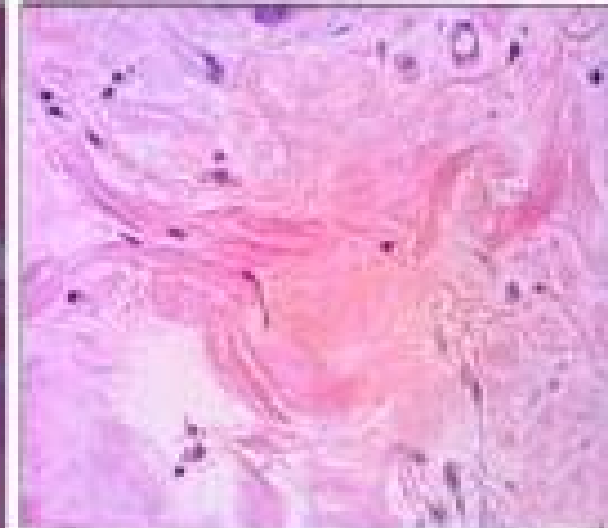




ISSN 1979-1305

VETERINARIA

Medika



Vet Med | Vol. 7 | No. 2 | Hal 100 - 104 | Surabaya, Juli 2014

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA



EDITORIAL BOARD

Susunan Dewan Redaksi

Susunan Dewan Redaksi Ketua Penyunting : Widjiati Sekretaris : Lucia Tri Suwanti Bendahara : Hani Plumeriastuti Iklan dan Langganan : Budi Setiawan Penyunting Pelaksana : Imam Mustofa Mustofa Helmi Effendi Sri Hidanah Suherni Susilowati Gracia Angelina Hendarti Penyunting Teknis : Djoko Legowo



Table of Contents

No	Title	Page
1	The Influence of Carbofuran Exposure Toward White Pulp Diameter of Spleen of Mice (Mus musculus)	100 - 105
2	Antibacterial Activity of the Supernatant of Soil Isolate Bacillus Subtilis Against Aeromonas Hydrophila and Staphylococcus Aureus (In Vitro)	106 - 113
3	The Potential of Giving Synbiotic in Different Ages of Female Broilers on Histological of Ileum	114 - 119
4	Evaluation Toluidine Blue Staining to Identify Connective Tissue Mast Cells (CTMS) in Paraffin Block Thin Skin of Dog	120 - 125



Evaluation Toluidine Blue Staining to Identify Connective Tissue Mast Cells (CTMS) in Paraffin Block Thin Skin of Dog

Evaluasi Pewarnaan Toluidine Blue untuk Identifikasi Sel Mast Jaringan Ikat dari Preparat Blok Parafin Kulit Tipis Anjing

Author :

Suryo Kuncorojakti | suryo-k@fkh.unair.ac.id
Fakultas Kedokteran Hewan

Abstract

Mast cells have an important role in allergic diseases because it contains histamine, it is the mediator of allergic reactions and stored in granules. Identification of mast cells can be done with some staining, for example by Alcian blue staining, safranin, berberine and immunohistochemical techniques. Various staining techniques is often done, in terms of a long process requiring a relatively long time, therefore it is necessary to find an alternative staining method that is easy to do, does not require a long time and cheap. This study aims to determine the effectiveness of the use of Toluidine Blue staining for identification of mast cells in the thin skin tissue of dog. Dog thin skin tissue (two years old, Male Labrador Reriever) used were obtained from the collection of tissue stored in Histology Laboratory School of Veterinary and Biomedical Science Murdoch University with a case code no. H12-944 in 10% formalin fixation fluid. Tissue processed for paraffin blocks were made and then sliced into two series, each series was repeated to 10 slides. The first series of thin skin tissue stained with routine staining techniques (Hematoxylin-Eosin Harris) according to the protocol in Bancroft and Gamble (2008), while the second series stained with Toluidine Blue staining. Results of tissue that has been stained and then observed under a microscope with 400x magnification for identification of mast cells. Data were analyzed by independent t test (5% significance) to determine whether there are differences between the two series of staining (Hematoxylin-Eosin and Toluidine Blue staining).The result of this research indicate that the use of routine staining methods (Hematoxylin-Eosin) and Toluidine Blue staining to identify mast cells in the skin thin dogs significantly ($P < 0.05$) showed differences, with an average \pm standard deviation of the number of mast cells were identified respectively is 9.85 ± 1.31 and 18.64 ± 2.19 . Toluidine Blue staining method can be used as an alternative of special staining to identify mast cells, it is easy and does not require an expensive cost.

Keyword : Metachromatic, Reaction, Histotechnique, Special, staining, Heparin, ,

Daftar Pustaka :

1. **Bancroft, J. D. And M. Gamble, (2008)**. Theory and Practice of Histological Techniques. China : Churchill Livingstone Elsevier
2. **Broome, M. And B. Villareal, (2012)**. Differential Staining of Mast Cells with Toluidine Blue. . . : Jurnal of Histotechnology 35(1): 27-30
3. **Joseph, S., S. Das, R. Chand, R. Roopa and I.M. Thomas, (2003)**. Comparison of Toluidine Blue Vs Thionin for Mast Cells in Rat Mesentery Using Carnoy,s Fixative. India : J. Anat. Soc. India 52 (2) : 166-167

Copy alamat URL di bawah ini untuk download fullpaper :

journal.unair.ac.id/filerPDF/vetmed44310cb615full.pdf

Evaluasi Pewarnaan *Toluidine Blue* untuk Identifikasi Sel Mast Jaringan Ikat dari Preparat Blok Parafin Kulit Tipis Anjing

Evaluation Toluidine Blue Staining to Identify Connective Tissue Mast Cells (CTMS) in Paraffin Block Thin Skin of Dog

Suryo Kuncorojakti

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya
Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115
Tlp. 031-5992785 fax.0315993015
e-mail: suryo-k@fkh.unair.ac.id

Abstract

Mast cells have an important role in allergic diseases because it contains histamine, it is the mediator of allergic reactions and stored in granules. Identification of mast cells can be done with some staining, for example by Alcian blue staining, safranin, berberine and immunohistochemical techniques. Various staining techniques is often done, in terms of a long process requiring a relatively long time, therefore it is necessary to find an alternative staining method that is easy to do, does not require a long time and cheap. This study aims to determine the effectiveness of the use of Toluidine Blue staining for identification of mast cells in the thin skin tissue of dog. Dog thin skin tissue (two years old, Male Labrador Reriever) used were obtained from the collection of tissue stored in *Histology Laboratory School of Veterinary and Biomedical Science Murdoch University* with a case code no. H12-944 in 10% formalin fixation fluid. Tissue processed for paraffin blocks were made and then sliced into two series, each series was repeated to 10 slides. The first series of thin skin tissue stained with routine staining techniques (Hematoxylin-Eosin Harris) according to the protocol in Bancroft and Gamble (2008), while the second series stained with Toluidine Blue staining. Results of tissue that has been stained and then observed under a microscope with 400x magnification for identification of mast cells. Data were analyzed by independent t test (5% significance) to determine whether there are differences between the two series of staining (Hematoxylin-Eosin and Toluidine Blue staining). The result of this research indicate that the use of routine staining methods (Hematoxylin-Eosin) and Toluidine Blue staining to identify mast cells in the skin thin dogs significantly ($P < 0.05$) showed differences, with an average \pm standard deviation of the number of mast cells were identified respectively is 9.85 ± 1.31 and 18.64 ± 2.19 . Toluidine Blue staining method can be used as an alternative of special staining to identify mast cells, it is easy and does not require an expensive cost.

Keywords: metachromaticreaction, histotechnique, special staining, heparin

Pendahuluan

Sel mast mempunyai peran yang sangat penting pada penyakit alergi seperti asma (Boyce, 2003), *inflammatory*

bowel disease (Chichlowski *et al.*, 2010), serta penyakit autoimun (Kawakami, 2009). Sel mast mengandung histamin yang merupakan mediator utama dari

reaksi alergi. Histamin tersimpan dalam granula 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 mukosa. Sel mast jaringan ikat tidak berikatan dengan aldehyd sedangkan sel mast mukosa lebih sensitif terhadap aldehyd. Secara morfologi sel mast jaringan ikat berukuran lebih besar dan mengandung banyak granula dibandingkan dengan sel mast mukosa (Metcalf *et al.*, 1997). Identifikasi sel mast bisa dilakukan dengan beberapa pewarnaan misalnya dengan pewarnaan *alcian blue*, safranin, berberin dan lain-lain. *Alcian blue* merupakan pewarna kationik yang sering digunakan karena mempunyai muatan positif dari gugus *tetramethylisothiuronium* pada molekulnya dan bereaksi secara elektrostatis dengan muatan negatif dari makromolekul sel, ikatan tersebut bersifat reversibel sehingga dapat mengalami disosiasi dengan penambahan larutan elektrolit (Scott, 1996). Pewarnaan dengan teknik imunohistokimia juga sering digunakan untuk mengidentifikasi sel mast pada jaringan, yaitu dengan melabel CD-117 yang merupakan marker dari sel mast. Identifikasi berdasarkan morfologi dengan hanya menggunakan pewarnaan rutin hematoksilin-eosin juga masih kerap dilakukan. Berbagai teknik pewarnaan yang disebutkan diatas masing-masing mempunyai kelebihan dan kekurangan, namun ditinjau dari lama pengerjaannya memerlukan waktu yang relatif lama karena memiliki protokol yang cukup kompleks, khusus untuk teknik imunohistokimia diperlukan ketelitian dan ketekunan pengerjaan serta memerlukan biaya yang relatif mahal, oleh karena itu perlu dicari alternatif metode pewarnaan yang mudah dilakukan, tidak memerlukan waktu lama serta murah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas

penggunaan pewarnaan *toluidine blue* untuk identifikasi sel mast jaringan pada kulit tipis anjing.

Materi dan Metode Penelitian

Jaringan kulit tipis anjing (*Labrador Retriever* jantan umur 2 tahun) yang digunakan diperoleh dari koleksi jaringan yang tersimpan di Laboratorium Histologi *School of Veterinary and Biomedical Science Murdoch University* dengan kode *case no.* H12-944 dalam cairan fiksasi formalin 10%. Untuk pemrosesan jaringan dan pembuatan blok parafin, bahan yang digunakan adalah alkohol absolut, 90%, 80%, 70%, xilol dan parafin cair. Xilol, alkohol dengan konsentrasi menurun, aquadest, pewarna alum hematoksilin, alkohol asam, larutan amonia, pewarna eosin, serta etanol digunakan untuk mewarnai jaringan dengan pewarnaan hematoksilin eosin, sedang bahan yang digunakan untuk pewarnaan *toluidine blue* adalah xilol, etanol 70%, pewarna *toluidine blue (working solution)* yang dibuat dari 5 ml larutan stok *toluidine blue* (1 gram *Toluidine Blue O* dalam 100 ml alkohol 70%) dalam 50 ml larutan NaCl 1%.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan nekropsi, *tissue cassette*, *automatic tissue prosesor*, *embedding machine*, mikrotom, penangas air, inkubator, gelas objek, gelas penutup, mikroskop dan kamera set untuk menganalisa hasil (Olympus CX21FS1 dan OptiLab Viewer).

Jaringan kulit tipis anjing yang sudah direndam dalam larutan fiksasi formalin 10% dibuat blok parafin. Blok parafin kemudian diiris menjadi dua seri dengan masing-masing seri diulang menjadi 10 slide. Seri pertama dari jaringan kulit tipis anjing diwarnai dengan teknik pewarnaan rutin (hematoksilin-eosin Harris) sesuai dengan protokol dalam Bancroft dan Gamble (2008), sedangkan

seri kedua dari jaringan kulit tipis anjing kemudian diwarnai dengan pewarnaan *toluidine blue* sesuai dengan protokol sebagai berikut; slide jaringan dideparafinasi dalam xilol kemudian dilanjutkan dengan rehidrasi dengan memasukkan slide dalam larutan alkohol dengan konsentrasi menurun (absolut, 90%, 80% dan 70%) sampai dengan ke dalam aquadest. Slide jaringan kemudian diletakan dalam rak pewarnaan, larutan *toluidine blue* diteteskan hingga menutupi semua jaringan, proses pewarnaan hanya berlangsung selama 30-40 detik. Setelah 30-40 detik slide jaringan dicuci dalam air mengalir hingga nampak jernih, kemudian dilakukan deferensiasi dalam larutan etanol 70%. Jaringan selanjutnya dilakukan dehidrasi secara cepat dengan memasukkan slide ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi meningkat dari 95% dan absolut. Langkah terakhir adalah dengan menjernihkan dalam larutan xilol, kemudian slide jaringan dikeringkan dan dilakukan *mounting* dengan entelan dan menutup dengan gelas penutup.

Hasil jaringan yang sudah diwarnai kemudian diamati untuk identifikasi sel mast. Masing-masing slide dari tiap seri pewarnaan dilakukan pengamatan oleh tiga orang pemeriksa dengan menggunakan *ten header teaching mikroskop*, hasil yang diperoleh kemudian dirata-rata. Data yang diperoleh dianalisis dengan *independent t test* (signifikansi 5%) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan diantara kedua seri perwarnaan (pewarnaan hematoksilin-eosin dengan *toluidine blue*).

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengamatan jumlah sel mast yang teridentifikasi baik dengan menggunakan pewarnaan rutin (hematoksilin-eosin) dan *toluidine blue* disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Rerata Jumlah Sel Mast yang Teridentifikasi pada Kulit Tipis Anjing

Pewarnaan	Mean \pm SD
Hematoksilin-Eosin	9.85 ^b \pm 1.31
Toluidine blue	18.64 ^a \pm 2.19

Keterangan: superskrip yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$)

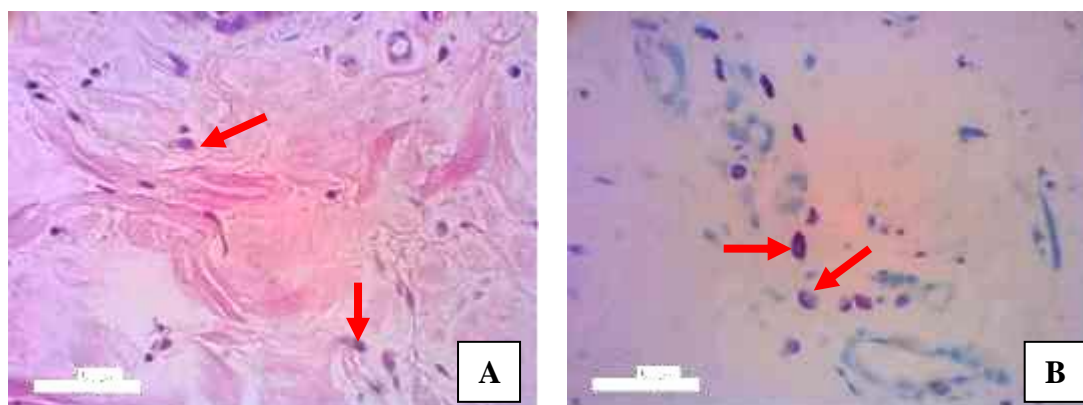
Berdasarkan Tabel 1. dapat dilihat bahwa penggunaan pewarnaan rutin (hematoksilin-eosin) dan *toluidine blue* menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$). Pada penelitian ini pemeriksaan untuk identifikasi sel mast dilakukan oleh tiga pemeriksa yang sudah mempunyai reputasi dan kualifikasi yang bagus untuk menginterpretasikan sediaan histologi. Dengan pewarnaan hematoksilin-eosin sel mast dideskripsikan sebagai sel berbentuk lonjong, tidak teratur, memiliki granula pada sitoplasmanya (Kierszenbaum, 2002) sedang dengan pewarnaan *toluidine blue* sel mast akan terwarnai ungu violet (reaksi metakromasi) dengan latar belakang warna biru (reaksi ortokromasi).

Toluidine blue atau yang juga dikenal dengan *tolonium chloride* merupakan zat warna metakromasi asidofilik yang secara selektif mewarnai komponen jaringan yang bersifat asam (sulfat, karboksilat dan radikal fosfat) (Epstein *et al.*, 1992). Prinsip dasar mekanisme pewarnaan *toluidine blue* adalah didasarkan pada reaksi metakromasi, dimana zat warna akan bereaksi dengan jaringan dan menghasilkan warna yang berbeda dengan warna asal dari zat warna tersebut. Reaksi metakromasi ini cukup penting karena hanya struktur jaringan khusus yang dapat terwarnai, reaksi ini terjadi oleh karena zat warna mampu mengabsorpsi sinar dengan panjang gelombang yang berbeda-beda tergantung dari konsentrasi komponen khusus dan lingkungan dari jaringan tanpa merubah

susunan struktur kimianya (Drupy dan Wallington, 1980).

Sel mast pertama kali diketahui bisa mengadakan reaksi metakromasi pada tahun 1877 oleh Paul Ehrlich. Komponen yang bertanggung jawab untuk terjadinya reaksi ini adalah heparin yang merupakan glikosaminoglikan didalam granula sel mast (Kumar dan Kiernan, 2010). *Toluidine blue* merupakan zat warna monokationik yang bermuatan

positif sehingga akan berikatan secara elektrostatis dengan muatan negatif dari glikosaminoglikan (heparin) dari granula sel mast, hal ini sesuai dengan pendapat Nugroho dan Maeyama (2011) yang menyatakan bahwa dengan pewarnaan *toluidine blue* sel mast akan tercatat lebih jelas dan tajam berwarna ungu violet apabila dibandingkan dengan pewarnaan rutin hematoxilin-eosin (Gambar 1).



Gambar 1. Gambaran histologi sel mast (panah merah) jaringan ikat pada kulit tipis anjing yang diwarnai dengan hematoxilin-eosin (A) dan *toluidine blue* (B); pembesaran 400x (Olympus CX21FS1, Optilab Viewer)

Berdasarkan Gambar 1. nampak bahwa perbedaan yang sangat jelas pada sel mast yang diwarnai dengan pewarnaan hematoxilin eosin (Gambar 1.A) dan pewarnaan *toluidine blue* (Gambar 1.B). Pewarnaan hematoxilin-eosin bukan merupakan pewarnaan spesifik untuk sel mast sehingga sel mast hanya terwarnai biru karena granula-granula yang terdapat dalam sitoplasma akan berikatan dengan hematoxilin tanpa adanya reaksi metakromasi (Carnoy dan Toledo, 1976). Ditinjau dari jumlah sel mast yang teridentifikasi, metode pewarnaan hematoxilin eosin memberikan hasil jumlah penghitungan sel mast yang lebih sedikit dibandingkan dengan pewarnaan *toluidine blue*, hal ini dimungkinkan terjadi karena pengaruh jumlah granula yang terdapat pada sitoplasma, semakin sedikit granula yang terdapat dalam sitoplasma sel mast,

maka warna biru dengan pewarnaan hematoxilin eosin akan sulit teridentifikasi, sebaliknya dengan pewarnaan *toluidine blue*, adanya reaksi metakromasi yang terjadi memudahkan untuk identifikasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Bancroft dan Gamble (2008) yang menyatakan bahwa substansi sulfat yang terkandung dalam glikosaminoglikan (heparin) granula sel mast merupakan substansi yang mempunyai afinitas metakromasi yang sangat tinggi, sehingga, meskipun granula yang ada dalam sitoplasma sel mast hanya sedikit namun reaksi metakromasi akan dengan mudah diamati.

Cairan fiksasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan larutan formalin 10% sesuai dengan protokol dari Bancroft and Gamble (2008). Pemilihan penggunaan formalin 10% didasarkan karena alasan larutan formalin merupakan larutan standar

yang sering digunakan untuk fiksasi jaringan pada banyak kajian histologi ataupun histopatologi. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan penggunaan cairan fiksasi larutan formalin 10% masih memberikan hasil interpretasi sel mast yang cukup bagus bila diwarnai baik dengan hematoksin eosin dan *toluidine blue*. Broome dan Villarreal (2012) melaporkan bahwa penggunaan fiksasi formalin 10% untuk identifikasi sel mast dengan pewarnaan *toluidine blue* hanya dapat digunakan pada sel mast jaringan ikat dan tidak dapat digunakan pada sel mast mukosa. Penelitian penggunaan *toluidine blue* untuk identifikasi sel mast juga dilakukan oleh Joseph *et al.*, (2003) yang menyatakan bahwa penggunaan fiksasi larutan Carnoy memberikan hasil yang memuaskan untuk identifikasi sel mast, baik sel mast jaringan ikat ataupun sel mast mukosa.

Kesimpulan

Metode pewarnaan *toluidine blue* dapat digunakan sebagai alternatif pewarnaan khusus untuk mengidentifikasi sel mast yang mudah serta tidak memerlukan biaya yang mahal.

Daftar Pustaka

- Boyce, J. 2003. The Role of Mast Cells in Asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (69):195-205
- Brancoft, J. D. And M. Gamble. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques Sixth Edition*. Churchill Livingstone Elsevier. China
- Broome, M. And B. Villarreal. 2012. Differential Staining of Mast Cells with Toluidine Blue. *Jurnal of Histotechnology* 35(1): 27-30
- Carnoy, J. D. And A.B. Toledo. 1976. *Metachromasia and Improved Histologic Detail with Toluidine Blue–Hematoxylin Eosin*. SAGE Publication
- Chichlow, M., G. Westwood, S. Abraham, and L. Hale. 2010. Role of Mast Cells in Inflammatory Bowel Disease and Inflammation Associated Colorectal Neoplasia in IL-10-Deficient Mice. *PloS ONE* (5); 1–9
- Drury, R. A. And E.A. Wallington. 1980. *Carleton's Histological Techniques*. 5th Ed. Oxford University Press
- Epstein, J.B., C. Scully and J. Spineli. 1992. Toluidine Blue and Lugol's Iodine Application in The Assessment of Oral Malignant Disease and Lesions at Risk of Malignancy. *J. Oral Pathol. Med.* 21: 160-163
- Foreman J.C. 1994. Mast Cells and Basophil Leucocytes in Dale M.M., J.C. Foreman and T.D. Fan. *Text Book of Immunopharmacology 3rd Edition*. Blackwell Scientific Publication. London
- Joseph, S., S. Das, R. Chand, R. Roopa and I.M. Thomas. 2003. Comparison of Toluidine Blue Vs Thionin for Mast Cells in Rat Mesentery Using Carnoy's Fixative. *J. Anat. Soc. India* 52 (2) : 166-167
- Kawakami, T. 2009. A Crucial Door to The Mast Cell Mystery Knocked In. *J. Immunol* 183 : 6861-6862
- Kierszenbaum, A. L. 2002. *Histology and Cell Biology – An Introduction to Pathology – Second Edition*. Mosby Elsevier. Philadelphia
- Kumar, G. L. and J.A. Kiernan. 2010. *Education Guide: Special Stains and H and E*. 2nd Ed. Dako North America. California

Metcalf, D.D., D. Baram, and Y.A. Mekori, 1997. Mast Cells. *Physiol Rev* 77 (4) : 1033-1064

Nugroho, A. E. And K. Maeyama. 2011. Evaluasi Pewarnaan Alcian Blue Terhadap Sel Mast Jaringan Ikat

dari Preparat Beku Jaringan Kulit Kaki Tikus. *Pharmacy* 6(1).

Scott, J. E. 1996. Alcian Blue. Now You See It, Now You Don't. *Eur. J. Oral Sci.* 104 (1) : 2-9