

Kemampuan *Whole Cell Helicobacter pylori* dalam Menginduksi Degradasi Kolagen Tipe IV Melalui Peningkatan Aktivitas Makrofag

Whole Cell Helicobacter pylori Ability to Induce Collagen Type IV Degradation through Increase Macrophage Activity

Yuly Peristiowati¹, Sumarno², I Ketut Gede Muliarta², Murwani³

¹ Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Surya Mitra Husada Kediri

² Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³ Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Helicobacter pylori berperan dalam *infark miokard* akut dan penyakit jantung koroner. Sitotoksin *H.pylori* dapat menginduksi sitokin inflamasi IL1- β dan TNF α yang mengaktivasi enzim proteolitik MMP-9 dan menyebabkan degradasi kolagen melalui plak aterosklerosis. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan kemampuan *whole cell H.pylori* dalam menginduksi degradasi kolagen tipe IV melalui peningkatan aktifitas *makrofag*. Aktivitas *makrofag* dilihat dari kadar TNF α dan IL1- β yang diukur dengan metode Elisa. Hasil uji ANOVA mengindikasikan perbedaan signifikan ($p < 0,001$) aktifitas *makrofag* pada kelompok normal dan *whole cell H.pylori*. Produksi enzim MMP-9 dapat dideteksi melalui gelatine zymography dilanjutkan dengan *western blotting* pada berat molekul 93 kDa. Fragmentasi kolagen didapatkan pada fragmen 61,2 kDa dan 29 kDa. Dapat disimpulkan bahwa *H.pylori* dapat menginduksi degradasi kolagen tipe IV melalui peningkatan *makrofag*. Temuan ini juga mendukung patomekanisme *infark miokard*.

Kata Kunci : Kolagen Tipe IV, makrofag, *whole cell H.pylori*

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) an association with acute myocardial infraction and cronic coronary disease. Bacteri cytotoxin can induce inflammatory cytokine produce IL1- β and TNF α , can acitivated proteolotic enzyme MMP-9, and cause collogen degradation by plague atherosclerosis. This research aim to provit the whole cell *H.pylori* ability to induce the degradasi of collagen of type IV by increase macrophage activity. Macrophag activity were seen from TNF α and IL1- β level by ELISA methode. Anova statistic analyse result show signifigan defferent (0,001) bettween group control with macrophage induce whole cell *H.pylori*. Enzyme MMP-9 production detected with the gelatine zymography continued by western blotting with molecule weight 93 kDa. Collogen fragmentation result of molecule weight which fragment 61,2 kDa and 29 kDa. It could be concluded that whole cell *H.Pylori* ability to induce the degradation of collagen type IV, by increase macrophageag activity. So that result of this research can support the patomekanism myocardial infraction disease.

Keywords: Collagen Type IV, macrophage, *whole cell H.pylori*

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 26, No. 1, Februari 2010; Korespondensi: Yuly Peristiowati. Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Surya Mitra Husada Kediri, Jl. Manila No. 37 Kediri Tel. (0354) 685130 Email: yulystikes@gmail.com

PENDAHULUAN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) merupakan bakteri utama penyebab gastritis kronis pada manusia dan banyak dijumpai di seluruh dunia(11). *H. pylori* juga dikaitkan dengan penyakit ,antara lain penyakit kardiovaskuler, khususnya strain yang lebih virulen (2). Pada saat ini *H. pylori* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit kardiovaskuler (3). Diyakini bahwa penyakit inflamasi mempunyai peran yang penting terhadap patogenesis penyakit kardiovaskuler (4).

Dari hasil pemeriksaan serologi penderita Infark Miokard Akut terhadap infeksi mikroorganisme, diketahui bahwa 77,77 % disebabkan oleh infeksi *H. pylori*(5). *Cytotoxin* dari bakteri tersebut dapat menginduksi produksi sitokin IL-1- β dan TNF α , yang selanjutnya mengaktivasi vaskuler endothelium (6).

Aterosklerosis merupakan salah satu penyakit inflamasi yang berhubungan dengan reaksi imun (7). Pada lesi aterosklerotik, ditemukan makrofag dan limfosit dalam jumlah banyak, sel mast serta sel B (7). Pada proses inflamasi, sel-sel radang yang teraktivasi akan meningkatkan produksi proenzim, diantaranya *Matrix Metalloprotease* atau MMPs. Proenzim ini dapat diubah menjadi enzim aktif yang menyebabkan lisisnya kolagen (8). Apabila proses ini terjadi pada permukaan plak aterosklerotik maka serabut kolagen yang melindungi plak akan mengalami lisis sehingga menjadi tipis dan akhirnya mudah ruptur (9).

Kolagen tipe-IV merupakan komponen utama dari membran basal vaskular yang mudah rusak oleh aktivitas proteolitik enzim MMP(10). *Outer membrane H. pylori* berisi *phospholipids* dan *lipopolysaccharide* (LPS)(11). Pada *outer membrane H. Pylori* juga berisi kolesterol glucosides (12). LPS pada OMP *H. pylori* diduga juga merupakan endotoksin dapat menimbulkan efek sistemik pada host sehingga mempengaruhi fungsi lokal sel-sel dinding vaskular, menurunkan sistem resistensi vaskuler, mengaktifkan endothelium yang berhubungan dengan evolusi dan pembentukan ateroma yang pada akhirnya menyebabkan disrupsi plak (13).

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah *whole cell H. pylori* mampu menginduksi degradasi kolagen tipe IV melalui peningkatan aktivitas makrofag.

METODE

Preparasi Bakteri

Helicobacter pylori didapatkan dari laboratorium sentral Biomedik Rumah Sakit Umum Mataram kemudian dilakukan uji biokimia untuk mengidentifikasi *H. pylori* meliputi uji pewarnaan gram, uji urease, uji oksidase, uji katalase, uji gula-gula.

Isolasi dan Preparasi Monosit

Isolasi monosit dengan menggunakan metode *Histopaque* (Sigma-*Leukocyte separation*). Monosit diisolasi dari *buffy coat Peripheral blood* individu sehat sebanyak 50 ml. Sel mononukleus yang terdapat pada *buffy coat* diperoleh menggunakan prosedur pemisahan dengan Ficoll-Hypaque dan selanjutnya dicuci dengan medium RPMI yang mengandung HEPES 25 mM, 1,5 ml L-glutamin, 10 mg/ml *gentamycine*, fetal *bovine serum* 10%. Sel diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C, dengan tekanan CO₂ 5%. Sel dicuci lagi sebanyak 2x dengan RPMI

yang mengandung HEPES 25 mM, 1,5 ml L-glutamin, 10 mg/ml *gentamycine*, fetal *bovine serum* 10%. Sel diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C, dengan tekanan CO₂ 5%. Sel dicuci lagi sebanyak 2x dengan *serum free*. Sel dikultur diatas *glass coverslip*, pada plat-titermikro 24 sumuran dengan kepadatan 25x10³ sel/sumuran. Kemudian ditambahkan medium komplet yang berisi FBS 10%, PMA 10⁻⁷ (*pharbol 12-myristate 13-acetate*). Selanjutnya sel monosit diinkubasi selama 7 hari sampai berdiferensiasi menjadi makrofag.

Infeksi Bakteri

H. pylori dalam medium cair sebelum diinduksikan pada makrofag dihitung konsentrasinya dengan menggunakan Spektrofotometri. Untuk menentukan konsentrasi 10⁸ sel/mL sampai mencapai OD 1. Bila OD 1 maka untuk menginduksikan bakteri dengan makrofag diperlukan 300 μ L *H. pylori*. Selanjutnya bakteri dalam medium dipipet dan diambil 2 mL dan dimasukkan kedalam falcon 15 mL. Kemudian disentrifus 3000 rpm, pada suhu kamar selama 10 menit. Pelet diambil dan supernatan disisihkan. Kemudian pelet di cuci menggunakan RPMI atau PBS. Selanjutnya sentrifus lagi 3500 rpm, pada suhu kamar 10 menit. Pelet diambil, dan supernatan dibuang. Pelet ditambahkan medium komplet (tanpa antibiotik). Bakteri siap diinduksikan pada makrofag.

Aktivitas Makrofag

Peningkatan aktivitas makrofag yang diinduksi dengan *whole cell H. pylori* yang dilihat dari peningkatan kadar TNF α dan IL1- β yang diperiksa menggunakan metode ELISA. Selanjutnya aktivitas makrofag dilihat dari produksi MMP-9 yang dihasilkan.

Deteksi Aktivitas MMP-9

Enzim MMPs diuji dengan menggunakan metode *gelatin zymography*. *Gel polyacrylamide* 7,5% berisi gelatin 2 mg/ml substrat yang diduga berisi enzim berasal dari supernatan yang diinfeksi makrofag. *Gel polyacrylamide running* dengan *tris-glycine SDS running buffer*, dan *running* pada kondisi voltase konstan (120 V), kuat arus (awal: 30 40 mA/gel dan akhir: 8 12 mA/gel) dalam 90 menit. Gel dilakukan *renaturasi* 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 (24 jam). Gel dilakukan *staining* dengan *comassie brilliant blue R-250*. Untuk mendeteksi MMP-9 dilanjutkan dengan uji *western blotting*. Enzim MMP-9 mempunyai berat molekul 93 kDa.

Degradasi Kolagen Tipe IV

Supernatan yang berasal dari makrofag yang diinduksi *H. pylori* diyakini berisi komponen collagenolytic seperti MMP-9 yang selanjutnya direaksikan dengan kolagen tipe IV (sigma) 50 μ g/ml dengan perbandingan 1:1, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam *waterbath*. Sebelum direaksikan dengan supernatan kolagen tipe IV didialisis dulu selama 3 hari.

Fragmentasi Kolagen Tipe IV

Substrat kolagen tipe IV dilabel dengan biotin (*biotinylated collagen substrate*) kemudian didialisa selama 3 hari. Kolagen yang sudah berbiotin ditambahkan pada

supernatan (MMPs) dari whole cell *H. pylori* dan protein, kemudian diinkubasikan selama semalam dalam *waterbath*. Supernatan yang sudah bercampur kolagen tipe IV dilihat profil degradasinya dengan menggunakan metode *ligan blotting* dengan SDS - PAGE 12%. Hasil elektroforesis degradasi kolagen tipe IV dipindahkan ke membran NC menggunakan alat *semi dry blotter* buatan Biorad. Membran NC direndam dalam 5% skim-milk selama 24 jam pada 4°C. Cuci dengan TBS-T 3x 5 menit, inkubasi SA-HRP 1 jam. Membran NC direndam dengan TMB substrat selama 1030 menit pada ruang gelap. Membran NC dibilas dengan akuades dan dikeringanginkan. Kemudian hasilnya di analisa.

HASIL

Persiapan *H. pylori*

Helicobacter pylori yang didapat dari Laboratorium Sentral Biomedik Rumah Sakit Umum Mataram. Dari hasil uji ulang secara biokimiawi *H. pylori* dengan metode *Microbact System 24E* yang dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya didapatkan : uji oksidase, motility, nitrat, glukose, manitol, xylose, ONPG, indole, urease, malonate, sorbitol, rhamnose, lactose, arabinose, arginin semuanya positif. Dari hasil uji biokimia tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri tersebut adalah *Helicobacter pylori* (Gambar 1).

OXOID

MICROBACT™

IDENTIFICATION KITS

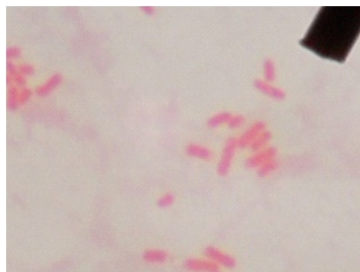
MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E

445 / 26

		GNB 24E																										
		GNB 12A / 12E						GNB 12B																				
		Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	YP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result / Resultado / Ergebnis		+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
Result / Resultado / Ergebnis		+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Result / Resultado / Ergebnis		+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sum / Suma / Summe		7			0	7		7		7		0		2		6		6		1								
Sum / Suma / Summe		7			0	7		7		7		0		2		6		6		1								
Sum / Suma / Summe		7			0	7		7		7		0		2		6		6		1								
Sum / Suma / Summe		7			0	7		7		7		0		2		6		6		1								
Identification / Identifikation / Identifizierung		Helicobacter pylori														87, 15%												
Identification / Identifikation / Identifizierung																												
Identification / Identifikation / Identifizierung																												
Identification / Identifikation / Identifizierung																												

Gambar 1. Hasil uji biokimia *H. pylori*.

Selanjutnya isolat bakteri dilihat dibawah mikroskop dengan pewarnaan gram didapatkan hasil : *H. pylori* berbentuk batang yang dapat dilihat pada Gambar 2.

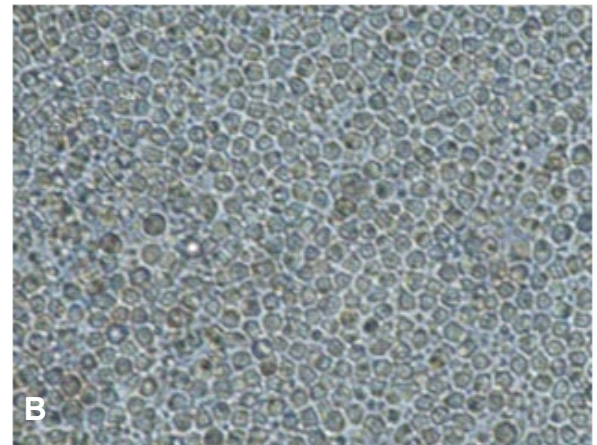
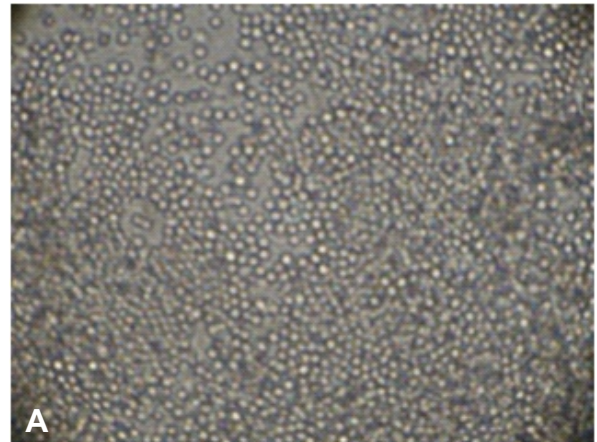


Gambar 2. Bakteri *H. pylori* gram negatif dengan pewarnaan gram (pembesaran >1000 kali).

Isolasi dan Preparasi Monosit

Sel berbentuk bulat, tepi rata, permukaan mengkilat,

besarnya seragam (Gambar 3A). Untuk menginduksi diferensiasi monosit menjadi makrofag, pada medium ditambahkan PMA 10^{-7} mM. Setelah 7 hari monosit dikultur, maka akan berubah menjadi makrofag yang ditunjukkan pada Gambar 3B.



Gambar 3. Kultur monosit.

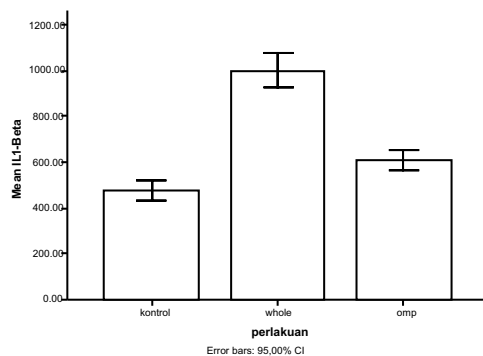
Keterangan : (A) Kultur monosit hari ke-1. Sel berbentuk bulat, tepi rata, permukaan mengkilat dan kompak, besar seragam. (B) Kultur monosit hari ke-7. monosit mengalami multiplikasi menjadi lebih banyak memenuhi dasar *flask*. Tanpa pewarnaan pembesaran 400

Peningkatan Produksi Sitokin TNF- α dan IL-1 β

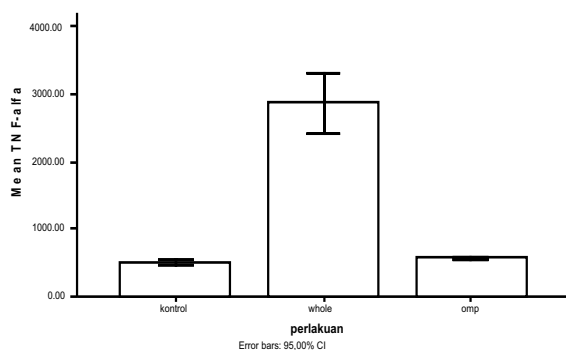
Terdapat perbedaan yang bermakna kadar IL1- β pada ketiga perlakuan. Secara statistik (ANOVA satu arah, $\alpha=0.05$), produksi IL1- β pada ketiga perlakuan terdapat perbedaan secara bermakna antara perlakuan dengan *Whole cell H. pylori*, dan kelompok kontrol dengan tingkat kemaknaan 0,000 (Gambar 4). Kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* antara kontrol dengan *whole* nilai signifikannya 0,000.

Pada gambar 5 dapat dilihat terjadinya peningkatan kadar TNF α tertinggi pada induksi *whole cell H. pylori*. Secara statistik (ANOVA satu arah, $\alpha=0.05$), produksi TNF α pada ketiga kelompok terdapat perbedaan secara bermakna antara kelompok perlakuan dengan *whole cell H. pylori* dan kelompok kontrol dengan tingkat kemaknaan 0,000. Kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* didapatkan antara kontrol dengan *whole cell* nilai

signifikannya 0,000, berarti ada perbedaan yang bermakna.



Gambar 4. Diagram batang hasil ELISA IL1- β makrofag yang dipapar dengan whole dan OMP *H.pylori*.

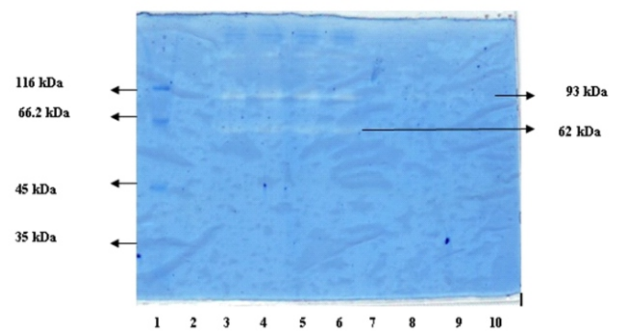


Gambar 5. Diagram batang hasil ELISA IL1- β makrofag yang dipapar dengan whole dan OMP *H.pylori*.

Deteksi Aktivitas MMP-9

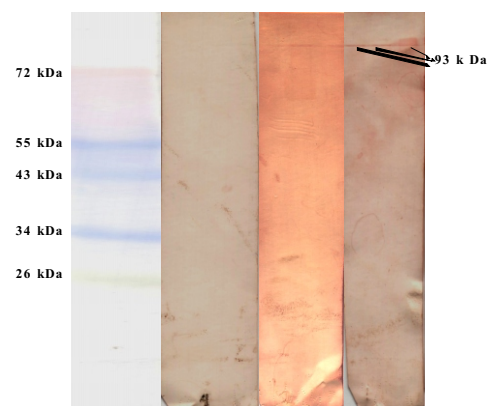
Hasil *gelatine zymography* menunjukkan bahwa makrofag yang dipapar dengan whole cell *H.pylori* dan protein 62 kDa pada outer membrane *H.pylori* memberikan gambaran jumlah produksi enzim dengan berat molekul yang sama (Gambar 6). Gambar 6 menunjukkan pada sumur 3-6 merupakan supernatan dari makrofag yang diinduksi whole cell *H.pylori* terdapat pita berwarna putih tebal dengan berat molekul 93 kDa dan 62 kDa. Sedangkan pada sumur 1 yang merupakan medium dari makrofag yang tidak diinduksi bakteri tidak terlihat adanya gambaran pita putih. Hal ini menunjukkan bahwa aktifitas MMPs hanya terdapat pada supernatan dari makrofag yang diinduksi oleh whole cell *H.pylori*.

Kemudian hasil SDS-PAGE 7,5% gelatin dilanjutkan dengan *western blotting* yang menggunakan antibodi anti MMP-9. Hasil *western blotting* dapat mengenali enzim MMP-9 pada gambar 7. Gambar 7 menunjukkan hasil *western blotting* dimana antibodi anti MMP-9 yang diberikan sebagai antibodi primer terlihat dapat mengikat enzim MMP-9 pada berat molekul 93 kDa.



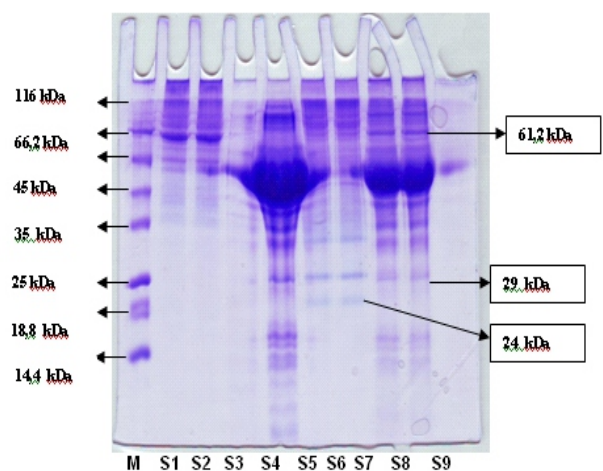
Gambar 6. Gelatine zymography supernatan pertumbuhan makrofag yang diinduksi whole cell dan OMP *H.pylori*.

Keterangan : sumur 1 : marker; sumur 2 : medium kultur monosit tanpa dipapar *H. pylori*; sumur 3 - 6 : MMPs dari whole cell *H. pylori* pada makrofag; sumur 6 - 10 : enzim MMPs dari induksi OMP pada makrofag.



Gambar 7. Hasil western blotting reaktifitas antibodi anti MMP-9 yang dapat mengenai enzim MMP yang dihasilkan oleh makrofag karena induksi whole *H.pylori*.

Keterangan : M: Marker /protein penanda low marker merk Sigma; S1: Medium pada makrofag; S2-S3: MMP-9 dari induksi whole *H.pylori* pada makrofag; S4-S6: MMP-9 dari induksi OMP *H.pylori* pada makrofag.



Gambar 8. Hasil elektroforesis degradasi kolagen tipe IV.

Keterangan : M : Protein penanda Low marker; S1-S2 : Kolagen tipe IV; S3 : Supernatan OMP *H.pylori*; S4 : Supernatan whole cell *H.pylori*; S5-S6 : Fragmen kolagen tipe IV oleh MMPs OMP *H.pylori*; S7-S9 : Fragmen kolagen tipe IV oleh MMPs whole cell *H.pylori*; Pita yang menunjukkan hasil degradasi kolagen tipe IV.

Degradasi Kolagen Tipe IV

Pada gambar 8 merupakan hasil degradasi kolagen tipe IV dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE 12,5 % dengan pewarnaan *comasie brilliant blue*. Berdasarkan hasil SDS-PAGE 12,5 % dengan pewarnaan *comasie brilliant blue* pada gambar 5.8 diatas pada kolagen hasil fragmentasi oleh MMPs dari *whole cell H.pylori* pada berat molekul 61,2 kDa dan 29 kDa.

DISKUSI

Pada produksi IL1- β oleh makrofag yang dipapar dengan *whole cell H.pylori*, dan kelompok kontrol yaitu makrofag yang tidak diinduksi *H.pylori*, menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Kadar TNF α oleh makrofag yang diinduksi dengan *whole cell H.pylori*, dan kelompok kontrol yaitu makrofag yang tidak diinduksi *H.pylori* menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Sesuai dengan teori yang dikemukakan Abbas *et al* (2007) (14) bahwa imunitas alami terhadap bakteri intraseluler terutama diperantarai oleh sel fagosit dan *natural killer* (NK). Imunitas alami tersebut aktif sejak awal sampai dengan 7 hari infeksi patogen. Neutrofil mengawali fagositosis dan diikuti oleh makrofag, akan tetapi bakteri intraseluler patogenik umumnya resisten terhadap degradasi oleh sel-sel fagosit (15). Sel NK yang teraktivasi memproduksi IFN- γ untuk mengaktifkan makrofag dalam membunuh bakteri intraseluler (16). Apabila sel-sel imunitas alami tidak mampu mengeliminasi bakteri tersebut, maka pada hari ke-7 imunitas adaptif akan berperan. Makrofag yang teraktivasi akan memproduksi berbagai substansi seperti fagositik oksidase, iNOS, sitokin (TNF- α , IL1- β , IL-12) dan enzim proteolitik (17).

TNF- α , IL1- β bekerja pada imunitas alami dan inflamasi. Sumber utama kedua sitokin tersebut adalah fagosit mononuklear yang teraktivasi. Interleukin-1 diproduksi oleh fagosit mononuklear yang teraktivasi karena adanya induksi produk bakterial seperti LPS dan oleh beberapa sitokin lainnya seperti TNF- α . TNF- α tidak hanya diproduksi oleh makrofag, tetapi juga oleh neutrofil, sel epitel seperti keratinosit dan sel endotel (17,18).

Makrofag yang teraktivasi akan menstimulasi terjadinya inflamasi melalui sekresi sitokin (terutama TNF- α dan IL1- β), kemokin dan *short-lived lipid mediator* (*platelet activating factor* /PAF, prostaglandin, leukotrien)(19). Kerja kolektif dari *macrophage-derived cytokine* dan *lipid mediator* adalah menginduksi inflamasi lokal yang banyak mengandung neutrofil yang akan memfagositosis dan menghancurkan patogen (20). Selain itu, makrofag yang teraktivasi (bersama neutrofil) memfagositosis jaringan yang mati dan memfasilitasi perbaikan jaringan akibat infeksi (21).

Eksresi MMP-9 diinduksi oleh pemicu yang adekuat. Diketahui monosit, neutrofil, sel dendritik, limfosit, sel endotelial, sel epitel dan osteoblast dapat menjadi mediator inflamasi yang penting pada proses ruptur plak antara lain TNF- α dan IL1- β , sedang IFN- γ menghambat berbagai sintesis MMP. Pada plak aterosklerotik mengandung ketiga sitokin tersebut. Terjadi ekspresi CD40 dari SMC dan CD40L dari limfosit T pada lesi aterosklerotik manusia. Ligasi CD40L sel limfosit T dengan CD40 SMC menginduksi MMP-1, MMP-2, MMP-3 dan

MMP-9 oleh SMC dan ligasi dengan CD40 monosit manusia menginduksi ekspresi MMP-9 (6). Penelitian tentang sitokin dan peran makrofag pada degradasi ECM, menunjukkan hasil bahwa 92 kDa gelatinase (MMP-9) makrofag meningkat (2-15 kali; rerata 5 kali) karena induksi oleh TNF- α dan IL1- β , sedang IFN- γ menghambat produksi 92 kDa gelatinase. Gelatinase 92 kDa mendegradasi ECM, terutama membran basal (22, 23).

Peningkatan TNF- α yang merupakan respon dari inflamatori pada lesi aterosklerotik juga dikemukakan oleh Ameriso *et al* (8, 18), bahwa ekspresi dari molekul adesi dalam endotel dan sel otot polos merupakan komponen kunci dari respon inflamasi dalam lesi aterosklerotik. Peningkatan aktivitas inflamatori endotel menyebabkan peningkatan ekspresi molekul adesi (ICAM-1) dan TNF- α pada orang dengan plak aterosklerosis.

Teori lain menyebutkan bahwa sitokin inflamatori dan faktor pertumbuhan yang dihasilkan selama terjadi aterosklerosis dapat mengaktifkan ekspresi MMP. MMP yang aktif selama aterosklerosis antara lain dari kelompok stromelysin-1 (MMP-3), gelatinase-B (MMP-9) dan collagenase (MMP-1 dan MMP-8) (9).

Disini jelas bahwa dalam proses terjadinya aterosklerosis dan pembentukan plak aterosklerosis diawali dengan adanya proses infeksi. Adanya respon inflamasi tersebut akan meningkatkan beberapa sitokin yang terkait termasuk TNF- α dan IL1- β . Dengan peningkatan sitokin tersebut akan mengaktifkan ekspresi dari enzim MMP terutama MMP-9 yang paling berperan pada patogenesis aterosklerosis (24).

Pada hasil penelitian ini didapatkan aktivitas enzim MMPs pada kultur makrofag yang telah dipapar dengan *whole cell H.pylori*. Pada Hasil *gelatine zymography* menunjukkan bahwa makrofag yang dipapar dengan *whole cell H.pylori* memberikan gambaran jumlah produksi enzim dengan berat molekul 93 kDa dan 62 kDa di tunjukkan dengan adanya gambaran pita putih tebal. Kemudian dari hasil *gelatine zymography* dilanjutkan dengan uji *Western Blotting* untuk membuktikan bahwa aktivitas enzim tersebut merupakan aktivitas dari enzim MMP-9. Dari uji *western Blotting* didapatkan berat molekul MMP-9 93 kDa.

Salah satu enzim MMP yang diduga berperan dalam patobiologi IMA adalah gelatinase B atau yang dikenal sebagai MMP-9 mempunyai berat molekul 92 kDa (10). Sedangkan pada penelitian ini didapatkan enzim MMP-9 pada berat molekul 93 kDa. Hal ini dapat dikarenakan adanya pergeseran pada saat perhitungan berat molekul. Dapat juga dikarenakan gambaran pita protein yang kurang jelas.

Sedangkan menurut hasil penelitian Worthly *et al* (2001), bahwa beberapa enzim terlibat dalam destruksi ECM (misal MMP-1 dan MMP-3) tetapi hanya MMP-9 yang mempunyai hubungan erat terhadap terjadinya ruptur plak aterosklerosis. MMP-9 merupakan MMP yang paling banyak dihasilkan oleh makrofag dan bersama dengan MMP yang dihasilkan oleh SMC berperan pada rupturnya plak secara akut (22). Pada *H.pylori* terdapat protein yang disebut *neutrophil activating protein* (NAP merupakan protein yang terdapat pada permukaan *Helicobacter pylori* dengan berat 150 kDa yang berkontribusi untuk aktivasi fagosit (12). Bentuk ini mempunyai berbagai fungsi antara lain dapat bertindak sebagai adhesin yang

memediasi pengikatan ke mukus, merupakan faktor kemotaktik untuk neutrofil dan monosit, meningkatkan adesi netrofil ke sel endotel, menginduksi netrofil untuk menghasilkan *Reactive Oxygen Radical* (ROS), dapat mengaktifasi sel mast dengan melepaskan cytokine proinflamatori dan berperan pada penyerapan iron oleh *Helicobacter pylori* (iron adalah nutrien esensial untuk bakteri) (13).

H.pylori juga menghasilkan *Heat-shock protein 60* atau *Hsp60* yang mempunyai berat molekul 60 kDa dan dapat menginduksi respon inflamasi melalui jalur *Toll-like reseptor* atau TLR. Jalur signaling yang digunakan dengan TLR ini mengaktifasi NF- κ B yang akhirnya mengekspresikan gen-gen yang mengkode protein yang penting dalam berbagai komponen respon imun non-spesifik yang meliputi sitokin inflamatori (TNF- α , IL-1 dan IL-12) (14).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Benagiano, *et al.* (2005) bahwa sel endotel arteri yang mengalami aterosklerosis memperlihatkan ekspresi HSP60, hal ini diduga karena adanya *molecular mimicry* dari mikroorganisme yang menjadi target sel T autoreaktif dan sel T *cross-reactive* terhadap HSP60 mikroba melalui *molecular mimicry* tersebut (23).

Melihat dari hasil penelitian disini dapat dilihat bahwa enzim MMPs dapat diaktifkan oleh *whole cell H.pylori*, yang ditunjukkan dengan hasil *gelatine zymography* dan dilanjutkan dengan uji *Western Blotting*. Pada *whole cell H.pylori* terdapat komponen protein seperti NAP dan *Heat-shock protein 60* atau *Hsp60*. Sedangkan *outer membrane H.Pylori* berisi *phospholipids* dan *lipopolysaccharide* (LPS). *Lipopolysaccharide* merupakan produk mikroorganisme dapat berperan sebagai aktivator sel-sel inflamatori. Kadar LPS ini mungkin dapat berkurang karena proses isolasi dari *outer membrane* itu sendiri dengan menggunakan SDS.

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa enzim MMP-9 dapat mendegradasi kolagen tipe IV. Berdasarkan hasil SDS-PAGE 12,5 % dengan pewarnaan *comasie brilliant blue* pada gambar 8 didapatkan kolagen yang terfragmentasi oleh MMPs dari *whole H.pylori* pada berat molekul : 170 kDa, 100 kDa, 68 kDa. 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 (15). Awal pembelahan terjadi dari dalam propeptida dan kemudian dipindahkan oleh fragmentasi intramolekular melalui beberapa itermdit (16).

Salah satu enzim proteolitik yang dihasilkan oleh sel-sel inflamatori adalah enzim *Matrix Metalloproteases* (MMPs). Enzim MMP ini dapat mendegradasi *extracellular matrix* atau ECM. Salah satu enzim MMP

yang diduga berperan dalam patobiologi IMA adalah gelatinase B atau yang dikenal sebagai MMP-9 mempunyai berat molekul 92 kDa dan diidentifikasi sebagai suatu *gelatin-binding protein* yang disintesis oleh sel-sel leukosit (14).

Menurut hasil penelitian Worthly *et al* (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 hingga terjadinya IMA. Dikatakan pula bahwa MMP-9 mampu mendegradasi komponen matriks yang tidak mampu didegradasi oleh enzim proteolitik lainnya.

Sehubungan dengan kemampuan MMP-9 dalam mendegradasi komponen matrik maka pada penelitian ini pula dilakukan uji degradasi kolagen tipe IV oleh MMPs yang diperoleh dari makrofag yang dipapar dengan *Whole cell H.pylori* dan protein 62 kDa *outer membrane H.pylori*. Berdasarkan hasil SDS-PAGE kemudian dilanjutkan dengan uji *Ligan Blotting*.

Pada proses inflamasi, sel-sel radang yang teraktivasi akan meningkatkan produksi proenzim, diantaranya *Matrix Metalloprotease* atau MMP. Proenzim ini dapat diubah menjadi enzim yang aktif yang menyebabkan lisisnya kolagen (15, 23). Apabila proses ini terjadi pada plak aterosklerosis maka serabut kolagen yang melindungi palk akan mengalami lisis sehingga menjadi tipis dan akhirnya mudah ruptur.

Gelatinase B atau yang dikenal sebagai MMP-9 mempunyai berat molekul 92 kDa dan diidentifikasi sebagai suatu *gelatin-binding protein* yang disintesis oleh sel-sel leukosit (16). Ekspresi MMP-9 dapat diinduksi oleh pemicu yang adekuat. Diketahui monosit, neutrofil, sel dendrit, limfosit, sel endotel, sel epitel dan osteoblas dapat memproduksi gelatinase B (17).

Degradasi kolagen tipe IV dapat terjadi secara langsung oleh protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau bila terdapat inflamasi yang signifikan, akan terjadi degradasi lebih besar oleh aktivitas MMP (18, 21). Diketahui pada struktur MMP-2 dan MMP-9 mempunyai tiga daerah yang sama dari fibronectin tipe II di dalam daerah heliknya, 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 (19,24).

Dapat disimpulkan *whole cell H.pylori* mampu meningkatkan aktivitas makrofag melalui peningkatan kadar TNF α , IL1- β dan produksi MMP-9 pada berat molekul 93 kDa. *Whole cell H.pylori* mampu menginduksi degradasi kolagen tipe IV melalui peningkatan aktivitas makrofag.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kavermann H, Burns PB, Angermuller K, *et al.* *Identification and Characterization of Helicobacter pylori Genes Essential for Gastric Colonization*. The Journal of Experimental Medicine. 2003; 197(7): 813-822.
2. Mayr M, Kiechl S, Mendall MA, Willeit J, Wick G, and Xu Q. *Increased Risk of Atherosclerosis Is Confine to CagA-Positive Helicobacter pylory Strains : Prospective Result From the Bruneck Study*. Stroke. 2003; 34: 610-615.
3. Mallika V, Goswami B, and Rajappa M. *Atherosclerosis Patophysiology and the Role of Novel Risk Factor : A Clinicobiochemical Perspective*. Angiology. 2007; 58;

- 513.
4. Alavarez A, Ibiza S, Hernandez C, et al. *Gastrin Induces Leukocyte-endothelial Cell Interactions In Vivo and Contributes to the Inflammation Caused by Helicobacter pylori*. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2006; 20; E1742-E1752.
5. Danesh J and Peto R. *Risk Factors for Coronary Heart Disease and Infection with Helicobacter pylori: Meta-analysis of 18 Studies*. British Medical Journal. 2009; 316: 1130-1132.
6. Yamaoka Y, Dong HK, and Graham DY. *A Mr 34,000 Proinflammatory Outer Membrane Protein (oipA) of Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Stanford, April 26, 2002.
7. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, and Libby P. *Neutrophil Elastase in Human Atherosclerotic Plaque : Production by Macrophages*. Circulation. 2003; 107: 2829-2836.
8. Visse R and Nagase H. *Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases; Structure, Function, and Biochemistry*. Circulation Research. 2003; 8: 827- 839.
9. Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, and Sevlever GE. *Detection of Helicobacter pylori in Human Carotid Atherosclerosis Plaques Editorial Comment*. Stroke. 2001; 32: 385-391.
10. Loftus IM, Naylor R, Goodall S, et al. *Increased Matrix Metalloproteinase -9 Activity in Unstable Carotid Plaques: A Potential Role in Acute Plaque Disruption*. Stroke. 2003; 31: 40.
11. Sheikhan A, Hassan ZM, Mustafaie A, Sokri F, Malekzadeh R, and Siavoshi F. *Extraction of the Outer Membrane Protein of Helicobacter pylori and Evaluation of Their Presence in Stool of the Infected Individuals*. Iranian Biomedical Journal. 2004; 8(2): 83-88.
12. Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK, and Syvanen M. *Modification of Helicobacter pylori Outer Membrane Protein Expression During Experimental Infection of Rhesus Macaques*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Stanford, December 22, 2003.
13. Ge ZM, Doig P, dan Fox JG. *Characterization of Protein in the Outer Membrane Preparation of a Murine Pathogen Helicobacter bilis*. Infection and Immunity. 2001: 3502-3506.
14. Abbas AK and Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth edition. Philadelphia: The Curtis Center; 2007; p. 296-349.
15. Dostal DE. *Matrix and Cell Adhesion Mediated Signaling*. Journal Molecular Cardiology. 2006
16. Weber TJ, Smallwood HS, Kathmann LE, Markillie LM, Squier TC, and Thrall BD. *Functional Link between TNF Biosynthesis and CaM-dependent Activation of Inducible Nitric Oxide Synthase in RAW 264.7 Macrophages*. American Journal Physiology-Cell Physiology. 2006; 290: C1512-C1520.
17. Eskandarian R, Moosavi S, Babai M, et al. *Impact of Helicobacter pylori on Prognosis of Patients with Acute Coronary Syndrome*. ARYA Atherosclerosis. 2006; 1(3): 164-169.
18. Davi G, Neri M, Falco A, et al. *Helicobacter pylori Infection Cause Persistent Platelet Activation In Vivo Through Enhance Lipid Peroxidation*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2005 ; 25: 246-251.
19. Andersson A, Kokkola R, Wefer J, Erlandsson-Harris H, and Harris RA. *Differential Macrophage Expression of IL-12 and IL-23 Upon Innate Immune Activation Defines Rat Autoimmune Susceptibility*. Journal of Leukocyte Biology. 2004; 76: 1118-1124.
20. Hansson GK. *Immune Mechanisms in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2001; 21: 1876- 1915.
21. Worthly SG, Osende JI, Helft G, Badimon JJ, and Fuster V. *Coronary Artery disease; Pathogenesis and Acute Coronary Syndrome*. Mount Sinai Journal of Medicine. 2001.
22. Pasterkamp G and Daemen M. *Circulating Cells : The Biofactory for Markers of Atherosclerotic Disease*. European Heart Journal. 2008; 29(22): 2701-2702.
23. Volanen L, Raitakari OT, Vainionpa R, et al. *Serum Lipid Profiles Poorly Correlate with Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, and Cytomegalovirus Seropositivity in Prospectively Followed-up Healthy Children*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2005 ; 25: 827-832.
24. Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, and Falkov S. *Helicobacter pylori Enter and Survive within Multivesicular Vacuoles of Epithelial Cells*. Cellular Microbiology. 2002; 4(10): 677.