

LOKALISASI PROTEIN S-100 PADA TESTIS FETUS SAPI

Heru Setijanto

Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Dengan menggunakan teknik imunohistokimia, lokalisasi protein S-100 pada testis fetus sapi dapat diperlihatkan. Imunoreaksi spesifik ditunjukkan oleh *sel-sel Sertoli*, *rete testis*, sel-sel endotel pembuluh darah dan limfe. Sel-sel endotel berperan dalam transportasi substansi bioaktif dari darah ke ruang perivaskuler. Interpretasi serupa kemungkinan berlaku juga pada sel-sel endotel dari testis fetus sapi. Dengan demikian cukup beralasan untuk menyatakan bahwa protein S-100 terlihat dalam proses "transcytosis" antar sel di daerah sepanjang *rete testis*.

PENDAHULUAN

Protein S-100 pertama kali diisolasi sebagai protein spesifik terhadap sistem syaraf. Protein ini disebut protein S-100, karena hanya larut dalam amoniumsulfat jenuh pada pH netral (Moore, 1965; Moore, 1972). Pada pH rendah (4,0-4,2) akan diendapkan oleh amoniumsulfat atau larutan garam lainnya. Selanjutnya Moore (1982) dapat menunjukkan bahwa kandungan asam glutamat, asam aspartat dan asam fenilalanin tinggi, sedangkan kandungan triptofan, tirosin dan prolin rendah. Selain itu protein S-100 merupakan protein pengikat kalsium dan mempunyai berat molekul yang rendah, sekitar 20.000-22.000.

Protein S-100 dapat dibuktikan keberadaannya baik pada sistem syaraf pusat maupun pada sistem syaraf perifer. Hyden and McEwen (1966) untuk pertama kalinya melokalisir protein S-100 pada sel-sel glia dan sel-sel syaraf. Secara umum kandungan protein S-100 pada *substansia alba* lebih tinggi dibandingkan pada *substansia grisea*. Kandungan yang cukup tinggi dijumpai pula pada *cerebellum* (Moore, 1972).

Berdasarkan hasil beberapa penelitian, kandungan protein S-100 dapat digunakan sebagai petunjuk terhadap keadaan pertumbuhan otak mammalia dan sebagai "marker" untuk diferensiasi sel-sel glia (Bock, 1978; Zomzely-Neurath and Walker, 1980). Menurut Donato *et al.* (1975), protein S-100 dapat pula dilokalisir di daerah sinaps. Peneliti ini mendemonstrasikan ikatan protein S-100 terhadap reseptor membran sinaps dan menunjukkan bahwa ikatan tersebut spesifik, mudah berubah dan tergantung pada kalsium. Miani *et al.* (1972) menduga bahwa protein S-100 ditransportasikan melalui *axon*.

Beberapa penelitian lanjutan menunjukkan, bahwa protein S-100 dapat dilokalisir pada beberapa tipe sel di luar sistem syaraf. Dengan menggunakan teknik imunokimia dan imunohistokimia, protein S-100 dapat dilokalisir pada khondrosit, adiposit, makrofag, sel-sel dendrit, folikel dan oosit (Vanstapel *et al.*, 1986; Kamiya *et al.*, 1989b).

Lokalisasi protein S-100 pada alat kelamin belum banyak diteliti. Kamiya *et al.* (1989a) menelitinya pada saluran telur (*oviduct*) sapi. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa sel-sel epitel dari *infundibulum*, *ampulla* dan *isthmus* imunoreaktif terhadap protein S-100. Selanjutnya Kamiya *et al.* (1989b) menyatakan, bahwa protein S-100 memberikan reaksi positif terhadap sel-sel endotel pembuluh arteri, pembuluh kapiler dan pembuluh limfe dari ovarium sapi. Demikian pula terhadap oosit dan sel-sel epitel *rete ovarii*.

Michetti *et al.* (1985) dapat membuktikan bahwa protein S-100 dapat dilokalisir pada sel-sel Leydig dari testis tikus dan manusia. Berlawanan dengan hasil tersebut, Girod *et al.* (1986) menunjukkan pada kera, *Macaca irus*, protein S-100 imunoreaktif terhadap sel-sel Sertoli, sedangkan pada tikus putih Wistar, imunoreaktif pada sel-sel Leydig. Amselgruber *et al.* (1992) dalam penelitiannya pada testis sapi dewasa membuktikan adanya imunoreaktif protein S-100 terhadap sel-sel Sertoli, *rete testis* dan sel-sel endotel.

Pada penelitian ini ditunjukkan lokalisasi protein S-100 pada testis fetus sapi dengan menggunakan teknik imunohistokimia.

MATERIAL DAN METODA

Pada penelitian ini digunakan 10 testis fetus sapi dengan perbedaan panjang badan (*crown-rump-length* = CRL), yaitu 7 cm, 9.2 cm, 15 cm, 17 cm, 20 cm, 28 cm, 35 cm, 40 cm, 51 cm, dan 80 cm yang diperoleh dari rumah potong hewan kota München, Jerman. Konversi panjang badan terhadap umur fetus dihitung menurut Winters *et al.* (1942), Evans dan Sack (1975).

Fetus sapi tersebut segera setelah pemotongan hewan bunting diambil, kemudian testisnya dipreparir dan difiksasi dalam larutan Bouin untuk kemudian diproses sesuai dengan teknik preparasi menjadi preparat histologis. Prosedur imunohistokimia yang dilakukan adalah dengan menggunakan metode Avidin-Biotin Kompleks (ABC method).

Setelah deparafinisasi dalam xylol dan rehidrasi dalam deretan alkohol, preparat testis dicuci sebanyak tiga kali dengan larutan bufer (*phosphate bufer saline*, 0.01 M, pH 7.4). Untuk menghambat peroksidase endogen, preparat tersebut diinkubasikan dalam campuran

larutan metanol absolut dan 3% H_2O_2 selama 20 menit, selanjutnya dibilas tiga kali dengan larutan bufer. Kemudian untuk menghindari kemungkinan reaksi antibodi non spesifik, preparat tersebut diinkubasi dengan serum babi normal yang diencerkan dengan larutan bufer (1:5), selama 30 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan inkubasi dengan antibodi S-100 (Dako, Hamburg) yang diencerkan dengan larutan bufer (1:400) dalam kotak lembab selama 30 menit pada temperatur kamar, kemudian dibilas sebanyak tiga kali dengan larutan bufer. Langkah berikutnya, preparat tersebut diinkubasi dengan antibodi sekunder (*biotinylated pig anti rabbit IgG*, Dako, Hamburg) konsentrasi 1:300 yang diencerkan kembali dengan serum sapi (1:8), dalam kotak lembab selama 30 menit pada temperatur kamar, kemudian dibilas sebanyak tiga kali dengan larutan bufer. Preparat tersebut selanjutnya diinkubasi dengan Avidin-Horseradish-peroxidase (*Strep-ABC-Kit*, Dako, Hamburg) dalam kotak lembab selama 30 menit pada temperatur kamar, kemudian dibilas sebanyak tiga kali dengan larutan bufer. Dilanjutkan dengan inkubasi dengan campuran larutan 0.05% DAB (*diaminobenzidine*, Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). Dan 0.01% H_2O_2 dalam larutan bufer selama 30 menit pada temperatur kamar. Setelah tiga kali pembilasan dengan larutan bufer dan beberapa preparat diwarnai dengan Hematoxylin-Eosin, preparat tersebut didehidrasi melalui deretan alkohol dan xylol, kemudian ditutup dengan Eukitt (Riedel de Hæn, AG., Seelze).

Sebagai kontrol, preparat tersebut hanya diinkubasikan dengan antibodi sekunder selama 30 menit pada temperatur kamar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian imunohistokimia protein S-100 pada testis fetus sapi secara kualitatif dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 1. Intensitas reaksi protein S-100 pada jaringan testis fetus sapi

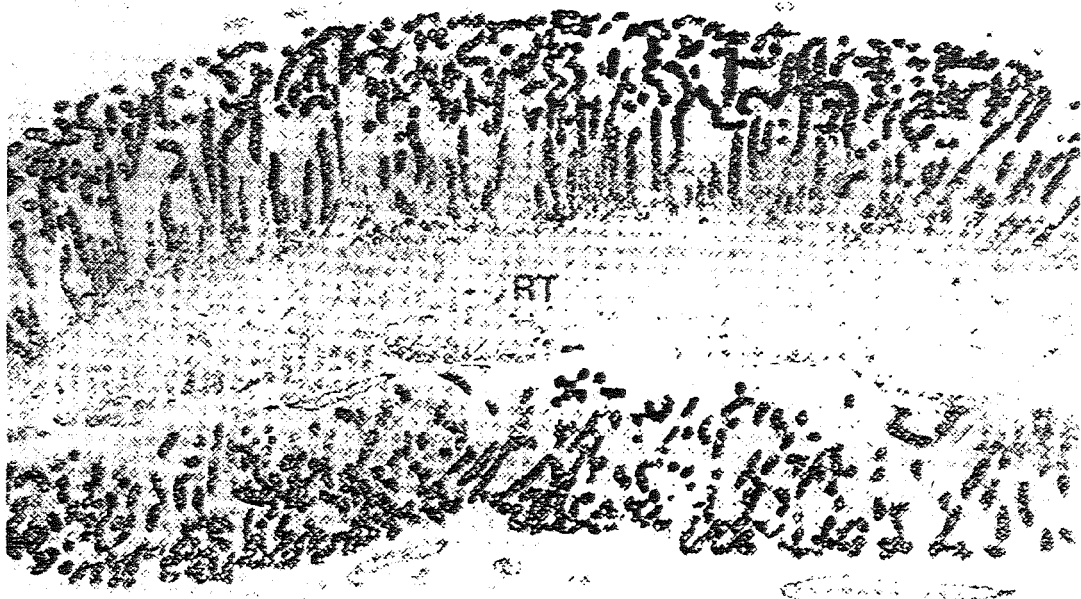
CRL (cm)	Umur p.c.	Sel Sertoli	Spermatogonia	Sel Leydig	Sel endotel	Rete testis
7	62	++	-	-	-	-
9.2	69	++	-	-	-	-
15	87	+++	-	-	±	±
17	93	+++	-	-	±	±
20	108	+++	-	-	+	+
28	123	+++	-	-	+	++
35	146	+++	-	-	++	++
40	159	+++	-	-	++	+++
51	174	+++	-	-	++	+++
80	245	+++	-	-	++	+++

Keterangan : CRL (crown-rump-length) : panjang badan dari kepala sampai pangkal ekor ; p.c : post coitus
Intensitas reaksi : - = negatif ; ± = sangat lemah ; + = lemah ; ++ = kuat ; +++ = sangat kuat

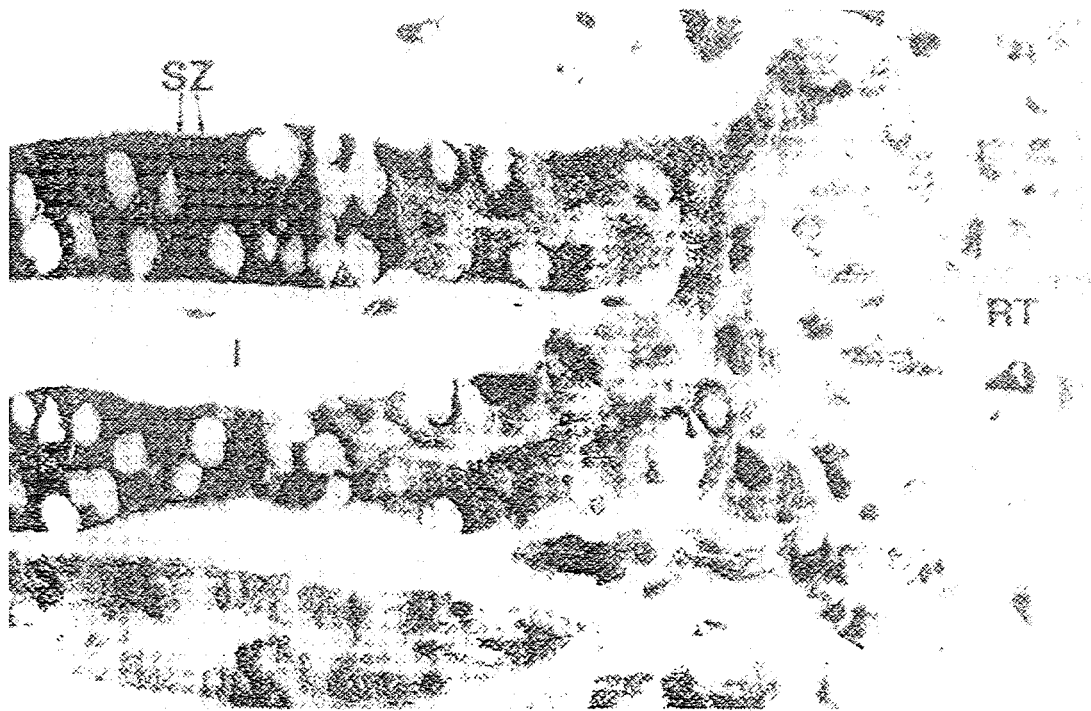
Selama perkembangan prenatal, *spermatogonia* dan sel-sel Leydig pada semua tahap perkembangan tidak menunjukkan adanya imunoreaktif terhadap protein S-100. Imunoreaksi spesifik dapat diamati pada sel-sel Sertoli (gambar 1, 2, 3, dan 4). Reaksi positif kuat sampai sangat kuat ditunjukkan oleh *sitoplasma* dan inti sel Sertoli pada semua tahap perkembangan (gambar 2, 3, dan 4). Pada testis fetus sapi usia 108 p.c. (CRL 20 cm) mulai dapat diamati adanya reaksi positif pada sel-sel endotel dari pembuluh darah dan limfe, demikian juga pada rete testis (gambar 1 dan 2).

Melihat hasil di atas, lokalisasi imunohistokimia protein S-100 pada testis fetus sapi sesuai dengan penemuan pada testis kera (*Macaca irus*) sebagaimana dikemukakan oleh Girod *et al.* (1992). Berbeda dengan laporan Michetti *et al.* (1985), pada testis tikus, imunoreaksi protein S-100 hanya dapat diamati pada *sel-sel Leydig*.

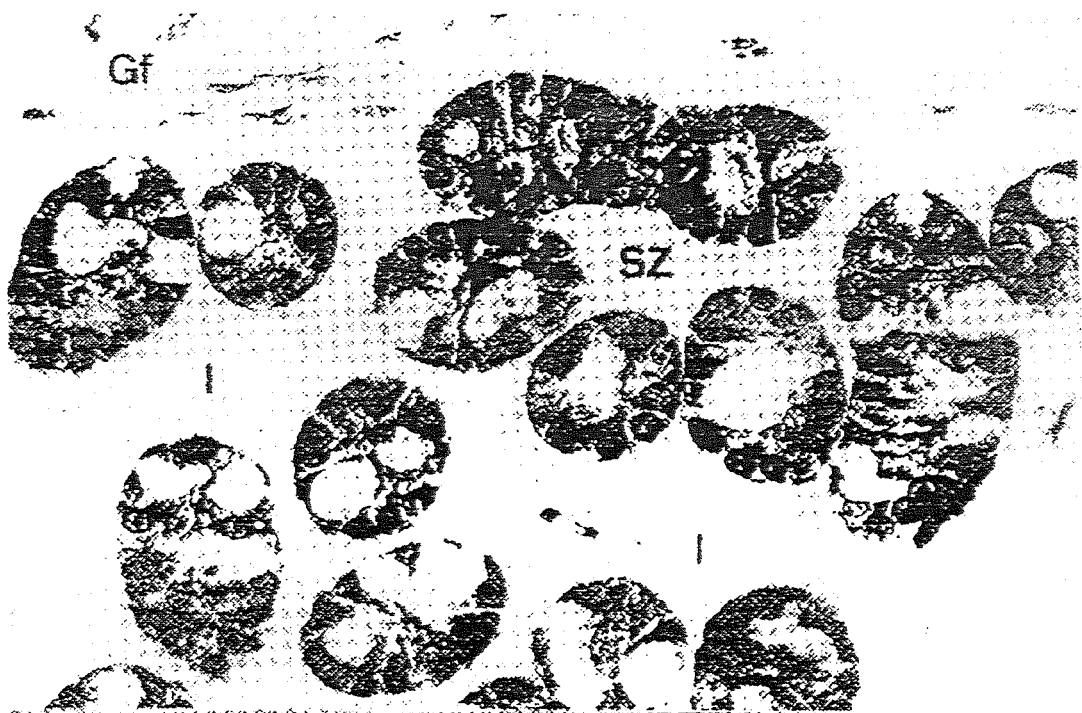
Secara fungsional imunoreaksi protein S-100 pada *sel-sel Sertoli* masih belum diketahui. Penelitian inipun tidak membahas mengenai hal itu. Namun demikian, sangat menarik perhatian bahwa tipe-tipe sel yang mengandung protein S-100 menunjukkan susunan morfologi yang mirip (Michetti *et al.*, 1985), yaitu adanya penjururan sitoplasma sel yang secara kompleks mengelilingi sel-sel di sekitarnya. Hal ini dapat diamati pada *astrosit*, *sel-sel ependim*, *sel-sel Schwann*, *sel-sel intersitial glandula pinealis*, *melanosit*, *sel-sel Langerhans* dan dalam penelitian ini *sel-sel Sertoli*.



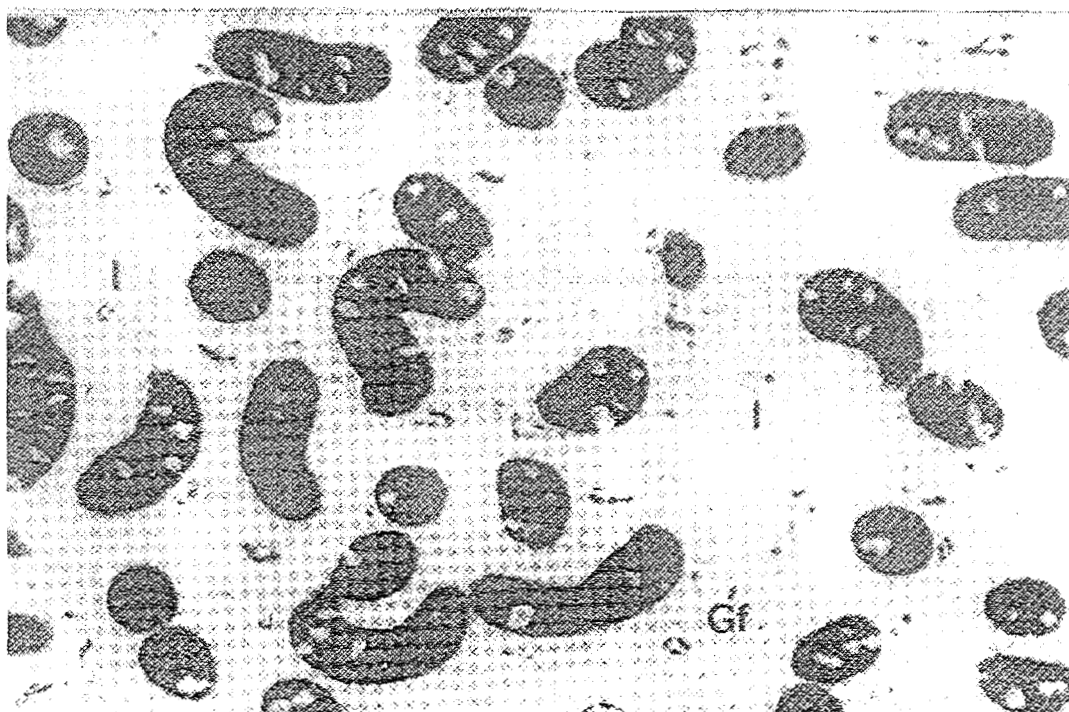
Gambar 1. Imunoreaksi protein S-100 pada testis fetus sapi. Gambaran umum CRL 20 cm, 90x. RT= rete testis.



Gambar 2. Immunoreaksi protein S-100 pada sel-sel Sertoli (SZ) dan rete testis (RT) CRL 20 cm, 580x. I=instersitium



Gambar 3. Immunoreaksi S-100 pada sel-sel Sertoli (SZ), spermatogonia selalu negatif. CRL 20 cm, 640x. I=instersitium; GF=pembuluh darah



Gambar 4. Immunoreaksi protein S-100 pada sel-sel Sertoli. CRL 20 cm, 360x. I=instesitium; GF=pembuluh darah

Dalam penelitian ini selanjutnya dapat dibuktikan bahwa pembuluh darah, pembuluh limfe dan rete testis memberikan hasil yang positif. Sementara itu menurut Michetti *et al.* (1985), protein S-100 dapat dijumpai pada sel-sel endotel pembuluh limfe, tidak pada pembuluh darah, sedangkan Vanstapel *et al.* (1986) dengan menggunakan antibodi monoklonal dapat mendemonstrasikan imunoreaksi protein S-100 pada sel-sel endotel pembuluh darah. Penelitian Vanstapel *et al.* ini diperinci oleh Iwanaga *et al.* (1987) yang melaporkan bahwa imunoreaksi protein S-100 selektif terhadap sel-sel endotel pembuluh arteri, sedangkan terhadap pembuluh vena tidak dapat diamati.

Sel-sel endotel mirip dengan sel-sel lemak yang secara intensif bereaksi terhadap protein S-100. Haimoto *et al.* (1985) mengemukakan bahwa protein S-100 dapat berperan sebagai pembawa protein untuk asam lemak bebas. Bertambahnya mikrovesikel dan invaginasi vesikuler selama proses lipolisis tidak hanya dijumpai pada sel-sel lemak saja, tetapi juga dijumpai pada sel-sel endotel dari pembuluh kapiler (Carpentier *et al.* 1977). Salah satu fungsi penting dari sel-sel endotel adalah dalam hal transportasi substansi bioaktif dari darah ke ruang perivaskuler. Proses yang disebut "transcytosis" ini berlaku untuk vesikel yang membawa cairan melewati sel (Simionescu, 1981; Vasile *et al.*, 1983). Interpretasi serupa

kemungkinan berlaku juga pada sel-sel endotel dari testis fetus sapi. Dalam hal ini mungkin cukup beralasan untuk menyatakan bahwa protein S-100 terlihat dalam proses "transcytosis" antar sel di daerah sepanjang *rete testis*.

Sampai saat ini belum diketahui mengapa protein S-100 dijumpai pada berbagai tipe sel yang berbeda, yang dalam proses ontogeni berasal dari lapisan germinal yang berbeda pula. Ada kemungkinan berbagai tipe sel yang mengandung protein S-100 tersebut awal mulanya berasal dari bakat sel yang sama dan bermigrasi menuju lokasi akhir pada berbagai jaringan selama embriogenesis (Kahn *et al.*, 1983).

KESIMPULAN

Lokalisasi protein S-100 pada testis fetus sapi terdapat pada *sel-sel Sertoli*, *rete testis*, sel-sel endotel pembuluh darah dan limfe. Imunoreaksi pada sel-sel tersebut sangat spesifik.

Dengan dilokalisirnya protein S-100 pada tipe-tipe sel yang berbeda diluar jaringan syaraf, maka protein S-100 ini tidak spesifik untuk sistem syaraf. Walaupun demikian fungsi biologis protein S-100 pada tipe-tipe sel yang berbeda sampai sekarang masih belum diketahui. Oleh karena itu diperlukan penelitian intensif untuk menjelaskan fungsi biologis protein S-100, terutama peranannya pada jaringan testis.

DAFTAR PUSTAKA

- Amselgruber, W., F. Sinowatz, D. Schams, and M. Lehmann. (1992). S-100 protein immunoreactivity in Bovine testis. *Andrologia* 24 : 231-235.
- Bock, E. (1978). Nervous system specific protein. *J. Neurochem.* 30 : 7-14
- Carpentier, J., A. Perrelet, and L. Orci. (1977). Morphological changes of adipose cell plasma membrane during lypolysis. *J. Cell. Biol.* 72 : 104-117.
- Donato, R., F. Michetti, and N. Miani. (1975). Soluble and membrane-bone S-100 protein and cerebral cortex synaptosomes. Properties of the S-100 receptor. *Brain res.* 98 : 561-573.
- Evans, H.E., and W.O. Sack. (1973). Prenatal development of domestic and laboratory mammals : growth curves, external features and selected references. *Anat. Histol. Embryol.* 2 : 11-45.

- Girod, C., N. Durand, and M. Raccurt. (1986). A comparative study of immunocytochemical localization of S-100 protein in the monkey *Macaca irus* and the albino rat testis. *Biomed. Res.* 7 (5) : 333-337.
- Haimoto. H., K. Kato. F. Suzuki, and H. Nagura. (1985). The ultrastructural changes of S-100 protein localization during lypolysis in adipocytes : An imunolectronmicroscopic study. *Am J. Pathol.* 121: 185-191.
- Hyden, H., and B. McEwen. (1966). A glial protein specific for the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 55 : 354-358.
- Iwanaga, T., T. Fujita, Y. Takahashi, and T. Isobe. (1987). Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in the endothelial cells of blood vessels in the pig and cattle. *Biomed. Res.* 8 : 329-334.
- Kahn, H.J., A. Marks, H. Thom, and R. Bauml. (1983). Role of antibody to S-100 protein in diagnostic pathology. *A. J. Clin. Pathol.* 79 (3) : 341-347.
- Kamiya, S., T.Tajika, and M. Diago. (1989a) Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in epithelial cells of bovine aviduct. *Acta Anatomica* 136 : 341-347.
- Kamiya, S., M. Tsukushi, S. Yamano, and M. Daigo. (1989b). S-100 protein immunoreactive cells in the bovine ovary. *Anat. Rec.* 223 : 384-386.
- Miani, N., F. De Renzis, F. Michetti, S. Correr, C. Olivieri-Sangiaco, and A. Caniglia. (1972). Axonal transport of S-100 protein in mammalian nerve fibres. *J. Neurochem.* 119 : 1387-1394.
- Michetti, F., L. Lauriola, M. Reude, V.H. Stolfi, F. Battaglia, and D. Cocchia. (1985). S-100 protein in the testis. An immunochemical and immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 240 : 137-142.
- Moore, B.W. (1965). A soluble Protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19 : 739-744.
- Moore, B.W. (1972). Chemistry and biology of two protein, S-100 and 14-3-2 specific to the nervous system. In : C C Pfeifer and J.R. Smythies (eds.) *International review of neurbiology*. Vol. 15 Acad Press. New York. Pp. 215-255.
- Moore, B.W. (1982). Chemistry and biology of the S-100 protein. *Scand. J. Immunol.* 15 (suppl. 9) : 53-74
- Simionescu, N. (1981). Transcytosis and trafic of membranes in the endthelial cell. In : H.G. Schweiger (ed.). *International Cell Biology*. 80/81. Springer. Berlin. Pp. 657-672.
- Vanstapel., M.-J., K. C. Gatter, C. de Wolf-Peeters, D.Y. Mason, and V.D. Desmet. (1986). New site of human S-100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies. *Am.J. Clin. Pathol.* 85 : 160-168.

- Vasile, E., M. Simionescu, N. Simionescu. (1983). Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. *J. Cell. Biol.* 96: 1677-1689.
- Winters, L.M., W.W. Green, and R.E. Comstock. (1942). Prenatal development of the bovine. *Minnesota Ag. Expt. Sta. Tech. Bull.* 151 : 1-150.
- Zomzely-Neurath, C., and W.A. Walker. (1980). Nervous System-specific proteins : 14-3-2 protein, neuron specific enolase, and S-100 protein. In : R.A. Bradshaw, and D.M. Schneider (eds.). *proteins of the Nervous System*. Raven Press. New York. Pp. 1-57.