

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Sitologi

Sitologi merupakan salah satu bidang yang berkaitan dengan ilmu yang mempelajari tentang morfologi sel – sel secara individual atau sel yang berasal dari fragmen jaringan yang diamati secara mikroskopis. Diagnostik atau sitologi klinis merupakan studi tentang penilaian normal maupun tidaknya dari sel yang diperoleh dari berbagai situs tubuh (deteksi karakteristik morfologi abnormal yang dipisahkan dari tubuh manusia. (Mutoharoh *et al.*, 2020)

Sediaan sitologi dapat dibuat dari berbagai sumber dalam tubuh (urin, puting, dahak, vagina, sinus, dll), kerokan diperoleh (mukosa bukal, lambung, saluran pernapasan), dan dari cairan yang terkumpul di dalam tubuh (pleura, peritoneal, perikardial) bahkan dari aspirasi benjolan tubuh yang terlihat atau teraba (Mutoharoh *et al.*, 2020).

B. Sitologi Eksfoliatif Oral

Sitologi eksfoliatif oral merupakan cabang ilmu patologi yang mempelajari morfologi sel-sel yang terdeskuamsi, baik dalam keadaan normal maupun yang mengalami perubahan akibat proses patologis. Secara fisiologis, sel-sel yang berasal dari jaringan dengan tingkat regenerasi tinggi (jaringan labil) akan mengalami deskuamsi secara terus-menerus seiring dengan proses pembaruan jaringan tubuh. Tingkat deskuamsi tersebut dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti jenis dan tempat jaringan, fungsi, kapasitas metabolisme sel, serta kondisi patologis (Rivoniarti *et al.*, 2024).

Sel-sel terdeskuamsi dapat berasal dari dua mekanisme, yaitu eksfoliasi alami dan eksfoliasi artifisial. Eksfoliasi alami terjadi secara fisiologis ketika sel-sel mengalami proses pelepasan normal (turnover) yang mencerminkan penuaan sel, namun dapat menunjukkan perubahan morfologi apabila terdapat kelainan atau penyakit. Sampel sel yang terdeskuamsi secara fisiologis dapat diperoleh cairan tubuh melalui metode aspirasi atau pencucian (wash), seperti sel mesotelial pada efusi pleura atau sel epitel rongga mulut yang di lepaskan secara alami dari permukaan gigi. Eksfoliasi artifisial dilakukan secara mekanis dengan mengambil sel dari permukaan mukosa sebelum terjadinya deskuamsi fisiologis. Metode ini dilakukan dengan teknik kerokan (scraping), sikatan (brushing), maupun usapan (swabbing) (Rivoniarti *et al.*, 2024).

Eksfoliasi mukosa oral tidak hanya digunakan untuk pemeriksaan sitologi dengan pewarnaan rutin, tetapi juga dapat dianalisis secara sitokimia, imunositokimia, bahkan digunakan untuk pemeriksaan berbasis DNA. Sitopatologi eksfoliatif memiliki potensi luas dalam mendeteksi perubahan seluler baik pada kondisi fisiologis maupun patologis (Rivoniarti *et al.*, 2024).

C. Fiksasi

Fiksasi adalah proses penting dalam pemeriksaan sitologi yang bertujuan mengawetkan struktur sel agar tetap menyerupai kondisi aslinya setelah diambil dari tubuh. Proses ini mencegah terjadinya autolisis (kerusakan sel akibat aktivitas enzim) dan pertumbuhan mikroorganisme yang dapat merusak sediaan. Fiksasi juga membantu mempertahankan komponen sel, seperti inti

dan sitoplasma, agar tidak berubah selama proses pewarnaan (Sukma *et al.*, 2022).

Secara umum, terdapat beberapa jenis metode fiksasi pada pemeriksaan sitologi :

1. Fiksasi basah (Wet Fixation)

Merupakan metode fiksasi standar yang digunakan di sebagian besar laboratorium sitologi. Sediaan difiksasi segera setelah dibuat dalam kondisi basah menggunakan alkohol 95-96%. Alkohol bekerja dengan mengendapkan protein sehingga struktur sel tetap stabil dan dapat diwarnai dengan baik. Fiksasi ini menghasilkan sediaan tampilan inti yang jelas dan sitoplasma yang bersih. Alkohol 95-96% juga menjadi standar baku (gold standar) dalam pemeriksaan sitologi karena memberikan hasil yang optimal pada pewarnaan *Papanicolaou* (Handa *et al.*, 2024).

2. Fiksasi Semprot (Spray Fixation)

Sebagai alternatif dari metode basah, digunakan formal alkohol spray (fixative spray) yang terdiri atas campuran formaldehid, etanol, dan polietilen glikol. Fixative spray digunakan dengan cara menyemprotkan langsung ke permukaan sediaan jarak sekitar 20-30 cm. Metode ini lebih praktis dan cepat karena tidak membutuhkan wadah perendaman dan dapat dilakukan di luar laboratorium (Handa *et al.*, 2024).

Formal alkohol spray bekerja dengan dua mekanisme, yaitu :

- a. Formalin membentuk ikatan silang antar protein untuk menjaga kestabilan struktur sel.

- b. Alkohol bertindak sebagai dehidrator yang mencegah pengeringan berlebih dan mempertahankan bentuk sel

Selain efisien, spray juga membentuk lapisan pelindung diatas sediaan, sehingga sel tidak mudah rusak akibat udara terbuka. Formal alkohol spray juga dapat digunakan dalam metode pewarnaan *Papanicolaou* karena sifatnya yang mampu mencegah pengeringan sel sebelum proses pewarnaan dimulai, membentuk lapisan pelindung tipis yang melindungi sel dari kerusakan akibat udara terbuka. Kandungan alkohol dan polietilen glikol di dalamnya bekerja mengendapkan protein dan menjaga kelembapan preparat, sehingga morfologi inti dan sitoplasma tetap terjaga dengan baik untuk pewarnaan diferensial. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa hasil pewarnaan pap dari sediaan yang difiksasi dengan spray masih menunjukkan kejernihan inti dan sitoplasma yang layak untuk interpretasi hasil mikroskopis, meskipun kontras warna sedikit lebih redup dibandingkan fiksasi basah konvensional (Sathawane *et al.*, 2022).

3. Fiksasi Kering (Air Dry Fixation)

Merupakan metode pengeringan sediaan di udara terbuka atau menggunakan pemanas bersuhu rendah. Fiksasi ini biasanya digunakan untuk pemeriksaan khusus, seperti pewarnaan giemsa atau pemeriksaan hematologi, karena menghasilkan tampilan sitoplasma yang lebih sesuai untuk pengamatan butiran sel (Collins *et al.*, 2021).

D. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Fiksasi

1. Konsentrasi ion hidrogen (pH)

Proses fiksasi sebaiknya dilakukan pada pH netral, yaitu sekitar 6-8. Kondisi hipoksia pada jaringan dapat menurunkan pH, sehingga larutan fiksatif perlu memiliki kemampuan buffering untuk mencegah terjadinya keasaman berlebihan. Keasaman yang tinggi dapat memicu terbentuknya pigmen formalin-heme, yang tampak sebagai deposisi berwarna hitam dalam jaringan. Beberapa buffer yang umum digunakan antara lain fosfat, bikarbonat, cacodylate, dan veronal, dengan formalin biasanya dibuffer menggunakan fosfat pada pH 7. Selain itu, sifat osmolalitas fiksatif juga memengaruhi sel fiksatif hipertonik dapat menimbulkan pembengkakan sel. (Musyarifah dan Agus, 2018)

2. Temperatur fiksasi

Peningkatan suhu pada semua reaksi kimia, akan meningkatkan kecepatan fiksasi dan akan meningkatkan difusi dari agen fiksatif ke dalam jaringan. Formalin dengan suhu tinggi akan memperbaiki jaringan yang lebih cepat dan ini sering sebagai langkah pertama pada proses jaringan otomatis. Namun, tetap dibutuhkan perhatian untuk menghindari spesimen terlalu 'overcooked'. Fiksasi untuk mikroskop cahaya secara rutin dilakukan pada suhu kamar dan ini harus dilanjutkan dengan fiksasi selanjutnya pada suhu sampai 45°C selama pengolahan jaringan. (Musyarifah dan Agus, 2018)

3. Kemampuan penetrasi (*penetration rate*) dan ketebalan pemotongan

Penetrasi jaringan tergantung pada kemampuan berdifusi dan berat molekul dari setiap cairan fiksatif, dimana formalin dan alkohol mempunyai kemampuan penetrasi terbaik dan glutaraldehid yang terburuk. Merkuri dan yang lainnya berada di antara keduanya. Salah satu cara untuk mengatasi masalah ini dengan pemotongan jaringan tipis (2 sampai 3 mm). Penetrasi pada potongan tipis akan terjadi lebih cepat daripada bagian tebal. Seperti yang didefinisikan oleh Medawar bahwa $d = K\sqrt{t}$, dimana d adalah dalamnya penetrasi, K adalah koefisien difusi (spesifik pada tiap agen fiksatif) dan t adalah waktu. Secara praktis, ini berarti bahwa koefisien difusi (K) adalah jarak dalam milimeter dimana agen fiksatif telah berdifusi ke jaringan dalam waktu satu jam, contohnya formalin 10% mempunyai $K = 0,78$, ini berarti bahwa formalin tidak dapat diharapkan untuk melakukan penetrasi lebih dari 1 mm dalam satu jam. Ketebalan sebuah spesimen tidak boleh lebih dari 4 mm. Idealnya spesimen dengan tebal 3 mm dapat menghasilkan fiksasi dan pengolahan jaringan yang baik. (Musyarifah dan Agus, 2018)

4. Konsentrasi Larutan

Konsentrasi larutan fiksatif harus disesuaikan sampai ke tingkat serendah mungkin, karena dapat menghemat dalam pembuatan cairan fiksatif tersebut. Formalin adalah yang terbaik di 10 %, glutaraldehid umumnya 0,25% - 4% dan etanol pada konsentrasi 70%. Konsentrasi

terlalu tinggi dapat mempengaruhi jaringan dan menghasilkan artefak serupa dengan panas yang berlebihan (Musyarifah dan Agus, 2018).

5. Volume Fiksasi

Rasio yang tinggi antara larutan fiksatif dengan jaringan akan memastikan proses fiksasi yang baik. Rasio optimal volume larutan fiksasi dengan jaringan adalah 20:1. Dalam praktek sehari-hari masih didapatkan rasio yang lebih rendah dari ini. Dalam hal ini, yang terbaik adalah untuk mengganti cairan fiksatif secara periodik beberapa kali selama proses fiksasi (Musyarifah dan Agus, 2018).

6. Durasi fiksasi

Fiksasi harus dilakukan segera setelah jaringan diangkat untuk mencegah perubahan pasca-eksisi. Durasi fiksasi yang ideal dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk jenis bahan fiksatif yang digunakan, ketebalan spesimen, serta parameter proses seperti suhu, kapasitas peyangga, kemampuan penetrasi, dan rasio volume antara jaringan dan larutan fiksatif. Waktu fiksasi yang terlalu lama dapat menurunkan reaktivitas antigen serta menyebabkan penyusutan dan pengerasan jaringan. Cairan fiksatif yang baik umumnya memiliki karakteristik berupa biaya yang terjangkau, mudah diperoleh, stabil, aman digunakan, memiliki daya penetrasi tinggi, mampu melakukan fiksasi secara menyeluruh, mencegah autolisis maupun dekomposisi bakteri, meminimalkan artefak berupa kerutan jaringan, serta bekerja cepat dalam menembus struktur jaringan. Di antara berbagai agen fiksatif, formaldehid

merupakan pilihan yang paling mendekati kriteria ideal tersebut, meskipun hingga kini belum tersedia larutan fiksatif yang benar-benar sempurna (Musyarifah dan Agus, 2018).

E. Senyawa Kimia Alkohol 96% Dan Formal Alkohol Spray

Alkohol 96% merupakan larutan etanol (C_2H_5OH) dengan kemurniaan mendekati 96 vol% yang berperan sebagai fiksatif koagulan (coagulative fixative). Mekanisme kerja etanol adalah denaturasi dan koagulasi protein serta dehidrasi cepat jaringan atau sel sehingga menekan aktivitas enzim autolisis dan mempertahankan detail nukleus pada preparat apusan, etanol 95%-96% banyak dipakai sebagai fiksasi basah pada pemeriksaan sitologi dan pewarnaan *Papanicolaou* (Dani, 2020).

Formula komersial mengandung formaldehida (CH_2O) atau bentuk pengawet aldehyd, etanol sebagai dehidrator, dan polietilen glikol (PEG) atau bahan pembentuk mencegah pengeringan terlalu cepat. Formaldehida bekerja dengan membentuk ikatan silang antar protein, etanol mempercepat pengeringan dan PEG membantu mempertahankan kelembapan dan membentuk lapisan pelindung yang mudah larut selama proses pewarnaan. Kombinasi ini menjelaskan mengapa spray sering dianggap praktis untuk pengambilan di lapangan dan pemeliharaan kualitas sampai sediaan diwarnai (Casatta et al., 2023).

F. Pewarnaan *Papanicolaou*

Pewarnaan *Papanicolaou* (pap stain) merupakan metode pewarnaan diferensial yang digunakan secara luas dalam pemeriksaan sitologi untuk memperjelas tampilan inti dan sitoplasma sel. Prinsip pewarnaan *Papanicolaou* ini berdasarkan interaksi ionik antara pewarna basa dan asam, dimana pewarna basa mengikat komponen sel yang bersifat asam (seperti inti), dan pewarnaan asam mengikat komponen sel yang bersifat basa seperti sitoplasma (Artati et al., 2024).

Pewarnaan *Papanicolaou* menggunakan tiga komponen utama, yaitu :

1. Hematoksilin Harris mewarnai inti sel dengan warna biru keunguan karena berikatan dengan DNA
2. Orange G6 (OG-6) memberikan warna oranye pada sel—sel yang mengandung keratin.
3. Eosin Azure (EA-50 atau EA-65) memberikan warna merah mudah, hijau, atau biru pada sitoplasma tergantung aktivitas sel.

Setelah proses pewarnaan inti selesai, sediaan mengalami dehidrasi terhadap dengan alkohol, kemudian dibersihkan dengan xylox dan ditutup menggunakan entellan. Pewarnaan *Papanicolaou* dianggap gold standar dalam pemeriksaan sitologi karena menghasilkan kontras warna yang tinggi dan detail inti yang jelas, sehingga memudahkan dalam identifikasi kelainan sel.

Penilaian kualitas pewarnaan menurut (Venkatesh & Swetha, 2020) dinilai dari 3 parameter, dan masing-masing diberikan skor 0-1, skor 0 diberikan jika didapatkan hasil tidak baik, skor 1 diberikan jika didapatkan hasil baik.

Kualitas sediaan dikatakan baik apabila mencapai total skor 2-3 dan dikatakan tidak baik apabila didapatkan total skor 0-1.

Tabel 2.1 Kualitas Pewarnaan

No	Parameter Penilaian	Skor
1.	Background atau latar belakang	
a.	Banyak debris atau endapan pewarna; artefak mengganggu pembacaan.	0
b.	Latar belakang bersih, bebas debris, presipitasi, atau artefak pewarna.	1
2.	Kontras Inti dan Sitoplasma	
a.	Inti kabur, warna pudar atau terlalu gelap; perbedaan inti-sitoplasma tidak jelas.	0
b.	Inti tampak jelas, berwarna biru-ungu dengan batas tegas; sitoplasma tampak jernih/pink dengan kontras yang jelas.	1
3.	Keseragaman Pewarnaan	
a.	Pewarnaan tidak merata; terdapat bagian terlalu gelap atau terlalu pucat.	0
b.	Warna merata di seluruh area apusan, tidak ada bagian terlalu gelap atau pucat.	1

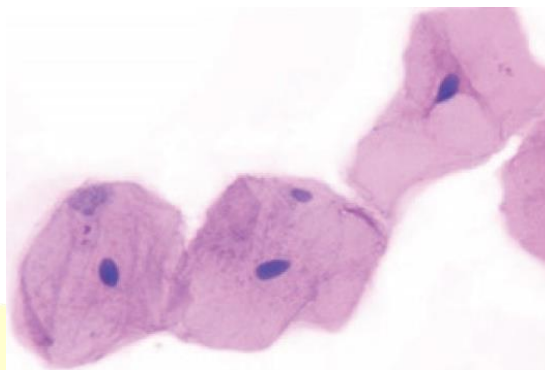
Sumber (Venkatesh dan Swetha, 2020)

G. Mukosa Oral

Mukosa oral adalah jaringan yang melapisi seluruh permukaan bagian dalam rongga mulut. Struktur mukosa oral tersusun atas dua lapisan utama yaitu epitel skuamosa berlapis di permukaan dan jaringan ikat longgar (lamina propria) di mengandung kelenjar dan pembuluh darah. Mukosa oral berfungsi sebagai pelindung mekanis terhadap gesekan dan trauma, sebagai organ sensoris (pengecepan, sensasi sentuhan), serta memiliki peran imunologis melalui sekresi saliva, komponen antibakteria (sIgA) dan sel imun lokal yang membantu mempertahankan homeostasis mikrobiota rongga mulut dan mencegah invasi patogen (Mizan et al., 2021).

Berdasarkan fungsi dan lokasi, mukosa oral dibagi menjadi tiga jenis :

1. Mukosa mastikatorik, melapisi daerah yang sering mendapat tekanan seperti gusi dan palatum durum
2. Mukosa pelapis, terdapat pada pipi, dasar mulut, dan bagian dalam bibir.
3. Mukosa khusus, terdapat pada lidah dan berhubungan dengan fungsi pengecap.



Gambar 2.1 Hasil Pewarnaan Papanicolau
Pada Sampel Epitel Mukosa Oral