

## Identifikasi Immunohistokimiawi Desmin dan Vimentin dalam Sel Otot Skelet Ayam Kedu Cemani (*Gallus gallus domesticus*)

### Immunohistochemical Identification of Desmin and Vimentin in Skeletal Muscle Fibers of Cemani Kedu Chicken (*Gallus gallus domesticus*)

Teguh Budipitojo\*, Hevi Wihadmadyatami, Ariana, dan Dewi K. Musana

Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Jln. Fauna 2 Klebengan Yogyakarta 55281

E-mail: budipitojo@ugm.ac.id \*Penulis korespondensi

#### Abstract

The two sub units of intermediate filaments, desmin and vimentin, are found in most cells of mesenchymal origin. The content and distribution of desmin in mature skeletal muscle have been known, but for vimentin has been a subject of disagreement. The present study was aimed to clarify the presence of desmin and vimentin immunoreactivities in the skeletal muscle fibers of Kedu Cemani chickens (*Gallus gallus domesticus*) by immunohistochemistry methods of avidin-biotin-complexes. Samples of muscle tissues were obtained from pectorales mayor, biceps brachii, and biceps femoris of five adult Kedu Cemani chickens (*Gallus gallus domesticus*). Immunohistochemical staining results showed that desmin immunoreactivities were detected in Z disc of myofibers, but not vimentin. The results stimulate further exploration on characteristics of Kedu Cemani chickens, especially in terms of the distribution of other intermediate filaments and neuroendocrine cells in a variety of organs system.

**Key words:** Kedu chicken, skeletal muscle, desmin, vimentin, immunohistochemistry

#### Abstrak

Vimentin dan desmin merupakan subunit filamen intermedia dan dapat ditemukan dalam sebagian besar sel mesenkimal. Keberadaan dan distribusi desmin dalam sel otot skelet dewasa/masak telah diketahui, namun keberadaan dan distribusi vimentin pada sel yang sama masih menjadi perdebatan. Penelitian ini bertujuan mengklarifikasi keberadaan immunoreaktivitas desmin dan vimentin dalam serabut otot skelet ayam kedu cemani dengan metode immunohistokimia kompleks avidin-biotin. Penelitian dilakukan menggunakan jaringan otot yang meliputi otot *pectorales mayor*, *biceps brachii*, dan *biceps femoris* dari 5 ekor ayam kedu cemani (*Gallus gallus domesticus*). Pengamatan terhadap immunoreaktivitas desmin dan vimentin dalam serabut otot normal ayam kedu cemani dewasa dengan menggunakan antibodi monoklonal terhadap desmin dan antibodi poliklonal terhadap vimentin memperoleh hasil bahwa immunoreaktivitas desmin terdeteksi pada diskus Z serabut otot skelet, namun immunoreaktivitas vimentin tidak terdeteksi. Hasil penelitian memunculkan dorongan untuk menggali lebih lanjut ciri-ciri khusus ayam kedu cemani, terutama dalam hal distribusi filamen intermedia dan jenis neuroendokrin lainnya pada berbagai sistem organ tubuh.

**Kata kunci:** Ayam kedu, otot skelet, desmin, vimentin, immunohistokimia

Diterima: 18 Desember 2013, disetujui: 29 Januari 2014

## Pendahuluan

Vimentin dan desmin merupakan subunit dominan filamen intermedia fibroblas, dan dapat ditemukan di sebagian besar sel yang secara embrional berasal dari sel mesenkimal (Franke dkk., 1978). Keberadaan dan distribusi vimentin dalam sel otot yang telah selesai berdiferensiasi

(matang/dewasa) masih menjadi subyek perbedaan pendapat dikalangan para ilmuwan. Bennett dkk., (1979) menyatakan bahwa baik desmin maupun vimentin terdistribusi dalam bentuk filamen memanjang pada serabut-serabut otot yang masih dalam masa perkembangan atau belum masak, tetapi secara bertahap vimentin menghilang ketika serabut otot sudah

masak/dewasa. Sebaliknya, Granger dan Lazarides (1980) melaporkan bahwa kedua protein tersebut teridentifikasi di tepi diskus Z pada miofibrils yang diisolasi dari otot skelet ayam dewasa dengan mikroskop imunofluoresen. Osborn dkk., (1983) menunjukkan bahwa serabut otot skelet dewasa pada beberapa spesies mamalia tidak mengandung antibodi vimentin, sehingga mendukung pengamatan Bennett dkk., (1979).

Cemani merupakan ayam endemik Indonesia yang terdapat di wilayah kedu, temanggung, Jawa Tengah. Ayam ini memiliki ciri khusus berupa otot yang memiliki warna hitam kelam. Telah diketahui bahwa warna hitam pada otot ayam kedu terkait dengan pigmen dominan melanin yang ada di dalamnya. Penelitian ini bermaksud untuk mengklarifikasi keberadaan filamen intermedia desmin dan vimentin dalam serabut otot ayam kedu yang berwarna hitam, dikaitkan dengan masih adanya perdebatan tentang keberadaan vimentin dalam serabut otot skelet dewasa.

## Metode Penelitian

Penelitian menggunakan 5 ekor ayam cemani dewasa yang diambil dari desa kedu, kecamatan kedu, kabupaten temanggung, Jawa Tengah. Hewan dikorbankan setelah lebih dulu ditidurkan dengan kloroform. Setelah dikorbankan sesegera mungkin diambil jaringan otot yang meliputi otot *pectorales mayor*, *biceps brachii*, dan *biceps femoris* (Gambar 1A) kanan dan kiri, dimasukan dalam larutan fiksatif Bouins selama 24 jam, dan kemudian dipindah ke dalam larutan alkohol 70%. Selanjutnya potongan sampel di proses untuk pembuatan blok parafin dan dipotong dengan ketebalan 4 µm. Slide hasil pemotongan digunakan untuk pewarnaan rutin hematoksin-eosin dan pewarnaan immunohistokimia dengan metode ABC terhadap anti-Desemin dan anti-Vimentin.

Deteksi filamen intermedia desmin dan vimentin dilakukan menggunakan monoklonal *anti-porcine desmin* yang dibuat dengan tikus (# M724) dan poliklonal *anti-calf lens vimentin* yang dibuat dengan kelinci (# 15248). Pewarnaan Immunohistokimia metode kompleks avidin-biotin diawali dengan proses

deparafinisasi dan rehidrasi sampel, inkubasi dalam aquades dengan *microwave* untuk mereutral antigen selama 10 menit, kemudian diinkubasi dalam 100 ml methanol yang mengandung 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untuk menghambat aktivitas peroksidase endogen selama 10 menit. Setelah dicuci dengan PBS, kemudian secara berurutan diinkubasi dalam serum kambing normal selama 30 menit pada suhu kamar dan selanjutnya dengan serum *anti-porcine desmin* yang diencerkan 1:50 dengan *diluent bufer* dan serum *anti-calf lens vimentin* yang diencerkan 1:100 dengan *diluent bufer*, selama 12 jam pada suhu 4°C. Setelah dicuci dengan PBS, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit dalam suhu kamar dengan serum anti-IgG kelinci dan serum anti-IgG tikus yang dibiotinilasi dalam pengenceran 1:200 (*Vectastain ABC kit*, Vector, Burlingame, CA). Berikutnya, setelah dicuci lagi dengan PBS, diinkubasi selama 30 menit dengan kompleks avidin-biotin-peroksidase (*Vectastain ABC kit*) yang disiapkan sesuai dengan instruksi pabrik. Setelah dicuci dengan PBS selama 15 menit, sampel direaksikan dengan 0,02% 3,3 – diaminobenzidinetetrachloride (DAB) yang dicampur dengan 0,06% hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) selama 10–15 menit untuk mendeteksi reaksi immunogenik positif. Setelah *counterstain* dengan hematoksin, dicuci dalam aquades, didehidrasi dalam alkohol bertingkat, dijernihkan dengan xilol, ditutup *cover glass* dengan balsam Kanada (*Merck, Darmstadt, Jerman*), selanjutnya diamati di bawah mikroskop cahaya (*BX60, OLYMPUS, Tokyo, Jepang*) dan diambil gambarnya.

## Hasil dan Pembahasan

Hasil pewarnaan HE memperlihatkan struktur histologi otot skelet ayam kedu cemani pada penampang membujur dan melintang yang tidak berbeda dengan struktur histologi otot skelet pada umumnya. Serabut otot skelet ayam kedu cemani berbentuk bulat tidak beraturan dan memanjang dengan inti sel yang berjumlah banyak dan menempel ditepi serabut. Sarkoplasma, yang merupakan sitoplasma serabut otot, sebagian besar diisi oleh komponen untuk berkontraksi berupa miofibril yang terusun teratur dalam sarkomer, sebagai unit kontraksi

otot. Sarkomer mengandung sejumlah protein, termasuk alfa-aktinin dan filamen intermedia sebagai komponen penyusun diskus Z, serta aktin dan miosin yang merupakan komponen utama penyusun filamen gelap dan terang.

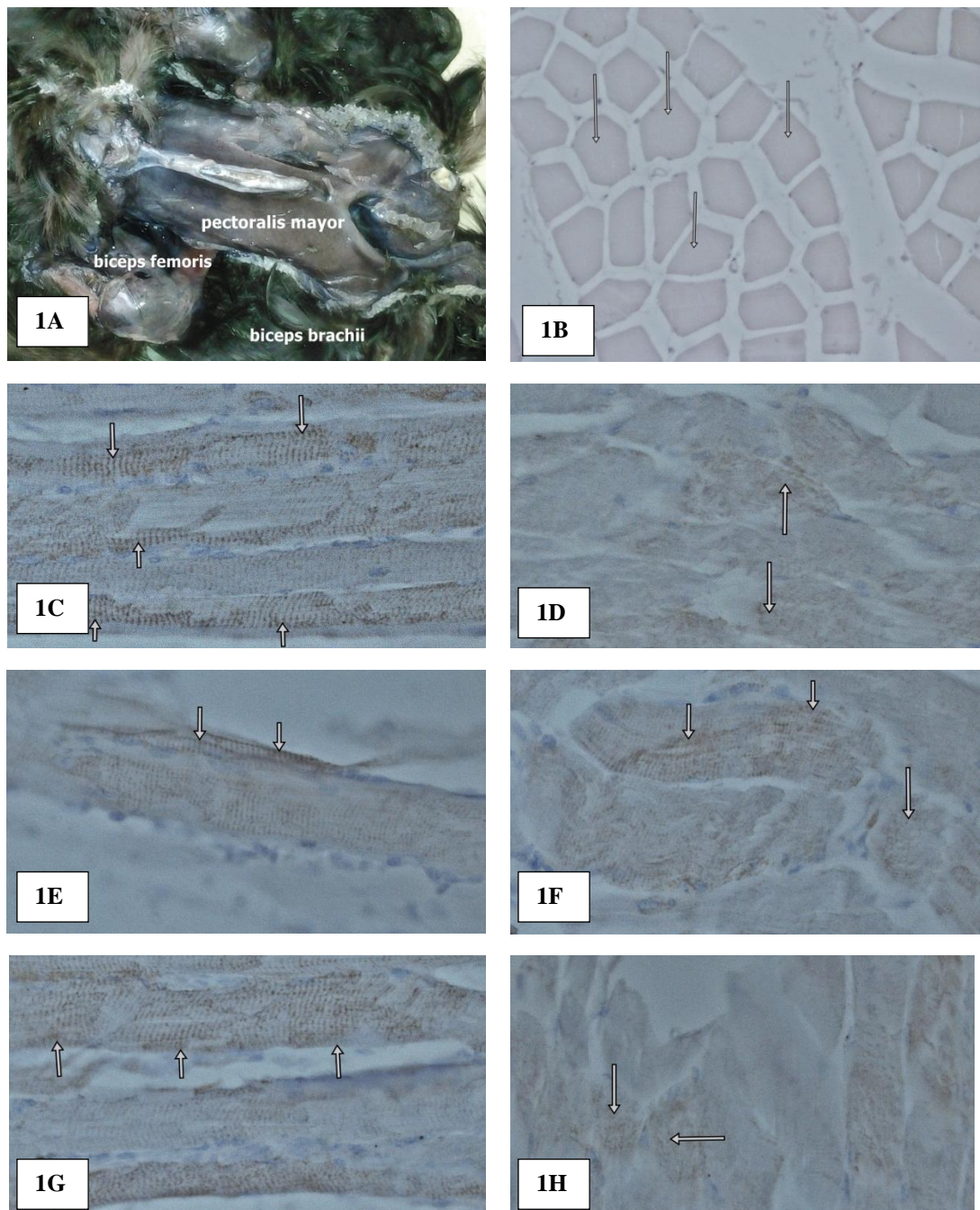
Penelitian ini telah mengklarifikasi keberadaan dan distribusi desmin serta vimentin pada otot skelet ayam cemani menggunakan monoklonal dan poliklonal antibodi dengan teknik immunohistokimia kompleks avidin-biotin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa immunoreaktivitas desmin yang kuat terdeteksi pada diskus Z serabut otot skelet ayam kedu cemani, baik pada otot *perctoralis mayor* (Gambar 1C dan 1D), *biceps brachii* (Gambar 1E dan 1F), maupun pada *biceps femoris* (Gambar 1G dan 1H). Sebaliknya, otot skelet ayam kedu cemani tidak menunjukan adanya immunoreaktivitas vimentin, baik pada penampang melintang serabut otot *perctoralis mayor* (Gambar 1B), *biceps brachii*, maupun pada *biceps femoralis*.

Penelitian ini menggunakan ayam kedu cemani dewasa normal, sehingga serabut otot skelet penyusunnya adalah otot skelet dewasa normal yang terlihat berwarna hitam secara makroskopis (Gambar 1A). Otot ini telah melewati masa perkembangan pembentukan otot dan tidak sedang mengalami proses regenerasi karena suatu sebab kerusakan tertentu. Kondisi fisiologis otot skelet yang diteliti perlu ditegaskan karena telah dilaporkan bahwa immunolokalisasi desmin dan vimentin dapat digunakan sebagai penanda yang baik pada serabut otot yang sedang mengalami regenerasi (Bornemann dan Schmalbruch, 1992). Disamping itu, desmin dan vimentin yang diekspresikan oleh serabut-serabut otot penyusun otot yang sedang terkena gangguan penyakit (*myopathy*) menunjukkan pola yang sama dengan otot pada fetus yang mengalami gangguan morfogenesis otot karena *myopathy* bawaan (Sarnat, 1991).

Telah diketahui bahwa dua jenis filamen intermedia, yaitu desmin dan vimentin, disintesis oleh serabut otot skelet (Gard dan Lazarides, 1980; Osborn dkk., 1982). Vimentin dan desmin sangat erat hubungannya, karena keduanya sama-sama merupakan filament intermedia kelas III. Selama stadium awal perkembangan aves dan mamalia, jaringan filament intermedia sel-

sel otot yang belum masak secara eksklusif disusun oleh vimentin (Bennett dkk., 1979; Gard dan Lazarides, 1980). Kemudian, mioblas dan miotubulus awal mengekspresikan desmin dan vimentin. Pada mencit dan manusia, vimentin dalam miotubulus menghilang segera setelah terjadi fusi, sedangkan pada ayam masih dilaporkan ada hingga menetas (Bennett dkk., 1979; Gard dan Lazarides, 1980). Pada saat miotubulus masak dan sarkomer dapat teridentifikasi sebagai filament gelap dan terang, desmin berlokasi di diskus Z, menghubungkan miofibril ke sarkolema dan melekatkan filament aktin ke diskus Z (Granger dan Lazarides, 1979; Tokuyasu dkk., 1985). Penelitian ini mengkonfirmasi keberadaan desmin (Gambar 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, dan 1H) dan tidak adanya imunoreaktivitas vimentin (Gambar 1B) dalam diskus Z serabut otot ayam kedu cemani dewasa, sesuai dengan gambaran uraian tersebut di atas.

Beberapa studi yang dilakukan menggunakan serabut otot yang sedang berkembang dan pada otot ayam, menunjukkan bahwa Vimentin mengelilingi setiap diskus Z miofibril dan membentuk jaringan seperti sarang lebah pada setiap diskus Z (Granger dan Lazarides, 1979). Distribusi desmin dan vimentin terdeteksi selama perkembangan serabut-serabut otot, tetapi konsentrasi vimentin secara bertahap berkurang seiring dengan serabut-serabut otot menjadi matang, dan kemudian tidak terdeteksi pada saat menetas (Tokuyasu dkk., 1984). Namun demikian, Granger dan Lazarides (1979) serta Gard dan Lazarides (1980) memberikan bukti kuat bahwa pada ayam, antigen dengan berat molekul yang identik dengan vimentin ditemukan dalam otot dewasa pada tepi diskus Z. Kemungkinan yang dapat menjelaskan terjadinya perbedaan hasil teknik immunohistokimia diantara berbagai laboratorium terkait keberadaan vimentin dalam otot skelet dewasa adalah (1) adanya protein dengan berat molekul yang sama seperti vimentin tetapi berbeda sifat imunologi dan urutan basa primernya yang ada dalam otot skelet dewas, (2) bahwa serum anti-vimentin mungkin dapat bereaksi silang dengan desmin pada derajat tertentu, dan (3) species spesifitas terkait kandungan protein dalam jaringan tertentu.



**Gambar 1.** Immunoreaktivitas anti-desmin dan anti-vimentin pada serabut otot skelet ayam kedu cemani. Gambar 1A memperlihatkan lokasi pengambilan sampel jaringan otot pada ayam cemani, yang terdiri dari musculus *pectoralis mayor*, *bicep brachii*, dan *biceps femoris*. Gambar 1B memperlihatkan tidak adanya immunoreaktivitas terhadap anti-vimentin pada serabut otot dalam musculus *pectoralis mayor* (tanda panah). Immunoreaktivitas positif terhadap desmin (ditunjukkan oleh tanda panah) pada musculus *pectoralis mayor* penampang membujur (1C) dan melintang (1D), *biceps brachii* penampang membujur (1E) dan melintang (1F), dan *biceps femoris* penampang membujur (1G) dan melintang (1H).

## Simpulan dan Saran

### Simpulan

Penelitian ini mengkonfirmasi adanya desmin dan tidak adanya vimentin dalam serabut otot skelet normal ayam kedu cemani dewasa (*Gallus gallus domesticus*). Hasil penelitian memperkuat teori bahwa pada ayam dewasa, serabut otot skelet normal mengandung filamen intermedia desmin, namun tidak mengandung vimentin.

### Saran

Perlu diidentifikasi keberadaan filamen intermedia lainnya (sitokeratin) dan mikrotubulus (tubulin) dalam sel otot skelet ayam kedu cemani dewasa, sehingga dapat dipastikan komponen kontraktile apa saja yang berperan dalam proses kontraksinya.

## Daftar Pustaka

- Bennett, G.S., Fellini S.A., Toyama, Y. dan Holtzer, H. 1979. Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *Journal Cell Biol.*, 82: 577–584.
- Bornemann, A. dan Schmalbruch, H. 1992. Desmin and vimentin in regenerating muscles. *Muscle Nerve*, 15: 14–20.
- Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. dan Weber, K. 1978. Different intermediate-size filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75: 5034
- Gard, D.L. dan Lazarides, E. 1980. The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell*, 19: 263.
- Granger, B.L. dan Lazarides, E. 1979. Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell*, 18: 1053–1063.
- Osborn, M., Geisler, N., Shaw, G., Sharp, G. dan Weber, K. 1982. Intermediate filaments. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.*, 46: 413–429.
- Sarnat, H.B. 1991. Vimentin/desmin immunoreactivity of myofibres in developmental myopathies. *Acta Paediatr Jpn.*, 33: 238–246.
- Tokuyasu, K.T., Maher, P.A. dan Singer, S.J. 1984. Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo: immunofluorescence study. *Journal Cell Biol.*, 98: 1961–1972.
- Tokuyasu, K.T., Maher, P.A. dan Singer, S.J. 1985. Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo: immunoelectron microscopic study. *Journal Cell Biol.*, 100: 1157–1166.