

Perbandingan Deteksi Proliferasi Sel Dengan Imunohistokimia BrdU Dan PCNA Pada Ovarium Tikus

Ira Cinta Lestari

Depatemen Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sumatera Utara

Iracinta.lestari@fk.uisu.ac.id

ABSTRAK

Deteksi sel yang mengalami proliferasi dapat digunakan untuk mengetahui efek inhibisi atau aktivasi suatu *agent* atau *growth factor*, dilakukan dengan melakukan identifikasi diferensiasi dan migrasi sel yang membelah pada satu waktu tertentu. Deteksi sintesis DNA menggunakan 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) dan deteksi *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) merupakan metode yang rutin digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati struktur ovarium pada tikus dengan pewarnaan hematoksilin eosin dan membandingkan deteksi sel yang berproliferasi pada ovarium tikus dengan metode imunohistokimia BrdU dan PCNA. Pengamatan dilakukan pada irisan jaringan yang dianalisis secara kualitatif meliputi struktur mikroskopis ovarium tikus dan distribusi sel yang berproliferasi pada ovarium tikus dengan antibodi primer anti PCNA dan anti BrdU. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa imunohistokimia BrdU memberikan gambaran yang lebih spesifik pada sel yang berada pada fase S siklus sel.

Kata Kunci : Imunohistokimia, BrdU, PCNA, Proliferasi, Ovarium

ABSTRACT

Detection of cells undergoing proliferation can be used to determine the effect of inhibition or activation of an agent or growth factor, carried out by identifying the differentiation and migration of cells dividing at a certain time. Detection of DNA synthesis using 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) are routine methods. This study aims to observe the structure of the ovaries in mice using hematoxylin-eosin staining and compare the detection of proliferating cells in mouse ovaries using BrdU and PCNA immunohistochemical methods. Observations were made on tissue slices that were analyzed qualitatively, including the microscopic structure of mouse ovaries and the distribution of proliferating cells in mouse ovaries with anti-PCNA and anti-BrdU primary antibodies. The results of this study show that BrdU immunohistochemistry provides a more specific picture of cells in the S phase of the cell cycle.

Keywords : Immunohistochemistry, BrdU, PCNA, Proliferation, Ovaries

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Sel yang mengalami proliferasi adalah sel yang aktif membelah melalui tahapan siklus sel untuk menghasilkan dua sel anak. Pada kondisi normal, jenis dan jumlah sel yang mengalami proliferasi pada setiap jaringan memiliki karakteristik yang berbeda. Deteksi sel yang mengalami proliferasi banyak digunakan untuk mengetahui efek inhibisi atau aktivasi suatu *agent* atau *growth factor*, melakukan identifikasi diferensiasi dan migrasi sel yang membelah pada satu waktu tertentu. Deteksi sintesis DNA menggunakan 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) dan deteksi *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) merupakan metode yang rutin digunakan. BrdU adalah senyawa sintetik yang analog dengan *thymidine*, akan berikatan dengan DNA yang baru tersintesis sehingga mampu mendeteksi sel yang berada pada fase S siklus DNA (Wakayama et al., 2015). BrdU dapat diberikan pada air minum secara *ad libitum*, secara *in vitro* maupun secara *in vivo* dengan penyuntikan intraperitoneal pada hewan coba (Kumari, 2020). Metode ini membutuhkan denaturasi DNA menjadi rantai tunggal, inkubasi dengan antibodi monoklonal yang spesifik untuk BrdU dan dapat dideteksi menggunakan teknik imunohistokimia (IHC), ELISA dan *flow cytometry* (Cappella et al., 2015). PCNA adalah protein nuklear *non-histone* yang berperan pada enzim *DNA polymerase alpha* yang dibutuhkan untuk proses sintesis DNA (Molina et al., 2013). PCNA juga berinteraksi dengan kompleks *Cyclin dependent kinase* (CDK)-*Cyclin* pada seluruh tahapan dalam siklus sel dan protein yang berperan dalam *checkpoint* (Maga & Hubscher, 2003). Ekspresi dari PCNA meningkat selama fase G₁, mencapai puncak pada fase S dan menurun pada fase G₂/M pada sel yang mengalami proliferasi (Bologna-Molina et al., 2013). Pada penelitian ini, dilakukan pengamatan struktur histologis jaringan ovarium tikus betina menggunakan pewarnaan hematoksilin eosin. Hematoksilin akan mewarnai inti sel dan eosin akan mewarnai sitoplasma. Selain itu dilakukan juga imunohistokimia BrdU dan imunohistokimia PCNA. Kedua metode tersebut dapat mendeteksi sel yang mengalami proliferasi pada fase siklus sel yang berbeda sehingga akan menghasilkan gambaran yang berbeda pula.

2. Perumusan Masalah

Pada penelitian ini terdapat rumusan masalah, yaitu: “Apakah metode imunohistokimia BrdU dan PCNA dapat memberikan gambaran sel yang berproliferasi pada ovarium tikus?”

3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati struktur ovarium pada tikus dengan pewarnaan hematoksilin eosin dan membandingkan deteksi sel yang berproliferasi pada ovarium tikus dengan metode imunohistokimia BrdU dan PCNA.

4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah wawasan dan pengetahuan mengenai metode deteksi sel yang berproliferasi pada ovarium tikus dengan metode imunohistokimia BrdU dan PCNA.

II. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Larutan Buffer dan Larutan Fiksatif

Larutan buffer yang digunakan adalah Phosphate-Buffered Saline (PBS) sedangkan larutan fiksatif yang digunakan adalah Paraformaldehid 4% dalam PBS. Pada metode imunohistokimia digunakan larutan Buffer Sitrat 10mM pH 6 untuk antigen retrieval dan larutan Tris EDTA pH 9 untuk proses pencucian.

Hewan Coba

Hewan coba berupa 1 ekor tikus betina galur Wistar berumur 3 minggu, dengan berat badan 50 gram, diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi UGM. Tikus diberi BrdU dengan dosis 50 mg/Kg berat badan, disuntikkan secara intraperitoneal sebanyak 10mg/mL dibagi 4 dosis dengan selang waktu 3 jam pada regio abdomen yang berbeda. Tikus dinekropsi 1 hari setelah pemberian BrdU.

Nekropsi

Tikus dianestesi dengan chloralhydrate 3,5% dengan dosis 1 mL/100g berat badan tikus secara intraperitoneal kemudian dilakukan proses perfusi transkardial. Bagian abdomen tikus dibuka hingga ke bagian thorax, diidentifikasi atrium dan ventrikel kiri jantung. Kemudian bagian kecil ujung ventrikel kiri dan atrium kiri dipotong, diikuti dengan memasukkan jarum perfusi melalui bagian yang terpotong tersebut hingga jarum dapat masuk ke aorta. Klem digunakan untuk mempertahankan jarum perfusi. Alat perfusi dijalankan dan ditunggu hingga semua darah tergantikan dengan cairan perfusi yang dipakai. Pertama, tikus dialiri PBS selama 5 menit kemudian menggunakan paraformaldehida 4% dalam PBS selama 15 menit. Setelah tikus terfiksasi sempurna, di ambil organ ovarium, direndam ke dalam wadah yang berisi larutan fiksatif paraformaldehida 4% dalam PBS dan didiamkan semalam pada suhu ruang.

Pembuatan Blok Parafin

Sampel yang sudah difiksasi akan didehidrasi terlebih dahulu. Ovarium dimasukkan ke dalam larutan etanol/alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut, masing-masing selama 5 menit. Setelah dehidrasi dilakukan proses clearing dimulai dengan memasukkan ovarium ke larutan alkohol absolut:toluene (1:1) selama 5 menit, ke larutan toluene murni sampai ovarium tampak transparan sekitar 2 menit dan larutan toluene parafin jenuh selama 3 jam. Setelah itu, dilakukan proses infiltrasi, jaringan dipindahkan ke dalam larutan parafin I, II, III dan IV masing-masing selama 3 menit dan dimasukkan ke dalam kaset/cetakan blok parafin sampai mengeras. Blok parafin dibuat dengan memperhatikan rencana pengirisan organ, ovarium dibuat dalam potongan melintang.

Pengirisan

Pengirisan blok parafin dilakukan dengan mikrotom putar. Irisan blok paraffin untuk pengecatan HE dibuat setebal 6 µm sedangkan irisan blok parafin untuk pengecatan imunohistokimia dibuat setebal 4 µm. Setelah mencapai irisan yang sesuai dengan karakteristik organ maka irisan dimasukkan ke akuades dan waterbath dengan suhu 40°C untuk mengembangkan jaringan. Irisan blok parafin untuk pengecatan HE diletakkan pada objek kaca yang dilapisi ewit (albumin-gliserin). Sedangkan irisan untuk pengecatan imunohistokimia (diletakkan pada objek kaca khusus yang dilapisi poly-L-lysin). Masing-masing objek kaca terdapat 3 irisan blok parafin dengan jarak irisan 100 µm.

Pengecatan HE

Tahapan sebelum pewarnaan adalah deparafinisasi. Irisan blok parafin yang akan diwarnai ditaruh di dalam staining jar kemudian dimasukkan ke dalam larutan xylol I (10 menit), xylol II (10 menit), alkohol absolut I (5 menit), alkohol absolut II (5 menit), alkohol 95 %, alkohol 90 %, alkohol 80 %, alkohol 70 % masing-masing 1 menit dan dicuci dengan akuades. Irisan jaringan diwarnai dengan hematoxilin selama 3 menit, dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali, dimasukkan dalam acid alkohol selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 1 menit. Kemudian jaringan diwarnai dengan eosin 1% selama 30 detik dan dibilas dengan akuades. Setelah itu irisan blok parafin didehidrasi dengan larutan alkohol 70 %, alkohol 80 %, alkohol 90 %, alkohol 95 %, alkohol absolut masing-masing selama 3 menit, xylol I, xylol II, xylol III masing-masing 5 menit. Setelah itu dimounting dengan Canada balsam.

Pengecatan Immunohistokimia PCNA

Imunohistokimia PCNA yang dilakukan pada ovarium menggunakan organ kolon sebagai kontrol negatif dan kontrol positifnya. Irisan jaringan dilakukan proses deparafinisasi. Setelah itu dilakukan bloking peroksidase, dengan menambahkan 0,3 % H₂O₂/methanol selama 15 menit, dicuci dengan akuades sebanyak 3 kali dan dicuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Tahap berikutnya antigen retrieval dalam larutan Buffer Sitrat pH 6, dipanaskan selama 20 menit menggunakan microwacve kemudian didinginkan sampai mencapai suhu ruang dan dicuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan proses blocking nonspesifik binding dengan larutan Background sniper dan didiamkan selama 10 menit. Tahap berikutnya proses IHC staining proper. Antibodi primer yang digunakan adalah Antibodi primer anti PCNA pengenceran 1:1000 yang diinkubasi selama 15 menit. Tujuannya untuk melihat distribusi sel yang berproliferasi pada jaringan yang diperiksa. Kontrol negatifnya adalah jaringan kolon yang tidak diberikan antibodi primer melainkan hanya diberikan larutan PBS saja. Setelah diberi antibodi primer, irisan blok parafin dicuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan antibodi sekunder (Trekki Universal Link) selama 10 menit, cuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Kemudian, ditambahkan Trek Avidin-HRP label dan diinkubasi selama 10 menit, lalu dicuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Pengecatan Immunohistokimia BrdU

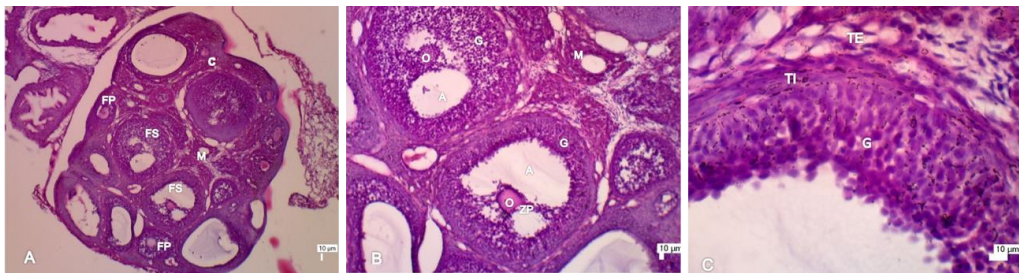
Imunohistokimia BrdU yang dilakukan pada ovarium menggunakan organ ovarium sebagai kontrol negatif dan organ kolon sebagai kontrol positifnya. Irisan jaringan dilakukan proses deparafinisasi. Setelah itu dilakukan bloking peroksidase, dengan menambahkan 0,3 % H₂O₂/methanol selama 15 menit, dicuci dengan akuades sebanyak 3 kali dan dicuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Tahap berikutnya antigen retrieval dalam larutan Buffer Sitrat pH 6, dipanaskan selama 15 menit menggunakan waterbath dengan suhu 90°C kemudian didinginkan sampai mencapai suhu kamar dan dicuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan proses blocking nonspesifik binding dengan larutan Background sniper dan didiamkan selama 10 menit. Tahap berikutnya proses IHC staining proper. Dilakukan inkubasi dengan antibodi primer yang terlabel biotin yaitu antibodi anti BrdU pengenceran 1:100 selama semalam pada suhu 4°C. Tujuannya untuk melihat distribusi sel yang berproliferasi pada jaringan yang diperiksa. Kontrol negatifnya adalah jaringan ovarium yang tidak diberikan antibodi primer melainkan hanya diberikan larutan PBS saja. Setelah diberi antibodi primer, irisan blok parafin dicuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan avidin-HRP (Trek Avidin-HRP label) pada suhu ruang selama 15 menit, cuci dengan Tris EDTA pH 9 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya Olympus CX21 dengan numerical aperture (NA) 1,25 yang terhubung dengan kamera digital. Foto dibuat dengan Software “Optilab”. Irisan jaringan akan dianalisis secara kualitatif meliputi hal-hal sebagai berikut : 1) Pada ovarium (potongan melintang) akan diamati lapisan lapisan epitel germinal, tunika albugenia, korteks ovarii, medula ovarium, folikel ovarium, korpus luteum dan korpus albikan. 2) Distribusi sel yang berproliferasi pada ovarium dengan antibodi primer anti PCNA dan anti BrdU.

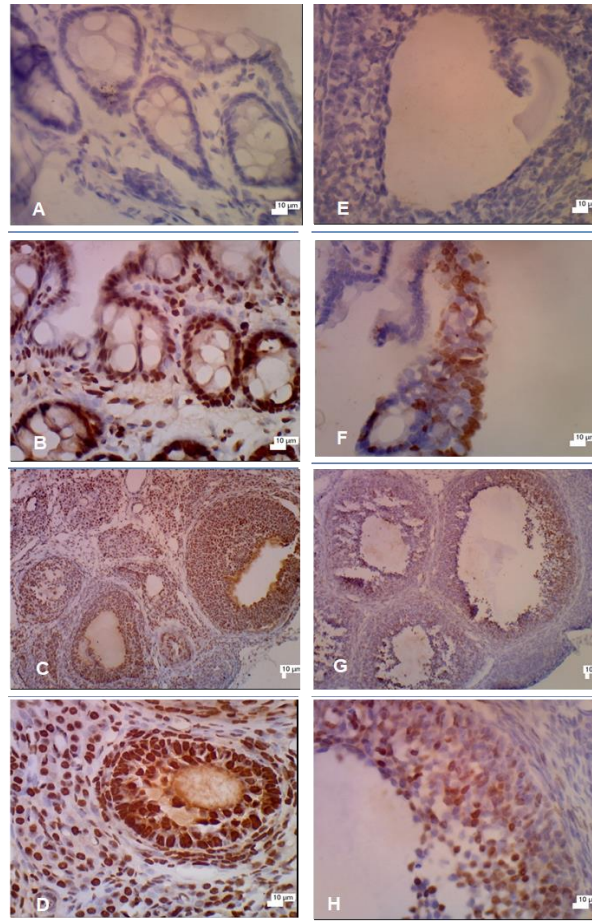
III. HASIL PENELITIAN

Ovarium pada tikus yang diamati berukuran panjang 5 mm, lebar 3 mm dan tebal 2 mm. Pewarnaan hematoksin eosin (HE) pada potongan melintang ovarium memberikan gambaran histologis yang cukup jelas seperti terlihat pada gambar 1. Hematoksin yang bersifat basa berikatan dengan asam nukleat sehingga memberikan warna biru pada inti sel. Eosin yang bersifat asam berikatan dengan protein sehingga memberi warna merah pada sitoplasma. Ovarium tampak dilapisi oleh epitel kuboid selapis yang disebut *germinal epithelium*, mesothelium dan lapisan jaringan ikat padat kapsul yang disebut *tunica albuginea*. Regio korteks ovarium terdiri atas stroma dan folikel-folikel ovarium. Regio medula terdiri atas jaringan ikat longgar dan pembuluh darah. Tidak ada batas yang jelas antara korteks dan medula. Pada area superfisial korteks terdapat folikel primordial, terdiri atas oosit primer yang dikelilingi selapis sel folikuler. Folikel primer yang tampak pada irisan jaringan adalah folikel primer multilaminar, terdiri atas sel-sel granulosa yang merupakan epitel folikular bertingkat, diantara oosit dan sel granulosa terdapat *zona pellucida*. Folikel sekunder disebut juga folikel antral dijumpai pada area cortex yang lebih dalam, terdiri atas *theca externa*, *theca interna*, lapisan sel granulosa dan antrum. Struktur lainnya seperti korpus luteum dan korpus albikan tidak terlihat pada jaringan ovarium yang diamati.



Gambar 1. Pewarnaan HE pada ovarium tikus, diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 4 x (A), 10 x (B) dan 100x (C) skala 10 µm. Inti sel berwarna biru. Sitoplasma berwarna merah. C : cortex, M : medula, FP : folikel primer, FS : foliker sekunder, O : oosit, G : sel granulosa, ZP : zona pellucida, A : antrum, CO : cumulus oophorus, TI : theca interna, TE : theca externa

Kontrol negatif yang digunakan pada IHC PCNA adalah jaringan kolon, sedangkan kontrol negatif pada IHC BrdU adalah ovarium, pada keduanya tidak terlihat sel yang imunoreaktif. Kontrol positif yang digunakan pada IHC PCNA dan BrdU adalah jaringan kolon, pada keduanya terlihat sel yang imunoreaktif pada sebagian sel-sel epitel. Inti sel yang imunoreaktif tampak berwarna coklat karena terwarnai oleh DAB, sedangkan sitoplasmanya dan sel lainnya berwarna ungu akibat pewarnaan *counterstain* hematoksin meyer seperti terlihat pada gambar 2. IHC PCNA dan BrdU yang dilakukan pada sampel ovarium menghasilkan gambaran distribusi yang hampir sama dari sel-sel yang berproliferasi yaitu pada folikel ovarium tepatnya pada sel-sel granulosa. Selain itu dijumpai juga sel yang berproliferasi pada medula ovarium namun jumlahnya lebih sedikit. Perbedaanannya adalah, pada IHC PCNA, sel yang terdeteksi sangat banyak dibandingkan dengan IHC BrdU, sehingga terlihat bahwa IHC PCNA bersifat kurang spesifik dibandingkan IHC BrdU.



Gambar 2. IHC PCNA : kontrol negatif kolon (A), kontrol positif kolon (B), ovarium perbesaran 10x (C) dan 40x (D). IHC BrdU : kontrol negatif ovarium (E), kontrol positif kolon (F), ovarium perbesaran 10x (G) dan 40x (H). Inti sel yang imunoreaktif berwarna coklat, sitoplasma dan sel lainnya berwarna ungu. Skala 10 µm. Sel yang mengalami proliferasi adalah sel yang aktif membelah melalui tahapan siklus sel untuk menghasilkan dua sel anak. Siklus sel tersebut terdiri atas beberapa tahapan yaitu interfase (G_1 , S, G_2) dan mitosis (M). Pada fase S terjadi proses sintesis DNA untuk replikasi DNA. Tahapan inilah yang menjadi target dari deteksi menggunakan BrdU. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) adalah senyawa sintetik yang *analog* dengan *thymidine*, akan berikatan dengan DNA yang baru tersintesis (Buenrostro-Jauregui et al., 2020; Yu et al., 2022).

BrdU dapat diberikan secara *in vivo* dengan melarutkan BrdU dalam larutan *saline* steril atau PBS dengan dosis 50-100 mg BrdU/kg kemudian disuntikkan secara intraperitoneal pada hewan coba (Kumari, 2020). Pada penelitian ini digunakan dosis BrdU 50 mg/Kg *i.p.*, dibagi 4 dosis dengan selang waktu 3 jam kemudian dinekropsi 1 hari setelah pemberian agar terjadi akumulasi BrdU pada jaringan. Deteksi BrdU membutuhkan proses denaturasi DNA menjadi rantai tunggal dan inkubasi dengan antibodi monoklonal yang spesifik untuk BrdU, bisa menggunakan imunohistokimia, immunositokimia, ELISA dan *flow cytometry* (Cappella et al., 2015). Pada penelitian ini BrdU dideteksi menggunakan imunohistokimia, denaturasi DNA dilakukan dengan cara pemanasan dan inkubasi antibodi anti-BrdU dilakukan selama semalam pada suhu 4°C. IHC BrdU sangat berguna untuk mendeteksi secara sel pada fase S, namun metode ini membutuhkan proses penyuntikan BrdU pada hewan coba, BrdU juga dapat berikatan pada DNA selama proses *DNA repair* dan bersifat mutagenik sehingga tidak sesuai untuk diterapkan pada studi toksikologi (Muskhelishvili et al., 2003). *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) adalah protein nuklear non-histone

yang berperan pada enzim DNA polymerase alpha yang dibutuhkan untuk proses sintesis DNA (Bologna-Molina et al., 2013). PCNA juga berperan pada berbagai tahapan dalam siklus sel (Mansilla et al., 2020). Ekspresi dari PCNA meningkat selama fase G1, mencapai puncak pada fase S dan menurun pada fase G2/M. PCNA juga memiliki peranan penting dalam metabolisme asam nukleat yang merupakan komponen replikasi DNA dan DNA repair (Ripley et al., 2020)..

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian , kesimpulan yang diperoleh yaitu : Pewarnaan hematoxilin eosin memberikan hasil yang baik dalam menggambarkan struktur histologis dari jaringan ovarium tikus. Sel yang mengalami proliferasi pada ovarium juga berhasil dideteksi dengan immunohistokimia PCNA dan BrdU. Namun, IHC BrdU memberikan gambaran yang lebih spesifik pada sel yang berada pada fase S siklus sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Bologna-Molina, R., Bedoya-Borella, A. M., Soria-Moreira, L., & Soría-Suárez, S. (2013). Molecular biomarkers of cell proliferation in ameloblastomas. *World Journal of Stomatology*, 2(4), 79–85.
- Buenrostro-Jauregui, M., Tapia-de-Jesús, A., Mata, J., Rodríguez-Serrano, L. M., Chávez-Hernández, M. E., Mata, F., Monroy-Plasencia, M., Alonso-Flores, A. C., & Leal-Galicia, P. (2020). Immunohistochemistry techniques to analyze cellular proliferation and neurogenesis in rats using the thymidine analog brdu. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 163, e61483.
- Cappella, P., Gasparri, F., Pulici, M., & Moll, J. (2015). Cell proliferation method: click chemistry based on BrdU coupling for multiplex antibody staining. *Current protocols in cytometry*, 72(1), 7–34.
- González-Magaña, A., & Blanco, F. J. (2020). Human PCNA structure, function, and interactions. *Biomolecules*, 10(4), 570.
- Kumari, Y. (2020). Bromodeoxyuridine (BrdU) marker for proliferating cells in living tissues: Detection in adult avian brain. *Progress in Drug Discovery & Biomedical Science*, 3(1).
- Maga, G., & Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*, 116(15), 3051–3060.
- Mansilla, S. F., De La Vega, M. B., Calzetta, N. L., Siri, S. O., & Gottifredi, V. (2020). CDK-independent and PCNA-dependent functions of p21 in DNA replication. *Genes*, 11(6), 593.
- Ripley, B. M., Gildenberg, M. S., & Washington, M. T. (2020). Control of DNA damage bypass by ubiquitylation of PCNA. *Genes*, 11(2), 138.
- Wakayama, T., Nakata, H., Kumchanteuk, T., Gewaily, M. S., & Iseki, S. (2015). Identification of 5-bromo-2'-deoxyuridine-labeled cells during mouse spermatogenesis by heat-induced antigen retrieval in lectin staining and immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(3), 190–205.
- Yu, J., Wang, Z., & Wang, Y. (2022). BrdU Incorporation Assay to Analyze the Entry into S Phase. In *Cell-Cycle Synchronization: Methods and Protocols* (hal. 209–226). Springer.

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
13 Januari 2024	21 Januari 2024	02 Februari 2024	Ya