

Induksi *Streptococcus mutans* terhadap Aktivitas Proteinase Netrofil pada Degradasi Kolagen Tipe IV (*Induction of Streptococcus mutans on Neutrophil Proteinase Activity in Degradation of Type IV Collagen*)

Purwanto; I Dewa Ayu Susilawati
Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
Jl. Kalimantan 37 Jember, telp. 0331333536
E-mail: purwantofkgunej@yahoo.com

Abstract

Background. Endothelial basal membrane of vasculature is composed mainly by type IV collagen. This vascular collagen degradation is the most powerful stimulus for platelet aggregation and thrombosis. This phenomenon is the basic mechanism of the pathogenesis of atherothrombotic diseases. *Streptococcus mutans*, the main bacterium of dental caries can invade easily into blood circulation, and therefore they have chance to involve in the pathogenesis of vascular destruction and thrombosis. It was assumed that *S. mutans* caused vascular destruction due to its potency to induce neutrophil proteinase activity to degrade type IV collagen. **Objective.** This study purposed to proof *in vitro* that *S. mutans* could induce and activate neutrophil proteinases leading to degradation tipe IV collagen. **Methods.** Collagen degradation was analysed by means of Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Soluble Biotinylated Assay (SBA). **Results.** Results showed that *S. mutans* induced production and activation of neutrophil proteinases leading to type IV collagen degradation into six fragments with the molecular weight were 129; 95; 50; 32; 28; 14 kDa. **Conclusion.** *S. mutans* induced neutrophil proteinase activity leading to degradation of type IV collagen. This study might explain one of mechanisms role of *S. mutans* in initiation of atherothrombotic diseases.

Key words: *Streptococcus mutans*; Type IV collagen; Neutrophil

Abstrak

Latar belakang. Kolagen tipe IV merupakan kolagen vaskular penyusun utama basal membran endotelial. Kerusakan kolagen vaskular akan menginduksi agregasi platelet dan pembentukan trombus vaskular, yang dapat memicu terjadinya penyakit aterotrombotik. Bakteri karies gigi *Streptococcus mutans* mudah berinvasi ke sirkulasi darah dan menginduksi respons inflamasi vaskular yang berpotensi menyebabkan kerusakan kolagen vaskular. Invasi *S. mutans* diduga menyebabkan rekrutmen dan aktivasi netrofil untuk memproduksi proteinase yang menyebabkan kerusakan kolagen vaskular. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan membuktikan secara *in vitro* bahwa *S. mutans* menginduksi produksi dan aktivasi proteinase netrofil sehingga menyebabkan degradasi kolagen tipe IV. **Metode.** Degradasi kolagen dianalisa dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dan *Soluble Biotinylated Assay* (SBA). **Hasil.** *S. mutans* mampu menginduksi dan mengaktifkan proteinase netrofil sehingga menyebabkan degradasi kolagen tipe IV menghasilkan enam jenis fragmen dengan berat molekul 129; 95; 50; 32; 28; 14 kDa. **Kesimpulan.** *S. mutans* menginduksi aktivitas proteinase netrofil dan menyebabkan degradasi kolagen tipe IV. Penelitian ini menjelaskan salah satu mekanisme peran *S. mutans* pada inisiasi penyakit aterotrombotik.

Kata Kunci: *Streptococcus mutans*; Kolagen tipe IV; Netrofil

Pendahuluan

Degradasi/kerusakan kolagen vaskuler tipe IV merupakan stimuli terjadinya agregasi platelet dan pembentukan trombus, yang menjadi tahap awal patogenesis penyakit aterosklerotik. Kolagen tipe IV adalah penyusun utama membran basal endotel yang terletak paling superfisial terhadap lumen vaskular [1]. Ketika ada agen injurial dalam darah, kolagen tipe IV akan terpapar, disusul dengan agregasi platelet dan pembentukan trombus. Pada pembuluh arteri yang telah menyempit karena aterosklerosis, adanya trombus yang kecil saja dapat menyebabkan oklusi pembuluh darah, menghentikan aliran darah serta menyebabkan iskemia dan infark pada jaringan/organ tempat aliran arteri. Bila hal ini terjadi pada arteri yang mensuplai darah ke organ-organ vital seperti jantung atau otak dapat mengakibatkan infark miokardial atau serebral, yang dapat berakibat pada kematian [1-5].

Bakteri karies gigi *Streptococcus mutans*, melalui karies gigi yang dalam, sangat mudah berinvasi ke dalam sirkulasi darah [6] dan diduga dapat berperan menyebabkan rusaknya kolagen vaskular yang memicu trombosis [7,8]. Invasi *S. mutans* ke sirkulasi darah, diduga menginduksi respons inflamasi vaskular berupa rekrutmen serta aktivasi netrofil untuk melawan *S. mutans*. Netrofil yang teraktivasi oleh *S. mutans* ini akan memproduksi berbagai proteinase terutama enzim pendegradasi matrik yakni *matrix metalloproteinases* (MMPs) yang menyebabkan degradasi kolagen vaskular diikuti dengan agregasi platelet dan pembentukan trombus [9,10]. Penelitian ini bertujuan membuktikan secara *in vitro* peran *S. mutans* pada kerusakan kolagen vaskular melalui mekanisme aktivasi proteinase netrofil.

Metode

Penelitian eksperimental eksploratif *in vitro* ini menggunakan desain *the post test only*. Secara ringkas prosedur penelitian adalah sebagai berikut. Suspensi isolat netrofil dipapar dengan *S. mutans*, filtrat supernatannya mengandung proteinase aktif kemudian direaksikan dengan

kolagen tipe IV berlabel biotin dan diinkubasi 18 jam, 37°C, 5% CO₂. Selanjutnya dilakukan identifikasi fragmentasi/ degradasi kolagen. Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yakni di Laboratorium Biomedik dan Mikrobiologi.

Reagen dan Bahan. *S. mutans* (*wild type*) diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. *Tripticase yeast cystein* (TYC, Topley House UK), *Brain heart infusion* (BHI) medium, *Ficoll-Hypaque gradien* (d=1,077) (Sigma); Dextran 500 (Merk); *RBC lysing buffer* (8,26 g NH₄Cl + 1,0 g KHCO₃ + 0,037 g EDTA dalam 1 liter dH₂O). *Streptavidin-Avidin Horse Redish Peroxidase* (SA-HRP, Dako), *TMB Membran Peroxidase Substrat* (KPL), membran *Nitrocellulose* (NC, KPL), Kolagen tipe IV (Sigma), *Biotin-N-Hydroxysuccinimide Ester* (ICN Biomedicals, Inc), *Protein marker high range molecular weight standart* (Bio-Rad). *Hank's balance salin solution* HBSS (Sigma), darah vena perifer dari donor sehat.

Preparasi kolagen tipe IV berlabel biotin, modifikasi metode Monnet & Faurel-Laveye [11]. Kolagen tipe IV (5 mg) dilarutkan dalam 2,5 ml asam asetat 0, 25%, kemudian dilabel dengan biotin (1:1). dengan cara dicampur dan distirer 4°C, 24 jam, dialisis dalam H₂O steril, 24 jam, 4°C, dialisis dalam PBS steril, 24 jam, 4°C.

Isolasi netrofil. Netrofil diisolasi dari darah vena perifer dengan metode *ficoll hypaque centrifugation*. Sebanyak enam cc darah (*heparinized whole blood*) diencerkan dengan HBSS (1:3), kemudian dilapiskan pada ficoll (1:3) dan disentrifuse 30 menit, 1400 rpm, *room temperature* (RT). Tahapan ini terbentuk empat lapisan, lapisan terbawah mengandung netrofil yang bercampur dengan *red blood cell* (RBC) dipisahkan dengan menambahkan dextran (6%) sampai konsentrasi menjadi 1%, kemudian dibiarkan selama 1½ jam, RT, agar RBC turun. Supernatan mengandung netrofil diaspirasi, diencerkan dengan HBSS dan disentrifuse 1700 rpm, 10 menit, RT. Pelet netrofil kemudian divortex, dicuci dua kali, dan bila masih ada kontaminan RBC, ditambahkan NH₄Cl *lysing buffer*, dan setelah pencucian, pelet netrofil diresuspensi dalam 500 µl HBSS.

Induksi *S. mutans* pada proteinase netrofil. *Streptococcus mutans* dikultur dalam medium BHI dan konsentrasinya disesuaikan menjadi 10^9 sel per ml. Selanjutnya, 500 μ l suspensi *S. mutans* dipaparkan pada 500 μ l suspensi netrofil kemudian diinkubasi 18 jam, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ (2 jam pertama dalam *water shaker*). Selanjutnya dilakukan sentrifuse 5000 rpm, 15 menit, 4°C . Supernatan difilter dengan mikrofilter 0,2 μ m (Sartorius), filtrat mengandung proteinase aktif (MMPs aktif), siap untuk uji fragmentasi kolagen.

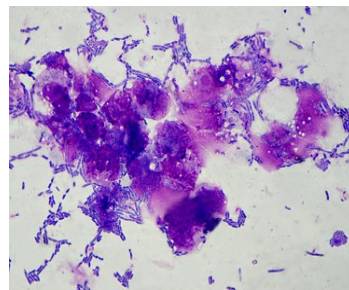
Degradasi kolagen oleh proteinase netrofil dideteksi dengan SDS-PAGE dan SBA, modifikasi metode Romanelli dkk [12]. Secara ringkas 200 μ l sampel mengandung proteinase (MMPs) aktif diinkubasikan pada 200 μ l kolagen tipe IV berlabel biotin selama 18 jam, 37°C , $5\%\text{CO}_2$. Reaksi dihentikan dengan penambahan 300 μ l *reducing sample buffer* (RSB) dan pemanasan 100°C selama 5 menit. Selanjutnya fragmen kolagen dipisahkan dengan SDS-PAGE (12,5%) dan ditransfer ke membran NC. Setelah *blocking non-specific binding* dengan *blotto Skim milk*, membran dicuci dan diinkubasi dengan SA-HRP 2 jam. Setelah dicuci membran diinkubasi dengan substrat TMB, stop reaksi dengan aquades. Fragmen kolagen tampak sebagai pita berwarna pada membran blot.

Hasil

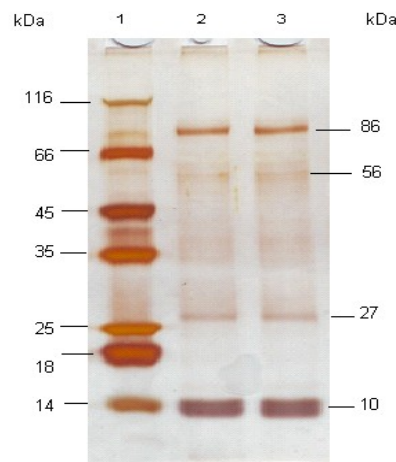
Respons netrofil terhadap stimuli *S. mutans* ditunjukkan oleh kemampuannya mengadesi *S. mutans* (Gambar 1). Interaksi fisik antara netrofil dengan *S. mutans* menghasilkan interaksi fungsional berupa produksi dan aktivasi proteinase netrofil. Gambar 2 menampilkan profil SDS-PAGE proteinase netrofil (yang diinduksi *S. Mutans*).

Hasil penelitian yang menunjukkan *S. mutans* menginduksi produksi proteinase pada netrofil ditindak lanjuti dengan menguji kemampuan proteinase tersebut pada degradasi kolagen tipe IV, yang ditunjukkan dengan metode SDS-PAGE (Gambar 3). Rasionalisasi uji ini adalah sebagai berikut: proteinase netrofil

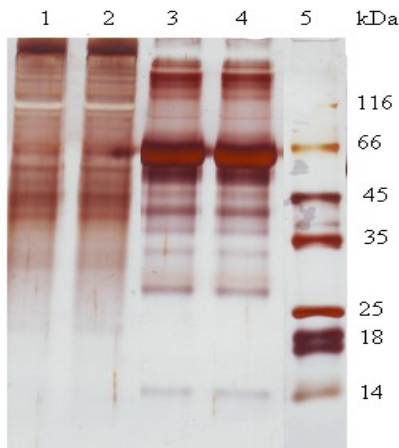
yang aktif (hasil filtrasi supernatan medium netrofil dan *S. mutans*) direaksikan dengan kolagen tipe IV, akibatnya terjadi degradasi kolagen IV. Visualisasi terjadinya degradasi ditunjukkan oleh perbedaan pola fraksinasi kolagen tipe IV yang tidak dipapar proteinase netrofil (kontrol) dengan yang dipapar proteinase netrofil, pada gel elektroforetik yang dicat dengan perak nitrat.



Gambar 1. Adesi *S. mutans* pada netrofil, menunjukkan respons netrofil terhadap *S. mutans* (pengecatan Giemsa, pembesaran 1000 x).



Gambar 2. Proteinase netrofil (SDS-PAGE 12,5%, perak nitrat). Kolom 1: marker; kolom: 2 & 3 proteinase netrofil (diinduksi *S. mutans*)

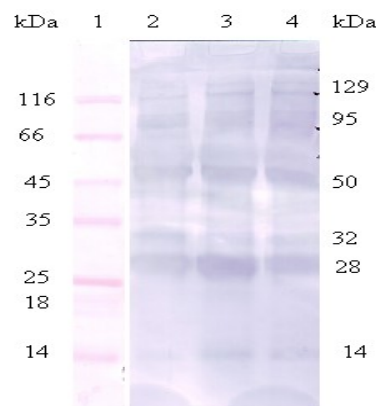


Gambar 3. Profil SDS PAGE degradasi kolagen tipe IV oleh proteinase netrofil (gel 12,5 %, perak nitrat). Kolom 1,2: kolagen tipe IV kontrol (tidak diberi perlakuan); kolom 3,4: fragmentasi kolagen tipe IV (diberi perlakuan proteinase neutrofil yang diaktifkan *S. mutans*). kolom: 5. Marker.

Kolagen tipe IV yang tidak direaksikan dengan proteinase netrofil memiliki pola fraksinasi yang berbeda dengan yang direaksikan dengan proteinase netrofil. Gambar 3 pada kolom 1 dan 2 terlihat profil kolagen tipe IV (kontrol yang tidak dipapar proteinase), sedangkan kolom 3 dan 4 terlihat fragmentasi kolagen IV yang menunjukkan terbentuknya *band-band* dengan jumlah yang lebih banyak dengan berat molekul yang lebih kecil dibanding kolagen kontrol. Namun demikian perlu dicermati bahwa *band-band* tersebut bukan hanya fragmen kolagen IV, tetapi juga berisi metabolit ekstraseluler (proteinase) netrofil dan juga dari *S. mutans*. Jadi analisis dengan SDS-PAGE belum dapat menentukan secara spesifik adanya degradasi kolagen IV, oleh karena itu dilakukan uji lebih lanjut dengan metode SBA.

Hasil uji SBA dapat ditunjukkan degradasi kolagen IV oleh proteinase netrofil (Gambar 4). Rasionalisasi uji SBA pada penelitian ini adalah, fragmen-fragmen kolagen tipe IV berlabel biotin (yang telah dipisahkan dengan SDS-PAGE dan dipindahkan ke membran nitroselulose) direaksikan dengan enzim SA-HRP yang

mengubah substrat kromogenik (TMB) menghasilkan produk berwarna pada fragmen-fragmen kolagen berlabel biotin pada membran NC. Setelah uji SBA nampak hanya beberapa *band*, yang merupakan fragmen kolagen hasil degradasi proteinase netrofil. Fragmen kolagen IV hasil degradasi proteinase netrofil yang distimulasi *S. mutans* adalah 129, 95, 50, 32, 28, 14 kDa.



Gambar 4. Fragmen kolagen tipe IV hasil degradasi oleh proteinase netrofil yang diaktifkan *S. mutans*. Kolom 1 marker; kolom 2,3,4: fragmen-fragman kolagen tipe IV.

Pembahasan

Peran *S. mutans* pada kerusakan kolagen vaskular subendotelial diduga diperantarai oleh interaksinya dengan sel inflamatori netrofil. Perlekatan *S. mutans* pada reseptor pada netrofil menginduksi produksi *tumor necrosis factor* (TNF- α), interleukin (IL 1 β dan IL 6). Sitokin-sitokin ini diketahui dapat meningkatkan ekspresi proteinase seperti MMPs yang menyebabkan degradasi matriks pada jaringan vaskular [15]. *S. mutans* juga dilaporkan dapat menginduksi produksi kemokin IL-8 dan *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1), hal ini menunjukkan bahwa *S. mutans* berperan pada rekrutmen sel-sel inflamatori [13].

Hasil penelitian ini, menunjukkan bukti visual bahwa *S. mutans* berinteraksi dengan netrofil

(adesi *S. mutans* pada netrofil). Interaksi antara dua jenis sel ini merupakan interaksi alamiah antara sel invader (*S. mutans*) dengan sel inang (netrofil). Mekanisme imunitas alami terhadap bakteri ekstraseluler (misalnya *S. mutans*) adalah aktivasi komplemen, fagositosis, dan respon inflamatorik [14]. Bakteri Gram positif (*S. mutans*) mempunyai dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan yang dapat mengaktifkan jalur alternatif komplemen. Akibat dari aktivasi komplemen terjadi opsonisasi dan peningkatan fagositosis terhadap bakteri. Sel-sel fagositik mengikat bakteri ekstraseluler dan yang sudah teropsonisasi melalui reseptor komplemen. Sementara itu, respon inflamatorik terjadi karena stimuli produk bakteri (peptidoglikan), yang kemudian mengaktifkan fagosit agar mensekresi sitokin (TNF, IL-1 dan kemokin) dan menginduksi infiltrasi leukosit ke tempat yang terinfeksi.

Sel-sel inflamatorik berperan sebagai imunitas alami untuk mengeliminasi bakteri, namun efek samping dari mekanisme ini dapat menyebabkan degradasi jaringan di sekitar daerah injuri, misalnya aktivitas netrofil melalui proteinasinya dapat mendegradasi kolagen. Proteinase netrofil yang mendegradasi kolagen utamanya MMPs. Sehingga dapat dikatakan bahwa peran *S. mutans* pada degradasi kolagen diduga karena kemampuannya menginduksi aktivasi proteinase terutama MMPs.

Potensi *S. mutans* mengaktifkan proteinase netrofil dapat dijelaskan melalui laporan-laporan berikut. *S. mutans* dapat menginduksi fagosit untuk meningkatkan produksi MMPs [15]. Sementara itu terdapat laporan, *S. mutans* mampu menghasilkan protease [16], dan telah diketahui protease beberapa bakteri dapat mengaktifkan proMMPs menjadi MMPs aktif [17,18]. Penjelasan lain diduga terkait dengan respons *oxidative burst* netrofil. Stimuli bakteri terhadap netrofil akan meningkatkan konsumsi oksigen oleh netrofil, dan hal ini dapat berakibat pada terjadinya *oxidative burst* yang mengakibatkan produksi oksidan dan radikal bebas dalam jumlah besar [14]. Oksidan dan radikal bebas juga dilaporkan dapat mengaktifkan MMPs [19, 20]. Hasil penelitian ini

membuktikan, *S. mutans* menginduksi produksi dan aktivasi proteinase netrofil, sehingga menyebabkan degradasi kolagen tipe IV.

Potensi *S. mutans* menginduksi degradasi kolagen melalui aktivasi netrofil, mungkin menjelaskan salah satu mekanisme perannya pada inisiasi penyakit aterotrombotik. Hipotesis yang dapat dikemukakan adalah sebagai berikut. *S. mutans* (yang berasal dari karies gigi yang dalam) berinvansi ke sirkulasi darah sistemik dan kemungkinan ada yang menempel pada dinding vaskular. Hal ini menyebabkan rekrutmen dan aktivasi sel inflamatori netrofil. Interaksi *S. mutans* dengan netrofil menginduksi produksi dan aktivasi proteinase (MMPs) yang menyebabkan degradasi kolagen tipe IV, disusul agregasi platelet dan pembentukan trombus. Perlu penelitian lebih lanjut misalnya melalui penelitian *in vivo* untuk mengkonfirmasi hal ini.

Kesimpulan dan Saran

Streptococcus mutans mampu menginduksi produksi dan aktivasi proteinase netrofil dan menyebabkan degradasi kolagen IV. Hal ini mungkin menjelaskan salah satu mekanisme peran *S. mutans* pada degradasi kolagen vaskular yang berhubungan dengan penyakit aterotrombotik. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi jenis proteinase yang diinduksi dan diaktifkan *S. mutans* yang berperan mendegradasi kolagen tipe IV. Ada enam fragmen kolagen yang terbentuk pada degradasi kolagen tipe IV oleh proteinase netrofil, yaitu fragmen 129, 95, 50, 32, 28, 14 kDa. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut terhadap struktur dan sifat kimia fragmen-fragmen kolagen tersebut serta identifikasi reseptornya pada platelet.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada proyek Risbin Iptekdok Departemen Kesehatan RI yang telah membiayai penelitian ini. Kepada Mbak Fitri, Mas Yuda dan Mas Slamet yang telah membantu penelitian, serta Pak Radi yang

telah menyumbangkan darahnya, kami ucapkan terimakasih.

Daftar Pustaka

- [1] Jeziorska M., Wooley DE. 1999. Local Neovascularization and Cellular Composition within Vulnerable Regions of Atherosclerotic Plaques of Human Carotid Arteries. *J. Pathology*, vol 188, issue 2, pp. 189-196.
- [2] Kunicki TJ, 2002. The influence of collagen platelet receptor polymorphisms in Hemostasis and thrombotic disease. *J. Ather, Thromb, and Vasc Biol* vol 22: 1-10
- [3] Brass LF. 2003. Thrombin and platelet activation. *Chest* 124:18S-25S.
- [4] Gibbin JM. 2004. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *Journal of Science* 117, 3415 – 3425.
- [5] Furie B; Furie BC. 2005. Thrombus formation in vivo. *J. Clin. Invest.* 115:3355-3362.
- [6] Vojdani, A 2003. A Look at Infectious Agent as Possible Causative Factor in Cardiovascular Disease: Part I. *Science (microb. and virology/ immunologi)*.
- [7] Chia JS., Lin YL., Lien HT., Chen JY. 2004. Platelet Aggregation Induced by Serotype Polysaccharides from *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity* 72:5:2605-2617.
- [8] Chia JS., Yeh CY., Chen JY. 2000. Identification of Fibronectin Binding Protein from *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunology*, vol 68, no 4, p. 1864-1870
- [9] DeCarlo AA, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. 1997. Activation and Novel Processing of Matrix Metalloproteinases by a Thiol-Proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J. Den.Res* 76 (6): 1260-1270.
- [10] Kerrigan SW, Douglas I, Wray A, Heath J, Birnie MF, Fitzgerald D. Cox D. 2002 A Role for Glycoprotein Ib in Streptococcus Sanguis Induced Platelet Aggregation. *Blood*. Vol 100: P. 509-516.
- [11] Monnet E & Faurel-Laveye F. 2000. A New Platelet Receptor Specific to Type III Collagen. *J. Biol Chem*, Vol. 275, Issue 15, 10912 – 10917.
- [12] Romanelli R., Mancini S., Laschinger C., Overall CM., Sodek J., McCulloch CAG. 1999. Activation of Neutrophil Collagenase in Periodontitis. *Infection and Immunity*. 69:5: p. 2319-2326
- [13] Haniastuti T. 2009. Chemotactic Activity of Human Neutrophil to *Streptococcus mutans*. *Indonesian Journal of Dentistry*. 16(2):149-162
- [14] Abbas AK, Lichtman AH. 2003. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Saunder, USA. pp. 345-355.
- [15] Trask BC, Maloney MJ, Lum EH, Welgus HG, Shapiro SD. 2001. Induction of Macrophage Matrix Metalloproteinase Biosynthesis by Surfactant Protein D. *J. Biol Chem*, Vol. 276 (41), 37846-37825.
- [16] Ajdi D, Mc Shan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferritti JJ. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *PNAS*. Oct 29, vol 99, no.2, p 14434-14439.
- [17] DeCarlo AA., Windsor LJ., Bodden MK., Harber GJ., Birkedal-Hasen B., Birkedal-Hasen H. 1997. Activation and Novel Processing of Matrix Metalloproteinases by Thiol-proteinase from the Oral Anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent Res*. 76(6): 1260-1270

- [18] Creemers EEJM., Cleutjens JPM., Smith JFM., Daemen MJAP. 2001. Matrix Metalloproteinase Inhibition after Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 89:201.
- [19] Channon KM. 2002. Oxidative Stress and Coronary Plaque Stability. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 22;1751
- [20] Giordino FJ.. 2005. Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia and Heart Failure. *J. Clint. Invest*. 115:500 -508.