

Studi Mikroanatomi Pankreas Kodok Lembu Menggunakan Metode Pewarnaan Baku dan Immunohistokimia

(MICROSCOPICAL STUDY OF PANCREAS OF BULLFROG USING CONVENTIONAL AND IMMUNOSTAINING METHODS)

I Ketut Mudite Adnyane, Supratikno, Adi Winarto, Srihadi Agungpriyono

Bagian Anatomi, Histologi dan Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Wing 5 Lt. 3 Kampus IPB Dramaga Bogor 16680; Telp. 0251-8626064 Fax. 0251-8629464;
E-mail: adnyane@gmail.com

ABSTRAK

Morfologi, distribusi dan frekuensi relatif sel-sel endokrin pankreas kodok lembu (*Rana catesbeiana*) telah dipelajari menggunakan metode standar dan imunohistokimia. Sampel pankreas diambil dari sepuluh ekor kodok lembu dewasa (5 jantan dan 5 betina). Secara umum pankreas kodok lembu terdiri dari bagian eksokrin, bagian endokrin (pulau Langerhans) dan alat penyalur (duktus kelenjar). Bagian endokrin tersebar di antara bagian eksokrin dari pankreas. Sel endokrin pankreas kodok lembu mempunyai bentuk polimorfik, bulat, oval segitiga atau seperti tetes air. Sel glukagon berdistribusi di bagian perifer, sel insulin di bagian tengah dan sel somatostatin tersebar pada pulau Langerhans. Jumlah sel glukagon lebih banyak dibandingkan dengan jumlah sel insulin dan somatostatin.

Kata-kata kunci: Kodok lembu, pankreas, immunohistokimia

ABSTRACT

Morphology, distribution and relative frequency of endocrine cells in the pancreas Bullfrog (*Rana catesbeiana*) were studied using conventional and immunohistochemical methods. Samples pancreas taken from ten adult Bullfrogs (five males and five females). In general, pancreas of the Bullfrog consists of exocrine portion, endocrine portion (Langerhans islets) and ducts. The Langerhans islets were distributed among the exocrine portion of pancreas. Endocrine cells in the pancreas of Bullfrog were polymorph, round, oval or triangular in shapes with bipolar cytoplasmic granules. Glucagon cells were distributed mainly in the peripheral, insulin cells in the center while the somatostatin cells in the area between glucagon and insulin cells of Langerhans islet. The number of the glucagon cells were higher compare to the number of insulin and somatostatin cells.

Key words: Bullfrog, pancreas, immunohistochemistry

PENDAHULUAN

Kodok lembu atau yang dikenal dengan nama *Bullfrog* di Amerika, termasuk dalam famili *Ranidae*, spesies *Rana catesbeiana*. Kodok lembu dewasa bisa mencapai ukuran panjang 20 cm dan berat 750 gram (IUCN, 2006). Kodok lembu mempunyai daya adaptasi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang kurang baik dan dapat hidup sampai 9 tahun setelah metamorfosis (Babbitt, 2005; Spear *et al.*, 2009).

Kodok sudah lama menjadi komoditas ekspor yang potensial. Sejak tahun 1969, Indonesia mengeksport paha kodok ke berbagai negara di Eropa. Kodok sangat bermanfaat dan mempunyai kepentingan ekonomi bagi kehidupan manusia, di antaranya sebagai kontrol hama serangga dan hewan laboratorium dalam penelitian bidang kedokteran. Peternakan kodok lembu di Indonesia telah berkembang secara intensif sejak tahun 1981 dan terus berkembang sampai sekarang.

Namun, demikian data tentang anatomi dan morfologi saluran pencernaan kodok lembu masih belum banyak dilaporkan.

Pankreas merupakan organ tubuh istimewa yang berfungsi ganda sebagai kelenjar eksokrin dan endokrin. Sebagai kelenjar eksokrin pankreas membantu dan berperan penting dalam sistem pencernaan dengan mensekresikan enzim-enzim pankreas seperti amilase, lipase, dan tripsin. Sebagai kelenjar endokrin, pankreas dikenal dengan produksi hormon utama yaitu glukagon dan insulin yang berperanan dalam metabolisme glukosa. Fungsi endokrin pankreas dilakukan oleh pulau Langerhans yang tersebar di antara bagian eksokrin pankreas (Cunningham dan Klein, 2007; Norris, 2007). Pulau Langerhans pada hewan mamalia berisi kurang lebih lima jenis sel endokrin. Empat dari lima tipe tersebut adalah sel insulin (b), glukagon (a), somatostatin (SS), dan *polypeptide pancreas* (PP), yang dapat diketahui melalui respon dari hormon yang dikandungnya. Secara umum topografi sel insulin berada di tengah, sel glukagon, dan sel PP berada di perifer atau di sepanjang tepi pulau Langerhans. Sedangkan sel-sel somatostatin berada pada posisi yang cukup strategis yaitu di antara sel-sel glukagon, sel insulin serta sel PP (Huang et al., 2009; Norris, 2007).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat morfologi pankreas kodok lembu secara mikroskopis, dengan tinjauan khusus pada distribusi dan frekuensi sel-sel penghasil hormon glukagon, insulin, dan somatostatin menggunakan metode imunohistokimia.

METODE PENELITIAN

Hewan dan Penyiapan Sampel Jaringan

Penelitian ini menggunakan 10 ekor (5 ekor betina dan 5 ekor jantan) kodok lembu (*R. catesbeiana*) berumur 1 tahun setelah metamorfosis. Sampel organ pankreas diambil segera setelah hewan dikorbankan. Organ dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4 kemudian dimasukkan ke dalam larutan fiksatif *Bouin* (dengan komposisi asam pikrat jenuh : formalin pa : asam asetat glasial = 15:5:1) selama 24 jam. Setelah organ 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 konsentrasi

bertingkat mulai 80% sampai dengan 100% dan dijernihkan dengan xilol (*clearing*) sebelum akhirnya ditanam dalam parafin (*embedding*). Jaringan dalam blok parafin diiris secara serial dengan ketebalan 5 μ m menggunakan mikrotom (*Rotary microtome* Yamatokoki, Japan), dilekatkan pada gelas objek kemudian disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam.

Pewarnaan Jaringan

Hasil sayatan diwarnai dengan pewarnaan baku hematoksilin eosin (HE) dan pewarnaan imunohistokimia. Pewarnaan HE digunakan untuk melihat struktur umum dari jaringan (Kiernan, 1993). Morfologi dan distribusi sel-sel penghasil hormon glukagon, insulin, dan somatostatin dideteksi menggunakan pewarnaan imunohistokimia metode *Avidin-Biotin Complex* (ABC) (Hsu et al., 1981). Proses pewarnaan diawali dengan *deparafinisasi* jaringan dengan xilol dan *rehidrasi* dengan alkohol dan PBS. Jaringan kemudian diinkubasikan dengan larutan H₂O₂ 3% dalam metanol selama 15 menit untuk menghilangkan aktivitas enzim peroksidase endogen. Jaringan diinkubasikan dalam serum normal kambing (S-1000, Vector Laboratories Inc., USA) selama 30 menit untuk menutupi bagian antigen yang tidak spesifik. Setelah itu, masing-masing jaringan diinkubasikan dengan antibodi primer yang berbeda yaitu antiglukagon (*Glukagon rabbit polyclonal antibody* G-P806, Vector Laboratories Inc., USA) 1:50; antiinsulin (*Insulin mouse monoclonal* I2018, Sigma Aldrich Inc., USA) 1:2000 dan antisomatostatin (*Somatostatin rabbit polyclonal antibody* VP-S282, Vector Laboratories Inc., USA) 1:100 pada suhu 4°C selama 1 malam. Setelah dilakukan pencucian dengan PBS, kemudian diinkubasikan selama 60 menit dalam antibodi sekunder (Biotinylated 1:200 BA-1000 Vector Laboratories Inc., USA) *antirabbit* untuk glukagon dan somatostatin, serta Biotinylated *antimouse* untuk insulin, selanjutnya jaringan dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan dilanjutkan inkubasi dalam Vectastain Elite ABC Kit (1:2, PK-6100, Vector Lab. Inc. USA) selama 30 menit. Reaksi positif divisualisasikan dengan diaminobenzidine (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate 1:20 SK-4105, Vector Laboratories Inc., USA) selama 1 menit.

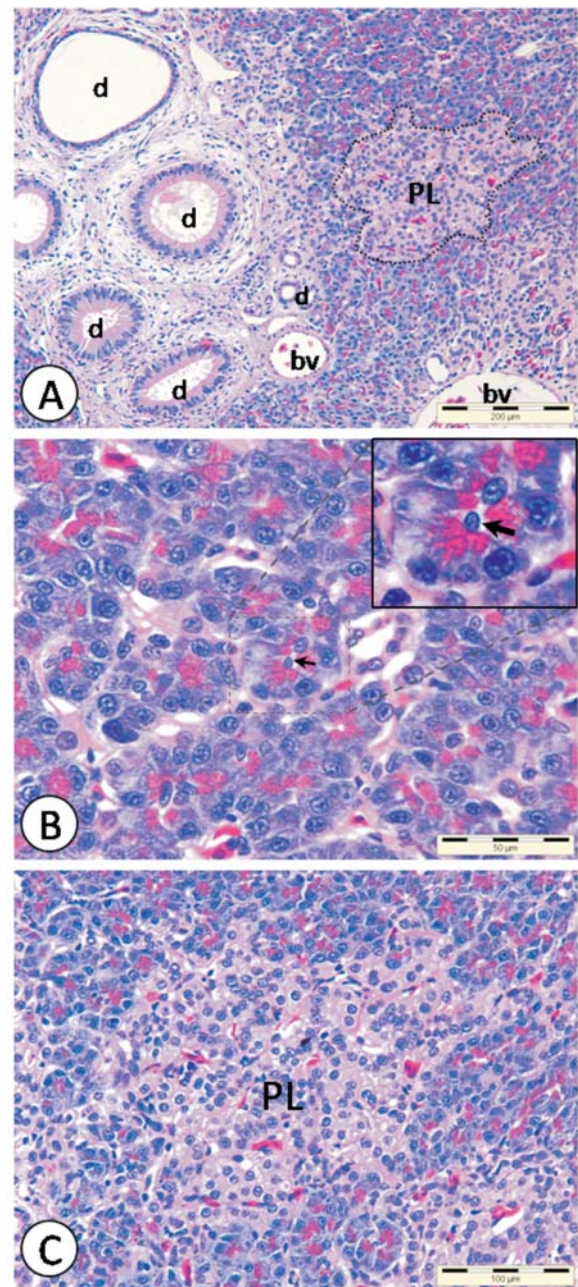
Untuk menjamin spesifisitas reaksi dilakukan prosedur kontrol negatif dan kontrol positif. Kontrol negatif dilakukan dengan menginkubasikan sediaan menggunakan PBS

sebagai pengganti antibodi primer. Jaringan pankreas hewan mamalia (domba) digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini. Hasil pewarnaan diamati dan didokumentasikan menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi *image analyzer* (Olympus BX51, Japan).

HASIL DAN PEMBAHASAN

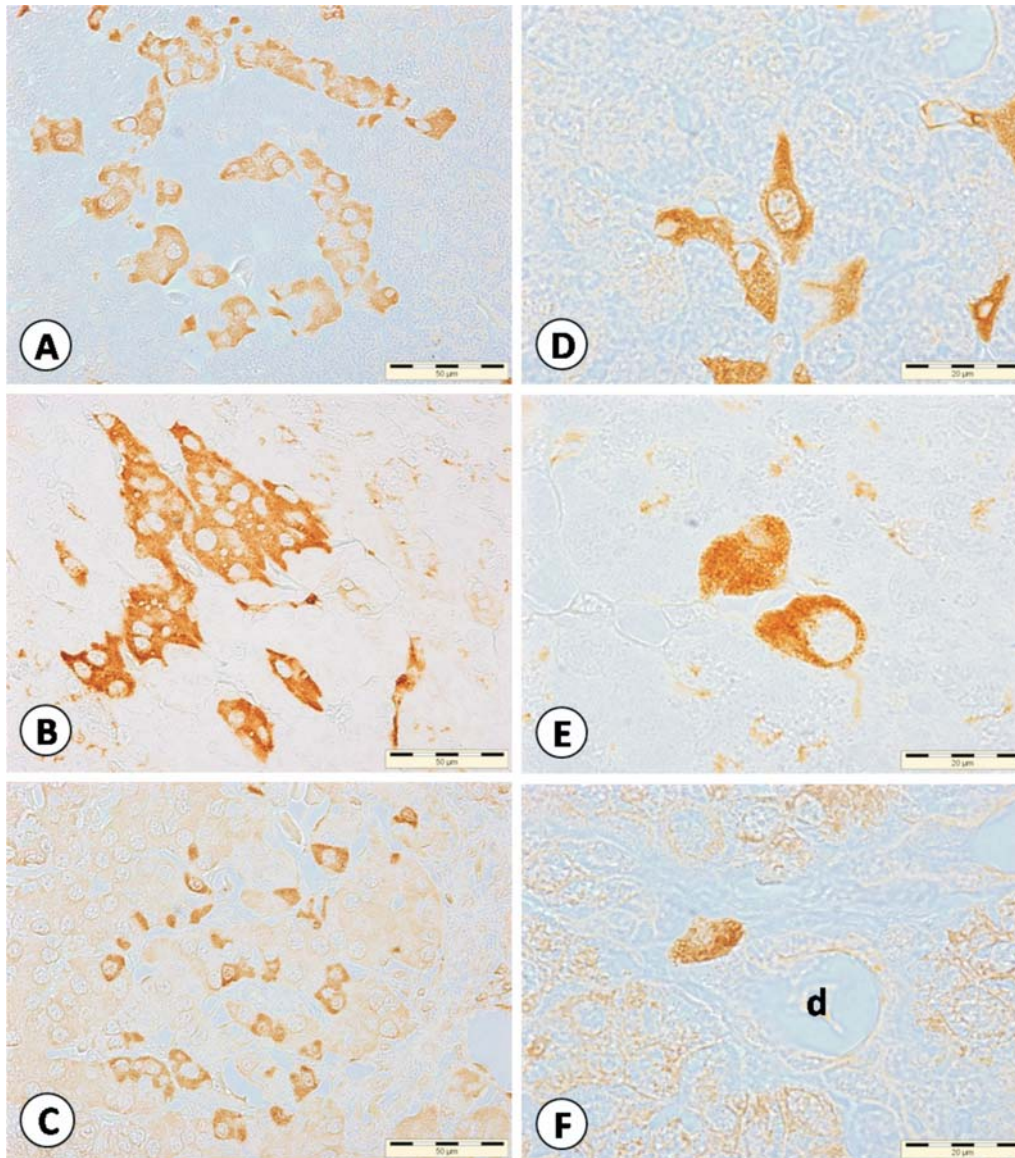
Penelitian ini berhasil menggambarkan morfologi secara mikroskopis pankreas kodok lembu. Secara umum pankreas kodok lembu terdiri dari bagian eksokrin, bagian endokrin, dan alat penyalur/duktus kelenjar (Gambar 1A). Kelenjar eksokrin terdiri atas kumpulan sel-sel serous yang berbentuk piramid dengan sel sentro asinarnya. Sitoplasma sel-sel asinar pankreas kodok lembu mengandung butiran sekreta (berwarna merah) terlihat jelas di bagian apikal sel dengan pewarnaan HE (Gambar 1B). Gambaran ini sama seperti yang dilaporkan pada kambing dan domba (Adnyane *et al.*, 2001). Alat penyalur bagian eksokrin ini terdiri atas: *duktus interkalatus*, *duktus striatus* dan *duktus eksretorius*. Saluran-saluran ini dapat dibedakan menurut ukuran dan struktur histologinya (Gambar 1A). Gambaran yang sama juga ditemukan pada ruminansia, manusia, dan tikus (Dellmann dan Carithers, 1996; Huang *et al.*, 2009; Ku dan Lee, 2005).

Kapsula jaringan ikat membentuk sekat-sekat, membagi pankreas menjadi lobus dan lobulus. Dalam jaringan ikat interlobularis ditemukan pembuluh darah, saraf, dan saluran kelenjar. Berbeda dengan morfologi pankreas hewan mamalia, pankreas kodok lembu tidak mempunyai batas antar lobulus yang jelas. Bagian endokrin pankreas (pulau Langerhans) dibalut oleh jaringan ikat dan tersebar di antara bagian eksokrin pankreas dengan bentuk yang tidak beraturan. Sitoplasma sel-sel di pulau Langerhans mengambil warna bersifat eosinofilik lemah dan lebih muda sehingga sangat mudah untuk dibedakan dengan bagian eksokrinnya (Gambar 1A dan C). Di dalam pulau Langerhans pankreas kodok lembu ditemukan banyak pembuluh darah kapiler. Keberadaan pembuluh darah ini berkaitan dengan fungsinya untuk menyalurkan sekreta hormon dari pulau Langerhans. Sel-sel endokrin dikatakan menyalurkan hormon yang dihasilkannya melalui pembuluh darah kapiler (Cunningham



Gambar 1. Fotomikrograf pankreas kodok lembu, memperlihatkan: A, struktur umum pankreas terdiri dari bagian eksokrin, endokrin dan duktus kelenjar (d) dan pembuluh darah (bv). B, bagian eksokrin terdiri dari sel-sel asinar dengan sel sentro asinar (tanda panah) di bagian tengahnya; C, bagian endokrin atau pulau Langerhans (PL). Pewarnaan HE. Skala: A=200µm; B=50µm; C=100µm.

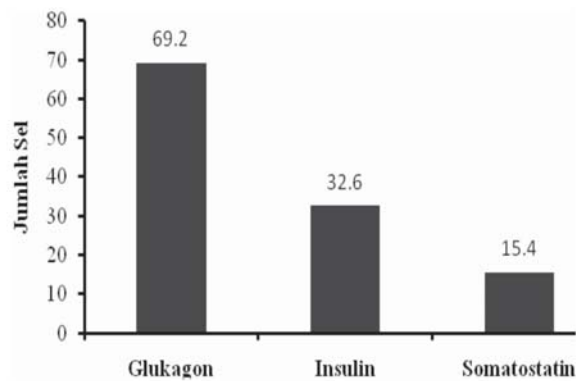
dan Klein, 2007; Norris, 2007). Pulau Langerhans pada pankreas kodok lembu yang diteliti mempunyai rata-rata ukuran diameter $204 \pm 94 \mu\text{m}$.



Gambar 2. Fotomikrograf pankreas kodok lembu memperlihatkan distribusi sel glukagon, insulin dan somatostatin pada pulau Langerhans (A, B, C) dan di bagian eksokrin pankreas (D, E, F). Sel glukagon berdistribusi di bagian tepi dari pulau Langerhans (A), sel insulin berdistribusi di bagian tengah dari pulau Langerhans (B), sedangkan sel somatostatin tersebar di antara sel glukagon dan sel insulin (C); d, duktus eksretorius. Pewarnaan Imunohistokimia (A & D antiglukagon; B & E antiinsulin; C & F antisomatostatin). Skala: A-C = 50 μ m; D-F = 20 μ m

Reaksi positif terhadap pewarnaan imunohistokimia ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada butiran-butiran di bagian sitoplasma sel dengan inti yang tidak terwarnai. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa sel-sel endokrin pada pulau Langerhans pankreas kodok lembu memiliki gambaran khas sel endokrin baik bentuk terbuka maupun bentuk tertutup. Morfologi sel glukagon dan insulin

yang teramati adalah polimorfik, bulat, oval, segitiga atau seperti tetes air, sedangkan pada sel somatostatin ditemukan adanya penjurulan pada bagian sitoplasmanya. Bentuk ini mirip dengan morfologi sel endokrin pada saluran pencernaan babirusa (Agungpriyono *et al.*, 2000), kancil (Agungpriyono *et al.*, 1994), kelelawar (Nisa *et al.*, 2005). Sel glukagon pankreas kodok lembu berdistribusi di bagian perifer dari pulau



Gambar 3. Jumlah rata-rata sel glukagon, insulin dan somatostatin per pulau Langerhans pada pankreas kodok lembu.

Langerhans (Gambar 2A). Sel insulin berdistribusi di bagian tengah dari pulau Langerhans (Gambar 2B). Sel somatostatin yang teramat tersebar di antara sel glukagon dan sel insulin pada pulau Langerhans pankreas (Gambar 2B). Susunan yang sama seperti ini telah dilaporkan pada pankreas kadal gurun (El-Salhy *et al.*, 1983), kodok *Red-bellied*, *Bombina orientalis* (Lee *et al.*, 2003) dan hewan mamalia pada umumnya. Namun, berbeda dengan yang ditemukan pada pankreas kuda, karena terjadi hal sebaliknya yaitu sel glukagon berdistribusi di bagian tengah dari pulau Langerhans (Dellmann dan Carithers, 1996).

Selain itu sel glukagon, insulin, dan somatostatin juga ditemukan di luar pulau Langerhans pankreas yaitu di antara sel-sel asinar, di sekitar pulau Langerhans, dekat atau di antara epitel duktus kelenjar dan sekitar pembuluh darah. Sel endokrin ini dikenal sebagai sel endokrin ekstra insular pankreas (Gambar 2D-F). Seperti halnya pada pulau Langerhans, sel-sel ekstra insular pankreas terdiri dari sel glukagon, insulin dan somatostatin. Hal yang sama dilaporkan pada pankreas kodok *Red-bellied* / *B. orientalis* (Lee *et al.*, 2003), kadal gurun (El-Salhy *et al.*, 1983), tikus (Ku dan Lee, 2005), kambing dan domba (Adnyane *et al.*, 2001; Rahayu *et al.*, 2005), sapi (Dellmann dan Carithers, 1996) dan manusia (Grimelius, 1968).

Pengamatan secara mikroskopik menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan *image analyzer*, dapat dikemukakan bahwa jumlah rata-rata sel glukagon per pulau Langerhans jauh lebih banyak dibandingkan

dengan jumlah sel insulin dan somatostatin (Gambar 3). Proporsi yang sama juga ditemukan pada bagian asinar pankreas. Hasil ini berbeda dengan proporsi jumlah sel endokrin pada pankreas mamalia. Secara umum jumlah sel insulin jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan jumlah sel glukagon seperti yang dilaporkan pada kambing dan domba (Adnyane *et al.*, 2001), tikus (Ku dan Lee, 2005), dan manusia (Grimelius, 1968). Keberadaan sel-sel endokrin pankreas di luar pulau Langerhans ini diduga berkaitan erat dengan pengaturan fungsi-fungsi intrinsik pankreas. Sel-sel yang berada di sekitar pulau Langerhans kemungkinan mengatur fungsi bagian endokrin dan pengeluaran sekreta hormon melalui pembuluh darah. Sel-sel endokrin yang berada di asinar diduga terlibat dalam pengaturan fungsi eksokrin pankreas yang mencakup sintesis maupun pengeluaran enzim-enzim serta ion melalui duktus, sedangkan yang berada di antara sel-sel epitel duktus dan di sekitar duktus (Gambar 2F), diduga mengatur pengeluaran hormon dan sekreta serta menerima rangsangan dari sekreta eksokrin. Lucini *et al.* (1998) mengemukakan bahwa sel-sel endokrin pada dinding duktus hanya berperan dalam pengeluaran hormon-hormon pankreas dan sekreta pankreas yang lain (enzim atau ion bikarbonat) atau menerima rangsangan dari sekreta eksokrin pankreas dan menanggapiannya melalui mekanisme endokrin. Berdasarkan hasil penelitian yang didapat tidak ditemukan adanya perbedaan morfologi maupun distribusi dan frekuensi relatif dari sel-sel endokrin pankreas kodok lembu di antara jenis kelamin jantan dan betina.

SIMPULAN

Secara umum morfologi pankreas kodok lembu terdiri dari bagian asinar, bagian endokrin, dan duktus kelenjar. Sel endokrin pankreas kodok lembu mempunyai bentuk polimorfik, bulat, oval segitiga atau seperti tetes air. Sel glukagon berdistribusi di bagian tepi, sel insulin di bagian tengah dan sel somatostatin tersebar pada pulau Langerhans. Jumlah sel glukagon lebih banyak dibandingkan dengan jumlah sel insulin dan somatostatin. Tidak ada perbedaan morfologi dan distribusi sel endokrin pankreas pada kodok jantan maupun betina.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ketua Laboratorium Histologi, Fakultas Perubatan Veteriner, Universiti Putra Malaysia yang telah mengijinkan penggunaan mikroskop yang dilengkapi *image analyzer* dalam pengamatan dan pengambilan gambar yang disajikan pada tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnyane IKM, Novelina S, Sari DK, Wresdiyati T, Agungpriyono S. 2001. Perbandingan antara mikroanatomi bagian endokrin pankreas kambing dan domba lokal dengan tinjauan khusus pada distribusi dan frekuensi sel-sel glukagon pankreas. *Media Veteriner* 8(1): 5-9.
- Agungpriyono S, Macdonald AA, Leus KY, Kitamura N, Adnyane IKM, Goodall GP, Hondo E, Yamada J. 2000. Immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the babirusa, *Babirusa babirusa* (Suidae). *Anat Histol Embryol* 29: 173-178.
- Agungpriyono S, Yamada J, Kitamura N, Yamamoto Y, Said N, Sigit K, Yamashita T. 1994. Immunohistochemical study of the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*). *Acta Anat (Basel)* 151: 232-238.
- Babbitt KJ. 2005. The relative importance of wetland size and hydroperiod for amphibians in southern New Hampshire, USA. *Wetlands Ekology and Management* 13: 269-279.
- Cunningham JG, Klein BG. 2007. *Textbook of Veterinary Physiology*. 4th ed, St. Louis, Missouri. Saunders Elsevier. Pp 424-431.
- Dellmann HD, Carithers JR. 1996. *Cytology and Microscopic Anatomy*. Philadelphia. William and Wilkins. Pp 233-235.
- El-Salhy M, Abu-Sinna G, Wilander E. 1983. The endocrine pancreas of a squamate reptile, the desert lizard (*Chalcides ocellatus*). A histological and immunocytochemical investigation. *Histochemistry* 78: 391-397.
- Grimelius. 1968. A silver nitrate stain for alpha-2 cells in human pancreatic islet. *Acta Soc Med Upsal* 73: 234-270.
- Hsu S, Raine L, H F. 1981. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 92: 577-580.
- Huang YH, Sun MJ, Jiang M, Fu BY. 2009. Immunohistochemical localization of glucagon and pancreatic polypeptide on rat endocrine pancreas: coexistence in rat islet cells. *Eur J Histochem* 53: 81-85.
- IUCN. 2006. Conservation International and Nature Serve. *Global Amphibian Assessment* <www.globalamphibians.org> accessed on 14 April 2009
- Kiernan JA. 1993. *Histological and Histochemical Method: Theory and Practice*. 3rd ed, London. Pergamon Press. Pp 90-102.
- Ku SK, Lee HS. 2005. Distribution and frequency of endocrine cells in the pancreas of the ddY mouse: an immunohistochemical study. *Eur J Histochem* 49: 125-130.
- Lee JH, Ku SK, Lee HS, Kitagawa H. 2003. An immunohistochemical study of endocrine cells in the pancreas of the Red-bellied frog (*Bombina orientalis*). *Eur J Histochem* 47: 165-172.
- Lucini C, Castaldo L, Lai O. 1998. Ontogeny, Postnatal Development and Ageing of Endocrine Pancreas in *Bubalus bubalis*. *J Anat* 192: 417-424.
- Nisa C, Kitamura N, Sasaki M, Agungpriyono S, Choliq C, Budipitojo T, Yamada J, Sigit K. 2005. Immunohistochemical study on the distribution and relative frequency of endocrine cells in the stomach of the Malayan Pangolin, *Manis javanica*. *Anat Histol Embryol* 34: 373-378.
- Norris DO. 2007. *Vertebrate Endocrinology*. 4th ed, New York. Elsevier Inc. Pp 450-461.
- Rahayu EY, Adnyane IKM, Agungpriyono S, Novelina S. 2005. Studi histologi sel-sel ekstra insular pankreas kambing dan domba lokal. *J. Veteriner UNUD* 6(1): 25-30.
- Spear PA, Boily M, Giroux I, DeBlois C, Leclair MH, Levasseur M, Leclair R. 2009. Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Quebec, Canada. *J Aquatic Toxicology* 91: 110-117.