

## Deteksi Ekspresi Protein *Wnt4* pada Uterus Mencit (*Mus musculus L.*) dengan Metode *Immunohistochemistry*

Agung Janika Sitasiwi

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Email: agssiwi@yahoo.co.id

### ABSTRACT

Study to detect the expression of Wnt4 protein in the uterus of Swiss Webster mice with immunohistochemistry method has been done. Laboratory animals that were used are adult Swiss Webster mice weighing 25-30 grams. Pregnancy is determined by the presence of vaginal plug in female mice after breeding. Uterus was isolated on seventh days of gestation. The detection of protein expression was done by paraffin method using mouse anti-Wnt4 (Santa Cruz Biotechnology) as primary antibody with 1:250 in dilution. Visualization of Wnt4 protein was done by DAB as chromogen. The positive reaction to the primary antibody showed in perimetrium, myometrium, and endometrium in uterine tissue. The positive reaction to the primary antibody were expressed on blood vessels also. It could be concluded that the Wnt4 protein as signal molecule regulates the embryo development by circulation system. This study offer as source to study Wnt4 protein expression pattern as molecular marker in early development of organism.

*Keywords: Wnt4, immunohistochemistry, Mus musculus*

### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian dengan tujuan mendeteksi ekspresi protein *Wnt4* pada uterus mencit dengan metode *immunohistochemistry*. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*M.musculus L*) strain Swiss Webster dewasa, virgin dengan rerata bobot badan 25-30 gram. Hari pertama kebuntingan ditentukan dengan melihat *vaginal plug* setelah mencit dikawinkan. Uterus diisolasi pada usia kebuntingan 7 hari. Deteksi ekspresi dilakukan setelah dibuat sediaan histologis uterus dengan metode parafin menggunakan antibodi primer *Mouse Anti-Wnt4* (Santa Cruz Biotechnology) dengan pengenceran 1/250. Visualisasi ekspresi protein dilakukan dengan chromogen *diaminobenzidin* (DAB). Hasil penelitian menunjukkan protein *Wnt4* terekspresi positif pada semua lapisan penyusun uterus (perimetrium, miometrium dan endometrium). Ekspresi protein *Wnt4* juga terjadi pada pembuluh darah. Dapat disimpulkan bahwa protein *Wnt4* sebagai sinyal meregulasi perkembangan embrio secara serentak melalui sistem sirkulasi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai rujukan dalam mempelajari pola ekspresi protein *Wnt4* sebagai penanda molekuler dalam perkembangan awal individu.

*Kata kunci: Wnt4, immunohistochemistry, Mus musculus*

### PENDAHULUAN

Gen *wingless-type MMTV integration site family member 4 (wnt4)* merupakan salah satu gen yang meregulasi proses implantasi embrio pada mencit (Hayashi *et al.*, 2009). Mohamed *et al.* (2004) menyatakan bahwa gen *wnt* terekspresi

pada jaringan uterus dan beraksi pada beberapa tahap perkembangan awal embrio. Protein *Wnt* melalui sistem sinyal selular berperan dalam proses perkembangan fundamental yaitu determinasi nasib sel, proliferasi, polaritas, dan kematian sel selama perkembangan embrio (He *et al.*, 1997; Paria *et al.*, 2002; Miller, 2002; Saito-

Diaz, 2013). Sonderegger *et al.* (2010) menyatakan bahwa sistem sinyal yang diregulasi oleh protein *Wnt* berperan dalam perkembangan embrionik, dalam aktivasi blastokista, implantasi dan desidualisasi. McAuley *et al.* (2013) menunjukkan bahwa sistem sinyal *Wnt* terjadi sepanjang perkembangan embrio sehingga membuktikan bahwa sistem sinyal *Wnt* memiliki sejumlah peran dalam perkembangan embrio.

Selama proses implantasi embrio pada mencit dapat dideteksi ekspresi beberapa macam gen *wnt*, yaitu gen *wnt4*, *wnt5*, *wnt7a*, *wnt7b*, *wnt11*, serta *wnt16*. Hayashi *et al.* (2009) menyatakan bahwa gen *wnt4* merupakan regulator yang penting dalam proses implantasi embrio mencit. Gen *wnt4* juga diekspresikan pada folikel dalam ovarium, berperan dalam perkembangan awal embrio (Mohamed *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2005; Cory *et al.*, 2007). Gen *wnt4* telah diidentifikasi pada manusia dan mencit (Mohamed *et al.*, 2004). Hasil penelitian Hayashi *et al.* (2009) tersebut juga menunjukkan bahwa ekspresi *Wnt4* hanya terjadi pada *implantation site*, tidak ditemukan pada *nonimplantation site*. Ekspresi protein tersebut, baik pada mencit maupun manusia, mengalami kenaikan seiring proses desidualisasi (Cory *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014).

Protein *Wnt4* tereskpresi pada hari pertama kebuntingan pada epitel luminal dan epitel stroma, di sekeliling blastokista yang mengalami implantasi (Cory *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2009). Ekspresi gen *wnt4* menurut Hayashi *et al.* (2009) pada hari ke-7 kebuntingan terjadi lima belas kali lebih besar daripada hari pertama kebuntingan.

Sitasiwi *et al.* (2015a) telah berhasil mengisolasi, mengamplifikasi, serta melakukan kloning gen *Wnt4* (Sitasiwi *et al.*, 2015b) menggunakan *E.coli* BL 21. Protein *Wnt4* rekombinan juga telah berhasil dieskpresikan oleh *E.coli* BL21 (Sitasiwi *et al.*, 2015c). Penelitian Sitasiwi *et al.* (2016) menunjukkan pelacakan protein *Wnt4* pada uterus mencit dengan metode *immunoblotting*. Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa protein *Wnt4* menunjukkan reaksi positif terhadap antibodi primer *anti-Wnt4* dan memiliki ukuran bobot molekul berkisar 35-40 kDa.

*Immunohistochemistry* (IHC) merupakan kombinasi teknik histologi, imunologi dan biokimia untuk mendeteksi komponen spesifik dalam jaringan dengan konsep reaksi antigen-antibodi. *Immunohistochemistry* memungkinkan visualisasi distribusi dan lokalisasi komponen selular spesifik dalam sel atau jaringan. Keberadaan protein komponen selular dalam sel atau jaringan merupakan antigen (Burkitt *et al.*, 1993; Brancoft and Steven, 1996). Visualisasi interaksi antigen-antibodi dilakukan dengan pelabelan warna tertentu (*chromogen*) melalui serangkaian reaksi enzimatik. *Chromogen* yang paling umum adalah *diaminobenzidin* (DAB) yang mengekspresi warna coklat pada sediaan histologis (Burkitt *et al.*, 1993).

Berlatar belakang masalah tersebut di atas, dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mendeteksi ekspresi protein *Wnt4* pada uterus mencit dengan umur kebuntingan tujuh hari dengan metode *immunohistochemistry*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai rujukan dalam mempelajari pola ekspresi protein

*Wnt4* sebagai penanda molekuler dalam perkembangan awal individu.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahapan yaitu, pemeliharaan hewan uji dan deteksi ekspresi protein *Wnt4* pada uterus mencit (*M. musculus* L.) Swiss Webster. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di LPPT Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM; *immunohistochemistry* dilakukan di Laboratorium Anatomi FKH UGM.

Hewan uji untuk penelitian ini adalah mencit betina dara/virgin dengan rata-rata bobot badan berkisar 25-30 gram dan diadaptasi selama tujuh hari (Lloyd *et al.*, 2003; Hardy *et al.*, 2004). Hewan uji dikawinkan dengan cara menggabungkan empat ekor mencit betina dengan satu ekor mencit jantan dalam satu kandang. Penggabungan hewan uji jantan dan betina dilakukan pada saat hewan betina sedang mengalami fase estrus. Fase penyusun siklus estrus hewan ditentukan dengan *vaginal smears* (ulas vagina). Mencit betina yang telah kawin ditandai dengan terbentuknya sumbat vagina (*vaginal plug*). Hari yang ditandai dengan terbentuknya sumbat vagina pada hewan coba diasumsikan sebagai hari pertama kebuntingan.

Hari ke-tujuh setelah terbentuknya sumbat vagina, mencit betina bunting dikorbankan nyawanya dengan metode dislokasi cervicalis. Abdomen bagian bawah di-sectio dan uterus diisolasi dari pangkal uterus sampai dengan bagian *utero-tubal junction*. Uterus selanjutnya diproses untuk membuat sediaan histologis dengan metode parafin.

Deteksi ekspresi protein *Wnt4* dilakukan dengan cara membuat sayatan 6µm. Sayatan ditempel pada kaca obyektif dan diinkubasi dalam oven 60 °C selama 2 jam. Sayatan secara berurutan dilakukan deparafinasi (menggunakan xylol), hidrasi (menggunakan ethanol bertingkat), *blocking endogenous peroxidase* (menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 3%), inkubasi menggunakan antibodi primer (*Mouse Anti Wnt-4*, Santa Cruz Biotechnology, Cat.No.sc-37627, dengan pengenceran 1/250, pada suhu 4 °C, *overnight*). Amplifikasi ekspresi antigen dilakukan dengan ABC/HRP kit (DAKO, Australia) dilanjutkan dengan visualisasi menggunakan DAB (DAKO).

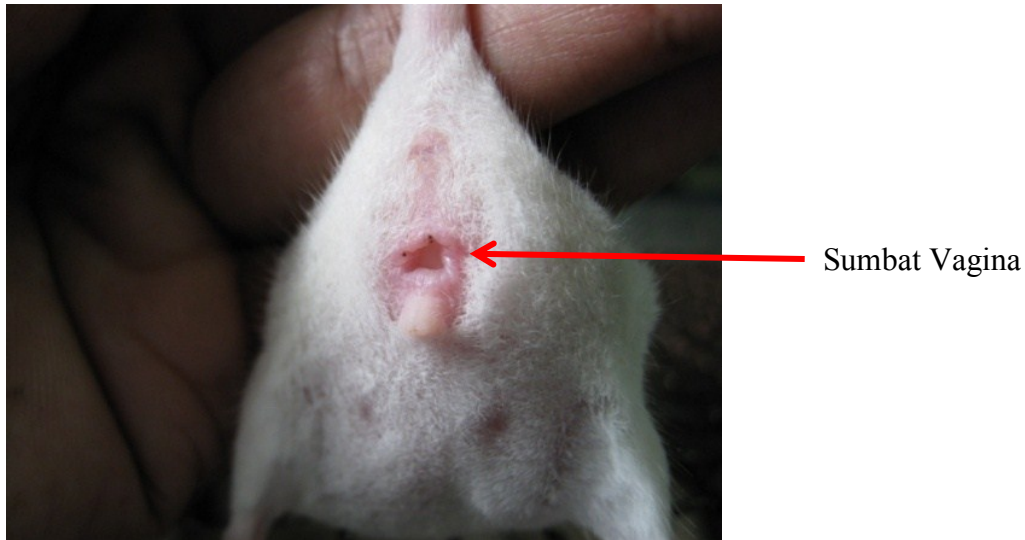
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi organ reproduksi eksternal mencit dengan sumbat vagina sebagai penentu terjadinya kebuntingan hari pertama, disajikan pada Gambar 1. Mencit yang telah menunjukkan *vaginal plug* pada organ reproduksi eksternal, selanjutnya dipelihara sampai hari ke-7. Isolasi organ reproduksi dilakukan pada usia kebuntingan 7 hari. Anatomi saluran reproduksi mencit (*M.musculus* L.) usia kebuntingan 7 hari, disajikan pada Gambar 2. Uterus yang telah diisolasi dan dibuat sediaan histologis dengan metode parafin, dilanjutkan dengan deteksi ekspresi protein *Wnt4* dengan metode IHC. Hasil ekspresi protein *Wnt4* menggunakan antibodi primer *Mouse Anti Wnt-4* disajikan pada Gambar 3.

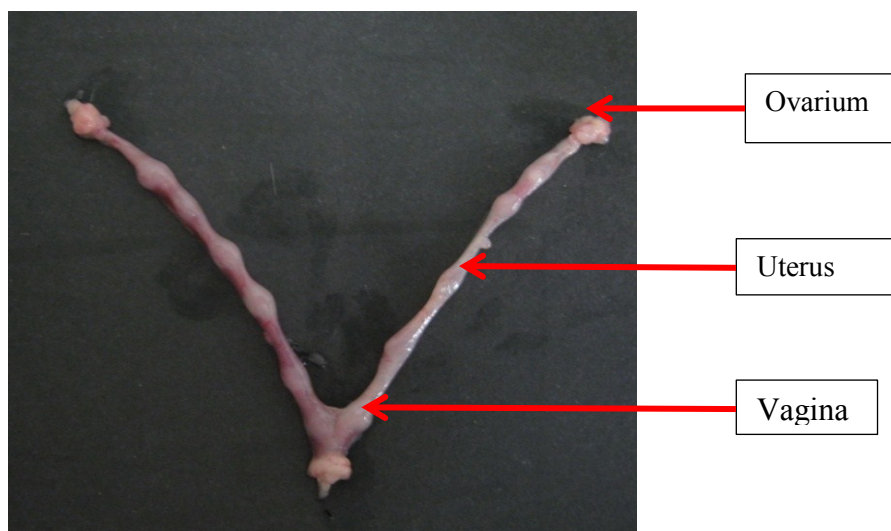
Fokus penelitian ini adalah ekspresi *Wnt4* pada uterus mencit dengan usia kebuntingan 7 hari. Hasil visualisasi menggunakan antibodi *Mouse anti Wnt-4* dengan metode IHC pada

penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi protein *Wnt* pada uterus mencit terjadi pada seluruh lapisan penyusun uterus. Gambar 3 menunjukkan reaksi positif dengan antigen dan antibodi *Mouse anti-Wnt4*, yang ditunjukkan dengan ekspresi warna coklat. Ekspresi warna coklat pada sediaan

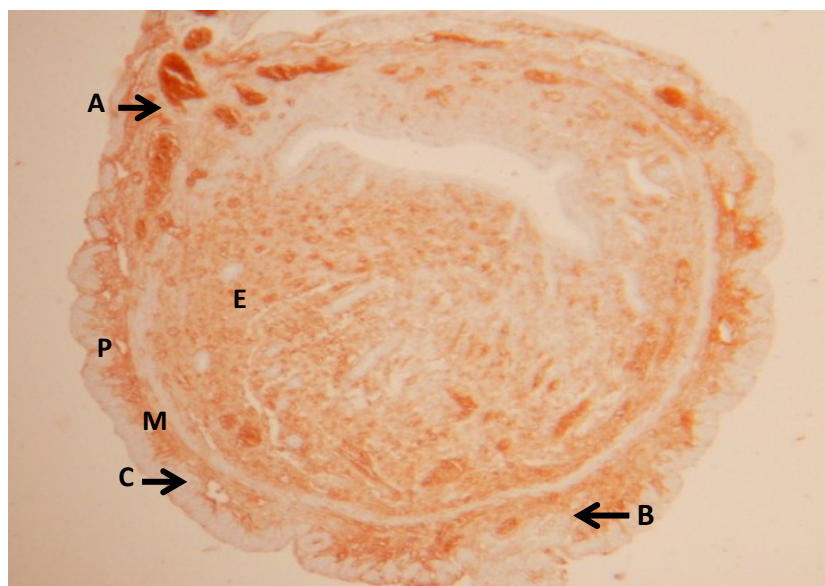
histologis uterus dalam Gambar 3 terjadi pada lapisan perimetrium (p), miometrium (m) serta endometrium (e). Ekspresi pada endometrium uterus terjadi pada seluruh lapisan stroma, tetapi ekspresi pada bagian basal epitel luminal terjadi hanya sebagian kecil.



Gambar 1. Morfologi organ reproduksi eksternal mencit setelah dikawinkan



Gambar 2. Anatomi saluran reproduksi mencit pada usia kebuntingan 7 hari



Gambar 3. Hasil *immunohistochemistry* uterus mencit pada usia kebuntingan 5 hari, menggunakan antibodi *Mouse Anti Wnt-4* (Perbesaran: 40X)  
Keterangan: P: Perimetrium; M: Miometrium; E: Endometrium  
A: Ekspresi Kuat; B: Ekspresi Sedang; C: Ekspresi Lemah

Hasil uji imunohistokimia positif pada sediaan histologis epitel vagina ditunjukkan dengan adanya spot berwarna coklat, warna coklat diberi skor bertingkat dari ada/lemah (+), sedang/menengah (++) dan kuat (+++). Hasil visualisasi ekspresi protein *Wnt4* pada sediaan histologis uterus usia kebuntingan 5 hari menunjukkan tingkatan warna coklat yang menengah (++) baik pada perimetrium, miometrium maupun endometrium. Ekspresi warna coklat yang kuat (+++) ditemukan tersebar tidak merata pada beberapa bagian dalam perimetrium, miometrium maupun endometrium. Bagian tersebut diduga merupakan pembuluh darah (tanda panah).

Visualisasi ekspresi positif protein *Wnt4* pada Gambar 3 disebabkan oleh usia kebuntingan hewan coba yang telah mencapai hari ke-7. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Mohamed *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa mekanisme regulasi ekspresi gen *wnt* selama proses implantasi

embrio berkaitan dengan lonjakan estrogen pada hari ke-4 kebuntingan yang dikenal sebagai estrogen nidatori. Estrogen nidatori beraksi pada uterus menginduksi sintesis molekul regulator yang disekresikan ke dalam lumen uterus. Molekul regulator selanjutnya akan mempengaruhi blastokista untuk memacu ekspresi *estradiol-regulated genes* sehingga menginduksi gen target pada uterus atau pada blastokista untuk memfasilitasi terjadinya implantasi. Mekanisme rangkaian sinyal oleh protein *Wnt* menyebabkan stabilisasi dan translokasi inti  $\beta$ -*catenin*, yang kemudian berperan sebagai ko-aktivator transkripsi gen target (Wodarz and Nusse, 1998; Cadigan, 2002; Li *et al.*, 2009). Sampel pada penelitian ini diambil pada usia kebuntingan ke-7, diasumsikan semua rangkaian proses regulasi estrogen nidatori telah terjadi sehingga ekspresi *Wnt4* terjadi pada semua lapisan penyusun uterus.

Ekspresi *Wnt4* menurut Mohamed *et al.* (2004) dan Hayashi *et al.* (2009) dapat dideteksi

pada lapisan epitel dan stroma endometrium uterus, pada hari pertama kebuntingan. Hari ke-5 kebuntingan *Wnt4* terekpresi pada stroma disekeliling blastokista yang mengalami implantasi. Ekspresi *Wnt4* berlanjut sepanjang perkembangan embrio dalam uterus. Mohamed *et al.* (2004) menyatakan bahwa *Wnt4* diperlukan untuk desidualisasi stroma, pembentukan komunikasi embrio dan induk, serta kemajuan implantasi pada manusia dan mencit. Gen *wnt4* juga merupakan gen target sistem sinyal *Bmp2* yang berperan dalam desidualisasi stroma. Sinyal *Bmp2* merupakan integrator molekuler pada proses peri-implantasi yang diperlukan untuk koordinasi sistem molekuler selama diferensiasi sel stroma.

Hasil penelitian ini menunjukkan deteksi ekspresi *Wnt4* juga terjadi pada pembuluh darah. Hal tersebut membuktikan bahwa protein tersebut merupakan protein yang berperan dalam sistem sinyal selular dan terdistribusi melalui pembuluh darah. Hewan coba yang digunakan adalah mencit. Mencit merupakan hewan yang bersifat politokus yaitu menghasilkan anak dalam jumlah banyak dalam satu kali kelahiran. Distribusi molekul sinyal melalui pembuluh darah diduga mampu meregulasi perkembangan beberapa embrio secara serentak dalam uterus.

## SIMPULAN

Ekspresi protein *Wnt4* pada uterus mencit terjadi pada seluruh lapisan penyusun uterus. Ekspresi protein *Wnt4* juga terjadi pada pembuluh darah sehingga diduga protein *Wnt4* meregulasi perkembangan embrio secara serentak melalui sistem sirkulasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Prof. Dr. drh. Wayan T. Artama (Guru Besar Bagian Biokimia FKH UGM Yogyakarta), drh. Agung Budiyanto, M.P., Ph.D. (Staf Edukatif Bagian Reproduksi FKH UGM Yogyakarta), dan Prof.dr. Edi Dharmana, M.Sc., Ph.D, Sp.Park. (Guru Besar Bagian Parasitologi FK UNDIP Semarang).

## DAFTAR PUSTAKA

- Brancroft, J.D. and A. Stevens, 1996. Theory and practice of histological techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone. Edinburg.
- Burkitt, H.G., B.Young, and J.W.Heath, 1993. Wheather's functional histology . A text and colour atlas. Internasional Student Edition. 3<sup>rd</sup> Ed. Churchill Livingstone. Edinburg.Lloyd, M.L., G.R. Shellam, J.M. Papadimitriou, and M.A. Lawson, 2003. Immunocontraception is induced in BALB/c mice inoculated with murine cytomegalovirus expressing mouse zona pellucida 3. *Biol. Reprod.* 68: 2024–2032.
- Cadigan, K.M., 2002. *Wnt* signaling—20 years and counting. *Trends Genet.* 18:340-342.
- Cory, A., M. Paquet,R. Behringer, F. DeMayo, J.A. Richards, and D. Boerboom, 2007. *Wnt4* expression in ovarian granulosa cell precursors is required for follicle formation. *Biol. Reprod.* 77:133–136.
- Hardy, C.M., G. Clysdale, and K.J. Mobbs, 2004.Development of the Mouse-Specific Contraceptive Vaccines: Infertility in Mice Immunized with Peptide and Polyepitope Antigens. *Reprod.* 128:395–407.
- Hayashi, K., D.W. Erikson, S.A. Tilford, B.M. Bany, J.A. Maclean,E.B. Rucker, G.A. Johnson, and T.E. Spencer, 2009. *Wnt* Genes in the Mouse Uterus: Potential Regulation of Implantation. *Biol.Reprod.* 88:989–1000.

- He, X., J.P. Saint-Jeannet, Y. Wang, J. Nathans, I. Dawid, and H. Varmus, 1997. A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5a. *Science*. 275:1652–1654.
- Hsieh, M., D. Boerboom, M. Shimada, Y. Lo, A.F. Parlow, U.F.O. Luhmann, W. Berger, and J.S. Richards, 2005. Mice Null for Frizzled4 (Fzd4<sup>-/-</sup>) Are Infertile and Exhibit Impaired Corpora Lutea Formation and Function. *Biol. Reprod.* 73:1135–1146.
- Li, Q., A. Das, A. Kannan, R.N. Taylor, F.J. DeMayo, P.J. Hornsby, M.K. Bagchi, and I. C. Bagchi, 2009. Wnt4 Acts Downstream of BMP2 and Functions via Canonical Beta-Catenin-Dependent Signaling Pathway to Regulate Human Endometrial Stromal Cell Differentiation. *Biol. Reprod.* 81:413 – 420.
- Li, W., Y. Zhang, M. Zhang, G. Huang, and Q. Zhang, 2014. Wnt4 is overexpressed in human pituitary adenomas and is associated with tumor invasion. *J. Clin. Neurosci.* 21: 137–141.
- McAuley, B.S., E. Akyar, L. Filliger, and V. F. Hinman, 2013. Expression of wnt and frizzled genes during early sea star development. *Gene Expr. Patt.* 13: 437–444.
- Miller, J.R., 2002. The Wnts. *Gen. Biol* 3:3001-3015.
- Mohamed, O.A., D. Dufort, and H.J. Clarke, 2004. Experimental and estradiol regulation of *Wnt* genes in the mouse blastocyst. Identity a candidate pathway of embryo-maternal signalling at implantation. *Biol.Reprod.* 71:417 -424.
- Paria, B.C., J. Reece, S.K. Das, and S.K. Dey, 2002. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*. 296:2185–2188.
- Saito-Diaz, K., T.W. Chen, X.Wangi, C.A. Thorne, H.A. Wallace, A. Page-McCaw, and E. Lee, 2013. The way Wnt works: Components and mechanism. *Growth Factors*. 31(1):1–31.
- Sitasiwi, Agung J., W.T. Artama, A. Budiyo, E. Dharmana, 2015a. Kloning Gen *wnt4* Untuk Penyediaan Antigen Baru dalam Imunokontrasepsi Satwa Liar. Prosiding Seminar Ilmiah dan Sarasehan Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia. UGM Yogyakarta.
- Sitasiwi, Agung J., W.T. Artama, A. Budiyo, E. Dharmana, 2015b. Isolasi dan Amplifikasi Gen *wnt4* untuk Penyediaan Antigen dalam Imunokontrasepsi Satwa Liar. Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas. UNS Solo.
- Sitasiwi, Agung J., W.T. Artama, A. Budiyo, E. Dharmana, 2015c. Penggunaan *E. coli* BL21 dalam Kloning Gen *wnt4*. Prosiding Pertemuan Ilmiah Tahunan PERMI. Semarang.
- Sitasiwi, Agung J., W.T. Artama, A. Budiyo, E. Dharmana, 2016. Pelacakan Protein *Wnt4* pada Uterus Mencit Swiss Webster . *Jurnal Veteriner*. Vol. 17(1): 1-7.
- Sonderegger, S., J. Pollheimer, and M. Knöfler, 2010. Wnt Signalling in Implantation, Decidualization and Placental Differentiation: A Review. *Placenta*. 31: 839-847.
- Wodarz, A. and R. Nusse. 1998. Mechanisms of *Wnt* signaling in development. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14:59–88.