

**DISTRIBUSI SARAF PADA EPITEL OLFAKTORIUS KALONG KAPAUK
(*Pteropus vampyrus*) DAN LASIWEN DEIGNAN (*Myotis horsfieldii*)
BERDASARKAN EKSPRESI NEURON-SPECIFIC
ENOLASE (NSE)**

THE NEURON DISTRIBUTION IN THE OLFACTORY EPITHELIUM OF THE COMMON
FLYING-FOX (*Pteropus vampyrus*) AND THE DEIGNAN BAT (*Myotis horsfieldii*)
BASED ON NEURON-SPECIFIC ENOLASE (NSE) EXPRESSION

Yosephine Nicolory Paula¹, Soehartini Jatman², Ariana³, Tri Wahyu Pangestiningih⁴, Teguh Budipitojo⁵

^{1,2,3,4,5} Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Kelelawar merupakan salah satu keanekaragaman dan kekayaan satwa di Indonesia. Adanya keanekaragaman jenis makanan maupun habitat kelelawar menyebabkan terjadinya perbedaan dalam mencari dan cara makan dari berbagai jenis kelelawar. Keterkaitan antara struktur indra penciuman dengan jenis dan cara makan kelelawar sangat menarik untuk dieksplorasi, karena sampai saat ini sangat sedikit data mengenai hal tersebut. Penelitian ini menggunakan 3 ekor kalong betina dewasa dan 3 ekor lasiwen betina dewasa, sebagai sampel. Hidung sebagai sampel, kemudian dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan imunohistokimia terhadap ekspresi NSE. Hasil pewarnaan imunohistokimia menunjukkan bahwa imunoreaktivitas NSE pada lasiwen teridentifikasi dalam epitel olfaktorius di kedua sisi septum nasalis, konka dorsalis dan beberapa fila olfaktoria. Pada kalong tidak teridentifikasi adanya imunoreaktivitas NSE.

Kata kunci: saraf, epitel olfaktorius, kalong, lasiwen, *Neuron-Specific Enolase* (NSE)

ABSTRACT

Bat is one kind of Indonesian biodiversity. Various kind of food and the environment affect the technic to obtain food. Since there is lack information about the relationship between the structure of the olfactory organ and feeding behavior of bat, the study will explore some data about this interested matter. The samples of nose were taken from 3 mature female deignan bat and 3 mature female common flying-fox. It made for histological slides and stained with ABC method of immunohistochemistry for Neuron-Specific Enolase (NSE) expression. The results showed that the NSE immunoreactivity in the deignan bats were localized in the both side of the nasal septum, the dorsal chonca and the some fila olfaktoria, but it did not show in the common flying-fox.

Key words: neuron, olfactory epithelium, common flying-fox, deignan bat, Neuron-Specific Enolase (NSE)

PENDAHULUAN

Kelelawar merupakan salah satu keanekaragaman dan kekayaan satwa di Indonesia. Penelitian dan tulisan ilmiah mengenai spesies ini terutama yang berkaitan dengan struktur anatomi berbagai macam organ, baik secara makroskopis maupun mikroskopis relatif sangat sulit ditemukan.

Adanya keanekaragaman jenis makanan maupun habitat kelelawar menyebabkan terjadinya perbedaan dalam mencari dan cara makan di antara berbagai jenis kelelawar. Kelelawar pemakan serangga menggunakan ekolongasi untuk mendeteksi keberadaan mangsanya, sedangkan kelelawar pemakan buah menggunakan indra penciuman untuk menemukan buah yang masak. Kalong kapauk (*Pteropus vampyrus*) adalah kelelawar pemakan buah dan lasiwen deignan (*Myotis horsfieldii*) adalah kelelawar pemakan serangga.

Kelelawar atau *Chiroptera* merupakan ordo terbesar kedua setelah rodensia dalam kelas mammalia. *Chiroptera* mencakup 18 famili atau sekitar 192 genus dan 977 spesies kelelawar (Suyanto, 2001). Ordo *Chiroptera* dibagi menjadi dua subordo megachiroptera atau kelelawar besar yang memakan nektar, polen atau buah yang meliputi 170 spesies. Subordo microchiroptera yang memakan serangga meliputi sekitar 760 spesies (Cleave, 1999). Pembagian ini dilakukan berdasarkan jenis makanannya sehingga megachiroptera lebih dikenal sebagai kelelawar buah dan microchiroptera lebih dikenal sebagai kelelawar insektivora (Eisentraut, 1975).

Untuk kalong, indra yang paling utama digunakan untuk navigasi adalah daya penciumannya yang tajam (Anonim, 2005). Kelelawar pemakan serangga menggunakan ekolongasi yaitu dengan cara mengeluarkan suara berfrekuensi sangat tinggi yang diproduksi laring, dan dipantulkan kembali oleh benda-benda disekitarnya dan akhirnya diterima telinga kelelawar untuk memandu gerakannya (Eisentraut, 1975). Berdasarkan jaringan mukosanya, permukaan rongga hidung dapat dibedakan menjadi dua macam yaitu area

olfaktori dan non olfaktori atau area respirasi (Banks, 1981). Secara mikroskopik, mukosa olfaktorius dapat dikenali atau dibedakan dari daerah non olfaktorius karena epitelnya lebih tebal dan banyak kelenjar terorientasi vertikal, serta banyak berkas serabut saraf tanpa mielin dalam lamina propria (Plopper dan Adams, 1987).

Menurut Vinores *et al.* (1984) yang disitasi oleh Iwanaga *et al.* (1989) *Neuron Specific Enolase* (NSE) adalah protein yang dapat larut, terdistribusi secara merata dalam sitoplasma (perikarion, akson dan dendrit) sel saraf, akan tetapi tidak terdapat dalam nukleus. Imunoreaktivitas NSE terdistribusi dalam semua tipe sel saraf baik sistem saraf pusat maupun tepi (Marangos dan Schmechel, 1980). Imunoreaktivitas positif NSE berlokasi pada perikarion, dendrit dan axon (Yoshie *et al.*, 1988). Imunoreaktivitas NSE dari sel olfaktorius ditemukan pertama kali pada fetus manusia dan kemudian pada manusia dewasa serta marmut (Yamagishi *et al.*, 1987). Deteksi NSE secara imunohistokimia ditemukan pada paraneuron sensoris termasuk sel olfaktori, sel gustatori dan badan karotid dari sel *chief* (Kondo *et al.*, 1982 ; Fujita *et al.*, 1983 ; Takahashi *et al.*, 1984). Laporan mengenai data struktur mikroskopik sistim saraf di epitelium olfaktorius tunika mukosa hidung kelelawar masih sangat sedikit.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan distribusi saraf pada epitel olfaktorius tunika mukosa hidung kelelawar pemakan buah dan kelelawar pemakan serangga secara mikroskopis. Penelitian ini akan menghasilkan data tentang peta distribusi sistim saraf pada epitelium olfaktorius tunika mukosa hidung kalong dan lasiwen deignan berdasarkan ekspresi NSE sebagai marker. Hasil penelitian ini akan dapat digunakan sebagai pembandingan penelitian lanjutan tentang saraf pada spesies lainnya.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan dengan menggunakan 3 ekor kalong dan 3 ekor lasiwen betina umur dewasa sebagai sampel. Pada

keadaan terbius kalong dan lasiwen dikorbankan, selanjutnya kepala kelelawar dipisahkan dari tubuhnya, dan rahang bawahnya dipisahkan dari kepala. Pada kalong, pengambilan organ nasal dilakukan dengan memotong moncong di antara kedua mata, sedangkan untuk lasiwen otak dan rahang bawahnya dihilangkan. Hidung yang akan diproses untuk pembuatan preparat histologi, terlebih dahulu dimasukkan dalam larutan dekalsifikasi *acid formic-sodium acetat* sampai tulang menjadi lunak, baru kemudian disimpan dalam alkohol 70% untuk penggunaan jangka panjang.

Moncong kalong dipotong menjadi 6 bagian secara transversal dan moncong lasiwen dipotong menjadi 2 bagian secara transversal. Masing-masing potongan didehidrasi dalam serial alkohol, dijernihkan dalam xilol dan diblok dalam parafin. Blok parafin kemudian disayat secara serial dengan ketebalan 4 μm menggunakan *rotary microtome Yamato Kohki*. Pewarnaan yang dilakukan adalah pewarnaan imunohistokimia terhadap ekspresi NSE. Sampel terlebih dahulu dideparafinisasi dengan menggunakan xilol 3 kali masing-masing selama 20 menit dan rehidrasi dengan menggunakan etanol konsentrasi menurun dari 100%, 90%, 80%, 70% masing-masing selama 20 menit, kemudian sampel dicuci dengan *phosphate-buffered saline* (PBS), diinkubasi dengan 0,3% H_2O_2 dalam metanol selama 15 menit untuk menghambat aktivitas *endogen peroksidase*. Setelah dicuci dengan PBS, selanjutnya diinkubasi pada 4°C dengan antibodi primer yaitu *monoclonal rabbit anti-neuron specific enolase* (1:1000 Cobas[®], Core NSE, Roche, Germany) selama 12 jam, dan dilanjutkan dengan inkubasi dalam *biotyniled anti-rabbit IgG raised in goat* (1:200, BA-1,000, Vektor Laboratories Inc., Burlingame, U.S.A) sebagai antibodi sekunder selama 45 menit pada suhu kamar. Setelah dicuci PBS, sampel kemudian diinkubasi dengan larutan ABC (Vectastin Elite[®] ABC Kit, PK-6100, Vektor Laboratories Inc), selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk mencegah pewarnaan yang tidak spesifik, sampel terlebih dahulu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar

dengan serum normal kambing sebelum diinkubasi dengan antibodi pertama. Jaringan yang imunoreaktif terhadap NSE divisualisasi dengan menggunakan *Tris-HCl buffer* (pH 7,4) yang mengandung 0,02% 3,3 *Diaminobenzidine tetrahydrochloride* dan 0,03% H_2O_2 .

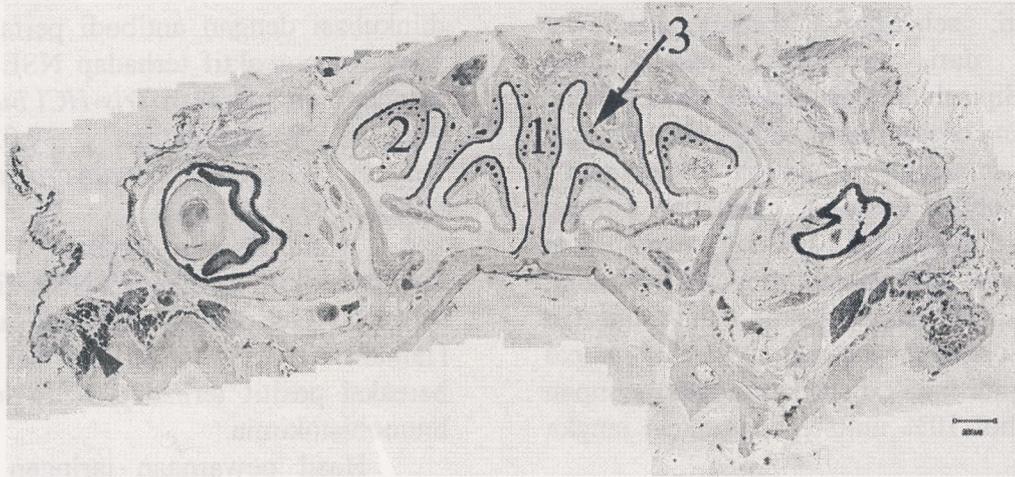
Kontrol positif pewarnaan imunohistokimia terhadap NSE digunakan sel-sel otot skelet pada organ yang sama. Menurut Haimoto *et al.* (1985) sel-sel otot skelet bereaksi positif terhadap NSE dengan teknik imunohistokimia.

Hasil pewarnaan jaringan diamati di bawah mikroskop cahaya Olympus DX15 dan diambil gambarnya dengan kamera digital Olympus DP 12-2. Gambar jaringan yang dihasilkan diolah menggunakan perangkat lunak *Adobe Photoshop 7.0*. Jaringan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pewarnaan imunohistokimia menunjukkan keberadaan NSE dalam sel saraf di epitel olfaktorius pada kedua sisi septum nasalis, konka dorsalis, dan beberapa fila olfaktoria (Gambar 1 dan 2) lasiwen, namun tidak teridentifikasi pada kalong (Gambar 3).

Keberadaan NSE pada sel saraf di epitelium olfaktorius lasiwen sejalan dengan pendapat Takahashi *et al.* (1984) yang menyatakan bahwa deteksi NSE pada paraneuron sensoris, dalam hal ini sel olfaktori, dapat dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia. Ditambahkan oleh Yoshi *et al.* (1988) bahwa imunoreaktivitas NSE dapat teridentifikasi pada perikarion, dendrit, dan akson. Sebaliknya, pada kalong tidak teridentifikasi keberadaan NSE dalam sel saraf di epitel olfaktoriusnya. Perbedaan ini diduga terkait dengan perbedaan tipe sel saraf di epitel olfaktorius lasiwen dan kalong. Meskipun menurut Marangos dan Schmechel (1980) imunoreaktivitas NSE dapat terdeteksi pada semua tipe sel saraf, baik pada sistem saraf pusat maupun saraf tepi, tetapi hasil penelitian ini memberikan bukti bahwa tidak semua tipe sel saraf dapat terdeteksi oleh NSE. Diduga tipe

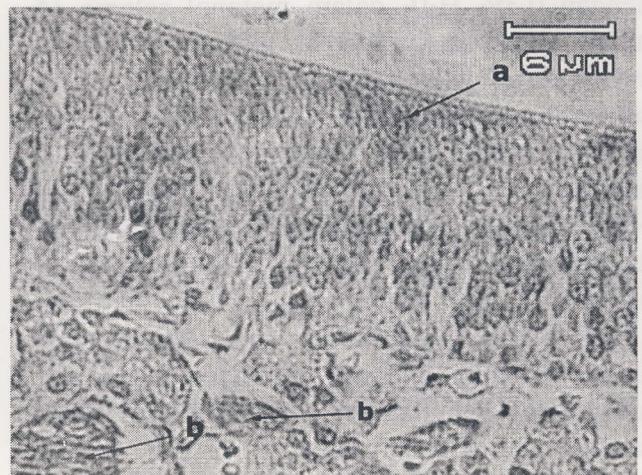


Gambar 1. Distribusi imunoreaktivitas NSE pada lasiwen. Imunoreaktivitas NSE ditandai dengan garis tebal di kedua sisi septum nasalis (1) dan konka dorsalis (2). Imunoreaktivitas NSE ditandai dengan titik-titik pada beberapa fila olfaktorika (3). Tanda kepala panah menunjukkan otot skelet yang imunoreaktif terhadap NSE sebagai kontrol positif.

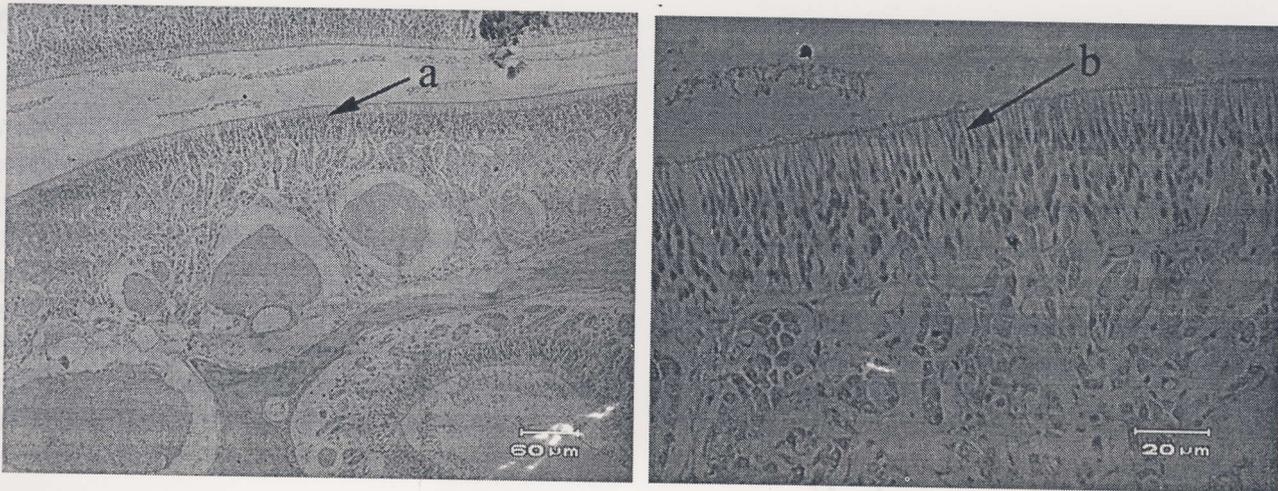
sel saraf olfaktorius kalong yang mengandalkan penciuman untuk mencari makanannya berkembang dan terdistribusi secara lebih luas (Paula dan Budipitojo, 2007), berbeda dengan tipe sel saraf olfaktorius lasiwen yang tidak mengandalkan penciuman untuk mencari makan sehingga perkembangan dan distribusi sel olfaktoriusnya terbatas. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui

perbedaan tipe sel saraf olfaktorius pada kedua spesies tersebut.

Hasil penelitian ini juga membuka kemungkinan penggunaan NSE untuk mendeteksi tingkat ketajaman membau pada hewan-hewan yang imunoreaktif positif terhadap NSE. Menurut Marangos dan Schmechel (1980), meskipun imunoreaktivitas NSE dapat terdeteksi pada semua tipe sel saraf,



Gambar 2. Imunoreaktivitas NSE di epitel olfaktorius pada daerah septum nasalis lasiwen yaitu pada fila olfaktorika (tanda kepala panah) dan permukaan epitel (tanda panah). Imunoreaktivitas NSE di epitel olfaktorius pada daerah septum nasalis lasiwen yaitu pada serabut saraf (a) dan fila olfaktorika (b).



Gambar 3. Tidak teridentifikasi adanya imunoreaktivitas NSE di epitel olfaktorius kalong (a) dan (b).

baik pada sistem saraf pusat maupun sistem saraf tepi, tetapi level imunoreaktivitasnya sesuai dengan tingkat diferensiasinya. Pada masa embrional, tingkat intensitas dari imunoreaktivitas NSE dalam saraf-saraf otak terdeteksi ringan, namun kemudian mengalami peningkatan seiring dengan pertumbuhan hewan. Dalam penelitian ini, digunakan lasiwen dewasa, dan ditemukan imunoreaktivitas NSE pada sel-sel saraf olfaktorius di kedua sisi septum nasalis, konka dorsalis, dan beberapa fila olfaktoria dengan intensitas kuat. Pada hewan lebih muda dengan tingkat diferensiasi saraf olfaktoriusnya belum sempurna, diduga akan ditemukan intensitas imunoreaktif yang lebih rendah. Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, sel saraf olfaktorius yang memiliki imunoreaktivitas NSE positif dengan intensitas kuat menunjukkan daya penciuman yang lebih tinggi dibanding yang imunoreaktivitas NSE positif dengan intensitas lemah.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekspresi NSE pada epitel olfaktorius lasiwen terlokalisasi dalam sel-sel saraf di kedua sisi septum nasalis, konka dorsalis, dan beberapa fila olfaktoria, sedangkan pada epitel olfaktorius kalong ekspresi NSE tidak teridentifikasi. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan

adanya perbedaan tipe sel saraf olfaktorius pada lasiwen dan kalong.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan dana hibah penelitian Fakultas melalui Anggaran Dana Masyarakat, dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian, Nomor: 1280A/J.01.1.22/LK/2006. Ucapan terimakasih disampaikan kepada Saudari Margareta Anik Diyan Andriyani dan Saudara Fajar Shodiq Permata yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2005. Bats. <http://www.serebella.com/encyclopedia/article-Bat.html>. Diakses tanggal 27 Mei 2005.
- Banks, W.J. 1981. *Applied Veterinary Histology*. William and Wilkins, Baltimore. p. 390.
- Cleave, A. 1999. *Bats: a Portrait of the Animal World*. Todtri Book Publishers, New York. p. 6.

- Eisentraut, M. 1975. The Bats. In: *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. 1997 Volume 11: Mammals III, Grzimek, B. (ed.), Van Nostrand Reinhold Company, New York. pp. 93, 111.
- Fujita, T., Iwanaga, T. and Nakajima, T. 1983. Immunohistochemical detection of nervous system-specific proteins in normal & neoplastic paraneurons in the gut and pancreas. In: *Gut Peptides and Ulcer*. A. Miyoshi (ed.) Biomedical Research Foundation Tokyo. pp. 81-88.
- Haimoto, H., Takahashi, Y., Koshikawa, T., Nagura, H. and Kato, K. 1985. Immunohistochemical localization of γ -enolase in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues. *Lab. Invest.* 52: 257.
- Iwanaga T, Takahashi Y. and Fujita, T. 1989. Immunohistochemistry of neuron specific and glia specific proteins. *Arch. Histol. Cytol.* 52 : 13-24.
- Kondo, H.T., Iwanaga, T. and Nakajima, T. 1982. Immunocytochemical study on the localization of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body of rats. *Cell Tiss. Res.* 227: 291-295.
- Marangos, P.J., Schmechel, P., Parnas, A.M. and Goodwin, F.K. 1980. Developmental profile of neuron-specific enolase (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. *Brain Res.* 190: 185-193.
- Marangos, P.J. and Schmechel, D. 1980. The neurobiology of the brain enolases. In: *Essays in neurochemistry and neuropharmacology*. Vol. 4. Youdim, M.B.H., Lovenberg, W., Sharman, D.F. and Lagnado, J.R. (eds.). John Wiley and Sons, New York. pp. 211-247.
- Paula, Y.N. dan Budipitojo, T. 2007. *Peta Distribusi Syaraf Pada Epitelium Olfaktorius Tunika Mukosa Hidung Kalong Kapauk (Pteropus vampyrus) dan Lasiwen deignan (Myotis horsfieldii) Berdasarkan Ekspresi Neuron Specific Enolase (NSE)*. Laporan Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.
- Plopper, C.G. dan Adams, D.R. 1987. Sistem Pernapasan dalam Dellmann, H.D dan Brown. Dalam: Buku Teks *Histologi Veteriner Jilid 2*. Diterjemahkan oleh: Hartono, edisi ketiga. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta. p. 289.
- Suyanto, A. 2001. *Kelelawar di Indonesia*. Puslitbang Biologi LIPI. PT. Ghalia Indonesia. p. 1.
- Takahashi, S., Iwanaga, T., Takahashi, Y., Nakano, Y. and Fujita, T. 1984. Neuron-specific enolase, neurofilament protein and S-100 protein in the olfactory mucosa of human fetuses. An Immunohistochemical Study. *Cell. Tiss. Res.* 238: 231-234.
- Yamagishi, M., Hasegawa, S., Takahashi, S., Nakano, Y. and Iwanaga, T., 1987. Immunohistochemical method for the diagnosis of olfactory disturbance. *Acta otolaryngol. (Stockh)* 103 : 145-150.
- Yoshie, S., Wakasugi, C., Teraki, Y., Iwanaga, T. and Fujita, T. 1988. Immunocytochemical localizations of neuron-specific protein in the taste bud of the guinea pig. *Anch. Histol. Cytol.* 51: 379-384.