

Peran Lipopolisakarida *Helicobacter pylori* terhadap Aktivitas Neutrofil pada Penderita Infark Miokard Akut melalui Degradasi Kolagen Tipe IV

Djangan Sargowo*, Sumarno*, I Ketut Gede Muliarta*, Mudyawati Kamaruddin**

Matrix metalloproteases (MMPs) are proteolytic enzymes that play a critical role in decreasing the stability of atherosclerotic plaque causing Acute Myocardial Infarction (AMI). In this process, degradation of type IV collagen as an important component of endothelial membrane is thought to be important. Several microorganisms and their products including Lipopolysaccharide (LPS) have been suggested to be able to activate MMPs. The aim of this study is to investigate the role of *Helicobacter pylori* LPS in type IV collagen degradation (in vitro).

We used two stages in this study: MMP production stage and degradation of type IV collagen. MMP derived from the neutrophils of AMI and non-AMI patients that had been stimulated with LPS of *Helicobacter pylori* were used to digest type IV collagen. Analysis of type IV collagen degradation was performed with SDS-PAGE and Western blot.

This study showed MMP isolated from neutrophil of AMI patients is an active MMP-9 at Molecular weight of 72 kDa. It can degrade type IV collagen at MW 78.6 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 47.8 kDa and 43.8 kDa. Whereas MMP isolated from neutrophil of non-AMI have MW of 91.2 kDa and can only degrade collagen IV at merely 60 kDa.

In conclusion, *Helicobacter pylori* LPS is able to induce neutrophil of AMI patients to produce an active MMP-9 at MW 72 kDa and the enzyme may play strategic role in the degradation of type IV collagen.

(J Kardiol Ind 2007;28:327-337)

Keywords: *Helicobacter pylori* LPS, Type IV Collagen, MMP, Acute Myocardial Infarction

* Dosen Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya, Malang

** Alumni Program Pascasarjana
Universitas Brawijaya, Malang

Peran Lipopolisakarida *Helicobacter pylori* terhadap Aktivitas Neutrofil pada Penderita Infark Miokard Akut melalui Degradasi Kolagen Tipe IV

Djangan Sargowo*, Sumarno*, I Ketut Gede Muliarta*, Mudyawati Kamaruddin**

Matriks Metalloprotease (MMP) merupakan enzim proteolitik yang berperan dalam ruptur plak aterosklerosis, sehingga menyebabkan terjadinya Infark Miokard Akut (IMA). Hal ini melibatkan degradasi kolagen yang menyusun membran basal lapisan endotel. Beberapa mikroorganisme baik virus maupun bakteri serta produk mikroorganisme tersebut diduga dapat mengaktivasi MMP. Lipopolisakarida (LPS) merupakan salah satu produk yang dihasilkan oleh bakteri Gram negative. Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana peran endotoksin *Helicobacter pylori* dalam mendegradasi kolagen pada penderita IMA.

Penelitian ini dibagi dalam dua tahap, yaitu tahap produksi enzim MMP dan tahap degradasi kolagen tipe IV. Enzim MMP diperoleh dari isolasi neutrofil penderita IMA dan darah sehat yang dipapar oleh lipopolisakarida *Helicobacter pylori* enzim MMP yang diperoleh kemudian dipaparkan pada kolagen tipe IV yang diharapkan terjadi degradasi kolagen tipe IV. Data yang diperoleh berupa pita-pita hasil SDS-PAGE dan Western blot yang kemudian dianalisis secara deskriptif.

Enzim MMP yang berasal dari neutrofil penderita IMA merupakan MMP-9 aktif pada 72 kDa dapat mendegradasi kolagen tipe IV pada berat molekul 78.6 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 47.8 kDa dan 43.8 kDa sedangkan enzim MMP yang berasal dari neutrofil darah sehat hanya dapat mendegradasi kolagen tipe IV pada berat molekul 60 kDa. Sehingga dapat disimpulkan bahwa LPS *Helicobacter pylori* dapat menginduksi neutrofil dalam menghasilkan enzim MMP-9 dan enzim tersebut dapat berperan dalam degradasi kolagen tipe IV.

Kata kunci: LPS *Helicobacter pylori*, Kolagen tipe IV, MMP, Infark Miokard Akut

Infark Miokard Akut (IMA) saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang utama di dunia. Selain karena prevalensinya yang semakin meningkat penyakit ini juga telah menjadi penyebab kematian yang utama

(Braunwald, 1997). Pada tahun 2000, sebanyak 16,7 juta penduduk atau sekitar 30,3% dari total kematian di seluruh dunia disebabkan oleh IMA. Lebih dari setengahnya dilaporkan dari negara berkembang (Tjandjaja, 2004).

Faktor yang telah dikaitkan dengan perkembangan IMA adalah aterosklerosis. Menurut Ross (1999) proses atherogenesis menyerupai respon inflamasi kronis terhadap mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut dapat secara langsung menginvasi endotel vaskular dan menginduksi respon inflamasi atau secara tidak langsung (efek sistemik).

Alamat korespondensi:

Prof. Dr. dr. Djangan Sargowo, SpPD(K), SpJP(K)
Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Pada proses inflamasi, sel-sel radang yang teraktivasi akan meningkatkan produksi proenzim, diantaranya *Matrix Metalloprotease* atau MMP. Proenzim ini dapat diubah menjadi enzim aktif yang menyebabkan lisisnya kolagen (Romanelli *et al.* 1999). Apabila proses ini terjadi pada permukaan plak aterosklerotik maka serabut kolagen yang melindungi plak akan mengalami lisis sehingga menjadi tipis dan akhirnya mudah ruptur.

Kolagen tipe-IV merupakan komponen utama dari membran basal vaskular yang letaknya berada di bawah lapisan sel endotel pembuluh darah, Kolagen tipe IV mudah rusak oleh aktivitas kolagenase dari sirkulasi, selain karena lokasinya yang berada paling dekat dengan sirkulasi darah juga karena strukturnya yang mengandung protein globuler (*non-collagenous domain*, tidak fibrilar) yang rentan terhadap berbagai kolagenase (Lee and Libby, 1997; Ortega and Werb, 2002; Cimpean and Caloianu, 1997). Degradasi kolagen tipe IV dapat terjadi secara langsung oleh protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau akibat peningkatan aktivitas degradasi oleh MMP pada inflamasi yang signifikan (Romanelli, *et al.*, 1999).

Beberapa penelitian mengaitkan infeksi *Helicobacter pylori* dengan penyakit ektragastroduodenal antara lain penyakit kardiovaskuler, khususnya ketika penelitian seroepidemiologi yang dilakukan oleh Ameriso, *et al.* (2001), Muliarta dkk, (2005) menemukan bahwa ada keterkaitan yang nyata antara pasien seropositif *H.pylori* dengan penderita aterosklerosis.

Akan tetapi, Dalam menginfeksi, *H.pylori* tidak ikut dalam peredaran darah sehingga keterlibatan *H.pylori* pada aterosklerosis mungkin melalui mekanisme sekunder yaitu dengan cara systemic effect.

Menurut Fong, I.W.(2000), produk mikroorganisme yang berupa endotoksin dalam sirkulasi darah secara tidak langsung dapat merusak endothelium vascular dengan menstimulasi respon imun sedangkan O'Connor,S.(2001) berpendapat bahwa endotoksin yang dikeluarkan oleh mikroorganisme masih bersifat virulen pada host endotoksin yang ikut dalam peredaran darah akan menimbulkan suatu *echo*, dimana terjadinya aktivasi sel-sel yang berhubungan dengan ateroma dan terjadi pelepasan sitokin *interleukin-1* (IL-1) dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α). Selain itu sitokin akan merangsang sintesis *acute-phase reactants*, seperti fibrinogen (O'Connor, S. 2001).

H.pylori adalah salah satu bakteri gram negatif yang mempunyai endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS). Diketahui LPS ini berhubungan dengan

patogenesitas dari strain *H.pylori* karena merupakan antigen yang dapat dikenali oleh system imun nonspesifik dan spesifik dan melibatkan system *toll-like receptor* (TLR4).

Berdasarkan pernyataan di atas, maka dilakukan penelitian secara *in vitro* terhadap LPS *H.pylori* yang mungkin dapat menginduksi respon imun dalam menghasilkan enzim MMP dan membuktikan apakah enzim tersebut dapat aktif mendegradasi kolagen tipe-IV.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek induksi LPS *H.pylori* terhadap neutrofil dalam menghasilkan enzim MMP dan membuktikan bahwa MMP yang dihasilkan dari induksi LPS *H.pylori* dapat mendegradasi kolagen tipe-IV.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium sentral Biomedik Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

Penelitian ini terdiri dua tahap: tahap produksi enzim matriks metaloprotease (MMP) yang diinduksi oleh LPS *H.pylori* melalui neutrofil dan tahap degradasi kolagen tipe-IV oleh enzim MMP yang diproduksi oleh neutrofil oleh karena induksi LPS *H.pylori*.

Tahap Produksi enzim MMP

Uji endotoksin *Helicobacter pylori*

Endotoksin *H. pylori* dalam hal ini LPS diperoleh dari Laboratorium sentral Biomedik Rumah Sakit Umum Mataram, NTB. Uji LPS *H. pylori* dilakukan dengan SDS-PAGE dan dilanjutkan dengan pengecatan perak nitrat (AgNO₃). Uji ini dilakukan untuk mengetahui berat molekul LPS *H. pylori* yang akan digunakan dalam mengaktivasi neutrofil dalam memproduksi enzim MMP.

Isolasi dan Preparasi Neutrofil

Isolasi neutrofil dengan menggunakan darah vena peripheral yang diambil dari penderita IMA dan orang sehat kemudian dikumpulkan dalam tabung *heparin*. Cara isolasi neutrofil dengan menggunakan metode *Histopaque* (Sigma-*Leukocyte separation*). *Histopaque-1119* dimasukkan ke dalam tabung *Falcon* dan

ditambahkan *H-1077* secara hati-hati di atasnya melalui dinding tabung. Kemudian darah dengan perbandingan 1:2 dilapiskan di atas lapisan *H-1077*. Setelah itu disentrifus 1600 rpm selama 30 menit maka akan terbentuk 2 lapisan cincin, cincin pertama adalah lapisan yang mengandung monosit sedangkan cincin kedua lapisan yang mengandung neutrofil. lapisan yang mengandung neutrofil dipisah, masukan dalam falcon dan tambahkan 10 ml HBSS steril, disentrifus 700 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan pelet diresuspensi, dilakukan 2 kali. Pelet yang dihasilkan adalah neutrofil murni. Sel neutrofil diamati dan dihitung dengan haemositometer. Metode ini sesuai dengan *Leukocyte separation* dari Sigma-Aldrich.

Produksi dan Uji Aktifitas Enzim MMP

Stimulasi sekresi dan aktivasi enzim MMP dilakukan dengan cara memasukkan LPS *H.pylori* ke dalam neutrofil yang telah diisolasi secara terpisah pada neutrofil IMA dan orang sehat dan diinkubasi selama 1 jam pada 37°C. Kemudian disentrifus dingin 4°C tahap pada suhu 4°C pada 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang mengandung enzim MMP diambil, dipisahkan dan dicampur dengan *tris-glycine SDS buffer*, dibiarkan pada suhu ruang 10 menit tanpa dipanaskan. Sampel dimasukkan pada sumuran yang telah berisi gel dengan 0.1% gelatin dan gel dirunning dengan *tris-glycine SDS running buffer*, dan dirunning pada kondisi voltase konstan (125 V), kuat arus (awal: 30 – 40 mA/gel dan akhir: 8 – 12 mA/gel) dalam 90 menit. Gel direnaturasi pada *Zymogram renaturing buffer* pada suhu ruang selama 30 menit sambil diagitasi. Gel dipindahkan ke *Zymogram developing buffer* pada suhu ruang dengan agitasi lembut selama 30 menit kemudian gel dimasukan pada *Zymogram developing buffer* yang baru kemudian diinkubasi pada 37°C semalam. Gel distaining dengan *comassie brilliant blue* lalu destaining dengan metanol-glacial. Pita yang berwarna putih pada gel yang berwarna biru menandakan aktivitas gelatinase. Hasil elektroforesis yang dilakukan pada enzim MMP dilanjutkan dengan Western blotting yang menggunakan antibodi anti MMP-9 sebagai antibodi primer.

Uji Degradasi Kolagen Tipe-IV

Enzim MMP yang diperoleh dipaparkan pada kolagen tipe-IV yang telah dilabel biotin dengan perbandingan 1:2, diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang.

Ditambahkan RSB dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Sampel dimasukkan pada sumuran yang telah berisi gel kemudian dirunning dengan *tris-glycine SDS running buffer*, dan dirunning pada kondisi voltase konstan (120 V), kuat arus 30 mA dalam waktu 90 menit. Pita-pita hasil fragmentasi kolagen tipe-IV diamati dengan pewarnaan *comassie blue R-250* kemudian penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* sambil digoyang dengan menggunakan *shaker* sampai gel menjadi jernih. Hasil elektroforesis dilanjutkan dengan Western blotting dengan menggunakan antibodi poliklonal anti kolagen tipe IV.

Analisa Hasil SDS-PAGE

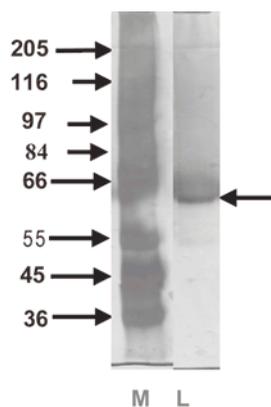
Data yang diperoleh berupa pita-pita hasil SDS-PAGE dan Western blotting dianalisa dengan menggunakan analisa regresi diperoleh dari *Retardation factor* (Rf) standar dan logaritma massa molekul relatif yang bertujuan untuk menentukan berat molekul tiap pita-pita yang diperoleh.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Penelitian

Uji LPS dengan Pewarnaan Perak Nitrat

Pengujian LPS *H.pylori* dengan pewarnaan AgNO_3 seperti pada gambar 1.



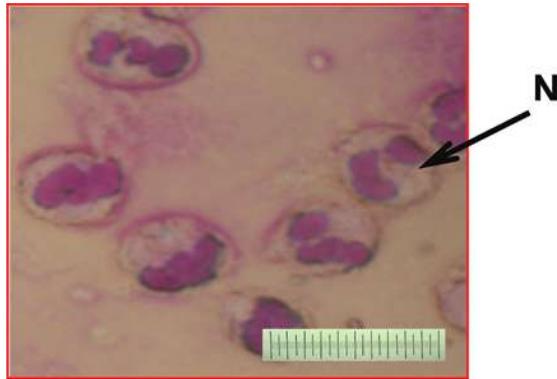
Gambar 1. Hasil SDS-PAGE 10% LPS *H. pylori* dengan pewarnaan AgNO_3
Keterangan: M : Marker merk Sigma L : Pita LPS *H. pylori*

Pada uji LPS *H.pylori* dengan menggunakan pewarnaan perak nitrat di atas mendapatkan berat molekul 63.5 kDa.

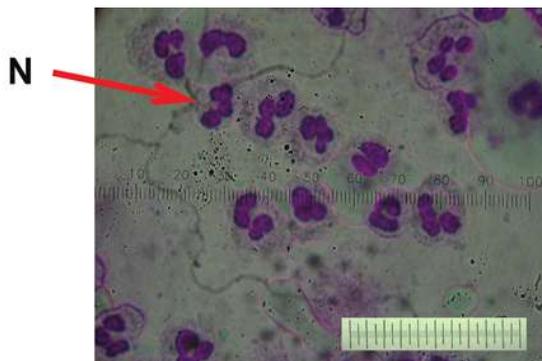
Isolasi Neutrofil

Isolasi neutrofil dilakukan untuk mendapatkan neutrofil yang murni tanpa kontaminasi dari sel yang lain. Berdasarkan hasil pewarnaan giemsa terhadap neutrofil yang diperoleh dari darah sehat sebelum dipapar LPS *H. pylori* seperti yang diperlihatkan pada gambar 2a.

Sedangkan hasil pewarnaan giemsa terhadap neutrofil yang diperoleh dari darah penderita IMA sebelum dipapar oleh LPS *H.pylori* seperti yang diperlihatkan pada gambar 2b.



Gambar 2a. Neutrofil darah sehat perbesaran 1000x dengan pewarnaan giemsa
Keterangan N: Neutrofil darah sehat sebelum dipapar LPS *H. pylori*



Gambar 2b. Neutrofil penderita IMA perbesaran 1000x dengan pewarnaan giemsa
Keterangan N : Neutrofil penderita IMA sebelum dipapar LPS *H.pylori*

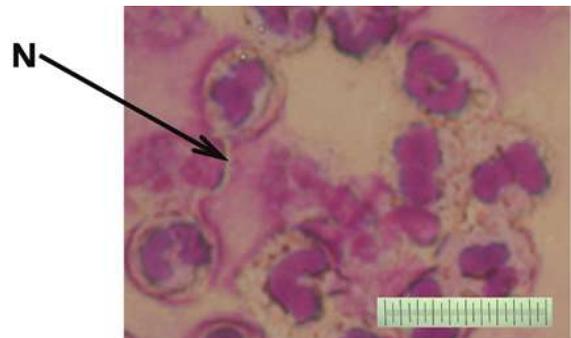
Adapun neutrofil yang diperoleh dari darah sehat setelah dipapar oleh LPS *H.pylori* diperlihatkan pada gambar 3a.

Sedangkan hasil pewarnaan giemsa terhadap neutrofil yang diperoleh dari darah penderita IMA setelah dipapar oleh LPS *Helicobacter pylori* seperti yang diperlihatkan pada gambar 3b.

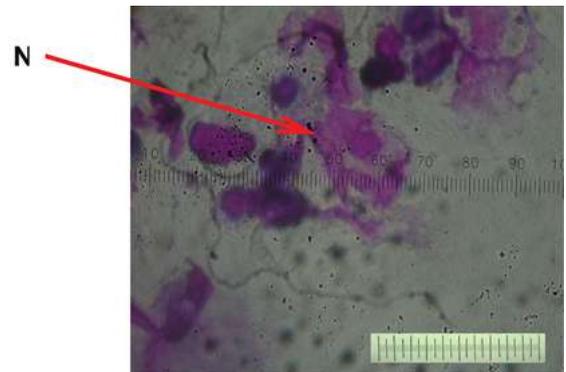
Pada gambar 3a dan 3b di atas menunjukkan neutrofil yang mengalami degranulasi, sehingga dimungkinkan neutrofil mengeluarkan isi sel yang mungkin salah satunya berupa enzim MMP.

Produksi dan Uji MMP dengan SDS-PAGE-Gelatin Zymography

Produksi enzim MMP diduga diperoleh dari salah satu isi neutrofil, dimana neutrofil yang terinduksi oleh paparan LPS *H.pylori* akan memproduksi enzim MMP. Untuk mengetahui keberadaan dan aktivitas MMP maka dilakukan uji enzim MMP dengan menggunakan



Gambar 3a. Neutrofil darah sehat setelah dipapar LPS *H.pylori* dengan pewarnaan Giemsa, perbesaran 1000x
Keterangan: N: neutrofil mengeluarkan isi sel



Gambar 3b. Neutrofil penderita IMA setelah dipapar LPS *H.pylori* dengan pewarnaan Giemsa, perbesaran 1000x
Keterangan: N : neutrofil mengeluarkan isi sel

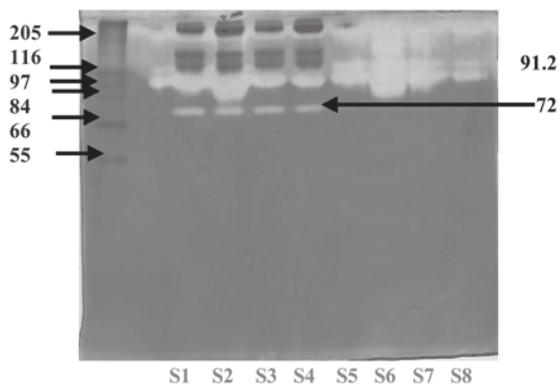
SDS-PAGE gel gelatin terhadap supernatan dari neutrofil yang dipapar dengan LPS *H. pylori*

Adapun Hasil uji enzim MMP yang menggunakan SDS-PAGE gel gelatin dapat dilihat pada gambar 4.

Pada gambar 4 di atas menunjukkan pada sumur S1 sampai S4 (supernatan dari neutrofil darah penderita IMA) terdapat pita berwarna putih transparan dengan berat molekul 91 kDa dan 72 kDa, Pada sumur S2 juga terlihat pita putih yang tebal yang berada pada berat molekul 82.5 kDa. Sedangkan pada sumur S5 sampai S8 (supernatan dari neutrofil darah orang sehat) terlihat pita putih transparan pada berat molekul 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa dan 91.2 kDa.

Gel hasil SDS-PAGE 7.5% gelatin kemudian dilanjutkan dengan Western blotting yang menggunakan antibodi anti MMP-9 sebagai antibodi primer. Pada gambar 5 menunjukkan hasil Western blotting dimana reaktifitas antibodi anti MMP-9 dapat mengenali enzim MMP.

Enzim MMP yang dikenali oleh antibodi anti MMP-9 diduga merupakan enzim MMP-9. Pada sampel S1 sampai dengan S4 adalah MMP-9 yang diperoleh dari neutrofil penderita IMA yang dipapar oleh LPS *H. pylori* menunjukkan antibodi anti MMP-9 mengenali pita pada berat molekul 91 kDa dan 72 kDa. Sedangkan pada sampel S5 sampai dengan S8 adalah MMP-9 yang diperoleh dari neutrofil orang sehat yang dipapar oleh LPS *H. pylori* menunjukkan



Gambar 4. MMP dengan SDS-PAGE 7.5% gel gelatin menunjukkan BM 70kDa pada netrofil penderita IMA (S1-S4)

Keterangan:

M : Perunut protein High marker merk Sigma dengan pewarnaan commassie Brilliant Blue R-250

S1-S4 : sampel supernatan neutrofil IMA yang dipapar LPS *H. pylori*

S5-S8 : sampel supernatan neutrofil sehat dipapar LPS *H. pylori*

antibodi anti MMP-9 mengenali pita pada berat molekul 91.2 kDa, walaupun pita yang dihasilkan terlihat kabur (samar-samar).

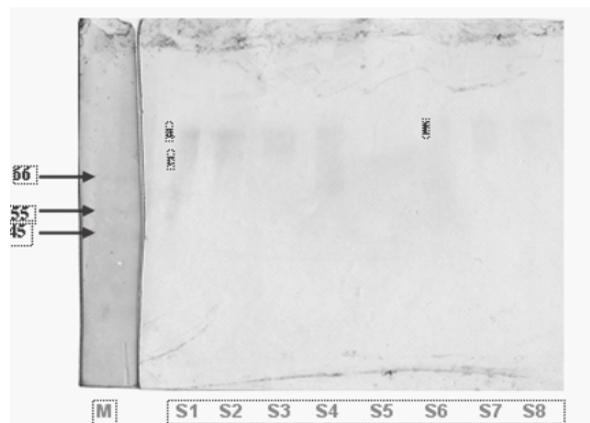
Tahap Degradasi Kolagen Tipe IV

Hasil SDS-PAGE

Tahap selanjutnya dilakukan uji degradasi kolagen tipe IV oleh MMP-9 dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE 10%. Adapun Hasil SDS-PAGE 10% terhadap MMP-9 yang dipaparkan ke kolagen tipe IV tersebut dapat dilihat pada gambar 6.

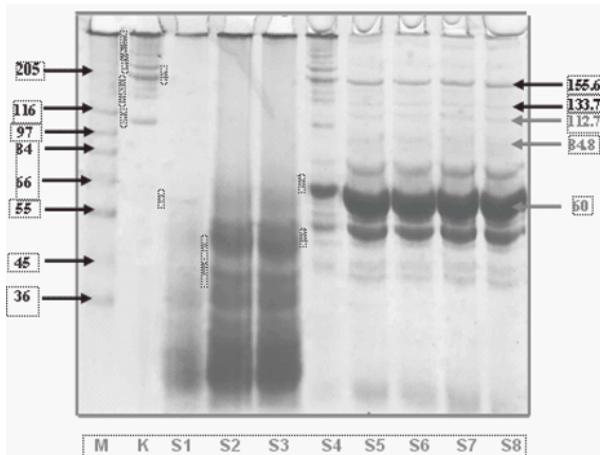
Berdasarkan hasil SDS-PAGE 10% pada gambar 6 di atas menunjukkan pada perlakuan MMP-9 dari neutrofil penderita IMA (sampel S1) diperoleh pita-pita pada gel poliakrilamid dengan berat molekul 60 kDa, 47.8 kDa, 43 kDa dan 36 kDa dan 14 kDa.

Pada sampel S2 pita-pita yang dapat terlihat adalah 65 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 47.8 kDa, 43.8 kDa, 36.6 kDa, 34 kDa, 23 kDa dan 20 kDa. Adapun sampel S3 memperlihatkan pola pita yang sama dengan pita pada sampel S2. Sedangkan sampel S4 memperlihatkan pita-pita dengan berat molekul 181.8 kDa, 177.7 kDa, 168 kDa, 155 kDa, 138.8 kDa, 114.8 kDa, 102 kDa, 88 kDa, 78 kDa, 65 kDa, 62 kDa, 50 kDa dan 45 kDa. Pada perlakuan MMP-9 dari neutrofil darah sehat (sampel S5 – S8) menunjukkan pola pita yang sama dengan berat molekul sebagai berikut 155.6 kDa, 133.7 kDa, 123.9 kDa, 112.7 kDa, 98.7 kDa, 84.8 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 54.8 kDa, 50.8 kDa, 42.8 kDa dan 39.8 kDa.



Gambar 5. Hasil Western blotting reaktifitas antibodi anti MMP-9 yang dapat mengenali enzim MMP

a : 91 kDa c : 72 kDa f : 91.2 kDa



Gambar 6. Hasil SDS-PAGE 10% pada kolagen tipe IV yang dipapar MMP-9 dengan pewarnaan *comassie brilliant blue R-250*

Keterangan :

- M : Protein perunut high marker merk Sigma
- K : kolagen tipe IV
- S1 – S4 : kolagen tipe IV yang dipapar MMP-9 dari Neutrofil penderita IMA
- S5 – S8 : kolagen tipe IV yang dipapar MMP-9 dari Neutrofil darah orang sehat
- : Pita yang dapat direpson oleh antibodi poliklonal anti kolagen tipe IV

b : 65 kDa	1 : 195 kDa	6 : 155.6 kDa
c : 60 kDa	2 : 188 kDa	7 : 112.7 kDa
d : 50 kDa	3 : 181 kDa	
e : 47.8 kDa	4 : 171 kDa	
f : 43.8 kDa	5 : 167.9 kDa	

Hasil Uji Western blotting

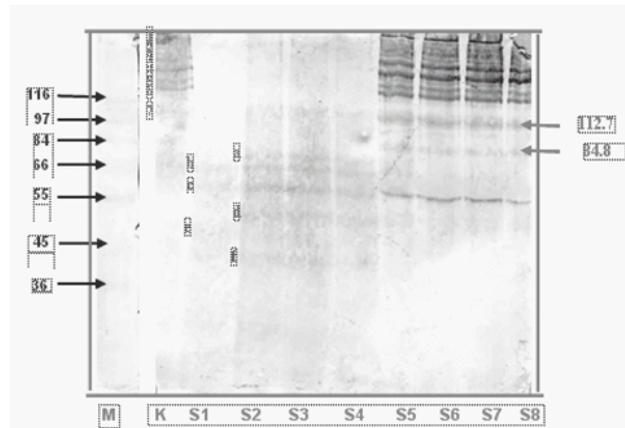
Reaktivitas antibodi poliklonal anti kolagen tipe IV terhadap pita-pita perlakuan MMP-9 yang dipapar ke kolagen tipe IV dapat dilihat seperti **gambar 7**.

Pada gambar 7 menunjukkan reaktivitas antibodi poliklonal anti kolagen tipe IV terhadap pita-pita sampel kolagen tipe IV yang dipapar oleh MMP-9 dari neutrofil penderita IMA pada pita-pita yang mempunyai berat molekul 65 kDa, 60 kDa, 47.8 kDa dan 43.8 kDa (sampel S1), 112 kDa, 78.6 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 50 kDa dan 43.8 kDa (sampel S2 dan S3) dan pada sampel S4 pada pita-pita dengan berat molekul 112 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 50 kDa dan 43.8 kDa. Sedangkan pada sampel kolagen tipe IV yang dipapar oleh MMP-9 dari neutrofil darah sehat menunjukkan pita-pita yang terespon pada berat molekul 112 kDa, 84.8 kDa dan 60 kDa.

Pada hasil Western blot diatas terdapat 2 pita yang dikenali oleh antibodi poliklonal anti kolagen tipe IV (gambar 7) yang tidak tampak pada gel poliakrilamid (gambar 6). Berat molekul kedua pita tersebut adalah 78.6 kDa (sumur sampel S2 dan S3) dan 47.8 kDa pada sumur sampel S1.

Sedangkan reaktivitas antibodi poliklonal anti kolagen tipe IV terhadap sampel kolagen tipe IV murni sebagai kontrol (sumur 2) menunjukkan semua pita-pita terespon bahkan beberapa pita yang tidak terdeteksi pada SDS-PAGE 10% yang diberi pewarnaan *comassie brilliant blue* dapat terdeteksi dan dikenali oleh antibodi poliklonal anti kolagen tipe IV. Adapun berat molekul tiap pita sampel kolagen tipe IV murni adalah 195 kDa, 188 kDa, 181 kDa, 171 kDa, 167.9 kDa, 155.6 kDa, 112.7 kDa, 84.8 kDa dan 65 kDa

Sehubungan dengan kejadian tidak tampaknya pita pada SDS-PAGE tapi dapat terdeteksi dan terespon oleh antibodi poliklonal anti kolagen tipe IV



Gambar 7. Hasil Blotting pada kolagen tipe IV yang dipapar MMP-9

Keterangan :

- M : Protein perunut high marker merk Sigma
- K : Kolagen tipe IV
- S1 – S4 : Kolagen tipe IV yang dipapar MMP-9 dari Neutrofil darah penderita IMA
- S5 – S8 : Kolagen tipe IV yang dipapar MMP-9 dari Neutrofil orang sehat
- : Pita hasil degradasi kolagen tipe IV

a : 78.6 kDa	1 : 195 kDa	7 : 112.7 kDa
b : 65 kDa	2 : 188 kDa	
c : 60 kDa	3 : 181 kDa	
d : 50 kDa	4 : 171 kDa	
e : 47.8 kDa	5 : 167.9 kDa	
f : 43.8 kDa	6 : 155.6 kDa	

menunjukkan bahwa densitas dari pita-pita tersebut sangat kecil, sehingga pada penelitian ini juga dilakukan analisa densitometri dengan menggunakan gel densitometer. Hasil yang diperoleh dari analisa densitometri menunjukkan rasio pita-pita yang terdeteksi cukup besar (gambar tidak ditampilkan)

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dan untuk mencapai tujuan, maka pembahasan disusun berdasarkan LPS *Helicobacter pylori* sebagai penginduksi produksi enzim MMP oleh neutrofil sampai terbentuknya pita hasil degradasi kolagen tipe IV oleh MMP tersebut.

Pada penelitian ini dilakukan uji LPS *Helicobacter pylori* dengan menggunakan pewarnaan perak nitrat (*silver staining*). Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul LPS *Helicobacter pylori* yang digunakan dalam menginduksi neutrofil untuk memproduksi enzim MMP. Menurut Gibson J.R (1998), pewarnaan perak nitrat dapat mendeteksi LPS dengan baik yang tidak dapat dilakukan oleh pewarnaan *comassie brilliant blue* selain itu pewarnaan dengan perak nitrat dilakukan apabila konsentrasi protein yang terdeteksi pada elektroforesis sangat rendah. Deteksi protein tergantung pada pengikatan ion perak pada rantai asam amino diikuti dengan reduksi menjadi metallic silver (Merril et al. 1986).

Berat molekul LPS yang diperoleh dari hasil uji LPS *Helicobacter pylori* dalam penelitian ini adalah 63.5 kDa. Berat molekul LPS *Helicobacter pylori* tersebut diduga merupakan tipe *smooth-form LPS*. Alasan tersebut diperkuat oleh Walsh and Moran (1997) dalam Gibson JR (1998) yang melaporkan tipe LPS *Helicobacter pylori* akan berubah dari *smooth-form LPS* menjadi *rough-form LPS* bila ditumbuhkan pada media padat dan menunjukkan berat molekul yang rendah. Sedangkan berat molekul LPS *Helicobacter pylori* pada penelitian ini merupakan berat molekul yang cukup tinggi.

Beberapa strain *Helicobacter pylori* menghasilkan LPS rantai O-spesifik yang *smooth-form LPS* dan pada strain yang lain dapat menghasilkan *rough-form LPS*. Menurut Gibson J.R et al. (1998) Isolat *Helicobacter pylori* yang diperoleh dari biopsi akan menghasilkan *smooth-form LPS* sedangkan isolat *Helicobacter pylori* yang telah ditumbuhkan secara *in vitro* dalam waktu yang lama atau subkultur yang berulang-ulang akan

menghasilkan *rough-form LPS*. Berdasarkan pernyataan di atas, maka dapat dinyatakan bahwa pada penelitian ini dimana LPS *Helicobacter pylori* yang diperoleh dari kultur Laboratorium sentral Biomedik RSU Mataram merupakan isolat *Helicobacter pylori* yang mungkin baru saja diperoleh dari biopsi, sehingga diharapkan efek aktivitasnya lebih kuat dibanding dengan kultur isolat *H.pylori* yang telah berulang-ulang dikultur.

LPS tersusun atas molekul yang kompleks yaitu terdiri dari komponen lipid dan polisakarida yang dibagi dalam 3 area, yaitu rantai O-spesifik, core-oligosakarida dan lipid A. Kelompok polisakarida dari LPS tersebut merupakan antigen yang dapat dikenali oleh sistem imun spesifik sedangkan kelompok lipid A merupakan antigen yang dapat dikenali oleh sistem imun nonspesifik (Abbas, 1991 dan Jafar, M., 2004). Kemungkinan juga karena tipe LPS *Helicobacter pylori* yang *smooth-form* tersebut maka dengan mudah dapat terwarnai dengan jelas oleh perak nitrat oleh karena rantai O-spesifik dari tipe tersebut yang merupakan polimer unit polisakarida

Seerti telah dijelaskan sebelumnya, LPS yang merupakan produk mikroorganisme dapat melibatkan sistem *toll-like reseptor* (TLR4) yang dapat mengaktivasi NF- κ B dan mengekspresikan gen-gen yang mengkode protein yang penting dalam berbagai komponen respon imun nonspesifik yang meliputi sitokin inflamatori (TNF- α , IL-1 dan IL-12), molekul *leukocyte-endothelial adhesion host* (seperti E dan P-selectin) dan protein yang terlibat di dalam mekanisme killing mikroba (seperti iNOS) (Abbas, 1991; Galustian et al, 2003).

Masih menurut Abbas (1991), produksi sitokin yang meningkat akan mengaktifkan fagosit dan TNF yang diproduksi oleh sitokin akan mengerahkan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel-sel tersebut untuk menyingkirkan LPS. Pendapat Abbas tersebut juga sesuai dengan Lee A and Moran A.P. (1993) yang menyatakan bahwa LPS dapat memicu sistem imun non spesifik maupun spesifik, antara lain dengan mengaktifkan komplemen secara langsung melalui jalur alternatif, menstimulasi limfosit B, mengaktifkan makrofag dan menginduksi inflamasi.

Sehubungan efek aktivitas LPS *Helicobacter pylori* maka dalam penelitian ini dilakukan paparan LPS *Helicobacter pylori* terhadap neutrofil seperti yang diperlihatkan pada gambar 3a dan 3b. Pada gambar tersebut menunjukkan neutrofil yang dipapar oleh LPS

Helicobacter pylori mempunyai ukuran yang lebih besar dibanding neutrofil sebelum dipapar LPS *Helicobacter pylori* (Gambar 2a dan 2b). Hal ini mungkin disebabkan perlekatan dan fagositosis terhadap LPS oleh neutrofil menyebabkan vakuola fagositik menelan LPS tersebut. Menurut Bellanti (1993) Setelah terjadi perlekatan permukaan neutrofil pada kompleks imun, sel dirangsang untuk memfagositosis kompleks. Penambahan area permukaan membran yang diperoleh dari adanya vakuola terikat membran atau fagosom disediakan dengan penambahan sintesis lipida dan dengan pemutaran kembali membran ke plasmalemma.

Setelah fagositosis, neutrofil dirangsang untuk melakukan percepatan pemakaian oksigen, diikuti oleh pembangkitan radikal oksigen yang sangat toksik yang dapat merusakkan sel membran, hal ini mungkin yang terjadi pada neutrofil setelah dipapar LPS tampak pecah dan mengeluarkan isi selnya, tentunya terjadi pelepasan dari unsur-unsur pokok neutrofil ke lingkungan ekstraseluler, yang diduga salah satunya adalah enzim protease. Hal ini dapat ditunjukkan dengan mengukur supernatan dari neutrofil yang dipapar LPS dengan metode *zymography gelatin*. Gambar 4 menunjukkan terdapatnya enzim protease pada supernatan tersebut, pita putih transparan menunjukkan bahwa enzim protease yang diperoleh dapat mengkatalisis gelatin yang merupakan komponen pada poliakrilamid (Aulanni'am, 2004).

Neutrofil memiliki bermacam-macam senyawa antimikrobal, yang dapat digunakan untuk membunuh mikroba. Aktivitas bakterisida neutrofil normalnya disertai dengan pembentukan spesies-spesies oksigen reaktif (ROS) dan metabolit-metabolit aktif melalui mekanisme yang bersifat oksidatif sehingga dihasilkan metabolit-metabolit oksigen yang bersifat toksik (radikal bebas) (Carranza, 2000; Dreosti, 1991). Selain produksi radikal bebas, menurut Hansen (1995); Romanelli (1999); dan Shah, *et al.* (2001) Stimuli bakterial ataupun produk bakteri pada neutrofil dapat menginduksi dalam jumlah besar produksi enzim MMP yang dapat menyebabkan destruksi matriks ekstraseluler. MMP disekresi oleh neutrofil dalam bentuk zimogen yang tidak aktif dan membutuhkan aktivasi sebelum MMP tersebut dapat mendegradasi matriks ekstraselular.

Pada hasil reaktifitas antibodi anti MMP-9 pada Western blotting menunjukkan pita putih 91 kDa dan 72 kDa pada sampel S1 sampai S4 dapat dikenali sedangkan pada sampel S5 sampai dengan S8 antibodi anti MMP-9 hanya mengenali pita putih 91.2 kDa

walaupun terlihat tidak jelas (samar-samar). Hal ini menunjukkan pita yang dapat dikenali tersebut merupakan enzim MMP-9. Akan tetapi, apabila merujuk pada Sorsa, *et al* (1997) bahwa selama aktivasi terjadi, MMP-9 latent 92 kDa akan dikonversi dalam bentuk aktif dengan ukuran berat molekul sekitar 63 kDa hingga 82 kDa, maka pita dengan berat molekul 72 kDa merupakan enzim MMP-9 aktif.

Aktifnya MMP-9 pada berat molekul 72 kDa, memberikan suatu indikasi bahwa neutrofil yang diisolasi dari penderita IMA merupakan neutrofil yang telah mengandung proMMP-9, sehingga pada waktu pemaparan LPS *Helicobacter pylori* proMMP-9 tersebut langsung aktif. Hal ini mungkin ada hubungannya dengan kondisi pasien penderita IMA yang telah mengalami inflamasi selama perkembangan aterosklerosis. Menurut Visse dan Nagase (2003) bahwa sitokin inflamatori dan faktor pertumbuhan yang dihasilkan selama terjadi aterosklerosis dapat mengekspresikan MMP dan Ekspresi MMP-9 dapat diinduksi oleh pemicu yang adekuat (Opdenakker *et al.* 2001). Menurut Kalela, (2002), MMP-9 banyak dihubungkan dengan inflamasi arteri. Peningkatan MMP-9 dalam serum pernah dilaporkan pada pasien dengan infark miokard dan unstable angina.

MMP dapat diaktifkan oleh tiga mekanisme yaitu aktivasi *stepwise*, aktivasi intraseluler dan aktivasi pada permukaan sel. Walaupun semua MMP mempunyai keluarga protease, struktur dan fungsi yang sama, tetapi MMP dapat diaktifkan dengan mekanisme yang berbeda (Ramos-DeSimone *et al.* 1999). Awal pembelahan terjadi di dalam propeptida dan kemudian propeptida dipindahkan oleh fragmentasi intramolekuler melalui beberapa intermedit (Gambar 19) (Okada 1988, Nagase 1990). Aktivasi kimia juga diperlihatkan pada percobaan *in vivo*, dimana NO mengaktifkan proMMP-9 selama *cerebral ischemia* oleh reaksi dengan kelompok thiol dari sistein (Gu *et al.*, 2002). Selama inflamasi proMMP dapat diaktifkan oleh *reactive oxygen species* atau ROS, seperti hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Aktivasi kimia atau oksidatif ini dianggap penting pada penyakit inflamasi (Weiss, 1989).

Masih berdasarkan berat molekul bentuk aktif dari MMP-9 menurut Sorsa, maka MMP-9 pada berat molekul 91.2 kDa yang diproduksi oleh neutrofil yang diisolasi dari darah sehat diduga masih merupakan proMMP-9, atau mungkin terjadi suatu aktivasi yang parsial. Hal ini mungkin salah satu

faktor yang menyebabkan hasil degradasi kolagen tipe IV pada neutrofil darah sehat mempunyai distribusinya lebih kecil dibandingkan dengan uji degradasi kolagen tipe-IV yang menggunakan neutrofil penderita IMA.

Menurut Worthly dkk(2001), meskipun beberapa enzim terlibat dalam destruksi ECM (misalnya MMP-1, dan MMP-3), tetapi hanya MMP-9 yang mempunyai hubungan kuat terhadap terjadinya ruptur plak aterosklerotik. Dikatakan bahwa MMP-9 mampu mendegradasi komponen matriks yang tidak mampu didegradasi oleh enzim proteolitik lainnya.

Sehubungan dengan kemampuan MMP-9 dalam mendegradasi komponen matriks maka pada penelitian ini pula dilakukan uji degradasi kolagen tipe-IV oleh MMP-9 yang diperoleh dari neutrofil yang dipaparkan LPS *H.pylori*. Berdasarkan hasil SDS-PAGE (Gambar 6) kemudian dilanjutkan dengan uji imunoblotting (Gambar 7) diperoleh profil fragmen hasil degradasi kolagen tipe IV yang menggunakan MMP-9 dari neutrofil penderita IMA dengan berat molekul 60 kDa, 50 kDa, 47.8 kDa dan 43.8 kDa. Penentuan degradasi tersebut berdasarkan bahwa pada pita terendah kolagen tipe IV berada pada berat molekul 65 kDa sehingga diasumsikan berat molekul yang terbentuk lebih kecil dari 65 kDa adalah pita hasil degradasi kolagen tipe IV. Penentuan degradasi tersebut seperti yang dilakukan oleh Suzanne EG, *et al* (2002) pada penelitiannya tentang degradasi kollagen tipe 1 oleh MMP-1.

Sedangkan pola fragmen hasil degradasi kolagen tipe IV yang menggunakan MMP-9 dari neutrofil darah orang sehat menunjukkan berat molekul 60 kDa. Distribusi degradasinya sangat kecil, hal itu mungkin tergantung aktivitas MMP-9 yang diperoleh. Pada neutrofil yang diambil dari orang sehat kemungkinan belum terpapar oleh keadaan inflamasi sedangkan pada neutrofil penderita IMA sudah mengalami paparan inflamasi sebelumnya sehingga kemungkinan proMMP-9 pada neutrofil penderita IMA sudah terbentuk sebelumnya hanya membutuhkan induksi saja, dalam hal ini paparan LPS *H.pylori* akan cepat menghasilkan MMP-9 yang aktif. Kemungkinan pula pada MMP-9 yang diperoleh dari neutrofil orang sehat terjadi suatu aktivitas MMP-9 yang parsial sehingga mampu mendegradasi kolagen tipe IV walaupun hanya pada berat molekul 60 kDa.

Pada proses inflamasi, sel-sel radang yang teraktivasi akan meningkatkan produksi proenzim,

diantaranya *Matrix Metalloproteinases* atau MMP. Proenzim ini dapat diubah menjadi enzim aktif yang menyebabkan lisisnya kolagen (Romanelli *et al.* 1999). Apabila proses ini terjadi pada permukaan plak aterosklerotik maka serabut kolagen yang melindungi plak akan mengalami lisis sehingga menjadi tipis dan akhirnya mudah ruptur.

MMP-9 atau dikenal sebagai gelatinase B merupakan kelompok gelatinase yang mempunyai berat molekul 92 kDa dan diidentifikasi sebagai suatu *gelatin-binding protein* yang disintesis oleh sel leukosit. Ekspresi MMP-9 dapat diinduksi oleh pemicu yang adekuat. Diketahui monosit, neutrofil, sel dendritik, limfosit, sel endothelial, sel epitel dan osteoblast dapat memproduksi gelatinase B (Opdenakker *et al.*, 2001).

Degradasi kolagen tipe-IV dapat terjadi secara langsung oleh protease yang dihasilkan oleh protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau bila terdapat inflamasi yang signifikan, akan terjadi degradasi yang lebih besar oleh aktivitas MMP (Romanelli, *et al.*, 1999; Kadowaki, *et al.*, 2000). Diketahui pada struktur MMP-2 dan MMP-9 mempunyai 3 daerah yang sama dari fibronectin tipe II di dalam daerah katalitiknya, diduga pada waktu MMP-9 aktif maka 3 daerah yang sama dari fibronectin tipe II ini akan berinteraksi dengan Kolagen tipe-IV, selain itu *C-terminal hemopexin-like domain* yang dimiliki MMP-9 digunakan untuk membelah bentuk kolagen yang triple heliks (Nagase *et al.* 1999).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Lipopolisakarida dari *H.pylori* dapat menginduksi neutrofil penderita IMA dengan menghasilkan MMP-9 aktif pada berat molekul 72 kDa.
2. MMP-9 aktif pada berat molekul 72 kDa mampu mendegradasi kolagen tipe-IV pada berat molekul 60 kDa, 55.8 kDa, 49.8 kDa dan 47 kDa
3. Lipopolisakarida *H.pylori* juga dapat menginduksi neutrofil darah sehat untuk menghasilkan MMP-9 walaupun dalam bentuk proMMP-9

Masih diperlukan penelitian lanjut terhadap fragmen kolagen tipe IV hasil degradasi MMP-9 yang berasal dari neutrofil penderita IMA, yang mungkin dapat dijadikan sebagai salah satu marker alternatif deteksi penyakit aterosklerosis yang berkaitan dengan infeksi mikroorganisme.

Daftar Pustaka

01. Abbas A.K. and A.H. Lichtman, 2005. Cellular and Molecular Immunology, Fifth Edition. The Curtis Center, Philadelphia. p.296-349.
02. Ameriso, S.F.; A.F. Esteban; C.L. Ramon; E.S. Gustavo, 2001. Detection of *Helicobacter pylori* in Human Carotid Atherosclerosis Plaques. *J. Stroke*. 32(3):385
03. Aulanni'am. 2004. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press, Malang, Indonesia
04. Bellanti, J.A. 1993. *Immunology III*. Washington, D.C
05. Braunwald E. 1997. Heart Disease a textbook of Cardiovascular Medicine. 5th Edition. United State, America.
06. Carranza F.A. 2000. Glikman's Clinical Periodontology. 8th edition. Philadelphia, London
07. Gibson, J.R.; H. Chart and R.J. Owen, 1998. Intra-strain Variation in expression of Lipopolysaccharide by *Helicobacter pylori*. *The Society for Applied Microbiology*, (26) : 399-403
08. Hansen P.R. 1995. Roles of Neutrophils in Myocardial Ischemia and Reperfusion. *J. Circulation* (91):1872-1885
09. Lee R.T. and P. Libby 1997. The Unstable Atheroma. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. (17) :1859-1867
10. Lee A. and A.P. Moran. 1993. *Helicobacter pylori*, Basic Mechanisms to Clinical Cure. First edition. Kluwer Academic Publishers. London. p. 169-177
11. Merrill, C.R., M.E. Pratt. 1986. A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Anal Biochem*
12. Moran, A.P., I.M. Helander and T.U. Kosunen. 1992. Compositional analysis of *Helicobacter pylori* rough-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol* (174) : 1370-1377,
13. Muliarta., Sumarno dan Sulistya, 2005. Deteksi Protein Spesifik *Helicobacter pylori* Penderita Infark Miokard Akut Yang Terkait Infeksi *Helicobacter pylori*. Universitas Brawijaya, Malang
14. O'Connor S., C. Taylor; L.A. Campbell; Epstein and P. Libby 2001. Potential Infectious Etiologies of Atherosclerosis: A Multifactorial Perspective. *CDC Upcoming Issue*, (7):5
15. Opdenakker G, Van den Steen PE & Van Damme J (2001) Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 22(10): 571-579
16. Romanelli R.; S. Mancini; C. Laschinger; C.M. Overall; J. Sodek and C.A.G. McCulloch 1999. Activation of Neutrophil Collagenase in Periodontitis. *Infection and Immunity*. 69 (5) :2319-2326
17. Ross R. 1999. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease (review). *New Eng J. Medicine*. (340) : 115 - 12
18. Sargowo, D. 2006. Update in Unstable Angina: Mechanism of Plug Disruption to Symptoms and the Role of Low Molecular Weight Heparin. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
19. Shah P.K. and Z.S. Galis 2001. Matrix Metalloproteinase Hypothesis of Plaque Rupture. *J. Circulation*. (104) : 1878
20. Sorsa T.; T. Salo; E. Koivunen; Tynela J, Kontinen YT, Bergmann U, Tuuttila A, Niemi E, Teronen O, Heikkilä P, Tschesche H, Leinonen J, Osman S & Stenman UH (1997) Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem* 272(34): 21067-21074
21. Suzanne E.G., et al. 2002. Cleavage of intact type I collagen by MMP-1. *Biochemistry*.
22. Tsang K.W. and S.K. Lam 1999. Extragastrroduodenal Conditions Associated with *Helicobacter pylori* Infection. *HKMJ* (50) :169-174
23. Visse R & Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8): 827-839
24. Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320(6): 365-376
25. Winarsih, S. 2005. *Respons Imun Seluler dan Protektivitas In Vivo Protein Adhesin adh036 Salmonella typhi (Upaya memperoleh Kandidat Vaksin Demam Tifoid)*. Disertasi, Universitas Brawijaya. Malang