

Sel Penghasil Lisozim Terdeteksi pada Kelenjar Ludah Sapi dengan Teknik Imunohistokimia

(LYSOZYME PRODUCING CELLS ARE DETECTED IN THE BOVINE SALIVARY GLANDS BY IMMUNOHISTOCHEMICAL TECHNIQUE)

I KETUT MUDITE ADNYANE¹, SAVITRI NOVELINA¹, TUTIK WRESDIYATI¹, ADI WINARTO¹,
SRIHADI AGUNGPRIYONO¹

¹Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Wing 8, Lt. 2, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680.
Telp. 0251-626064,
E-mail: iik_guris@yahoo.com

ABSTRAK

Lisozim bersifat bakteriolitik dengan cara merusak ikatan glikosida pada dinding bakteri sehingga pelacakan sel penghasil lisozim pada kelenjar ludah sapi perlu dilakukan. Dalam penelitian ini, sel penghasil lisozim diperiksa menggunakan teknik pewarnaan histologi dan imunohistokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelenjar parotis sapi bersifat serous murni. Kelenjar submandibularis bagian asinarnya terdiri atas sel-sel serous dan sel-sel mukous. Sel-sel asinar mukous terlihat lebih dominan jika dibandingkan dengan sel-sel asinar serous. Sel-sel asinar kelenjar parotis sapi bereaksi positif dengan intensitas sedang (++) terhadap pewarnaan imunohistokimia. Sel-sel epitel duktus kelenjar bereaksi sedang (++) sampai dengan kuat (+++). Pola sebaran lisozim yang terdeteksi pada penelitian ini menunjukkan kemiripan dengan hewan mamalia pada umumnya. Sel-sel asinar serous pada kelenjar submandibularis memberikan reaksi positif dengan intensitas rendah (+) sampai dengan sedang (++) dan sel-sel epitel duktus kelenjar dengan intensitas kuat (+++). Lisozim ditemukan pada bagian sel-sel asinar serous dan sel-sel epitel duktus kelenjar parotis dan submandibularis.

Kata kunci: imunohistokimia, lisozim, kelenjar ludah.

J Vet 2007 8 (1) : 10-15

ABSTRACT

Lysozyme is capable of inducing direct bacteriolytic action by hydrolyzing the glycoside bonds found in bacterial cell wall. A study is therefore conducted to detect the lysozyme-producing cells in the bovine salivary glands. In this study, tissue preparation was examined using histological and immunohistochemical staining. The results showed that bovine parotid glands were purely serous acinar cells. The submandibular gland, however, contained both mucous and serous acinar cells, but the mucous acinar cells were found to be more dominant than the serous acinar cells. Immunohistochemical staining on parotid gland using antibody against lysozyme gave a moderate positive reaction (++) to the acinar cells and a strong positive reaction (+++) to the epithelial cells of the ducts. The distribution pattern of lysozyme producing cells was similar to those of other mammalian species. In the submandibular gland, a weak (+) to medium (++) positive reaction was detected in the acinar serous cells, but a strong positive reaction (+++) was detected in the epithelial cells of the ducts. Lysozyme was found in the serous acinar cells and epithelial cells of the ducts in both parotid and submandibular glands.

Key Word: Immunohistochemical, Lysozyme, Salivary glands

J Vet 2007 8 (1) : 10-15

PENDAHULUAN

Kelenjar submandibularis dan parotis merupakan kelenjar ludah utama pada hewan mamalia. Kedua kelenjar ini menghasilkan sekreta yang disebut air liur. Air liur mengandung air, elektrolit, protein dan karbohidrat. Air liur berfungsi untuk membasahi dan melunakkan makanan yang kering, memecah dan mengencerkan bahan makanan secara kimiawi, mempertahankan pH dalam rongga mulut dengan adanya ion bikarbonat, memecah rantai 1-4 glikosida karbohidrat dengan enzim amilase (Guyton, 1992; Ross *et al.*, 1995).

Salah satu unsur penting dalam air liur adalah senyawa glikoprotein. Adanya senyawa glikoprotein antibakteri seperti lisozim dan laktoferin (Inoue, 1995; Wolff *et al.*, 2002) menjadikan air liur sebagai pencegah masuknya bakteri ke dalam saluran cerna. Lisozim pertama kali ditemukan oleh Alexander Fleming pada tahun 1922, lima tahun sebelum penemuan antibiotik penisilin. Lisozim adalah senyawa glikoprotein dengan berat molekul sekitar 14 kDa, dan mempunyai afinitas yang sangat kuat dan spesifik terhadap ikatan glikosida pada dinding bakteri. Karena alasan inilah lisozim dikenal sebagai bakterisida (Klockars dan Reitamo, 1975; Witholt *et al.*, 1976). Dewasa ini penelitian di bidang kedokteran khususnya kedokteran manusia terhadap rongga mulut banyak dilakukan terutama yang berkaitan dengan obat-obat yang berhubungan dengan penyakit dalam rongga mulut (Hannig *et al.*, 2005).

Dengan demikian, informasi ilmiah sel-sel penghasil lisozim pada kelenjar ludah sapi sangat diperlukan agar dapat dijadikan landasan ilmiah dalam usaha pemurnian dan produksi bahan bioaktif lisozim sebagai antibakteri yang dapat

digunakan dalam penelitian dan terapi biomedis, baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (kultur jaringan). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi secara imunohistokimia keberadaan sel-sel penghasil lisozim pada kelenjar ludah sapi.

METODE PENELITIAN

Hewan Coba dan Penyiapan Sampel Jaringan

Pada penelitian ini digunakan organ kelenjar ludah dari 10 ekor sapi. Sampel organ diambil langsung setelah hewan dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH). Organ dicuci dengan 0,9% NaCl fisiologis, kemudian dimasukkan ke dalam larutan fiksatif Bouin (dengan komposisi asam pikrat jenuh : formalin p.a : 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 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 dengan ketebalan 5 μ m, dilekatkan pada gelas objek kemudian disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam.

Pewarnaan Jaringan

Dalam penelitian ini, jaringan diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) dan pewarnaan imunohistokimia. Pewarnaan HE digunakan untuk melihat struktur umum dari jaringan kelenjar ludah sapi. Sebaran dan

kandungan lisozim pada kelenjar ludah dideteksi menggunakan pewarnaan imunohistokimia. Pewarnaan imunohistokimia terhadap lisozim dilakukan dengan menggunakan metode *Avidin-Biotin Complex (ABC)* (Hsu *et al.*, 1981). Teknik ini memanfaatkan prinsip ikatan antara antigen dan antibodi. Proses pewarnaan diawali dengan *deparafinisasi* jaringan dengan silol dan *rehidrasi* dengan alkohol dan PBS. Jaringan kemudian diinkubasikan dalam larutan H_2O_2 3% selama 15 menit untuk menghilangkan aktifitas peroksidase endogen. Jaringan diinkubasikan dalam serum normal selama 30-60 menit untuk menutupi bagian antigen yang tidak spesifik. Setelah itu, jaringan diinkubasi dalam antibodi antilisosim pada suhu 4°C selama 1 malam, kemudian diinkubasikan selama 60 menit dalam antibodi sekunder (antimouse IgG, Dako Envision™). Reaksi antigen dengan antibodi divisualisasikan dengan menggunakan *diamino benzidine (DAB)* selama 20 menit. Setelah dilakukan *dehidrasi* dan *clearing*, jaringan kemudian dimounting dengan entelan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Struktur Umum

Struktur umum dari kelenjar ludah diamati secara mikroskopis dengan mikroskop cahaya pada jaringan yang diwarnai dengan HE. Dari hasil pengamatan berhasil diperoleh gambaran struktur histologi kelenjar parotis dan kelenjar submandibularis sapi. Kelenjar ludah secara umum terdiri atas ujung-ujung kelenjar (sel-sel asinar) dan alat penyalur air liur (duktus). Jumlah sel-sel asinar pada kelenjar ludah mencapai sekitar 91% dari jumlah keseluruhan sel yang ada, sedangkan sisanya (9%) terdiri atas sel duktus, pembuluh darah, saraf

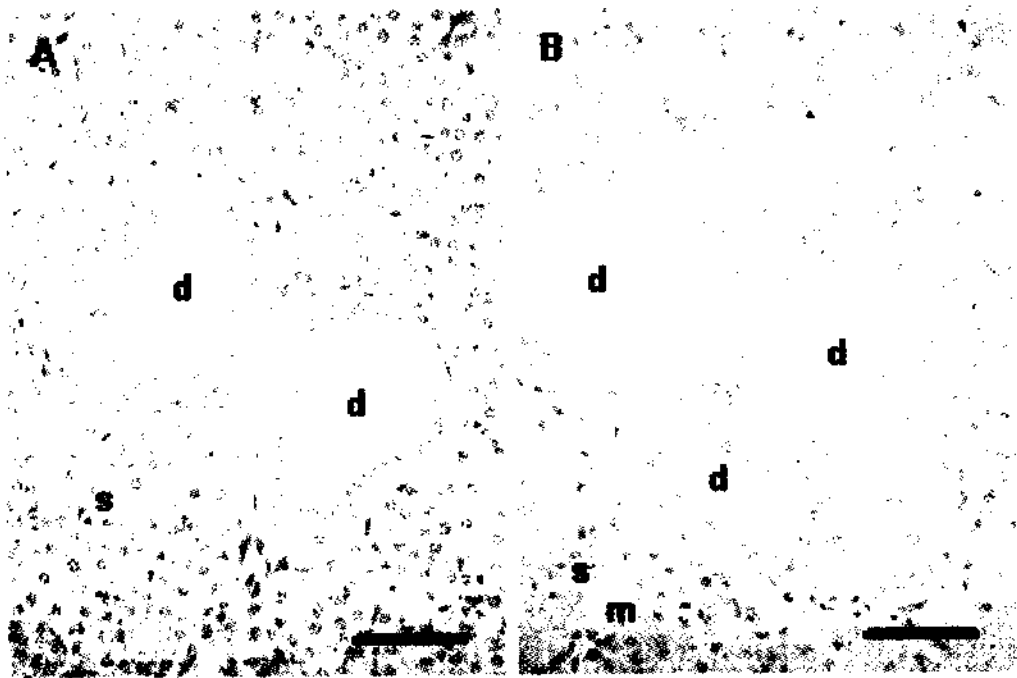
dan jaringan ikat (Dellmann dan Brown, 1993; Ross *et al.*, 1995). Sel-sel asinar pada ujung-ujung kelenjar berfungsi sebagai penghasil sekreta utama, yaitu air liur, sedangkan duktus berfungsi menyalurkan sekreta yang dihasilkan oleh sel-sel asinar menuju rongga mulut. Pada pemeriksaan histologis tampak bahwa kelenjar parotis dan kelenjar submandibularis memiliki lobulasi yang jelas dan setiap lobus terdiri atas beberapa lobulus.

Kelenjar parotis

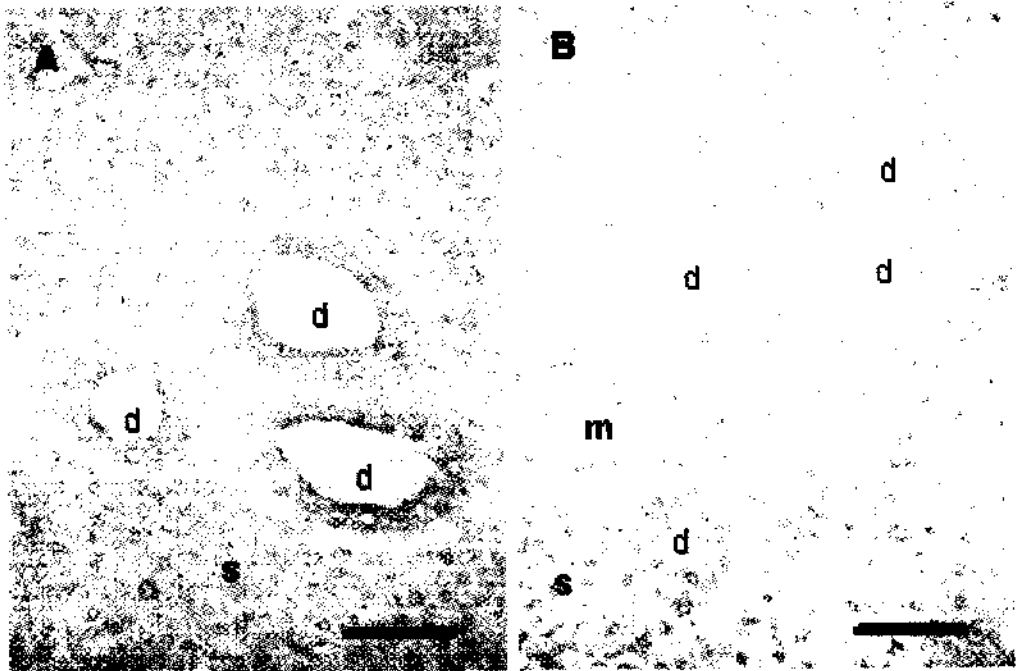
Pemeriksaan dengan mikroskop cahaya menunjukkan bahwa sel-sel asinar kelenjar parotis umumnya bersifat serous, berbentuk piramid dengan inti bulat yang terletak di tengah dan sitoplasmanya bersifat asidofilik (Gambar 1A). Dengan pewarnaan HE, tampak bahwa inti selnya berwarna ungu sedangkan bagian sitoplasma berwarna merah muda. Di dalam sitoplasma sel-sel serous terdapat butiran yang bersifat asidofilik. Butiran ini mempunyai ukuran yang bervariasi pada setiap hewan. Sel-sel asinar kelenjar parotis hewan sapi bersifat serous murni. Hal yang sama juga dilaporkan pada baboon (Tandler dan Erlandson, 1976), mencit (Parks, 1961) dan domba (Lennep *et al.*, 1977).

Kelenjar submandibularis

Kelenjar submandibularis dari hewan yang diteliti bersifat campuran, bagian asinarnya terdiri atas sel-sel serous dan sel-sel mukous (Gambar 1B). Sel-sel asinar serous terletak di antara sel-sel asinar mukous. Sel-sel asinar serous pada kelenjar submandibularis sama dengan sel-sel asinar serous pada kelenjar parotis. Sel-sel asinar serous pada kelenjar submandibularis tersusun di tepi sel-sel mukous sehingga nampak seperti bulan sabit (*demiluna*), dulu disebut sebagai *demiluna serous*. Dengan pesatnya perkembangan penelitian, fenomena ini telah dibantah dan telah ditemukan bahwa bentuk *demiluna serous* adalah penampakan artifak akibat dari preparasi jaringan menggunakan metode



Gambar 1. Fotomikrograf memperlihatkan struktur umum dari kelenjar parotis (A) dan kelenjar submandibularis (B). Kelenjar terdiri dari sel-sel asinar serous (s); sel-sel asinar mukous (m) dan duktus kelenjar (d). Pewarnaan HE; Skala A, B = 50 mm.



Gambar 2. Fotomikrograf pola sebaran Lisozim dari kelenjar parotis (A) dan kelenjar submandibularis (B). Kelenjar terdiri dari sel-sel asinar serous (s); sel-sel asinar mukous (m) dan duktus kelenjar (d). Reaksi positif ditemukan dominan pada bagian duktus kelenjar. Pewarnaan Imunohistokimia; Skala A, B = 50 mm.

Tabel 1. Sebaran lisozim pada kelenjar parotis dan submandibularis sapi

Kelenjar	Bagian	Lisozim
Kelenjar Parotis	- Sel serous	++
	- Sel duktus	++ ~ +++
Kelenjar Submandibularis	- Sel serous	+ ~ ++
	- Sel mukous	-
	- Sel duktus	+++

Keterangan: Intensitas reaksi: negatif (-), lemah (+), sedang (++) , kuat (+++)

konvensional. Gambaran tiga dimensi dari kelenjar submandibularis yang disayat dalam keadaan segar jelas menunjukkan bahwa sel-sel asinar serous tidak berhubungan dengan sel-sel asinar mukous, melainkan masing-masing berdiri sendiri (Mashina *et al.*, 1999).

Sel-sel asinar mukous berbentuk piramid, dengan inti berbentuk oval yang terletak di basal dan sitoplasmanya bersifat basofilik. Sitoplasma mengandung bahan-bahan yang tampak jelas seperti globul-globul. Sel-sel asinar mukous berfungsi dalam menghasilkan lendir yang mengandung mukopolisakarida, sedangkan sel-sel serousnya menghasilkan sekreta yang beraspek cair (Ross *et al.*, 1995). Sel-sel asinar mukous pada kelenjar submandibularis terlihat lebih dominan dibandingkan dengan sel-sel asinar serous, hal yang sama dilaporkan pada hewan mammalia pada umumnya (Delmann dan Brown, 1993; Ross *et al.*, 1995).

Alat penyalur atau duktus kelenjar

Duktus pada kelenjar parotis dan kelenjar submandibularis secara umum meliputi duktus interkalatus, duktus striatus dan duktus ekskretorius. Ketiga alat penyalur tersebut dibedakan berdasarkan ukuran dan jenis sel-sel epitel penyusun dindingnya. Pada pewarnaan HE terlihat bahwa inti sel mengambil warna ungu/biru sedangkan warna sitoplasmanya bervariasi tergantung dari jenis duktusnya. Duktus interkalatus mempunyai epitel kubus sebaris dengan sitoplasma bersifat basofilik, merupakan penyalur yang sangat pendek dan

menghubungkan antara ujung kelenjar dengan duktus striatus. Duktus striatus mempunyai epitel silindris dengan sitoplasma bersifat asidofilik sehingga terlihat berwarna merah pada pewarnaan HE. Duktus ekskretorius mempunyai epitel silindris banyak baris sampai pipih banyak lapis, merupakan duktus besar yang menyalurkan sekreta (air ludah) dari kelenjar menuju rongga mulut. Sel goblet (sel mangkok) ditemukan di antara sel epitel dari duktus ekskretorius. Sel goblet ini terlihat mempunyai inti terletak di basal dengan sitoplasma bersifat basofilik. Sel goblet merupakan sel epitel kelenjar yang bersifat uniseluler. Sekreta yang dihasilkan oleh sel goblet berupa lendir yang secara langsung dikeluarkan melalui permukaan sel menuju lumen duktus.

Berdasarkan hasil pengamatan struktur umum dari kelenjar parotis dan kelenjar submandibularis dapat disimpulkan bahwa kelenjar parotis sapi bersifat serous murni, sedangkan kelenjar submandibularis bersifat campuran.

2. Pola Sebaran Lisozim

Untuk mengetahui sebaran dari protein antibakteri lisozim pada kelenjar parotis dan kelenjar submandibularis, digunakan pewarnaan imunohistokimia. Pada penelitian ini digunakan antibodi monoklonal terhadap *human lisozim*. Kelenjar parotis dan submandibularis sapi memberikan reaksi yang bervariasi terhadap pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan (Tabel 1.)

Dari Tabel 1 terlihat bahwa sel-sel asinar kelenjar parotis sapi memberikan reaksi positif dengan intensitas sedang

(++) terhadap pewarnaan imunohistokimia. Sel-sel epitel duktus kelenjar memberikan reaksi sedang (++) sampai dengan kuat (+++) (Gambar 2A) Hal ini menunjukkan bahwa sel-sel asinar kelenjar parotis hewan yang diteliti diduga menghasilkan enzim antibakteri lisozim dalam konsentrasi sedang sampai dengan tinggi. Secara umum imunoreaksi lisozim lebih dominan pada sel-sel epitel duktus. Hal yang sama dilaporkan pada kelenjar parotis manusia (Klockars dan Reitamo, 1975). Pola sebaran lisozim yang terdeteksi pada penelitian ini menunjukkan kemiripan dengan hewan mamalia pada umumnya.

Sel-sel asinar serous pada kelenjar submandibularis memberikan reaksi positif dengan intensitas rendah (+) sampai dengan sedang (++) , sedangkan sel-sel asinar mukous negatif (-). Sel-sel epitel duktus kelenjar memberikan reaksi positif dengan intensitas kuat (+++) (Gambar 2B). Hal ini menunjukkan bahwa lisozim ditemukan pada sel-sel asinar serous dan duktus kelenjar dari kelenjar submandibularis.

SIMPULAN

Kelenjar parotis sapi bertipe serous murni sedangkan kelenjar submandibularis bertipe seromukous. Lisozim pada kelenjar parotis terdeteksi pada bagian sel-sel asinar serous dan sel-sel epitel duktus kelenjar. Pada kelenjar submandibularis lisozim terdeteksi pada bagian sel-sel asinar serous dan epitel duktus kelenjar dan tidak ditemukan pada bagian sel-sel asinar mukous.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ditjen Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui proyek Penelitian Dasar, Nomor. 026/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005.

DAFTAR PUSTAKA

- Dellmann, H. D. and E. M. Brown. 1993. *Textbook of Veterinary Histology*. 4th edition. Lea and Febiger. Philadelphia. Pp 153-165.
- Guyton, A. C. 1992. *Buku Teks Fisiologi Kedokteran*. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta. Hal 86-105.
- Hannig C., J. Hoch, K. Becker, M. Hannig and T. Attin. 2005. *Oral biology*. 50:821-828.
- Hsu, S.M., L. Raine and H. Fanger. 1981. The use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : A Comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 29:577-580
- Inoue, M., J. Yamada, N. Kitamura, K. Shimazaki, A. Andren and T. Yamashita. 1995. Immunohisto-chemical localization of lactoferrin in bovine exocrine glands. *Tissue and Cell*. 25:791-797
- Klockars, M. and S. Reitamo. 1975. Tissue distribution of lysozyme in man. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 12: 932-940
- Lenep, E. W., A. R. Kennerson and J. S. Compton. 1977. The ultrastructure of the sheep parotid gland. *Cell and Tissue Res*. 179:377-392
- Mashina, S. Y., H. Tamaki and O. Katsumata. 1999. The serous demilune of rat sublingual gland is an artificial structure produced by conventional fixation. *Arch. Histol. Cytol*. 4:347-354
- Parks, H. F. 1961. On the fine structure of the parotid gland of mouse and rat. *Am. J. Anat*. 108:303-329
- Ross, M. H., L. J. Romrell and G. I. Kaye. 1995. *Histology: A text and atlas*. Williams and Wilkins. A Waverly Company. USA. 25-30
- Tandler, B and R. A. Erlandson, 1976. Ultrastructure of baboon parotid glands. *Anat. Rec*. 184:115-132.
- Witholt, B., H.V. Heerikhuizen, and L De Leij. 1976. How does lysozyme penetrate through the bacterial outer membrane?. *Biochem Biophys Act*. (443) 3:534-544
- Wolff A., D. Harell, N. Gadoth, and E. Mass. 2002. Oral surgery. Oral medicine. *Oral pathology and Endodontics*. 94:315-319