



Prosiding

SEMINAR NASIONAL *BASIC SCIENCE VI*

*Sains Membangun Karakter dan Berpikir Kritis
Untuk Kesejahteraan Masyarakat*

Ambon, 07 Mei 2014

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PATTIMURA
AMBON**

Hak cipta dilindungi Undang-Undang

Cetakan I, Agustus 2014

Diterbitkan oleh: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pattimura

ISBN: 978-602-97552-1-2

Deskripsi halaman sampul : Gambar yang ada pada cover adalah kumpulan benda-benda langit dengan berbagai fenomena

EKSPRESI IMMUNOGLOBULIN A (IgA) PADA USUS HALUS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

Efraim Samson dan Adrien Jems Akiles Unitly

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pattimura
e-mail : givenefse@yahoo.com

ABSTRAK

Usus halus (*intestinum tenue*) bagian duodenum mempunyai beberapa lapisan penyusun dan beberapa sel yang mempunyai ciri spesifik. Melalui pewarnaan Imunohistokimia terlihat beberapa lapisan penyusun duodenum usus halus, meliputi lapisan mukosa, muskularis mukosa, submukosa, muskularis sirkular, muskularis longitudinal dan serosa. Fotomikrograf preparat histologis usus halus memperlihatkan, pada sel-sel usus halus memberi reaksi positif terhadap IgA. Reaksi positif tersebut ditunjukkan oleh adanya warna coklat pada bagian jaringan mukosa duodenum usus halus, walaupun dengan intensitas warna lebih lemah dan pola sebaran yang relatif sedikit. Kontaminasi yang diakibatkan terbentuknya warna coklat pada sel-sel usus tersebut merupakan bentuk respons adanya kandungan IgA pada sel-sel tersebut. Dengan adanya antibodi primer, antibodi ini berikatan dengan molekul antigen sel/jaringan yang dideteksi, selanjutnya antibodi yang di label dengan peroksidase akan bereaksi dengan antibodi primer tersebut sehingga keberadaan enzim peroksidase ini melambangkan adanya kompleks antigen-antibodi. Apabila kompleks antigen-antibodi ini bereaksi dengan kromogen DAB maka akan menghasilkan endapan berwarna (kromogranin) sehingga menghasilkan produk tervisualisasi yang berwarna coklat.

Kata kunci : Imunohistokimia, IgA, Usus Halus

PENDAHULUAN

Usus halus adalah bagian dari saluran pencernaan yang terletak di antara lambung dan usus besar. Usus halus panjangnya sekitar 4 - 5 m (pada orang dewasa hidup), berupa organ tubular yang terbentang dari pylorus gaster ke valvula ileosekal, dimana usus halus melanjutkan diri ke usus besar. Usus halus terdiri dari tiga bagian yaitu usus dua belas jari (duodenum), usus kosong atau jejunum (bagian usus ini biasanya kosong jika dilakukan pemeriksaan post mortem), dan usus penyerapan atau ileum yang digantungkan dengan mesenterium yang melekatkannya ke dinding posterior abdomen. Karena itu, bagian ini ditutupi peritoneum dan bebas bergerak. Jejunum membentuk 2/5 bagian proksimal dan terutama terletak di bagian kiri atas rongga abdomen, sedangkan ileum merupakan 3/5 bagian distal terutama terletak di bagian kanan bawah rongga abdomen [Wikipedia 2010].

Ketika segmen usus halus kontinyu satu sama lain dan pada dasarnya mempunyai struktur histologist sama. Di usus halus, kimus dibawa dan bersamaan mengalami pemecahan kimia sempurna menjadi zat-zat yang dapat diserap ke dalam darah dan pembuluh limf mukosa. Empat lapisan yang khas dari dindingnya adalah tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis eksterna dan tunika serosa, khusus mempunyai morfologi teratur di usus halus dan semuanya berkembang baik (Geneser 1994).

Usus halus (intestinum tenue) bagian duodenum mempunyai beberapa lapisan penyusun dan beberapa sel yang mempunyai ciri spesifik. Duodenum panjangnya sekitar 25 - 30cm terletak retroperitoneal (kecuali 3 cm bagian yang pertama). Melalui pewarnaan Imunohistokimia terlihat beberapa lapisan penyusun duodenum usus halus, meliputi lapisan mukosa, muskularis mukosa, submukosa, muskularis sirkular, muskularis longitudinal dan serosa.

Imunoglobulin atau antibodi adalah sekelompok glikoprotein yang terdapat dalam serum atau cairan tubuh pada hampir semua mamalia. Imunoglobulin termasuk dalam famili glikoprotein yang mempunyai struktur dasar sama, terdiri dari 82-96% polipeptida dan 4-18% karbohidrat. Komponen polipeptida membawa sifat biologik molekul antibodi tersebut. Molekul antibodi mempunyai dua fungsi yaitu mengikat antigen secara spesifik dan memulai reaksi fiksasi komplemen serta pelepasan histamin dari sel mast.

Imunoglobulin A (IgA) disebut juga rantai α (alpha) merupakan imunoglobulin utama pada hasil sekresi misalnya susu, saliva dan air mata serta sekresi traktus respiratorius, intestinal dan genital. Imunoglobulin ini melindungi membran mukosa dari serangan bakteri dan virus. Tiap molekul IgA terdiri atas dua unit H_2L_2 dan satu molekul terdiri atas rantai J dan komponen sekresi, molekul yang disebut terakhir merupakan protein yang diturunkan dari celah reseptor poli-Ig. Reseptor ini mengikat dimer IgA dan mempermudah transpornya melintasi epitel mukosa. IgA dihasilkan paling banyak dalam bentuk dimer yang tahan terhadap proteolisis berkat kombinasi dengan suatu zat protein khusus, disebut *secretory component*, oleh sel-sel dalam membrane mukosa. IgA yang keluar dengan sekret juga diproduksi secara lokal oleh sel plasma. Kehadirannya dalam kolostrum (air susu pertama keluar pada mamalia yang menyusui) membantu melindungi bayi dari infeksi gastrointestinal. Fungsi utama IgA adalah untuk mencegah peralutan virus dan bakteri ke permukaan epitel. Fungsi IgA setelah bergabung dengan antigen pada mikroorganisme mungkin dalam pencegahan melekatnya mikroorganisme pada sel mukosa.

Metode imunohistokimia dulunya diperkenalkan dalam mempelajari reaksi imun organisme. Kepentingan imunohistokimia sangat besar karena pada kenyataannya, kita dapat menentukan asal sel dari hormon tertentu. Spesifitas metode seluruhnya tergantung pada, apakah antigen yang digunakan dapat dipisahkan tanpa kontaminasi zat lainnya. Karena itu penting kontrol metode ini yang terdiri atas pemeriksaan kemurnian antigen (Geneser 1994). Metode imunohistokimia berdasarkan pada penggunaan suatu antibodi yang spesifik yang dilabel dengan ikatan kimia pada suatu zat yang dapat dilihat, tanpa label itu mempengaruhi kemampuan antibodi untuk membentuk suatu kompleks dengan antigen yang bersangkutan.

Dilakukannya pewarnaan Imunohistokimia pada usus halus bertujuan untuk mendeteksi adanya kandungan IgA.

BAHAN DAN METODE

Sampel organ yang digunakan dalam penelitian ini adalah usus halus dari hewan mamalia tikus (*Rattus norvegicus*). Bahan lain yang digunakan adalah larutan Bouin untuk pengawetan jaringan, alkohol, silol, paraffin, 0,9% NaCl fisiologis, hidrogen peroksida (H_2O_2), *hydrofobic marker*, 3,3-diaminobenzidine (DAB, Dojindo, Japan), 0,01 M *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4, medium perekat Entellan dan aquades. Peralatan yang digunakan terdiri atas satu set alat bedah, gelas piala, gelas ukur, gelas obyek, gelas penutup, kotak lembab, mikrotom, mikropipet, inkubator dan mikroskop cahaya yang dilengkapi kamera.

Hewan dikorpsi kemudian organ usus halus diambil kemudian 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 usus halus terfiksasi larutan diganti dengan alkohol 70% yang dikenal sebagai “*stopping point*” dengan pengertian jaringan dapat disimpan lama pada larutan ini.

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 μ m, dilekatkan pada gelas obyek yang telah dilapisi dengan alkohol 70% atau 0,2% Neofren® dalam toluene, kemudian disimpan dalam inkubator 40⁰C selama 24 jam. Sediaan kemudian diwarnai secara imunohistokimia.

Pewarnaan imunohistokimia memiliki 3 tahapan yang harus dilakukan, yaitu preparasi gelas obyek yang digunakan untuk penempelan preparat atau sediaan histologis, pembuatan neofren (agen penempel) untuk membantu proses *afixing* preparat ke gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia itu sendiri. Pewarnaan imunohistokimia meliputi beberapa tahap preparasi, antara lain preparasi gelas obyek, pelapisan (*coating*) gelas obyek dengan neofren (agen penempel), penempelan preparat irisan pada gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia yaitu dengan memilih preparat irisan yang paling bagus, kemudian dilakukan perlakuan sesuai prosedur berikut ini:

1. Deparafinasi (silol III, II, I)
2. Rehidrasi (alkohol absolut III, II, I – 95%, 90%, 85%, 80%, 70%), DW/*milique* (MQ) selama 10 - 15 menit

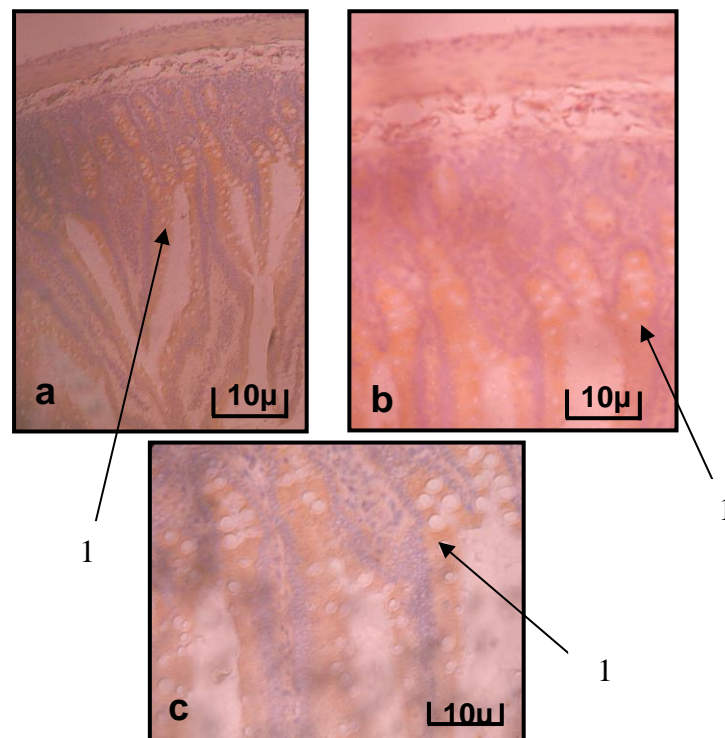
3. Penghilangan peroksidase endogen (kalau terlambat hasilnya positif semua) dengan menggunakan substrat metanol (50 ml) yang dicampur dengan H₂O₂ (0,5 ml) atau 3 % H₂O₂ dalam metanol (dicampur sesaat sebelum gelas obyek dimasukkan) dengan cara dicelup dan dibiarkan selama 15 menit
4. Dilakukan pencucian dengan menggunakan mikropipet: (a) DW/MQ sebanyak 100 µl selama 5-10 menit (2x) dilanjutkan pencucian dengan menggunakan (b) PBS (*phospat buffer saline*) sebanyak 100 µl selama 5-10 menit (2x)
5. Permukaan sediaan di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan kertas tisu dengan tetap menjaga jaringan untuk tidak kering, kemudian dibuat lingkaran pembatas di sekitar jaringan dengan menggunakan *hydrophobic marker*. Sediaan selanjutnya disejajarkan secara mendatar dalam kotak yang lembab. Jaringan pada *slide* yang telah dibatasi dengan *hydrophobic marker*, selanjutnya ditetesi normal serum 10% dalam PBS (agar memblok antigen/Ag non spesifik dan tidak mengacaukan reaksi), kotak kemudian ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30-60 menit
6. Dicuci dengan PBS (100 µl) selama 5 menit (3x)
7. Diberi antibodi/Ab primer IgA 1:500 sebanyak 50-60 atau 80 µl per preparat dan diinkubasi dalam refrigerator suhu 4⁰C selama 1 malam. Penggunaan Ab primer tersebut disesuaikan dengan senyawa atau bahan bioaktif yang akan dideteksi
8. Dicuci lagi dengan menggunakan PBS (100 µl) selama 10 menit (3x)
9. Diberi antibodi/Ab sekunder DEPS (*Dako Envision Peroxydase system*) sebanyak 50-60 atau 80 µl per preparat dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30-60 menit (tahap ini berlangsung dalam suasana gelap, tidak boleh ada cahaya)
10. Dicuci dengan PBS (100 µl) selama 5 menit (3x)
11. Visualisasi dilakukan dengan menggunakan: DAB (*3,3-diaminobenzidine*) sebanyak 10 mg dalam *tris buffer* (50 cc) yang dicampur dengan H₂O₂ (50 µl). Proses pencampuran ini dilakukan sesaat sebelum preparat dimasukkan dan kemudian ditutup (gelap) selama 25 menit. Bahan bioaktif yang terdeteksi akan terwarnai coklat
12. Dicuci atau dimasukkan dalam DW/MQ (*stopping point*) selama 10-15 menit
13. *Counterstain* dengan Hematoksin – DW/MQ (optional)
14. Dehidrasi (70%, 80%, 85%, 90%, 95%), bagian bawah gelas obyek dilap tisu (untuk menghindari terjadinya pengenceran), dilanjutkan ke alkohol absolut I, II, III, bagian bawah gelas obyek dilap tisu lagi, *clearing* (silol I, II, III) dan *mounting*. Untuk selanjutnya sediaan histologis siap diamati di bawah mikroskop dan direkam dengan menggunakan foto digital.

Catatan:

- a. Kontrol negatif tidak menggunakan Ab primer/Ab sekunder atau kedua-duanya, sehingga memungkinkan bahan bioaktif yang terdapat dalam sel tidak terdeteksi
- b. Rasio pengenceran antibodi dengan PBS untuk setiap produk berbeda-beda. Contoh: (1) 1:50 dibanding (2) 1:10.000, untuk yang pertama memungkinkan larutan stok lebih sedikit sehingga hanya dapat digunakan untuk keperluan pewarnaan imunohistokimia preparat dalam jumlah sedikit, sedangkan untuk yang kedua sebaliknya
- c. Untuk produk antibodi terbaru (primer/sekunder) dapat dilakukan uji coba secara *trial and error* untuk menentukan rasio antibodi: PBS yang paling optimum. Untuk produk baru yang mencantumkan penggunaan antibodi dengan rasio 1:50 (antibodi:PBS) dapat dilakukan pembuatan 3 rasio, 1:50, 1:75 atau 1:100. Dari ketiga rasio tersebut kemudian dibandingkan dan dicari yang paling optimum dapat mendeteksi bahan aktif pada preparat.
- d. Pembuatan DAB harus dalam ruangan yang gelap, demikian pula pada saat penetasan ke preparat juga harus dalam suasana gelap. Hal ini dimaksudkan agar terjadi proses berpendar (*fluoresence*)
- e. Rasio DAB:PBS adalah 100:500 μ l. Dalam DAB terdapat 3 reagen dan penggunaan DAB:PBS per reagen adalah R1 = 12,5 μ l, R2 = 12,5 μ l, R3 = 12,5 μ l. Untuk menjaga reaktifitasnya masing-masing disimpan dalam tabung apendorf dan ditutup dengan aluminium foil
- f. Antibodi yang disimpan dalam tabung apendorf sebelum digunakan harus selalu divortex agar terjadi pencampuran secara homogen dengan PBS
- g. *Hydrophobic marker* yang digunakan untuk membuat lingkaran mengelilingi preparat irisan yang akan diwarnai (untuk memproteksi tersebarnya PBS/MQ) adalah PAP Pen (*Peroxidase Anti Peroxidase*), DAKO Pen dan EmmEdgeTM Pen

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fotomikrograf preparat histologis usus halus terlihat sel-sel beta usus halus menunjukkan adanya reaksi positif berwarna coklat (Gambar 1). Reaksi positif dengan warna coklat hampir memenuhi sel-sel usus halus. Hal ini menunjukkan bahwa sel-sel usus halus mengandung IgA. Adanya IgA pada sel-sel usus halus menunjukkan bahwa sel-sel tersebut tidak mengalami kerusakan. Ini di duga terjadi karena tikus yang digunakan dalam penelitian adalah tikus normal yang secara klinis sehat sehingga tidak mengalami kerusakan sel-sel usus halus.



Gambar 1. Fotomikrograf usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia untuk mendeteksi kandungan IgA. (1) ekspresi IgA, (a) Perbesaran 100x usus halus, (b) Perbesaran 200x dan (c) Perbesaran 400x usus halus.

Gambar 1, memperlihatkan pada sel-sel usus halus memberi reaksi positif terhadap IgA. Reaksi positif tersebut ditunjukkan oleh adanya warna coklat pada bagian jaringan mukosa duodenum usus halus, walaupun dengan intensitas warna lebih lemah dan pola sebaran yang relatif sedikit. Kontaminasi yang diakibatkan terbentuknya warna coklat pada sel-sel usus halus merupakan bentuk respons adanya kandungan IgA pada sel-sel tersebut. Dengan adanya antibodi primer, antibodi ini berikatan dengan molekul antigen sel/jaringan yang dideteksi, selanjutnya antibodi yang dilabel dengan peroksidase akan bereaksi dengan antibodi primer tersebut, sehingga keberadaan enzim peroksidase ini melambungkan adanya kompleks antigen-antibodi. Apabila kompleks antigen-antibodi ini bereaksi dengan kromogen DAB maka akan menghasilkan endapan berwarna (kromogranin) sehingga menghasilkan produk tervisualisasi yang berwarna coklat.

KESIMPULAN

1. Pewarnaan imunohistokimia pada usus halus tikus telah berhasil memperlihatkan gambaran kandungan IgA.

2. Hasil reaksi memberikan gambaran kualitatif dari intensitas produk warna yang terbentuk pada sitoplasma. Sel-sel usus halus yang positif mengandung IgA ditunjukkan dengan warna coklat, baik pada inti maupun sitoplasma.

DAFTAR PUSTAKA

- Geneser F. 1994. *Textbook of histologi*. Jilid 1 dan Jilid 2. Alih Bahasa: Dr. F. Arifin Gunawijaya M.S. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Geneser F. 1994. *Textbook of histologi*. Jilid 2. Alih Bahasa: Dr. F. Arifin Gunawijaya M.S. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Kiernan, J. A. 1990. *Histological and Histochemical Method: Theory and Practice*. 2nd edition. Pergamon Press. Pp. 170-197
- [Wikipedia] Wikipedia. 2010. Usus Halus. http://id.wikipedia.org/wiki/Usus_halus. 19 Januari 2010.

