



**UJI EFEKTIVITAS *CHLORHEXIDINE* SEBAGAI INHIBITOR
MMP-2 DAN MMP-9 DALAM PROSES DERMONEKROSIS
AKIBAT RACUN KUMBANG TOMCAT (*Paederus* sp.)**

SKRIPSI

Oleh

**Putri Erlinda Kusumaningarum
NIM 122010101098**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**UJI EFEKTIVITAS *CHLORHEXIDINE* SEBAGAI INHIBITOR
MMP-2 DAN MMP-9 DALAM PROSES DERMONEKROSIS
AKIBAT RACUN KUMBANG TOMCAT (*Paederus* sp.)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

Putri Erlinda Kusumaningarum
NIM 122010101098

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah memberikan nikmat hidup dan pemikiran sehingga saya bisa sampai ditahap ini dengan cara terbaik-Nya;
2. orang tua saya Ibu Lilis Ismulyani dan Bapak Paryoto yang telah membesarkan dan mendidik saya dengan penuh kasih sayang yang luar biasa dan doa yang tiada hentinya;
3. guru-guru dan semua orang yang telah memberikan pelajaran hidup dan mewarnai kehidupan saya;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
5. Bangsa dan Negara Indonesia.

MOTO

“... tetapi boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu teramat baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu buruk bagimu.

Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.”

(terjemahan QS: Al-Baqarah: 216*)

*) Departemen Agama RI. 2011. Mushaf Al-Quran Terjemahan. Jakarta: Al-Mizan

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Putri Erlinda Kusumaningarum

NIM : 122010101098

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah dengan judul “Uji Efektivitas *Chlorhexidine* sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan tersebut tidak benar.

Jember, 2 Desember 2015

Yang menyatakan,

Putri Erlinda Kusumaningarum

NIM 122010101098

SKRIPSI

**UJI EFEKTIVITAS *CHLORHEXIDINE* SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 DAN
MMP-9 DALAM PROSES DERMONEKROSIS AKIBAT
RACUN KUMBANG TOMCAT (*Paederus* sp.)**

Oleh

Putri Erlinda Kusumaningarum
NIM 122010101098

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama	: dr. Al Munawir, M.Kes, Ph.D
Dosen Pembimbing Anggota	: dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Efektivitas *Chlorhexidine* sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 2 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Penguji I,

Penguji II,

dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

NIP 19820309 200812 2 002

NIP 19821211 200812 2 002

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Al Munawir, M.Kes, Ph.D

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed

NIP 19690901 199903 1 003

NIP 19830405 200812 1 001

Mengesahkan

Dekan,

dr. Enny Suswati, M. Kes

NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Uji Efektivitas *Chlorhexidine* sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.); Putri Erlinda Kusumaningrum; 122010101098; 2015: 45 halaman; Fakultas Kedokteran; Universitas Jember.

Dermatitis paederus atau dermatitis linearis adalah dermonekrosis yang terjadi akibat adanya kontak dengan racun paederin yang berasal dari kumbang Tomcat (*Paederus* sp.). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Piel (2002), gen pada biosintesis racun paederin tidak berasal dari genom kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) melainkan lebih mendekati genom bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Menurut Asoodeh dan Musaabadi (2012), *Pseudomonas aeruginosa* mampu mensekresikan enzim matriks metaloproteinase ekstraseluler. MMP-2 dan MMP-9 merupakan MMP yang mendegradasi komponen matriks ekstraseluler kulit seperti kolagen, gelatin dan elastin. Oleh sebab itu, enzim MMP-2 dan MMP-9 diduga memiliki peran dalam dermonekrosis akibat racun paederin. Berdasarkan hal tersebut, peneliti memiliki hipotesis bahwa pemberian terapi dengan kemampuan antibakteri dan inhibitor MMP dapat dijadikan dasar terapi dermatitis. Hipotesis ini didukung oleh penelitian Fakoorziba *et al.* (2011) bahwa pengobatan dermatitis paederus menggunakan kortikosteroid menyebabkan waktu penyembuhan menjadi lebih lama jika dibandingkan dengan penggunaan anti pruritus dan *cleansing agent*. Belum diketahui efektivitas *chlorhexidine* sebagai terapi dermatitis paederus sehingga penulis mengajukan penelitian uji efektivitas *chlorhexidine* sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam proses dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus* sp.).

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental nyata (*true experimental design*) dengan *post test only control group design*. Kelompok penelitian

terdiri atas kontrol negatif (racun paederin 9,3 µg), perlakuan 1 (racun paederin 9,3 µg + *chlorhexidine* 0,012%), perlakuan 2 (racun paederin 9,3 µg + *chlorhexidine* 0,06%), perlakuan 3 (racun paederin 9,3 µg + *chlorhexidine* 0,3%), dan kelompok kontrol normal (aquades). Sampel penelitian ini adalah sumuran gel *acrylamide* 8%. Jumlah sampel yang digunakan sebesar 25 sampel dengan masing-masing kelompok penelitian dilakukan pengulangan sebanyak lima kali. Penelitian dilaksanakan menggunakan metode gelatin zimografi. Data yang diamati adalah *optical density* gel yang diukur menggunakan *software* imageJ. Analisis data yang digunakan adalah *One Way ANOVA*. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna apabila $p < 0,05$.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa terdapat aktivitas MMP-2 dan MMP-9 yang ditunjukkan dengan munculnya *band* pada kelompok kontrol negatif. *Band* muncul karena MMP-2 dan MMP-9 memiliki kemampuan mendegradasi gelatin. MMP-2 memiliki berat molekul sebesar 72 kDa dan MMP-9 memiliki berat molekul 92 kDa. Selain terbukti bahwa racun paederin mengandung MMP-2 dan MMP-9, dari penelitian ini juga diperoleh bahwa pada konsentrasi 0,012%; 0,06% dan 0,3%; *chlorhexidine* mampu menghambat aktivitas racun paederin dalam mendegradasi gelatin. Konsentrasi *chlorhexidine* yang digunakan ditentukan berdasarkan uji pendahuluan. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, sediaan *chlorhexidine* mengalami penggumpalan ketika proses elektroforesis, sehingga konsentrasi yang bisa digunakan pada penelitian ini adalah 0,12%; 0,06%; dan 0,3%. Hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan ($p < 0,05$), akan tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan. Daya hambat tertinggi pada aktivitas MMP-2 ditunjukkan oleh *chlorhexidine* 0,06% sebesar 21,6% sedangkan daya hambat tertinggi aktivitas MMP-9 paling tinggi ditunjukkan oleh *chlorhexidine* 0,3% sebesar 16,4%.

PRAKATA

Puji syukur atas ridho dan rahmat yang diberikan oleh Allah SWT. sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Efektivitas *Chlorhexidine* sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)”. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa masih banyak terdapat kekurangan dan kelemahan, baik dari teknik penulisan maupun materi.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran, Universitas Jember;
2. dr. Al Munawir, M.Kes, Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Anggota yang dengan penuh kesabaran meluangkan segenap waktunya untuk membimbing saya dan memberikan banyak masukan dalam penyelesaian skripsi ini;
3. dr. Ancah Caesarina Novi M., Ph.D dan dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed selaku Dosen Penguji skripsi yang telah memberikan banyak masukan dalam penyelesaian skripsi ini;
4. dr. Ali Santosa, Sp.PD dan dr. Nindya Shinta R, M.Ked selaku dosen-dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjalani pendidikan;
5. Ibu Lilis Ismulyani dan Bapak Paryoto yang selalu memberi semangat, kasih sayang, dan doa yang tiada hentinya, serta adik tercinta Putra Pamungkas Abdi Mulyono yang selalu memberikan dukungan dengan cara terbaiknya;
6. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah mendanai penelitian ini dalam Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) 2014 dan telah menyelenggarakan Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) 27 di Semarang;

7. rekan kerja penelitian Brenda Desy Romadhon, Bagus Indra Kusuma, dan Silvi Ahmada Chasya yang telah mencurahkan segenap pemikiran, tenaga, dan doa hingga selesainya penelitian ini;
8. semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan hingga terselesaikannya penulisan Karya Tulis Ilmiah ini.

Penulis menerima kritik dan saran dari semua pihak dalam hal penyempurnaan skripsi ini. Akhirnya, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi umat manusia.

Jember, Desember 2015

Penulis

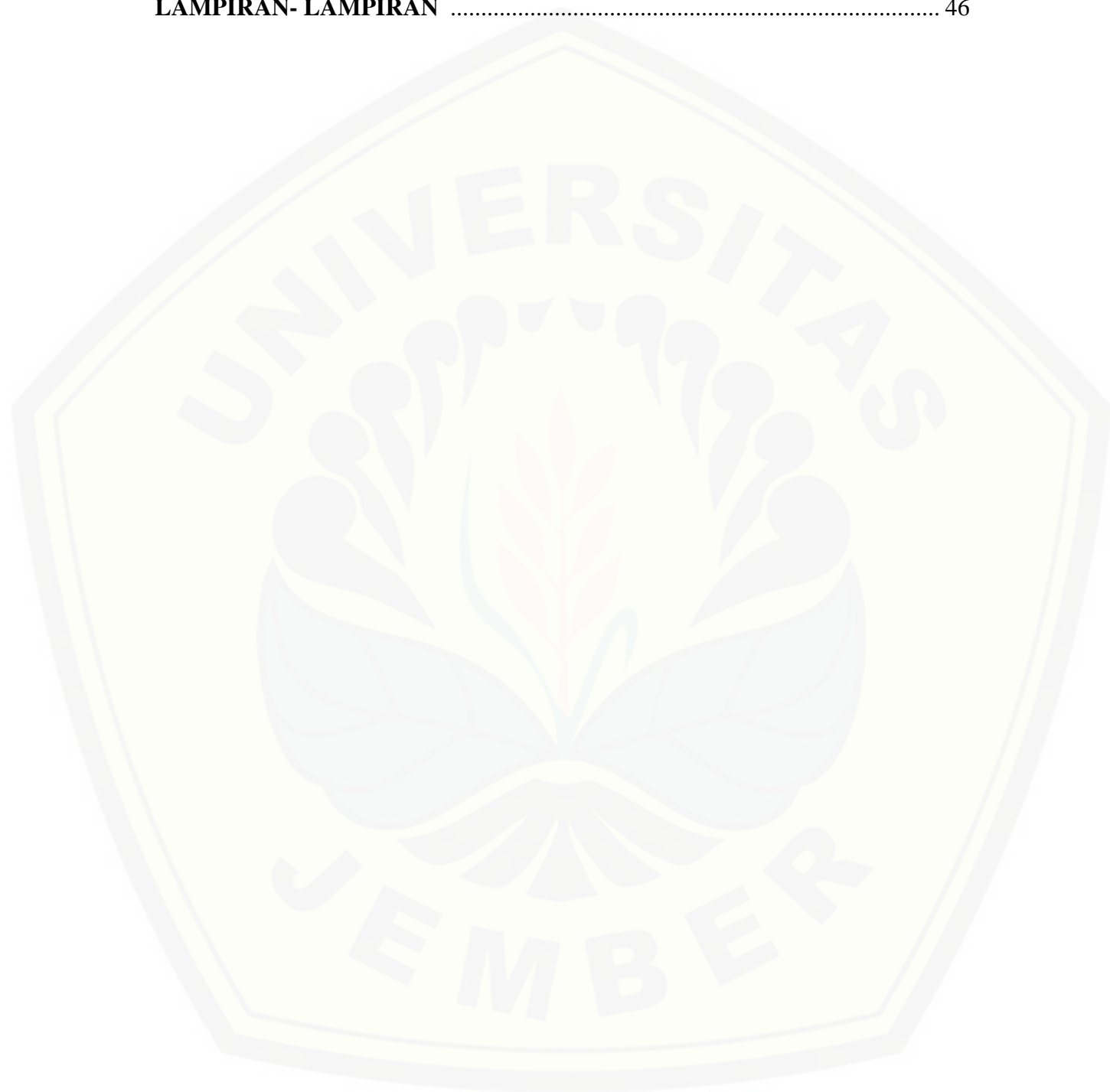
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kumbang Tomcat (<i>Paederus</i> sp.)	4
2.1.1 Klasifikasi	4
2.1.2 Morfologi	5

2.1.3 Habitat	6
2.1.4 Siklus Hidup.....	7
2.1.5 Peranan bagi Manusia	8
2.1.6 Cara Penularan pada Manusia.....	8
2.1.7 Racun Paederin.....	8
2.2 Dermatitis Paederus	9
2.2.1 Etiologi.....	10
2.2.2 Patogenesis.....	10
2.2.3 Gejala Klinis.....	10
2.2.4 Tata Laksana	12
2.3 Matriks Metaloproteinase (MMP).....	13
2.3.1 Pengelompokan MMP.....	13
2.3.2 MMP-2 dan MMP-9 dan Peranannya dalam Dermonekrosis.....	15
2.3.3 Deteksi MMP-2 dan MMP-9	15
2.4 Chlorhexidine	15
2.4.1 Farmakologi dan Biokimia.....	16
2.4.2 Chlorhexidine sebagai Inhibitor MMP	18
2.5 Kerangka Konseptual	19
2.8 Hipotesis	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Jenis Penelitian	21
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.3 Sampel Penelitian	21
3.4 Variabel Penelitian	22
3.4.1 Variabel Bebas	22
3.4.2 Variabel Terikat	22

3.4.3 Variabel Terkendali.....	22
3.5 Definisi Operasional	22
3.5.1 Dermonekrosis	22
3.5.2 Racun Paederin.....	23
3.5.3 <i>Chlorhexidine</i>	23
3.5.4 Densitas Gel	23
3.6 Rancangan Penelitian.....	23
3.7 Alat dan Bahan	25
3.7.1 Alat.....	25
3.7.2 Bahan	25
3.8 Prosedur Penelitian	25
3.8.1 Pencarian Kumbang Tomcat (<i>Paederus</i> sp.).....	25
3.8.2 Ekstraksi Racun Paederin	25
3.8.3 Pengukuran Kadar Protein	26
3.8.4 <i>Stock Solution Chlorhexidine</i>	27
3.8.5 Gelatin Zimografi.....	27
3.9 Analisis Data	28
3.10 Alur Penelitian.....	29
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Hasil Penelitian	30
4.1.1 Kadar Protein Tomcat	30
4.1.2 Uji Gelatin Zimografi	31
4.2 Analisis Data	35
4.3 Pembahasan	37
BAB 5. PENUTUP	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41

DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN- LAMPIRAN	46



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi MMP	14
Tabel 4.1 Analisis normalitas dan homogenitas	35
Tabel 4.2 <i>Slope and power for transformation</i>	35
Tabel 4.3 Hasil Uji <i>One Way ANOVA</i>	36
Tabel 4.4 Hasil uji LSD <i>relative optical density</i> MMP-2	36
Tabel 4.5 Hasil uji LSD <i>relative optical density</i> MMP-9	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Paederus</i> sp.	4
Gambar 2.2 <i>Paederus fuscipes</i> dewasa	6
Gambar 2.3 Dewasa (A), pupa (B), pre pupa (C), larva (D) <i>Paederus fuscipes</i>	7
Gambar 2.4 Struktur paederin	9
Gambar 2.5 Anak panah menunjukkan kasus dermatitis paederus. Wajah (daerah dagu) (A); Leher (B); Bahu kanan (C); Lengan kiri (D). Lesi linear terdapat pada A, B, dan D	11
Gambar 2.6 <i>Kissing lesions</i>	12
Gambar 2.7 Struktur kimia <i>chlorhexidine</i>	17
Gambar 2.8 Struktur kimia <i>chlorhexidine gluconate</i>	17
Gambar 2.9 Kerangka konseptual penelitian	19
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian	24
Gambar 3.2 Skema alur penelitian	29
Gambar 4.1 Kurva standar <i>Bovin Serum Albumin</i>	31
Gambar 4.2 <i>Band</i> MMP-2 dan MMP-9 hasil elektroforesis	32
Gambar 4.3 <i>Band</i> MMP-2 dan MMP-9 (<i>invert picture</i>)	32
Gambar 4.4 Rata-rata <i>relative optical density</i> MMP-2	33
Gambar 4.5 Rata-rata <i>relative optical density</i> MMP-9	34
Gambar 4.6 Rata-rata kemampuan hambat <i>chlorhexidine</i> terhadap aktivitas MMP-2 dan MMP-9	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. PROSEDUR ZIMOGRAFI (Kupai, 2011)	46
B. HASIL GELATIN ZIMOGRAFI	50
C. PLOT IMAGEJ	54
D. ANALISIS STATISTIK	59
E. DOKUMENTASI KEGIATAN	67
F. PERIZINAN KOMISI ETIK	74

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dermatitis paederus atau dermatitis linearis adalah dermonekrosis yang terjadi akibat adanya kontak dengan kumbang Tomcat (*Paederus* sp.). Racun paederin dari *Paederus* sp. menimbulkan gejala berupa rasa gatal, merah, dan melepuh seperti terbakar pada kulit. Selama ini, dokter menggunakan kortikosteroid topikal sebagai terapi dermatitis paederus (Kemenkes RI, 2012). Padahal, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fakoorziba *et al.* (2011), pengobatan dermatitis paederus menggunakan kortikosteroid tidak efektif karena menyebabkan waktu penyembuhan menjadi lebih lama jika dibandingkan dengan penggunaan anti pruritus dan *cleansing agent*.

Paederus sp. pertama kali menyerang manusia tahun 1901 (Taneja *et al.*, 2013) dan kemudian tahun 1916 di Afrika (Mbonile, 2011). Sejak itu, serangan *Paederus* sp. terjadi di berbagai belahan dunia termasuk Indonesia. Tercatat sebanyak 260 warga di Tulungagung pada tahun 2004, 50 warga Gresik pada tahun 2008, 20 warga Surabaya pada tahun 2008-2009, dan 160 warga Surabaya pada tahun 2012 yang mengalami gejala paederus dermatitis (Kompas, 2012). Selain data tersebut, pada tahun 2013 dilaporkan 500 warga di Pacitan juga mengalami serangan *Paederus* sp. (Seputar Indonesia Siang, 2015). Sebagian laporan lainnya tidak menyebutkan secara konkret jumlah penderita, seperti serangan *Paederus* sp. di Cilacap pada tahun 2014 (Seputar Indonesia Siang, 2015). Sehingga dapat disimpulkan jika jumlah kasus serangan *Paederus* sp. lebih banyak jika dibandingkan data kasus yang ada.

Paederus sp. tidak menyengat atau menggigit, namun tubuh kumbang *Paederus* sp. apabila tergecet akan mengeluarkan cairan yang mengandung racun paederin (Mammino, 2011). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Piel (2002), gen pada biosintesis racun paederin tidak berasal dari genom kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) melainkan lebih mendekati genom bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Singh an Ali

(2007) juga menyebutkan bahwa paederin tersebut dihasilkan dengan proses endosimbiosis antara *Paederus* sp. dengan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian lain menyebutkan bahwa penggunaan terapi tambahan berupa antibiotik memberikan waktu penyembuhan yang lebih singkat dari pada hanya menggunakan kortikosteroid dan antihistamin (Qadir *et al.*, 2006). Hal ini memperkuat bukti adanya simbiosis antara bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan racun paederin dari *Paederus* sp. untuk terjadinya dermatitis paederus.

Menurut Asoodeh dan Musaabadi (2012), *Pseudomonas aeruginosa* mampu mensekresikan enzim matriks metaloproteinase ekstraseluler. Enzim matriks metaloproteinase (MMP) merupakan enzim proteolitik yang memiliki kemampuan mendegradasi matriks ekstraseluler. MMP-2 dan MMP-9 merupakan MMP yang mendegradasi komponen matriks ekstraseluler kulit seperti kolagen, gelatin dan elastin. Oleh sebab itu, enzim MMP-2 dan MMP-9 diduga memiliki peran dalam dermonekrosis akibat racun paederin (Whittaker dan Ayscough, 2001; Setianto *et al.*, 2011).

Chlorhexidine merupakan salah satu antiseptik yang selama ini digunakan untuk mencegah infeksi nosokomial di rumah sakit. Pada konsentrasi 1% *chlorhexidine* mampu mengurangi mikroorganisme sebesar 100% pada peralatan rumah sakit (Setiawan, 2011). Penggunaan lain dari *chlorhexidine* adalah sebagai obat kumur dengan konsentrasi 2% yang mencegah kerusakan ikatan dentin dengan memanfaatkan kemampuannya sebagai inhibitor MMP-2, MMP-8 dan MMP-9 (Moon *et al.*, 2014). Berdasarkan latar belakang di atas, penulis tertarik untuk meneliti peran MMP-2 dan MMP-9 terhadap terjadinya dermonekrosis pada dermatitis paederus dan pengobatan yang sesuai untuk penyakit ini secara *in vitro* menggunakan metode gelatin zimografi. Hal ini tertuang dalam proposal penelitian berjudul “Uji Efektivitas *Chlorhexidine* sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)”.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah MMP-2 dan MMP-9 berperan dalam mekanisme dermonekrosis akibat racun *Paederus* sp.?
2. Apakah penggunaan *chlorhexidine* dapat mengurangi proses dermonekrosis akibat racun *Paederus* sp. secara *in vitro* dengan metode gelatin zimografi?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Membuktikan bahwa MMP-2 dan MMP-9 berperan dalam mekanisme dermonekrosis akibat racun *Paederus* sp.
2. Membuktikan bahwa penggunaan *chlorhexidine* mampu mengurangi dermonekrosis akibat racun *Paederus* sp. secara *in vitro* dengan metode gelatin zimografi.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

Dapat dijadikan landasan teori dan sebagai dasar pengembangan penelitian selanjutnya khususnya dalam bidang kesehatan dan toksikologi.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Dapat dijadikan bahan pertimbangan dokter dalam melakukan terapi dan pencegahan pada pasien dermatitis paederus.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)

2.1.1 Klasifikasi

Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) tersebar di seluruh dunia dan memiliki 622 spesies (Zargari *et al.*, 2003; Singh dan Ali, 2007). Klasifikasi taksonomi *Paederus* sp. adalah sebagai berikut.

Phylum : Arthropoda
Kelas : Hexapoda
Ordo : Coleoptera
Famili : Staphylinidae
Genus : *Paederus*
Spesies : *Paederus littotarius*, *Paederus fuscipes*
(Kemenkes RI, 2012).



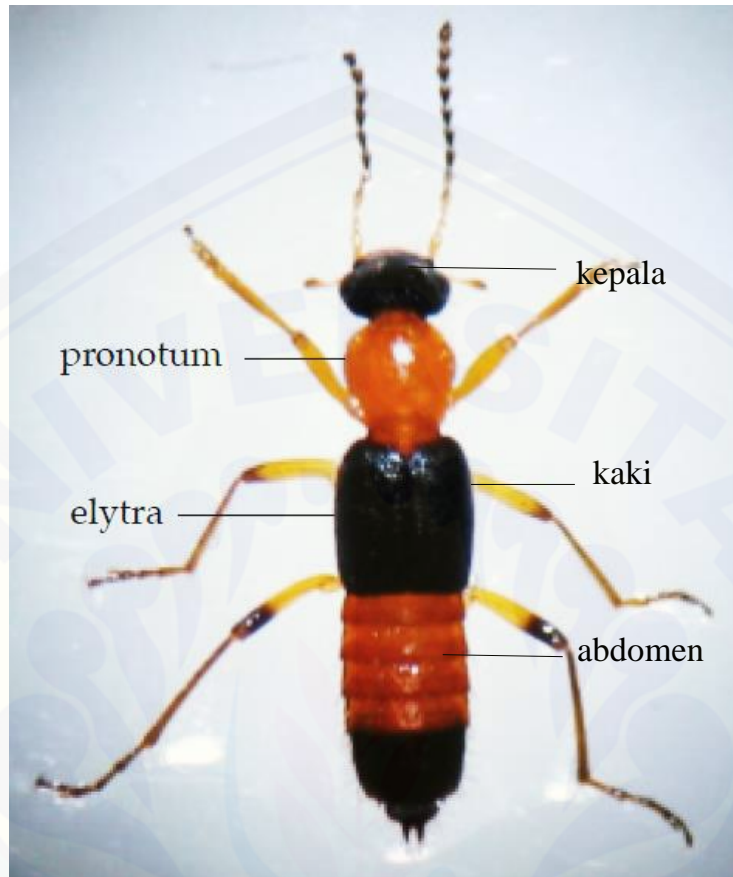
Gambar 2.1 *Paederus* sp. (Sumber: Kemenkes RI, 2012)

Di Indonesia, spesies yang paling banyak menyebabkan dermatitis adalah *Paederus peregrinus* (Singh dan Ali, 2007). Kumbang ini dikenal dengan nama semut semai. *Paederus* sp. disebut juga Tomcat karena bentuk badannya mirip pesawat tempur Tomcat (F-14). Nama lain yang dimiliki oleh *Paederus* sp. adalah *Rove Beetle* atau kumbang penjelajah/ pengelana karena aktif berjalan-jalan. Selain itu di setiap wilayah di Indonesia, kumbang *Paederus* sp. ini memiliki nama lokal tersendiri (Kemenkes RI, 2012).

2.1.2 Morfologi

Morfologi *Paederus* sp. dewasa berukuran panjang antara 7-10 mm dan lebar antara 0,5 sampai 1 mm. Tubuh berbentuk memanjang, terbagi menjadi tiga bagian yaitu kepala, toraks, dan tiga ruas abdomen. *Paederus* sp. memiliki kepala berwarna hitam, pronotum dan abdomen segmen III hingga VI berwarna *orange*, dan segmen abdomen ke VII dan VIII berwarna hitam. Sedangkan bagian lainnya merupakan gabungan antara warna *orange* dan hitam (Heo *et al.*, 2013).

Paederus sp. memiliki kaki yang terdiri atas tiga pasang dan tidak berkuku. *Paederus* sp. merupakan kumbang berkaki panjang dan merupakan tipe serangga pejalan cepat. Sayap *Paederus* sp. tidak sempurna, terdiri dari dua pasang, tetapi tidak menutupi seluruh abdomen. Sayap depan mengeras disebut elitera berwarna biru metalik, dan berfungsi sebagai perisai, sedangkan sayap yang kedua membranous atau bening digunakan untuk terbang pada kondisi tertentu. Bila terancam maka *Paederus* sp. akan menaikkan bagian perut sehingga nampak seperti kalajengking (Singh dan Ali, 2007; Kemenkes RI 2012; Heo *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 *Paederus fuscipes* dewasa (Sumber: Heo, *et al.*, 2013)

2.1.3 Habitat

Keberadaan *Paederus* sp. umum tersebar di berbagai belahan dunia, khususnya banyak ditemukan di daerah tropis. Kumbang *Paederus* sp. pernah dilaporkan menimbulkan wabah dermatitis di Australia, Malaysia, Srilangka, Nigeria, Kenya, Iran, Afrika Tengah, Uganda, Argentina, Brazil, Perancis, Venezuela, Ecuador dan India (Kemenkes RI, 2012).

Paederus sp. berkembang biak di habitat yang lembab seperti daun busuk basah dan tanah serta banyak ditemukan pada lahan padi (Khan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2013).

2.1.4 Siklus Hidup

Daur hidup dari telur - imago selama 18 hari. Stadium telur selama 4 hari, larva selama 9,2 hari, prepupa selama 1 hari, dan pupa hari 3,8 hari. Lama hidup serangga betina adalah 113,8 hari dan serangga jantan adalah 109,2 hari. *Paederus* sp. memiliki kemampuan bertelur 106 butir per betina dengan masa inkubasi telur selama 4 hari.

Populasi *Paederus* sp. akan meningkat pesat pada akhir bulan musim hujan (bulan Maret dan April) dan kemudian dengan cepat berkurang dengan timbulnya cuaca kering pada bulan-bulan berikutnya (Qadir *et al.*, 2006; Kemenkes RI, 2012).



Gambar 2.3 Dewasa (A), pupa (B), pre pupa (C), larva (D) *Paederus fuscipes* (Sumber: Nikbakhtzadeh dan Tirgasi, 2008)

Sepanjang hidupnya, 90% *Paederus* sp. betina mampu melakukan endosimbiosis dengan *Pseudomonas auregenosa* untuk menghasilkan paederin. *Paederus* sp. betina inilah yang mampu mentransfer *trait* (sifat) tersebut kepada keturunannya (Piel *et al.*, 2004).

2.1.5 Peranan bagi Manusia

Kumbang ini berperan sebagai predator aktif pada beberapa serangga pengganggu tanaman padi, seperti wereng batang coklat, wereng punggung putih, wereng zigzag, wereng hijau dan hama kedelai. Sehingga sebenarnya memiliki nilai guna positif (Kemenkes RI, 2012).

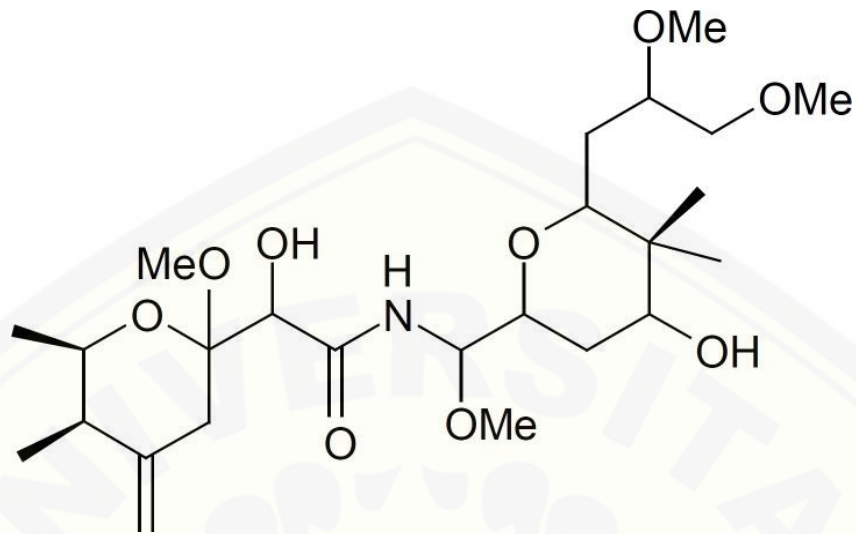
2.1.6 Cara Penularan pada Manusia

Paederus sp. merupakan kumbang yang memiliki sifat nokturnal dan memiliki ketertarikan pada cahaya. Ketertarikan pada cahaya tersebut yang akan menyebabkan *Paederus* sp. dapat berada di lingkungan yang dekat dengan manusia. Akibat ketidakhati-hatian manusia, kumbang ini dapat melakukan kontak dengan manusia (Singh dan Ali, 2007). Beberapa hal yang bisa meningkatkan risiko kontak antara *Paederus* sp. dan manusia adalah kondisi padat penduduk, jendela yang dibiarkan terbuka pada malam hari, dan tidur di lantai (Taneja *et al.*, 2013).

Kondisi-kondisi tersebut menyebabkan *Paederus* sp. mampu kontak dengan manusia secara tidak sengaja. Apabila dalam proses kontak tersebut *Paederus* sp. tidak sengaja tertekan atau tergencet akan menyebabkan pecahnya hemolimfe sehingga mengeluarkan racun paederin dan akhirnya menyebabkan dermatitis kontak iritan yang dikenal dengan dermatitis paederus (Piel *et al.*, 2004; Mittal *et al.*, 2013; Taneja *et al.*, 2013).

2.1.7 Racun Paederin

Paederus sp. atau yang dikenal dengan kumbang Tomcat mampu menghasilkan paederin. Paederin yang dihasilkan tidak sepenuhnya berasal dari tubuh *Paederus* sp. akan tetapi menurut Piel *et al.* (2004), paederin dihasilkan karena adanya endosimbiosis antara *Paederus* sp. dan *Pseudomonas aureginosa*. Hal tersebut dibuktikan dengan ditemukannya genom 16S ribosomal DNA yang mendekati genom *Pseudomonas aureginosa* pada racun paederin melalui proses.



Gambar 2.4 Struktur paederin (Sumber: Ebrahimzahed *et al.*, 2014)

Paederin adalah amida dengan dua cincin tetrahidropiran yang menyumbang sekitar 0,025% dari berat *Paederus* sp. Struktur kimia paederin didominasi oleh unsur asam yang sangat banyak dengan rumus kimia sebagai $C_{24}H_{45}O_9N$ dan diketahui bahwa paederin lebih poten dibandingkan racun *black widow spider* (Muller dan Durden, dalam Heo *et al.*, 2013; Ebrahimzahed *et al.*, 2014) dan menurut Nasir *et al.* (2015), racun paederin juga lebih poten jika dibandingkan dengan racun Cobra. Dominasi unsur asam pada racun paederin memiliki sifat korosif sehingga mampu mengiritasi kulit dengan reaksi yang muncul antara 24-48 jam (Singh dan Ali, 2007).

2.2 Dermatitis Paederus

Dermatitis paederus atau dermatitis linearis juga dikenal dengan dermatitis kumbang meledak “*blister beetle*” adalah iritasi kulit akut yang disebabkan adanya kontak kulit dengan racun yang ada pada *Paederus* sp., yaitu racun paederin. Racun paederin dikeluarkan dari tubuh kumbang Tomcat bukan melalui sengatan ataupun gigitan, melainkan karena tubuh *Paederus* sp. tergencet atau tidak sengaja ditekan (Singh dan Ali, 2007).

2.2.1 Etiologi

Penyebab dermatitis paederus adalah *Paederus* sp., dan jumlahnya di dunia mencapai 622 spesies (Singh dan Ali, 2007). Menurut Singh dan Ali (2007) spesies yang paling banyak menyebabkan dermatitis adalah *Paederus peregrinus*, sedangkan yang paling banyak ditemukan di Indonesia adalah *Paederus thalamus* dan *Paederus fuscipes* (Hadi, 2012).

2.2.2 Patogenesis

Dermonekrosis yang disebabkan oleh *Paederus* sp. timbul akibat racun paederin. Namun, mekanisme yang menyebabkan reaksi iritasi tersebut belum sepenuhnya diketahui (Ahmed *et al.*, 2013), diduga disebabkan oleh tingkat keasaman yang tinggi dari racun paederin serta kandungan Matriks Metaloproteinase (MMP). MMP tersebut dihasilkan oleh *Pseudomonas aurigenosa* yang berendosimbiosis dengan *Paederus* sp. (Piel *et al.*, 2004; Asoodeh dan Musaabadi, 2012).

2.2.3 Gejala Klinis

Dermatitis paederus bisa terjadi pada semua jenis kelamin, usia, ras ataupun sosial ekonomi, dipengaruhi oleh kegiatan yang dilakukan serta habitat dari *Paederus* sp. Bagian tubuh yang mengalami dermatitis paederus lebih banyak pada bagian tubuh yang terbuka. Wajah merupakan tempat predileksi terjadinya dermatitis (Mittal *et al.*, 2013), sedangkan menurut Singh *et al.* (2013) predileksi dermatitis paederus adalah pada bagian leher. Selain itu dermatitis paederus juga bisa mengenai leher, tangan, kaki, serta tubuh manusia (Mittal *et al.*, 2013).

Gejala klinis dermatitis paederus bisa muncul dalam 24 jam setelah kontak dengan paederin (You *et al.*, 2003). Gejala yang paling banyak ditemukan adalah kemerahan, bengkak, dan gatal. Pada sebagian kasus juga dijumpai rasa nyeri yang hebat, terbakar atau rasa yang sangat panas, keluhan pada mata, pembesaran limfe, gejala konstitusional lainnya, atau bahkan tanpa keluhan sama sekali (Taneja *et al.*, 2013).



Gambar 2.5 Anak panah menunjukkan kasus dermatitis paederus. Wajah (daerah dagu) (A); Leher (B); Bahu kanan (C); Lengan kiri (D). Lesi linear terdapat pada A, B, dan D (Sumber: Heo, *et al.*, 2013)

Bentuk lesi yang paling banyak dijumpai adalah bentuk linear, vesikel, bulosa, atau pustul dengan dasar eritematosa (Qadir *et al.*, 2006). Bentuk lesi lainnya berupa *kissing lesion* (Taneja *et al.*, 2013). Lesi yang muncul tersebut harus dibedakan dengan lesi yang muncul akibat herpes simplex, herpes zoster, luka bakar, alergi akut

atau dermatitis kontak iritan lainnya. Karakteristik berupa lesi linear, predileksi pada area tubuh yang terbuka, *kissing lesions*, dan juga data epidemiologi bisa membantu untuk menegakkan diagnosis dermatitis paederus (Singh dan Ali, 2007).



Gambar 2.6 *Kissing lesions* (Sumber: Taneja *et al.*, 2013)

2.2.4 Tata Laksana

Berdasarkan Panduan Pencegahan dan Pengendalian kumbang *Paederus* sp. Kemenkes RI (2012), di Indonesia tata laksana yang dianjurkan adalah dengan membersihkan lokasi kontak dengan *Paederus* sp. menggunakan air yang mengalir segera setelah terjadi kontak. Pengobatan selanjutnya bisa menggunakan kortikosteroid topikal dan apabila timbul lesi seperti luka bakar dilakukan pengompresan menggunakan antiseptik. Pengobatan lain yang bisa dilakukan adalah pengobatan secara simptomatik menggunakan antihistamin dan analgesik oral (Kemenkes RI, 2012).

Akan tetapi berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fakoorziba *et al.* (2011), penggunaan kortikosteroid topikal tidak lebih efektif untuk mencegah efek toksik dari paederin dibandingkan dengan penggunaan antipruritus dan *cleansing agent*. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Qadir *et al.* (2004), diketahui bahwa terapi menggunakan kombinasi topikal kortikosteroid dan antibiotik lokal memiliki respons penyembuhan yang lebih baik dibanding terapi dengan kortikosteroid topikal saja.

2.3 Matriks Metaloproteinase (MMP)

2.3.1 Pengelompokan MMP

Matriks Metaloproteinase (MMP) adalah kelompok kalsium dependen yang mengandung *zinc* endopeptidase yang secara struktur dan fungsi berhubungan. MMP disekresikan dalam bentuk laten yang disebut sebagai *zymogen* atau pro-MMP. MMP dalam bentuk laten perlu melewati beberapa langkah sebelum mampu mendegradasi matriks ekstraseluler (Bode dan Maskos, 2003). Pro-MMP disekresikan oleh jaringan ikat dan *sel pro-inflammatory*. Pro-MMP dapat diaktivasi oleh ion *calcium* (Ca^{2+}) dan *zinc* (Zn^{2+}) yang memiliki peran sebagai kofaktor yang berikatan pada koenzim dan berperan sebagai katalisator pada pH 4,5 (Moon *et al.*, 2010).

Pada keadaan normal, MMP memiliki peranan dalam proses *remodeling* jaringan saat perkembangan embrio, migrasi sel, penyembuhan luka, dan pertumbuhan gigi. Aktivitas MMP juga dipengaruhi oleh beberapa inhibitor yaitu *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). Apabila terjadi kelebihan ekspresi MMP akan menghasilkan ketidakseimbangan antara aktivitas MMP dan TIMPs. Ketidakseimbangan tersebut dapat menyebabkan timbulnya berbagai kondisi patologis seperti *remathoid*, *osteoarthritis*, kanker, dan penyakit kardiovaskular (Beurden dan Hoff, 2005).

Terdapat 26 jenis MMP dalam tubuh manusia yang dikelompokkan menjadi enam kelompok (Tabel 2.1). Berdasarkan karakteristik yang dimiliki, masing-masing MMP memiliki urutan yang spesifik dengan beberapa kesamaan.

Tabel 2.1 Klasifikasi MMP

No	Subgrup	MMP	Enzim
1	<i>Collagenases</i>	MMP-1	<i>Collagenases-1</i>
		MMP-8	<i>Collagenases-2</i>
		MMP-13	<i>Collagenases-3</i>
		MMP-18	<i>Collagenase-4</i>
2	<i>Gelatinases</i>	MMP-2	<i>Gelatinases A</i>
		MMP-9	<i>Gelatinases B</i>
3	<i>Stromelysins</i>	MMP-3	<i>Stromelysins-1</i>
		MMP-10	<i>Stromelysins-2</i>
		MMP-11	<i>Stromelysins-3</i>
		MMP-27	<i>Homology to stromelysin-2 (51,6%)</i>
4	<i>Matrilysins</i>	MMP-7	<i>Matrilysins-1 (PUMP)</i>
		MMP-26	<i>Matrilysins-2</i>
5	MT-MMP (<i>membrane type</i>)	MMP-14	MT1-MMP
		MMP-15	MT2-MMP
		MMP-16	MT3-MMP
		MMP-17	MT4-MMP
		MMP-24	MT5-MMP
		MMP-25	MT6-MMP
6	<i>Others</i>	MMP-12	<i>Macrophage Metalloelastase</i>
		MMP-19	RASI 1
		MMP-20	<i>Enamelysin</i>
		MMP-21	<i>MMP identified on chromosome 1</i>
		MMP-22	<i>MMP identified on chromosome 1</i>
		MMP-23	CMMP
		MMP-28	<i>Epilysin</i>
		MMP-29	<i>Unnamed</i>

Sumber: Beurden dan Hoff, 2005; Verma dan Hansch, 2007

2.3.2 MMP-2 dan MMP-9 dan Peranannya dalam Dermonekrosis

Kelompok gelatinase terdiri atas MMP-2 dan MMP-9 yang mampu mencerna gelatin hasil perubahan bentuk dari kolagen. Substrat yang terkandung dalam MMP-2 adalah gelatin, kolagen tipe I, II, III, IV, VII, dan X, sedangkan MMP-9 mengandung gelatin, kolagen tipe IV dan V (Beurden dan Hoff, 2005). Pernyataan serupa juga disampaikan oleh Verma dan Hansch (2007) dan Pereira *et al.* (2014) bahwa MMP-2 dan MMP-9 mampu mendegradasi kolagen tipe IV pada membran basalis dan gelatin pada kulit.

Piel (2002) menemukan bahwa racun paderin berasal dari simbiosis antara kumbang *Paederus sp.* dengan bakteri gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan penelitian Asoodeh dan Musaabadi (2012), *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan enzim proteolitik yaitu matriks metalloproteinase. Oleh karena itu, enzim ini diduga memiliki andil dalam proses dermonekrosis pada dermatitis paederus.

2.3.3 Deteksi MMP-2 dan MMP-9

MMP dapat dideteksi menggunakan beberapa teknik. Teknik yang paling banyak digunakan adalah zimografi. Zimografi mengidentifikasi MMP berdasarkan proses degenerasi substrat spesifik dan berat molekul dari MMP. Penggunaan teknik ini dapat mendeteksi MMP baik dalam posisi aktif maupun laten.

Teknik yang digunakan untuk mendeteksi gelatinase, MMP-2 dan MMP-9 adalah gelatin zimografi. Teknik ini efektif karena pada level 10 pg MMP-2 sudah bisa dideteksi. Meskipun MMP-1, MMP-8, dan MMP-13 juga mampu melisiskan substrat gelatin, akan tetapi kemampuan tersebut sangat lemah karena gelatin bukan substrat spesial yang dimiliki (Beurden dan Hoff, 2005).

2.4 Chlorhexidine

Chlorhexidine sejak awal digunakan di rumah sakit di berbagai negara sebagai antiseptik. *Chlorhexidine* efektif sebagai disinfektan pada kulit sebelum operasi, cuci tangan serta sebagai disinfektan alat-alat kedokteran, terutama alat-alat operasi.

Penggunaan lain dari *chlorhexidine* adalah sebagai obat kumur yang berfungsi sebagai anti gingivitis dan juga mengurangi plak pada gigi (Carihlo *et al.*, 2007).

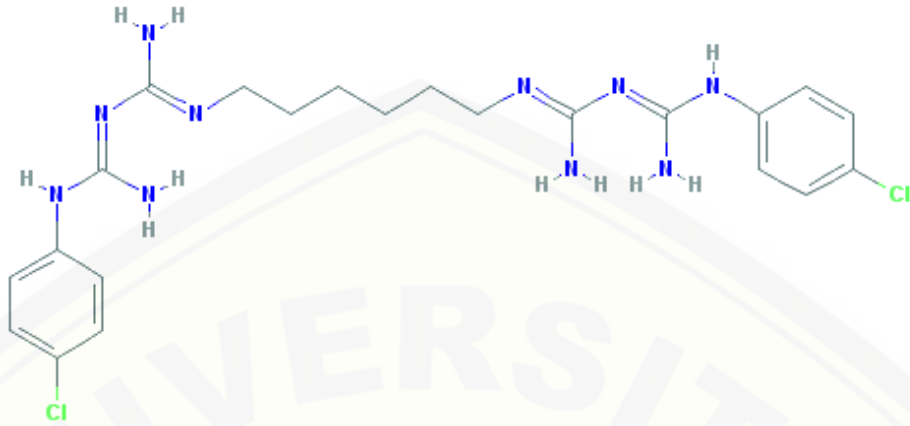
2.4.1 Farmakologi dan Biokimia

Chlorhexidine adalah biguanida kationik yang memiliki rumus molekul $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ dan berat molekul 505.4466 g/mol. Bentuk *chlorhexidine* yang banyak digunakan adalah *chlorhexidine gluconate*, bentuk garam dari *chlorhexidine* dengan rumus struktur $C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$ dan memiliki berat molekul 897.75716 g/mol. (Pubchem, 2015).

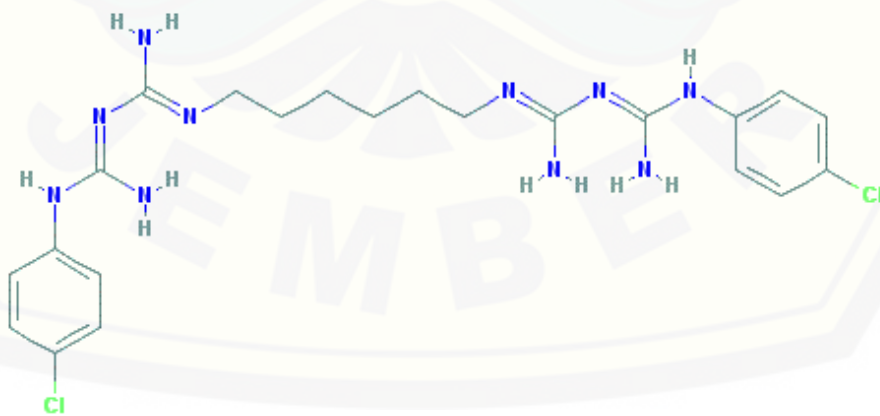
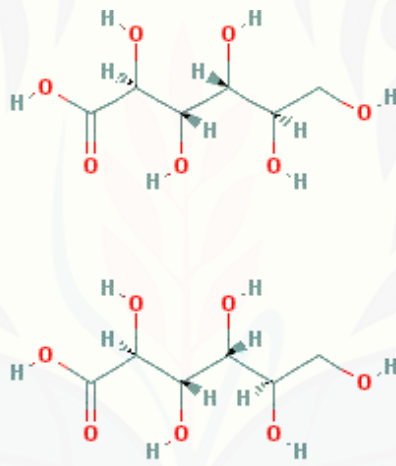
Chlorhexidine gluconate yang larut dalam air digunakan sebagai formulasi berbahan dasar air sebagai antiseptik serta memiliki sifat basa. Zat ini aktif pada pH 5,5-7,0. Kerja *chlorhexidine gluconate* lebih lambat dari alkohol akan tetapi memiliki aktivitas residual sehingga menghasilkan efek bakterisidal yang setara dengan alkohol. *Chlorhexidine gluconate* resisten terhadap inhibisi oleh darah dan materi organik (Katzung, 2010).

Diketahui bahwa *chlorhexidine* berspektrum luas dan mampu menghilangkan bakteri baik gram positif maupun negatif serta efektif terhadap bakteri aerob dan anaerob. Selain itu sebagai desinfektan, *chlorhexidine* sangat efektif untuk menghilangkan *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Cholerasiesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium bovis*, *Trichophyton mentagrophyte* dan *trichophyton megnini* (California Departement of Pesticide Regulation, 2007).

Chlorhexidine bermuatan positif dan bereaksi dengan permukaan sel mikroba yang bermuatan negatif, sehingga menghancurkan integritas membran sel. Selanjutnya, *chlorhexidine* menembus ke dalam sel dan menyebabkan kebocoran komponen intraseluler sehingga menyebabkan kematian sel (Pubchem, 2015).



Gambar 2.7 Struktur kimia *chlorhexidine* (Sumber: Pubchem, 2015)



Gambar 2.8 Struktur kimia *chlorhexidine gluconate* (Sumber: Pubchem, 2015)

Chlorhexidine memiliki ikatan yang kuat dengan kulit dan mukosa sehingga menyebabkan absorpsi setelah penggunaan oral dan topikal sangat sedikit. Oleh karena itu, tidak ada residu yang ditemukan di darah setelah penggunaan *chlorhexidine* 5% sebagai antiseptik sebelum operasi secara rutin selama enam bulan (EMEA, 1996). Sifat iritasi yang ditimbulkan oleh *chlorhexidine* juga sangat rendah. Akan tetapi *chlorhexidine* tidak boleh digunakan pada pembedahan telinga tengah karena menyebabkan tuli sensorineural serta pembedahan saraf (Katzung, 2010).

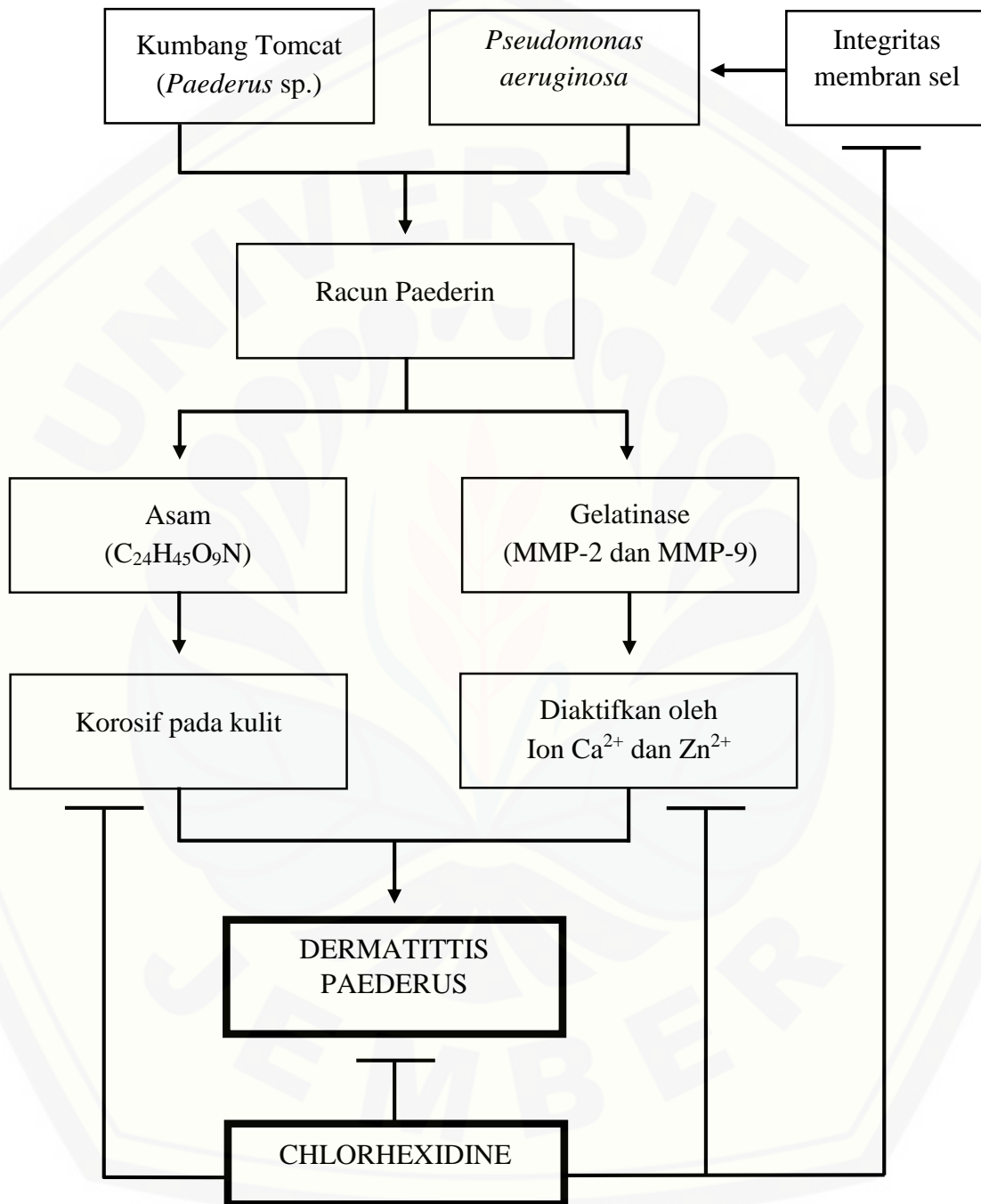
2.4.2 *Chlorhexidine* sebagai Inhibitor MMP

Selain memiliki sifat antibakteri, berdasarkan Gendron *et al.* (1999), *chlorhexidine* mampu menghambat aktivitas dari MMP-2, MMP-8, dan MMP-9. *Chlorhexidine* mampu berperan sebagai inhibitor MMP dengan cara berikatan dengan *calcium* (Ca^{2+}) dan *zinc* (Zn^{2+}) yang dibutuhkan dalam proses proteolisis (Moon, 2010; Boushell, 2011).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Gendron *et al.* (1999) secara *in vitro* dengan metode zimografi diketahui bahwa pada konsentrasi 0,03% *chlorhexidine* mampu menghambat aktivitas MMP-2 dan MMP-9 secara menyeluruh. Konsentrasi minimal yang mampu menghambat aktivitas MMP-9 adalah 0,002% sedangkan MMP-2 lebih sensitif terhadap *chlorhexidine* dan terjadi penghambatan pada konsentrasi 0,0001% (Gendron *et al.*, 1999).




Penelitian lain yang dilakukan oleh Hashimoto *et al.* (2005) menyebutkan bahwa *chlorhexidine* dengan konsentrasi 0,2% dan 2% mampu mengurangi aktivitas MMP pada dentin dengan penilaian aktivitas MMP menggunakan *fluorescent*. Hal serupa juga disampaikan oleh Montagner *et al.* (2014) bahwa pada konsentrasi 0,2% *chlorhexidine* mampu berperan sebagai inhibitor MMP.

2.5 Kerangka Konseptual



Gambar 2.9 Kerangka konseptual penelitian

Keterangan:

-  : Permasalahan
 : Variabel yang diteliti
 : Supresi

Endosimbiosis terjadi antara *Paederus* sp. dan *Pseudomonas aeruginosa*. Endosimbiosis tersebut menghasilkan racun paederin yang bersifat asam sehingga bersifat korosif terhadap kulit. Selain itu racun paederin diduga mengandung MMP-2 dan MMP-9 yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa*. MMP-2 dan MMP-9 yang disekresikan dalam bentuk pro-MMP akan aktif jika terjadi proses aktivasi dengan adanya ikatan Ca^{2+} dan Zn^{2+} . Degradasi gelatin dan sifat korosif paederin adalah penyebab terjadinya dermatitis paederus.

Chlorhexidine memiliki spektrum yang luas dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghancurkan integritas membran sel kemudian menembus ke dalam sel dan menyebabkan kebocoran komponen intraseluler sehingga menyebabkan kematian sel. Selain itu *chlorhexidine* memiliki kemampuan sebagai inhibitor MMP dengan cara mencegah ikatan antara Ca^{2+} dan Zn^{2+} . *Chlorhexidine* juga memiliki kemampuan ikatan yang kuat dengan kulit. Sifat basa pada *chlorhexidine* akan mampu menetralkan sifat asam dari paederin. Mekanisme tersebut yang diduga menyebabkan *chlorhexidine* mampu menghambat proses dermonekrosis akibat kumbang Tomcat (*Paederus* sp.).

2.6 Hipotesis

Berdasarkan beberapa teori dan tinjauan pustaka, hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. MMP-2 dan MMP-9 berperan dalam mekanisme dermonekrosis akibat racun *Paederus* sp.
2. Penggunaan *chlorhexidine* mampu mengurangi dermonekrosis akibat racun *Paederus* sp. secara *in vitro* dengan metode gelatin zimografi.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental nyata (*true experimental design*) secara *in vitro* dengan rancangan *post test only control group design*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober sampai November 2015. Penelitian yang terdiri atas ekstraksi racun paederin, pengukuran kadar protein, dan uji zimografi dilaksanakan di Laboratorium Biologi molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah sumuran gel *acrylamide* yang dianalogikan sebagai kulit manusia (Kang *et al.*, 2013). Sediaan yang dipilih adalah gel *acrylamide* 8% karena sediaan tersebut merupakan sediaan yang biasa digunakan untuk gelatin zimografi dan dapat menghasilkan visualisasi aktivitas MMP dengan berat molekul ~200 kDa dengan baik (Toth dan Fridman, 2013).

Perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus Federer sebagai berikut.

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \text{ dibulatkan } 5$$

Keterangan:

t : jumlah kelompok

r : jumlah sampel dalam kelompok

Menurut perhitungan menggunakan rumus Federer, besar sampel yang dibutuhkan minimal adalah 5 sumuran gel untuk masing-masing kelompok. Terdapat 5 kelompok penelitian yang terdiri atas kelompok kontrol normal, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. Masing-masing kelompok penelitian membutuhkan 5 sumuran sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 25 sumuran.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah:

1. pemberian racun kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dan
2. konsentrasi *chlorhexidine*.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah *optical density* gel yang diukur menggunakan *software* ImageJ.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah gel *polyacrilamide* dan zimografi.

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Dermonekrosis

Dermonekrosis adalah nekrosis pada kulit yang disebabkan oleh racun paederin. Penampakan pada kulit menunjukkan kerusakan pada kolagen dan gelatin

yang menjadi komponen penyusun kulit. Proses dermonekrosis pada penelitian ini dianalogikan dengan proses degradasi gelatin pada proses gelatin zimografi.

3.5.2 Racun Paederin

Racun paederin diperoleh dengan cara ekstraksi *whole body* kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) menggunakan metode homogenisasi secara makros lima ekor kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) yang dilarutkan dalam 1 mL aquades.

3.5.3 Chlorhexidine

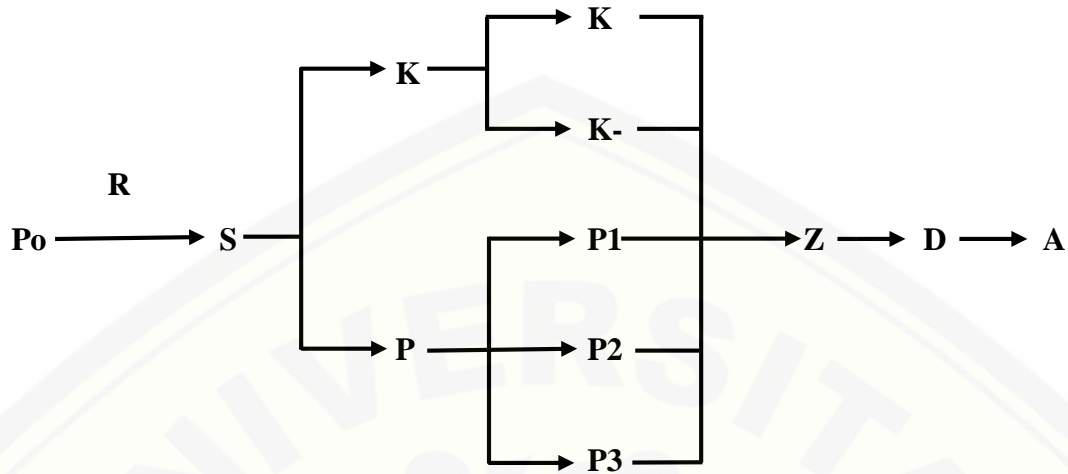
Chlorhexidine yang digunakan dalam penelitian ini adalah *chlorhexidine gluconate* 4% dan diperoleh secara bebas di apotek. Proses pengenceran dilakukan untuk menghasilkan konsentrasi 0,012%; 0,06%; dan 0,3%.

3.5.4 Densitas gel

Densitas gel merupakan ketebalan *band* atau pita yang tampak pada gel *acrylamide* 8% yang mengandung gelatin setelah uji zimografi. Densitas diukur menggunakan densitometer yang terdapat dalam *software* ImageJ. Data yang dihasilkan berupa data semikuantitatif berupa perbandingan *peak area* dari *band* setiap kelompok yang dinyatakan dalam *relative optical density*.

3.6 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *post only control group design*. Penelitian ini membagi sampel menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Jumlah kelompok perlakuan sebanyak tiga perlakuan dengan pengulangan sebanyak lima kali pada tiap perlakuan. Rancangan penelitian dapat dilihat dalam skema berikut.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

- Po** : Populasi
- R** : Randomisasi
- S** : Sampel racun paederin
- K** : Kelompok kontrol
- P** : Kelompok perlakuan
- K** : Kelompok kontrol normal tanpa pemberian racun paederin
- K-** : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian racun paederin 9,3 µg tanpa *chlorhexidine*
- P1** : Kelompok perlakuan dengan pemberian racun paederin 9,3 µg dan *chlorhexidine* 0,012%
- P2** : Kelompok perlakuan dengan pemberian racun paederin 9,3 µg dan *chlorhexidine* 0,06%
- P3** : Kelompok perlakuan dengan pemberian racun paederin 9,3 µg dan *chlorhexidine* 0,3%
- Z** : uji zimografi
- D** : data densitas gel
- A** : analisis data

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Hand scoon, botol plastik, gelas ukur, *beaker glass*, *microtube*, mikropipet *white tip*, mikropipet *yellow tip*, mikropipet *blue tip*, neraca Ohaus, mortar, vortex, *sentrifuge*, inkubator, *shaker*, perangkat elektroforesis, wadah plastik, *ELISA reader*, microsoft excel, dan *software* ImageJ.

3.7.2 Bahan

Kumbang Tomcat (*Paederus sp.*), es batu, aquades, *chlorhexidine gluconate 4%*, *running gel*, *stacking gel*, gelatin, *running buffer*, Triton X-100, *development buffer*, *Comassie Brilliant Blue*, methanol.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pencarian Kumbang Tomcat (*Paederus sp.*)

Pencarian kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) dilakukan dengan penangkapan secara manual pada beberapa lokasi persawahan di daerah Antirogo Kabupaten Jember. Penangkapan menggunakan *general precaution* berupa *handscoon*. Identifikasi kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) dilakukan berdasarkan ciri fisik yang dinyatakan oleh Heo *et al.* (2013). *Paederus sp.* disimpan dalam botol plastik dan dimasukkan ke dalam refigator dengan suhu -20°C .

3.8.2 Ekstraksi Racun Paederin

Metode ekstraksi yang dilakukan oleh You *et al.* (2003) dimodifikasi dengan cara tubuh *Paederus sp.* dihancurkan menggunakan mortar. Lima ekor *Paederus sp.* dilarutkan dalam 1 mL aquades. Hasil suspensi tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 300 detik. Supernatan yang berhasil dipisahkan dengan proses *sentrifuge* kemudian dilakukan pengukuran kadar protein menggunakan uji protein Bradford. Standar yang digunakan dalam uji protein adalah *Bovin Serum*

Albumin (BSA) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sampel yang diuji terstandardisasi berdasarkan kadar protein racun *Paederus* sp. dengan konsentrasi dalam satuan 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.8.3 Pengukuran Kadar Protein

Pengukuran kadar protein menggunakan uji protein Bradford. Standar yang digunakan dalam uji protein adalah *Bovin Serum Albumin* (BSA) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Ernst dan Zor, 2010). Tujuan dari pengukuran kadar protein adalah untuk standardisasi massa protein racun paederin dalam proses penelitian. Prosedur yang dilaksanakan terdiri atas tahapan sebagai berikut.

1. siapkan protein standar dan simpan dalam suhu 4°C,
2. siapkan lima *microtube* dengan kadar protein standar (BSA) 0 μL , 5 μL , 10 μL , 15 μL , dan 20 μL ,
3. tambahkan larutan Bradford pada masing-masing *microtube* dengan kadar yang berbeda,
 - a. BSA 0 μL ditambah dengan Bradford 1000 μL ,
 - b. BSA 5 μL ditambah dengan Bradford 995 μL ,
 - c. BSA 10 μL ditambah dengan Bradford 990 μL ,
 - d. BSA 15 μL ditambah dengan Bradford 985 μL ,
 - e. BSA 20 μL ditambah dengan Bradford 980 μL ,
4. siapkan dua *microtube* dengan kadar masing-masing 10 μL dan 20 μL *stock solution* ekstrak *Paederus* sp.,
5. tambahkan larutan Bradford pada masing-masing *microtube* dengan kadar yang berbeda,
 - a. *stock solution* ekstrak *Paederus* sp. 10 μL ditambah dengan Bradford 990 μL ,
 - b. *stock solution* ekstrak *Paederus* sp. 20 μL ditambah dengan Bradford 980 μL ,
6. ambil 100 μL dari masing-masing *microtube* dan masukkan ke *microplate*,
7. lihat absorbansi proteinnya di ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm,
8. hasil absorbansi dianalisis menggunakan perhitungan microsoft excel untuk mendapatkan kadar protein rata-rata pada racun *Paederus* sp.

3.8.4 Stock Solution Chlorhexidine

Chlorhexidine yang digunakan sebagai bahan adalah *chlorhexidine gluconate* 4%. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dengan cara pengenceran *chlorhexidine* menggunakan aquades. Konsentrasi *chlorhexidine* ditentukan berdasarkan uji pendahuluan. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, sediaan *chlorhexidine* mengalami penggumpalan ketika proses elektroforesis, sehingga konsentrasi yang dipilih pada penelitian ini adalah 0,12%; 0,06%; dan 0,3%.

$$\phi_i = \frac{V_i}{V} \times 100\%$$

Keterangan:

ϕ_i : Konsentrasi volume (%)

V_i : Volume komponen (m³)

V : Volume campuran (m³)

3.8.5 Gelatin Zimografi

Zimografi adalah teknik elektroforesis untuk mendeteksi enzim hidrolisis. Gel mengandung gel *acrylamide* 8% dan gelatin sebanyak 2 mg/mL. Jumlah racun yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 μ L racun *Paderus* sp. yang diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Racun paederin pada kelompok perlakuan ditambah dengan *chlorhexidine*, sedangkan pada kelompok kontrol negatif ditambah dengan aquades hingga mencapai volume 50 μ L sesuai dengan desain penelitian. Semua kelompok penelitian tersebut ditambah dengan *sample buffer* dengan perbandingan 1:1 kemudian di vortex. Selanjutnya, dimasukkan sebanyak 35 μ L ke dalam masing-masing sumuran gel *acrylamide* 8% sebanyak 35 μ L sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah racun paederin yang digunakan dalam uji zimografi adalah sebesar 9,3 μ g.

Kemudian dilakukan elektroforesis dengan tegangan sebesar 80 volt. Setelah itu gel dicuci dengan Triton X-100 selama 40 menit pada temperatur ruang sambil

digoyang menggunakan *shaker*. Gel diinkubasi di dalam suhu ruangan menggunakan *development buffer* selama 20 jam supaya protein MMP dapat mencerna substrat. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan gel menggunakan *comassie brilliant blue* selama 30 menit di suhu ruang. Hasil pewarnaan tersebut mendeteksi MMP sebagai *band* jernih dengan latar belakang biru. Warna biru menunjukkan substrat yang tidak terdegradasi. Setelah itu dilakukan *destaining* dengan metanol selama ± 15 menit di temperatur ruang (Kupai *et al.*, 2010). Area jernih yang didapat bisa dihitung menggunakan densitometri. Analisis data densitas ini menggunakan *software* ImageJ (Kang *et al.*, 2013). Densitas gel menunjukkan ketebalan gel yang mampu dicerna oleh MMP.

3.9 Analisis Data

Data yang dianalisis berupa *relative optical density*. Analisis data yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Jika sebaran data normal dan data varian sama ($p > 0,05$), analisis data yang digunakan adalah *One Way ANOVA*. Setelah itu dilakukan analisis *Post Hoc* LSD. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna atau signifikan apabila nilai $p < 0,05$.