

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Pewarnaan Papanicolaou

Pewarnaan Papanicolaou adalah teknik pewarnaan sel multicolor yang dikembangkan oleh George Papanicolaou sebagai bapak sitopatologi. Pap Satin digunakan untuk membedakan sel-sel dalam sedimen apus berbagai sekresi tubuh. Spesimen yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah dahak, urin, cairan serebrospinal, cairan pleura, cairan sinovial, cairan mani, aspirasi jarum halus, atau bahan lain yang mengandung sel. Pap Stain adalah teknik pewarnaan yang sangat handal, seluruh prosedur ini dikenal dengan Pap Smear. Pap Stain melibatkan lima pewarna dalam tiga larutan : Haematoxylin digunakan untuk menodai inti sel (Samari H,2018).

Prosedur pengecatan preparat setelah dilakukan fiksasi yaitu proses direhidrasi dengan cara direndam dalam alkohol 90%, 80%, 70%, 50%, 30%, dan terakhir dalam aquadest, dilakukan selama 1 menit dalam tiap-tiap larutannya. Selanjutnya preparat direndam dalam larutan Harri's haematoxylin selama 5 menit kemudian dicuci dibawah air mengalir selama 10 menit. Preparat kemudian di dehidrasi kembali dengan cara direndam dalam alkohol 30%, 50%, 70%, 80%, 90% masing-masing larutan selama 1 menit. Preparat diletakan di atas alas datar, ditetesi zat warna Orange-G dibiarkan selama 3 menit, dan dibilas alkohol 95% sebanyak 3 kali. Preparat kemudian dipulas dengan zat warna EA-50 dibiarkan selama 6 menit, kemudian dibilas alkohol

96% sebanyak 3 kali. Preparat dimasukan kedalam alkohol absolut 3 kali berturut-turut dengan waktu masingmasing 3 menit kemudian dikeringkan dengan kertas saring. Kemudian preparat dimasukan kedalam larutan xylol I, II, III masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat diberi entelan dan ditutup dengan deck glass. Terahir amati dibawah mikroskop perbesaran 400x (Rahesti, 2019).

2. Pembuatan Sediaan Preparat Mukosa Mulut

Pengambilan dilakukan dengan mengerok mukosa yang akan diambil sampelnya menggunakan spatel kayu. Cara *scraping* dilakukan menggunakan spatel kayu dengan cara mengerok mukosa oral secara berulang-ulang dan dilakukan dalam satu arah. Objek glass yang sudah diapus harus segera dimasukkan ke larutan fiksasi dan tidak boleh dikeringkan untuk mencegah pembusukan spesimen, perubahan sel, dan kontaminasi.

Bahan fiksasi untuk pewnaan rutin yaitu alkohol 95%. Fiksasi juga berguna untuk mengkondisikan struktur sel agar dapat diwarnai. Fiksasi dilakukan minimal selama 20-30 menit. Perendaman di larutan yang dilakukan kurang dari 20 menit akan menyebabkan sampel mudah lepas dari objek glass. Preparat yang sudah difiksasi kemudian dikeluarkan dari alkohol dan dibilas dengan air bersih kemudian dilakukan pewarnaan dengan metode Papanicolaou, ditutup dengan entelan dan *deck glass*, dan langsung dapat dilihat secara mikroskopis (Sabirin, 2015).

3. Fiksasi

Fiksasi merupakan tahap pertama dalam pembuatan sediaan histopatologi . Fiksasi adalah suatu metode untuk mempertahankan komponen-komponen sel agar tidak mengalami perubahan dan tidak muda rusak. Prinsip kerja dari fiksasi adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk fisiologinya. Cairan fiksatif mengubah komposisi jaringan atau sel secara kimiawi dengan cara koagulasi dan membentuk senyawa aditif baru. Senyawa tersebut terbentuk dengan cara ikatan seilang dari dua makromolekul yang berbeda, yakni cairan fiksatif dan protein sel. Hal ini menyebabkan sel resisten terhadap gerakan air dan cairan-cairan lainnya. Hal ini membantu untuk teknik setelah fiksasi, khususnya pada proses pewarnaan dimana zat-zat tersebut akan masuk kedalam sel dan menempel dengan mudah (Jamie,2010).

Kualitas fiksasi adalah kunci untuk semua tahap selanjutnya yang penting dalam pembuatan sediaan histopatologik, oleh karena itu pengawetan sel dengan perubahan morfologi yang minimal dan secara kasat mata tanpa adanya kehilangan molekul sangat penting dalam pengolahan jaringan. Fiksasi diharapkan dapat melindungi spesimen biologi dari efek denaturasi dehidrasi dan semua proses pengolahan jaringan (Musyarifah and Agus, 2018)

Fiksasi kimia biasanya dilakukan dengan merendam jaringan pada larutan fiksatif atau pada sebagian kecil organ seperti paru dengan memasukkan cairan fiksatif pada sistem vaskuler. Fiksasi kimia menjalankan perannya dalam memproteksi sel dan jaringan dengan mendenaturasi protein

menggunakan cara koagulasi (fiksasi nonaditif), *cross-linking* (membentuk senyawa aditif) atau dengan kombinasi keduanya. Fiksatif kimia adalah yang paling umum digunakan untuk sediaan yang dilihat menggunakan mikroskop (Musyarifah and Agus, 2018)

a. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi fiksasi :

1) Ph

pH optimal untuk dilakukan fiksasi adalah 6-8 jika Ph diluar rentang nilai tersebut maka secara garis besar dapat menyebabkan perubahan pada struktur jaringan, menjadi rusak akibat presipitasi sel. Perubahan pH akan mempengaruhi jumlah ion sehingga akan terjadi peningkatan atau penurunan laju reaksi yang memberikan efek pada pengamatan mikroskopik.

2) Suhu

Fiksasi yang akan dilihat dengan mikroskopis electron lebih baik disimpan pada suhu 0-4 °C.

3) Perubahan Volume

Selama fiksasi, volume jaringan biasanya mengalami perubahan. Hal ini disebabkan oleh penghambatan respirasi intraseluler, perubahan permeabilitas, dan perubahan transport ion. Fiksasi dengan alkohol yang berkepanjangan akan membuat sel menyusut. Volume sel harus dijaga dalam batas normal agar saat pengamatan terlihat seperti sel yang hidup. Volume cairan fiksasi 5-10x sampel.

4) Konsentrasi

Konsentrasi memberikan efek positif yaitu dengan mempercepat proses fiksasi melalui layaknya molekul yang terbentuk (Alwi, 2016).

Seperti yang telah disebutkan di atas, fiksasi dari sediaan terbagi menjadi beberapa bagian yaitu :

b. Fiksasi Kering

Fiksasi kering merupakan fiksasi yang dilakukan pada sediaan sitologik yang dilakukan dengan mengeringkan sediaan tersebut di udara terbuka (udara kering) atau dengan bantuan pemanasan hingga kering. Sediaan sitologik harus diproses dan dikeringkan dengan segera untuk menghindari munculnya artefak. Salah satu keuntungan dari fiksasi ini adalah pembuatan dan pewarnaan yang cepat (2-3 menit). Pewarnaan cepat berguna dalam penilaian awal dari kelayakan spesimen sebelum pasien diperkenankan untuk meninggalkan ruang pengambilan spesimen. Hal ini juga berguna pada pasien dengan indikasi keganasan hematologi seperti limfoma atau leukemia.

c. Fiksasi Basah

Fiksasi basah merupakan tindakan fiksasi dimana sediaan sitologik masih dalam kondisi basah atau lembab. Fiksasi spesimen sitologi yang dilakukan dengan segera dilakukan guna mencegah pengeringan dan perubahan bentuk sel akibat faktor luar. Metode ini adalah metode yang ideal untuk menjaga suatu sediaan sitologik baik sitologi ginekologi ataupun sitologi non-ginekologi. Larutan fiksasi basah dapat terdiri dari :

- 1) Alkohol 95-96%.
- 2) Methanol absolut.
- 3) Eter: alkohol 95%
- 4) Propanol dan isopropanol 80%
- 5) Denaturasi alkohol

d. Fiksatif “Coating”

Fiksasi Coating merupakan fiksasi yang dilakukan untuk pengganti fiksatif basah. Fiksasi ini dilakukan dengan memberikan aerosol (penyemprotan) pada spesimen sitologi yang dibuat secara konvensional maupun dengan metode berbasis cairan. Fiksasi ini terdiri dari alkohol dan polietilen glicol yang berfungsi sebagai pelapis dari sediaan sitologik. Fiksasi dengan menyemprotkan lapisan diaphine (*Hairspray*) dengan kandungan alkohol yang tinggi dan minimal lanolin atau minyak dapat juga menjadikannya fiksatif yang efektif. Sebagian besar agen-agen ini memiliki aksi ganda dalam fungsinya yaitu dengan menjaga sel dari kerusakan (fiksasi) dan pada saat kering akan membentuk lapisan tipis sebagai pelindung di atas sediaan sitologik itu. Fiksatif ini sangatlah praktis untuk situasi di mana sediaan sitologik harus dikirim ke laboratorium sitologi yang berjarak jauh dari tempat pengambilan spesimen. Namun metode ini tidak dianjurkan untuk sediaan berbasis cairan dan jika tempat pengambilan spesimen tidak berjarak jauh dengan laboratorium sitologi.

e. Fiksasi Khusus

1) Fiksasi *Carnoy*

Fiksasi ini adalah fiksasi yang dikhususnya untuk spesimen yang hemoragik. Asam asetat dalam larutan fiksatif ini akan melisiskan sel darah merah. Fiksasi ini sangat baik untuk melihat detail dari inti serta pengawet untuk glikogen. Namun fiksasi ini akan menghasilkan penyusutan pada sel dan cenderung menghasilkan pewarnaan yang lebih di *hematoxylin*. Kelebihan waktu dalam fiksasi inipun akan menyebabkan kerusakan pada materi kromatin. Ketika fiksasi ini digunakan, sediaan yang dibuat harus dalam kondisi segar dan segera dibuang ketika selesai pengamatan.

2) Fiksasi Cair (FAA)

Fiksasi ini merupakan fiksasi yang baik ketika akan membuat “*cell block*” ataupun dalam pengamatan sel dalam kondisi segar (penggunaan di parasit, mikologi dan lain sebagainya).

4. Fiksasi Sediaan Sitologi

Fiksasi spesimen sitologi yang sempurna adalah prasyarat untuk diagnosis sitologi dengan benar. Jika fiksasi jaringan seperti yang disebutkan pada topik di atas hanya dilakukan dengan tahap perendaman, berbeda dengan fiksasi pada sediaan sitologik terbagi menjadi beberapa bagian yaitu fiksasi kering, fiksasi lembab dan fiksasi basah. Pada jenis fiksasi basah, sediaan sitologik harus direndam dalam larutan fiksasi terpilih segera setelah pengambilan spesimen sitologi masih dalam kondisi yang lembab. Fiksasi spesimen sitologi yang dilakukan dengan segera dilakukan guna mencegah

pengeringan dan perubahan bentuk sel akibat faktor luar. Hasil dari fiksasi tersebut akan memungkinkan pewarnaan menjadi jelas dan tentunya menghasilkan diagnosis yang benar. Lain halnya ketika fiksasi sitologi dilakukan dengan teknik pengeringan, metode ini dilakukan untuk sel-sel yang relatif kuat dari faktor lingkungan dan digunakan untuk jenis pewarnaan yang memiliki prinsip sederhana (Kristian dan Inderiati, 2017).

Fiksasi spesimen sitologi yang dilakukan dengan segera dilakukan guna mencegah pengeringan dan perubahan bentuk sel akibat faktor luar. Hasil dari fiksasi tersebut akan memungkinkan pewarnaan menjadi jelas dan tentunya menghasilkan diagnosis yang benar. Lain halnya ketika fiksasi sitologi dilakukan dengan teknik pengeringan, metode ini dilakukan untuk sel-sel yang relatif kuat dari faktor lingkungan dan digunakan untuk jenis pewarnaan yang memiliki prinsip sederhana. Idealnya fiksasi yang dilakukan pada sediaan sitologi hampir sama kriteria dengan fiksasi yang dilakukan pada sediaan jaringan (Kristian dan Inderiati, 2017).

Kriteria-kriteria yang harus diperhatikan dalam fiksasi sediaan sitologik adalah mempenetrasi sel dengan cepat, minimal menjaga sel dari kerusakan atau kehilangan komponen sel layaknya ketika sel masih dalam kondisi hidup, menjaga secara struktur sel maupun komponen sel (kimiawi, enzimatik, imunologi), menghentikan proses metabolisme autolisis, menghentikan pertumbuhan selular dan mikroorganisme, meningkatkan diferensiasi optik dan meningkatkan pewarnaan struktur dan komponen sel (Sispita, 2019).

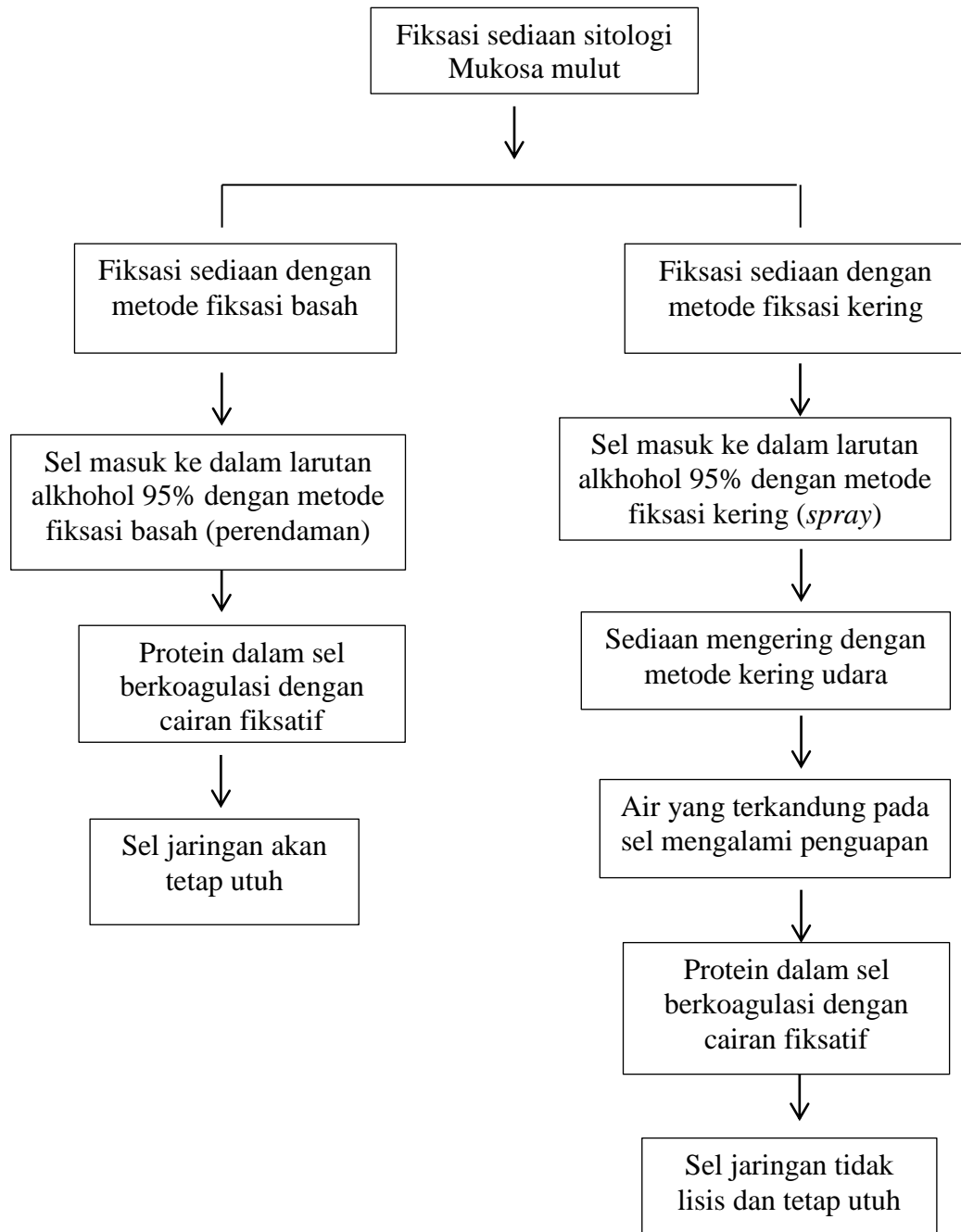
Fiksasi sediaan sitologik terbagi menjadi beberapa bagian yaitu fiksasi basah fiksasi basah merupakan tindakan fiksasi dimana sediaan sitologik masih dalam kondisi asah atau lembab. Metode ini adalah metode yang ideal untuk menjaga suatu sediaan sitologik baik sitologi ginekologi ataupun sitologi non-ginekologi. (Sispita,2019).

5. Mukosa Mulut

Sampel yang dapat difiksasi sediaan sitologinya salah satunya yaitu mukosa mulut. Mukosa Mulut adalah jaringan yang melapisi rongga mulut, terdiri dari dua bagian yaitu epitel dan lamina propia. Lamina propia mengandung serabut kolagen, serabut elastik, retikulin, dan jaringan penghubung. Lapisan di bawah lamina propia adalah lapisan submukosa, yang merupakan jaringan ikat kendur yang mengandung lemak, pembuluh darah, limfe, dan saraf (Santoso and Titien, 2013).

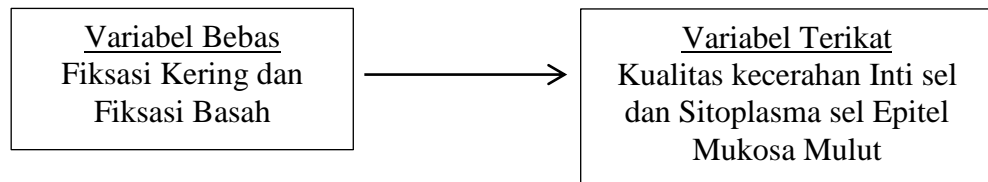
Keuntungan dari pengambilan sediaan sitologik mukosa mulut adalah metode pengambilannya yang sangat mudah, cepat dan tidak menimbulkan pendarahan pada pasien.

B. Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 2. Hubungan Antar Variabel

D. Pertanyaan Penelitian

Pada metode fiksasi basah pewarnaan papanicoloau kecerahan inti sel dan sitoplasma terlihat jelas sedangkan pada metode fiksasi kering pewarnaan papanicoloau kecerahan inti sel dan sitoplasma terlihat kurang jelas.