

Perubahan Karbohidrat Selama Perkembangan Folikel Ovarium Kancil, *Tragulus javanicus*

(CARBOHYDRATES OF CHANGES DURING THE FOLLICULAR DEVELOPMENT IN THE OVARY OF THE MOUSE DEER, *TRAGULUS JAVANICUS*)

Hamny¹⁾, Srihadi Agungpriyono^{2, 3)}, Ita Djuwita²⁾, Chairun Nisa²⁾,
Wahono Esthi Prasetyaningtyas²⁾, Erdiansyah Rahmi⁴⁾

¹⁾ Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111, Indonesia

²⁾ Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

³⁾ Jabatan Sains Praktikal Veterinar, Fakulti Perubatan Veterinar, Universiti Putra Malaysia (UPM) 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia

⁴⁾ Laboratorium Embriologi dan Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111, Indonesia

ABSTRAK

Laporan tentang perkembangan organ reproduksi kancil (*Tragulus javanicus*) masih sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari distribusi dan konsentrasi karbohidrat selama perkembangan folikel ovarium. Pada penelitian ini digunakan satu ovarium kancil yang berada pada fase luteal. Sayatan jaringan ovarium dibuat mengikuti metode standar dan selanjutnya diwarnai dengan histokimia lektin menggunakan lektin *peanut agglutinin* (PNA), *Ricinus communis agglutinin* (RCA), *Concanavalin A* (Con A), *Winged bean agglutinin* (WGA) dan *Ulex europaeus agglutinin* (UEA) yang berlabel *fluorescens*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi perubahan pada distribusi dan konsentrasi beberapa jenis karbohidrat selama perkembangan folikel, baik pada tahap preantral maupun antral. Pada folikel preantral, sitoplasma oosit banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa. Zona pelusida banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa, manosa, galaktosa dan N-asetilgalaktosamin, sedangkan matriks ekstraseluler banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa. Pada folikel antral, sitoplasma oosit banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula galaktosa dan N-asetilgalaktosamin, sedangkan zona pelusida, matriks ekstraseluler dan cairan folikuli banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula fukosa, N-asetilglukosamin dan asam sialat. Hasil ini jelas menunjukkan bahwa ada perbedaan jenis dan pola distribusi karbohidrat dari kedua tipe folikel, baik pada folikel preantral maupun pada folikel antral.

Kata kunci : ovarium, folikel, kancil, lektin, histokimia:

ABSTRACT

The data available on the female reproductive organ of mouse deer (*Tragulus javanicus*) is still very limited. A study was therefore conducted to investigate the distribution and the concentration of carbohydrate residues during the development of ovary follicles. An ovary at luteal phase was used in this study. Thin sections of the ovary were prepared according to the standard methods and they were then histochemically stained with fluorescein-labelled lectins such as peanut agglutinin (PNA), *Ricinus communis agglutinin* (RCA), *Concanavalin A* (Con A), *Winged bean agglutinin* (WGA) and *Ulex europaeus agglutinin* (UEA). The result showed that changes in the distribution and the concentration of carbohydrate occurred during the development of the follicle. During the preantral stage, the cytoplasm of oosit contained carbohydrate with the residues of glucosa dan mannosa. Zona pelusida contained carbohydrates with residues of glucosa, mannosa, galactosa dan N-acetylglactosamine, whereas extracellular matrix contained carbohydrate with the residues of glucosa dan mannosa. In the antral follicle, the cytoplasm of oocytes contained carbohydrate with the residues of galactosa dan N-acetylglactosamine, whereas its zona pelusida, extracellular matrix and follicular fluid contained carbohydrate with the residues of fucose, N-acetylglucosamin and sialic acid. Differences in the types and the distribution pattern of carbohydrates were observed in this study, both in preantral and antral follicles.

Keywords: ovary, follicles, deer, lectins, histochemistry

PENDAHULUAN

Karbohidrat merupakan makromolekul yang berfungsi penting dalam tubuh, seperti pada proses migrasi, pengenalan, adhesi, diferensiasi pematangan dan interaksi antar sel termasuk pada proses perkembangan folikel ovarium untuk menghasilkan oosit yang mampu dibuahi oleh spermatozoa. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa karbohidrat berperan penting dalam proses fertilisasi karena berfungsi sebagai unsur yang memungkinkan spermatozoa untuk membuahi oosit (Shalgi *et al.* 1986; Avilles *et al.* 1997; Tulsiani *et al.* 1997; Rath *et al.* 2005). Pada *isthmus* dari tuba Fallopii terjadi ikatan karbohidrat antara epitel tuba Fallopii dan membran plasma spermatozoa yang spesifik pada setiap spesies.

Pada beberapa spesies mamalia, membran plasma spermatozoa berikatan dengan epitel mukosa tuba Fallopii melalui suatu *ligan* karbohidrat. DeMott *et al.* (1995) melaporkan bahwa asam sialat memperantarai ikatan spermatozoa dengan epitel tuba Fallopii pada hamster, galaktosa pada kuda (Lefebvre *et al.* 1995), dan fukosa pada sapi (Lefebvre *et al.* 1997). Penelitian oleh Revah *et al.* (2000) menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi karbohidrat selama siklus estrus menyebabkan pelepasan spermatozoa yang mampu membuahi oosit dari reservoir tuba Fallopii. Prasetyaningtyas (2005) melaporkan bahwa membran plasma spermatozoa pada kancil (*Tragulus javanicus*) jantan mengandung karbohidrat dengan residu N-asetilglukosamin dan asam sialat.

Laporan mengenai jenis karbohidrat dan pola distribusinya pada organ reproduksi hewan betina, khususnya ovarium yang menghasilkan oosit belum banyak yang melaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari jenis dan pola distribusi karbohidrat selama perkembangan folikel

ovarium kancil khususnya pada folikel preantral dan folikel antral.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan satu ovarium (fase luteal) yang berasal dari kancil (*T. javanicus*) betina dewasa yang diperoleh dengan memanfaatkan kancil yang telah mati.

Pewarnaan Histokimia pada Folikel Ovarium

Ovarium difiksasi dengan larutan *Bouin* dan selanjutnya dipreparasi untuk pembuatan preparat histologi (Kiernan 1990). Ovarium ditanam dalam parafin (Paraplast, Thermo Shandon, Pittsburgh, USA) dan dipotong dengan ketebalan 5 μ m menggunakan mikrotom. Preparat diwarnai dengan pewarnaan histokimia lektin dengan beberapa lektin yang berlabel *fluorescence isotyocyanate* (FITC) (Fluorescein Lectin Kit 1, FLK 2100, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Jenis, spesifisitas dan dosis lektin yang digunakan disajikan pada Tabel 1.

Untuk menentukan spesifisitas metode histokimia lektin dipakai kontrol positif dan negatif. Kelenjar submandibularis domba digunakan sebagai preparat kontrol positif, sedangkan untuk kontrol negatif digunakan larutan *phosphate buffer saline* (PBS) sebagai pengganti lektin. Data yang diperoleh adalah data semikuantitatif tentang afinitas dan intensitas warna yang ditimbulkan pada metode tersebut. Penilaian intensitas warna dikelompokkan dalam empat kategori, yaitu negatif (-), sangat lemah ($\pm$), lemah (+), sedang (++) dan kuat (+++).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pewarnaan histokimia lektin (Tabel 2 dan Gambar 1-3) dengan menggunakan

Tabel 1 Jenis, spesifisitas dan dosis lektin yang digunakan

Jenis Lektin	Spesifisitas	Dosis
Con A (<i>Canavalia ensiformis agglutinin</i>)	Man, Glc	30 μ g/ml
RCA (<i>Ricinus communis agglutinin</i>)	Gal, GalNAc	30 μ g/ml
UEA (<i>Ulex europaeus agglutinin</i>)	Fuc	30 μ g/ml
WGA (<i>Triticum vulgare agglutinin</i>)	GlcNAc, sialic acid	30 μ g/ml
PNA (<i>Arachis hypogaea agglutinin</i>)	Gal, GalNAc	30 μ g/ml

Keterangan : Man = mannose, Glc = glucose, Gal = galactose, GalNAc = N-acetylgalactosamine, Fuc = fucose, GlcNAc = N-Acetylglucosamine

Tabel 2 Distribusi karbohidrat (residu gula) pada folikel preantral dan antral ovarium kancil *Tragulus javanicus* dengan metode histokimia lektin

Lektin dan Residu Gula	Folikel preantral			Folikel antral			
	ST	ZP	MES	ST	ZP	MES	CF
Glc, Man (Con A)	++~+++	±	++	+	-	±	±
Gal, GalNAc (RCA)	++	*	*	+++	-	±~+	±~+
Fuc (UEA)	+	*	*	+	+++	+	+++~++++
GlcNAc, Sialic Acid (WGA)	+	*	*	+	+++	+	+++~++++
Gal, GalNAc (PNA)	±~+	±	±~+	+	+	±~+	±~+

Keterangan: Man : mannose, Glc : glucose, Gal : galactose, GalNAc : N-acetylgalactosamine, Fuc : fucose, GlcNAc : N-Acetylglucosamine

perbedaan pada jenis dan pola distribusi karbohidrat dari kedua tipe folikel baik pada folikel preantral maupun pada folikel antral. Pada folikel preantral, lektin Con A yang mengindikasikan karbohidrat dengan residu glukosa dan manosa, bereaksi positif dengan intensitas sangat lemah pada zona pelusida hingga kuat pada sitoplasma oosit, sedangkan pada folikel antral terjadi penurunan intensitas menjadi sangat lemah pada matriks ekstraseluler dan cairan folikuli hingga lemah pada sitoplasma oosit. Pada zona pelusida, Con A bereaksi negatif. Lektin RCA yang mengindikasikan karbohidrat dengan residu galaktosa (Gal) dan N-asetilgalaktosamin (GalNAc) bereaksi positif dengan intensitas sedang pada sitoplasma oosit dari folikel preantral dengan intensitas sangat lemah pada matriks ekstraseluler dan cairan folikuli hingga sedang pada sitoplasma oosit dari folikel antral. Lektin UEA yang mengindikasikan karbohidrat dengan residu fukosa bereaksi positif dengan intensitas lemah pada sitoplasma oosit dari folikel preantral dan intensitas lemah pada sitoplasma oosit, zona pelusida, dan matriks ekstraseluler dari folikel preantral hingga kuat pada cairan folikuli dari folikel antral. Lektin WGA mengindikasikan adanya karbohidrat dengan residu gula N-asetilglukosamin (GlcNAc) dan asam sialat bereaksi positif dengan intensitas lemah pada sitoplasma oosit dari folikel preantral dan intensitas lemah pada sitoplasma oosit, zona pelusida, dan matriks ekstra-seluler hingga kuat pada cairan folikuli dari folikel antral. Lektin PNA yang mengindikasikan karbohidrat dengan residu galaktosa dan N-asetilgalaktosamin (GalNAc) bereaksi positif dengan intensitas sangat lemah pada sitoplasma oosit, zona pelusida, dan matriks ekstraseluler hingga lemah pada

sitoplasma oosit dan matriks ekstraseluler dari folikel preantral, sedangkan pada folikel antral, lektin PNA bereaksi positif dengan intensitas sangat lemah pada matriks ekstraseluler dan cairan folikuli hingga lemah pada sitoplasma oosit, zona pelusida, matriks ekstraseluler, dan cairan folikuli.

Berdasarkan tahapan perkembangannya maka pada folikel preantral, keberadaan dan fungsi karbohidrat diduga berkaitan dengan proses perkembangan, diferensiasi folikel, dan sebagai signal komunikasi antar sel granulosa, sedangkan pada folikel antral fungsi karbohidrat diduga berkaitan dengan proses sintesis reseptor terhadap spermatozoa terutama pada zona pelusida. Karbohidrat pada zona pelusida berkaitan erat dengan proses fertilisasi dan bersifat *species-specific*. Substansi-substansi termasuk karbohidrat pada zona pelusida merupakan kunci pada proses awal inisiasi pengenalan (*recognized*) dan perlekatan (*binding*) oosit dengan spermatozoa.

Skutelsky *et al.* (1994) melaporkan bahwa zona pelusida, sel granulosa dan cairan folikuli pada folikel ovarium tikus, hamster, kelinci, kucing, dan babi mengandung karbohidrat dengan residu gula β -galaktosa dan N-asetilgalaktosamin. Wu *et al.* (1984) melaporkan bahwa zona pelusida oosit tikus mengandung N-asetilglukosamin, asam sialat, β -galaktosa dan β -asetilgalaktosamin. Namun demikian pola distribusi karbohidrat pada struktur ovarium ruminansia masih belum banyak dilaporkan. Adanya variasi pada pola distribusi karbohidrat pada struktur folikel ovarium pada berbagai spesies telah dikemukakan oleh Tulsiani *et al.* (1997) dan Rath *et al.* (2005).

Hasil penelitian ini memperlihatkan pada folikel preantral, sitoplasma oositnya banyak

Gambar 1 Pola distribusi lektin Con A dan RCA pada folikel preantral dan antral ovarium kancil. Pada folikel preantral, lektin con A bereaksi positif sedang hingga kuat pada sitoplasma oosit, sangat lemah pada zona pelusida dan sedang pada folikel antral, lektin Con A bereaksi positif lemah pada sitoplasma oosit, sangat lemah pada matriks ekstraseluler dan cairan folikuli, serta negatif pada zona pelusida. Pada folikel antral, lektin RCA bereaksi positif sedang pada zona pelusida. Pada folikel preantral, lektin RCA bereaksi positif lemah hingga sedang pada sitoplasma oosit, sedang pada folikel antral, lektin RCA bereaksi positif lemah hingga sedang pada sitoplasma oosit, sangat lemah pada matriks ekstraseluler dan cairan folikuli, serta negatif pada zona pelusida. MFS : zona pelusida, OT : oosit, ZP : zona pelusida, CF : cairan folikuli, FITC. Bar : A & D : 30 μ m, B, C, & E : 50 μ m, F : 100 μ m

Gambar 2 Pola distribusi lektin UEA dan WGA pada folikel preantral dan antral ovarium kancil. Pada folikel preantral, lektin UEA bereaksi positif lemah pada sitoplasma oosit, sedang pada folikel antral, lektin UEA bereaksi positif lemah pada zona pelusida, sedang hingga ekstraseluler, lektin WGA bereaksi positif lemah pada sitoplasma oosit, sedang pada folikel antral, lektin WGA bereaksi positif lemah pada sitoplasma oosit dan matriks ekstraseluler, lektin WGA bereaksi positif lemah pada sitoplasma oosit dan matriks ekstraseluler, lektin WGA bereaksi positif lemah pada sitoplasma oosit dan matriks ekstraseluler, lektin WGA bereaksi positif lemah pada zona pelusida, sangat lemah hingga kuat pada cairan folikuli, OT : oosit, ZP : zona pelusida, MFS : matriks ekstraseluler, CF : cairan folikuli, FITC. Bar : A, C & D : 30 μ m, B : 20 μ m, E & F : 50 μ m

Gambar 3 Pola distribusi lektin PNA pada folikel preantral dan antral ovarium kancil. Pada folikel preantral, lektin PNA bereaksi positif sangat lemah hingga sedang pada sitoplasma oosit dan matriks ekstraseluler, dan sangat lemah pada zona pelusida, sedangkan pada folikel antral, lektin PNA bereaksi positif lemah pada sitoplasma oosit dan zona pelusida, sangat lemah hingga matriks ekstraseluler dan cairan folikuli, OT : oosit, ZP : zona pelusida, MFS : matriks ekstraseluler, CF : cairan folikuli, FITC. Bar : A : 30 μ m, B : 50 μ m

histokimia lektin pada ovarium kancil lebih bervariasi. Variasi semacam ini menunjukkan adanya perbedaan aktivitas dan fungsi folikel dan ovarium pada kedua jenis hewan ini.

SIMPULAN

Pada folikel preantral, sitoplasma oosit banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa, zona pelusida banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula asetilglukosamin, sedangkan matriks ekstraseluler banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa. Pada folikel antral, sitoplasma oosit banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa, galaktosa dan N-asetilglukosamin, sedangkan matriks ekstraseluler banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa, manosa, galaktosa dan N-asetilglukosamin, sedangkan matriks ekstraseluler banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa. Pada folikel preantral, sitoplasma oosit banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa, N-asetilglukosamin dan asam siat. Perbedaan distribusi residu karbohidrat tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan proses perkembangan maupun karakteristik folikel pada tahap antral. Hasil serupa telah dilaporkan pada ovarium rusa (Ritgiyati 2006), tetapi tampaknya distribusi karbohidrat yang dilacak dengan teknik

klasifikasi penelitian ini menunjukkan bahwa pada folikel preantral, sitoplasma oosit banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa. Pada folikel antral, sitoplasma oosit banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa, galaktosa dan N-asetilglukosamin. Matriks ekstraseluler banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa, manosa, galaktosa dan N-asetilglukosamin. Matriks ekstraseluler banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa, galaktosa dan N-asetilglukosamin, sedangkan zona pelusida banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa. Pada folikel antral, sitoplasma oosit banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa, galaktosa dan N-asetilglukosamin, sedangkan zona pelusida banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa dan manosa, galaktosa dan N-asetilglukosamin. Matriks ekstraseluler banyak mengandung karbohidrat dengan residu gula glukosa, N-asetilglukosamin dan asam siat. Perbedaan distribusi residu karbohidrat tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan proses perkembangan maupun karakteristik folikel pada tahap antral. Hasil serupa telah dilaporkan pada ovarium rusa (Ritgiyati 2006), tetapi tampaknya distribusi karbohidrat yang dilacak dengan teknik

DAFTAR PUSTAKA

Revah I, Gadella BM, Plesch FM, Colenbrander B, Suarez SS. 2000. Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties. *Biol Reprod* 62 : 1010-1015

Rifqiyati N. 2006. Dinamika perkembangan morfologi ovarium rusa timor (*Cervus timorensis*) dengan tinjauan khusus pada gambaran dan karakteristik histokimia folikel. [Tesis]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Shalgi R, Matityahu A, Nebel L. 1986. The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. *Biol Reprod* 34 : 446-452

Skutelsky E, Ramen E, Shalgi R. 1994. Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. *J Reprod and Fertil* 100 : 35-41

Tuliani DRP, Yosahida-Komiyah H, Araki Y. 1997. Mammalian fertilization : a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod* 57 : 487-494

Wu GM, Lai L, Mao J, McCauley TC, Caamano JN, Cantley T, Riecke A, Murphy CN, Prather RS, Didion BA, Day BN. 2004. Birth of piglets by in vitro fertilization of zona-free porcine oocytes. *Theriogenology* 62: 1544-1556

Avilles M, Jaber L, Castells MT, Ballesta J, Kan FWK. 1997. Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biol Reprod* 57 : 1163

DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS. 1995. Carbohydrate mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* 52 : 1395-1403

Kiernan JA. 1990. *Histological & Histochemical Methods : Theory & Practice*. Ed-2. England : Pergamon Press.

Lefebvre R, DeMott RP, Suarez SS, Samper JC. 1995. Specific inhibition of equine sperm binding to oviductal epithelium. *Equine Reprod* VI : 689-696

Lefebvre R, Lo M, Suarez SS. 1997. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod* 56 : 1198-1204

Prasetyaningtyas WE. 2005. Kajian karakteristik semen dan morfologi spermatozoa kancil (*Tragulus javanicus*). [Tesis]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Rath D, Topfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, Ebeling S. 2005. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of *in vivo* and *in vitro* produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* 63 : 352-362