

INDUKSI METABOLIT PORPHYROMONAS GINGIVALIS PADA PRODUKSI RADIKAL SUPEROKSID NETROFIL

(INDUCTION OF PORPHYROMONAS GINGIVALIS METABOLITES ON
NEUTROPHIL SUPEROXIDE RADICAL PRODUCTION)

I Dewa Ayu Susilawati

Departemen Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37 Jember 68121 East Java, Indonesia
Telp. 0331-333536. E-mail: dewayususilawati@yahoo.com

Abstract

Radical suproxide is a kind of reactive oxygen species (ROS) which causes oxidative damage by attacking biomolecules such as protein, lipid, DNA, etc. Over production of radical superoxide becomes a centre of the generation of other radical species and oxidants, and responsible for occurring many pathological processes. The main source of radical superoxide is to activate neutrophil. Therefore, it was speculated that induction of neutrophil by periodontitis bacteria *Porphyromonas gingivalis* is potential to induce superoxide production, only a few study, however concerned with this topic. This study aimed to know the pathogenicity of *P. gingivalis* by demonstrating the potency of *P. gingivalis* metabolites to induce production of radical superoxide by neutrophil. This study was conducted experimentally *in vitro* using posttest only design. Superoxide radical production was demonstrated by means of *Nitrobluetetrazolium* (NBT) slide assay and spectrophotometric. The results showed that *P. gingivalis* metabolites induced neutrophil to produce a large amount of radical superoxide both intra and extra cellular. Its radical superoxide production affected degranulation, apoptosis, and lysis of neutrophil. In conclusion, neutrophil responses against *P. gingivalis* generated prooxidative and toxic condition. This mechanism may explain the pathogenicity of *P. gingivalis* on many pathological processes.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, neutrophil, superoxide, reactive oxygen species

PENDAHULUAN

Radikal superoksida adalah salah satu jenis ROS yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada berbagai biomolekul seperti lipid, protein, DNA, dll.¹ Pembentukan radikal superoksida dapat memicu terbentuknya spesies radikal atau oksidan lain seperti hidrogen peroksida, peroksinitrit, radikal hidroksil, asam hipoklorid, dll, sehingga dapat menimbulkan kondisi stres oksidatif dan berperan pada berbagai kejadian patologik.¹⁻³

Sumber utama radikal superoksida adalah netrofil yang teraktivasi. Netrofil merupakan fagosit yang berperan pada barisan pertama sistem pertahanan tubuh.⁴ Netrofil berfungsi memfagosit dan menghancurkan agen injurial dengan mekanisme oksidatif (menggunakan radikal bebas dan oksidan) maupun nonoksidatif (menggunakan enzim proteolitik maupun hidrolitik).^{4,5} Meskipun aktivitas netrofil ditujukan untuk menghancurkan agen injurial, dan aktivitas tersebut menghasilkan radikal bebas, oksidan dan enzimolitik, dampaknya dapat meng-

akibatkan kerusakan pada molekul-molekul di jaringan sekitarnya.⁶ Hal ini diduga menjadi dasar molekuler peran netrofil pada berbagai kejadian patologik akut, bahkan pada kasus yang fatal seperti pada infark serebral dan miokardial.¹⁻³

Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dikenal sebagai penyebab utama kerusakan jaringan periodontal.⁵ *P. gingivalis* juga diketahui mudah berinvasi ke sirkulasi darah sistemik serta jaringan lain. Beberapa penelitian telah melaporkan peran *P. gingivalis* pada keadaan patologik di jaringan lain seperti pada aterosklerosis, infark miokardial akut, kelahiran bayi prematur, dll.⁷⁻¹² Sejauh ini patomekanisme peran *P. gingivalis* pada patogenesis berbagai penyakit tersebut belum diketahui sepenuhnya. Barangkali patogenitas *P. gingivalis* tersebut terkait dengan kemampuannya menginduksi aktivitas netrofil untuk memproduksi radikal superoksida, hal ini belum banyak diteliti. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan membuktikan bahwa stimulasi *P. Gingivalis* menginduksi produksi radikal superoksida pada netrofil yang berpotensi destruktif.

BAHAN DAN METODE

Kultur *P. gingivalis* (ATTC, 33277) dilakukan dalam medium BHIB yang diperkaya dengan vitamin K₁, hemin dan *yeast extract* pada atmosfer anaerobik selama 2x24 jam. Konsentrasi *P. Gingivalis* disesuaikan menjadi 10⁹ sel per ml.

Preparasi metabolit *P. gingivalis* dilakukan sebagai berikut: metabolit *P. gingivalis* yang dimaksud adalah produk ekstraselular *P. gingivalis* yang diidentifikasi pada medium kultur *P. gingivalis* setelah diinkubasi 2x24 jam. Sebanyak 1 cc suspensi *P. gingivalis* disentrifus 5000 rpm, selama 15 menit pada temperatur 4°C. Supernatan kemudian difilter dengan mikrofilter 0,2 µm (Sartorius). Filtrat yang mengandung metabolit *P. Gingivalis* dianalisis dengan *sodium dodecyl sulfatepoly-acrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan gel 12,5% dan pewarnaan perak nitrat, disimpan -20°C sampai sebelum digunakan. Produksi metabolit ditunjukkan oleh perbedaan profil SDS-PAGE medium kultur dengan medium tanpa *P. gingivalis*.

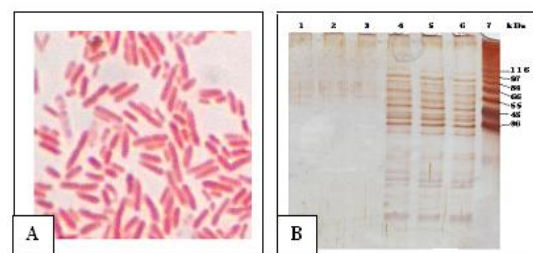
Preparasi isolat netrofil dilakukan sebagai berikut: sebanyak 12 cc darah diencerkan dengan HBSS (1:3), kemudian dilapiskan pada ficoll (1:3) secara berhati-hati dan disentrifus selama 30 menit dengan kecepatan putaran 1400 rpm pada suhu ruang, sehingga terbentuk 4 lapisan. Lapisan terbawah mengandung netrofil yang bercampur dengan *red blood cell* (RBC) dipisahkan, kemudian diencerkan dengan HBSS (1:2) dan ditambahkan (6%) sampai konsentrasi menjadi 1%, dibiarkan selama 60 menit pada suhu ruang, agar RBC mengendap. Supernatan mengandung netrofil diaspirasi, diencerkan dengan HBSS (1:2), kemudian dilapiskan pada *histopack* 1119 dan disentrifus 1700 rpm, 30 menit, pada suhu ruang. Lapisan netrofil dikumpulkan dan dicuci dengan HBSS tiga kali. Bila pelet netrofil masih ada kontaminan RBC ditambahkan NH₄Cl *lysing buffer*. Pelet netrofil dicuci 2 kali dan dire-suspensi dalam 1200 µl HBSS.

Deteksi produksi radikal superoksida dilakukan sebagai berikut: netrofil yang terstimulasi *P. Gingivalis* atau produknya akan memproduksi radikal superoksida yang mereduksi NBT menjadi bentuk tidak terlarut yaitu formasan.¹ Formasan dideteksi dengan *slide assay* (mikroskop cahaya) sebagai granula biru tua dalam sitoplasma dan membran netrofil, atau dengan spektrofotometrik dalam medium (ekstraselular) netrofil. Pada penelitian ini digunakan metabolit *P. gingivalis* (ekstraselular) sebagai stimulator netrofil. Pertama sekali, disiapkan 12 *coverslip* yang telah dibersihkan dengan asam, kemudian diletakkan dalam *plastic chamber* (6 *well*). Suspensi neutrofil dilapiskan pada *coverslip*

(@100 µl), ditambahkan 500 µl HBSS dan diinkubasi 30 menit, 37°C, 5% CO₂. Netrofil dicuci 2 kali dan dire-suspensi dengan 1000 µl HBSS. Pada *chamber* 1-6 ditambahkan @ 500 µl metabolit *P. gingivalis*, sedangkan pada *chamber* 7-12 ditambahkan @ 500 µl HBSS (sebagai kontrol). Kemudian, pada semua *chamber* ditambahkan 1000 µl NBT. *Chamber* ditutup dan diinkubasi 37°C, 5% CO₂. Setelah inkubasi 1 jam, medium inkubasi diambil @ 1000 µl, dan setelah 18 jam supernatan diambil kembali, siap untuk dilakukan analisis spektrofotometrik (580nm). Pelet sel dicuci, difiksasi dan diberi *counter stain* safranin. Setelah *mounting coverslip* pada *slide*, sel dievaluasi dengan mikroskop cahaya. Sel positif memiliki deposit formasan biru gelap yang tersebar dalam sitoplasma dan membran, *counter stain* tampak merah.

HASIL

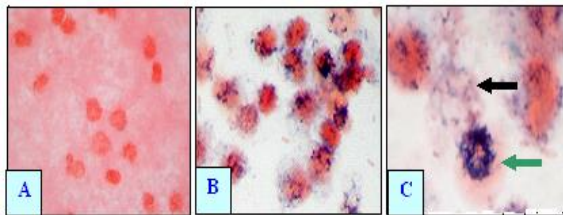
Paparan metabolit *P. gingivalis* pada netrofil menginduksi produksi radikal superoksida baik intra maupun ekstraselular. Adanya produk metabolit diketahui dari perbandingan profil SDS-PAGE antara medium kultur *P. gingivalis* dengan medium kontrol yang tidak dipapar *P. gingivalis*, setelah inkubasi 2 x 24 jam (Gambar 1). Filtrat medium kultur *P. gingivalis* mengandung sekret produk-produk metabolik. Profil SDS-PAGE filtrat medium kultur *P. gingivalis* mengandung pita-pita protein lebih banyak (lajur 4, 5 dan 6) dibandingkan dengan medium kontrol yang tidak mengandung *P. gingivalis* (lajur 1, 2 dan 3). Pita protein pada medium kultur yang tidak ditemui pada medium kontrol merupakan produk metabolit *P. gingivalis* yang disekresi.



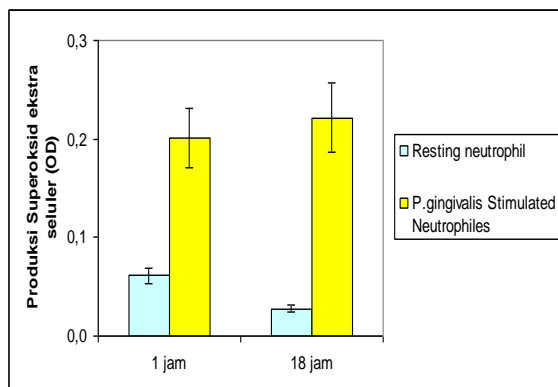
Gambar 1. *P. gingivalis* dan metabolit ekstraselular. A. Preparat apus *P. gingivalis*. B. Profil SDS-PAGE (12,5 %, pewarnaan perak nitrat) medium kultur *P. gingivalis* setelah inkubasi 2 x 24 jam mengandung metabolit ekstra-selular Lajur 1, 2, 3 medium tanpa *P. gingivalis* (kontrol). Lajur 4, 5, 6 medium kultur *P. gingivalis* dan lajur 7 marker

Hasil analisis mikroskopik menunjukkan bahwa netrofil yang distimulasi metabolit *P. gingivalis*

memproduksi radikal superoksida, sedangkan yang tidak distimulasi (*resting*) tidak menghasilkan superoksida (Gambar 2). Penelitian juga menunjukkan, terjadinya produksi superoksida yang masih menyebabkan apoptosis, degranulasi dan lisis netrofil sehingga superoksida tumpah ke milieu ekstraselular. Hasil analisis spektrofotometrik menunjukkan, netrofil yang distimulasi metabolit *P. gingivalis* memproduksi superoksida ekstraselular dalam jumlah besar mencapai 8-10 kali dibanding netrofil saat *resting* (Gambar 3).



Gambar 2. Produksi radikal superoksida (*slide assay*). A. Netrofil *resting* tidak memproduksi radikal superoksida; B. Netrofil yang distimulasi metabolit *P. gingivalis* menghasilkan superoksida (biru tua). C. Produksi superoksida yang masif menyebabkan apoptosis (panah hijau), degranulasi dan lisis netrofil sehingga superoksida tumpah ke milieu ekstraselular (panah hitam)



Gambar 3. Produksi superoksida ekstraselular (spektrofotometrik). Densitas optikal medium netrofil yang distimulasi dengan *P. Gingivalis* dibanding dengan netrofil *resting* (stimulasi 1 jam dan 18 jam).

PEMBAHASAN

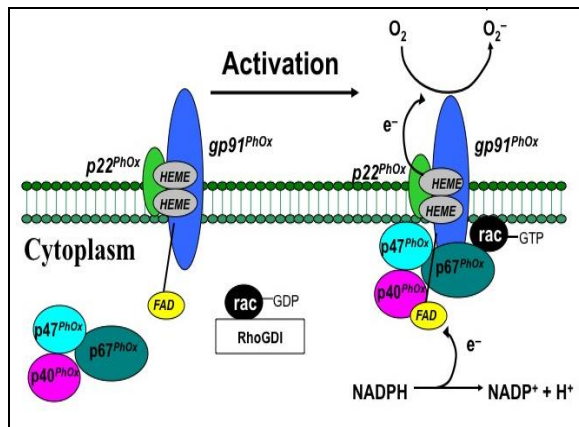
Hasil penelitian ini membuktikan bahwa stimulasi *P. gingivalis* menginduksi netrofil untuk menghasilkan milieu toksik prooksidatif yang berpotensi destruktif. Hal ini ditandai oleh produksi radikal superoksida dalam waktu cepat dan efeknya menyebabkan apoptosis, degranulasi dan lisis netrofil.

Respons awal netrofil terhadap stimulasi bakterial adalah *respiratory burst* disusul dengan *oxidative burst*. Saat *resting*, netrofil hanya mengonsumsi sedikit oksigen, karena metabolisme utama untuk memproduksi *adenosinetriphosphate* (ATP) menggunakan jalur glikolisis yang tidak memerlukan oksigen. Akan tetapi pada saat aktif (bila ada stimulasi bakterial), netrofil akan mengaktifkan sistem enzim *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase* (NADPH oksidase) pada membran netrofil, dan ini memicu *respiratory burst* (peningkatan konsumsi oksigen seluler). Reaksi antara oksigen dengan NADPH oksidase menghasilkan radikal superoksida. Hal ini akan segera disusul oleh pembentukan oksidan lain (hidrogen peroksida, asam hipoklorit, radikal hidroksil) dalam jumlah besar, sehingga terjadi *oxidative burst*.¹⁻³ Radikal superoksida sangat reaktif dan dengan cepat dapat berpartisipasi pada berbagai reaksi biokemikal. Radikal superoksida dapat menyerang molekul nonradikal atau mengambil sebuah atom hidrogen dari ikatan C-H, O-H, atau S-H dari molekul nonradikal. Reaksi semacam ini sangat umum terjadi pada sistem biologis yang molekul-molekulnya kebanyakan merupakan spesies nonradikal seperti lipid, protein, DNA, dll.¹

Pada penelitian ini terlihat bahwa netrofil *resting* tidak memproduksi superoksida, sedangkan yang distimulasi oleh *P. gingivalis* memproduksi superoksida dalam jumlah besar, baik intra maupun ekstraselular. Pada netrofil yang tidak distimulasi, enzim NADPH oksidase berada pada keadaan tidak aktif, hal ini terkait dengan lokasi fraksi protein yang memicu aktivitas NADPH oksidase yang berada di sitosol. Untuk mengaktifkan NADPH oksidase perlu adanya stimulasi yang menyebabkan translokasi elektron dari subunit protein sitosolik ($p^{47\text{phox}}$ dan $p^{67\text{phox}}$) ke subunit protein pada permukaan membran yang mengandung sitokrom.¹³⁻¹⁵ Paparan metabolit *P. gingivalis* diduga dapat secara langsung menstimulasi aktivitas enzim NADPH oksidase yang terletak pada membran netrofil, untuk memproduksi radikal superoksida.

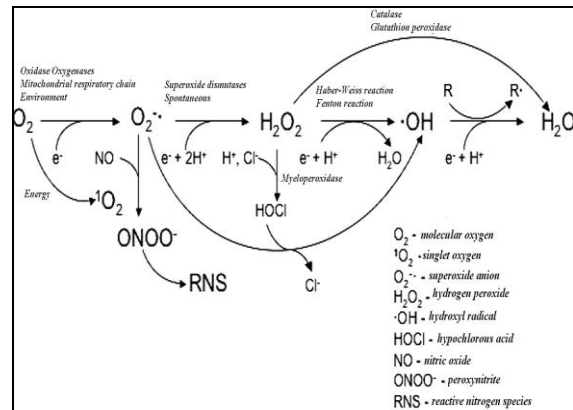
NADPH oksidase pada netrofil adalah kompleks molekul yang terikat membran dan terdiri atas kompleks sitokrom b558 (mengandung $gp^{91\text{phox}}$ dan $p^{22\text{phox}}$), protein sitosolik p47 dan p67, serta molekul berat molekul rendah protein G dari famili rac. NADPH oksidase menjadi aktif bila terdapat translokasi elektron dari molekul sitosolik p47, p67 dan protein G ke kompleks molekul sitokrom b588 pada membran. Struktur $gp^{91\text{phox}}$ katalitik, merupakan kompleks protein yang terikat membran yang mengandung flavin-adenin dinukleotid dan dua heme.

NADPH oksidase mengkatalisa reduksi molekul oksigen, menggunakan NADPH sebagai donor elektron, dan menghasilkan radikal superoksida (O_2^{\bullet}).¹³⁻¹⁵ (Gambar 4).



Gambar 4. Aktivasi NADPH oksidase menghasilkan radikal superoksida (O_2^{\bullet})¹⁶

Radikal superoksida merupakan pusat oksidasi seluler. Secara *in vivo*, pembentukan superoksida ini akan diikuti oleh pembentukan oksidasi yang lain oleh reaksi enzimatik atau nonenzimatik. Misalnya, O_2^{\bullet} dapat bereaksi dengan cepat dengan *nitric oxide* (NO) membentuk *peroxynitrite* ($ONOO^-$). Superoksida juga dapat diubah menjadi *hydrogen peroxide* (H_2O_2) oleh *superoxide dismutase* (SOD). Secara teoritis, baik SOD dan NO berkompetisi untuk memperebutkan O_2^{\bullet} . Kecepatan perubahan O_2^{\bullet} menjadi H_2O_2 yang dikatalisis SOD, hanya sepertiga kecepatan reaksi O_2^{\bullet} dengan NO. H_2O_2 dapat bereaksi dengan radikal yang lain seperti metal transisi Fe^{2+} (reaksi Fenton) membentuk radikal hidroksil (OH^{\bullet}) yang sangat reaktif. Netrofil juga mengandung enzim mieloperoxidase, yang dapat mengubah H_2O_2 menjadi asam hipoklorid ($HOCl$) yang merupakan oksidasi kuat. Selanjutnya asam hipoklorid dapat bereaksi dengan superoksida menghasilkan radikal hidroksil, OH^{\bullet} , radikal yang sangat toksik.³ Jadi, stimulasi pada netrofil dapat menyebabkan terbentuknya oksidasi dan radikal dalam jumlah besar (*oxidative burst*), dan apabila hal ini tidak diimbangi oleh antioksidan yang memadai akan terjadi stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan berbagai biomolekul pada jaringan sekitarnya. Oleh karena itu, dapat dipahami bahwa infeksi bakterial akut dapat menginduksi aktivasi akut netrofil yang mengakibatkan kondisi stres oksidatif yang akut dan dapat berakibat fatal. Hal ini diduga menjadi salah satu potensi toksik dari aktivitas netrofil pada kasus-kasus fatal seperti pada infark serebral dan miokardial akut.



Gambar 5. Metabolisme ROS: mekanisme pembentukan oksidasi dan radikal bebas berasal dari radikal superoksida¹⁷

Sebenarnya, fenomena respons netrofil terhadap *P. gingivalis* menghasilkan ROS telah dikenal dengan baik pada periodontitis. Akan tetapi dengan dilaporkannya penyebaran *P. gingivalis* ke berbagai organ lain, maka potensi *P. gingivalis* yang dapat menginduksi produksi ROS ekstra dan intraseluler dalam jumlah besar perlu mendapat perhatian besar. Karena kini diketahui bahwa ROS berperan penting pada patogenesis berbagai penyakit sistemik seperti aterosklerosis, hipertensi, IMA, kelahiran prematur dan lain-lain.^{2,3} Barangkali mekanisme inilah yang mendasari peran *P. gingivalis* pada patogenesis berbagai penyakit sistemik. Oleh karena itu, fokus penelitian tentang *P. gingivalis* yang selama ini tertuju pada penyakit periodontal seharusnya juga dikembangkan ke arah peran *P. gingivalis* pada penyakit sistemik. (Gambar 5)

Sebagai kesimpulan, induksi *P. gingivalis* terhadap netrofil dapat menghasilkan kondisi toksik pro-oksidatif yang berpotensi destruktif, mekanisme ini diduga menjelaskan potensi patogenik *P. gingivalis* pada berbagai kejadian patologik, baik pada periodontitis maupun pada jaringan tubuh lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat penelitian. Bapak Radi dan Bapak Tris atas sumbangan darahnya, Saudara Fitri, Yuda dan Slamet atas bantuannya pada pelaksanaan penelitian.

Daftar Pustaka

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. 3rd ed. Osaka: University Press, 2000: 60, 246-319.

2. Giordino FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 500-8.
3. Wall PD, Pressman EK, Woods JR. Preterm premature rupture of the membranes and antioxidants: the free radical connection. *J Perinat Med* 2002; 30: 447-57.
4. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia: Saunderson Elsevier Science, 2003.
5. Carranza FA. Glickman's clinical periodontology. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2000: 373-8.
6. Romanelli R., Mancini S., Laschinger C., Overall CM, Sodek J, McCulloch CAG. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infection and Immunity* 1999; 69: 5: 2319-26.
7. Poon BY, Ward CA, Cooper CB., Giles WR, Burns AR, Kubes P. α_4 -Integrin mediates neutrophil-induced free radical injury to cardiac myocytes. *J Cell Biol* 2001; 152 (5): 857-66.
8. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic plaques. *J Periodontol* 2000; 71: 1554-60.
9. Stelzel M, Conrads G, Pankuweit S, Maisch B, Vogt S, Moosdorf R, Flores-de-Jacoby L. Detection of Porphyromonas gingivalis DNA in aortic tissue by PCR. *J Periodontol* 2000; 73(8): 868-70.
10. Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005; 25: e17.
11. Vojdani A. The role of periodontal disease and other infections in the pathogenesis of atherosclerosis and systemic diseases. Immuno-sciences Lab, Inc. Beverly Hills, Ca 90211, 2000.
12. Beck JD, Eke P, Heiss G, Madianos P, Couper D, Lin D, Moss K., et al. Periodontal disease and coronary heart disease. *Circulation* 2005; 112: 19-24.
13. Zalba G, Fortuño A, Orbe J, José GS, Moreno MU, Belzunce M, et al. Phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; 27: 587.
14. Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R277-97.
15. Hordijk, PL. Regulation of NADPH oxidases. *Circulation Res* 2006; 98: 453.
16. Roswell Park Cancer Institute. <<http://www.roswell-park.edu/brahm-segal/lab>> (5 April 2011).
17. Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: procedures, destroyers, function, and disease. *Experimental Biology and Medicine* 2007; 232: 27-37.