

49.4 Kda Outer Membrane Protein of *Porphyromonas gingivalis* Is A Hemagglutinin and Adhesin Protein to Neutrophil

Outer Membrane Protein 49,4 Kda dari *Porphyromonas gingivalis* Merupakan Protein Hemagglutinin dan Adhesin Terhadap Netrofil

Siti Nurul Mubarakah*, Sumarno**, I Ketut Gede Muliarta***

*Program Studi Biomedik Program Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

**Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

***Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Periodontitis is caused mostly by *P. gingivalis* and it is related to acute coronary syndrome. *P. gingivalis* readily invades into blood circulation and potentially induces. Collagenolytic activity of neutrophil which result in collagen vascular degradation lead to atherosclerotic plaque rupture (APR). APR is responsible for occurring fatal cardiovascular events such as acute myocardial infarction (AMI). These information brought out notion concerning the adhesion interaction of *P. gingivalis* with neutrophil. The aim of this study was to assess adhesion molecule of *P. gingivalis* outer membrane protein (OMP) by partial characterization took in hemagglutination assay using mice erythrocytes, adhesion inhibition assay by gradual concentration of adhesion blocked in neutrophil, immunologic assay using Western-blotting and immunocytochemistry. The results showed that 49,4 kDa *P.gingivalis* OMP can agglutinate mice erythrocytes and adherence to neutrophil. Increase concentration of OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa reduce adhesion process to neutrophil. This protein was recognized by the polyclonal antibody of 49,4 kDa adhesion molecule. It can be concluded that *P. gingivalis* outer membrane protein is a hemagglutinin and an adhesion molecule to neutrophil

Keywords : 49,4 kDa *P. gingivalis* OMP, neutrophil, hemagglutination, adhesin

PENDAHULUAN

Infark miokard akut (IMA), adalah keadaan nekrosis otot jantung akibat ketidakseimbangan antara kebutuhan dengan suplai oksigen yang terjadi secara mendadak. Di Amerika sekitar 1,5 juta orang menderita IMA per tahun dengan angka kematian 30%. Sedangkan di Indonesia, berdasarkan survei kesehatan rumah tangga nasional tahun 1986, kematian akibat penyakit jantung koroner diperkirakan 53,5 per 100.000 penduduk (1).

Penyebab IMA yang paling sering adalah terjadinya sumbatan koroner sehingga terjadi gangguan aliran darah. Sumbatan tersebut terjadi karena rupturnya plak aterosklerosis yang memicu trombosis (2). Hingga saat ini telah diakui bahwa degradasi kolagen merupakan mekanisme molekular yang mendasari patogenesis *atherosclerotic plaque rupture* (APR) (3).

Akhir-akhir ini, infeksi bakterial selalu dihubungkan dengan kejadian sindrom koroner akut. Bukti terbaru menunjukkan keterlibatannya pada patogenesis *atherosclerotic plaque rupture* (APR). Penelitian Susilawati 2008, memberikan penjelasan mengenai peran *P. gingivalis* dalam menginduksi terjadinya degradasi kolagen yang berakibat pada rupturnya plak aterosklerotik (4). Adanya infeksi *P. gingivalis* akan menyebabkan

timbulnya respon inflamatorik akut oleh netrofil. Netrofil yang terstimuli akan mengaktifkan *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9) yang akan mendegradasi kolagen tipe IV dan memicu terjadinya ruptur plak. Dugaan peran *P. gingivalis* tersebut juga didukung temuan oleh Susilawati mengenai keberadaan epitop-epitop *P. gingivalis* pada 100% penderita IMA yang diambil sampel darahnya (4). Teridentifikasinya bermacam-macam epitop *P. gingivalis* pada penderita IMA memunculkan dugaan bahwa dalam darah terkandung komponen-komponen patogenik *P. gingivalis* serta keberadaan *whole cell* bakteri *P. gingivalis* viabel yang memiliki potensi invasif di sirkulasi darah.

Porphyromonas gingivalis mudah berinvasi ke sirkulasi darah dikaitkan dengan kebutuhannya untuk mendapatkan nutrisi, yaitu peptida dan hemin (sumber besi yang mutlak diperlukan). Karena sumber hemin utama adalah hemoglobin yang terdapat dalam darah, maka *P. gingivalis* cenderung berinvasi ke sirkulasi darah untuk mendapatkan hemoglobin (5). Berbagai penelitian juga telah melaporkan kemampuan *P. gingivalis* untuk berinvasi dan menempel pada endotel dan plak aterosklerotik (7-10). Sedangkan Kozarov *et al* (2005) melaporkan ditemukannya *P. gingivalis* viabel pada plak aterosklerotik. Kemampuan menempel pada substrat atau sel tersebut dikarenakan *P. gingivalis* memiliki molekul-molekul adhesin pada permukaan selnya, seperti hemagglutinin dan fimbriin (5).

Porphyromonas gingivalis setidaknya memiliki tiga jenis hemagglutinin dan lima jenis proteinase (5).

Keberadaan molekul hemaglutinin pada bakteri sangat penting karena berperan sebagai molekul adhesi bakteri tersebut pada permukaan sel hospes (11).

Molekul adhesi pada setiap bakteri berbeda dalam hal berat molekulnya serta reseptor yang berperan dalam perlekatan ke sel hospes. Molekul bakteri identik dengan protein hemaglutinin. Keberadaan molekul adhesi bakteri ke sel hospes dapat diketahui dengan cara menghitung Index Adhesi (IA) yaitu jumlah bakteri yang melekat pada setiap sel yang dihitung pada 100 sel (12).

Outer membrane protein (OMP) dari suatu bakteri gram negatif termasuk *P. gingivalis*, berperan sangat penting dalam virulensi melalui proses adhesi dengan sel hospesnya serta merupakan antigen untuk mendeteksi adanya serum antibodi pada penderita (13).

Berdasarkan bukti-bukti yang menunjukkan peran *P. gingivalis* pada patogenesis ruptur plak, serta potensinya dalam menginduksi aktivitas kolagenolisis netrofil Susilawati, 2008, maka proses perlekatan bakteri tersebut pada sel atau substrat sebagai tahap awal proses infeksi menjadi sangat penting untuk dikaji (4). Terutama mengenai dugaan perlekatannya langsung pada sel inflamatorik netrofil, mengingat secara viabel bakteri tersebut dapat berinvansi ke sirkulasi darah.

Penelitian-penelitian yang banyak dilakukan telah membuktikan dan mengungkap proses perlekatan *P. gingivalis* baik pada sel endotel maupun pada permukaan plak aterosklerotik, sedangkan dugaan mengenai proses adhesinya pada netrofil belum pernah dilaporkan sebelumnya. Lebih lanjut, penelitian ini membuktikan keberadaan protein hemaglutinin pada OMP bakteri *P. gingivalis* yang diduga sebagai salah satu molekul adhesin pada netrofil.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif eksperimental *In Vitro*, dilakukan di Laboratorium Sentral Biomedik dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dilaksanakan pada bulan September 2008 sampai bulan November 2008. Sampel pemeriksaan adalah galur murni *P. gingivalis* ATCC33277 yang diperoleh dari LabKesDa Yogyakarta.

Kultur *P.gingivalis*

Memodifikasi metode Condorelli *et al* (1998), *P. Gingivalis* dikultur dalam medium BHI yang diperkaya dengan vitamin K1 dan hemin, kemudian dikultur pada atmosfer anaerobik (menggunakan *anaerobic jar*) selama 2 x 24 jam. Konsentrasi *P. gingivalis* disesuaikan menjadi 10^8 per ml.

Isolasi protein Hemaglutinin *Outer Membrane Protein* (OMP) *P. gingivalis*

Isolasi dilakukan menurut Winarsih *et al.* 1998 yang merupakan modifikasi dari Evan's (14).

Modifikasi yang dilakukan adalah tanpa proses kromatografi kolom. *P. gingivalis* hasil kultur dalam 500 mL media BHI diendapkan dan dicuci sebanyak 3 kali dengan PBS pH 7,4, kemudian ditambahkan *n-Octyl--D-glucopyranoside* (NOG) hingga konsentrasi mencapai 0,5%. Dilakukan homogenasi dengan vortex kecepatan penuh selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Cairan supernatan dikoleksi sebagai supernatan pertama. Endapan kembali ditambahkan NOG dan perlakuan diulangi hingga enam kali dan diperoleh enam koleksi supernatan. Seluruh cairan supernatan dilakukan proses dialisa. 24 jam pertama digunakan dH₂O dan dilanjutkan menggunakan PBS pH 7,4 pada 2x24 jam berikutnya.

Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Monitoring bobot molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE berdasarkan metode Laemmli (1970). Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCl pH 6,8, 2-mercapto ethanol 5%, w/v *sodium dodecyl sulfate* 2,5%, v/v *glyserol* 10% dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipilih *mini slab* gel 12,5% dengan *tracking gel* 4%. Voltase yang digunakan 120 mV. Bahan pewarna yang digunakan adalah *coomassie brilliant blue*. Marker protein yang dipakai adalah *prestained protein ladder*.

Pemurnian Protein Hemaglutinin OMP *P. gingivalis*

Petunjuk penelitian seperti dilakukan oleh Ehara dengan modifikasi (3,14). Hasil koleksi OMP tersebut dilakukan SDS-PAGE. Gel dipotong lurus pada bobot molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam tabung membran dialisa memakai cairan penyangga elektroforesis *running buffer*. Selanjutnya dilakukan elektroelusi menggunakan *electroforesis horizontal apparatus* voltase 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilakukan proses dialisa. 24 jam pertama digunakan dH₂O dan dilanjutkan menggunakan PBS pH 7,4 pada 2X24 jam berikutnya. Cairan dialisat berupa protein hasil potongan pita SDS-PAGE tersebut dipresipitasi menggunakan etanol absolut dingin. Presipitat dilakukan uji hemaglutinasi.

Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dikerjakan menurut petunjuk dari Hanne dan Finkelstein, 1982 (15). Pengenceran sampel dibuat konsentrasi $\frac{1}{2}$ pada *microplate V* yang tiap sumur volumenya 50µL. Tiap sumur ditambahkan suspensi darah merah mencit konsentrasi 0,5% volume sama. Kemudian digoyang dengan menggunakan *rotator plate* selama 1 menit. Selanjutnya diletakkan pada suhu kamar selama 1 jam. Besarnya titer ditentukan dengan pengamatan adanya aglutinasi darah merah pada pengenceran yang terendah. Sampel yang diuji adalah *P. gingivalis whole cell lysat* (sel bakteri utuh), protein OMP dan pelet *P. gingivalis* yang telah diisolasi OMPnya. Jenis darah merah yang digunakan berasal dari mencit sehat.

Isolasi Netrofil

Isolasi netrofil dilakukan dengan metode *ficoll hypaque centrifugation* (16). Sepuluh mL darah (*heparinized whole blood*) dibagi menjadi 2 tabung dan diencerkan dengan PBS pH 7,4 (1:1). Kemudian dilapisan pada *ficoll hypaque* (densitas 1.0770 dan 1119 g/mL pada 20°C) (1:2) dan disentrifus selama 30 menit, 1000 rpm, RT hingga terbentuk 3 lapisan. Lapisan cincin *buffycoat* di bagian tengah dipisahkan dan dilarutkan dengan PBS pH 7,4. Selanjutnya disentrifus selama 10 menit, 1500 rpm, RT. Pellet dicuci 3x dengan PBS pH 7,4 dan morfologi netrofil di cek dengan pewarnaan giemsa.

Optimasi Waktu Inkubasi *P. gingivalis* pada Netrofil

Tahap pertama dilakukan preparasi biakan bakteri yang diperoleh dari kultur *P. gingivalis*. Sel bakteri *P. gingivalis* dipanen dengan menggunakan sentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan *P. gingivalis* ditambah dengan PBS steril. Sampel diukur tingkat kekeruhan dengan *optical density* (OD = 1) atau sekitar 10^9 sel/mL. Suspensi sel neutrofil dimasukkan ke dalam suspensi bakteri. Suspensi digoyang dengan *shaker* selama waktu yang dibuat bertahap, yaitu 30 detik, 1 menit, 2 menit, 5 menit, 10 menit, 30 menit dan 40 menit. Suhu dipertahankan 37°C dengan goyangan 60 kali/menit. Diambil masing-masing 20 µL untuk dibuat hapusan pada *object glass*. Hapusan diwarnai dengan pewarnaan giemsa dan dilakukan perhitungan indeks adhesi *P. gingivalis* pada netrofil melalui pengamatan mikroskopis (12).

Uji Molekul Adhesi

Dilakukan preparasi biakan bakteri yang diperoleh dari kultur *P. gingivalis*. Netrofil yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam suspensi bakteri. Suspensi digoyang dengan *shaker* selama waktu optimum pada suhu 37°C dengan goyangan 60 kali/menit. Endapan diambil dan dicuci menggunakan PBS sebanyak 3x. Kemudian pellet disuspensi dengan 300 µL PBS, diambil masing-masing 20 µL untuk dibuat hapusan pada *object glass*. Hapusan diwarnai dengan pewarnaan giemsa dan dilakukan perhitungan indeks adhesi melalui pengamatan mikroskopis (12).

Uji Hambat Adhesi

Metode uji hambatan adhesi mengacu pada Sumarno (12). Dilakukan preparasi biakan bakteri yang diperoleh dari kultur *P. gingivalis*. *P. gingivalis* masing-masing diambil 50 µL, disentrifus 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet *P. Gingivalis* yang diperoleh dimasukkan sampel netrofil yang telah mengandung protein HA yang sudah diencerkan masing-masing 500 µL, dishaker selama waktu optimum (menit) 37°C, dengan goyangan 60 kali permenit. Sampel disentrifus 1000 rpm selama 5 menit, diambil endapannya dan ditambahkan 300µL. Selanjutnya diambil masing-masing 20µL untuk hapusan pada preparat.

Preparat siap untuk dilakukan pengecatan giemsa dan perhitungan index adhesi dilakukan di bawah mikroskop.

Produksi Antibodi Poliklonal Anti Protein Adhesin OMP *P. gingivalis*

Antigen dengan konsentrasi 100 µg/ml disiapkan dengan mencampurkan ajuvan inkomplit (*incomplete Freund' adjuvant*) 1:1 sebelum disuntikkan secara intraperitoneal pada mencit jantan. *Boosters* diberikan setiap seminggu sekali selama 3 minggu dengan ajuvan komplit (*complete Freund' adjuvant*). Serum darah mencit yang mengandung antibodi poliklonal dipanen 3 hari setelah booster terakhir (14).

Pemeriksaan Antibodi Poliklonal Protein Adhesin OMP *P. gingivalis*

Imunositokimia

Preparasi sampel adhesi protein OMP *P. gingivalis* 49 kDa pada sel netrofil yang telah difiksasi dengan methanol, kemudian dilanjutkan dengan pencucian dengan PBS pH 7,4 3x dengan mikropipet dan diinduksi dengan hidrogen peroksidase 3% selama 10 menit. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit dan diulang 3x. Dilanjutkan dengan inkubasi dengan *blocking buffer* (mengandung 0,2% BSA, 0,2% NaN₃, 1% Triton-X-100) selama 1 jam pada suhu ruang, setelah itu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama sebanyak 3x. Berikutnya diinkubasi dengan antibodi primer (produksi antibodi poliklonal anti- protein OMP *P. gingivalis* 49 kDa) dengan perbandingan 1:50 µL selama semalam pada suhu 4°C. Kemudian dicuci dengan PBS steril selama 5 menit 3x. Tahap selanjutnya dilakukan inkubasi dengan antibodi sekunder IgG *anti mouse* selama 1 jam dengan perbandingan 1:200 µL, kemudian dicuci dengan PBS steril 5 menit 3x, setelah itu ditetesi streptavidin HRP (1:500) sebanyak 50 µL untuk setiap totalan selama 45 menit dan dicuci PBS steril 5 menit 3x, selanjutnya diinkubasi dengan DAB (*diaminobenzidine*) selama 30 menit kemudian langsung ditetesi HE (*meyer hematoxyline*) selama 10 menit dan dihentikan dengan cara menetesasi sampel dengan air kran secara langsung selama 10 menit. Setelah dikering anginkan, sampel siap diamati di bawah mikroskop.

Western-Blotting

Western-blotting menggunakan metode Towbin, 1979 (17). Gel dipindahkan pada kertas nitroselulosa (NC) menggunakan alat *semi dry blotter* buatan *bioered* setelah protein sampel tersebut dilakukan SDS-PAGE. Aliran listrik yang dipakai 300 mA selama 120 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan pewarna *ponceau* 2% yang mengandung TCA sampai 3% untuk mengetahui apakah protein sampel telah pindah pada kertas nitroselulosa dan diberi tanda untuk menentukan berat molekul. Kertas nitroselulosa dipotong sesuai dengan lajur sumuran. Untuk menghilangkan warna *ponceau* kertas NC dibilas

dengan H₂O. Selanjutnya *diblocking* dengan TBS yang mengandung albumin 3% dalam TBS pH 7,4 ditambah BSA 1% direndam semalaman pada suhu 4°C. Dilakukan pencucian sebanyak 2 kali masing-masing digoyang selama 10 menit menggunakan cairan TBS pH 7,4 yang mengandung Tween 20 0,05%. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer (anti protein adhesin OMP *P. gingivalis*) konsentrasi 1/100 selama 2 jam. Dicuci dengan TBS-Tween 0,05% selama 2x5 menit. Kemudian ditambahkan antibodi sekunder yaitu IgG-*anti mouse label biotin* dengan konsentrasi 1/1000 dalam TBS pH 7,4 dan BSA 1% dan dilindungi terhadap pengaruh sinar. Diinkubasi selama 2 jam, kemudian dilakukan pencucian 2x5 menit menggunakan PBS-Tween 0,05%. Diinkubasi dengan HRP selama 40 menit, dicuci dengan TBS-Tween 0,05% selama 2x10 menit dan ditetesi dengan substrat TMB sebagai pewarna, jika sudah terbentuk *band* dengan warna kebiruan reaksi dihentikan menggunakan akuades. Hasil dikeringkan dan segera direkam.

Analisis Data

Data dari hasil uji adhesi dan hambat adhesi dianalisis dengan regresi linier. Uji *one way ANOVA* dan *Tukey's test* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan hambatan protein HA *P. gingivalis* terhadap adhesi *P. gingivalis* pada sel netrofil berdasarkan peningkatan konsentrasi protein HA.

HASIL

Identifikasi Netrofil dan *P. gingivalis*

Porphyromonas gingivalis yang dijadikan sampel adalah galur murni *P.gingivalis* ATCC33277 hasil kultur dalam media BHI yang memodifikasi metode dari Condorelli, 1998 (19). Hasil identifikasi *P. gingivalis* disajikan pada Gambar 1 (A dan B).

Netrofil diisolasi dari darah manusia sehat menggunakan metode dari Romanelli, 1999 dengan *ficoll hypaque centrifugation* (18). Isolasi netrofil tersebut dilakukan untuk uji adhesi bakteri *P. gingivalis* terhadap netrofil. Hasil identifikasi netrofil disajikan pada Gambar 1 (C).

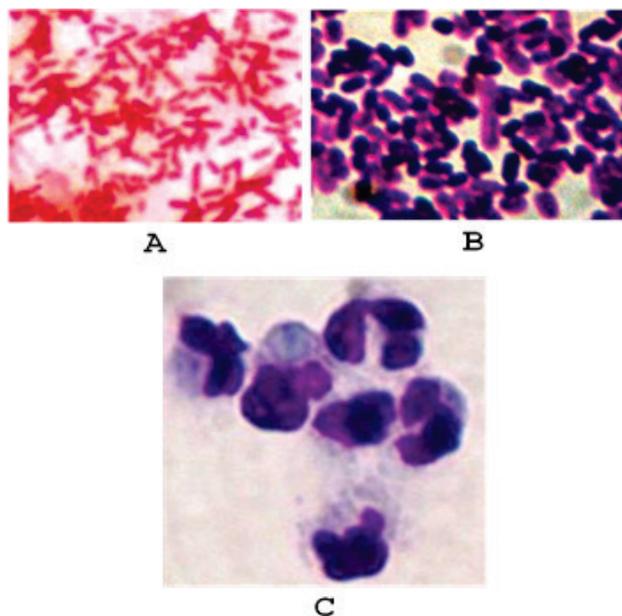
Optimasi Waktu Inkubasi *P. gingivalis* pada Sel Netrofil

Sebelum dilakukan uji adhesi *P. gingivalis* pada sel netrofil, maka dilakukan optimasi waktu inkubasi mengingat uji adhesi tidak dilakukan pada keadaan anaerobik sesuai kondisi hidup *P. gingivalis*.

Jumlah indeks adhesi bakteri terus meningkat seiring penambahan waktu inkubasi dan tidak lagi mengalami penambahan yang cukup berarti setelah 30 menit inkubasi. Gambaran kenaikan indeks adhesi ditunjukkan pada Gambar 2.

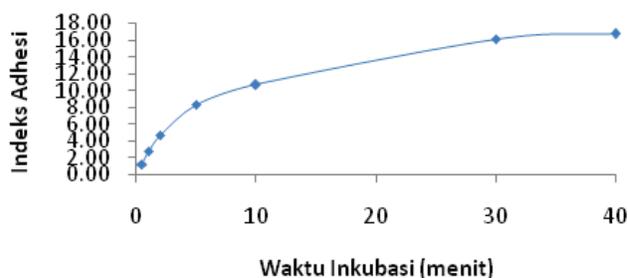
Uji Adhesi *P. gingivalis* pada Netrofil

Metode yang digunakan mengacu pada Sumarno, 2000 yang dimodifikasi dari Nagayama, 1995 (3,20).

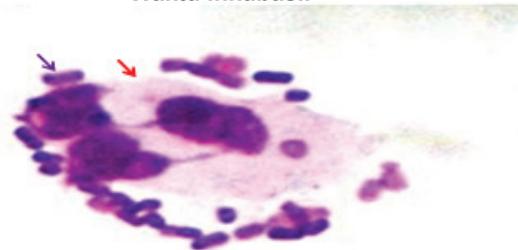


Gambar 1. Identifikasi Netrofil Hasil Isolasi dan Identifikasi Kultur *P. gingivalis*.

Keterangan: *P. gingivalis* dengan pewarnaan Gram (Perbesaran 1000 x) tampak sebagai bakteri bentukbatang dan berwarna merah yang menunjukkan bakteri Gram negatif (A). Gambar B adalah preparat apus *P. gingivalis* dengan pewarnaan Giemsa (1000x). Hasil isolasi netrofil dari darah manusia sehat menunjukkan adanya sel netrofil dengan *segmented nucleus* yang berwarna ungu tua dengan pewarnaan Giemsa (C).



Gambar 2. Indeks Adhesi *P. gingivalis* Berdasarkan Waktu Inkubasi.



Gambar 3. Adhesi *P. gingivalis* pada Netrofil.

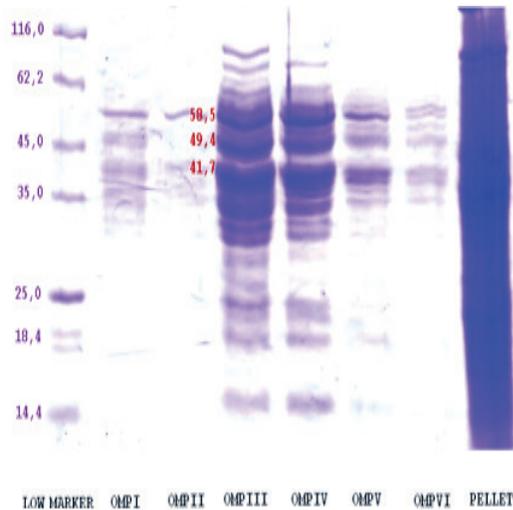
Keterangan:
 → *P. gingivalis* → Sel netrofil
 Pewarnaan Giemsa (perbesaran 1000 x)

Preparat kemudian dilihat dibawah mikroskop perbesaran 1000x untuk melihat tipe perlekatan dan menghitung indeks adhesi (Gambar 3).

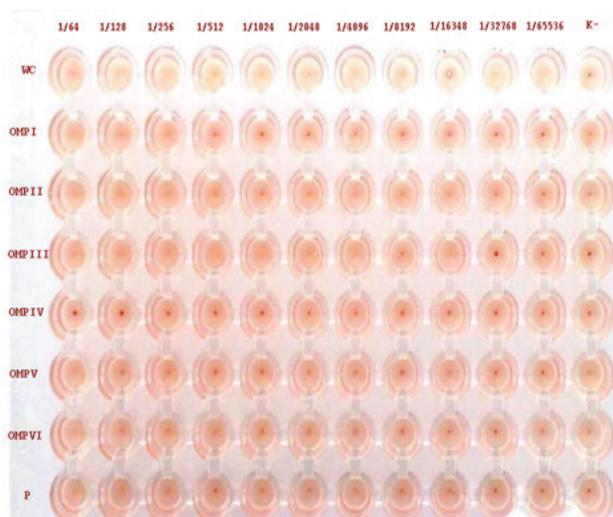
Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa tipe atau profil perlekatan bakteri *P. gingivalis* terhadap sel netrofil adalah tipe difus atau menyebar.

Isolasi Protein Hemaglutinin OMP *P. gingivalis*

Isolasi protein hemaglutinin OMP *P. gingivalis* dilakukan mengacu pada Winarsih, 1998 menggunakan modifikasi dari Evan's, 1978 (14). Hasil isolasi OMP *P. gingivalis* sebanyak enam kali koleksi OMP diseparasi dengan metode elektroforesis untuk mengetahui berat molekul (BM) protein pada OMP (Gambar 4).



Gambar 4. Profil Fraksinasi Outer Membrane Protein (OMP) *P. gingivalis* Hasil Elektroforesis SDS-PAGE dengan Pewarnaan Commasie Blue.

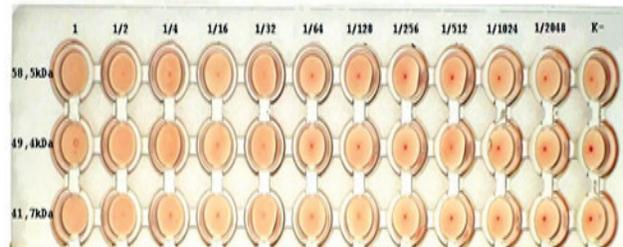


Gambar 5. Profil Hemaglutinasi Hasil Isolasi OMP *P. gingivalis* Menggunakan Eritrosit Mencit.

Keterangan: 1/64, 1/128, ... , 1/65536 = pengenceran protein; WC = whole cell bacteria.

Pada Gambar 4 diperoleh tiga protein utama yang paling menonjol pada koleksi OMP hasil isolasi dari *P. gingivalis* yaitu protein dengan BM 58,5 kDa; 49,4 kDa dan 41,7 kDa. Selanjutnya masing-masing koleksi dilakukan uji hemaglutinasi menggunakan sel eritrosit mencit. Profil hemaglutinasinya disajikan pada Gambar 5. Pada Gambar 5 terlihat bahwa OMP koleksi ketiga memberikan hasil hemaglutinasi terbaik ditandai dengan terbentuknya

aglutinat dan tidak terdapat titik pengendapan protein di dasar sumuran (*dotting*). Aglutinat OMP koleksi ketiga masih terbentuk pada titer yang lebih tinggi dibandingkan dengan koleksi isolat OMP lainnya yaitu pada pengenceran protein 1/4096. Sehingga OMP koleksi ketiga ini selanjutnya diproduksi untuk diisolasi protein-protein utamanya. Hasil isolasi protein-protein utama pada OMP *P. gingivalis* diuji hemaglutinasi untuk mendapatkan protein yang mempunyai titer aglutinasi tertinggi. Hasil uji aglutinasi tersebut disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Profil Hemaglutinasi Tiga Protein Utama OMP III *P. gingivalis* (58,5 kDa; 49,4 kDa dan 41,7 kDa).

Keterangan: 1/64, 1/128, ... , 1/65536 = pengenceran protein; WC = whole cell bacteria. Tampak bahwa pada protein OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa menunjukkan konsentrasi protein terendah dengan hasil hemaglutinasi positif yang ditandai dengan warna coklat merah

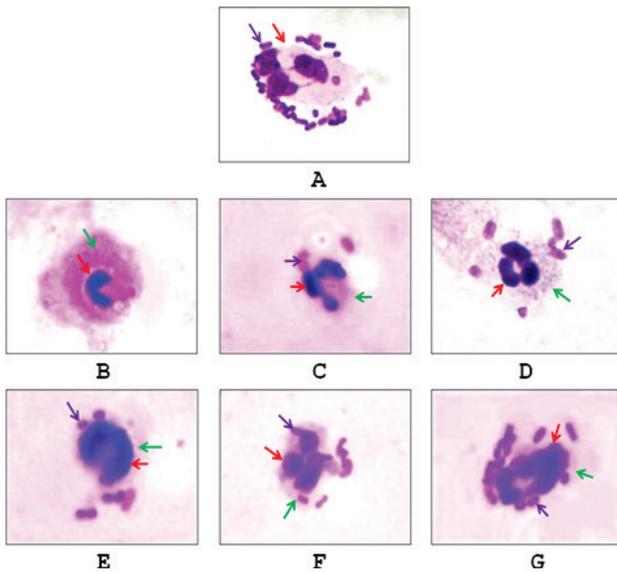
Berdasarkan hasil uji hemaglutinasi tersebut (Gambar 6) diperoleh hasil bahwa protein-protein OMP *P. gingivalis* merupakan protein hemaglutinin dengan aglutinasi terbaik oleh protein dengan BM 49,4 kDa. Aglutinat terbentuk hingga titer protein 1/4. Maka protein OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa disebut sebagai protein hemaglutinin.

Uji Hambatan Protein Hemaglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa terhadap Adhesi *P. gingivalis* pada Sel Netrofil

Dari hasil SDS-PAGE, elektruelusi serta uji hemaglutinasi maka protein hemaglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa dikaji kembali untuk menentukan protein tersebut sebagai protein adhesi. Pengkajian dilakukan dengan melakukan uji hambatan adhesi *P. gingivalis* pada netrofil oleh protein hemaglutinin yang dibuat dengan konsentrasi bertingkat 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25% dan 3,125%. Hasil uji hambatan protein hemaglutinin OMP *P. gingivalis* pada netrofil dapat dilihat pada Gambar 7.

Hasil analisis statistik data uji hambatan protein hemaglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa pada netrofil menunjukkan bahwa protein tersebut adalah protein adhesin. Semakin tinggi konsentrasi protein yang disalurkan maka hambatan adhesi *P. gingivalis* semakin besar, yaitu tampak jumlah *P. gingivalis* yang melekat semakin sedikit. Hasil tersebut juga didukung oleh analisis regresi dan diagram batang yang disajikan pada Gambar 8.

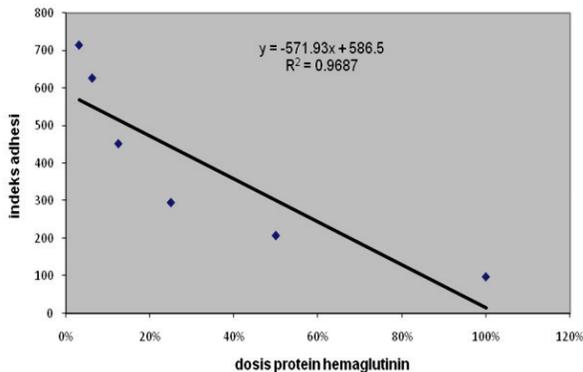
Protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa selanjutnya dikarakterisasi imunitasnya dengan *immunoblotting* melalui metode *Western-blotting* dan Imunositokimia.



Gambar 7. Uji Hambat Adhesi *P. gingivalis* oleh Protein Hemaglutinin OMP 49,4 kDa pada Netrofil.

Keterangan:Gambar A menunjukkan adhesi *P. gingivalis* pada sel netrofil tanpa hambatan OMP 49,4 kDa. Gambar B-G menunjukkan perbedaan indeks adhesi *P. gingivalis* akibat hambatan OMP 49,4 kDa dengan pengenceran konsentrasi bertingkat, masing-masing konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25% dan 3,125%.

→ *P. gingivalis* → Netrofil → OMP *P. gingivalis* berat molekul 49,4 kDa
Pewarnaan Giemsa (perbesaran 1000 x).

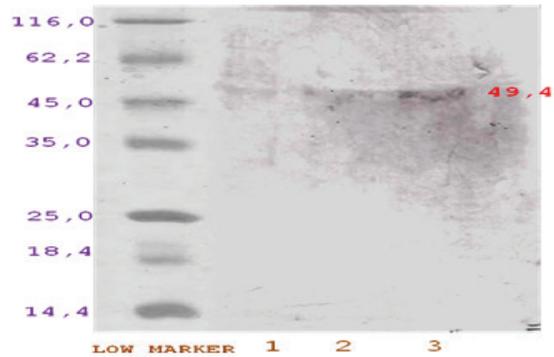


Gambar 8. Regresi Linier Antara Indeks Adhesi *P.gingivalis* dengan Dosis Pengenceran Protein Hemaglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa.

Deteksi Anti Protein Adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa

Karakterisasi imunologik bertujuan untuk mengetahui antigenitasnya dalam menginduksi respon imun humoral secara *in vivo*. Hasil *immunoblotting* melalui *Western-blotting* protein sub unit OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa dengan IgG mencit yang disuntik dengan protein sub unit *P. gingivalis* 49,4 kDa dapat dilihat pada Gambar 9.

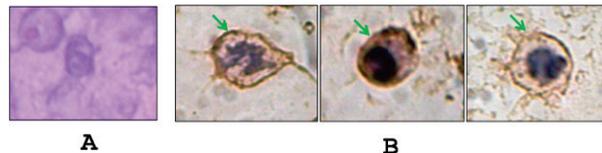
Pengamatan hasil *Western-blotting* menunjukkan adanya respon terhadap IgG mencit yang mengandung anti protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa baik dari sampel *crude* OMP koleksi ketiga (Lajur 1) maupun dari sampel protein hasil elektroelusi (Lajur 2 dan 3) (Gambar 9). Respon antibodi terhadap antigen protein adhesin OMP



Gambar 9. Hasil Uji Imunologik *Western-Blotting* Protein Adhesin *P. gingivalis* 49,4 kDa Terhadap IgG Mencit yang Disuntik dengan Protein Adhesin *P. gingivalis* 49,4 kDa.

Keterangan:Lajur 1 adalah hasil *Western-Blotting* dengan antigen *crude* OMP III. Lajur 2 dan 3 adalah hasil *Western-Blotting* dengan antigen protein adhesin *P. gingivalis* 49,4 kDa. Protein penanda menggunakan *low marker protein ladder* (Sigma). Berat molekul

P. gingivalis 49,4 kDa juga dibuktikan melalui teknik imunositokimia. IgG dalam serum mencit menunjukkan reaksi positif terhadap antigen netrofil yang telah disalut protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa (Gambar 10, tampak bahwa protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa menyalut netrofil mengelilingi membran selnya.



Gambar 10. Hasil Uji Imunologik Protein Adhesin *P. gingivalis* 49,4 kDa terhadap IgG Mencit yang Disuntik dengan Protein Adhesin *P.gingivalis* 49,4 kDa.

Keterangan:Gambar A menunjukkan hasil imunositokimia negatif dengan antigen sel netrofil yang disalut *bovine serum albumin*. Gambar B menunjukkan hasil imunositokimia positif dengan antigen netrofil yang di salut protein adhesin *P. gingivalis* 49,4 kDa. Teknik pewarnaan imunositokimia dengan kromogen DAB (perbesaran >1000x).

DISKUSI

Optimasi Waktu Optimum Inkubasi *Porphyromonas gingivalis* pada Netrofil

Porphyromonas gingivalis disebutkan sebagai mikroorganisme anaerob yang hidup dalam lingkungan anerobik pada *oral cavity*. Namun dengan adanya seperangkat genom pada bakteri, yaitu PG1582-PG1586 memungkinkannya untuk dapat bertahan dengan adanya oksigen di lingkungannya, namun kemampuannya bertahan terhadap oksigen sangat terbatas pada kadar yang rendah dalam waktu tertentu (21). Maka, dalam penelitian ini optimasi waktu inkubasi diperlukan mengingat adhesi dilakukan tidak dalam lingkungan anerobik, meskipun diketahui *P. gingivalis* mentoleransi keberadaan oksigen namun seberapa efektif bakteri tersebut dapat melekat pada netrofil dalam lingkungan aerobik perlu diketahui.

Pada hasil penelitian ini ditemukan bahwa waktu

optimum bagi *P. gingivalis* untuk secara efektif melekatinya pada netrofil adalah inkubasi selama lebih kurang 30 menit. Pada selang waktu tersebut terdapat 16,08 *P. gingivalis* yang melekat pada netrofil, dan penambahan waktu hingga 40 menit tidak memberikan penambahan berarti pada jumlah *P. gingivalis* yang melekat pada netrofil. Pada Gambar 2 terlihat bahwa grafik indeks adhesi mulai bergerak stasioner. Sehingga pada langkah selanjutnya dalam melakukan adhesi *P. gingivalis* pada netrofil digunakan waktu inkubasi selama 30 menit.

Ada beberapa dugaan yang dapat dijelaskan, diantaranya adalah bahwa setelah 30 menit kemampuan *P. gingivalis* untuk mentoleransi keberadaan oksigen menurun atau bahkan *P. gingivalis* tidak lagi aktif, kemudian dugaan berikutnya adalah bahwa setelah 30 menit reseptor pada netrofil yang berikatan dengan protein adhesin *P. gingivalis* telah jenuh dilekati oleh bakteri tersebut. Dalam hal ini diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mendukung dan membuktikan dugaan yang diberikan dari data yang diperoleh dalam penelitian ini, yaitu dilakukannya pengkulturan bakteri *P. gingivalis* setelah paparan oksigen dalam waktu tertentu untuk membandingkan viabilitasnya akibat lamanya terpapar oksigen, serta mengkarakterisasi reseptor netrofil yang dapat berikatan dengan *P. gingivalis* untuk mengetahui jumlah dan jenis reseptor netrofil yang dilekati *P. gingivalis*.

Adhesi *P. gingivalis* pada Netrofil

Adhesi *P. gingivalis* pada netrofil dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan dan tipe adhesi *P. gingivalis* pada netrofil manusia. Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa *P. gingivalis* mampu berlekatan dengan netrofil yang diisolasi dari darah manusia sehat, dan tipe adhesi bakteri tersebut pada sel netrofil tampak merupakan tipe adhesi difus. Adhesi tipe difus ditandai dengan gambaran bakteri yang menyebar merata di permukaan sel.

Kemampuan adhesi *P. gingivalis* pada netrofil penting untuk diketahui sebagai dasar untuk isolasi protein/ molekul adhesinnya dalam rangka evaluasi daya hambat protein tersebut terhadap adhesi bakteri *P. gingivalis* pada netrofil.

Kemampuan adhesi *P. gingivalis* pada netrofil juga menjelaskan bahwa *P. gingivalis* yang disebutkan pada berbagai studi mampu berinvansi secara viabel ke sirkulasi darah, maka bakteri tersebut secara viabel juga dapat bertemu langsung dengan agen inflamatorik netrofil dan berikatan melalui reseptor tertentu, yang kemudian diduga akan menginisiasi baik proses fagositosis maupun induksi *P. gingivalis* tersebut terhadap peningkatan aktivitas enzim-enzim degradatif pada netrofil, studi mengenai dampak peningkatan aktivitas netrofil serta mekanisme degradatifnya telah dijelaskan secara *in vitro* oleh Susilawati pada tahun 2008 (4).

Kemampuan *P. gingivalis* untuk melekat pada netrofil sejalan dengan beberapa penelitian yang menunjukkan kemampuannya melekat pada sel

atau substrat tertentu, meski tidak dijelaskan tipe adhesinya, namun Hiratsuka pada tahun 1996 juga telah menunjukkan kemampuan *P. gingivalis* untuk melekat pada sel epitel mulut melalui perantara *outer membrane protein* (22). Deshpande *et al*, 1999; Dorn *et al*, 1999; Chiu, 2001; Harasthy *et al*, 2000 dan Stelzel *et al*, 2002 juga menemukan bahwa *P. gingivalis* memiliki kemampuan melekat pada sel endotel di sirkulasi darah manusia (6-10).

Uji Hambat Adhesi Protein Hemaglutinin OMP *P. gingivalis* terhadap adhesi *P. gingivalis* pada Netrofil Manusia

Kemampuan adhesi *P. gingivalis* pada suatu substrat atau sel oleh Lamont & Jenkinson, 1998 dijelaskan dapat dilakukan melalui OMP-nya secara *afimbial adhesion*, lebih lanjut penelitian oleh Hiratsuka, 1996 telah membuktikan bahwa agregasi bakteri *P. gingivalis* serta koagregasinya dengan bakteri lain diperantari oleh OMP *P. gingivalis* (5,22).

Selanjutnya, mengacu pada perumusan masalah, maka pada penelitian ini dilakukan pendekatan dalam rangka menemukan protein adhesin OMP *P. gingivalis* melalui karakterisasi parsial protein tersebut. Karakterisasi yang dilakukan mencakup penentuan berat molekul (BM) protein, penentuan protein hemaglutinin serta uji imunologik.

Pada penelitian ini, OMP *P. gingivalis* diisolasi menggunakan detergent NOG 0,5% yang disebutkan oleh Zhang, 2006 sebagai detergent terbaik dengan selektivitas optimal dalam memisahkan protein membran, detergent ini melarutkan membran dengan sangat efektif serta dapat dengan mudah dipisahkan melalui proses dialisis (23). Sejauh ini belum ditemukan bukti yang menunjukkan inaktivasi protein akibat penggunaan detergent ini, sehingga dalam penelitian ini diharapkan protein molekul adhesi yang diisolasi tidak akan mengalami perubahan fungsi dan dapat mewakili perannya sebagai protein adhesin pada bakteri *P. gingivalis*. OMP yang isolasi dari membrane bakteri dilakukan sebanyak 6x koleksi untuk memastikan semua OMP terisolasi secara optimal. Keenam koleksi tersebut dibuat profil proteinnya untuk menggunakan SDS-PAGE. Pada gambaran profil SDS-PAGE (Gambar 4) dapat dilihat keberadaan protein-protein yang paling menonjol pada semua koleksi isolat OMP, yaitu protein dengan berat molekul 58,5 kDa; 49,4 kDa dan 41,7 kDa. Protein-protein tersebut diketahui berat molekulnya berdasarkan hasil interpolasi pada protein penanda (*low marker protein ladder*).

Berdasarkan uji hemaglutinasi menunjukkan bahwa isolat OMP koleksi ketiga memberikan titer tertinggi (Gambar 5), yang menjelaskan bahwa OMP isolat ketiga mampu mengaglutinasi eritrosit mencit lebih baik dibandingkan dengan koleksi isolat OMP yang lain, hasil ini memberikan informasi bahwa karakteristik biologis pada OMP isolat ketiga memiliki lebih banyak kesamaan dengan reseptor dari pada koleksi isolat OMP lainnya, dan bila mengacu pada Mc-Garrey dan Alfred, 1994

Hasil ini menunjukkan bahwa protein hemagglutinin lebih banyak berada pada OMP isolat ketiga (24).

Ada hasil menarik yang dapat dilihat dari Gambar 4 dan 5. pada Gambar 4 tampak profil separasi protein isolat OMP koleksi ketiga yang konsentrasinya hampir sama dengan isolat OMP koleksi keempat, namun pada Gambar 5.5 ditunjukkan hasil hemagglutinasinya yang tidak relevan dengan gambar tersebut, dimana OMP koleksi keempat memberi hasil hemagglutinasinya negatif sejak pengenceran eritrosit tertinggi yang menunjukkan bahwa protein OMP tersebut tidak dapat mengaglutinasi sel darah merah. Hal ini diduga akibat keberadaan protein hambat aglutinasi yang banyak terisolasi pada OMP keempat, sesuai penelitian oleh Sumarno dkk, 1991 yang menemukan protein 12 kDa sebagai bentuk monomer dari bentuk tetramer fraksi protein hemagglutinin, namun berfungsi sebagai penghambat adhesi (3). Penelitian lebih lanjut diperlukan berkaitan dengan dugaan adanya protein hambat aglutinasi pada isolat OMP keempat.

Beberapa studi menunjukkan beberapa hasil profil OMP yang berbeda dengan yang ditemukan pada penelitian ini, diantaranya Hiratsuka, 1996 menemukan keberadaan protein dengan BM 40 kDa pada OMP *P. gingivalis* (22). Kemudian Mouton, 1991 menemukan keberadaan protein dengan BM 43 kDa (25). Lebih lanjut, Mouton juga menemukan keberadaan protein 49 kDa sebagaimana yang ditemukan pada penelitian ini. Selain itu, Lepine, 1996 dan Progulske, 1996 juga mendeteksi keberadaan protein 49 kDa pada OMP *P. gingivalis* (26,27).

Berbagai perbedaan mengenai BM protein pada OMP yang ditemukan dimungkinkan karena perbedaan metode separasinya selain karena perbedaan dalam menginterpolasi *band-band* protein pada protein petanda. Namun adanya beberapa studi yang juga telah mempelajari protein-protein yang sama dengan yang ditemukan pada penelitian ini semakin menguatkan bukti bahwa protein-protein yang menonjol yang tampak pada hasil (Gambar 4) diduga merupakan protein utama dan diharapkan sebagai protein hemagglutinin.

Untuk membuktikan bahwa protein-protein yang terseparasi pada profil OMP *P. gingivalis* merupakan protein hemagglutinin maka setelah masing-masing protein tersebut diproduksi melalui gel elektroforesis dan dielektroelusi, ketiga protein tersebut di uji hemagglutinasinya. Berdasarkan data yang disajikan pada Gambar 6 terlihat bahwa protein seberat 49,4 kDa memiliki titer tertinggi dibandingkan kedua protein lainnya, hasil ini menunjukkan bahwa protein tersebut mempunyai kemampuan mengaglutinasi eritrosit menciit terbaik. Artinya karakteristik biologi protein tersebut lebih memiliki banyak kemiripan dengan reseptor eritrosit sehingga berkorelasi positif dengan eritrosit.

Menurut Mc-Garrey dan Alfred, 1994 bahwa uji hemagglutinasinya bertujuan untuk mendapatkan protein hemagglutinin yang umumnya merupakan protein adhesin (24).

Alam *et al*, 1996 menjelaskan bahwa pada beberapa bakteri patogen usus seperti *Vibrio cholera* ada korelasi positif antara sifat kemampuan aglutinasi dengan kemampuan adhesi pada mukosa usus (28). Mc-Garrey dan Alfred (1994) juga telah membuktikan bahwa ada beberapa adhesin bacterial seperti pada *Helicobacter pylory*, *Bordetella pertusis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dapat mengaglutinasi sel darah merah (24).

Terkait dengan kemampuan *P. gingivalis* dalam mengaglutinasi sel darah merah, Hiroaki *et al*, 2004 menjelaskan bahwa organisme ini memiliki protein hemagglutinin yang merupakan protein adhesin sebagai alat untuk melekat tidak hanya pada sel-sel di jaringan gingival, namun ligan yang sama juga dipakai untuk menempel pada sel darah merah dan melisisnya untuk mengambil hemin demi kebutuhan nutrisinya (29). Berdasarkan uraian di atas maka protein 49,4 kDa dari OMP *P. gingivalis* dapat dikatakan sebagai protein hemagglutinin.

Untuk menguji protein hemagglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa sebagai molekul adhesi pada sel netrofil, maka dapat diketahui dengan cara menghitung indeks adhesi, yaitu jumlah bakteri yang melekat pada setiap sel yang dihitung pada 100 sel (12). Sedang untuk membuktikan peran protein hemagglutinin OMP *P. gingivalis* sebagai protein adhesin, dilakukan uji penghambatan adhesi *P. gingivalis* oleh protein hemagglutinin pada sel netrofil. Penghambatan oleh protein hemagglutinin dilakukan dengan menjenuhkan reseptor yang terlibat dalam proses adhesi sehingga ada proses inhibisi atau penghambatan perlekatan *P. gingivalis* (20).

Pada penelitian ini, uji penghambatan oleh protein hemagglutinin dilakukan dengan 6 konsentrasi protein bertingkat, yaitu yang paling pekat, tanpa pengenceran 100%; kemudian diencerkan menjadi 50%; 25%; 12,5%; 6,25% dan 3,125%. Masing-masing protein tersebut disalutkan pada sel netrofil sebelum diinkubasi dengan *P. gingivalis*. Berdasarkan data penghambatan adhesi *P. gingivalis* oleh dosis bertingkat protein hemagglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa (Tabel 2) serta gambaran regresinya (Gambar 8) terlihat bahwa semakin meningkat konsentrasi protein hemagglutinin yang disalutkan maka semakin sedikit *P. gingivalis* yang dapat melekat pada sel netrofil.

Hasil tersebut mengartikan bahwa protein hemagglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa merupakan protein adhesin terhadap netrofil dan diduga memiliki reseptor tertentu yang spesifik dapat berikatan dengan protein hemagglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa. Hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Hiroaki *et al* (2004) yang menjelaskan bahwa protein 40 kDa dari OMP *P. gingivalis* ditemukan dapat menghambat perlekatan dan kolonisasi dari bakteri *P. gingivalis*.

Menurut Abraham *et al*, 1999 ada tiga tipe interaksi *adhesion*-reseptor (30). Tipe pertama berdasarkan pengenalan lektin-karbohidrat. Tipe kedua melibatkan interaksi protein-protein yaitu protein yang terdapat pada bakteri dengan

protein pada permukaan mukosa. Tipe ketiga, melibatkan interaksi antara protein dan lipid dimana lipid bisa berada pada sel hospes atau permukaan sel bakteri. Sebagian besar adhesin adalah spesifik terhadap karbohidrat dan telah diketahui sebagai lektin. Lektin akan mengikat bakteri dengan karbohidrat dari glikoprotein atau glikolipid yang terdapat pada sel epitel atau sel lain dari hospes. Contoh ikatan lektin-karbohidrat adalah lektin (*type-1 fimbriae*) dengan reseptor glikoprotein (32). Lektin ini dapat membentuk struktur *fimbriae*. Menurut Goldhar, 1994 lektin dapat membentuk struktur *fimbriae*, kapsul atau komponen OMP dari bakteri gram negatif (32).

Dari gambar uji hambat adhesi oleh protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa (Gambar 7) tampak protein tersebut menyulut netrofil mengelilingi membran sel, hal ini didukung data imunositokimia terhadap anti protein adhesin tersebut (Gambar 10), terlihat gambaran coklat merata diseluruh permukaan netrofil yang menunjukkan perlekatan protein adhesin tersebut, hal ini sesuai dengan jenis perlekatan bakteri *P. gingivalis* pada netrofil tanpa salutan protein adhesin. Dapat dikatakan bahwa netrofil yang telah disulut protein adhesin akan menempati reseptor yang digunakan oleh bakteri untuk melekat pada sel netrofil (Gambar 7), dan semakin tinggi konsentrasi protein adhesin semakin banyak reseptornya pada netrofil yang ditempati sehingga semakin sedikit bakteri *P. gingivalis* yang dapat menempel (Gambar 7).

Penghambatan perlekatan *P. gingivalis* pada sel netrofil memiliki arti penting berkaitan dengan kemampuannya menginduksi peningkatan aktivitas kolagenolisis netrofil pada mekanisme ruptur plak aterosklerotik in vitro (4). Dengan ditemukannya protein adhesin yang dapat memblok perlekatannya pada netrofil maka harapan protein adhesin ini untuk dijadikan sebagai sub unit vaksin sebagai penginduksi imunitas aktif. Monoklonal antibodinya untuk imunitas pasif dapat menjadi harapan untuk mencegah aktivasi enzim-enzim degradatif dari netrofil, selain dapat mencegah bakteri tersebut melakukan invasinya pada sel epitel. Invasi bakteri pada sel epitel dimodulasi oleh fibronektin. Langkah ini merupakan mekanisme pertahanan non-spesifik dan melibatkan banyak sel dan molekul. Langkah berikutnya mencakup interaksi yang lebih spesifik dari protein bakteri, yaitu interaksi dengan reseptor lain yang menghasilkan afinitas interaksi sel inang yang tinggi. Sehingga terjadi internalisasi bakteri pada sel inang. Maka apabila dengan dihasilkannya antibodi yang dapat memblok protein adhesin bakteri *P. Gingivalis* ini maka patogenitasnya diharapkan dapat direduksi. Hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut.

Deteksi Anti Protein Adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa

Suatu antigen belum tentu antigenik, dan antigen yang antigenik pasti bersifat imunogenik. Penemuan protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa dalam penelitian ini juga dikarakterisasi imunogenitasnya untuk mengetahui bagaimana

sistem imun tubuh merespon antigen tersebut. Dalam menginduksi terbentuknya antibodi terhadap paparan antigen protein protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa, mencit disuntikkan dengan antigen tersebut dengan penambahan adjuvant, meskipun disebutkan oleh Maeba *et al*, 2005 bahwa antigen yang berasal dari OMP *P. gingivalis* umumnya bersifat imunogenik tanpa pemberian adjuvant, namun dalam penelitian ini tetap digunakan mengingat sifat adjuvant yang antigenik serta dapat menguatkan pembentukan antibodi (33).

Hasil *immunoblotting* dengan metode *Western-blotting* (gambar 5.10) serta didukung dengan data imunositokimia (Gambar 5.11) menunjukkan bahwa protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa dapat dideteksi dengan antibodi poliklonal anti protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa. Sehingga dapat dikatakan bahwa antigen tersebut bersifat imunogenik, karena berhasil menginduksi imunitas humoral dari tubuh mencit yang diimunisasi dengan antigen tersebut.

Pembuktian bahwa antigen protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa bersifat imunogenik selanjutnya pada penelitian berikutnya dapat menjadi landasan menjadikan imunitasi dengan protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa sebagai target terapeutik untuk mencegah infeksi *P. gingivalis* terutama berkaitan dengan kemampuannya menginterupsi aktivitas netrofil.

Penelitian berkaitan dengan imunitasi menggunakan protein dari OMP *P. gingivalis* pernah dilakukan oleh Maeba *et al*, 2005 (33). Pada studi yang dikakukan tersebut dijelaskan bahwa imunitasi secara transkutan dengan OMP *P. gingivalis* 40 kDa menghasilkan respon IgG baik di serum maupun di saliva. Antibodi tersebut juga dibuktikan dapat mencegah agregasi *P. gingivalis* dan koagregasi oleh bakteri lain yang diperhitungkan menjadi patogen dalam menyebabkan penyakit periodontitis. Hasil penelitian tersebut memberi harapan terhadap metode dalam mencegah infeksi *P. gingivalis* yang kini menjadi menjadi penting bagi kesehatan sistemik.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh berbagai temuan diantaranya adalah didapatkannya protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa. Protein ini diharapkan dapat menjadi kandidat vaksin untuk pencegahan infeksi *P. gingivalis*. Selain itu digunakannya sel fagosit dalam hal ini difokuskan pada netrofil merupakan hal baru dalam uji adhesi bakteri, karena sebelumnya studi berkaitan dengan adhesi *P. gingivalis* selalu menggunakan sel epitel.

KESIMPULAN

Protein 49,4 kDa hasil isolasi dari OMP *P. gingivalis* merupakan protein hemaglutinin yang dapat mengaglutinasi sel eritrosit mencit. Protein hemaglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa merupakan protein adhesin

terhadap sel netrofil. Peningkatan konsentrasi protein hemagglutinin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa menurunkan adhesi bakteri *P. gingivalis* pada netrofil. Protein adhesin OMP *P. gingivalis* 49,4 kDa merupakan antigen yang dapat dikenali oleh antibodi poliklonal.

Untuk pengembangan, perlu penelitian lebih lanjut mengenai sekuens gen protein adhesin *P. gingivalis* 49,4 kDa untuk mengetahui asam amino yang berperan dalam proses adhesi serta mengkarakterisasi reseptor pada sel yang berikatan dengannya untuk menyempurnakan informasi mengenai mekanisme perlekatannya. Hasil ini perlu ditindaklanjuti dengan membuat antibodi monoklonal yang spesifik terhadap molekul adhesin *P. gingivalis* 49,4 kDa sebagai upaya untuk membuat agen *passive immunotherapy* maupun metode diagnostik yang lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Joesoef, H. Andang, Setianti, Budhi. *Hipertensi sekunder*. Buku Ajar Kardiologi. Jakarta; FK UI. 2003.
- Constantinides P. *General pathobiology*. Appleton & Lange. Norwalk. Connecticut; US. 1994.
- Sumarno, Noorhamdani AS, Samsul Islam, Sjoekoer M. Dzen, Ehara M, dan Ichinose Y. *Purifikasi protein hambatan aglutinasi Vibrio cholerae El Tor*. Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya. 1991;10(5): 179-186.
- Susilawati IDA. *Induksi Porphyromonas gingivalis terhadap aktivitas kolagenolisis netrofil pada kolagen tipe IV (studi in vitro mekanisme kolagenolisis plak aterosklerotik)*. [Disertasi]. Malang: Universitas Brawijaya. 2008.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. *Life below the gum kolom: patogenik mechanism of porphyromonas gingivalis*. Microbiology and Molecular Biology Review. 1998; 62 (4):1244-1263.
- Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. 1999. *Invasion of aortic and heart endothelial cells by Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity. 1999; 66(11): 5337-5343.
- Dorn BR, Dunn WA, Fox AP. *Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens*. Infection and Immunity. 1999; 7(11): 5792-5708.
- Chiu B. *Multiple infection in carotid atherosclerotic plaques*. Am Heart J. 2001;138(5 Pt 2): 534-6.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. *Identification of periodontal pathogens in atheromathosus plaques*. J. Periodontol. 2000; 71 : 1554-60.
- Stelzel M, Conrads G, Pankuweit S, Maisch B, Vogt S, Moosdorf R, Flores-de-Jacoby L. 2002. *Detection of Porphyromonas gingivalis DNA in aortic tissue by PCR*. J. Periodontol. 2002 Aug; 73(8): 868-70.
- Todar K. *The Mechanisms of bacterial pathogenicity*. Departement of Bacteriology. University of Wisconsin; 2002.
- Sumarno. *Karakterisasi molekuler protein adhesi Vibrio cholerae 01 MO94 dan protein reseptornya pada sel epitel usus halus tikus putih (Wistar)*. Studi Patogenesis *V.cholerae* 01 MO94. [Disertasi]. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga. 2000.
- Ekpo, Pattama., Utane, et al. *Expression and purification of 30 Kilodalton protein antigen of ara-Burkholderia pseudomallei*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2009; 40(2): 295-301.
- Winarsih S, Sumarno, Roekistiningsih. *Kajian fungsi dan sifat imunogenisitas protein hemagglutinin 32 kDa dan 20 kDa pada Helicobacter pylori*. Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya. 1998.
- Finkelstein RA and Henne LF. 1982. *Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by Vibrio cholera*. Infect Immun. 1982; 36: 209-269.
- Romanelli R, Mancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CAG. *Activation of neutrophil collagenase in periodontitis*. Infection and Immunity. 1999; 69(5): 2319-2326.
- Towbin H, Stahelin T, and Gordon J. *Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979; 76: 4350-4354.
- Romanelli R, Mancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CAG. *Activation of neutrophil collagenase in periodontitis*. Infection and Immunity. 1999; 69(5): 2319-2326.
- Condorelli F, Scalisi G, Cali G, Rossetti B, Nicoletti and Blue AML. 1998. *Isolation of Porphyromonas gingivalis and detection of immunoglobulin a specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid*. JCM. 1998; 36(8): 2322-2325.
- Nagayama K, Oguchi T, Arita M, Honda T. *Purification and characterization of a cell associated hemagglutinin of Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun. 1995; 63(5) : 1987-1992.
- Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, et al. *Complete genome sequence of the pathogenic bacterium Porphyromonas gingivalis strain W83*. Journal of Bacteriology. 2003; 185(18): 5591-5601.
- Hiratsuka K, Yoshida W, Hayakawa M, Takiguchi H, Abiko Y. *Polymerase chain reaction and an outer membrane protein gene probe for the detection of Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett. 1996; 138(23): 16772.
- Zhang G, Neubert. *Use of detergent to increase selectivity of immunoprecipitation of tyrosine phosphorylated peptides prior to identification by*

MALDI quadrupole-TOF MS. *Proteomics*. 2006; 6(2): 571-578.

24. Mc. Garrey DJ, Alfred DR. *Characterization of a cell associated hemagglutinin of Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 1994; 62(10): 4587-4593.
25. Mouton C, Ni ED, Deslauriers M, Lamy L. *The hemagglutinating adhesin HA-Ag2 of Bacteroides gingivalis is distinct from fimbriin*. *Oral Microbiol Immunol.* 1991; 6(1): 6-11.
26. Lepine J, Messner HA. *Pluripotent hemopoietic progenitors (CFU-GEMM) in chronic myelogenous leukemia*. *The International Journal of Cell Cloning.* 1996; 1(4): 230-239.
27. Progulske-Fox A, S. Tumwasorn, and S. C. Holt. *The expression and function of a Bacteroides gingivalis hemagglutinin gene in Escherichia coli*. *Oral Microbiol. Immunol.* 1989; 4: 121131.
28. Alam M, Miyoshi SI, Tomochika KI, Shinoda S. *Purification and characterization of novel hemagglutinin from Vibrio mimicus : 39-kDa major outer membrane protein and lipopolysaccharide*. *Infect. Immune.* 1996; 64: 4035-4041.
29. Hiroaki, Tagawa, Kiyama K, Michiko, Sheng YL, Abiko Y. *Inhibition of hemagglutinating activity by monoclonal antibody againsts Porphyromonas gingivalis 40-kDa outer membrane protein*. *Hybridoma and Hybridomics.* 2004; 23(3).
30. Abraham SM, Sharom N, Ofek L. *Adhesion of bacterial to mucosal surfaces*. Di dalam Sanarto, S. Laporan Penelitian Disertasi. Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya; 1999.
31. Wu, J Diep, TS Ho VA. *Quantification of bacteria in blood of typhoid fever patients and relationship between countd and clinical features, transmissibility and antibiotic resistance*. *J. Clin Microbiol.* 1999; 70: 551-557.
32. Goldhar, J. *Bacterial lectinlike adhesions : determination and specificity in bacterial pathogenesis. methods in enzymology*. Academic Press. San Diego. 1994; 236: 211-231.
33. Maeba Satomi, Shigeo Otake, Jun Namikoshi, et al. 2005. *Transcutaneous immunization with a 40-kDa outer membrane protein of Porphyromonas gingivalis induces specific antibodies which inhibit coaggregation by P. gingivalis*. *J Vaccine.* 2005; 23: 2513-2521.