

Mikroanatomi Kelenjar Kulit *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) dan *Kalaoula baleata* (Müller, 1836) (Amphibia, Anura)

Tony Febri Qurniawan dan Deera Army Pramana

Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Microanatomi skin gland morphology research have been done as an effort to make skin glands as one of their character identification. Adult amphibian skin, *Duttaphrynus melanostictus* and *Kalaoulabaleata* examined by light microscopy. The amphibian skin were prepared by the paraffin sections method and described their morphology. Results showed the morphology of amphibian skin consists of flattened to columnar epithelium in the epidermis and the dermis consists of connective tissue that can be divided into spongy and compact. Both amphibian skin gland consists of two types glands, mucous glands and granular. Mucous glands is small which located in the upper layers of the stratum spongiosum of the connective tissue. Granular glands is large and forming secretory compartments. The size, frequency and distribution of skin glands *Duttaphrynus melanostictus* and *Kalaoula baleata* are differences. Those differences structure in skin glands potential for identification and taxon.

ABSTRAK

Penelitian morfologi mikroanatomi kelenjar kulit telah dilakukan dalam upaya menjadikan karakter kelenjar kulit sebagai karakter identifikasi. Kulit amfibi dewasa, *Duttaphrynus melanostictus* dan *Kalaoula baleata* diteliti dengan mikroskop cahaya. Kulit amfibi tersebut dipreparasi dengan metode irisan parafin dan dideskripsikan karakter morfologinya. Hasil menunjukkan morfologi dasar kulit amfibi dengan epitel pipih hingga kolumnar pada epidermis dan jaringan ikat dalam dermis yang dapat dibagi menjadi spons dan kompak. Kelenjar kulit kedua amfibi terdiri dari dua jenis kelenjar, kelenjar lendir dan granular. Kelenjar lendir kecil dan terletak di lapisan atas dari stratum spongiosum jaringan ikat. Kelenjar granular besar dan membentuk kompartemen sekretori. Terdapat perbedaan ukuran, frekuensi dan persebaran kelenjar kulit antara *Duttaphrynus melanostictus* dengan *Kalaoula baleata*. Perbedaan struktur mikroanatomi kelenjar kulit berpotensi untuk identifikasi habitat dan takson famili amfibi tersebut.

PENDAHULUAN

Integumen atau biasa disebut sebagai kulit merupakan suatu organ yang melapisi permukaan tubuh dan berfungsi untuk melindungi lapisan di bawahnya dari pengaruh luar misalnya dari patogen. Selain itu didalam kulit juga terdapat reseptor yang dapat mengenali perubahan lingkungan (Junqueira, 1998; Pough *et al.*, 1998). Pada umumnya amfibi memiliki

kulit yang tipis, banyak pembuluh darah dan selalu basah. Kondisi kulit tersebut pada amfibi berperan sebagai alat respirasi. Bahkan beberapa jenis amfibi paru-parunya mereduksi sehingga sistem respirasi hanya menggunakan kulit saja atau disebut respirasi *cutaneous* (Hutchin *et al.*, 2003; Iskandar, 1978; Cox, 1967). Kulit amfibi dapat selalu basah karena didalamnya terdapat banyak kelenjar-

kelenjar sekresi. Sekresi dari kelenjar kulit amfibi mengandung berbagai senyawa yang kaya akan protein, peptida steroid, alkaloid, amina biogenik dan lipid. Sehingga senyawa sekresi kulit amfibi dapat berpotensi dijadikan sebagai bahan obat antibiotik dan antimikrobia di masa mendatang (Maciel *et al.*, 2003; Felseburgh *et al.*, 2007). Penelitian Yoshie *et al.* (1985) dan Ersparmer (1994) memberikan informasi bahwa sekresi dari kelenjar kulit amfibi memberikan pertahanan terhadap predator, memiliki sifat antibiotik terhadap pertumbuhan mikroba, membantu dalam respirasi kulit, berperan dalam transfer trans epitelial ion, osmoregulasi dan penyerapan air. Kulit yang memiliki peran yang begitu penting pada kehidupan amfibi sangat menarik untuk diteliti. Penelitian histologi pada kelenjar kulit amfibi khususnya untuk jenis-jenis amfibi dari negara tropis seperti Indonesia masih sangat minim dan terbatas. Padahal penelitian terkini Faivovich *et al.* (2005) dan Delfino *et al.* (2002) mengindikasikan bahwa karakter histomorfologi kelenjar kulit dapat digunakan untuk identifikasi dan mencari hubungan filogenetik antara spesies amfibi. Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukanlah penelitian ini yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan struktur mikroanatomi kelenjar kulit amfibi terestrial dengan akuatik yaitu kodok

Duttaphrynus melanostictus (Schneider, 1799) dan katak *Kalaoula baleata* (Müller, 1836). Kodok (*toad*) *Duttaphrynus melanostictus* dan katak (*frog*) *Kalaoula baleata* merupakan amfibi yang melimpah dan mudah ditemukan disekitar lingkungan kita. Informasi dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi pendukung dalam mengidentifikasi struktur kulit kedua amfibi tersebut.

METODOLOGI

Dalam penelitian ini preparat kelenjar kulit *Duttaphrynus melanostictus* dan *Kalaoula baleata* dibuat dengan menggunakan metode irisan. Fiksatif yang digunakan berupa larutan *Bouin's*. Fiksatif *Bouin's* membuat jaringan terfiksasi lebih baik dibandingkan dengan fiksatif *Neutral Buffered Formalin* (NBF) dan *Zenker's* (Hostetler & Cannon, 2005; Bancroft & Cook, 1984). Alat-alat yang diperlukan untuk tahap narkose dan pembedahan disiapkan. *Duttaphrynus melanostictus* dan *Kalaoula baleata* yang akan digunakan ditangkap dari area kampus pada malam hari sebelum pembuatan preparat dimulai. Setelah ditentukan jenis kelamin serta diukur panjang SVL (*Snout Vent Length*) dan berat tubuhnya, *Duttaphrynus melanostictus* dan *Kalaoula baleata* di narkose dalam Killing bottle menggunakan *Duttaphrynus melanostictus* dan *Kalaoula baleata* dimasukkan ke dalam botol

tersebut. Eter diteteskan pada kapas bersih. Kemudian kapas tersebut dimasukkan ke dalam *killing bottle* dan ditutup rapat. Setelah beberapa saat, kedua amfibi tersebut dikeluarkan dan diletakkan di atas kotak parafin untuk proses pembedahan.

Pengambilan kelenjar kulit dilakukan dengan pertama-tama menjepit kulit bagian posterior diatas membran *tympanum* dengan pinset. Kulit tersebut agak direntangkan dan kemudian digunting. Organ diiris dengan ketebalan kurang lebih lima milimeter. Selanjutnya masing-masing irisan tersebut dimasukkan ke dalam botol Flakon yang telah diisi larutan fiksatif Bouin dan diberi label sebelumnya. Langkah yang sama diterapkan pada kelenjar kulit pada sisi kepala yang lain.

Jaringan dibiarkan dalam larutan Bouin minimal selama 60 menit. Kemudian larutan fiksatif diganti dengan alkohol 70%. Alkohol diganti sebanyak tiga kali. *Washing* dilakukan pada saat fiksatif *Bouin's*, hingga warna kuning menipis. Tahap berikutnya, alkohol dalam botol Flakon berturut-turut diganti dengan alkohol 70% (4 x 30 menit), 80% (2 x 30 menit), 90% (2 x 30 menit), 96% (1 x 30 menit), dan alkohol absolut (1 x 30 menit). Setelah itu, alkohol absolut diganti dengan toluol selama 15 menit untuk proses dealkoholisasi. Berikutnya, jaringan dimasukkan ke dalam toluol:parafin pada oven selama 30 menit. Proses infiltrasi ini

dilanjutkan dengan memindahkan jaringan ke parafin murni selama 3x 50 menit.

Untuk proses *embedding* dibuat parafin murni dituangkan ke dalam kotak untuk membentuk blok parafin. Segera setelah itu, jaringan dicelupkan ke dalam parafin dan diatur orientasinya. Blok parafin yang telah membeku diiris sehingga permukaan yang hendak diiris dengan mikrotom berbentuk segi empat. Blok parafin kemudian ditempelkan pada holder kayu. Parafin dicairkan pada holder kayu, lalu blok parafin yang berisi preparat ditempelkan pada holder.

Pada proses *sectioning*, holder dipasang pada mikrotom. Setelah pisau mikrotom dipasang, pengirisan dapat mulai dilakukan dengan memutar tuas mikrotom. Pita parafin yang terbentuk diatur pada lembaran kertas karbon. Setelah didapatkan irisan yang cukup baik, pemotongan dihentikan. Pita parafin dipotong dengan pisau bedah untuk mengambil dua atau tiga segmen irisan. Potongan tersebut yang akan dilekatkan pada gelas benda. Gelas benda yang akan digunakan untuk meletakkan irisan diolesi albumin Meyer's terlebih dahulu. Selanjutnya, akuades diteteskan di atas gelas benda, lalu irisan preparat diletakkan di atas air tersebut. Gelas benda dipindahkan ke hotplate dengan suhu 40°-45°C hingga preparat merentang.

Pewarnaan menggunakan *Mallory Acid Fuchsin* (MAF). Sebelum masuk ke

pewarnaan, selanjutnya dilakukan dideparafinasi dengan dicelupkan pada xylol selama minimal 15 menit. Proses dehidrasi dilakukan dengan mencelupkan preparat pada alkohol absolut, 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 30%, dan akuades. Kemudian preparat dapat dicelupkan dalam larutan *acid fuchsin* selama 3 menit. Setelah dicuci dengan akuades, preparat dimasukkan ke dalam larutan PMA selama 5 menit. Kemudian, dicuci dengan akuades dan dicelupkan dalam larutan *Mallory's* selama 2 menit. Setelah dicuci lagi dalam akuades, preparat diamati dengan mikroskop untuk melihat hasil pewarnaan. Apabila terlalu tebal, dicuci kembali, bila kurang tebal, dicelup lagi ke dalam larutan *Mallory's*. Setelah pewarnaan, preparat didehidrasi dengan mencelupkannya pada alkohol konsentrasi 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut secara berturut-turut. Kemudian, preparat dicelupkan pada larutan xylol, dikeringkan dan di-mounting. *Canada balsam* diteteskan di atas preparat dalam jumlah yang cukup, tidak berlebihan. Setelah itu, preparat dikeringkan di atas hotplate. Setelah kering, preparat diamati dengan mikroskop cahaya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pengamatan diperoleh bahwa kulit pada amfibi *Duttaphrynus melanostictus* dan *Kalaoula baleata* terdiri

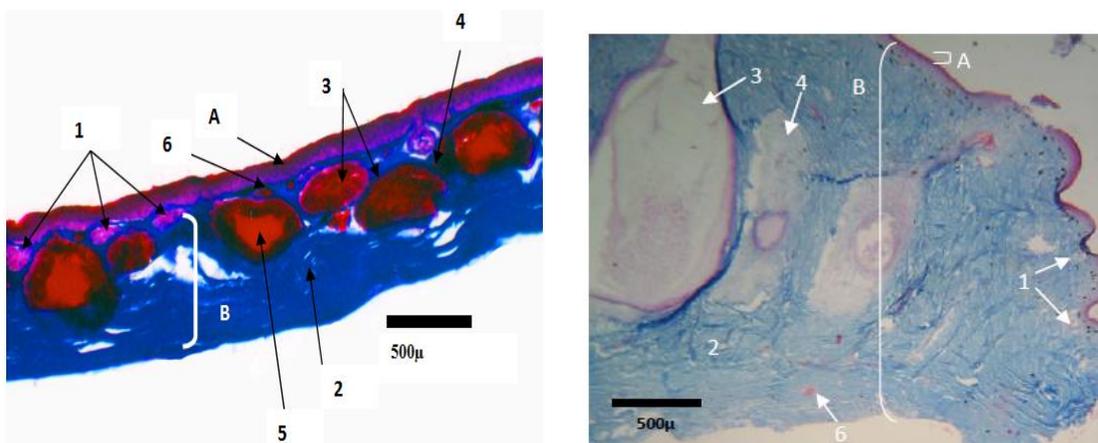
dari 3 bagian yaitu kutikula/epidermis, korium/*cutis vera*/dermis dan beberapa kelenjar - kelenjar sekresi (gambar 1 dan gambar 2). Lapisan epidermis merupakan perkembangan dari ectoderm pada bagian terluar dari suatu embrio hewan, sedangkan dermis merupakan perkembangan dari dermatom yang juga dipengaruhi oleh mesoderm somatik lateral dan ventral.

Epidermis terdiri atas beberapa lapisan sel epithelial dengan bentuk bervariasi. Pada lapisan bawah epidermis pada kodok *Duttaphrynus melanostictus* juga dapat ditemukan beberapa sel berpigmen. Secara umum lapisan epidermis kulit katak dapat dibagi menjadi 4 macam yaitu dari lapisan paling terluar berupa *horny layer*, selanjutnya berupa *middle layer*, *deep layer* dan sel-sel mukosa. *Horny layer* tersusun atas sel berbentuk pipih dan rapat. *Middle layer* tersusun dari sel berbentuk semi kolumnar dan *deep layer* tersusun dari sel berbentuk kolumnar dengan melekat pada membran basalis dibawahnya. Beberapa sel kolumnar termodifikasi dan diferensiasi menjadi *isolated mucous cell* yang mensekresikan lendir sehingga kulit kedua amfibi selalu lembab dan basah.

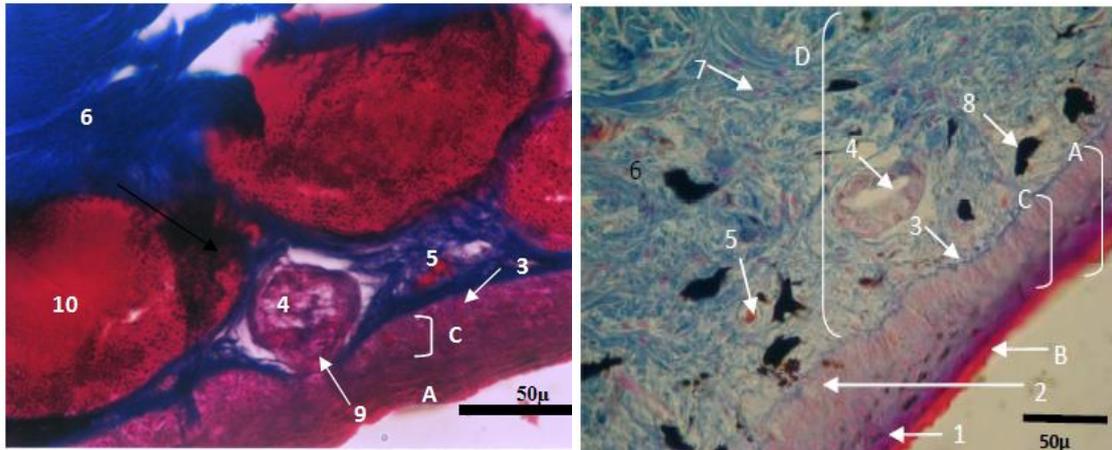
Dermis terdiri atas 3 lapisan yaitu lapisan superficial, lapisan tengah dan lapisan dalam. Pada dermis kaya jaringan ikat yang dapat menentukan kulit amfibi

tipis atau tebal. Jaringan ikat di dalam dermis dibagi menjadi dua lapisan utama yaitu spons dan kompak. Dermis spons atas berupa jaringan ikat longgar dan kaya sel melanin yang didistribusikan sekitar kelenjar mukus. Dermis kompak dibentuk oleh serabut kolagen dan serat elastis (Gambar2). Dari hasil pengamatan, dermis kodok *Duttaphrynus melanostictus* kaya akan serabut kolagen sehingga lapisan kulit

pada kodok tersebut lebih tebal daripada pada katak *Kalaoulabaleata*. Lapisan superficial berbatasan langsung dengan epidermis, pada lapisan ini kaya akan sel-sel berpigmen, kelenjar seromukus dan pembuluh darah. Hasil pengamatan preparat *Duttaphrynus melanostictus*, sel-sel berpigmen yang mengandung deposit kalsium dapat teramati dan terwarnai berwarna hitam (gambar 2 no 8).



Gambar 1. Penampang melintang kulit *Kalaoulabaleata* (kiri) dan *Duttaphrynus melanostictus* (kanan). Keterangan: A. Epidermis, B. Dermis, 1. Kelenjar seromukosa, 2. Serabut kolagen, 3. Kelenjar granula, 4. Jaringan ikat longgar, 5. Sekret kelenjar serosa-granular, 6. Pembuluh darah



Gambar 2. kelenjar kulit *Kalaoulabaleata* (kiri) dan *Duttaphrynus melanostictus* (kanan). Keterangan: A. Epidermis, B. Stratumcorneum, C.Stratumgranulosum, D. Dermis, 1. Sel epitel pipih, 2.Sel epitelkolumner, 3. Membrana basalis, 4. Kelenjar mukus, 5.pembuluh darah, 6. Serabut kolagen, 7. Inti sel fibroblast, 8. Deposit kalsium, 9. Ductusmucosa, 10. Sekret kelenjar serosa granular

Terdapat 2 macam kelenjar kulit kedua spesimen yaitu serosa dan mukosa. Kelenjar serosa memiliki ukuran besar 0,15-0,3 mm pada *Kalaoula baleata* dan 0,2-0,45 mm pada *Duttaphrynus melanostictus* dan ada yang bergranular. Kelenjar serosa bergranular banyak terdapat pada paratoid dimana kelenjar ini mensekresikan racun, sehingga kelenjar ini disebut kelenjar racun/granular. Delfinoet al., (1998) membagi kelenjar serosa pada amfibi menjadi 2 tipe berdasarkan produk kandungan sekret yang dihasilkan, organel yang berperan, dan sel-sel yang terlibat dalam proses pendewasaan (diferensiasi dan maturasi). Kelenjar serosa tipe I merupakan kelenjar yang tersusun atas vesikula bersel tunggal padat dengan

substruktur tersusun berulang rapi dan sesuai dengan garis sekretori dasar kulit amfibi. Kelenjar ini terlibat dalam biosintesis steroid (Hostetler & Cannon, 2005). Tipe II, merupakan kelenjar serosa bergranular dengan frekuensi kepadatan granular bervariasi dan mensintesis produk berupa *proteinaceous* (Ananniaset al., 2008).

Kelenjar mukus umumnya berbentuk bulat berukuran kecil dengan jumlah lebih banyak dan tersebar dibandingkan kelenjar serosa. Kelenjar ini terbentuk dari sel-sel mukus yang terisolasi dan berdiferensiasi menghasilkan sekret berupa asam sulfat glikoprotein (Anannias et al, 2008). Dari hasil (gambar 2) teramati saluran kelenjar mukus pada *Kalaoula*

baleata yang menandakan bahwa pada katak akuatik seperti *Kalaoula baleata* kulitnya selalu basah dan tidak dapat jauh dari air. Perbedaan ukuran, jumlah dan distribusi kelenjar kulit serosa dan mukus pada dua amfibi tersebut kodok *Duttaphrynus melanostictus* (hidup terrestrial) dan katak *Kalaoula baleata* (hidup akuatik) sebenarnya berpotensi dapat dijadikan identifikasi habitatnya dan kelompok sampai taksonnya, namun masih perlu penelitian lebih lanjut dan luas lagi untuk dapat menjadi identifikasi hingga genus.

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan ukuran, frekuensi dan persebaran kelenjar kulit antara *Duttaphrynus melanostictus* dengan *Kalaoula baleata*. Perbedaan ketebalan kulit dan tekstur kehalusan kulit pada kedua jenis amfibi tersebut dipengaruhi oleh ketebalan jaringan ikat pada lapisan dermis kulit serta persebaran kelenjar kulit mukosa pada lapisan superficial dermis. Pada kulit katak *Kaloula baleata* terdapat dua kelenjar yaitu mucus yang berwarna ungu dan racun yang berwarna merah. Pada kulit kodok *Duttaphrynus melanostictus* kelenjar racun berukuran besar dan yang berwarna ungu. Perbedaan morfologi mikroanatomi kelenjar kulit berpotensi untuk identifikasi habitat dan takson famili amfibi tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Ananias F., J.R. Rigolo, J.A. Almeida. 2008. Histochemistry of skin glands of *Trachycephalus aff. venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae). *Micron* 39; 56–60
- Bancroft, J.D. & H.C. Cook. 1984. *Manual of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, London, pp.39
- Cox, C.B. (1967). Cutaneous respiration and the origin of the modern Amphibia. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 178, 37-47.
- Delfino G, Brizzi R, Kracke-Berndorff R, Alvarez B. 1998. Serous gland dimorphism in the skin of *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae). *Journal Morphol* 237(1):19-32
- Delfino, G., Brizzi, R., Nosi, D., Terreni, A., 2002. Serous cutaneous glands in new world hylid frogs: An ultrastructural study on skin poisons confirms phylogenetic relationships between *Osteopilus septentrionalis* and *Phrynohyas venulosa*. *J. Morphol.* 253, 176–186.
- Duellman, W. E., L. Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw – Hill Book Company. New York ,pp : 151 – 162.
- Ersparmer, V., 1994. Bioactive secretions of the amphibian integument. In: Heatwolw, H. (Ed.), *Biology of Amphibians: The integument*. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, Australia, pp. 179–315.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A., Wheeler, W.C., 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 294, 1–240.
- Felseburgh, F.A., Carvalho-e-Silva, S.P., de Brito-Gitirana, L., 2007. Morphological characterization

- n of the anuran integument of the Proceratophrys and Odontophrynus genera (Amphibia, Anuran, Leptodactylidae). *Micron* 38 (5), 439–445.
- Hostetler, J.R., M.S. Cannon. 2005. The Anatomy of the Parotoid Gland in Bufonidae with Histochemical Findings. I. *Bufo marinus*. *Journal of Morphology*. Vol 142, pp.225-239
- Hutchins, M., W.E. Duellman, Neil Schlager 2003. *Grzimek's Animal Life Encyclopedia second edition Volume 6 Amphibians*. Gale Group. Farmington Hill
- Iskandar, D.T. (1978). A new species of *Barbourula*: First record of a discoglossid from Borneo. *Copeia* 1978, 564–566.
- Junqueira, L.C. 1998. *Histologi Dasar (Basic Histology)*, edisi kedelapan. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta, hal:357-359
- Maciel, N.M., Schwatz, C.A., Ju´nior, O.R.P., Sebben, A., Castro, M.S., Sousa, M.V., Fontes, W., Schwartz, E.N.F., 2003. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. *Comp. Biochem. Phys.* 134, 641–649.
- Pough, F.H., Heiser, J.B., W.N. McFarland. 1996. *Vertebrate Life* (4thed.) Prentice-Hall, Inc. New Jersey, pp : 215 ; 271 – 275.
- Vitt J., P. Caldwell. 2007. *Herpetology : an Introductory Biology of Ampibians and Reptiles*. Academic Press. New York.
- Yoshie, S., Toshihiko, I., Tsuneo, F., 1985. Coexistence of bombesin and 5- hydroxytryptamine in the cutaneous gland of the frog, *Bombina orientalis*. *Cell Tissue Res.* 239, 25–29.