

ANALISIS ANTIBODI IgG SPESIFIK FIMBRIA *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* DENGAN METODA ELISA PADA PENDERITA *EARLY-ONSET PERIODONTITIS*

Dewi Nurul M¹, Sukardi I¹, Yoneda M², Maeda K²

¹Bagian Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia

²Bagian Periodonsia dan Endodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Kyushu

Dewi Nurul, Sukardi I, Yoneda M, Maeda K: Analisis Antibodi IgG Spesifik Fimbria *Porphyromonas gingivalis* dengan Metoda Elisa Pada Penderita Early-Onset Periodontitis. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2000; 7 (Edisi Khusus): 506-511

Abstract

The adherence of bacteria to the host tissues is a first step in the development of infections. Bacterial fimbriae have been shown to play an important role in the interaction between bacteria and host cells or among bacterial cells. Optical density of serum IgG specific *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 fimbriae antibodies has been estimated in 32 cases of Early-Onset Periodontitis and 14 healthy periodontal subjects as control. The mean level of IgG were significantly elevated ($p=0,000$) in the cases. *The data support the role of P. gingivalis as a key pathogen in Early-Onset Periodontitis.*

Abstrak

Perlekatan bakteri terhadap jaringan inang merupakan langkah awal dari perkembangan infeksi. Fimbria bakteri berperan penting dalam interaksi antara bakteri dan sel-sel inang maupun antar sel-sel bakteri. *Optical density* antibodi IgG serum spesifik fimbria *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 telah diukur pada 32 penderita *Early-Onset Periodontitis* dan 14 individu dengan jaringan periodonsium sehat sebagai kelompok kontrol. Rerata kandungan IgG meningkat bermakna ($p=0,000$) pada kelompok kasus. *Hasil penelitian ini menunjang peran P. gingivalis sebagai bakteri patogen penting dalam Early-Onset Periodontitis.*

Pendahuluan

Early-Onset Periodontitis (EOP) merupakan penyakit periodontal dengan destruksi berat yang terjadi pada awal dua puluhan. belasan tahun, atau sebelumnya, dari individu tampak sehat. Penyakit ini heterogen dan berdasarkan umur terjadinya, dapat ditemukan sebagai *Prepubertal Periodontitis* (PP), *Juvenile Periodontitis* (JP), dan *Rapidly Progressive Periodontitis* (RPP). *Early-Onset Periodontitis* mudah dibedakan dari *Adult Periodontitis* (AP) yang menjadi berat^{1,2} karena umur terjadinya AP adalah lebih dari 35 tahun.³

Watanabe (1990)⁴ menuliskan bahwa *Porphyromonas gingivalis* (Pg) dapat ditemukan dalam lesi *localized-PP*. Lopez dkk (1996)⁵ dalam penelitiannya juga menemukan bahwa Pg dapat diisolasi dari semua penderita *generalized-JP* dan hampir seluruh penderita *localized-JP*. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa keberadaan Pg meningkat dalam lesi RPP berat dan sedang.⁶ Selain itu Kigure dkk (1995)⁷ juga dapat mengkultur Pg dari lesi periodontitis berat, *Refractory Periodontitis* (RP), dan AP. Beberapa waktu sebelum itu, van Winkelhoff dkk (1988)⁸ telah menyatakan bahwa Pg adalah bakteri yang paling patogenik dan virulen dari seluruh bakteri oral, serta sebagai penyebab penting dari infeksi oral. Bakteri ini resisten terhadap fagositosis sebab kespesifikan kapsulnya dan dapat berinvansi ke dalam sel inang sehingga terhindar dari faktor-faktor pertahanan tubuh.⁹

Pietrzak dkk (1998)¹⁰ menemukan adanya antibodi spesifik Pg dalam serum individu dengan maupun tanpa periodontitis. Bahkan Ebersole & Steffen (1995)¹¹ melaporkan bahwa serum penderita periodontitis berespons terhadap berbagai macam antigen dari Pg maupun terhadap sel utuh Pg. Imunoglobulin G merupakan isotip respons imun paling spesifik terhadap Pg, yang meningkat secara dramatis pada kasus

generalized-EOP. Salah satu bagian dari membran luar Pg, yaitu fimbria, dinyatakan sangat berperan penting dalam kolonisasi dan invasi jaringan periodonsium. Antigen fimbria ini menstimulasi proliferasi sel-sel inang pembentuk antibodi. Jumlah sel B pembentuk IgG spesifik terhadap fimbria Pg meningkat dari 1 % dari seluruh sel pembentuk imunoglobulin dalam gingiva meradang penderita periodontitis sedang, menjadi 5 % pada periodontitis tahap berat. Imunoglobulin G spesifik fimbria Pg ini dikeluarkan ke saliva, cairan celah gingiva (*gingival crevicular fluid* /GCF), dan juga ke sirkulasi darah tepi.^{10,12,13} Namun Ogawa dkk (1991)¹⁴ menemukan, meningkatnya produksi IgG spesifik fimbria Pg tidak hanya berarti tingginya pertahanan inang terhadap Pg, tetapi juga akan memperberat proses destruksi jaringan, sebab subklas IgG tertentu mempunyai fungsi efektor termasuk aktivasi komplemen yang akan menyebabkan inflamasi jaringan.

Bahan dan Cara

Subyek Penelitian

Sejak Juli 1999 hingga Maret 2000 telah ditemukan sejumlah 32 penderita EOP di Rumah Sakit Gigi dan Mulut FKGUI, Jakarta. Mereka memenuhi kriteria inklusi penelitian yaitu menderita periodontitis destruktif sebagian atau menyeluruh tetapi bukan AP yang menjadi berat, dan berumur 18-45 tahun. Sebagai kriteria eksklusi adalah menderita penyakit sistemik, dalam 3 bulan terakhir minum antibiotika terutama dari preparat kuinolon dan klindamisin serta mendapatkan perawatan periodontal termasuk pembersihan karang gigi, sedang hamil, dan pada area sampling ada gigi gangraen, abses, karies servikal, tambalan klas V, inlai /onlai proksimal, mahkota tiruan, protesa sebagian lepas, alat ortodonsi lepas/ cekat, serta ke-

adaan-keadaan yang mempermudah terjadinya impaksi makanan. Kepada setiap subyek dijelaskan mengenai penelitian ini, dan dimintai persetujuannya (*informed consent*).

Pengumpulan Serum

Sampel darah dari penelitian potong lintang ini diambil dari vena antekubital sebanyak 3 ml, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Serunya diambil dan disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan.

Reagensia dan Antigen.

Goat anti human IgG (Fc spesific) alkaline phosphatase conjugate, dan *p-nitrophenyl phosphate (pNPP) liquid substrate system* dari Sigma (USA). *Tween 20* dari BIO-RAD (USA). Beberapa bahan kimia lain dari Merck (UK).

Antigen adalah fimbria *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 sebagai bantuan dari Departemen Periodontologi & Endodonti FKG Universitas Kyushu, Jepang.

Esei ELISA

Pemeriksaan ini untuk mengukur titer IgG spesifik fimbria Pg. Lapiskan antigen dengan cara memasukkan 100 ul larutan fimbria (dilarutkan dalam 0,1 M bufer karbonat pH 9,6 sampai mencapai OD 0,05) berisi 0,02 % NaN_3 ke sumur dari plat mikrotiter. Sumur pertama digunakan sebagai kontrol dan diisi hanya dengan bufer saja. Inkubasikan pada 37°C selama 1-2 jam. Kemudian larutan dibuang, plat dicuci dengan larutan PBST (*phosphate buffer saline* berisi 0,05 % Tween 20 dan 0,02 % sodium azide sebagai pengawet). Masukkan 100 ul spesimen serum (telah dilakukan pengenceran 1/100, 1/1000, 1/10000 dengan PBST) ke dalam sumur, inkubasi pada 37°C selama 1-2 jam. Lalu larutan dibuang dan cuci dengan PBST. Kemudian tambahkan 100 ul larutan *goat anti human IgG* berlabel

ALP (yang telah dilarutkan 1/1000 kali dengan akuabides). Campuran ini diinkubasi 37°C selama 1-2 jam, lalu cuci dengan PBST sebanyak 3 kali. Masukkan 100 ul pNPP yang telah dilarutkan dalam dietanolamin pH 9,8: inkubasikan pada suhu ruang selama 30-45 menit. Bubuhkan 50 ul 3 N sodium hidroksida untuk menghentikan reaksi. Tunggu sekitar 30-45 menit pada suhu ruang untuk memperjelas adanya perubahan warna. Hasil dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm. Percobaan dilakukan secara duplo.

Analisis Statistik.

Hasil esei ELISA berupa *optical density* dari kelompok EOP dan kelompok kontrol diperbandingkan dengan uji t.

Hasil

Jumlah penderita EOP yang dapat dianalisis untuk penelitian ini hanya 32 orang karena mereka adalah kasus EOP yang murni. Yang dimaksud dengan EOP murni adalah kasus yang betul-betul tidak menderita penyakit sistemik, tidak mendapatkan perawatan periodontal termasuk skaling ataupun minum antibiotika dalam 3 bulan terakhir. Pada waktu pengumpulan kasus, juga berkunjung 12 penderita EOP baru. Namun mereka adalah penderita rujukan dan telah mendapatkan perawatan awal. Beberapa kasus juga dieksklusi karena pada pemeriksaan penyaringan ternyata kadar gula darahnya di atas normal.

Tabel 1 menunjukkan kisaran, rerata, serta SD umur subyek penelitian. Dalam ketiga pengenceran sampel serum dengan PBST didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok penderita EOP dan kelompok kontrol ($p=0,000$)(tabel 2). Keparahan keadaan klinis penderita EOP tergambarkan dalam tabel 3.

Tabel 1. Kisaran dan rerata umur subyek penelitian

Kelompok	Umur		
	Kisaran	Rerata	SD
EOP	22 - 45	34,34	6,87
Kontrol	21 - 45	29,5	8,12

Tabel 2. Nilai rerata *optical density* kelompok subyek pada tiga pengenceran sampel

Pengenceran	Kelompok	N	Rerata	SD	p
100 •	EOP	32	0,9727	0,3869	0,000
	Kontrol	14	0,1484	0,0844	
1000 •	EOP	32	0,6432	0,3025	0,000
	Kontrol	14	0,0719	0,0596	
10000 •	EOP	32	0,3525	0,2465	0,000
	Kontrol	14	0,0373	0,0336	

• Bermakna ($p < 0,05$)

Tabel 3. Data klinis penderita EOP (N=32)

Data	PIS	CS	BOP	Sis gi	Hil eop	Goy	Hip sektan	Res mm	Pok mm
Rerata	125,97		231,34		3	14	2,44	6,28	9,09
SD	50,97	113,59		27,72					
		76,63	102,71	3,64	3,5	5,9	1,66	2,68	2,83

Pembahasan

Kisaran umur penderita EOP dalam penelitian ini sama dengan kisaran umur kelompok kontrol (tabel 1). Tetapi hasil analisis ELISA mengenai IgG spesifik fimbria Pg berupa *optical density* kelompok EOP diperbandingkan terhadap kelompok kontrol ditemukan berbeda bermakna ($p=0,000$). Pada pengenceran 1/100 *optical density* kelompok EOP 6,47 kali kelompok kontrol, pada 1/1000 sebesar 9,15 kali, dan pada pengenceran 1/10000 sebesar 8,75 kalinya. Hasil penelitian ini menunjang pernyataan Hamada dkk (1998)¹² bahwa fimbria Pg bersifat sangat imunogenik. Karena sifat fimbrianya, Pg sangat diyakini sebagai penyebab penting dari periodontitis berat seperti EOP.

Hasil pemeriksaan laboratorik ini secara klinis tergambarkan sebagai gangguan berat pada geligi maupun gingivanya seperti yang dapat dilihat dalam tabel 3. Sisa gigi yang dimaksud adalah keberadaan geligi secara keseluruhan dihitung dari total 32 buah, karena dari seri radiografis, pada beberapa geligi Molar 3 yang masih ada dapat terlihat

adanya radiolusensi pada area furkasi sampai dekat apeks yang dibatasi oleh tulang kompak di area marginalnya. Berarti ternyata di dalam tulang alveolar geligi Molar 3 yang tidak goyang dan secara klinis tidak ada tanda-tanda terkena dampak EOP, sedang terjadi proses destruksi. Sedangkan yang dimaksud dengan jumlah gigi hilang disebabkan proses EOP adalah geligi yang tanggal atau dicabut karena kerusakan pada tulang alveolar pendukungnya. Kebenaran akan hal ini dibuktikan dari adanya gambaran radiolusensi pada area edentulous yang bersangkutan. Gambaran keparahan klinis EOP subyek penelitian juga sangat jelas dari data kegoyangan gigi. Rerata jumlah gigi goyang kelompok EOP adalah 14 gigi. Keadaan klinis lain yang mencolok dan terjadi pada gingiva adalah lebar terbesar dari resesi gingiva sebesar 6 mm serta poket periodontal terdalam 9 mm. Data di atas disimpulkan sebagai akibat patogenitas Pg yang terdeteksi dari tingginya kadar *optical density* IgG spesifik fimbria Pg. Kajian ini menunjukkan dua kelompok dengan kisaran umur sama tetapi keadaan jaringan periodonsiumnya sangat berbeda. Kerusakan periodontal yang

terjadi pada kelompok EOP yang sebenarnya masih muda, sangat berat dalam arti proses pengunyahannya tidak dapat sempurna. Tidak kalah pentingnya adalah penampilan wajah sangat terganggu karena perubahan posisi dan kekuatan kedudukan gigi pada alveolus serta penampilan gingivanya yang umumnya meradang berat seperti yang dinyatakan oleh Schenkein & van Dyke (1994).¹⁵

Selain oleh fimbrianya, Pg dinyatakan sangat patogenik karena berbagai sifatnya yang lain. Beberapa contoh seperti Pg adalah satu-satunya bakteri oral yang mempunyai sifat kolagenolitik,¹⁶ resisten terhadap fagositosis oleh neutrofil dalam poket karena kapsulnya yang spesifik,⁸ dapat menginvasi sel-sel inang di dekatnya sehingga terhindar dari fusi fagolisosom sebagai usaha pertahanan tubuh,⁹ dan hanya Pg di samping *F. nucleatum* yang mempunyai aktivasi hemaglutinasi sehingga perlekatannya sangat baik.¹⁷

Kemampuan Pg, yaitu bakteri yang ditemukan berada dalam berbagai bentuk periodontitis^{4,5,6,7} untuk menginvasi sel inang, diawali dengan perlekatannya melalui fimbria. Terpikirkan oleh para pakar untuk menghambat perlekatan Pg ke sel inang ataupun pada bakteri lain guna menghambat awal infeksi oleh Pg. Dengan demikian fimbria telah dicoba sebagai vaksin dalam imunisasi terhadap kejadian periodontitis destruktif, dan percobaan tersebut berhasil pada binatang percobaan.¹²

Kandungan antibodi spesifik ini dalam serum penderita EOP tinggi. Walaupun Taubman dkk (1992)¹⁸ menyatakan bahwa antibodi spesifik ini di dalam GCF lebih tinggi dari pada kandungannya dalam serum individu yang bersangkutan, namun antibodi spesifik yang dalam serum tersebut telah terbukti dapat digunakan sebagai indikator maupun prediktor periodontitis. Yang ditemukan adalah sebagai indikator aktivitas penyakit yang sedang berlangsung, sebagai prediktor progresivitas penyakit yang akan datang pada penderita sudah dengan keadaan destruksi periodontal, dan sebagai prediktor untuk mulai terjadinya periodontitis destruktif

dalam mulut yang masih tampak sehat.¹⁹ Keadaan ini disebabkan karena metoda ELISA paling peka dalam mendeteksi antibodi dibandingkan dengan metoda-metoda lain seperti imunofluoresensi, reaksi hemolisis, reaksi bakterisidal, hemaglutinasi, aglutinasi bakteri, dan imunopresipitasi.²⁰ Sebagai kesimpulan adalah *Porphyromonas gingivalis* berperan penting dalam proses EOP, dan hal ini diketahui karena metoda ELISA sangat peka untuk penelitian serologis guna mengetahui hubungan antara respons imun humoral dan penyakit periodontal.

Daftar Pustaka

1. Ranney RR. Classification of periodontal diseases. In: Loe H. and Brown LJ. eds. Classification and epidemiology of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1993;2:13-25.
2. Shapira L, Smidt A, Van Dyke TE, Barak V, Sosholne AW, Brantbar C et al. Sequential manifestation of different forms of Early-onset Periodontitis. A case report. *J Periodontol* 1994;65:631-5.
3. Petsios A, Nakou M, Manti F. Microflora in adult periodontitis. *J Periodont Res* 1995;30:325-31.
4. Watanabe K. Prepubertal periodontitis: a review of diagnostic criteria, pathogenesis, and differential diagnosis. *J Periodont Res* 1990;25:31-48.
5. Lopez NJ, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of *Actinobacillus actinomyces-temcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *J Clin Periodont* 1996;23:101-5.
6. Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Predominant microflora of severe, moderate, and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodont Res* 1995;30:66-72.
7. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodont Res* 1995;30:332-41.

1. Van Winkelhoff AJ, Van Steenberghe TJM, de Graaff J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J Clin Periodontol* 1988;15:145-55.
2. Sandros J, Papapanou PN, Dahlen G. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells *in vitro*. *J Periodont Res* 1993;28:219-26.
3. Pietrzak ER, Polak B, Walsh LJ, Savage NW, Seymour GJ. Characterization of serum antibodies *Porphyromonas gingivalis* in individuals with and without periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:65-72.
4. Ebersole JL, Steffen MJ. Human antibody responses to outer envelope antigens of *Porphyromonas gingivalis* isotypes. *J Periodont Res* 1995;30:1-14.
5. Hamada S, Amano A, Kimura S, Nakagawa I, Kawabata S, Morisaki I. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:129-38.
6. Amano A, Nakamura T, Kimura S, Morisaki I, Nakagawa I, Kawabata S, et al. *Infect Immunol* 1999;67:2399-405.
7. Ogawa T, Kono Y, McGhee ML, McGhee JR, Roberts JE, Hamada S, et al. *Porphyromonas gingivalis* specific serum IgG and IgA antibodies originate from immunoglobulin-secreting cells in inflamed gingiva. *Clin exp Immunol* 1991;83:237-44.
8. Schenkein HA, van Dyke TE. Early-onset periodontitis: systemic aspects of etiology and pathogenesis. *Periodontol* 2000 1994;6:7-25.
9. Sundqvist G, Carlsson J, Hanstrom I. Collagenolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* species. *J Periodont Res* 1987;22:300-6.
10. Isogai E, Hirose K, Fujii N, Isogai H. Short communication. Three types of binding by *Porphyromonas gingivalis* and oral bacteria to fibronectin, buccal epithelium cells, and erythrocytes. *Archs Oral Biol* 1992;37:667-70.
11. Taubman MA, Haffjee AD, Socransky SS, Smith DJ, Ebersole JL. Longitudinal monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases. *J Periodont Res* 1992;27:511-21.
12. Wilton JMA, Johnson NW, Curtis MA, Gillett IR, Carman RJ, Bampton JML, et al. Specific antibody responses to subgingival plaque bacteria as aids to the diagnosis and prognosis of destructive periodontitis. *J Clin Periodontol* 1991;18:1-15.
13. Ebersole JL, Frey DE, Taubman MA, Smith DJ. An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetem-comitans*. *J Periodont Res* 1980;15:621-32.