

DOKSISIKLIN SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 dan MMP-9 PADA DERMATITIS PAEDERUS DENGAN METODE GELATIN ZIMOGRAFI

**Brenda Desy Romadhon, Bagus Indra Kusuma,
Silvi Ahmada Chasya, Putri Erlinda
Kusumaningarum, Rovian Cahya Prasetya**

Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran,
Universitas Jember:
email: brenda.romadhon@yahoo.com

Abstract

Tomcat (Paederus sp.) venom can bring a condition called dermaconecrosis. Initially, paederin toxins was thought that come from the body of Tomcat (Paederus sp.). However, based on Piel's research, the genes come from biosynthesis of tomcat (Paederus sp.) venom is more approach to Pseudomonas aeruginosa genes than body itself. In other fact, Pseudomonas aeruginosa can secrete enzymes metalloprotease (MMP), especially extracellular MMP-2 and MMP-9. MMP-2 and MMP-9 are gelatinase that can destroy the gelatin on human skin. There has been no previous report about the treatment of dermatitis paederus based on the mechanism of action except for the use of corticosteroids as symptomatic drugs. Because of that, researcher hypotheses that MMP-2 and MMP-9 have a role on dermatitis paederus and doxycycline can inhibit that process as MMP inhibitor and antibiotics component. The research design is quasi-experimental research, in vitro with a post-test only control group design. The research steps are Tomcat (Paederus sp.) venom extraction, doxycycline solution preparation, and electrophoresis of gelatin zymografi. The independent variables are induction of Tomcat (paederin sp.) venom and the doses of doxycycline, while the dependent variable is the density of the gel. Gel density was measured using densitometry software ImageJ and calibrated as optical density. This study describes the first time the mechanism Paederus dermatitis caused by MMP-2 and MMP-9, so that the first line of therapy that can be used is doxycycline with an effective dose of 10 mM in vitro.

Keywords: *paederus dermatitis, doxycycline, gelatin zimografi, MMP*

1. PENDAHULUAN

Racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) dapat menyebabkan terjadinya dermakonekrosis berupa rasa gatal, merah, dan melepuh seperti terbakar pada kulit, atau yang biasa dikenal dengan nama dermatitis paederus. Sampai sekarang, belum ada teori pasti tentang patogenesis dermatitis paederus dan penelitian di bidang ini masih sangat sedikit.

Awalnya, racun paederin diduga berasal dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus sp.*). Namun, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Piel, gen pada biosintesis racun paederin tidak berasal dari genom kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) melainkan lebih mendekati genom bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Berdasarkan hal tersebut, peneliti memiliki hipotesis bahwa pemberian terapi antibiotik dapat memberikan waktu penyembuhan yang lebih singkat daripada kortikosteroid pada dermatitis paederus. Selain itu, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat mensekresikan enzim metalloprotease (MMP) ekstraseluler khususnya MMP-2 dan MMP-9 yang dapat mendegradasi gelatin pada kulit. Doksisisiklin dosis rendah dapat menjadi inhibitor bagi enzim ini sehingga terapi menggunakan doksisisiklin memberi dua efek sekaligus yaitu sebagai antibiotik dan MMP inhibitor.

Oleh karena itu, peneliti mengajukan penelitian berupa uji efektifitas doksisisiklin sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam dermakonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) dengan metode gelatin zimografi.

2. METODE

Penelitian ini berlangsung selama enam bulan dari bulan Januari sampai dengan Juni 2014, bertempat di laboratorium biologi molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Jenis penelitian yang dilakukan

adalah eksperimental laboratoris secara in vitro. Metode yang digunakan adalah gelatin zimografi.

Ekstraksi racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*)

Langkah yang dilakukan setelah kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) terkumpul sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan untuk pembuatan *stock solution* adalah penggerusan pada suhu 4°C, kemudian dicampur dengan NaCl 0,9% dan dimasukkan ke dalam gelas ukur yang tertutup dengan aluminium foil. Hasil larutan kumbang tomcat di *lypolizer* untuk mendapatkan serbuk kering.

Stock solution doksisisiklin dan ekstrak racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*)

Stock solution doksisisiklin dibuat dari 100 mg zat aktif doksisisiklin yang dilarutkan dalam aquades hingga volume mencapai 1 mL, kemudian di *vortex* dan di *sentrifuge* dan

diambil bagian supernatan. *Stock solution* ekstrak racun Tomcat (*Paederus sp.*) dibuat dengan jumlah dan cara yang sama.

Uji kadar protein *paederus sp.*

Uji kadar protein racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) dilakukan dengan menggunakan metode Bradford dan dibaca di ELISA *reader* dengan panjang gelombang 630 nm.

Gelatin zimografi

Pada penelitian ini, dilakukan dua kali pengulangan untuk mendapat hasil optimal. Pada penelitian pertama, peneliti menggunakan 10 kelompok sampel sumuran, (Tabel 1).

Penelitian kedua dilakukan untuk mengetahui dosis yang mampu menghambat MMP-2 dan MMP-9 dengan optimal. Desain penelitian kedua seperti dam Tabel 2.

Tabel 1. Kelompok sampel sumuran

Kelompok kontrol	Sumuran tidak diisi
Kelompok perlakuan I (KP I)	Racun tomcat 1,8 µg/µL
Kelompok perlakuan II (KP II)	Racun tomcat 1,44 µg/µL
Kelompok perlakuan III (KP III)	Racun tomcat 1,08 µg/µL
Kelompok perlakuan IV (KP IV)	Racun tomcat 0,72 µg/µL
Kelompok perlakuan V (KP V)	Racun tomcat 1,8 µg/µL+ Doksisisiklin 10 mM
Kelompok perlakuan VI (KP VI)	Racun tomcat 1,8 µg/µL+ Doksisisiklin 20 mM
Kelompok perlakuan VII (KP VII)	Racun tomcat 1,8 µg/µL+ Doksisisiklin 30 mM
Kelompok perlakuan VIII (KP VIII)	Racun tomcat 1,8 µg/µL+ Doksisisiklin 40 mM
Kelompok perlakuan IX (KP IX)	Racun tomcat 1,8 µg/µL+ Doksisisiklin 50 mM

Tabel 2. Perlakuan Dosis menghambat optimal MMP-2 dan MMP-9

Kelompok Kontrol	Racun tomcat 1,8 µg/µL
Kelompok perlakuan I (KP I)	Racun tomcat 1,8 µg/µL+ Doksisisiklin 0.1 mM
Kelompok perlakuan II (KP II)	Racun tomcat 1,8 µg/µL+ Doksisisiklin 1 mM
Kelompok perlakuan III (KP III)	Racun tomcat 1,8 µg/µL+ Doksisisiklin 10 mM

Analisis statistik

Hasil *band* yang didapat dari elektroforesis gel gelatin dilakukan analisis densitometri menggunakan ImageJ dan diukur rasio ketebalan dengan satuan *optical density* (O.D.).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

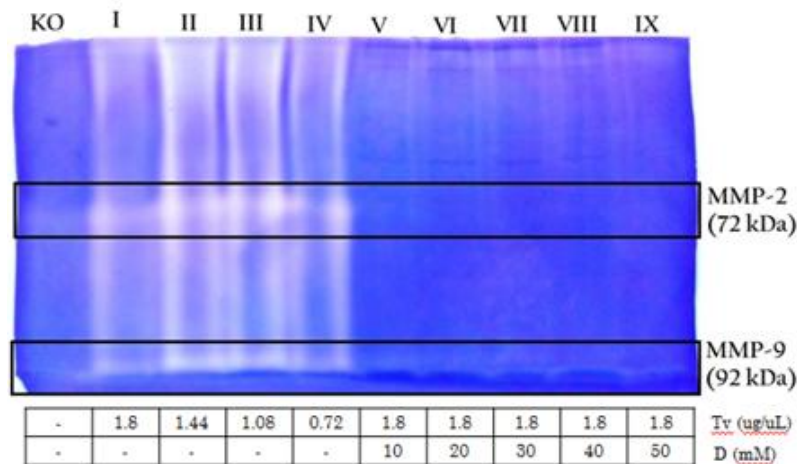
Telah terjadi peningkatan laporan kasus kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) yang signifikan pada tahun 2012 di berbagai wilayah Indonesia dan diperkirakan kasus yang tidak dilaporkan jauh lebih banyak daripada kasus yang tercatat karena

sedikitnya penelitian epidemiologi mengenai serangan kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) di Indonesia. Pasca kontak dengan kumbang Tomcat (*Paederus sp.*), perlu waktu 24 hingga 48 jam sampai munculnya iritasi kulit akut yang disertai dengan eritema, melepuh serta rasa gatal.

Dalam rangka untuk menyelediki keterlibatan enzim matriksmetaloprotease (MMP) dalam racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*), dilakukan kegiatan analisis dengan gelatin zimografi. Uji gelatin zimografi pada penelitian ini memungkinkan penilaian peran MMP-2 dan MMP-9 yang terdapat dalam racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) terhadap proses iritasi lokal pada kulit akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*). Dari hasil pengujian yang telah dilakukan didapatkan gambaran *band* atau pita yang menunjukkan terjadinya mekanisme pendegradasian gelatin oleh

MMP. MMP yang bereperan dalam proses dermakonekrosis gelatin pada racun kumbang tomcat adalah MMP-2 dan MMP-9 yakni MMP golongan gelatinase yang masing-masing memiliki berat molekul 92 kDa dan 72 kDa yang ditunjukkan pada Gambar.1.

Ketebalan *band* yang muncul berbanding lurus dengan dosis kadar protein racun kumbang tomcat (*Paederus sp.*) yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak paparan terhadap racun tomcat (*Paederus sp.*) maka akan semakin luas lesi yang ditimbulkan pada kulit yang pada penelitian ini ditunjukkan dengan ketebalan *band* yang terbentuk pada gel seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2a. Hasil analisis densitometri dengan image-J *optical density* atau banyaknya area gelatin yang terdegradasi oleh MMP-2 dan MMP-9 (Gambar 2b).

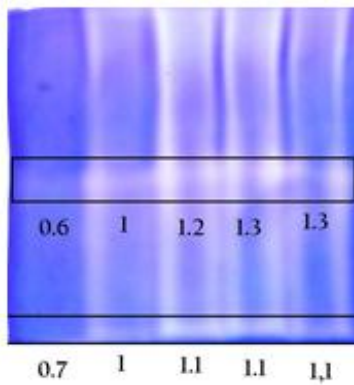


Gambar 1. Gel hasil elektroforesis yang menunjukkan aktivitas MMP-2 dan MMP-9. Pada bagian atas terlihat *band* yang muncul akibat adanya aktivitas MMP-2 dengan berat molekul 92 kDa mendegradasi gelatin. Pada bagian bawah terlihat *band* yang muncul akibat adanya aktivitas MMP-9 dengan berat molekul 72 kDa mendegradasi gelatin (Tv: Tomcat venom; D: Doksisisiklin)

Dengan mempertimbangkan efek patologis yang berasal dari racun kumbang tomcat (*Paederus sp.*), pengobatan yang dilakukan selama ini adalah menggunakan kortikosteroid yaitu pengobatan simptomatik berdasarkan gejala klinis yang muncul dan bukan berdasarkan mekanisme patologis iritasi lokal akibat racun tersebut. Baru-baru ini, pengembangan MMP inhibitor yang telah diuji secara klinis untuk beberapa penyakit ternyata dapat digunakan sebagai inhibitor yang menghambat racun dari beberapa jenis hewan.

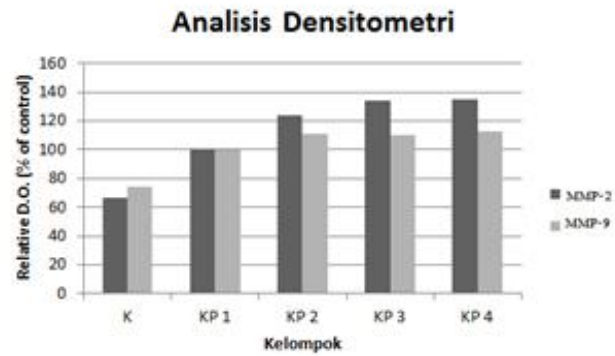
Doksisisiklin memiliki efek MMP inhibitor dengan cara kerja menghambat Ca^{2+} dan atau berinteraksi langsung dengan protein MMP sehingga menghambat enzim protease tersebut. Dari pemaparan tersebut doksisisiklin memiliki nilai potensial untuk mengobati pasien dengan dermatitis paederus yang diduga mengandung MMP-2 dan MMP-9 pada racunnya.

Untuk penilaian kemungkinan hubungan penggunaan doksisisiklin dan luasnya gelatin yang terdegradasi oleh MMP, pada

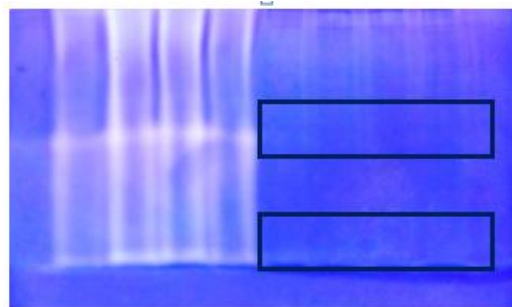


Gambar 2a.

Gambar 2a. aktivitas MMP-2 dan MMP-9. Terdapat perbedaan ketebalan *band* dipengaruhi oleh kadar protein tomcat yang digunakan sebagai sample. **Gambar 2b.** Analisis aktivitas MMP-2 dan MMP-9 menggunakan Image-J. Ketebalan *band* yang ditransformasikan kedalam *optical density* (O.D.) menunjukkan rasio luas gelatin yang terdegradasi oleh MMP-2 dan MMP-9 dibanding dengan control positif yang terkandung dalam racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*).



Gambar 2b.



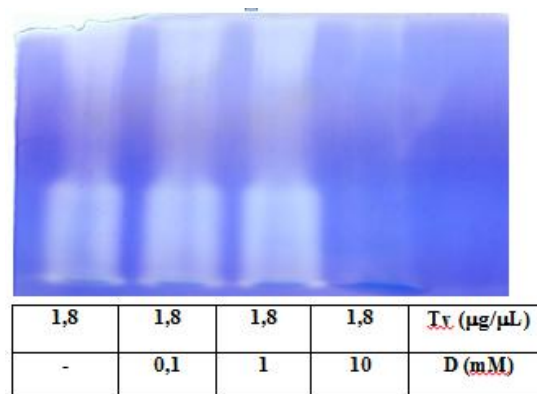
Gambar 3.

Gambar 3. Aktivitas doksisisiklin terhadap racun tomcat. Tidak terdapat gambaran *band* yang menunjukkan proses degradasi oleh MMP karena ada peran doksisisiklin sebagai inhibitor MMP.

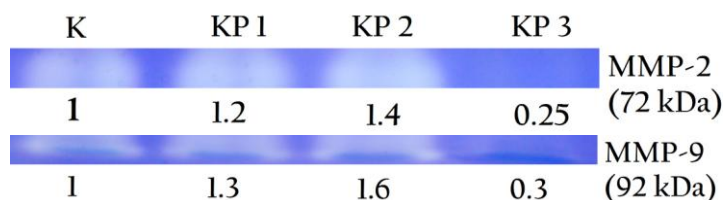
pengulangan pertama, sampel racun kumbang tomcat (*Paederus sp.*) ditambahkan doksisisiklin dengan dosis yang semakin ditingkatkan yaitu 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, dan 50 mM.

Pada hasil uji gelatin zimografi menunjukkan bahwa doksisisiklin mampu menekan ekspresi MMP pada kelima dosis tersebut. Kelima dosis yang digunakan tersebut mampu menghambat MMP secara optimal. Data yang didapatkan menunjukkan bahwa efek positif dari doksisisiklin adalah mengurangi aktivitas MMP sehingga terjadi penurunan luasnya gelatin yang terdegradasi yaitu ditandai dengan tidak munculnya *band* pada gel (Gambar 3).

Pada pengulangan kedua, digunakan dosis doksisisiklin sebesar 0,1 mM, 1 mM, dan 10 mM. Hasil yang didapatkan adalah terjadi penurunan luas gelatin yang didegradasi pada dosis 10 mM (Gambar 4a. dan Gambar 4b.). Dari dua pengulangan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa secara invitro doksisisiklin dengan dosis 10 mM adalah dosis efektif yang bisa digunakan sebagai pengobatan dermatitis paederus. Doksisisiklin mampu digunakan sebagai *first line* terapi dermatitis paederus berdasarkan mekanisme patologisnya.



Gambar 4a. Aktivitas doksisisiklin terhadap MMP-2 dan MMP-9. Terdapat perbedaan densitas gel yang dipengaruhi oleh dosis doksisisiklin yang digunakan sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dan diperoleh densitas terkecil pada dosis doksisisiklin 10 mM. (Tv: Tomcat Venom; D: Doksisisiklin)



Gambar 4b. Aktivitas doksisisiklin terhadap MMP-2 dan MMP-9. Terdapat perbedaan densitas gel yang dipengaruhi oleh dosis doksisisiklin yang digunakan sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dan diperoleh densitas terkecil pada dosis doksisisiklin 10 mM. (Tv: Tomcat Venom; D: Doksisisiklin)

4. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah MMP-2 dan MMP-9 memiliki peran pada dermakonekrosis yang terjadi akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*). Hal tersebut merupakan mekanisme patologis terjadinya dermatitis paederus. Oleh karena itu maka pengobatan yang tepat untuk dermatitis paederus berdasarkan mekanisme patologisnya adalah doksisisiklin.

5. REFERENSI

Asoodeh, A. dan Musaabadi, H. M. 2012. Purification and Characterization of a Thermostable Neutrophilic Metalloprotease from *Pseudomonas sp.* DR89. *Iranian Journal of Biotechnology* 10(2): 120-128.

Chang, W. Y. C., Clements, D., Johnson, S. R. 2010. Effect of Doxycycline on Proliferation, MMP Production, and Adhesion in LAM-related cells. *American Journal of Physiology* 229: L393-L400.s

European Pharmacopoeia. 2005. Doxycycline Hyclate. *European Pharmacopoeia* 01 : 0272.

Fakoorziba, M. R., Eqhbal, F., Azizi, K., Moemenbellah, F. 2011. Treatment Outcome of Paederus Dermatitis Due to Rove Beetles (Coleoptera: Staphylinidae) On Guinea Pigs. *Trop Biomed* 28(2): 18-24.

Gunawan, S. G. 2012. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: FK UI.

Kang, C., Jin, Y. B., Kwak, J., Jung, H., Yoon, W. D., Yoon, T.J., Kim, J. S., Kim, E. 2013. Protective Effect of Tetracycline Against Dermal Toxicity Induced by Jellyfish Venom. *PLOS ONE* 8(3): 1-8.

Katzung, B. G. 2012. *Farmakologi Dasar & Klinik*. Jakarta: EGC.

Kemenkes RI, 2012. *Panduan Pencegahan dan Pengendalian Kumbang Paederus sp.*Jakarta: Kemenkes RI.

Kompas. 2012. *Tercatat, 130 Laporan Serangan Tomcat*.

Kristanti, R.A. 2013. Penggunaan Doksisisiklin Hyclate Sebagai Inhibitor Matriks

- Metalloproteinase Pada Terapi Tambahan Periodontis. *SAINSTIS* 1 (2).
- Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T., Ferdinandy, P. 2010. Matrix Metalloproteinase Activity Assays: Importance Of Zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 61 (2): 205-209.
- Mbonile, L., 2011. Acute Haemorrhagic Conjunctivitis Epidemics and Outbreaks of *Paederus* spp. Keratoconjunctivitis ('Nairobi red eyes') and Dermatitis. *The South African Medical Journal* 101(8).
- Piel, Jörn. 2002. A polyketide Synthase-peptide Synthetase Gene Cluster from An Uncultured Bacterial Symbiont of *Paederus* Beetles. *PNAS* 99 (22): 14002-14007.
- Qadir, S. N. R., Raza, N., Rahman, S.B. 2006. *Paederus* Dermatitis In Sierra Leone. *Dermatology Online Journal* 12(7): 9.
- Setianto, Y. S., Mubarika, S., Astuti, I., Irawan, B. 2011. Corelation Between Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) With Complications of Acute Heart Failure In Myocardial Infarction With ST Elevation (STEMI) And Acute Coronary Syndromes Without STElevation (NSTEACS). *Jurnal Kardiologi Indonesia* 32 (4): 229-235.
- Singh, G. dan Ali, Y.A. 2007. *Paederus* Dermatitis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73: 13-15.
- Verma, R. P. dan Hansch, C. 2007. Matrix Metalloproteinases (MMP): Chemical-biological Functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15: 2223-2268.
- Whittaker, M. dan Ayscough, A. 2001. Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors – Current Status and Future Challenges. *Celltransmissions* 17(1): 3-14.
- You, D. O., Kang, J. D., Youn, N. H., Park, S. D. 2003. Bullous Contact Dermatitis Caused by Self-Applied Crushed *Paederus fuscipes* for the Treatment of Vitiligo. *Cutis* 72: 385-388.