

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sitologi

2.1.1 Pengertian Sitologi

Sitologi berasal dari dua kata yaitu *cytos* yang berarti sel dan *logos* yang berarti ilmu pengetahuan. Jadi definisi sitologi adalah ilmu yang mempelajari tentang sel-sel tubuh manusia baik yang terlepas sendiri atau diambil dengan cara tertentu (Ekawati, 2014). Pemeriksaan sitologi adalah pemeriksaan dari cairan tubuh manusia yang kemudian diproses, yaitu dilakukan fiksasi, sentrifugasi dan diproses sampai siap menjadi slide atau preparat hapusan yang kemudian dilakukan pembacaan dengan mikroskop. Perbedaan utama antara pemeriksaan histopatologi dan sitologi adalah pada pemeriksaan histopatologi akan tampak struktur jaringan, sedangkan pada pemeriksaan sitologi hanya tampak gambaran sel-selnya tanpa terlihat struktur jaringannya (Ongko, 2018).

Pemeriksaan sitologi adalah jenis pemeriksaan yang mengamati perubahan sel akibat penyakit/jejas terhadap tubuh, keuntungannya adalah dapat dilakukan sebelum tindakan operasi (pra bedah). Adapun prinsip pemeriksaan sitologi adalah memeriksa sampel sel yang terlepas (eksfoliasi) atau yang dilakukan aspirasi, karena untuk mendapatkan hasil yang akurat harus memperhatikan antara lain pengambilan sampel, pengolahan sel di laboratorium dan pemeriksa. Pemeriksaan sitologi termasuk pelayanan deteksi dini dalam pemeriksaan kanker. Tindakan paling tepat dalam menghadapi kanker adalah melakukan pencegahan primer yaitu mengenal faktor resiko dan bahaya penyebab kanker kemudian

menghindarinya, dan pencegahan sekunder adalah melakukan deteksi kanker sedini mungkin, yang salah satunya adalah pemeriksaan sitologi, kemudian dilakukan terapi adekuat. Diharapkan angka morbiditas dan mortalitas akibat kanker dapat diturunkan dengan melaksanakan pencegahan tersebut (Tjahjono, 2012).

2.1.2 Spesimen Sitologi

Spesimen untuk pemeriksaan sitologi bisa diperoleh dengan dua cara, yaitu :

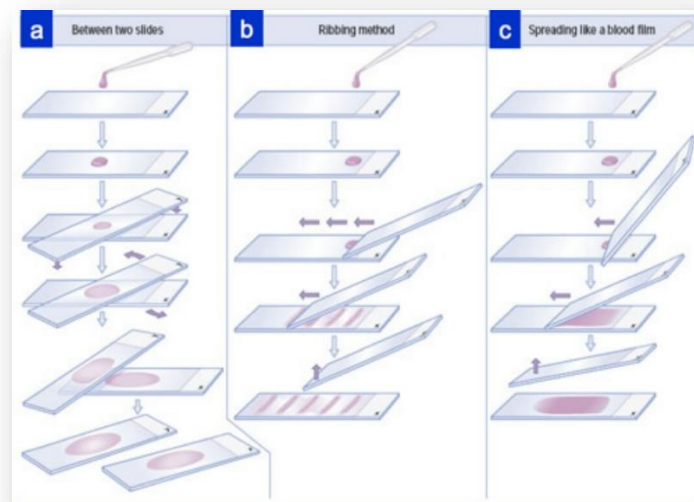
1. Spesimen cairan yang terlepas spontan dari jaringan (exfoliated cells), sesuai dengan cara pengambilan dikategorikan menjadi 2, yaitu :
 - Cairan yang sudah keluar lepas dari organ tubuh dan sewaktu-waktu bisa kita siapkan dengan mudah. Contoh : Urine, sputum.
 - Cairan yang didapat secara aspirasi pada organ tubuh yang dicurigai. Contoh : Cairan ascites, cairan BAL (Broncho Alveolar Lavage), pericardium, cairan pleura, dll. (Hernowo *et al*, 2011).
2. Spesimen yang sengaja dilepaskan dari jaringan dengan teknik sikatan/sitologi abrasif
Contoh : Sediaan pap smear, bronchial brushing (Ekawati, 2014).

2.1.3 Preparasi Spesimen Sitologi Cairan Pleura

Secara teknis, pelaksanaan pemeriksaan sitologi cairan pleura adalah dengan melakukan tindakan invasif dengan menginsersi jarum melalui dinding thorax untuk mengeluarkan cairan tersebut dari rongga pleura. Setelah didapatkan spesimen cairan pleura dapat diperiksa lebih lanjut (Djharuddin *et al*. 2017).

Setelah cairan pleura didapatkan, cairan tersebut harus segera dikirim ke laboratorium, bila karena sesuatu hal pengiriman tidak bisa dilakukan segera, spesimen hendaknya disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 4°C, namun perlu diperhatikan bahwa cairan tidak boleh dibekukan. Berbagai literatur tidak menyarankan penggunaan zat fiksatif, namun pada keadaan spesimen yang tidak bisa dikirimkan langsung ke laboratorium, dapat dipertimbangkan penggunaan fiksatif berupa alkohol 50% dengan perbandingan 1:1 dengan spesimen. Namun, perlu diperhatikan bahwa spesimen yang akan diproses tidak cocok untuk dilakukan pulasan giemsa, sehingga pulasan yang dapat dilakukan adalah Papanicolaou, demikian pula dengan pewarnaan imunositokimia atau pewarnaan imunohistokimia pada sediaan blok sel yang sediaan awalnya difiksasi dengan alkohol 50% dapat memberikan hasil yang kurang akurat. Setelah sediaan diterima di laboratorium, maka perlu dilakukan pemeriksaan makroskopis cairan pleura, antara lain: volume, warna, kejernihan, bau, dan kekentalan. Sebagian besar efusi yang mengandung sel ganas, tampak berwarna oranye atau merah gelap karena mengandung darah, namun hanya 46% efusi berdarah yang mengandung sel tumor ganas. Kelompok-kelompok sel kanker dapat terlihat dengan mata telanjang apabila ukurannya hingga 2 mm, spesimen dengan karakteristik makroskopik demikian sangat baik untuk dibuat blok sel sehingga diagnosis dapat dibuat blok sel pula. Sediaan dapat diproses dengan prosedur masing-masing laboratorium, pertama dibuat dulu hapusan pada kaca objek. Spesimen dilakukan sentrifugasi (pemusingan) dalam waktu tertentu sehingga tampak endapan dan cairan jernih. Kemudian cairan jernih ini secara hati-hati

dibuang. Endapannya dipisahkan ke objek glass dengan pipet atau alat yang serupa kemudian dilakukan apusan dengan menggunakan salah satu sisi objek glass yang lain. Cairan yang kental tadi biasanya cepat melekat pada objek glass oleh karena mengandung mukus atau protein. Bahan yang lebih encer mempergunakan suatu cara yang lain yaitu melapisi permukaan objek glass dengan albumin agar sel-sel dapat melekat dengan baik. Cara ini mengurangi bahaya sel terlepas selama tahapan pengecatan dan resiko kontaminasi dari bahan lain (Shidam *et al.*,2007).



Gambar 2.1 : Preparasi Apusan Spesimen Sitologi

(Sumber : Shidam *et al.*,2007)

2.1.4 Metode Fiksasi Spesimen Sitologi

Menurut Hernowo, *et al.* 2011. Bahan/larutan fiksasi yang sering digunakan dalam pemeriksaan sitologi antara lain alkohol (ethanol) dan methyl alkohol (methanol). Metode fiksasi spesimen sitologi terbagi menjadi 2, yaitu:

1. Fiksasi Langsung

Untuk bahan pemeriksaan sitologi berupa sediaan pap smear / hapusan. Sediaan langsung dapat difiksasi ke dalam larutan alkohol 95-96% tanpa menunggu kering selama minimal 15 menit.

Contoh : Pap smear, aspirasi biopsi, hapusan dari endapan cairan yang sudah disentrifuge.

2. Fiksasi Tidak Langsung

Untuk bahan cairan yang tidak segera dibuat sediaan hapusan. Sediaan dapat difiksasi dengan alkohol 50% dengan perbandingan 1 : 1,

Contoh : Cairan ascites, cairan pleura, dll. kecuali spesimen sputum difiksasi dengan alkohol 50% dengan perbandingan 1 : 1.

2.1.5 Prosedur Pewarnaan Preparat Sitologi

Setelah proses fiksasi selesai, sediaan kemudian dilakukan pewarnaan Papanicolaou. Tujuan pewarnaan sediaan adalah untuk melihat bagian-bagian sel hingga mudah dikenal dibawah mikroskop. Ada 2 pewarna pokok, yang satu berdaya mewarnai inti sel dan memperlihatkan strukturnya dan yang lain berdaya mewarnai sitoplasma. *Hematoxylin* paling sering dipakai untuk pewarnaan inti, dan untuk sitoplasma digunakan 2 macam pewarna yaitu *EA* dan *OG*. Tahapan pertama sebelum sampai pada *hematoxylin* adalah proses hidrasi sel, karena

hematoxylin adalah larutan cat dalam air. Dua pewarna lainnya adalah pewarna sitoplasma, adalah larutan cat dalam alkohol, maka sesudah pengecatan inti dengan *hematoxylin*, sel harus di dehidrasi pula melalui celupan beberapa larutan-larutan alkohol dengan berbagai kepekatan. Sebelum pemeriksaan sediaan, sel harus dibersihkan dari air yang ada. Bila air tertinggal dalam sel, sediaan yang dicelupkan ke dalam larutan xylol pembersih, akan menimbulkan kabut putih di dalam xylol tersebut. Bila hal ini terjadi, sediaan harus diulang melalui larutan alkohol yang terakhir. Tiap laboratorium sedikit berbeda dalam proses pengecatan, terutama mengenai lamanya waktu dari 3 cat dasar tersebut. Hal ini tidak begitu berarti, karena pekerja di tiap laboratorium akan segera menguasai cara-caranya sendiri dan mengetahui nada pengecatannya. Setelah pengecatan selesai, gelas penutup dipakai pada tiap sediaan dengan menggunakan perekat depex. Tidak boleh ada gelembung udara, dan tidak boleh terlalu banyak depex. Keringnya depex memakan waktu hingga 60 menit, setelah itu sediaan siap diperiksa di bawah mikroskop (Soedoko, 1996).

Keuntungan yang diperoleh dari metode pewarnaan Papanicolaou ini adalah mewarnai inti sel dengan jelas sehingga dapat dipergunakan untuk melihat inti apabila terdapat kemungkinan keganasan, menggunakan pewarna banding yang berbeda dengan pewarna utama untuk mewarnai sitoplasma, sehingga warna inti tampak lebih kontras, warna yang cerah dari sitoplasma memungkinkan dapat dilihatnya sel-sel lain di bagian bawah yang saling bertumpuk (Hernowo *et al*, 2011).

2.2 Quality Control Pemeriksaan Sitologi

Sampai saat ini interpretasi pemeriksaan histopatologi dan sitopatologi masih merupakan baku emas (standar emas) untuk diagnosis sebagian besar penyakit keganasan. Penanganan dan pengolahan bahan pemeriksaan histopatologi dan sitopatologi yang baik ikut menentukan ketepatan diagnostik dan hasil interpretasi sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut untuk pemeriksaan molekuler dan genetik.

Pengolahan dan penanganan bahan pemeriksaan meliputi fase pre analitik dan analitik. Fase pre analitik yaitu spesimen yang telah diidentifikasi sumber, tingkat kekeruhan dan gejala awal serta diagnosis awal pasien, kemudian dilakukan pembuatan sediaan sitologi, adapun hal-hal yang harus diperhatikan sebelum teknik dilakukan adalah,

1. Melabel semua spesimen dengan identifikasi pasien, tanggal, dan sumber spesimen. Menggunakan pensil tebal untuk melabel slide dan tidak menggunakan stiker label.
2. Memberi jarak kurang lebih 2 cm dari atas dan bawah kaca objek untuk melakukan pembuatan sediaan. Hal ini dikarenakan ada beberapa mikroskop yang tidak mampu membaca ke ujung kaca objek.
3. Tidak menggunakan formalin untuk melakukan fiksasi sitologi, kecuali ketika akan dilakukan pembuatan sitoblok.
4. Mengirim secepat mungkin spesimen yang didapatkan dari pasien. Perubahan dapat terjadi dengan cepat pada spesimen sitologi seperti perubahan pada mikroorganisme (30 menit) dan fagositosis eritrosit (beberapa jam setelah

spesimen di dapat). Namun ketika spesimen sulit untuk diproses (jarak laboratorium jauh atau jumlah sediaan yang akan diproses terlalu banyak), maka spesimen dapat disimpan ke dalam lemari pendingin, hindari kontak langsung dengan es dan jangan dibekukan.

Fase analitik dimulai dari pengolahan bahan sampai sediaan siap dibaca oleh Spesialis Patologi Anatomi. Untuk memperoleh kualitas sediaan sitologi yang baik yang berasal dari cairan, ada beberapa tips yang dapat digunakan sebelum dilakukan pembuatan sediaan sitologi, antara lain :

1. Memastikan kaca objek benar-benar bersih
2. Menghindari teknik penyemprotan tanpa dilakukan penyebaran. Hal ini dapat menyebabkan sel menumpuk bahkan sulit untuk dilakukan interpretasi.
3. Membuat hapusan dengan tekanan yang lembut
4. Melakukan fiksasi secepat mungkin (fiksasi basah atau kering)

(Khristian *et al.*,2017).

Membuat sediaan sitologi yang berkualitas sangat diperlukan untuk memperoleh hasil yang meyakinkan dan akurat. Hal tersebut bisa dicapai dengan mencegah kesalahan di laboratorium patologi anatomi, dan mengontrol kualitas dari suatu proses pada tahap pra analitik, post analitik dan pasca analitik. Disamping itu adekuasi dari pemeriksaan sitologi dapat dikonfirmasi dengan pemeriksaan histopatologi sebagai gold standart diagnosa patologi anatomi, atau dengan pemeriksaan pelengkap yaitu pemeriksaan blok sel dari sisa endapan spesimen cairan sitologi yang diproses menggunakan teknik histopatologi.

Richardson *et al.*, Dekker dan Bupp telah menunjukkan bahwa diagnosis tambahan kanker dapat diperoleh dalam spesimen cairan jika teknik hapusan konvensional sitologi ditambah dengan pemeriksaan blok sel dari bahan residu. Spesimen blok sel dapat dilanjutkan ke pemeriksaan khusus seperti *Periodic Acid-Schiff (PAS)*, *alcian blue* dan imunositokimia (ICC).

Menurut penelitian Dey *et al.*, berdasarkan fitur morfologi (keutuhan membran sel, karakteristik sitoplasma, membran inti, pola kromatin inti, dan ada atau tidak adanya nucleolus, keberadaan mikrovili, dan jarak antar sel, teknik blok sel memberikan gambaran yang jauh lebih baik sebesar 81,48% dibandingkan dengan hapusan konvensional sebesar 51,85%. Berdasarkan keawetan pola arsitektur sel, jauh lebih terawetkan dengan baik pada spesimen blok sel sebesar 88,88% daripada hapusan konvensional sebesar 44,44%. Sensitivitas dan spesifisitas blok sel dibandingkan dengan hapusan konvensional sitologi dalam mendeteksi keganasan masing-masing adalah 88,88% dan 86,98%. Perbandingan teknik konvensional sitologi dengan metode blok sel ditemukan bahwa blok sel menghasilkan hasil yang jauh lebih baik saat mendeteksi lesi ganas dan mengurangi hasil yang mencurigakan.

2.3 Blok Sel

2.3.1 Pengertian Blok Sel

Blok sel adalah endapan cairan dari spesimen sitologi yang ditanam dalam blok parafin, yang prosesnya meliputi fiksasi, dehidrasi, impregnasi,



Gambar 2.2 : Langkah Pemeriksaan Blok Sel Secara Umum

(Sumber : Jain D. *et al.*,2014)

pengeblokan, pemotongan, pewarnaan dan pemeriksaan mikroskopis yang dipersiapkan dari suspensi sel dari semua cairan (yaitu aspirasi dan pencucian), endapan sel yang terbentuk dari sentrifugasi atau penyaringan dan agregasi yang dihasilkan yang kemudian diproses dan diibaratkan seolah-olah sampel tersebut adalah spesimen padat dari jaringan. (Farlex, 2012).

2.3.2 Fungsi Pemeriksaan Blok Sel

Menurut Heriyanto, 2017. Fungsi dari pemeriksaan blok sel adalah sbb.:

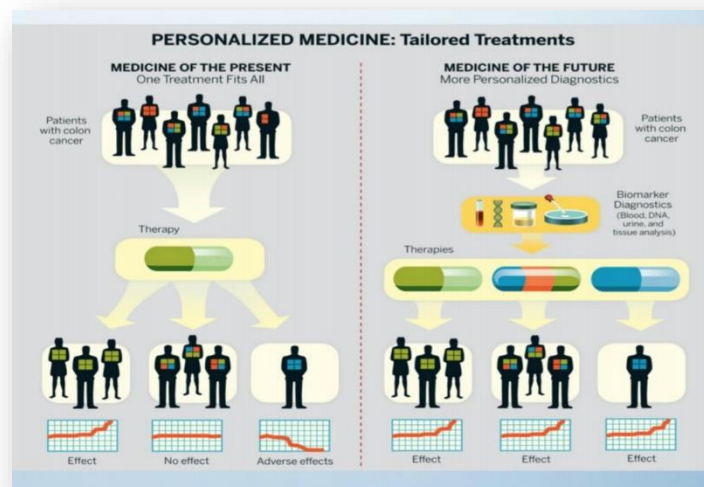
1. Blok sel membuka kesempatan untuk menilai struktur histologis dan melakukan pemeriksaan tambahan.
2. Memanfaatkan sisa material yang menggumpal seperti fragmen jaringan.
3. Ketersediaan blok sel memungkinkan untuk dilakukan pembedahan berulang yang lebih banyak.
4. Teknik pengerjaan yang sederhana dan penyimpanan blok sel yang lebih mudah.
5. Ketersediaan blok sel memungkinkan dapat menunjang pemeriksaan lanjutan seperti pewarnaan khusus, imunositokimia, mutasi EGFR.

Dalam penelitiannya, Shivakumarswamy *et al.*, 2012 juga mengemukakan fungsi dari blok sel meliputi :

1. Pengakuan pola histologis penyakit yang kadang-kadang tidak dapat diidentifikasi secara handal dalam hapusan konvensional.
2. Memungkinkan untuk mempelajari beberapa bagian dengan pewarnaan rutin, pewarnaan khusus dan prosedur imunositologi.
3. Lebih sedikit penyebaran sel, yang memungkinkan pengamatan mikroskop lebih mudah daripada hapusan konvensional.
4. Lebih sedikit kesulitan meskipun latar belakang menunjukkan kelebihan darah pada pengamatan mikroskopis.
5. Kemungkinan menyimpan slide untuk studi retrospektif. Penyimpanan hapusan konvensional adalah masalah praktis.

2.3.3 Tujuan Pemeriksaan Blok Sel

Ketersediaan terapi bertarget molekuler, pemeriksaan blok sel memungkinkan untuk pemeriksaan lanjutan seperti imunositokimia dan mutasi EGFR untuk mendapatkan karakterisasi molekuler tiap individu yang bertujuan untuk membantu menentukan terapi yang lebih spesifik terhadap pasien kanker sehingga pengobatan yang lebih sesuai dapat dilaksanakan. (Jain D.*et al.* 2014).



Gambar 2.3 : Pengobatan Personal Dengan Perawatan Disesuaikan

(Sumber : Heriyanto, 2017)

2.3.4 Spesimen Pemeriksaan Blok Sel

Sel blok sitologi dapat dibuat dari hampir semua jenis sampel sitologi, seperti cairan pleura, cairan ascites, cairan pericardium, washing peritoneum, BAL (Broncho Alveolar Lavage), dll. Dey *et al.*, juga menyebutkan bahwa bahan sisa setelah pemeriksaan sitologi yang biasanya dibuang, dapat digunakan dalam persiapan pemeriksaan blok sel.

Dalam era kedokteran saat ini, spesimen sitologi, termasuk blok sel, menambah kegunaan sampel sitologi dalam menganalisis perubahan molekuler seefektif biopsi bedah atau spesimen reseksi. Dengan ketersediaan terapi bertarget molekuler untuk banyak kanker, sejumlah besar penelitian baru-baru ini telah menggunakan bahan sitologi atau blok sel untuk karakterisasi molekuler (Jain *et al.* 2014).

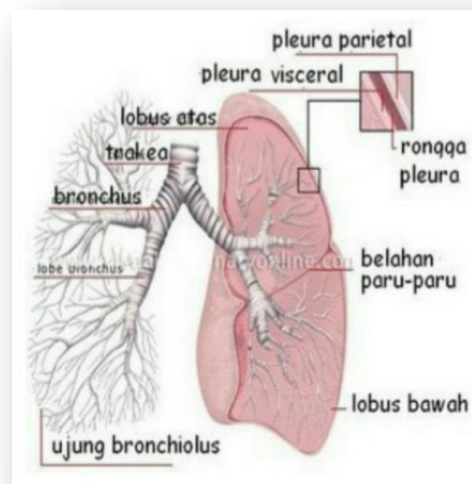
Permintaan tertinggi untuk pemeriksaan blok sel di RSUD Dr. Soetomo selama tahun 2018 adalah dari spesimen cairan pleura. Dari total 415 sampel selama satu tahun untuk pemeriksaan blok sel, 99% spesimen adalah dari cairan pleura, dan sisanya adalah cairan pericardium.

Penyebab paling umum dari efusi pleura ganas adalah karsinoma paru-paru pada pria. Pada wanita, penyebab paling umum efusi pleura adalah karsinoma payudara (Dey, *et al.* 2017).

Berdasarkan keterangan di atas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian dengan menggunakan spesimen cairan pleura.

2.3.4.1 Pleura

Paru-paru dilapisi oleh lapisan pembungkus yang disebut pleura, yang tersusun oleh jaringan ikat fibrosa yang di dalamnya banyak terdapat kapiler limfa dan kapiler darah. Pleura juga disusun oleh sel terutama fibroblast, dilapisi mesothel. Pleura merupakan membran halus, licin, tipis yang membungkus dinding anterior thoraks dan superior diafragma. (Adita, 2015).



Gambar 2.4 : Anatomi Paru dan Pleura

(Sumber : Adita, 2015)

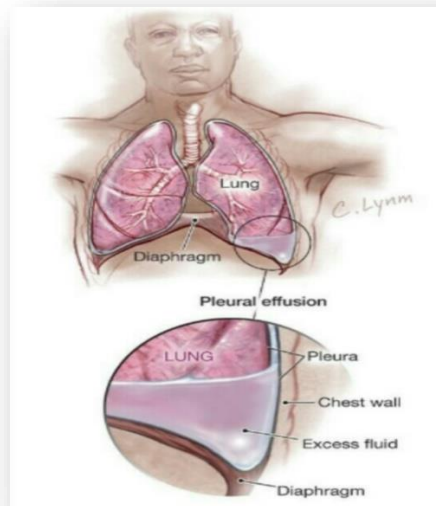
Rongga pleura dibatasi oleh pleura parietal dan visceral. Pleura parietal menutupi permukaan dalam dari rongga dada, termasuk mediastinum, diafragma, dan tulang rusuk. Pleura visceral menyelubungi seluruh permukaan paru-paru, termasuk celah interlobar. Ruang pleura kanan dan kiri dipisahkan oleh mediastinum. Tebal rongga pleura 10-20 mikron, berisi cairan 25-50 cc yang berfungsi sebagai pelicin agar paru dapat bergerak leluasa saat bernafas. Pleura parietalis dan viseralis terdiri atas selapis mesothel (yang memproduksi cairan), membrane basalis, jaringan elastik, dan kolagen, pembuluh darah dan limfe, membrane pleura bersifat semipermeabel. Sejumlah cairan terus merembes keluar dari pembuluh darah yang melalui pleura parietal. Cairan ini yang diserap oleh pembuluh darah pleura viseralis, dialirkan ke pembuluh limfe dan kembali ke darah. Diantara kedua lapisan ini terdapat rongga yang disebut cavum pleura.

Cavum ini terdapat sedikit cairan pleura yang berfungsi agar tidak terjadi gesekan antar pleura pada saat pernafasan. Keluar masuknya cairan dari dan ke pleura harus seimbang agar nilai cairan pleura dapat dipertahankan (Astowo, 2013).

2.3.4.2 Efusi Pleura

Efusi pleura berasal dari dua kata, yaitu *effusion* yang berarti ekstravasasi cairan ke dalam jaringan atau rongga tubuh, sedangkan pleura yang berarti membran tipis yang terdiri dari dua lapisan yaitu pleura viseralis dan pleura parietalis. Sehingga dapat disimpulkan efusi pleura merupakan ekstravasasi cairan yang terjadi diantara lapisan viseralis dan parietalis. Efusi pleura dapat berupa cairan jernih, transudate, eksudat, darah, dan pus (Diane, 2000).

Efusi pleura juga dapat diartikan sebagai keadaan dimana terdapat kelebihan jumlah cairan dalam rongga pleura, yang dihasilkan dari produksi cairan yang berlebihan atau penurunan penyerapan atau keduanya (Adita, 2015).



Gambar 2.5 : Individu Dengan Efusi Pleura

(Sumber : Adita, 2015)

Rongga pleura dalam keadaan normal berisi sekitar 10 – 20 ml cairan yang berfungsi sebagai pelicin agar paru dapat bergerak dengan leluasa saat bernafas. Biasanya, cairan memasuki rongga pleura dari kapiler pada pleura parietal dan dibuang melalui lubang-lubang kecil di diafragma. Limfatik memiliki kapasitas untuk menyerap cairan 20 kali lebih daripada yang terbentuk secara normal. Oleh karena itu, efusi pleura dapat berkembang bila ada formasi cairan pleura berlebihan (dari ruang interstisial paru-paru, pleura parietal, atau rongga peritoneum) atau bila terjadi penurunan pembuangan cairan oleh limfatik (Adita, 2015).

Pemeriksaan makroskopis cairan pleura sangat membantu dalam menentukan apakah efusi tersebut termasuk transudat atau eksudat. Walaupun banyak transudat dan beberapa eksudat tampak jernih, kekuning-kuningan, tidak berbau dan non viscous, tampak berdarah, keruh, milky atau tampak kental bisa menunjukkan sebab dari efusi pleura tersebut. Secara umum cairan pleura dapat diklasifikasikan menjadi transudat atau eksudat. Transudat berasal dari ultrafiltrasi membran dan mengandung protein yang rendah, sedangkan eksudat terbentuk dari sekresi aktif atau kebocoran membran dan mengandung protein yang tinggi. Adanya efusi transudat menunjukkan adanya proses non-inflamasi yang disebabkan oleh gangguan tekanan hidrostatik atau tekanan osmotik koloid dengan tanpa adanya keterlibatan penyakit pleura. Adanya cairan eksudat menunjukkan adanya keterlibatan pleura dalam proses inflamasi atau proses keganasan yang menyebabkan adanya peningkatan permeabilitas kapiler. Tes non biokimia seperti misalnya tes sitologi dapat digunakan sebagai alat diagnostik,

yang dapat menunjukkan adanya sel ganas, dan pengecatan terhadap mikroorganisme sebelum dilakukan kultur. Nilai diagnostik sitologi cairan pleura dalam efusi keganasan dilaporkan berkisar antara 40-87% (Wande, 2016).

Akumulasi cairan melebihi volume normal dan menimbulkan gangguan jika cairan yang diproduksi oleh pleura parietal dan visceral tidak mampu diserap oleh pembuluh limfe dan pembuluh darah mikropleuravisceral atau sebaliknya yaitu apabila produksi cairan melebihi kemampuan penyerapan. Akumulasi cairan pleura melebihi normal dapat disebabkan oleh beberapa kelainan antara lain infeksi dan kasus keganasan di paru atau organ luar paru (Syahrudin, 2009).

Efusi pleura merupakan indikator dari suatu proses penyakit yang mendasari yang mungkin berasal dari paru atau bukan dari paru dan dapat bersifat akut atau kronis. Meskipun etiologi efusi pleura luas, efusi pleura paling sering disebabkan oleh gagal jantung kongestif, pneumonia, emboli paru atau keganasan (Adita, 2015).

Efusi pleura ganas sering terjadi pada kasus kanker dan merupakan salah satu faktor penyulit pada penatalaksanaan kanker paru. Meskipun belum ada penelitian epidemiologi untuk efusi pleura ganas, tetapi insidensinya dapat diestimasi berdasarkan data-data yang ada yaitu sekitar 15% dari seluruh penyakit keganasan. Efusi pleura ganas dapat disebabkan oleh hampir semua jenis keganasan, dan hampir sepertiga kasus efusi pleura ganas disebabkan oleh kanker paru (Syahrudin, 2009).

Kanker paru adalah salah satu jenis penyakit paru yang memerlukan penanganan dan tindakan yang cepat dan terarah. Penegakan diagnosis penyakit

ini membutuhkan keterampilan dan sarana yang tidak sederhana dan memerlukan pendekatan multidisiplin kedokteran kanker paru dalam arti luas adalah semua penyakit keganasan di paru, mencakup keganasan yang berasal dari paru sendiri maupun keganasan dari luar paru / metastasis tumor di paru. Banyak cara untuk mendapatkan spesimen sitologi dari paru diantaranya adalah *bronchial washing*, *sputum cytology*, *pleural effusion cytology*, *bronchoalveolar lavage* dan *transtorachal biopsy (with FNAB)*. Prosedur pengambilan sitologi ini *relative less invasive* (Prandani, 2014).

Diagnosa efusi pleura ganas adalah dengan penemuan sel ganas pada cairan pleura atau jaringan cairan pleura (Syahrudin, dkk. 2009). Mesothelioma ganas adalah tumor paru primer yang muncul dari sel-sel mesothelial yang melapisi rongga pleura. Pasien dengan mesothelioma mengalami nyeri dada dan sesak nafas (Adita, 2015).

Gambaran mikroskopik komposisi normal cairan pleura adalah sel mesothelial 3-70%, monosit 30-75%, limfosit 2-30%, granulosit 10%. Sel-sel patologis pada cairan pleura antara lain sel neutrophil (menunjukkan adanya infeksi akut), sel limfosit (menunjukkan adanya infeksi kronis seperti pleuritis Tb atau Limfoma Maligna), sel mesothel (bila jumlahnya meningkat maka menunjukkan adanya infark paru), sel mesothel maligna pada mesothelioma (Mescher, 2016).

Gambaran morfologi mesothelioma ganas dapat berupa sel-sel tunggal maupun berkelompok. Pada umumnya sel membesar. Bentuk sel bulat maupun oval. Bentuk gelondong sukar ditemukan. Pada tumor berdiferensiasi baik batas

sel tegas, pada diferensiasi yang lebih jelek batas sel semakin tidak jelas. Pada tumor yang berdiferensiasi lebih jelek, sel-sel yang besar kadang-kadang menyerupai sel skuamosa. Disamping itu sering ditemukan pula sel-sel raksasa multinuclear dengan inti atypik, anak inti jelas dan sitoplasma mengandung vakuola-vakuola kecil di perifer (Ghozali, 1993).

Kelompokan sel tumor dapat berbentuk bulat menyerupai bola, lembaran, atau papiler terdiri dari sel-sel yang padat, dengan gambaran *scalloped*, atau *knobby*, kadang-kadang ditemukan badan *psammoma*. Pada bentuk papilar sering ditemukan stroma fibrovaskular, yang lebih memperkuat diagnosis mesothelioma ganas. Bentuk lain yang sering ditemukan adalah roset dan asinar (Ghozali, 1993).

Inti sel tumor membesar, tapi rasio antara inti dan sitoplasma masih mendekati normal, karena sitoplasma juga membesar. Letak nukleus sentral, parasentral, atau eksentrik. Kadang-kadang bentuk inti irregular. Inti sel hiperkromatis dengan kromatin tersebar tidak teratur, anak inti jelas. Bahkan adapula yang semakin tidak terdiferensiasi, yaitu kromatin inti semakin kasar dan anak inti semakin membesar (Ghozali, 1993).

Sitoplasma eosinofil atau kadang kadang basofil. Pada sitoplasma sering ditemukan ruangan intrasel yang disebut *window*, vakuolisasi buih maupun vakuola besar yang mendesak inti sehingga membentuk sel cincin stempel (*signet*) (Ghozali, 1993).

Sedangkan untuk gambaran sel adenokarsinoma dapat berupa sel-sel tunggal maupun kelompokan seperti pada mesothelioma ganas. Pada

adenokarsinoma yang berdiferensiasi baik dapat ditemukan bentuk asinar yang murni (Ghozali, 1993).

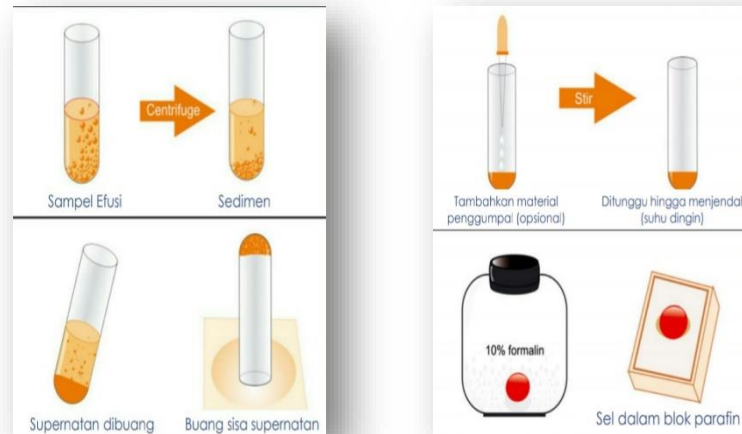
Diagnosa dapat berdasarkan anamnesa, pemeriksaan fisik, foto toraks dan torakosintesis. Langkah awal yang penting untuk diagnosis efusi pleura ganas adalah dengan melakukan pemeriksaan terhadap cairan yang dapat dilakukan di laboratorium klinik maupun laboratorium patologi anatomi. Sampel cairan yang dikirim ke laboratorium patologi anatomi diperiksa secara sitopatologi dan histopatologi. Teknik sitopatologi merupakan teknik yang cukup aman, ekonomis, dan cepat untuk mendapatkan hasil. Pemeriksaan dengan teknik histopatologi atau biasa disebut teknik histologi blok sel (Kodandaswamy *et al*, 2013).

Pemeriksaan sitologi adalah pemeriksaan yang dilakukan untuk mencari dan menilai setiap struktur sel yang ditemukan untuk deteksi kanker serta kelainan genetik dan hormonal. Dilanjutkan dengan pemeriksaan histoblok sel dimana pada teknik pemeriksaan ini menggunakan endapan cairan dari pemeriksaan sitologi (Boon *et al*. 2006).

2.3.5 Prosedur Pemeriksaan Blok Sel

Teknik blok sel itu sendiri bukan hal yang baru. Prosesnya yaitu perpaduan antara histologi dan sitologi. Untuk tahap sitologi, sebaran-sebaran seluler dan fragmen jaringan diisolasi dari cairan serosa melalui proses sentrifugasi. Untuk persiapan histologi dapat dibuat dari sedimen yang sama (terutama jika gumpalan seluler dan potongan-potongan kecil jaringan terlihat), selanjutnya secara manual sedimen tersebut diproses menjadi gumpalan dengan menambahkan koagulan, kemudian diproses menjadi blok sel dengan membungkus gumpalan tersebut ke

dalam kertas saring dan memasukkannya ke dalam kaset jaringan. Dan tahap selanjutnya adalah proses histologi. Keuntungan utama bagi ahli patologi dari teknologi tersebut adalah bahwa sel-selnya menyerupai sel-sel yang terlihat dalam histologi. (Smalley et al. 1992).



Gambar 2.6 : Langkah Pemrosesan Blok Sel

(Sumber : Heriyanto, 2017)

Untuk tahap pengolahan histologi blok sel efusi pleura menurut Boon and Drijver (2006), diawali dengan proses fiksasi yang bertujuan untuk mencegah terjadinya autolisis dan pengaruh bakteri, mempertahankan bentuk sel jaringan mendekati kondisi sebelum fiksasi, memungkinkan proses pengolahan jaringan selanjutnya berjalan dengan baik, mempertahankan komponen jaringan. Pada pemeriksaan sitologi, cairan fiksasi yang digunakan untuk hapusan adalah alkohol 96%, sedangkan untuk cairan segar menggunakan alkohol 50%.

Dehidrasi yaitu proses penarikan air dari dalam jaringan/sel. Larutan yang digunakan dalam dehidrasi ini adalah alkohol dari konsentrasi rendah hingga konsentrasi tinggi (kadar 70%, ke kadar 80%, ke kadar 90%, hingga kadar 100%).

Penjernihan (*clearing*) adalah suatu proses penarikan alkohol dari jaringan dan menggantinya (substitusi) dengan larutan yang dapat berikatan dengan parafin yaitu xylol. Jaringan tidak dapat langsung dimasukkan ke dalam parafin karena alkohol dan parafin tidak bisa saling melarutkan.

Impregnasi adalah proses mengeluarkan xylol dari dalam jaringan untuk digantikan (disubstitusikan) dengan parafin. Pada tahap impregnasi, jaringan harus benar-benar bebas dari xylol, karena sisa cairan penjernih dapat mengkristal, dan pada saat dilakukan pemotongan blok parafin, jaringan akan menjadi mudah robek.

Pengeblokan (*embedding*) adalah proses pembuatan blok parafin. Dengan menanamkan atau memasukkan jaringan ke dalam cetakan untuk memudahkan proses pemotongan dengan mikrotom. Menggunakan cetakan *base mould*, yaitu cetakan yang terbuat dari logam yang tidak berkarat. Tujuan dari proses ini adalah untuk membuat blok parafin menjadi preparat permanen.

Pemotongan (*sectioning*) adalah proses pemotongan blok parafin dengan menggunakan mikrotom untuk mendapatkan sediaan jaringan yang tipis, rata dan tidak melipat ataupun terputus saat diletakkan pada gelas obyek. Dan ketebalan potongan diatur 5-7 mikron.

Pewarnaan merupakan proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong agar unsur jaringan mudah dikenali pada saat pengamatan dengan

menggunakan mikroskop. Sebelum dilakukan proses pewarnaan, obyek glass yang telah direkatkan dengan pita parafin berisi sampel, diletakkan pada hotplate pada suhu 60⁰C. Tujuan dari tahap ini adalah untuk menghilangkan parafin sehingga hanya sampel yang akan diamati saja yang menempel pada objek glass. Pewarnaan rutin yang digunakan pada laboratorium Patologi Anatomi adalah Hematoxyllin-Eosin (HE). Pada pewarnaan HE digunakan dua macam zat warna, yaitu Meyer Hematoxillyn yang berfungsi untuk memberikan warna biru (basofilik) pada inti sel, serta Eosin yang berfungsi untuk memberikan warna merah pada sitoplasma.

2.3.6 Fiksasi dan Koagulan Pemeriksaan Blok Sel

Untuk membuat suatu sediaan yang baik, sel dan jaringan yang akan diamati diharapkan sangat mirip dengan kondisi ketika masih hidup. Oleh karena itu, bagian penting daripada teknik pembuatan sediaan sitologi adalah bagaimana caranya agar sel dapat tetap terjaga secara alami. Untuk mencapai hal ini, maka sel yang dibuat dengan teknik apusan harus segera diawetkan pada suatu cairan yang disebut dengan teknik fiksasi. Menurut definisi, fiksasi mengubah komposisi kimia sel, fiksasi dapat juga menyebabkan perubahan fisik pada komponen seluler maupun ekstraseluler. Mekanisme kerja dari fiksasi pada dasarnya adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk ketika masih di tubuh. Secara teknis, fiksasi bertujuan untuk mencegah atau menahan proses degeneratif yang dimulai segera setelah cairan keluar dari tubuh. (Khristian *et al.* 2017).

Sedangkan untuk menghasilkan efek fiksasi dengan baik, ada beberapa faktor yang harus dipenuhi oleh suatu proses fiksasi, antara lain :

1. Koagulasi

Koagulasi adalah proses penggumpalan partikel koloid di dalam sel karena adanya penambahan bahan kimia atau pemberian perlakuan fisik sehingga partikel-partikel tersebut bersifat netral dan membentuk endapan. Koagulasi pada proses fiksasi dapat terjadi pada protein yang ada di dalam sel atau kandungan lainnya yang dianggap perlu dipertahankan akibat degradasi yang terus berlangsung. Secara kimiawi, protein di dalam sel diubah secara fungsional maupun struktural. Perubahan tersebut dapat dilakukan dengan cara koagulasi dan atau membentuk senyawa aditif baru. Senyawa aditif terbentuk dengan cara ikatan silang antara dua makromolekul yang berbeda, yakni komponen di larutan fiksasi dan protein di dalam sel. Ikatan silang tersebut akan menyebabkan sel tahan terhadap gerakan air dan juga cairan lainnya yang mempengaruhi sel itu dan dengan adanya koagulasi struktur sel menjadi lebih stabil. Prinsip lainnya adalah menginaktivasi enzim yang ada di dalam sel, sehingga aktivitas metabolisme sel tidak terjadi dan menghentikan proses autolisis.

2. Presipitasi

Secara umum pengertian presipitasi adalah pengendapan yang terjadi akibat koagulasi yang terjadi sebelumnya. Presipitasi protein adalah pengendapan yang terjadi secara intrasel akibat penggumpalan yang

parsial. Presipitasi ini disebabkan oleh berkurangnya tingkat kelarutan protein yang terjadi akibat adanya penambahan senyawa kimia yang berdampak terhadap perubahan senyawa kimia baru. Seperti halnya koagulasi, presipitasi juga terjadi karena faktor kimia dan fisika. Dengan adanya presipitasi protein ini maka akan menyebabkan berkurangnya tingkat kelarutan suatu protein yang berdampak terhadap kekuatan sel dari kerusakan baik secara internal maupun eksternal.

- **Alkohol**

Khristian *et al.* 2017 dalam bukunya membahas bahwa, alkohol adalah larutan fiksasi yang paling ideal untuk bahan/spesimen sitologi, baik sitologi ginekologi maupun sitologi non ginekologi. Kadar alkohol yang digunakanpun bermacam-macam, dapat terdiri dari :

- a. Alkohol 95-96%

Larutan ini merupakan larutan fiksasi yang paling ideal yang dianjurkan pada sebagian besar laboratorium sitologi. Hasil dari fiksasi ini menghasilkan karakteristik inti yang ideal. Alkohol 95-96% ini adalah larutan dehidrasi dan dapat menyebabkan penyusutan sel karena akan menggantikan air di dalam sel. Penggunaan ethanol absolutpun sebenarnya dapat dilakukan, namun biaya yang dikeluarkan relative lebih besar. Dalam teori lain menyebutkan bahwa dengan pemberian alkohol 95-96% ini akan membuat sel menjadi lebih kuat merekat dengan kaca sediaan dibandingkan ketika sediaan basah dimasukkan ke dalam konsentrasi yang lebih rendah.

b. Methanol Absolut

Metanol absolut ini merupakan larutan fiksasi yang digunakan untuk sediaan berbasis cairan seperti *Thin prep*, *Sure prep* dan lain sebagainya. Penggunaan larutan ini sebenarnya baik karena menghasilkan sediaan yang tidak begitu menyusut jika dibandingkan dengan alkohol 95-96%.

c. Eter : Alkohol 95%

Fiksasi basah menggunakan campuran eter : alkohol 95% = 1:1 merupakan fiksasi awal yang digunakan untuk fiksasi sediaan pap smear. Hasil dari fiksasi menggunakan campuran ini menghasilkan sediaan yang lebih baik dibanding dengan alkohol 95-96%. Namun eter yang digunakan memiliki sifat yang berbahaya, berbau dan mudah mengikat air di sekitar (higroskopis).

d. Propanol dan Isopropanol

Propanol dan isopropanol menyebabkan penyusutan sel lebih sedikit dari eter-ethanol atau methanol. Penggunaan prosentase lebih rendah dari alkohol ini, penyusutan diseimbangi oleh efek pembengkakan akibat air yang ada dalam larutan fiksasi. Oleh karena itu, 80% propanol atau isopropanol merupakan pengganti ethanol 95-96% yang direkomendasikan.

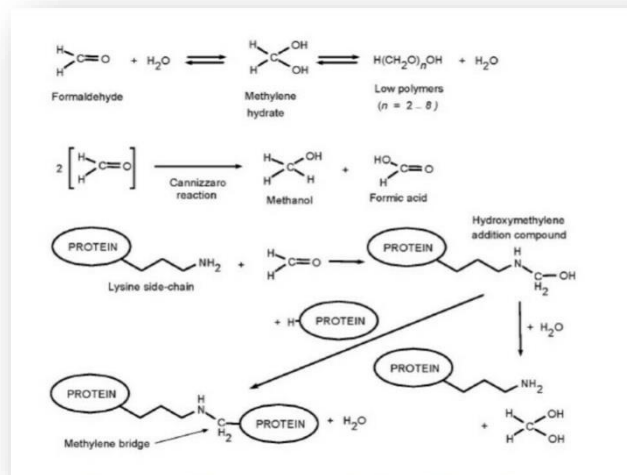
e. Denaturasi alkohol

Denaturasi alkohol ini merupakan ethanol yang telah diubah dengan penambahan aditif sehingga tidak cocok untuk dikonsumsi oleh manusia. Ada banyak formula yang berbeda untuk denaturasi alkohol. Namun dari semua denaturasi alkohol, pada dasarnya semua mengandung ethanol sebagai bahan utama dan karenanya ini dapat digunakan pada konsentrasi 95% atau 100%.

Salah satu formulasi yang telah digunakan adalah campuran dari 90 bagian ethanol 90% + 5 bagian 100% methanol + 5 bagian 100% isopropanol.

- **Formalin**

Formalin merupakan nama dagang dari suatu larutan yang mengandung 40% b/v (=40% b/b) formaldehida (yang merupakan gas) di dalam air. Sebagian besar formaldehida hadir sebagai polimer larut, yang dipolimerisasi pada suatu larutan. Formalin mengandung sekitar 10% methanol, yang ditambahkan oleh produsen untuk menghambat pembentukan polimer yang lebih tinggi, yang menghasilkan suatu larutan yang biasa disebut dengan paraformaldehida. Ketika penyimpanan formalin di tempat yang dingin, maka akan terdapat endapan bubuk putih. Formaldehida dalam larutan dapat melakukan reaksi dengan sendirinya (reaksi Cannizzaro) dan berubah menjadi methanol dan asam formiat. Monomer formaldehida hampir seluruhnya mengandung metilen hidrat, senyawa lain yang dibentuk akibat reaksi yang reversibel dengan air. Formaldehida itu sendiri adalah senyawa yang bereaksi dengan protein dan ada pada konsentrasi yang sangat rendah yaitu 4% formaldehida dalam larutan. Struktur kimia formaldehida terlihat dalam gambar.



Gambar 2.7 : Struktur Kimia Formalin Dan Reaksinya Dengan Protein.

(Sumber : Khristian *et al.* 2017)

Larutan fiksatif yang paling umum digunakan untuk histopatologi adalah larutan 4% formaldehida yang biasa disebut dengan formalin 10%. Penggunaan larutan ini telah 50 tahun digunakan, hal ini dikarenakan larutan fiksatif dapat mempertahankan pH netral dan memiliki tekanan osmotik yang sama dengan cairan ekstraseluler. Untuk memastikan bahwa penggunaan formalin mencapai pH yang netral, maka dilakukan menambah garam sehingga disebut sebagai neutral buffered formalin atau NBF. Larutan NBF melakukan kerjanya sebagai agen fiksasi bukan dengan koagulasi, tetapi dengan menambahkan ke sisi rantai dasar asam amino, terutama lisin, dan ikatan peptide dari atom amida nitrogen, Ikatan silang menghubungkan metilen terbentuk dari dua sisi formaldehida yang saling mengikat bersama –sama, Dengan ikatan ini maka NBF dapat menurunkan permeabilitas untuk makromolekul metilen glikol dan formaldehida yang

memungkinkan penetrasi menjadi cepat, dan dengan akibatnya, fiksatif ini cocok untuk spesimen dengan ukuran yang besar atau kecil.

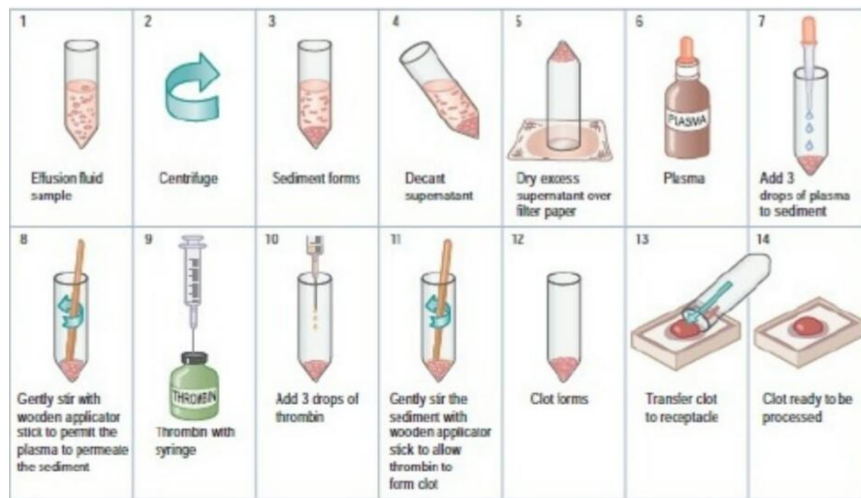
Sayangnya, meskipun penetrasi menggunakan formalin memiliki penetrasi yang cepat pada jaringan, reaksi antara formaldehida dengan protein jaringan untuk menjadi ikatan metilen tetap terjadi secara perlahan-lahan. Inilah kesalahan yang sering terjadi biasa ketika menggunakan formalin sebagai larutan fiksasi. Untuk ukuran jaringan yang kecil (10x10x3 mm) ketika difiksasi menggunakan NBF selama 12-24 jam pada umumnya akan menunjukkan kondisi sitoplasma dan inti yang baik dan rinci. Penggunaan formaldehida sebagian besar akan sempurna terfiksasi dalam waktu 24 jam, tetapi reaksi silang ini akan terus berlanjut selama hingga kurang lebih 2 minggu. Untuk spesimen yang lunak seperti otak manusia secara keseluruhan membutuhkan waktu 2-6 minggu ketika difiksasi di NBF hingga menjadi cukup kuat untuk dipotong-potong. Dengan adanya variasi waktu dan kondisi fiksasi maka akan menyebabkan sebagian besar masalah di sediaan ketika dilakukan pewarnaan histokimia (Khristian *et al.* 2017).

- **Plasma – Thrombin**

Terdapat pula berbagai cara lain pembuatan blok sel, antara lain dengan menambahkan gel sebagai bahan perekat sel seperti gelatin, albumin, atau agar, baik sediaan segar maupun sediaan yang telah difiksasi dapat dibuat blok sel nya dengan penambahan gel jenis ini. Pilihan lain adalah dengan menambahkan plasma-thrombin, namun metode ini tidak dapat dilakukan pada cairan yang telah ditambah dengan bahan fiksatif. Metode plasma-thrombin banyak digunakan dalam pemeriksaan blok sel, dan mungkin yang paling mudah untuk penggunaan

umum, karena hanya perlu mendapatkan dua bahan, yaitu plasma dan thrombin. Untuk melakukan metode ini, thrombin dapat dibeli, dan pooled plasma biasanya tersedia di laboratorium klinik (Shidam, 2007).

Spesimen untuk blok sel bisa disiapkan secara terpisah dengan spesimen untuk hapusan sitologi konvensional. Spesimen disentrifugasi, supernatan dipisahkan dari endapan secara hati-hati. Endapan sedimen ditambahkan dengan 2-3 tetes plasma kemudian dihomogenkan, selanjutnya ditambahkan 2-3 tetes reagen thrombin dan dihomogenkan kembali. Spesimen ditunggu hingga terbentuk bekuan, selanjutnya bekuan spesimen yang terbentuk dibungkus ke dalam kertas saring dan kemudian dimasukkan ke dalam kaset. Spesimen siap diproses dengan teknik histopatologi (Villabon *et al.*, 2014).



Gambar 2.8 : Prosedur Pemeriksaan Blok Sel dengan Koagulan Plasma-Trombin

(Sumber : Shidam, 2007)