

ANOMALY PROTEIN OF ORAL MUCOSAL INDUCES RECURRENT APHTHOUS ULCERATION

Diah Savitri Nugroho

Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry University of Airlangga

Diah Savitri Nugroho. Anomaly protein of oral mucosal induces recurrent aphthous ulceration. Journal Dentistry Indonesia 2004; 11(1) : 13-16

Abstract

Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) is a type of local inflammation of the oral mucosa with symptomatic soft tissue damage. The prevalence of RAU is about 17-67 %. Dominant factors causing this disease are understood, but there are predicted internal and external factors that cause related immune disorders. RAU is initiated by mucous proteins which continuously stimulate a physiological response required for a pathophysiological reaction. The aim of this study was to characterize specific anomaly proteins in oral mucosa as causing the initiation of RAU. Samples of mucosal proteins from 30 RAU patients were analyzed with sodium dodecylsulphate polyacrylamid gelelectrophorese (SDS-PAGE) and visualized with silver stain (AgNO₃) showing proteins with a range of molecular weight 27 – 180 kDa. *Western blotting* using a polyclonal antibody specific to RAU showed that the specific proteins of RAU have molecular weights of 23, 27, 65, 70 and 87 kDa. The finding of so many proteins appears to be a new phenomenon, suggesting that the initiation of RAU is possibly due to a continuous induction of internal and external reactions by several mucosal proteins, that become anomaly proteins of high reactivity and antigenicity. This situation can cause overreaction on the oral mucosa with specific symptoms that are known as a RAU.

Pendahuluan

Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) merupakan salah satu kelainan jaringan lunak rongga mulut yang paling sering dijumpai¹. Kelainan ini tergolong penyakit yang tidak ganas tetapi keberadaannya di rongga mulut merupakan masalah tersendiri bagi

penderita karena keluhan rasa sakitnya yang sangat mengganggu terutama pada saat makan, bicara serta dapat mempengaruhi estetik bila ulser terjadi pada daerah bibir². Meskipun telah diteliti oleh banyak ahli, faktor penyebab yang definitive dari RAU masih belum diketahui dengan jelas, hipotesis sementara

diduga berhubungan dengan gangguan sistem imun (*imun disorders*)^{1,3,4}.

Prevalensi RAU dari populasi tertentu cukup tinggi, terbukti dari hasil penelitian diberbagai negara menunjukkan angka yang bervariasi antara 17% - 66%^{5,6}. Hasil penelitian di Thailand menunjukkan prevalensi RAU

46,7%⁷, dan pada tahun 1996-2000 dijumpai 1808 penderita RAU⁸.

Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) merupakan suatu kondisi multifaktorial, dan kerusakan dari epitelium merupakan rangkaian akhir dari patogenesis RAU. Beberapa hasil peneliti terdahulu menunjukkan, bahwa penyebab utama RAU disebabkan oleh faktor eksternal dan internal⁹. Faktor-faktor yang dikaitkan dengan RAU dapat bertindak sebagai agen yang akan membentuk ikatan kompleks dengan mukosa rongga mulut. Rangsangan yang dilakukan secara terus menerus oleh agen tersebut akan mengakibatkan perubahan pada protein mukosa kearah anomali⁹. Anomali protein mukosa ini merupakan suatu antigen akan membentuk respons imun yang berlebih secara lokal dan dapat bereaksi dengan produk imunologis yang mengakibatkan terjadinya disorientasi respons imun yang akhirnya dapat menimbulkan ulser¹⁰.

Tujuan penelitian ini untuk mengkarakterisasi protein mukosa spesifik yang bertindak sebagai antigen atau protein anomali mukosa mulut yang dapat memicu reaksi imun sehingga timbul simptom klinis berupa *Recurrent Aphthous Ulceration*

Bahan dan Cara Kerja

Protein Mukosa

Protein mukosa yang diambil dengan cara swab dari mukosa mulut pasien yang menderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) maupun penderita yang sehat (non RAU) yang datang ke Klinik Oral Medicine Fakultas Kedokteran Gigi Unair Surabaya. Kriteria penderita yang diambil sebagai sampel adalah penderita RAU a) Umur 10-60 tahun. b)

pernah mengalami ulserasi 3 kali atau lebih pertahun. c) mukosa mulut tanpa kelainan atau peradangan kecuali lesi RAU. d) Diameter ulser > 3 mm. Kriteria penderita non RAU adalah a) umur 10-60 tahun. b) mukosa mulut sehat. c) tanpa adanya radang atau lesi lain pada mukosa mulut.

Pemurnian Protein Mukosa dengan Sistem Sepadex G 75

Glaswhole dimasukan kedalam kapiler yang berdiameter 1 cm, kemudian tuangkan suspensi *sepadex* dan biarkan sampai menjendal. Selanjutnya tuangkan sampel di atas *sepadex* sebanyak 1 ml, kemudian tambahkan phosphate buffer di atas sampel. Agar didapatkan protein murni, selanjutnya sampel dialirkan melalui pori-pori *sepadex* tersebut dengan cara membuka katub bawah secara perlahan-lahan dan sampel di tampung pada tabung ependorf. Pada akhirnya suspensi protein dapat dianalisis dengan SDS-PAGE, atau disimpan sampai di lakukan penelitian

Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal dikoleksi dari penderita RAU, di klinik Oral Medicine Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, dengan cara mengambil darah pasien tanpa koagulan, selanjutnya darah dibiarkan selama 20 menit pada temperatur ruang atau disimpan selama 24 jam dalam kulkas bersuhu 4°C, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Serum hasil pemisahan tersebut selanjutnya dipergunakan untuk identifikasi protein spesifik RAU dengan cara *Westernblot*.

Karakterisasi Protein

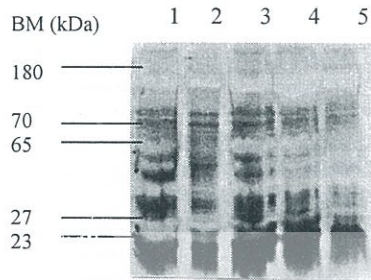
1. Sodium dedocyl sulphat-Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein hasil pemurnian dengan sistem *sepadex* G75 dicampur dengan bufer *laemmli* dengan perbandingan 1:3, selanjutnya dimasukan ke *waterbath* pada temperature 100°C selama 5 menit. Suspensi sampel tersebut dimasukan kedalam gel poliakrilamid konsentrasi 12%. Elektrofesis dijalankan pada voltase 150 dengan 40 mA. Akhirnya hasil SDS-PAGE dari protein sampel divisualisasikan dengan pengecatan silver (Ag No3). Selanjutnya dilakukan identifikasi molekul protein berdasarkan berat molekulnya. Sedang untuk menentukan protein spesifik yang bersifat antigenik dan imunogenik dilakukan analisis dengan *Westernblot*⁸.

2. Westernblot

Protein yang dielektrofesis dengan menggunakan gel poliakrilamid konsentrasi 12%, ditransfer ke *membrane nitrocellulose* dengan cara meletakkan kertas *watmann* rangkap lima, yang diatasnya diberi *membrane nitrocellulose* dengan panjang 12 cm dan lebar 8 cm. Selanjutnya gel di letakan diatas membran, kemudian di atas gel diberi 5 lapisan kertas *watmann*. Akhirnya dilakukan running dengan voltase 200 dan 40 mA selama 1,5 jam. Setelah selesai *running*, membran di potong-potong selebar 3 mm dan selanjutnya masing-masing potongan membran di reaksikan dengan antibodi poliklonal dari serum pasien RAU. Untuk visualisasi reaksi antigen antibodi pada membran ditambahkan konjugat fragment Fab immunoglobulin anti human, yang

selanjutnya dilakukan pewarnaan *Fast Red*¹¹.



Gambar 1: Analisis SDS-PAGE 12% dengan pewarnaan Silver ($AgNO_3$). Protein mukosa mulut dari penderita RAU. Lajur 1: Sampel protein mukosa mulut dari penderita non RAU, lajur 2: sampel protein mukosa mulut dari penderita RAS no 1, lajur 3: sampel protein mukosa mulut dari penderita RAU no 2. Lajur 4: sampel protein mukosa mulut dari penderita RAU no 3. Lajur 5: sampel protein mukosa mulut dari penderita non RAU.

Hasil Penelitian

Protein mukosa mulut dari penderita RAU 1-5 setelah dianalisis dengan SDS-PAGE 12% belum ditemukan protein spesifik, seperti terlihat pada Gambar 1 tampak banyak protein non spesifik yang terwarnai, setelah dianalisa secara *analisis wes-ternblot* akan tampak seperti pada Gambar 2.

Pembahasan

Berdasarkan analisis molekul protein dari penderita RAU dengan cara SDS-PAGE 12% terdapat variasi protein RAU yaitu protein dengan berat molekul antara 27 kDa, 65 kDa, 70 kDa, dan 87 kDa, sedangkan protein mukosa pada penderita non RAU (kontrol) didapatkan beberapa



Gambar 2. Analisis *Westerblot* protein mukosa mulut dari pasien RAS yang ditransfer ke *membrane nitroselulose* direaksikan dengan poliklonal antibodi dengan menggunakan konjugat Fab IgG anti human serta divisualisasikan dengan pewarnaan *Fast Red*, menunjukkan adanya beberapa protein spesifik 65 kDa, 70 kDa dan 87 kDa. Lane 1: protein mukosa mulut dari pasien RAS 1 ditemukan protein spesifik dengan BM 65 kDa, 70 kDa dan 87 kDa, Lane 2: protein mukosa mulut dari pasien RAS 2 ditemukan protein spesifik dengan BM 65 kDa, 70 kDa dan 87 kDa, Lane 3: protein mukosa mulut dari pasien RAS 3 ditemukan protein spesifik dengan BM 65 kDa, 70 kDa dan 87 kDa, Lane 4: protein mukosa mulut dari pasien RAS 4 ditemukan protein spesifik dengan BM 65 kDa, 70 kDa, Lane 5: protein mukosa mulut dari pasien RAS 5 ditemukan protein spesifik dengan BM 65 kDa, Lane 6: protein mukosa mulut dari pasien RAS 6 ditemukan protein spesifik dengan BM 65 kDa, Lane 7: protein mukosa mulut dari pasien RAS 7 ditemukan protein spesifik dengan BM 65 kDa. M: Marker protein.

protein mukosa dengan berat molekul antara 23-180 kDa. Adanya kemungkinan bahwa variasi protein yang ada pada penderita RAU merupakan hasil induksi dari beberapa faktor baik internal maupun eksternal. Protein hasil analisis SDS-PAGE masih belum spesifik, karena belum dapat ditemukan protein dengan berat molekul berapa yang merupakan protein spesifik pada RAU, walaupun ditemukan protein yang tidak ditemukan pada kontrol. Oleh karena itu masih harus dilakukan analisis *Westernblot*.

Hasil yang diperoleh dari analisis protein dengan *Westernblot* dalam penelitian ini dengan mereaksikan antara protein RAU dengan antibodi poliklonal penderita RAU didapatkan protein dengan berat moleku 87 kDa, 70 kDa dan 65 kDa. Hasil ini menunjukkan adanya respons imun di dalam tubuh distimulasi oleh beberapa protein tersebut dan juga mengindikasikan bahwa protein tersebut bersifat antigenik dan imunogenik. Protein lainnya yang muncul pada Gambar 1 analisis SDS-PAGE menunjukkan kemungkinan protein non spesifik RAU atau adanya protein yang tidak dapat menginduksi antibodi sehingga pada analisis *westerblot* tidak mempunyai daya reaktifitas. Dengan ditemukannya protein ini diduga protein ini memegang peranan penting pada patogenesis terjadinya RAS, dimana terjadinya perubahan protein mukosa pada permukaan yang mempunyai sifat antigenitas tinggi yang diakibatkan adanya induksi internal maupun eksternal secara terus menerus dapat memicu timbulnya ketidak seimbangan sistem imun sebagai reaksi dari molekul imun yang berlebihan (*over reactivity*) sehingga dapat menimbulkan symptom klinis berupa lesi *Recurrent Aphthous Ulceration*. Adanya induksi yang terus menerus dari faktor internal dan eksternal ini

kemungkinan juga *nuclear binding factor* yang berperan dalam transkripsi dari RNA sehingga memunculkan suatu protein anomali yang bersifat sebagai antigen mukosa¹². Antigen mukosa memodulasi reaksi berlebihan secara lokal, yang akhirnya dapat berperan sebagai faktor pemicu yang dapat menginduksi respons imun⁹.

Protein anomali yang bersifat antigenik dapat menginduksi *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) yang berperan dalam menginduksi transkripsi gen inflamasi, termasuk RIL-2, MHC-1, VCAM-1, ICAM-1 serta TNF, α ^{10,13,14}. IL-2 merupakan faktor pertumbuhan autokrin pada mayoritas sel T normal, oleh karena itu regulasi transkripsi dari gen IL-2 sangat berperan dalam proliferasi dan differensiasi sel Th1 dan sel T sitotoksik serta sel NK^{15,16}. Ketiga sel tersebut sangat berperan dalam imunopatogenesis RAU¹⁶.

Adanya perubahan pada protein mukosa mengakibatkan sel lain berpartisipasi seperti monosit/makrofag, sel mast dan sel endotel dengan cara mensekresi TNF- α Sitokin, adalah jenis sitokin proinflamasi dan sebagai mediator aspek imun, oleh karena itu sangat berkaitan dengan pengaktifan pengumpulan leukosit pada daerah RAU yang dapat mengakibatkan kerusakan dari epitelium dan merupakan rangkaian akhir dari patogenesis RAU^{10,17}.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein mukosa

penderita RAU dengan analisis westernblot didapatkan protein spesifik dengan berat molekul yang spesifik (paling dominan adalah 65 kDa). Dengan ditemukannya protein spesifik ini tampak adanya kecenderungan yang sangat kuat yang merupakan awal terjadinya *Recurrent Aphthous ulceration*, diawali dengan adanya anomali protein mukosa.

Daftar Pustaka

1. Barrons RW. Treatment Strategies for Recurrent Aphthous Ulcers. *Am J Health Syst Pharm* 2001. 58(1):41-53.
2. Soemarijah S. *Respons Imun Humoral terhadap Streptococcus Sanguis pada RAS*. Disertasi Surabaya:UNAIR 1985: 1-35.
3. Guranska N and Urbaniak B. Recurrent Aphthous Ulcers : The etiology with special reference to immunological theory. *Pol Merkurusz Lek* 2000.8 (44) : 113-7.
4. Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. The Diagnosis and Management of Recurrent Aphthous Stomatitis Consensus Approach. *J Am Dent* 2003. 134 (2) : 200-7.
5. Ship JA. Recurrent Aphthous Stomatitis. An Update. *Oral Surg Oral Med* 2001. 81 (2): 141-7
6. Scully C. Aphthous Ulcers. *J Med* 2002. 263 (6) :1-19.
7. Pongissawaranun W, Laohapand P. Epidemiologic Study on Recurrent Aphthous Stomatitis in a Thai dental patients population. *Com Dent Oral Epid* 1991. 19; 52-3.
8. Ernawati DS. Karakteristik secara Klinik System Imun pad Recurrent Aphthous Stomatitis. *Maj Ked Gigi* 2000.
9. Burruano F and Tortorici S. Major Aphthous Stomatitis (Sutton's Disease). *Ethiopathogenesis, histological and Clinical Aspects. Minerva Stomatol* 2000. 49 (1-2): 41-50.
10. Natah SS, Hayrinen-Immunen R Hietanen, J Malmstorm, M Kontinen YT. Immunolocalization of TNF-alfa Expressing cells in Recurrent Aphthous Stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2000. 29:19-25
11. Rantam FA. Bornavirus and Cells culture: isolation of infectious human and animal Bornavirus and their characterization. *J Diss FU Berlin* 1997. 2304.
12. NichiforMT, Dumitru F, Dinu D. Heat Shock Protein. *Roma Biotech Letters* 2002. 7 (5).
13. Heally CM and Thornhill MH. Induction of Adhnsion Molecule Expression on blood vessels and keratinocytes in recurrent oral ulceration. *J Oral Pathol Med* 1999. 28(1) : 5-11.
14. Sun A, Chin CT, Liu B, Wang JT, Leu JS, Chiang CP. Expression of Interleukin 2 receptors by Activated Peripheral Blood Lymphocytes by The Plasma level of IL-2 in patients with RAU. *Proc Natl Sci Coun Rep China* 2000. 24 : 116-22.
15. Abbas KA, Lichman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology* WB Saunders. Philadelphia 2000. 161-5
16. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*, 4th edition, WH Freeman and Co. New York 2000: 104-10.
17. Mirowski GW. Aphthous Stomatitis, Departmen of Dermatology and Oral Medicine. Surgery ad Pathology Indiana University School of Dentistry and Medicine 2001.