

EVALUASI PEWARNAAN *ALCIAN BLUE* TERHADAP SEL MAST JARINGAN IKAT DARI PREPARAT BEKU JARINGAN KULIT KAKI TIKUS

Agung Endro Nugroho*, Kazutaka maeyama**

*Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada,

**Departement of Pharmacology, School of Medicine, Ehime University

Abstrak

Alcian blue merupakan pewarna golongan phthalosianin tembaga yang digunakan dalam pewarnaan asam mukopolisakarida dan proteoglikan jaringan ikat. *Alcian blue* mengandung empat gugus tetrametilisothiuronium yang bermuatan positif (tetrakationik) yang berikatan secara elektrostatis dengan muatan negatif dari glikoaminoglikan (heparin). *Alcian blue* tidak mewarnai semua sel mast. Hal ini kemungkinan karena sisi anionik dari heparin terlindungi oleh protein, atau ikatan kompleks dalam granul sel mast sangat kuat. Safranin sering digunakan sebagai pewarna lanjutan sebagai kombinasi *alcian blue* dengan safranin untuk mewarnai *articular cartilage* proteoglikan pada pengamatan histologi.

Pewarnaan tunggal *alcian blue* terhadap sel mast jaringan ikat memberikan warna biru langit hingga hijau, sedangkan pewarnaan *alcian blue*-safranin memberikan variasi warna yaitu biru, merah dan campuran kedua warna tersebut. Sel mast akan teramati cukup jelas pada pewarnaan *toluidine blue* dibandingkan dengan pewarnaan *alcian blue*. Namun, pada pewarnaan *alcian blue* terutama *alcian blue*-safranin, jumlah sel mast jaringan ikat yang teramati lebih banyak dibandingkan pewarnaan *toluidine blue*.

Kata kunci : *alcian blue*, safranin, sel mast, glikoaminoglikan.

Abstract

Alcian blue is a copper phthalocyanin dye used for staining acid mucopolysaccharides and connective tissue proteoglycans in light microscopy. *Alcian blue* contains tetracationic groups named tetramethylisothiuronium that bond by electrostatic force with the negatively charged glycosaminoglycans (heparin) of mast cell granules. *Alcian blue* did not stain all mast cells granules because the anionic sites of heparin can be masked by protein, or the ionic bonds of the complex in mast cells

granules are so tight. Safranin is used in combination with alcian blue to counterstain articular cartilage proteoglycan in histological sections.

Alcian blue stained connective tissue mast cells blue to bluish-green. In other hand, alcian blue-safranin staining gave three colour patterns of mast cells granule staining i.e blue, red and mixed. Mast cells were stained more obviously after toluidine blue staining. Nevertheless, the number of mast cells observed in alcian blue staining especially alcian blue-safranin staining was more than the number observed in toluidine blue staining. This indicates that the affinity of alcian blue containing tetracationic group to stain connective tissue mast cells is higher than this of toluidine blue containing only one cationic group.

Key words : alcian blue, safranin, mast cells, glycosaminoglycan

Pendahuluan

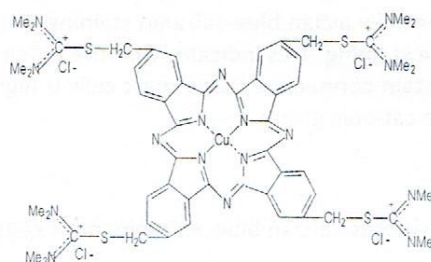
Sejarah tentang sel mast dimulai pertama kali oleh Paul Ehrlich pada tahun 1878, saat mempresentasikan disertasinya dengan judul "*Contribution to the theory and practice of histological dyes*". Dia menyebut sel mast dengan nama *Mastzellen*, yang digambarkan sebagai sel jaringan ikat dengan granul sitoplasmik yang dapat diwarnai metakromatik dengan pewarna kationik *toluidine blue* (Crivellato et al., 2003; Beaven, 2009). Sel mast mengandung histamin yang merupakan mediator utama dari reaksi alergi akut (anafilaksis). Histamin tersimpan dalam granul sel mast sebagai kompleks yang berikatan dengan proteoglikan dan protein (Foreman, 1994).

Sel mast pada hewan dibedakan menjadi dua yaitu sel mast jaringan ikat dan sel mast mukosal. Sel mast jaringan ikat idak sensitif terhadap aldehid sedangkan sel mast mukosa sensitif. Pada pewarnaan, sel mast jaringan ikat dapat diidentifikasi menggunakan *alcian blue*, safranin maupun berberin, sedangkan sel mast mukosal hanya teridentifikasi dengan *alcian blue*. Pada sel mast jaringan ikat, proteoglikan berupa heparin sedangkan pada sel mast mukosal berupa kondroitin. Sel mast jaringan ikat mengandung histamin sebanyak 10-15 pgram per sel, lebih banyak dibandingkan kandungan histamin pada sel mast mukosal, 1-2 pgram per sel. Secara morfologi, sel mast jaringan ikat berukuran lebih besar dan mengandung banyak granul dibandingkan sel mast mukosal.

Eicosanoid pada sel mast jaringan ikat adalah prostaglandin D_2 , sedangkan pada sel mast mukosal adalah prostaglandin D_2 , leukotrin C_4 dan leukotrin B_4 . Compound 48/80 dan substance P dapat menstimulasi pelepasan histamin pada sel mast jaringan ikat, sedangkan tidak berefek pada sel mast mukosal. Obat asma, kromoglikat beraksi hanya pada sel mast jaringan ikat (Foreman, 1994; Metcalfe *et al.*, 1997).

Pada manusia, terdapat beberapa versi penggolongan terhadap sel mast, diantaranya dibedakan menjadi sel mast TC+ dan T+. T dan C kepanjangan dari tryptase dan chymase. Sel mast tipe TC+ tidak tergantung pada sel T, sedangkan tipe T+ tergantung sel T. Eicosanoid sel mast tipe TC+ adalah prostaglandin D_2 sedangkan tipe T+ adalah prostglandin D_2 dan leukotrin C_4 . Sel mast tipe TC+ banyak terdistribusi di kulit sedangkan tipe T+ banyak terdistribusi di usus dan jaringan alveolar. Berdasarkan karakteristik keduanya, sel mast tipe TC+ lebih mengarah ke sel mast jaringan ikat pada tikus, sedangkan sel mast tipe T+ lebih cenderung ke sel mast mukosal pada tikus (Foreman,

1994; Metcalfe *et al.*, 1997; Heib *et al.*, 2008).



Gambar 1. Struktur kimia dari *alcian blue*, dengan copper phthalosinin sebagai kromofornya.

Identifikasi sel mast bisa dilakukan dengan beberapa pewarnaan, misalnya dengan *toluidine blue*, *alcian blue*, safranin, berberin dll. Di antara pewarna sel mast tersebut, yang sering digunakan adalah *alcian blue*. *Alcian blue* merupakan pewarna kationik phthalosianin yang digunakan dalam pewarnaan glikosaminoglikan atau asam mukopolisakarida. *Alcian blue* disebut pewarna kationik karena mempunyai muatan positif dari gugus tetrametillisothiuronium pada molekulnya dan berinteraksi secara elektrostatis dengan muatan negatif dari macromolekul. Ikatan tersebut bersifat terbalikkan (*reversible*), dapat mengalami disosiasi dengan

penambahan larutan elektrolit (Scott, 1969; Scott, 1996).

Alcian blue sangat bagus untuk pewarnaan sel mast terutama tipe jaringan ikat. Pada artikel berikut ini akan membahas salah satu percobaan pewarnaan *alcian blue* terhadap sel mast jaringan ikat pada kulit kaki tikus Wistar. Disamping itu, akan dievaluasi juga hasilnya dibandingkan dengan pewarnaan ganda menggunakan *alcian blue* kemudian dilanjutkan dengan safranin.

Metode Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus Wistar berumur 3 bulan dengan kisaran berat badan 200-250 gram. Jaringan kulit tikus diambil dan difiksasi dalam larutan paraformaldehid 4% pH 7,2 (dalam larutan dapar fosfat) selama 24 jam pada suhu 4°C. kemudian spesimen dicuci dengan menggunakan dapar fosfat 0,1 M, selanjutnya direndam dalam larutan sukrosa 20% (dalam larutan dapar fosfat 0,1 M) selama 24 jam pada suhu 4°C. Jaringan kulit yang sudah terfiksasi dibuat blok menggunakan larutan OCT compound, dan secepatnya disimpan pada suhu -

80°C. Spesimen beku dalam OCT compound kemudian diiris dengan ketebalan 4-5 μm menggunakan cryotome.

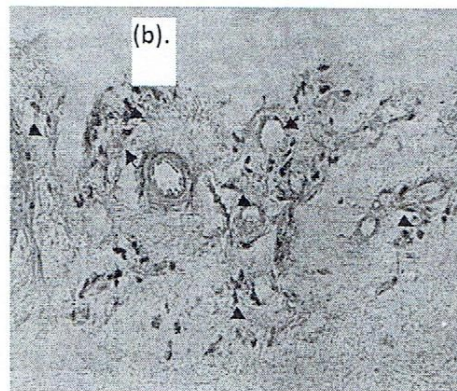
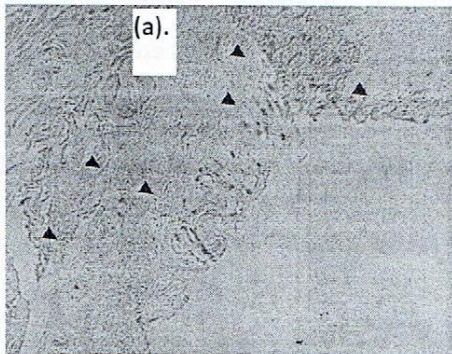
Pada identifikasi sel mast, preparat irisan jaringan yang telah dilekatkan pada object glass, direndam dalam larutan dapar fosfat-HCl selama 3 menit. Setelah itu, preparat direndam dalam larutan *alcian blue* selama 2 jam dan kemudian dicuci dengan dapar fosfat-HCl dilanjutkan dengan pencucian dalam air mengalir (*running water*). Untuk menimbulkan kontras pada preparat, dapat direndam secara cepat (5-10 detik) pada pewarna safranin. Kemudian, secara berurutan preparat direndam dalam larutan etanol 70% satu kali, dan etanol 100% selama 4 kali. Masing-masing perendaman tersebut membutuhkan waktu 20 menit. Selanjutnya preparat direndam dalam larutan xylene selama 5 kali, masing-masing 10 menit, kemudian dibuat slide preparat dengan menggunakan permount. Sel mast diamati menggunakan mikroskop, dan jumlahnya dapat ditetapkan secara semi kuantitatif.

Semua data disajikan dalam bentuk mean $\pm$ SEM. Analisa statistika

menggunakan *one-way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD). Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95%.

Hasil dan Pembahasan

Sel mast jaringan ikat yang banyak tersebar di jaringan kulit, setelah difiksasi dengan paraformaldehid 4% dan preparasi histologi menggunakan metode preparat beku (*frozen section*) dilakukan pewarnaan menggunakan *alcian blue* tanpa atau dengan pewarnaan lanjutan menggunakan safranin (Gambar 2).



Gambar 2. Pengamatan histopatologi terhadap sel mast jaringan ikat pada kulit kaki tikus dengan pewarnaan *alcian blue* (a); dan *alcian blue* dilanjutkan safranin (b). Perbesaran yang digunakan adalah 400x. Sel mast teramati sebagai daerah pada jaringan seperti yang ditunjukkan oleh anak panah (↑).

Dari gambar 2, pewarnaan tunggal menggunakan *alcian blue* terhadap sel mast jaringan ikat menghasilkan sel mast berwarna biru langit hingga hijau. Sedangkan pewarnaan *alcian blue* dilanjutkan dengan safranin menghasilkan sel mast dengan beberapa kemungkinan yaitu biru, merah dan campuran kedua warna tersebut. Safranin seringkali digunakan dalam pewarnaan sel mast sebagai counterstain, dengan tujuan membuat kontras pada preparat histologi sehingga memudahkan pengamatan

pada sel. Safranin dapat mewarnai cartilage (salah satu tipe jaringan ikat yang padat), mucin maupun sel mast itu sendiri (Jubb and Eggert, 1981; Marshall *et al.*, 1987).

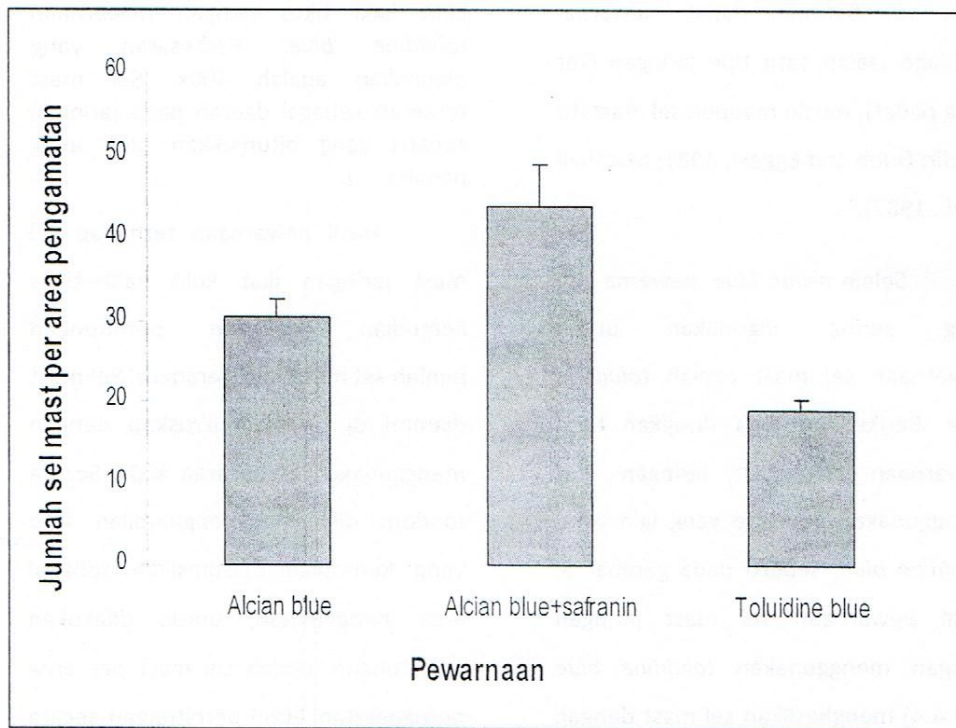
Selain *alcian blue*, pewarna lain yang sering digunakan untuk pewarnaan sel mast adalah *toluidine blue*. Berikut ini juga disajikan hasil pewarnaan sel mast jaringan ikat menggunakan pewarna yang lain yaitu *toluidine blue*, seperti pada gambar 3. Hasil pewarnaan sel mast jaringan dengan menggunakan *toluidine blue* (pH 4.4) menghasilkan sel mast dengan warna ungu violet.



Gambar 3. Pengamatan histopatologi terhadap sel mast jaringan ikat pada

kulit kaki tikus dengan pewarnaan *toluidine blue*. Perbesaran yang digunakan adalah 400x. Sel mast teramati sebagai daerah pada jaringan seperti yang ditunjukkan oleh anak panah ().

Hasil pewarnaan terhadap sel mast jaringan ikat kulit kaki tikus kemudian dilakukan perhitungan jumlah sel mast yang teramati. Sel mast diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 400x. Secara random dilakukan pengambilan foto yang kemudian diasumsikan sebagai area pengamatan, untuk dilakukan perhitungan jumlah sel mast per area pengamatan. Hasil perhitungan secara semi kuantitatif tersebut disajikan pada gambar 4. Dari hasil perhitungan semi kuantitatif, jumlah sel mast per area pengamatan setelah pewarnaan *alcian blue*, *alcian blue-safranin* dan *toluidine blue* berturut-turut sebesar $30,33 \pm 2,08$; $43,75 \pm 5,21$; dan $19,00 \pm 1,29$. Dengan analisa statistika analisis varian satu jalan dilanjutkan uji t LSD, ketiga nilai tersebut menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$).



Gambar 4. Jumlah sel mast per area pengamatan. Deteksi sel mast dilakukan dibawah pengamatan mikroskop (a X 10 objective, a X 10 eyepiece) dengan perbesaran 400x, dan area pengamatan secara random diambil gambarnya menggunakan Olympus Digital Camera.

Diskusi hasil penelitian

Pada kesempatan kali ini, pembuatan preparat irisan jaringan menggunakan metode preparat beku (*frozen section*). Pada prinsipnya metode preparat beku sama dengan metode parafin (*paraffine sections*). Apabila preparat jaringan memerlukan perlakuan yang lebih cepat maka akan lebih tepat jika melakukan pembuatan preparat jaringan beku (Gal and Cagle,

2005). Pembuatan preparat beku sering digunakan dalam kasus-kasus : 1). penanganan operasi bedah yang memerlukan penilaian histologi yang cepat, atau 2). pada penelitian yang berkaitan dengan protein tak terdenaturasi dan lipid pada jaringan yang membutuhkan penanganan cepat untuk menghindari kesalahan teknik pada percobaan tersebut. Namun demikian, pembuatan preparat beku membutuhkan ketebalan irisan yang

lebih tipis dibandingkan pada metode parafin, yaitu berkisar 5-10 μm (Cormack, 2001; Brender *et al.*, 2005).

Sel mast banyak terdistribusi dalam jaringan ikat misalnya jaringan kuit. Sel mast mengandung granula pada daerah sitoplasma, dan granula tersebut juga mengandung histamin yang berikatan secara ionik dengan proteoglikan dan protein basa. Proteoglikan lebih bersifat asam, dan terdiri dari inti protein yang berikatan dengan rantai samping glikoaminoglikan (heparin atau kondroitin) (Foreman, 1994; Metcalfe *et al.*, 1997). Gugus O-sulfat dari heparin yang berperan pada pembentukan kompleks antara heparin dengan protein basa, dan gugus negatif dari heparin yang tersisa digunakan untuk berikatan dengan histamin atau dengan pewarna kationik (Miyata and Takaya, 1980; Wang and Kovanen, 1999).

Pada pewarnaan sel mast, granula tersebut cenderung bersifat metakromatik, artinya bahwa granula tersebut jika dilakukan pewarnaan kemungkinan akan menghasilkan warna yang berbeda dengan pewarnaannya. *Alcian blue* mengandung gugus phthalosianin tembaga dan empat

gugus tetrametilisothiuronium yang bermuatan positif (tetrakationik) sehingga akan berikatan secara elektrostatis dengan muatan negatif dari glikoaminoglikan (heparin) dari granula sel mast. Phthalosianin merupakan gugus kromofor yang memberikan warna biru intensif pada *alcian blue* (Miyata and Takaya, 1980; Scott, 1996; Marshall *et al.*, 1987). Pewarnaan tunggal menggunakan *alcian blue* terhadap sel mast jaringan ikat pada kondisi asam (dapat fosfat-HCl) menghasilkan sel mast berwarna biru muda hingga hijau kebiruan (Gambar 2a). Pewarnaan *alcian blue* dilanjutkan dengan safranin terhadap sel mast jaringan ikat menghasilkan sel mast dengan warna yang agak bervariasi yaitu biru tua, merah dan campuran kedua warna tersebut. Sel mast berwarna biru kemungkinan besar mengandung granula yang terwarnai oleh *alcian blue*, sel mast warna merah mengandung granula yang terwarnai oleh safranin, sedangkan sel mast dengan warna campuran mengandung granula yang terwarnai oleh baik *alcian blue* dan safranin.

Safranin digunakan dalam pewarnaan sel mast sebagai

counterstain, dengan tujuan membuat kontras pada preparat histologi sehingga memudahkan pengamatan pada sel. Meskipun demikian, safranin juga dapat mewarnai sel mast jaringan ikat (Marshall *et al.*, 1987; Aldenborg and Enerbäck, 1988; Ho and Lin, 1997; Tran *et al.*, 2000). Seperti telah disebutkan pada bab pendahuluan bahwa sel mast jaringan ikat sensitif terhadap baik *alcian blue* dan safranin sehingga pada pewarnaan *alcian blue*-safranin akan menghasilkan tiga kemungkinan warna sel mast. Di lain pihak, pewarnaan *alcian blue*-safranin terhadap sel mast mukosal akan menghasilkan warna biru yang berasal dari *alcian blue* karena sel mast tersebut resisten terhadap safranin. Afinitas safranin terhadap heparin sel mast jaringan ikat relatif rendah dibandingkan *alcian blue*. Safranin berikatan dengan heparin hanya jika ikatan ionik dari kompleks granul sangat kuat, dan sisi anionik heparin tertutupi oleh molekul protein dalam granul sel mast sehingga *alcian blue* tidak dapat mendekat ke sisi anionik heparin. Safranin juga lebih mudah mewarnai sel mast jaringan ikat yang *mature* dibandingkan sel mast yang *immature*. Sel mast *immature* belum mensintesis

cukup protein untuk melindungi sisi anionik heparin sehingga akan terwarnai oleh *alcian blue*, sedangkan sel mast *mature* mempunyai cukup protein yang dapat melindungi sisi anionik heparin sehingga safranin dapat berikatan dengan heparin (Miyata and Takaya, 1980; Marshall *et al.*, 1987).

Dari bahasan di atas, sel mast jaringan ikat yang tidak terwarnai oleh pewarnaan tunggal *alcian blue* kemungkinan besar akan terwarnai oleh safranin pada pewarnaan *alcian blue* - safranin. Oleh karena itu, jumlah sel mast yang teramati pada pewarnaan *alcian blue* - safranin lebih banyak dibandingkan dengan saat pewarnaan tunggal *alcian blue* (gambar 4). Sebagai alternatif, pewarnaan sel mast jaringan ikat dengan menggunakan *toluidine blue* (pewarna monokationik) menghasilkan pewarnaan sel mast yang lebih jelas dan tajam. Dengan pewarna tersebut, sel mast nampak berwarna ungu violet (monokromatik). Namun, jumlah sel mast yang teramati pada pewarnaan *toluidine blue* relatif lebih sedikit dibandingkan dengan pewarnaan *alcian blue* dan *alcian blue*-safranin (Gambar 4). Hal ini kemungkinan besar terkait dengan

afinitas toluidine blue (monokationik) lebih rendah dibandingkan dengan *alcian blue* yang mempunyai 4 gugus kationik (tetrakationik).

Kesimpulan

Pewarnaan tunggal *alcian blue* terhadap sel mast jaringan ikat memberikan warna biru langit hingga hijau, sedangkan pewarnaan *alcian blue*-safranin memberikan variasi warna yaitu biru, merah dan campuran kedua warna tersebut. Sel mast akan teramati cukup jelas pada pewarnaan *toluidine blue* dibandingkan dengan pewarnaan *alcian blue*. Namun, pada pewarnaan *alcian blue* terutama *alcian blue*-safranin, jumlah sel mast jaringan ikat yang teramati lebih banyak dibandingkan pewarnaan *toluidine blue*.

Ucapan Terima Kasih

Kami ucapkan terima kasih terutama kepada Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Ehime Jepang yang telah memberikan fasilitas sebagian dari penelitian ini. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada segenap pihak yang telah membantu penelitian ini

Daftar Pustaka

- Aldenberg F, Enerbäck L., 1988, Histochemical heterogeneity of dermal mast cells in athymic and normal rats, *Histochem J.*, **20(1)**:19-28.
- Beaven MA., 2009, Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now, *Eur. J. Immunol.*, **39**:11-25.
- Brender E, Burke A, Glass RM, 2005, JAMA patient page. Frozen section biopsy, *JAMA.*, **294(24)**:3200.
- Crivellato E, Beltrami C, Mallardi F, Ribatti D., 2003, Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells, *Br J Haematol.*, **123(1)**:19-21.
- Cormack DH, 2001, *Essential Histology*, 2nd Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Toronto, Canada, p. 1-19.
- Foreman JC, 1994, Mast cells and basophil leucocytes, in Dale MM., Foreman JC, Fan TD, *Textbook of Immunopharmacology*, 3rd Edition, Blackwell Scientific Publications, London.
- Gal AA, Cagle PT, 2005, The 100-year anniversary of the description of the frozen section procedure, *JAMA.*, **294(24)**:3135-3137.
- Heib V, Becker M, Taube C, Stassen M., 2008, *Advances in the understanding of mast cell*

- function, *Br J Haematol.*, **142(5)**:683-694.
- Ho KC, Lin PS, 1997, Safranin O counter-staining enhances the counting of beta-galactosidase-expressing cells, *Biotechniques*, **23(4)**:642.
- Jubb RW, Eggert FM., 1981, Staining of demineralized cartilage. II. Quantitation of articular cartilage proteoglycan after fixation and rapid demineralization, *Histochemistry*, **73(3)**:391-396.
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA, 1997, Mast cells, *Physiol Rev.*, **77(4)** : 1033-1064.
- Miyata K, Takaya K, 1980, Effects of strong electrolytes on the iron alum--Alcian Blue--Safranin staining of mast cell granules of the rat, *Histochem J.*, **12(5)**:565-575.
- Marshall JS, Ford GP, Bell EB., 1987, Formalin sensitivity and differential staining of mast cells in human dermis, *Br J Dermatol.*, **117(1)**:29-36.
- Scott JE., 1970, Histochemistry of Alcian blue. I. Metachromasia of Alcian blue, Astrablau and other cationic phthalocyanin dyes, *Histochemie*, **21(3)**:277-285.
- Scott JE., 1996, Alcian blue. Now you see it, now you don't, *Eur J Oral Sci.*, **104(1)**:2-9.
- Tran D, Golick M, Rabinovitz H, Rivlin D, Elgart G, Nordlow B, 2000, Hematoxylin and safranin O staining of frozen sections, *Dermatol Surg.*, **26(3)**:197-199.
- Wang Y, Kovanen PT., 1999, Heparin proteoglycans released from rat serosal mast cells inhibit proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture, *Circ Res.*, **84(1)**:74-83.