

**PENGAMATAN JENIS GLIKOKONYUGAT PADA SEL KELENJAR
MANDIBULA BABI MENGGUNAKAN TEKNIK HISTOKIMIA LEKTIN**

*(STUDY OF GLYCOCONJUGATES IN THE MANDIBULAR GLAND OF SWINE USING
LECTIN HISTOCHEMISTRY)*

Luh Gde Sri Surya Heryani¹⁾ dan I Nyoman Suarsana²⁾

¹⁾Laboratorium Anatomi dan ²⁾Laboratorium Biokimia.

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

E-mail: surya_heryani@yahoo.com

ABSTRAK

Pengamatan jenis glikokonjugat dan kelompok karbohidrat pada kelenjar mandibula babi telah dilakukan menggunakan teknik pewarnaan *Biru Alcian* (AB), *Periodic Acid Schiff* (PAS) dan *Histokimia Lektin*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui jenis glikokonjugat dan distribusinya serta untuk mengetahui kelompok karbohidrat netral atau karbohidrat asam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel mukus, sereus, sel epitel dan lumen kelenjar mandibularis babi mengandung karbohidrat netral dengan distribusi yang bervariasi. Sedangkan sel sereus mengandung karbohidrat asam, namun sel mukous, sel-sel epitel dan lumen duktus tidak mengandung karbohidrat asam. Sel-sel mukus bereaksi positif terhadap lektin Peanut Agglutinin (PNA), Ricinus Communis Agglutinin (RCA), Wheat Germ Agglutinin (WGA), Con Canavalin A (ConA), Ulexeuropus Agglutinin (UEA) serta negatif Lens Culinaris Agglutinin (LCA) dan mengandung karbohidrat Galaktosa, GlcNAc, GalNAc, Asam sialat, Fruktosa, kecuali manosa. Sedangkan sel epitel bereaksi positif terhadap lektin PNA, RCA, WGA, ConA, UEA serta LCA dan mengandung karbohidrat Galaktosa, GalNAc, Asam sialat, Fruktosa, dan manosa dengan intensitas yang bervariasi.

Kata kunci : glikokonyugat, kelenjar mandibula babi, histokimia lektin.

ABSTRACT

Study of glycoconjugates in the mandibular gland of swine was performed. The aim of this study was to identify the composition of mainly terminal carbohydrate residues of glycoconjugates in the mandibular gland of swine using *Alcian Blue* (AB), *Periodic Acid Schiff* (PAS) and lectin histochemistry staining methods. Results showed that neutral carbohydrates were detected in the mandibular gland ie. mucous cells, serous cells, epithel ductus and lumen ductus cells. Acidic carbohydrates were detected in sereus cells of the gland. Whereas in the mucous cells, epitel ductus and lumen ductus cells there were no acidic carbohydrates detected. Using six types of lectins ie: PNA, RCA, WGA, LCA, ConA and UEA the terminal carbohydrate residues detected in the mucous cells of the gland were galactose, GlcNAc, GalNAc, sialic acid and fructose. In the epitel ductus cells carbohydrates detected were galactose, GalNAc, sialic acid, fucose and manose, respectively.

Key words : glycoconjugate, mandibular gland of pig, lectin histochemistry

PENDAHULUAN

Karbohidrat tersebar di dalam jaringan tubuh. Senyawa ini terutama ditemukan dipermukaan sel, di dalam sitoplasma (bergantung pada aktivitas fungsional sel) dan matriks ekstrasel. Sebagian besar karbohidrat sel berbentuk glikokonjugat, berikatan dengan protein (dalam bentuk proteoglikan dan glikoprotein) dan dengan lemak (bentuk glikolipid) (Agungpriyono, 2003).

Proses-proses biologis seperti pengeluaran air liur oleh kelenjar, pengaturan pertumbuhan, ekskresi enzim, pergerakan sel, respon imun dan respon sel terhadap hormon, semuanya bergantung pada keberadaan karbohidrat (glikokonjugat) pada membran sel. Tidak hanya itu, banyak bakteri atau virus memanfaatkan karbohidrat di permukaan sel sebagai reseptor untuk masuk ke dalam sel dan menginisiasi infeksi (Agungpriyono, 2003).

Kelenjar submandibularis pada mamalia tidak sama, hal ini telah dilakukan pembuktian penelitian histokimia secara terperinci terhadap glikokonjugat pada sel sekretori kelenjar submandibularis (Laden, *et al.*, 1984). Peran yang sangat luas dari karbohidrat dalam berbagai proses biologis di atas menjadikan substansi ini sangat menarik untuk diteliti dan pengembangan teknik baru dalam bidang biomedis.

Akhir-akhir ini berbagai jenis lektin telah digunakan untuk mendeteksi residu gula pada glikokonjugat dalam sel (Golstein dan Hayes, 1978). Lektin merupakan reseptor alamiah untuk glikokonjugat dan mungkin dapat menjadi pembeda yang sangat sensitif terhadap perbedaan yang sangat kecil pada oligosakarida antar sel, sama baiknya dengan spesifisitas dan sensitivitas antibodi monoklonal atau mungkin malah lebih praktis (Agungpriyono, 2003).

Lektin dapat digunakan dalam mendeteksi residu gula intraseluler dan karakterisasinya, sehingga keberadaan dan distribusi glikokonjugat pada area tertentu dari sel atau produk sel dapat memberikan dugaan yang berkaitan dengan fungsinya di lokasi tersebut (Spicer dan Schulte, 1992; Danguy, *et al.*, 1994). Lektin dapat berikatan dengan ujung gula dari glikokonjugat sehingga akan diketahui jenis glikokonjugatnya. Pada saat ini penggunaan teknik histokimia lektin terutama untuk melihat keberadaan jenis glikokonjugat pada kondisi normal atau perubahannya pada keadaan sakit.

Beberapa peneliti telah menggunakan teknik histokimia lektin untuk melihat sebaran karbohidrat pada kelenjar mandibula ayam (Supraset, *et al.*, 2000), distribusi karbohidrat pada beberapa segmen usus ayam (Pohlmeier, 2002) dan studi lektin sebagai penanda diferensiasi

dari kanker dan metastasis *cell line* (Sherwani, *et al.*, 2003).

Prosedur histokimia standar, seperti periodic acid Schiff (PAS) dan alcian blue (AB), dapat mendeteksi kelompok besar karbohidrat yaitu golongan karbohidrat netral dan karbohidrat asam. Lektin memiliki afinitas secara spesifik kepada residu gula tertentu sehingga memudahkan identifikasi glikokonjugat yang terdeteksi. Metode histokimia lektin mendeteksi banyak glikokonjugat yang sebelumnya tidak terdeteksi oleh prosedur standar karena tidak bereaksi dengan PAS atau pewarna lainnya (Kiernan, 1990). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai jenis karbohidrat (glikokonjugat) spesifik dan distribusinya pada sel dalam keadaan normal, sehingga dapat dipakai sebagai referensi jika kelenjar mandibula mengalami kelainan. Selain itu, dapat digunakan sebagai acuan untuk menggunakan berbagai jenis gula (monosakarida) sebagai inhibitor untuk mencegah terjadinya infeksi oleh mikroorganisme patogen yang mempunyai reseptor pada glikokonjugat pada sel kelenjar mandibula.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Bahan yang digunakan adalah kelenjar ludah babi bagian mandibularis dari 5 ekor babi betina jenis landrace dengan

berat badan 85-90 kg, Lektin berlabel biotin (PNA, ConA, RCA, WGA, LCA, dan UEA I), Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC Kit), larutan DAB, Alcian blue (AB) pH 2,5, Asam asetat 3%, counterstain, HCl 0,1 N, Periodic acid 0,5-1%, Schiff reagens.

Metode Penelitian

Pembuatan sediaan histologis

Kelenjar di dicuci dengan larutan PBS (phosphate buffered saline) yang mempunyai pH 7,2 kemudian difiksasi dalam larutan bouin selama 24 jam. Sampel kelenjar dipindahkan dan disimpan di dalam alkohol 70% sampai proses selanjutnya siap untuk dilakukan pewarnaan AB, PAS dan histokimia lektin (Agung priyono, 2003).

Pewarnaan Alcian blue (AB) pada pH 2,5

Pewarnaan alcian blue bertujuan untuk mengetahui kelompok karbohidrat asam dalam jaringan (*in situ*), yang jika bereaksi positif ditandai dengan terlihatnya warna biru.

Pewarnaan Periodic acid Schiff (PAS)

Pewarnaan PAS bertujuan untuk mendeteksi adanya kelompok karbohidrat netral, yang ditandai dengan terlihatnya warna merah – magenta.

Pewarnaan Histokimia Lektin

Sediaan histologis yang sudah dideparafinisasi di cuci dengan aquades, dilanjutkan dengan PBS selama 15 menit pada suhu ruang. Sediaan dikeringkan lalu tetesi dengan larutan 0,03 % H₂O₂, diamkan selama 15 menit pada

suhu ruang. Cuci sediaan dengan larutan PBS selama 10 menit Sediaan dikeringkan lalu masing-masing tetesi dengan 15 ml larutan lektin berlabel biotin (*biotinylated*). Jenis dan Spesifisitas lektin yang digunakan dalam penelitian ini dirangkum dalam Tabel 1.

Tabel 1 .Jenis lektin, gula spesifiknya, dan kontrol yang dipakai dalam penelitian.

No	Lektin (singkatan)	Sumber lektin	Posisi Gula spesifik
1	PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>	Man ?, Glc ?
2	RCA	<i>Ricinus communis</i>	Gal?1,4, GlcNAc pada posisis terminal
3	WGA	<i>Triticum vulgare</i>	?GlcNAc pada posisi terminal dan internal
4	LCA	<i>Lens culinaris</i>	Mannose ? pada posisi terminal
5	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	?-Mannose dan ?-Glukose pada posisi terminal dan internal
6	UEA	<i>Ulexeuropus Agglutinin</i>	GalNAc, oligosakarida
7	PBS	Kontrol Negatif	

Keterangan: Gal:galaktose; GalNAc: N-acetylgalactosamine; GlcNAc:N-acetylglucosamine. Kontrol negatif digunakan PBS pH 7,4.

Kemudian inkubasikan pada suhu 4°C selama 30 menit. Cuci sediaan dengan larutan PBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit dengan menggunakan *shaker*. Keringkan sediaan dan tetesi masing-masing sediaan dengan larutan ABC, inkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C. Cuci sediaan dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit denganshaker. Keringkan sediaan, tetesi dengan larutan DAB,

diamkan 30 menit sambil diamati di bawah mikroskop untuk melihat reaksi larutan DAB pada jaringan. Apabila timbul reaksi maka akan terlihat warna kecoklatan pada jaringan. Selama pengamatan, sediaan preparat harus berada dalam keadaan gelap. Cuci sediaan preparat dengan PBS 3 kali masing-masing 5 menit dilanjutkan dengan aquades 3 kali masing-masing 5 menit. Sediaan diberi pewarnaan dengan

larutan hematoksin (*counterstain*), kemudian dilakukan dehidrasi dan *clearing* lalu diakhiri dengan *mounting*.

Analisis Data

Afinitas dan intensitas reaksi yang diamati menunjukkan konsentrasi karbohidrat atau glikokonjugat dan dibagi menjadi lima kelompok yaitu negatif (-), sangat lemah (+/-), intensitas lemah (+), intensitas sedang (++) , dan intensitas kuat (+++). Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif (Suarsana,dkk., 2005).

Tabel 2. Intensitas Kelenjar Mandibularis Terhadap Pewarnaan PAS dan AB pH 2,5

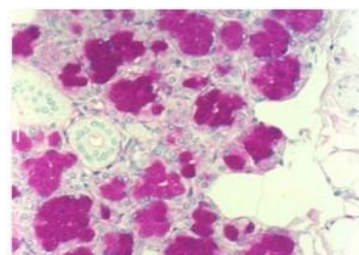
Kelenjar Mandibularis	Pewarnaan PAS	Pewarnaan AB pH 2,5
-Sel-sel Mukus	+++	-
-Sel-sel Sereus	++	++
-Sel-sel Epitel duktus	++	-
-Lumen duktus	++	-

Hasil pewarnaan PAS (Gambar 1) pada kelenjar mandibularis, sel-sel sereus dan mukus menunjukkan reaksi positif masing-masing dengan intensitas sedang (++) sampai kuat (+++), sedangkan sel-sel epitel dan dan lumen duktus juga menunjukkan reaksi positif dengan intensitas sedang (++) .

HASIL DAN PEMBAHASAN

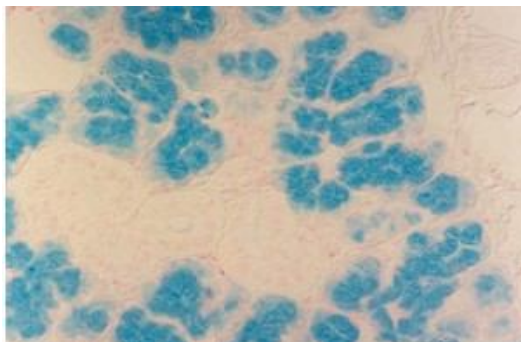
Hasil

Jenis dan pola distribusi karbohidrat kompleks (karbohidrat asam dan netral) pada kelenjar dapat diketahui dari reaksi jaringan tersebut terhadap pewarnaan PAS dan AB. Pola distribusi dan intensitas karbohidrat netral dan asam pada kelenjar mandibularis dapat dilihat dalam Tabel 2.



Gambar 1. Pewarnaan PAS terhadap kelenjar mandibularis menunjukkan Sel-sel mukus, sereus, sel-sel epitel dan lumen duktus kelenjar mandibularis bereaksi positif terhadap PAS.

Terhadap pewarnaan AB pada pH 2,5 (Gambar 2) pada sel-sel sereus kelenjar mandibularis menunjukkan hasil reaksi positif dengan intensitas sedang (++) , sementara sel-sel mukus, sel-sel epitel dan lumen duktus menunjukkan reaksi negatif.



Gambar 2. Hasil pewarnaan AB pH 2,5 terhadap kelenjar mandibularis. Sel-sel sereus bereaksi positif terhadap AB pH 2,5, sedangkan sel-sel mukus, sel-sel epitel dan lumen duktus kelenjar mandibularis bereaksi negatif terhadap AB pH 2,5.

Distribusi karbohidrat spesifik (glikokonjugat) pada kelenjar mandibularis dapat diketahui dengan pewarnaan lektin. Pola distribusi dan intensitas glikokonjugat pada kelenjar mandibularis dapat dilihat Tabel 3.

Tabel 3. Pola distribusi dan intensitas glikokonjugat pada kelenjar mandibularis terhadap pewarnaan histokimia lektin

Kelenjar mandibularis dan distribusi	Jenis Lektin dan Kontrol						
	PNA	RCA	WGA	LCA	ConA	UEA	PBS
-Sel-sel Mukus	++	+	+/-	-	+	+/-	-
-Sel-sel Sereus	-	-	-	-	-	+/-	-
-Sel-sel Epitel duktus	++/-	+	+/-	+	+	+	-
-Lumen duktus		-	++	-	+/-	-	-

Pembahasan

Secara umum kelenjar mandibularis menunjukkan reaksi positif terhadap PNA, RCA, ConA, UEA dan LCA (Gambar 3). Terhadap lektin PNA, sel-sel mukus, sel-sel epitel dan lumen duktus menunjukkan reaksi positif lemah sampai kuat. Sel-sel mukus dan sel-sel epitel

duktus menunjukkan reaksi positif terhadap RCA. Terhadap WGA dan ConA, sel-sel mukus, sel-sel epitel duktus dan lumen bereaksi positif. Terhadap UEA, sel-sel mukus, sel-sel sereus dan sel-sel epitel duktus menunjukkan reaksi positif, sementara terhadap LCA hanya sel-sel epitel duktus yang menunjukkan reaksi positif.

Hasil penelitian dengan pewarnaan PAS dan AB pH 2,5, dapat diperoleh gambaran tentang sebaran karbohidrat pada Kelenjar mandibularis. Pewarnaan AB dan PAS dapat digunakan untuk mendeteksi jenis karbohidrat yang bersifat asam dan karbohidrat netral dalam jaringan (Bancroft, 1967). Pada kelompok karbohidrat asam berarti di dalam strukturnya terdapat gugus asam sedangkan pada karbohidrat netral tidak terdapat gugus asam (Dellmann dan Brown, 1993). Jenis karbohidrat yang termasuk karbohidrat netral adalah glikoprotein, glikogen, glikolipid dan amilase sedangkan termasuk karbohidrat asam adalah kondroitin sulfat, hyaluronat, sialomusin, mukoin sulfat dan asam hyaluronat.

Hasil pewarnaan PAS terhadap sel-sel mukous, serous, sel epitel dan lumen duktus menunjukkan reaksi positif, hal ini menunjukkan bahwa pada lokasi tersebut terdistribusi karbohidrat netral. Reaksi positif pada pewarnaan PAS terjadi karena reaksi antara aldehide dan *Schiff reagent* yang membentuk warna merah. Gugus aldehide berasal dari hasil oksidasi glikol. Glikoprotein yang mengandung glikol antara lain: glukosil, manosil, fukosil, galaktosil dan asam sialik. Jika metabolise sel meningkat maka reaksi sel akan semakin meningkat atau terjadi reaksi positif (Kiernan, 1990).

Hasil pewarnaan AB pH 2,5, sel-sel serous memperlihatkan reaksi positif, hal

ini menunjukkan bahwa sel-sel serous mengandung karbohidrat asam. Menurut Zainudin, *et al*(2000) umumnya kelenjar mengandung karbohidrat asam, misalnya heparin sulfat dan hialuronat sulfat yang berhubungan dengan fungsinya dalam menghasilkan skreta, mukus dan beberapa enzim. Kelenjar mandibularis secara umum bereaksi positif terhadap enam jenis lektin yang digunakan yaitu PNA, RCA, WGA, LCA, Con A dan UEA. Hal ini menunjukkan bahwa kelenjar mandibularis mengandung karbohidrat glukosa, manosa, galaktosa, Gal?1-4, GlcNAc, dan GalNAc. Dalam hal ini kontribusi monosakarida – monosakarida tersebut terhadap permukaan sel adalah sebagai penyusun atau bagian struktur yang menyusun glikoprotein atau glikolipid.

Secara umum sel-sel mukus memperlihatkan reaksi positif terhadap PNA, RCA dan Con A (intensitas lemah sampai sedang), sementara terhadap WGA dan UEA memperlihatkan reaksi positif sangat lemah. Hal ini menunjukkan beberapa karbohidrat seperti galaktosa , GalNAc, manosa, glukosa disintese di dalam sel-sel mukus. Sel-sel epitel duktus memperlihatkan reaksi positif terhadap keenam lektin yang digunakan, sementara lumen duktus hanya positif terhadap PNA, WGA dan Con A. Hal ini menunjukkan karbohidrat galaktosa, asam sialat, glukosa, dan

fukosa dapat ditemukan pada epitel dan lumen duktus.

Menurut Pedini, *et al* (1994) kelenjar mandibularis babi memiliki beberapa kesamaan dengan kelenjar submandibularis anjing dalam hal kandungan karbohidrat yaitu memiliki fukosa, Galaktosa, GalNAc, GlcNAc dan asam sialat. Sementara adanya perbedaan distribusi dan kandungan karbohidrat lain yang mungkin terjadi antara jenis hewan ini kemungkinan disebabkan karena perbedaan fisiologis, biokimia perbedaan jenis dan pola makan masing-masing hewan.

SIMPULAN DAN SARAN

Sel-sel mukus, sereus, sel epitel dan lumen kelenjar mandibularis babi mengandung karbohidrat netral dengan distribusi yang bervariasi. Sedangkan sel serous mengandung karbohidrat asam, namun sel mukous, sel-sel epitel dan lumen duktus tidak mengandung karbohidrat asam.

Sel-sel mukous positif terhadap PNA, RCA, WGA, ConA, UEA serta negatif LCA dan mengandung karbohidrat Galaktosa, GlcNAc, GalNAc, Asam sialat, Fruktosa, kecuali manosa. Sedangkan sel epitel positif terhadap PNA, RCA, WGA, ConA, UEA serta LCA dan mengandung karbohidrat Galaktosa, GalNAc, Asam sialat,

Fruktosa, dan manosa dengan intensitas yang bervariasi.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini dan kepada Direktorat Jenderal pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui dana DIPA Universitas Udayana tahun anggaran 2006 dengan Kontrak Nomor : 002054 /J14/KU.04.07/2006.

DAFTAR PUSTAKA

- Agungpriyono, S. 2003. Glikobiologi dan Lektin. Dalam Modul: *Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia*. Pelatihan Dosen Universitas/Perguruan Tinggi. 16-26 Juni 2003. Kerja sama Proyek Peningkatan Kualitas Sumber daya Manusia Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional dengan Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran hewan Institut Pertanian Bogor.
- Brancroft, JD. 1967. An Introduction to Histochemical Tehnique. Appleton Century rofts, London. 62-93
- Danguy, A., F. Afik., B. Pajak., dan H.J. Gabius. 1994. Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology. *Histol. and Histopathol.* 9:155-171.
- Delmann, H.D dan E.M.Brown. 1993. Text Book of Veterinary Hstology. 4th, Edition. Lea and Febiger, Philadelphia. 161-164

- Goldstein, I.J., dan C.E. Hayes. 1978. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plant and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35:127-340.
- Kiernan, J.A. 1990. Histology and Histochemical Methods: theory and practice. 2nd edition. Pergamon press. Oxford, New York. Pp.433.
- Laden, S.A., B.A. Schulte., dan S.S. Spicer. 1984. Histochemical evaluation of secretory glycoproteins in human salivary gland with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* 32:965-972.
- Palmer, R.A. 2003. Lectin structure, carbohydrate binding and ribosome inactivating protein. [Http://www.cryst.bbk.ac.uk/research/lectin/lectin-p1.html](http://www.cryst.bbk.ac.uk/research/lectin/lectin-p1.html). 08-12-2003.
- Pedini, V., P. Ceccarelli, dan A.M. Gargiulo. 1994. Glycoconjugates in the mandibular Salivary Gland of Adult Dog revealed By Lectin Histochemistry. *Ret. Vet. Sci*: 57 (3):353-357.
- Sharon, N. dan H. Lis., 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246:227-234.
- Sherwani, A.F., S. Mohmood., F. Khan., R.H. Khan, dan M.A. Afer., 2003. Characterization of lectins and their Specificity in Carcinomas an appraisal. *Indian J. of Clin. Biochem.* 18(2):169-180
- Supraset, A., S. Arthitong, dan S. Koonjaenak. 2000. Lectin histochemistry of glycoconjugates in mandibular gland of chicken. *Kasetsart J.* 34:85-90.
- Spicer, S.S. dan D.A. Schulte. 1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *J. Histochem. Cytochem.* 40:1-38.
- Zainuddin, N., I.K.M. Adnyana., D.K. Sari., W. Wresdiyati., dan Agungpriyono, S. 2000. Studi histologi dan histokimia Kelenjar Submandibularis dan Kelenjar Parotis (Tupai glis) dengan tinjauan khusus pada jenis dan distribusi karbohidrat. *J. Primatologi Indonesia* 3 (1):9-16.
- Suarsana, N., I.B.O. Winaya., W. Suardana dan S. A Priyono. 2005. Kajian Histokimia Perubahan Pola Distribusi Glikokonjugate pada Epitel dan Sel-sel Kelenjar Usus Ayam pada Kondisi stress dan sakit. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi A2. FKH Universitas Udayana.