

Immunohistochemical Study of the Immunoreactive Follicle Stimulating Hormone (ir-FSH) Cells Distribution in Pituitary Gland of Rat (*Rattus norvegicus*)

Patrick Flaggellata¹, Sri Wahyuni², M. Jalaluddin², Hamny², Gholib³, T. Armansyah TR⁴, Muslim Akmal⁵

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁵Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: sriwahyuni@unsyiah.ac.id

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the development of the immunoreactive follicle stimulating hormone (ir-FSH) cells in pituitary glands of rats (*Rattus norvegicus*) in different age using immunohistochemical (IHC) methods. The pituitary organ that used in this study was collected from eight white female rats aged 2, 4, 6, and >12 months. Pituitary glands were processed histologically and stained with IHC methods to detect the ir-FSH cells. The result showed that the ir-FSH cells were observed in pars distalis (PD), pars tuberalis (PT), and pars intermedia (PI) of adenohypophysis with different number of cells. Furthermore, ir-FSH cells were found abundantly (++++) in the PT and a few (+) in PD of rats aged two months. In rats aged 4 months those cells were distributed in slight number (+) in PT and abundant (++++) in PD. In addition, the cells were also found in a great quantities in rats whose ages were 6 months, (++++) in both PT and PD, but these cells decreased (++) in rats aged >12 months in PD and absent (-) in PT. In conclusion, the development and distribution of ir-FSH cells were found in pars tuberalis and pars distalis adenohypophysis in the pituitary glands of rats aged 2 up to >12 months with different number and distribution patterns.

Key words: ir-FSH cells, immunohistochemistry, adenohypophysis, and *Rattus norvegicus*.

PENDAHULUAN

Organ endokrin merupakan kelenjar tanpa duktus yang mensintesis hormon-hormon yang disekresikan ke dalam sirkulasi darah untuk di transportasikan ke seluruh tubuh menuju organ target. Organ-organ endokrin tersebut adalah hipofisa, adrenal, tiroid dan paratiroid, pankreas, testis, ovarium, dan plasenta (Brown, 1994). Secara anatomi, kelenjar hipofisa terletak di dalam *sella tursica* dari *os sphenoidale* (Dyce dkk., 1996). Kelenjar hipofisa terbagi atas dua lobus, yaitu lobus anterior atau adenohipofisa dan lobus posterior atau neurohipofisa. Terdapat enam jenis hormon yang dihasilkan oleh adenohipofisa, yaitu *growth hormone* (GH), *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH), *thyroid stimulating*

hormone (TSH), *prolactin* (PRL), *follicle stimulating hormone* (FSH), dan *luteinizing hormone* (LH), serta *melanocyte stimulating hormone* (MSH) (Brown, 1994).

Follicle stimulating hormone (FSH) adalah hormon glikoprotein yang berperan penting dalam sistem reproduksi betina sedangkan pada hewan jantan, hormon tersebut terlibat dalam proses spermatogenesis. Fungsi kelenjar hipofisa dalam mensintesis dan mensekresikan FSH diatur oleh mekanisme umpan balik positif dan negatif yang melibatkan kelenjar hipotalamus dan gonad (Rose dkk., 2000). Peran FSH lainnya adalah sebagai regulator siklus estrus bersama LH untuk merangsang perkembangan sel-sel folikel ovarium, sel-sel granulosa, dan sel-sel teka dalam mensekresikan hormon estrogen. Adapun hormon progesteron terdapat dalam jumlah

sedikit pada awal perkembangan sel-sel folikel (Partodihardjo, 1980).

Studi perkembangan sel-sel penghasil hormon FSH pada kelenjar hipofisa dengan teknik IHK merupakan hal menarik untuk dipelajari. Secara umum teknik IHK dapat digunakan untuk mempelajari keberadaan bahan-bahan aktif dan sel-sel spesifik yang terdapat di jaringan (Taylor, 2006). Salah satu sel yang dapat dideteksi keberadaannya adalah sel-sel FSH yang tergolong sel-sel gonadotrop adenohipofisa. Sel-sel FSH yang terdeteksi positif dengan antibodi anti FSH yang digunakan dalam pewarnaan IHK disebut sebagai sel-sel imunoreaktif FSH (ir-FSH). Penelitian sebelumnya terkait deteksi sel-sel ir-FSH telah dilakukan pada kelenjar hipofisa fetus babi (Sasaki dkk., 1992), anjing *beagle* atau anjing pemburu (Sasaki dan Nishioka, 1998); ayam (Proudman dkk., 1999); ikan lohan (*Cichlasoma dimerus*) (Pandolfi dkk., 2006). Berdasarkan uraian tersebut perlu dilakukan kajian tentang perkembangan dan pola sebaran sel-sel ir-FSH pada adenohipofisa kelenjar hipofisa tikus (*Rattus norvegicus*) pada beberapa tingkat umur menggunakan teknik IHK.

MATERI DAN METODE

Pengambilan kelenjar hipofisa tikus

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah organ hipofisa dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina berumur 2 bulan, 4 bulan, 6 bulan, dan >12 bulan. Setiap tingkat umur digunakan dua ekor tikus. Sebelum dikorbankan dan dikoleksi kelenjar hipofisanya, tikus-tikus tersebut dianestesi dengan kloroform secara inhalasi. Pengambilan organ hipofisa diawali dengan pembedahan di bagian *cranium*. Organ hipofisa yang diperoleh selanjutnya dicuci dengan larutan NaCl

fisiologis 0,9 % dan dimasukkan ke dalam larutan fiksatif *paraformaldehid* 4% selama 48 jam dan dipindahkan ke dalam alkohol 70% sampai dilakukan proses dehidrasi.

Pembuatan preparat histologis kelenjar hipofisa

Prosedur pembuatan preparat histologis mengacu pada metode Kiernan (1990) yang telah dimodifikasi. Organ hipofisa yang telah difiksasi dalam larutan *para-formaldehyde* 4% dimasukkan ke dalam *tissue basket* yang telah diberi label. Sampel jaringan didehidrasi dengan alkohol konsentrasi bertingkat alkohol (80%, 90%, 95%, dan absolut) masing-masing selama 2 jam. Setelah proses dehidrasi, jaringan direndam dalam silol I, II, dan III masing-masing selama 1 jam. Tahap berikutnya adalah infiltrasi jaringan dalam parafin cair I, II, dan III pada temperatur 60°C masing-masing selama 1 jam dan dilanjutkan dengan proses penanaman jaringan di dalam parafin (*embedding*). Blok jaringan disayat dengan ketebalan 4-5 µm menggunakan mikrotom dan diletakkan pada gelas objek yang telah dilapisi dengan *poly L-lysine*.

Pewarnaan Imunohistokimia (IHK)

Metode IHK yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode tidak langsung dua tahap (*immunoperoxidase bridge methods*) (Key, 2009). Prosedur pewarnaan mengacu pada prosedur yang tercantum dalam *manual kit* IHK (Vector Lab., 2014) dengan sedikit modifikasi. Tahap awal dimulai dengan proses deparafinisasi dan rehidrasi jaringan dalam larutan silol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi, yaitu perendaman preparat di dalam larutan alkohol absolut, alkohol 95%, 90%, 80%, 70%. Preparat selanjutnya dibilas dalam air mengalir dan dilanjutkan dengan akuades.

Pewarnaan IHK diawali dengan proses *blocking endogenous peroxidase* menggunakan campuran larutan hidrogen

peroksida (H_2O_2) 3% dan metanol dengan perbandingan 1:9. Selanjutnya preparat jaringan (*slide*) dibilas dengan larutan TBS dan diinkubasi dengan *normal horse serum* 2,5 % selama 30 menit dalam inkubator suhu $37^{\circ}C$. Setelah proses inkubasi, *slide* dibilas kembali dengan TBS. Tahap berikutnya adalah inkubasi *slide* dengan antibodi primer (anti FSH) dan dimasukkan ke dalam *refrigerator* pada temperatur $4^{\circ}C$ selama 1 malam (*overnight*). *Slide* untuk kontrol negatif hanya diinkubasi dengan *normal horse serum* 2,5%. Keesokan harinya, *slide* dibilas kembali dengan TBS lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder dalam inkubator temperatur $37^{\circ}C$ selama 30 menit dan dicuci dengan TBS.

Tahapan berikutnya adalah proses visualisasi hasil pewarnaan dengan meneteskan kromogen *diaminobenzidine* (DAB) selama 3-4 menit pada jaringan sambil diamati di bawah mikroskop. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna coklat pada jaringan yang mengindikasikan adanya ikatan antigen (sel-sel ir-FSH) dan antibodi (anti FSH). Selanjutnya *slide* dibilas dengan akuades dan dilanjutkan dengan proses pewarnaan latar jaringan (*counterstain*) menggunakan larutan Mayer's hematoksilin. Tahap terakhir adalah proses dehidrasi, *clearing*, dan *mounting* dengan bahan perekat Entellan[®].

Pengamatan hasil pewarnaan

Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran lensa objektif 10 kali dan 40 kali. Pengamatan perkembangan sel-sel ir-FSH pada bagian adenohipofisa dilakukan berdasarkan adanya reaksi positif (warna coklat) pada bagian tersebut. Penghitungan jumlah sel-sel ir-FSH dilakukan pada semua bagian adenohipofisa dengan kriteria sebagai berikut: 1) tidak ditemukan sel-sel ir-FSH (-/negatif); 2) jumlah 1-5 sel (+/sedikit); 3) jumlah 6-10 sel (++)/sedang;

dan 4) jumlah >11 sel (+++/banyak). Setelah diamati, preparat hasil pewarnaan didokumentasikan menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan alat mikrofotografi.

Analisis Data

Data hasil penelitian tentang perkembangan dan sebaran sel-sel ir-FSH pada kelenjar hipofisa tikus putih dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

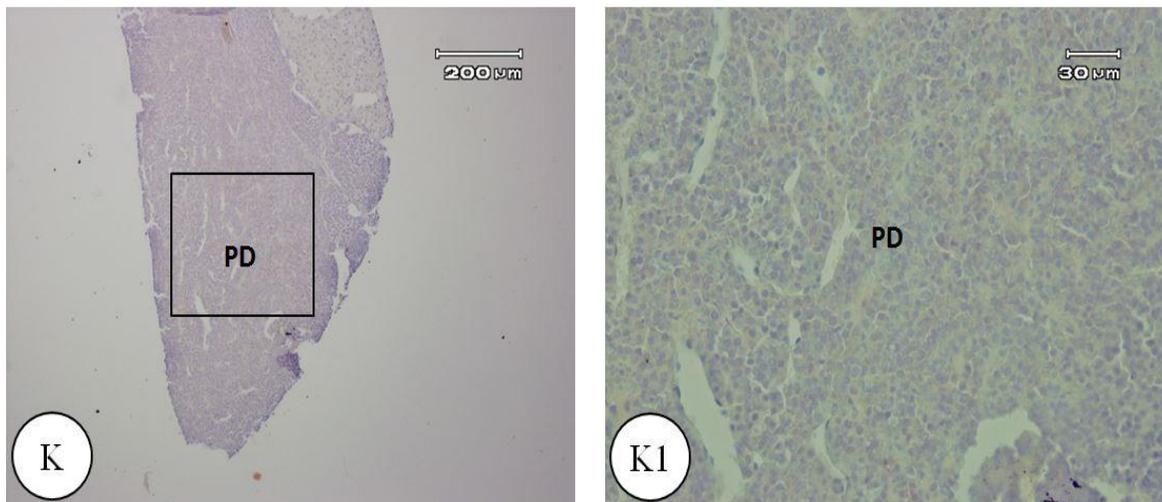
Pola sebaran dan perkembangan sel-sel ir-FSH pada kelenjar hipofisa tikus umur 2, 4, 6, dan >12 bulan disajikan pada Tabel 1. Adapun hasil pewarnaan IHK ditampilkan pada Gambar 1 dan 2. Kelenjar hipofisa tikus yang diamati pada penelitian ini terbagi atas pars tuberalis (PT), pars distalis (PD) dan pars intermedia (PI), sedangkan neurohipofisa hanya terdiri dari satu bagian yang disebut dengan pars nervosa (PN). Hasil pengamatan tersebut sesuai dengan pernyataan Hullinger dan Andrisani (2006) bahwa dari anterior ke posterior adenohipofisa dibagi menjadi tiga bagian yaitu bagian pars tuberalis (PT), pars intermedia (PI), dan pars distalis (PD). Gambaran pembagian daerah PD dan PT pada hipofisa tikus putih pada penelitian ini mirip dengan pembagian hipofisa babi (Sasaki dkk., 1992) dan anjing pemburu (Sasaki dan Nishioka, 1998).

Eksresi sel-sel ir-FSH terdeteksi positif di bagian PD dan PT adenohipofisa tikus dan tidak ditemukan pada bagian PI. Tidak ditemukannya sel-sel ir-FSH pada bagian PI menandakan bahwa bagian tersebut tidak mensintesis hormon FSH. Menurut Hullinger and Andrisani (2006) bagian PI terdiri dari sel-sel melanotrop yang mengsekresikan α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) dan β -lipotropin (β -LPH).

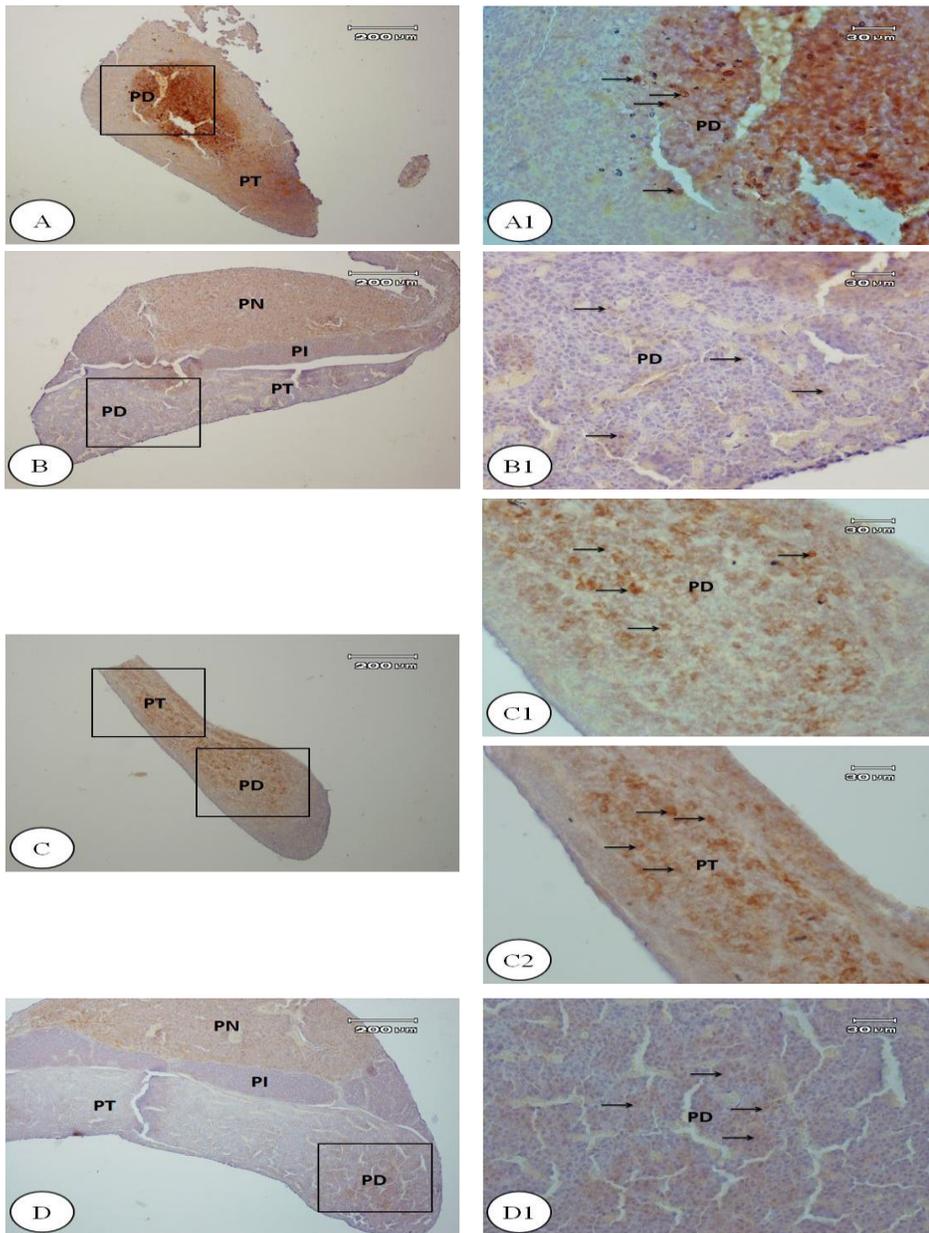
Tabel 1. Pola sebaran dan perkembangan sel-sel ir-FSH pada adenohipofisa kelenjar hipofisa tikus.

Umur Tikus (bulan)	Adenohipofisa		
	Pars Tuberalis (PT)	Pars Intermedia (PI)	Pars Distalis (PD)
2	+++	-	+
4	+	-	+++
6	+++	-	+++
>12	-	-	++

PT=pars tuberalis, PI=pars intermedia, PD= pars distalis; (-) tidak ditemukan sel- sel ir-FSH; (+) sedikit; (++) sedang; (+++) banyak.



Gambar 1. Kontrol negatif (K) kelenjar hipofisa tikus putih. Pars distalis (PD). Inset (K1): tidak terdeteksi sel-sel ir-FSH. Pewarnaan IHK. Skala garis 200 µm (K) dan 30 µm (K1)



Gambar 2. Perkembangan dan sebaran sel-sel ir-FSH pada hipofisa tikus putih. Hipofisa tikus umur 2 bulan (A), umur 4 bulan (B), umur 6 bulan (C), dan umur >12 bulan (D). Inset: Sel-sel ir-FSH terdeteksi positif (tanda panah) pada adenohipofisa tikus umur 2 bulan (A1), umur 4 bulan (B1), umur 6 bulan (C1, C2), dan umur >12 bulan (D1). PD= pars distalis, PT= pars tuberalis, PI= pars intermedia, PN= pars nervosa. Pewarnaan imunohistokimia. Skala garis 200 μm (A, B, C, D) dan 30 μm (A1, B1, C1, C2, D1).

Reaksi positif antara sel-sel FSH dan antibodi FSH yang digunakan pada penelitian ini ditemukan di bagian sitoplasma sel-sel gonadotrop (sel-sel FSH dan LH) sedangkan bagian inti sel (nukleus) tidak menunjukkan hasil positif. Hal tersebut mengindikasikan bahwa hormon FSH yang tergolong hormon glikoprotein disintesis dan disimpan di bagian sitoplasma sel bukan di inti sel. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Reimers (2003), bahwa hormon FSH merupakan hormon glikoprotein yang dihasilkan oleh sel-sel gonadotrop adenohipofisa yang mengandung reseptor GnRH pada membran sel tersebut. Sintesis gonadotropin oleh sel-sel gonadotrop hipofisa diawali dari proses transkripsi *deoxyribonukleat acid* (DNA) menjadi *messenger-ribonukleat acid* (mRNA) di dalam inti sel. Selanjutnya terjadi proses translasi mRNA menjadi prohormon dalam ribosom yang terdapat di sitoplasma sel.

Pola sebaran sel-sel ir-FSH memperlihatkan hasil yang berbeda pada setiap bagian adenohipofisa tikus (Tabel 1). Sebaran sel-sel ir-FSH dengan variasi jumlah sel tersebut menandakan adanya bagian-bagian tertentu yang menghasilkan hormon FSH dalam jumlah banyak dibandingkan bagian lain dari kelenjar hipofisa. Brown (1994), menyatakan bahwa sel-sel endokrin (FSH dan LH) pada hipofisa ditemukan pada bagian PD, sedangkan Reimers (2003); Hullinger dan Andrisani (2006) menyatakan sel-sel tersebut berada di PD dan PT kelenjar hipofisa. Menurut Inoue dan Kurosumi (1984) sebaran sel-sel ir-FSH dan ir-LH pada tikus tersebar pada berbagai tingkat umur. Hasil tersebut sedikit berbeda dengan hasil penelitian ini bahwa selain di PD, sel-sel ir-FSH juga ditemukan di PT adenohipofisa tikus.

Keberadaan sel-sel ir-FSH telah teramati pada tikus berumur 2 bulan, terutama di bagian PT dan PD (Gambar 2B

dan 2B1), sedangkan di bagian medial dari hipofisa masih jarang. Selain itu distribusi sel-sel tersebut belum merata dan intensitasnya masih agak lemah. Pada tikus yang berumur 4 bulan, pola sebaran sel ir-FSH masih menyerupai pola sebaran sel tersebut pada tikus berumur 2 bulan, namun pada umur tersebut telah ditemukan peningkatan jumlah sel terutama di bagian distal adenohipofisa dengan intensitas kuat (+++) yang berbatasan dengan bagian caudo- anterior pars intermedia (PI), sedangkan di bagian PT jumlahnya masih sedikit (Gambar 2C dan 2C1).

Pada tikus berumur 6 bulan, densitas dan intensitas pewarnaan sel-sel ir-FSH semakin meningkat dan sudah memiliki pola sebaran yang merata, baik di bagian PT maupun PD. Tikus umur 6 bulan tersebut sudah tergolong dewasa kelamin. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Larasaty (2013) bahwa rentang umur dewasa kelamin pada tikus betina adalah umur 4 – 6 bulan. Pada tikus berumur >12 bulan, ditemukan perubahan pola sebaran dimana sel-sel tersebut tersebar sedang (++) di bagian PD namun tidak ditemukan (-) di bagian PT. Berdasarkan uraian tersebut diduga sel-sel penghasil hormon FSH telah ada sebelum tikus berumur 2 bulan. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Hafez (2000) bahwa usia dewasa kelamin atau pubertas pada tikus berkisar antara 50-72 hari.

Adanya variasi pola sebaran sel ir-FSH di PT dan PD jaringan hipofisa tikus berumur 2 bulan sampai >12 bulan, menunjukkan adanya perbedaan aktivitas sel dalam menghasilkan hormon FSH pada setiap bagian adenohipofisa, dan jumlahnya mulai menurun pada tikus berumur > 12 bulan. Kondisi tersebut diduga sebagai faktor penuaan dan usia produktif tikus betina. Pada usia tua diduga sel-sel gonadotrop (sel-sel FSH) mengalami degenerasi yang jumlahnya sudah berkurang

dan cenderung berkelompok di bagian PD adenohipofisa. Hal ini berkaitan dengan pernyataan Larasaty (2013) bahwa usia hidup (*life span*) tikus hanya 2-3 tahun dengan usia produktif selama 1 tahun.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap perkembangan sel-sel ir-FSH di PD dan PT kelenjar hipofisa, menunjukkan bahwa sel tersebut telah ditemukan pada tikus umur 2 bulan. Namun demikian intensitas hasil pewarnaan pada sel-sel ir-FSH menunjukkan masih lemahnya reaksi antigen-antibodi yang terbentuk. Perkembangan sel dengan pola yang berubah-ubah di bagian PT jaringan hipofisa ditemukan pada tikus berumur 2 bulan sampai dengan 6 bulan dan mulai stabil pada tikus berumur 4 bulan sampai 6 bulan.

Dugaan lain terhadap adanya variasi pola sebaran berkaitan dengan fase estrus saat tikus dikorbankan. Berdasarkan hasil ulas vagina (*vaginal swab*), tikus umur 2 dan 4 bulan berada dalam fase estrus yang ditandai dengan ditemukannya sel-sel kornifikasi pada *slide vaginal swab*. Namun, tikus umur 6 dan >12 bulan berada pada fase proestrus akhir yang ditandai dengan ditemukannya sel-sel epitel berinti (sel-sel intermediet) dan sedikit sel-sel kornifikasi.

Menurut Busman dan Biomed (2013), hasil *vaginal swab* mencit yang berada pada fase proestrus ditemukan adanya sel-sel epitel berinti (sel-sel intermediet). Hal tersebut disebabkan oleh aktivitas estrogen yang mengakibatkan terjadinya proliferasi sel-sel epitel vagina, sedangkan pada fase estrus sel epitel didominasi oleh sel-sel epitel bertanduk yang disebut sel-sel superfisial.

KESIMPULAN

Perkembangan dan sebaran sel-sel ir-FSH ditemukan pada pars tuberalis dan pars

distalis adenohipofisa dari kelenjar hipofisa tikus yang berumur 2 bulan sampai >12 bulan dengan pola sebaran yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, R.E. 1994. **An Introduction to Neuroendocrinology**. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Busman, H. dan M. Biomed. 2013. Histologi ulas vagina dan waktu siklus estrus masa subur mencit betina setelah pemberian ekstrak rimpang rumput teki. **Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung**. 371-375.
- Dyce, K.M., W.O. Sack, and C.J.G. Wensing. 1996. **Text Book of Veterinary Anatomy**, 2nd ed. WB. Saunders, Philadelphia.
- Hafez, E.S.E.2000. Female Reproductive Organs. In **Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animal**. 3rd ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hullinger, R, I, and O. M. Andrisani. 2006. Endocrine System. In **Dellmann's textbook of Veterinary Histology**. 6th ed. Jo Ann Eurell and Brian L. Frappier. Blackwell Publishing, USA.
- Inoue, K, and K. Kurosumi. 1984. Ultrastructural immunocytochemical localization of LH and FSH in the pituitary of the untreated male rat. **Cell Tissue. Res**. 235:77-83.
- Key, M. 2009. Immunohistochemistry Staining Methode. In **Education Guide: Immunohistochemical Stain Methode**. 5th ed. George Kumar and Lars Rudbeck. Dako, California.
- Kieran, J.A. 1990. **Histological and Histochemical Methode: Theory and Praktice**. 2nd ed. Pergamon Press, New York.
- Larasaty, W. 2013. Uji Antifertilitas Ekstrak Etil Asetat Biji Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L.*) pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur *Sparague Dawley* Secara *In Vivo*. **Skripsi**. Program Studi Farmasi, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Pandolfi, M., F.L.L. Nostro, A. Shimizu, A.G. Pozzi, F.J. Mejjide. G.R. Vazques, and M.C. Maggese. 2006. Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the Cichild Fish *Cichlasoma Dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation. **Anat. Embryol**. DOI 10.1007/ s00429-006-86-9.
- Partodiharjo, S. 1980. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Penerbit Mutiara, Jakarta.
- Proudman, J.A., F. Vandesande, and L.R. Berghman. 1999. Immunohistochemical evidence that follicle stimulating hormone and luteinizing hormone residen in separate cells in the chicken pituitary. **Biology of Reproduction**. 60: 1324-1328.
- Reimers, T, J. 2003. The Pituitary Gland. in **McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction**.

- 5th ed. Mauricio H. Pineda and Micheal P. Dooley. Iowa State Press, USA.
- Rose, M.P., E.G.D. Rose, and H.B. Adam. 2000. Definition and measurement of follicle stimulating hormone. **Endocrine Reviews**. 21(1):5-22.
- Sasaki, F. and S. Nishioka. 1998. Fetal development of the pituitary gland in the beagle. **The Anatomical Record**. 251:143-151.
- Sasaki, F., Y. Ichikawa, and S. Yamauchi. 1992. Immunohistological analysis in the distribution of cells in the fetal porcine adenohypophysis. **The Anatomical Record**. 233:135-142.
- Taylor, C.R. 2006. Techniques Of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. In Dabbs D (Ed). **Diagnostic Immunohistochemistry**. 2nd ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Vector Lab. 2014. Instruction For Immunohistochemical Staining Using Goat Primary Antibodies. <http://www.vectorlabs.com>. (27 November 2015).