ISSN: 2302-1705
JESBIO Vol. I No. 1, November 2012

DETEKSI SENYAWA MUKOPOLISARIDA DENGAN PEWARNAAN *ALCIAN BLUE* PADA OVARIUM DAN UTERUS TIKUS PUTIH *RATTUS NORVEGICUS*

Safrida[1]

[1] Laboratorium Pendidikan Biologi Universitas Syiah Kuala.
Email: email:idabiologi@yahoo.co.id

Diterima 16 Mei 2012/Disetujui 16 Agustus 2012

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi mukopolisakarida atau karbohidrat yang bersifat asam pada ovarium dan uterus tikus denagn pewarnaan *Alcian* B*lue*. Pembuatan preparat histologis dengan menggunakan metode Kiernan. Pewarnaan *Alcian Blue* (AB) pada Ph 2,5 akan mewarnai inti dan sitoplasma, dimana inti akan terwarnai merah dan sitoplasma akan terwarnai biru. Respon komponen sel/jaringan ovarium dan uterus terhadap pewarnaan *Alcian Blue* (AB) pada Ph 2,5 ditunjukkan oleh warna biru pada sitoplasma dan warna merah muda/magenta pada inti sel. Preparat histologis jaringan ovarium yang diwarnai dengan pewarnaan *Alcian Blue* (AB) pH 2,5 ditemukan senyawa mukopolisakarida pada sitoplasma sel-sel granulosa dan sitoplasma oosit folikel tersier. Preparat histologis jaringan uterus yang diwarnai dengan pewarnaan *Alcian Blue* (AB) pH 2,5 terdapat senyawa mukopolisakarida pada sitoplasma sel-sel endometrium uterus.

Kata kunci: Senyawa Mukopolisakarida. Pewarnaan *Alcian Blue*, Ovarium, Uterus, *Rattus norvegicus*

ABSTRACT

This study aimed to detect the mucopolysaccharide or acidic carbohydrates in the ovaries and uterus of rat with Alcian Blue staining. Histological preparations using the method of Kiernan. Alcian Blue staining at pH 2,5 will color the nucleus and cytoplasm, which stained red nucleus and the cytoplasm will be stained blue. Response components of the cell or tissue ovaries and uterus to staining Alcian Blue at pH 2,5 is shown by the blue color of the cytoplasm and pink or magenta in the cell nucleus. Histological preparations of ovarian tissue with Alcian Blue staining at pH 2,5 there is a mucopolysaccharide compounds in the cytoplasm of granulosa cells of tertiary follicles and oocyte cytoplasm. Histological preparations uterine tissue with Alcian Blue staining at pH 2,5 there is a mucopolysaccharide compounds in the cytoplasm of cells of the uterine endometrium.

Keywords: Compounds mucopolysaccharide, Alcian Blue staining, ovaries, uterus, Rattus norvegicus

PENDAHULUAN

Histoteknik atau teknik histologi merupakan ilmu atau seni mempersiapkan organ, jaringan atau bagian jaringan untuk dapat diamati dan ditelaah. Sedangkan teknik histokimia merupakan teknik untuk mendeteksi keberadaan komponen-komponen yang terdapat dalam struktur jaringan atu sel seperti protein, lemak, karbohidrat, hormon ataupun enzim. Pengamatan dan penelaahan biasanya dilakukan dengan bantuan mikroskop sebabstruktur jaringan secara terperinci pada dasarnya sangat kecil dan tak memungkinkan untuk dilihat dengan mata telanjang, Selain dilekatkan pada kaca preparat, spesimen biasanya dilindungi atau ditutupi dengan kaca atau plastik yang tipis dan tembus pandang (Gunarso 1989).

Pengetahuan tentang histoteknik sangat diperlukan mengingat sifatnya yang mampu menunjang berbagai bidang ilmu seperti Biologi Sel, Embriologi, Anatomi, Fisiologi dan lain-lain.Perkembangan pengetahuan kita tentang anatomi mikroskopis baik hewan maupun tumbuhan banyak diperoleh dari hasil telaah spesimen mikroteknik atau yang dikenal sebagai spesimen histologi. Biasanya spesimen merupakan bagian yang sangat kecil dari suatu organisme, namun organisme secara keseluruhan dapat pula merupakan suatu spesimen bila organisme tersebut cukup kecil untuk diamati dengan mikroskop. Histoteknik adalah metoda atau cara/proses untuk membuat sajian

histologi dari spesimen tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga menjadi sajian yang siap diamati atu dianalisa.

Sajian histologi yang dibuat harus dapat memberikan gambaran tentang bentuk dan besar serta susunan sel; inti sel dan sitoplasma; badan inklusi (glikogen, tetesan lemak, pigmen dan sebagainya); susunan serat jaringan ikat; otot dan lain sebagainya sesuai dengan gambaran jaringan tubuh dalam kondisi hidup. Sajian yang baik dapat membantu dalam memahami struktur histologi jaringan tubuh sesuai dengan kondisi tubuh yang sebenarnya pada waktu hidup. Sajian yang baik juga akan memberikan hasil yang benar-benar shahih (valid/akurat) yang sangat dibutuhkan oleh para peneliti untuk menjawab permasalahan yang timbul. Di samping itusajian yang baik juga diperlukan oleh kimikus untuk menunjang diagnosa penyakit yang diderita oleh pasien (Jusuf 2008).

Pewarna adalah senyawa berwarna yang dapat berikatan dengan substrat dan digunakan untuk mempelajari morfologi, struktur dan berbagai komponen jaringan melalui proses pewarnaan, Pewarnaan ada dua jenis yaitupewarnaan umum dan pewarnaan khusus. Salah satu pewarnaan khusus, yaitu pewarnaan dengan menggunakan Alcian Blue (AB) pada pH 2,5 untuk mengetahui karbohidrat asam yang terdapat dalam sel atau jaringan. (Kiernan 1990)

Karbohidrat dapat ditemukaan di seluruh tubuh. Senyawa ini terutama ditemukan di permukaan sel, di dalam sitoplasma dan di matriks ekstrasel. Karbohidrat berperan penting dalam proses metabolisme, respons imun, differensiasi, migrasi sel, maturasi sel, dan proses interaksi antar sel (Bancroft 1967; Kurohmaru dan Hayashi 1998). Karbohidrat kompleks atau yang sering disebut sebagai glikokonjugat dibagi menjadi dua kelompok yaitukarbohidrat asam dam karbohidrat netral. Perbedaan antara karbohidrat asam dan karbohidrat netral yaitu terletak pada ada tidaknya gugus asam. Gugus asam terdapat pada kelompok karbohidrat asam, sedangkan karbohidrat netral tidak memiliki gugus tersebut (Bancroft 1967; Dellmann andBrown 1993). Metode pewarnaan *Alcian Blue* (AB) pada pH 2,5 merupakan pewarnaan yang bersifat khusus. Metode AB sering digunakan untuk mendeteksi mukopolisakarida atau karbohidrat yang bersifat asam, dengan cara mengikat gugus hidroksil pada pH 2,5 (Kiernan 1990).

Ovarium dan uterus merupakan organ reproduksi pada hewan betina. Ovarium mempunyai fungsi ganda yaitu menghasilkan serta melepaskan (ovulasi) oosit dan menghasilkan serta mensekresi hormon-hormon. Korteks ovari terdiri atas srtoma jaringan ikat yang mengandung banyak sel-sel, di dalamnya terbenam folikel-folikel ovarium. Uterus adalah organ dimana fetus berkembang dan mendapat nutrisi sampai lahir. Dinding uterus terdiri atas suatu mukosa yang disebut endometrium. Disekelilingi oleh lapisan otot polos miometrium yang membentuk hampir seluruh ketebalan dinding dan akhirnya membran serosa luar peritoneum, yang menutupi uterus disebut perimetrium (Geneser 1994).

Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi mukopolisakarida atau karbohidrat yang bersifat asam pada ovarium dan uterus tikus dengan pewarnaan *Alcian Blue*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Sampel organ yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovarium, uterus, dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina yang berasal dari galur *Sprague-Dawley* berumur 6 bulan. Bahan lain yang digunakan adalah larutan Bouin untuk pengawetan jaringan, alkohol, silol, paraffin, NaCl fisiologis 0,9%, hidrogen peroksida (H_2O_2). Metanol, larutan pewarna hemotoksilin eosin (HE), *Alcian Blue* (AB), *periodic acid Schiff* (PAS), *hydrofobic marker*, *3,3-diaminobenzidine* (DAB, Dojindo, Japan), tris buffer, 0,01 M *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4, medium perekat entelian dan akuades.

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah satu set alat bedah, gelas piala, gelas ukur, gelas obyek, gelas penutup, kotak lembab, mikrotom, mikropipet, inkubator dan mikroskop cahaya yang dilengkapi kamera.

Pembuatan Preparat Histologi

Hewan dikorbankan dengan cara dibius atau dislokasi leher. Segera setelah hewan mati organ ovarium dan uterus yang akan digunakan untuk preparat histologis diambil. Organ tersebut dicuci dengan 0,9% NaCl fisiologis dimasukkan dalam larutan fiksatif Bouin (dengan komposisi asam pikrat jenuh : formalin pro-analisis : asam asetat glacial = 15 : 5 : 1) selama 24 jam. Setelah organ terfiksasi larutan diganti dengan alkohol 70 % yang dikenal sebagai *"stopping point"* dengan pengertian jaringan dapat disimpan dalam waktu yang lama pada larutan ini. Dalam stopping point, jaringan dapat disimpan dalam waktu yang lama atau tidak terbatas namun perlu disertai dengan penggantian alkohol 70 % secara regular denagn yang baru misalnya setiap dua minggu atau sebulan sekali.

Proses penarikan air dari jaringan (dehidrasi) dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 80 % sampai dengan 100 % dan dijernihkan dengan silol *(clearing*) sebelum akhirnya ditanam dalam parafin *(embedding*). Jaringan dalam blok parafin disayat secara serial menggunakan mikrotom *rotary* dengan ketebalan 5 µm, dilekatkan

pada gelas obyek yang telah dilapisi dengan alkohol 70 % atau 0,2 % Neofren® dalam toluene, kemudian disimpan dalam inkubator 40^0C selama 24 jam, Sediaan kemudian diwarnai dengan pewarnaan *Alcian Blue* (AB).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ovarium

Folikel-folikel ovarium terdiri atas oosit dan satu lapisan epitel yang mengelilinginya. Kebanyakan folikel-folikel ovarium adalah folikel primordial. Selama pertumbuhan oosit memiliki membran refraktil, warnanya sangat eosinofilik disebut zona pellusida. Membran ini memisahkan oosit dari sel-sel granuloso didekatnya (Geneser 1994). Secara histologi folikel preantal (folikel sekunder) ditandai dengan oosit yang berkembang sempurna dikelilingai oleh zona pelusida. Kapsul polimer glikoprotein yang disebut zona pellusida terbentuk disekitar oosit memisahkannya dari sel granula disekeliling. Zona pellusida yang masih mengikuti oosit sesudah ovulasi, mengandung enzim yang mengkatalis penetrasi sperma (Ownby 2007)

Pada tahap folikel sekunder terjadi aktifitas mitosis folikel tinggi dan menyebabkan bertambahnya lapisan sel granulosa yang disebut membran granulasa. Membran granulosa ini mulai mensekresikan cairan folikel. Sel teka yang menyerupai stroma di bentuk dengan sinyal yang dilepaskan oleh oosit. Sel- sel ini mengelilingi sebagian besar lapisan luar folikel, membran basal, membentuk teka internal.

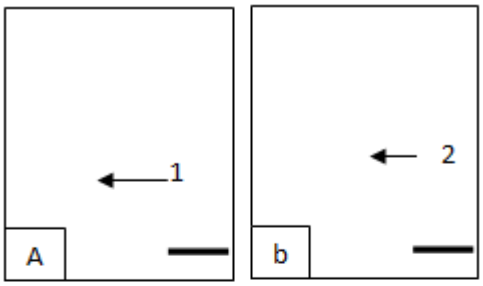
Sel-sel pada teka internal besar, bulat dan seperti epitel, sedangkan sel pada teka eksternal lebih kecil dan dinamakan fibroblast. Dengan berkumpulnya cairan folikel dari membran granulosa maka terbentuk kantung kantung kecil yang berisi cairan diantara sel-sel granulosa. Kantung-kantung kecil tersebut menyatu sehingga membentuk kantung yang lebih besar, yang kemudian akan berkembang menjadi antrum. Pada tahap ini folikel disebut juga dengan folikel sekunder vesikuler (Ownby 2007).

Pewarnaan AB pada pH 2,5 digunakan untuk menentukan kandungan karbohidrat asam. Reaksi sel/jaringan terhadap pewarnaan AB pada pH 2,5 ditunjukkan dengan adanya warna biru pada sitoplasma sel-sel granulosa dan sitoplasma oosit folikel tersier seperti terlihat pada Gambar 1. Hal ini menunjukkan telah terjadi ikatan antara gugus hidroksil dengan *Alcian Blue* pada pH 2,5. Dan ini merupakan indikasi adanya senyawa mukopolisakarida (karbohidrat asam) pada sel-sel granula dan sitoplasma oosit folikeltersier. Adapun bagian sitoplasma sel-sel lain yang tidak memunculkan warna biru, karena dalam sitoplasma sel-sel tersebut tidak mengandung karbohidrat asam atau kandungannya sangat sedikit sekali sehingga tidak terdeteksi oleh pewarnaan AB pada pH 2,5. Warna merah pada inti sel disebabkan oleh pewarnaan *counterstain nuclear fast red* (NFR) yang digunakan.

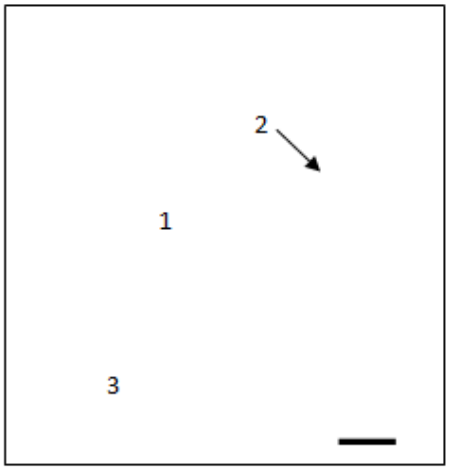
B. Uterus

Endometrium terdiri atas epitel dan jaringan ikat yang tebal dibawahya atau stroma endometrium. Mukosa membentuk beberapa lekukan sederhana yaitu kalenjar uterus yang berbentuk tubular, yang terbuka langsung ke permukaan mukosa. Kelenjar meluas kebawah pada seluruh ketebalan stroma sampai dekat miometrium, kadang-kadang ujungnya bercabang (Geneser 1994).

Gambar 2 menunjukkan preparat histologis jaringan uterus yang diwarnai dengan pewarnaan Alcian Blue (AB) pH 2,5, sitoplasma sel-sel endometrium uterus mengambil warna ungu/biru yang lemah. Hal ini diduga bahwa pada sitoplasma sel-sel endometrium mengandung senyawa mukopolisakarida (karbohidrat asam), walaupun mungkin kandungan karbohidrat asam dalam sitoplasmanya sedikit. Mungkin juga sitoplasma sel-sel endometrium uterus berwarna ungu/biru pudar berkaitan dengan pencucian menggunakan akuades yang tidak terlalu lama. Warna merah pada inti sel-sel uterus disebabkan oleh *counterstain nuclear fast red* (NFR).



Gambar 1 Fotomikrograf preparat histologis jaringan ovarium dengan menggunakan pewarnaan Alcian Blue (AB). (a) Pembesaran 200x bagian folikel sekunder; (b) Pembesaran 200x bagian folikel tersier. Respon positif terhadap pewarnaan AB akan menghasilkan warna biru pada sitoplasma dan warna merah muda/magenta pada inti sel. Keterangan gambar: 1. Sitoplasma sel granulosa folikel sekunder, 2. Sitoplasma oosit folikel tersier. Skala bar : 100 mikron.



Gambar 2 Fotomikograf preparat histologis jaringan uterus dengan menggunakan pewamaan Alcian Blue (AB) dengan pembesaran 400x. Skala bar 20 mikron. Reaksi pewamaan terhadap sel/jaringan akan memberikan wama biru pada sitoplasma dan wama merah muda pada inti sel. Keterangan gambar: 1. Endometrium, 2. Sel endometrium, 3. Rongga uterus (lumen).

SIMPULAN

Pewarnaan Alcian Blue (AB) dapat mendeteksi adanya senyawa mukopolisakarida (karbohidrat asam) dalam sitoplasma, permukaan membran sel dan matriks ekstrasel. Respon komponen sel/jaringan terhadap pewarnaan *Alcian Blue* (AB) pada pH 2,5 ditunjukkan oleh warna biru pada sitoplasma dan warna merah muda/magenta pada inti sel.

Preparar histologis jaringan ovarium yang diwarnai dengan pewarnaan Alcian Blue (AB) pH 2,5 ditemukan senyawa mukopolisakarida pada sitoplasma sel-sel granulosa dan sitoplasma oosit folikel tersier. Preparat histologis jaringan uterus yang diwarnai dengan pewarnaan Alcian Blue (AB) pH 2,5 terdapat senyawa mukopolisakarida pada sitoplasma sel-sel endometrium uterus.

DAFTAR PUSTAKA

Bancroft, J. D. 1967. An Introduction to Histochemical Technique. Appleton Century Crofts. London. 62-63

Dellman, H. D and E. M. Brown. 1993. Textbook of Veterinary Histology. 4th edition. Lea and Febiger. Philadelphia. Pp. 153-165

Geneser F. 1994. Textbook of Histology (Buku Teks Histology). Jilid 2. Terjemahan. Alih Bahasa: Arifin Gunawijaya. Jakarta: Binarupa Aksara

Gunarso, W. 1989. Mikroteknik. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor.

Jusuf AA. 2009. Histoteknik Dasar. Bagian Histology Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Kiernan, JA. 1990. Histologycal and Histochemiscal Method. 2nd Edition. Pergamon Press, England

Kurohmaru. M and Y. Hayashi. 1998. Lectin Binding Status of The Testis in Some Animals. In Reproduktive Biology Update- Novel Tools for Assessment of Environmental Toxicity. Nakanishi Printing Co., Kyoto

Ownby, CL. 2007. Female Reproductive System. Oklahoma State University Collegen Veterinar Medicinehttp://instruction.evhs.okstate.edu/Histology/ fr/HiFRp09.htm