

KEMAMPUAN WHOLE CELL *HELICOBACTER PYLORI* DALAM MENGINDUKSI DEGRADASI KOLAGEN TIPE IV MELALUI PENINGKATAN AKTIVITAS MAKROFAG

Yuly Peristiowati

Helicobacter pylori (H. pylori) an association with acute myocardial infraction and cronic coronary disease. Bacteri cytotoxin can induce inflamatory of IL1-β and TNFα cytokine produce, and it can acitivated MMP-9 proteolotic enzyme, and it caused collogen degradation in plague atherosclerosis. This research aim to provit the whole cell H.pylori can induce the degradasi of collagen type IV by increase macrophage activity. It were seen from TNFα and IL1-β level use ELISA methode. Anova statistic analyse result show significan defferent (0,000) 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 concluded that whole cell H.Pylori can induce the degradation of collagen type IV, by increase macrophageag activity. So, the result of this research can support the patomekanism myocardial infract disease.

Keyword : whole cell H.pylori, Macrophage, collagen Type IV

LATAR BELAKANG

Helicobacter pylori (H.pylori) merupakan bakteri utama penyebab gastritis kronis pada manusia dan banyak dijumpai di seluruh dunia. *H.pylori* juga dikaitkan dengan penyakit ,antara lain penyakit kardiovaskuler, khususnya strain yang lebih virulen. Pada saat ini *H. pylori* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit kardiovaskuler. Diyakini bahwa penyakit inflamasi mempunyai peran yang penting terhadap patogenesis penyakit kardiovaskuler (Amieva, 2002).

Dari hasil pemeriksaan serologi penderita IMA terhadap infeksi mikroorganisme, diketahui bahwa 77,77 % disebabkan oleh infeksi *H.pylori*. Cytotoxin dari bakteri tersebut dapat menginduksi produksi sitokin IL-1-β dan TNFα, yang selanjutnya mengaktifasi vaskuler endothelium (Romanelli, 1999).

Aterosklerosis merupakan salah satu penyakit inflamasi yang berhubungan dengan dengan reaksi imun

(Kalela, 2002). Pada lesi aterosklerotik, ditemukan makrofag dan limfosit dalam jumlah banyak, sel mast serta sel B. 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 (Hansson, 2001). 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 mudah rusak oleh aktivitas proteolitik enzim MMP. *Outer membrane H.Pylori* berisi *phospholipids* dan *lipopolysacharide (LPS)*. Antigen O dari LPS mungkin fucosylated dan seperti kelompok antigen dalam darah pada endotelium gaster (Abbas, 2001). Pada outer membran *H.Pylori* juga berisi kolesterol glucosides, dimana 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 endotelium yang sehubungan dengan evolusi dan pembentukan atheroma yang pada akhirnya menyebabkan disrupsi plak.

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

METODE PENELITIAN

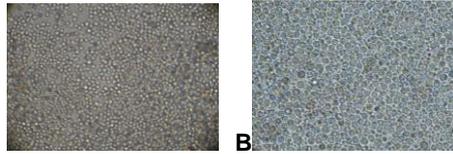
Helicobacter pylori didapatkan dari laboratorium sentral Biomedik Rumah Sakit Umum Mataram kemudian dilakukan uji biokimia untuk mengidentifikasi *H.pylori* meliputi Uji Pewarnaan Gram, Uji Urease, Uji Oksidase, Uji Katalase, Uji Gula-Gula. Isolasi monosit dengan menggunakan metode *Histopaque* (Sigma - *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 Ficol-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 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 berdeferensiasi menjadi makrofag.

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 µL *H.pylori*. Selanjutnya bakteri dalam medium dipipet dan diambil 2 mL dan dimasukkan kedalam falcon 15 mL. Kemudian sentrifuge 3000 rpm, RT 10 menit. Pelet diambil dan supernatan disisihkan. Kemudian pelet di cuci menggunakan RPMI atau PBS. Selanjutnya sentrifuge lagi 3500 rpm, RT 10 menit. Pelet diambil, dan supernatan dibuang. Pelet ditambahkan medium komplet (tanpa antibiotik). Bakteri siap diinduksikan pada makrofag.

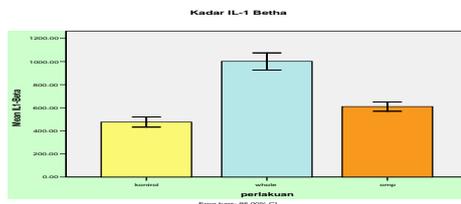
Peningkatan aktivitas makrofag yang diinduksi dengan *whole cell H. pylori* yang dilihat dari peningkatan kadar TNFα dan IL1-β yang diperiksa menggunakan metode ELISA. Selanjutnya aktivitas makrofag dilihat dari produksi MMP-9 yang dihasilkan.

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



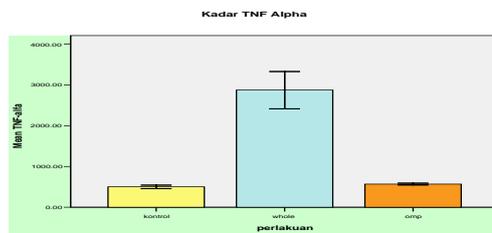
Gambar 3. A) Kultur monosit hari ke-1. Sel berbentuk bulat, tepi rata, permukaan mengkilat dan kompak, besar seragam B) Kultur monosit hari ke-7. monosit mengalami multiplikasi menjadi lebih banyak memenuhi dasar flask. Tanpa pewarnaan (pembesaran 400 kali)

Kemampuan Aktivitas Makrofag dilihat dari peningkatan Produksi Sitokin TNF- α dan IL-1 β



Gambar 4. Diagram Batang Hasil ELISA IL1- β makrofag yang dipapar dengan Whole dan OMP *H.pylori*

Dari tabel diatas dapat dilihat ada 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. Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc antara kontrol dengan whole nilai signifikannya 0,000.

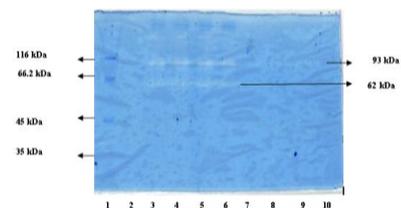


Gambar 5 Diagram Batang Hasil ELISA TNF- α makrofag yang dipapar dengan Whole dan OMP *H.pylori*

Dari tabel diatas 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.

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)

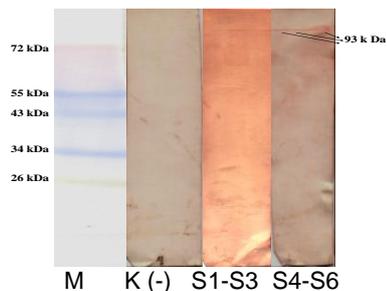


Gambar 5.7. *Gelatin zymography* supernatan pertumbuhan makrofag yang diinduksi *whole cell* dan OMP *H.pylori*.

Keterangan : sumur 1 marker ; sumur 2 Medium kultur monosit tanpa dipapar *H.pylori* ; sumur 3 s/d 6 MMPs dari *Whole cell H.pylori* pada makrofag ; sumur 8 s/ 10 enzim MMPs dan induksi OMP pada makrofag

Pada gambar 6 diatas 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.



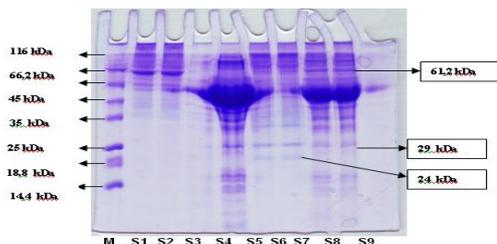
Gambar 7 : Hasil *Western blotting* Reaktivitas antibody anti MMP-9 yang dapat mengenai enzim MMP yang dihasilkan oleh makrofag karena induksi whole *H.pylori*.

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
- : BM Protein

Pada 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

Pada gambar 8 merupakan hasil degradasi kolagen tipe IV dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE 12,5 % dengan pewarnaan Comasie brilliant blue.



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.

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.

PEMBAHASAN

Kemampuan Whole cell H.pylori dan protein 62 kDa pada outer membrane H.pylori dalam meningkatkan aktivitas makrofag melalui peningkatan Kadar TNFα dan IL1-β.

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. Dari hasil uji Anova satu arah , α =0,05 didapatkan nilai signifikan 0,000.

Kadar TNFα oleh makrofag yang diinduksi dengan Whole cell *H.pylori*, dan kelompok kontrol yaitu makrofag yang tidak diinduksi *H.pylori* menunjukkan perbedaan yang signifikan. Dari hasil uji Anova satu arah , α =0,05 didapatkan nilai signifikan 0,000.

Sesuai dengan teori yang dikemukakan Abbas *et al*,2007 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. Sel NK yang teraktivasi memproduksi IFN- γ untuk mengaktifkan makrofag dalam membunuh bakteri intraseluler. 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.

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 (Amieva, 2002).

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)*. Kerja kolektif dari *macrophage-derived cytokine* dan *lipid mediator* adalah menginduksi inflamasi lokal yang banyak mengandung neutrofil yang akan memfagositosis dan menghancurkan patogen. Selain itu, makrofag yang teraktivasi (bersama neutrofil) memfagositosis jaringan yang mati dan memfasilitasi perbaikan jaringan akibat infeksi (Amieva, 2002).

Eksresi MMP-9 diinduksi oleh pemicu yang adekuat. Diketahui monosit, neutrofil, sel dendritik, limfosit, sel endothelial, sel epitel dan

osteoblast dapat memproduksi gelatinase B (Visse, 2003).

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 (Visse, 2003). 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 basalis (Egeblat, 2002).

Peningkatan TNF- α yang merupakan respon dari inflamatori pada lesi aterosklerotik juga dikemukakan oleh Ameriso, *et.al*(8, 24), 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) (Sulistia, 2005).

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

Produksi enzim MMP-9 yang dihasilkan dari induksi makrofag oleh Whole cell H.pylori

Pada hasil penelitian ini didapatkan bahwa terdapat 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. Sedangkan pada penelitian ini didapatkan enzim MMP-9 pada berat molekul 93 kDa. Hal ini dapat dikarenakan adanya pergeseran pada saat perhitungan berat molekul. Atau dapat juga dikarenakan gambaran pita protein yang kurang jelas (Worthly, 2001).

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 (*acute syndrome*) (Pasceri, 1998).

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 (Loftus, 2003). 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) (Mudyawati, 2008).

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) (Gibbs, 1999).

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.

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 –protein seperti NAP (*Neutrophil activating protein*) dan *Heat-shock protein 60* atau *Hsp60*. Sedangkan *outer membrane H.Pylori* berisi *phospholipids* dan *lipopolysaccharide* (LPS. Dimana LPS merupakan produk mikroorganisme dapat berperan sebagai aktivator sel-sel inflamatori. LPS ini mungkin dapat berkurang karena proses isolasi dari *outer membrane* itu sendiri dengan menggunakan SDS.

Identifikasi Berat molekul pita fragment kolagen tipe IV hasil degradasi enzim MMP-9.

Dari hasil penelitian 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 (Opdenaker, 2001).

Awal pembelahan terjadi dari dalam propeptida dan kemudian dipindahkan oleh fragmentasi intramolekular melalui beberapa itermdrit (Schoenbeck, 1997).

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 (Gibbs, 1999).

Menurut hasil penelitian Worthly *et al* (2001) bahwa 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 matriks 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 yang 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 (Opdenaker, 2001 dan Fong, 2000).

Apabila proses ini terjadi pada plak aterosklerosis maka serabut kolagen yang melindungi plak 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 (Schoenbeck, 1997).

Eksresi MMP-9 dapat diinduksi oleh pemicu yang adekuat. Diketahui monosit, neutrofil, sel dendrit, limfosit, sel endotel, sel epitel dan osteoblas dapat memproduksi gelatinase B (Rajagopalan, 1996).

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 (Yoshio, 2002 dan Falk, 1995).

Diketahui pada struktur MMP-2 dan MMP-9 mempunyai tiga daerah yang sama dari fibronektin tipe II di dalam daerah heliknya, diduga pada waktu MMP-9 aktif maka 3 daerah yang sama dari fibronektin 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 (Dostal, 2005 dan Lee, 1997)

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. *Whole cell H.pylori* mampu meningkatkan aktivitas makrofag melalui peningkatan kadar TNF α , IL1- β dan Produksi MMP-9 pada berat molekul 93 kDa.
2. *Whole cell H.pylori* mampu menginduksi degradasi kolagen

tipe IV melalui peningkatan aktivitas makrofag.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K. and Lichtman A.H., 1991. *Cellular and Molecular Immunology*, Fifth edition. The Curtis Center, Philadelphia. P.296-349.
- Amieva M.R.; Salama N.R.; Tompkins L.S. and Falkov S., 2002. *Helicobacter pylori enter and Survive Within Multivesicular Vacuoles of Epithelial Cells*. Cellular Microbiology. 4 (10): 677.
- Cimpean S., Caloianu M, 1997. *Matrix Metalloproteinases with Role in Collagen Biodegradation*. Romanian J. Biol. Sci, 1 (2), p.1
- Dostal, D.E. 2005. *Matrix and Cell Adhesion Mediated Signaling*. *Division of Molecular Cardiology*. October 10, 2006
- Egeblad M and Werb Z. 2002. *New Functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. NT Rev Cancer 2 (3): 161- 174.
- Falk, E., Shah P.K., Fuster, V., 1995. *Coronary Plaque Disruption*. *Circulation* 92, 657-671.
- Fong, I.W. 2000. *Emerging Relations Between infectious Disease and Coronary artery Disease and ath*. CMAJ; 13 (1) : 49-56
- Gibbs D.F. Warner R.L., Weiss S. J., Johnson K.J., Varani J. 1999. *Characterization of Matrix Metalloproteinases Products by Rat Alveolar macrophages*. Am.J. Respir. Cell Moll. Biol. 20(6), 1136-1144.
- Hansson, G.K. 2001. *Immune Mechanisms in atherosclerosis. Atherosclerosis, Thrombosis, and vascular Biology* 21, 1876- 1915

- Janeway , C.A. Travers, P ., Walport M ., Capra, J.D., 1999. *Immuno Biology, The Immune system in health and disease*, 4 ed. USA ; Current Biology Publisher, 299-302.
- Kalela, A. 2002. *Factor Affecting Serum Matrix Metalloproteinase -9 with special Reference to atherosclerosis* . University of Tampere , Tampere.
- Lee R.T. and P. Libby 1997. *The Unstable Atheroma . Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. (17): 1859-1867.
- Loftus, I.M. : Naylor R.; Goodal S . Crowther M, : Jones L. ; Bell P.R.F. ; Thompson M.M. 2003. *Increased Matrix Metalloproteinase -9 Activity in Unstable Carotid Plaques*. *Stroke J* , : 31 (40).
- Mudyawati, 2008. Peran LPS *Helicobacter pylori* dalam mendegradasi kolagen tipe-IV pada neutrofil penderita IMA.
- Opendaker G, Van den Sten PE & Van Damme J (2001) *Gelatinase B ; a tuner and amplifier of immune function*. *Trends Immunol* 22(10): 571-579.
- Ortega N . and Z Werb 2002. *New Functional Roles For Non-collagenous Domains of Basement Membrane Collagens*. *Journal of Cell Science* (115) ; 4201-4214.
- Pasceri V.; G . Cammarota ; L. Fatti ; G.Cuoca; A. Gasbarrini ; R.L. Grillo ; G. Fedeli; G. Gasbarrini and A.Maseri , 1998 . *Association of Virulent Helicobacter pylori strains with ischemic Heart Disease*. *J. Circulation* (97) ; 1675-1679.
- Rajagapalan S,; X.P. Meng ; S. Ramasamy; D.G. Harrison and Z.S. Galis 1996. *Reactive oxygen Species Produced by Macrophage Derived foam cells regulate the Activity ofv Vascular matrix Metalloproteinases in vitro; implication for atherosclerosis Plaque Stability*. *J.Clin. Invest*. 98 (11) :2572-2579.
- Romanelli R. ; S . Mancini; C.Laschinger ; Overall; Sodek and C.A.G. McCulloch 1999 . *Activation of Neutrophil Collagenase in Periodontitis*. *Infection dan Immunity*. 69 (5): 2319-2326.
- Schoenbeck , U ., Mach, F., Sukhova, G.K., Murphy, C., Bonnefoy, J-Y., Fabunmi, R.P., Libby, P., 1997. *Regulations of matrix metalloproteinase expressions in Human Vascular Smooth Muscle Cells. by T Lymphocytes, A Role for CD 40 Signaling in Plaque Rupture* . *Circulation Research*.81, 448-454.
- Sulistia,Y.2005. *Deteksi Protein Spesifik Helicobacter pylori Penderita Infark Miokard Akut Yang Terkait Infeksi Helicobacter pylori*. Universitas Brawijaya Malang .
- Visse R and Nagase H ,(2003) *Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase s; structure , function, and biochemistry*. *Circ Res* 92 (8) 827-839.
- Worthly , S.G. ; J.I. Osende ; G. Helft; J.J. Badimon; V.Fuster. 2001. *Coronary Artery disease ; Pathogenesis and Acute Coronary Syndrome* . The Mount.
- Yoshio Yamaoka, Dong H. Kwon, David Y. Graham 2002, *A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori*, Department of Medicine, Veterans Affairs Medical Center and Baylor College of Medicine.