

PENGARUH VARIASI WAKTU DAN SUHU INKUBASI METIL SALISILAT SEBAGAI *CLEARING* AGENT TERHADAP KUALITAS PREPARAT JARINGAN LIPOSARKOMA

*The Effect of Time and Temperature Variation Incubation of Methyl Salicylate
as A Clearing Agent on Liposarcoma Tissue Slide Quality*

, Wiwin Wiryanti¹, Dein Yohana¹, Adang Durachim¹, Dani Mahmud¹.

^{1*} Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Politeknik Kesehatan Bandung

Email : wiwinwiryanti@yahoo.com

ABSTRACT

Liposarcoma is a malignant neoplasm with adipocyte differentiation. One subtype of liposarcoma is the atypical lipomatous tumor which is macroscopic in size, while microscopically very similar to normal fat cells. Tissues that contain fat have properties that are difficult to penetrate by the fixative fluid in the process of maturation of tissues to allow for imperfect tissue processing. One of the stages of network maturation that affects the quality of preparations is clearing. Xylol is a commonly used clearing agent. Because of its dangerous and toxic nature, other clearing agents are used. Methyl salicylate is used as a clearing agent because it is non-polar that can dissolve adipose. In addition, methyl salicylates can also dissolve with dehydrating agents and can dissolve with paraffin so that they can harden tissue. The purpose of this study was to find out if there was an influence on time variations and Methyl salicylate incubation temperature as a clearing agent and know the difference with xylol using quasi-experimental methods. The sample uses micecco tissue organs that have been induced with liposarcoma tumor cells in more than 75 preparations from 5 blocks. The parameters used are interpretation quality of core and cytoplasmic color intensity preparations using an imageJ software and clarity of cell membranes by a pathologist. The results showed that there was an effect on the timing and incubation temperature of methyl salicylates on the quality of liposarcoma tissue slides and there wanoot a difference in nucleus color intensity and membranes cell compared to xylol. Research advice is to find the optimal time and temperature of methyl salicylate perfection as a clearing agent to get a good quality slide.

Keywords: methyl salicylate, time variation, temperature variation

BSTRAK

Liposarkoma adalah neoplasma ganas dengan diferensiasi adiposit. Salah satu sub tipe dari liposarkoma adalah *atypical lipomatous tumour* yang secara makroskopik memiliki ukuran yang relatif besar, sedangkan secara mikroskopik sangat mirip dengan sel lemak normal. Jaringan yang mengandung lemak mempunyai sifat yang sulit ditembus oleh cairan fiksatif pada proses pematangan jaringan sehingga memungkinkan terjadinya prosesing jaringan yang tidak sempurna. Salah satu tahap pematangan jaringan yang berpengaruh terhadap kualitas preparat adalah *clearing*. *Xylol* merupakan agen *clearing* yang umum digunakan. Karena sifatnya berbahaya dan toksik maka digunakan agen

clearing lain. Metil salisilat digunakan sebagai *clearing agent* karena bersifat non polar yang dapat melarutkan lemak. Selain itu, metil salisilat juga dapat larut dengan agen dehidrasi dan dapat larut dengan parafin sehingga dapat mengeraskan jaringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ada pengaruh variasi waktu dan suhu inkubasi metil salisilat sebagai *clearing agent* serta mengetahui perbedaannya dengan *xylol* menggunakan metode kuasi eksperimen. Sampel menggunakan organ jaringan mencit yang telah diinduksi dengan sel tumor liposarkoma sebanyak 75 preparat dari 5 blok. Parameter yang digunakan adalah interpretasi kualitas preparat berupa pengukuran intensitas warna inti dan sitoplasma menggunakan software ImageJ serta kejelasan membran sel oleh dokter patologi anatomi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh waktu dan suhu inkubasi metil salisilat terhadap kualitas preparat jaringan liposarkoma dan tidak terdapat perbedaan kualitas intensitas warna inti dan membran sel dibandingkan dengan *xylol*. Saran penelitian adalah menemukan waktu dan suhu yang optimal untuk kesempurnaan metil salisilat sebagai *clearing agent* sehingga mendapatkan kualitas preparat yang baik.

Kata kunci: metil salisilat, variasi waktu, variasi suhu.

PENDAHULUAN

Pemeriksaan histopatologi merupakan salah satu jenis pemeriksaan di laboratorium patologi anatomi yang berguna untuk melihat adanya perubahan jaringan secara makroskopik dan mikroskopik dari jaringan tubuh manusia.¹ Salah satu sampel yang diperiksa adalah jaringan liposarkoma. Pemeriksaan secara histopatologis pada liposarkoma dapat dikatakan sebagai gold standar pemeriksaan karena digunakan untuk membedakan tipe sel liposarkoma dengan jenis tumor lainnya dan juga berguna untuk menentukan prognosis.^{2,3} Salah satu subtype dari liposarkoma adalah *Atypical lipomatous tumour* atau *well differentiated liposarcoma* yang secara mikroskopik sangat mirip dengan sel lemak normal terutama bila tumor berukuran besar.^{4,5} Lemak yang berukuran besar akan sedikit menyulitkan pada tahapan pematangan jaringan karena sifatnya yang sulit ditembus oleh larutan fiksatif.

Hal ini dapat menyebabkan pewarnaan menjadi kurang sempurna sehingga menurunkan kualitas preparat jaringan liposarkoma.⁶ Salah satu tahapan pada proses pematangan jaringan adalah *clearing* yang umumnya menggunakan *xylol*. Akan tetapi, beberapa penelitian menyebutkan bahwa metil salisilat dapat digunakan sebagai *clearing agent* karena sifatnya yang non polar dapat menjadikan jaringan transparan sehingga memudahkan dalam proses pemotongan pada mikrotom. Waktu yang diperlukan bervariasi antara 20 - 45 menit tergantung dari ketebalan jaringan pada suhu 60°C.⁷ Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh variasi waktu dan suhu inkubasi metil salisilat sebagai *clearing agent* terhadap kualitas preparat jaringan liposarkoma dan perbedaan kualitas preparat jaringan liposarkoma antara *xylol* dengan metil salisilat sebagai *clearing agent*.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang digunakan adalah kuasi eksperimen, untuk membedakan

kelompok jaringan liposarkoma yang menggunakan *xylol* sebagai *clearing agent* pada proses pematangan jaringan

dengan kelompok lain yang menggunakan metil salisilat sebagai *clearing agent* menggunakan suhu dan waktu tertentu pada proses pematangan jaringan. Parameter yang diukur adalah gambaran mikroskopik berupa kualitas warna inti, warna sitoplasma dan kejelasan membran sel liposarkoma. Populasi pada penelitian ini adalah jaringan mencit, sampel adalah jaringan mencit yang telah diinduksi sel tumor liposarkoma. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD

Cibabat Kota Cimahi pada Agustus sd Desember 2021. Data yang digunakan adalah data primer yang berasal dari pengukuran intensitas kualitas warna inti dan sitoplasma menggunakan aplikasi imageJ serta kejelasan membran sel berdasarkan interpretasi kejelasan membran sel terhadap 75 preparat dari 5 kelompok perlakuan yang berbeda. Analisa data akan digunakan uji beda menggunakan SPSS v.25.

Tabel 1. Tahap Pematangan Jaringan Kelompok Uji

No	Reagen	Xylo/ Suhu Ruang	Xylo/ Suhu 60°C	Metil Salisilat 60°C 20 Menit	Metil Salisilat 60° 30 Menit	Metil Salisilat Suhu Ruang
1	Nbf 10 %	24 Jam	60 Menit	60 Menit	60 Menit	24 Jam
2	Aquadest	15 Menit		15 Menit	15 Menit	15 Menit
3	Alkohol 70%	60 Menit	30 Menit	30 Menit	30 Menit	60 Menit
4	Alkohol 85%	60 Menit	30 Menit			60 Menit
5	Alkohol 100%	60 Menit	60 Menit	30 Menit	30 Menit	60 Menit
6	Alkohol 100%		60 Menit	30 Menit	30 Menit	
7	Ethanol 1	60 Menit	60 Menit			60 Menit
8	Ethanol 2	60 Menit	60 Menit			60 Menit
9	Xylo/ 1	60 Menit	30 Menit			
10	Xylo/ 2	60 Menit	30 Menit			
11	Metil Salisilat 1			20 Menit	30 Menit	30 Menit
12	Metil Salisilat 2					30 Menit
13	Parafin	18 Jam	3-4 Jam	1 Jam	1 Jam	18 Jam

HASIL PENELITIAN

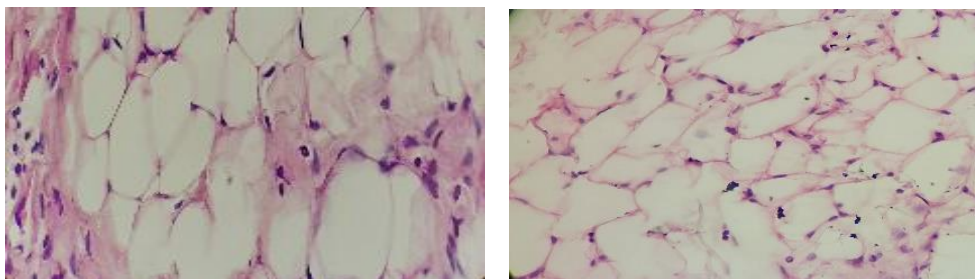
A. Intensitas Warna Inti dan Sitoplasma

Penilaian intensitas warna inti dan sitoplasma dilakukan dengan cara mengukur sediaan menggunakan aplikasi *imageJ*. Sediaan yang telah diambil citra digitalnya kemudian dipisahkan warnanya berdasarkan target

pewarnaan pada inti dan sitoplasma. Hasil pengolahan citra digital tersebut dapat dibaca pada histogram yang dihasilkan baik pada warna inti maupun pada warna sitoplasma.

Tabel 2. Hasil Uji Deskriptif Kualitas Intensitas Warna Inti Dan Sitoplasma

Parameter Penilaian	<i>XyloI</i> suhu 25°C Rata Rata ± SD (OD)	<i>XyloI</i> suhu 60°C Rata Rata ± SD (OD)	Metil Salislat Suhu 25°C Rata Rata ± SD (OD)	Metil Salislat Suhu 60°C ,20 menit Rata Rata ± SD (OD)	Metil Salislat Suhu 60°C ,30 menit Rata Rata ± SD (OD)
Inti	235.002 ±5.078	217,270 ± 7,206	233,929 ± 5,483	227,292 ± 1,1848	225,670 ± 1,8124
Sitoplasma	165.380 ±6.540	181,117 ± 4.889	172,421 ± 7,567	165.854 ± 1,6750	151,191 ± 1,2710



Gambar 1. Hasil visualisasi kelompok uji xyloI (1) : kelompok metil salisilat (2)

B. Membran Sel

Selain pengukuran intensitas warna inti dan sitoplasma, kejelasan membran sel juga turut diamati. Berdasarkan

interpretasi oleh dokter patologi anatomi, membran sel terlihat jelas pada semua kelompok uji.

PEMBAHASAN

Pemeriksaan jaringan secara makroskopik merupakan tahapan pertama untuk mendapatkan informasi diagnostik. *Gross examination* atau pembedahan kasar merupakan bagian yang penting untuk menegaskan

sampel yang digunakan berupa organ kecil yang sudah diinduksi oleh sel tumor liposarkoma. Liposarkoma berasal dari jaringan adiposa yang mengalami keganasan. Karena mengandung jaringan adiposa maka proses pematangan jaringan adiposa akan lebih sulit karena banyak mengandung air, hal ini dapat disiasati dengan menghilangkan lemak atau

diagnosis patologi yang tepat. Pemeriksaan secara makroskopik yang akurat pada jaringan dapat memberikan petunjuk yang diperlukan dalam menegaskan diagnosa akhir.⁸ Pada penelitian ini

delipidasi pada jaringan tersebut. Dengan suhu yang dinaikkan, maka proses delipidasi tersebut akan berlangsung lebih cepat.^{9,10} Pada proses pematangan jaringan menggunakan *xyloI* pada suhu 60°C terdapat perbedaan warna yang signifikan pada kualitas intensitas warna inti dan sitoplasma, hal ini dapat terjadi akibat beberapa hal, antara lain

jenis jaringan yang diperiksa, fiksasi yang tidak sempurna, proses dehidrasi yang terlalu cepat ataupun proses *clearing agent* dari sifat *xylol* itu sendiri apabila dipanaskan pada suhu yang tinggi akan menyebabkan perubahan pada struktur jaringan.¹¹ Selain *xylol*, *clearing agent* yang bisa digunakan adalah metil salisilat. Sifat nya yang non polar dapat melarutkan lemak dan indeks bias nya yang tinggi dapat digunakan dalam proses pembedahan jaringan.¹² Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan metil salisilat sebagai *clearing agent* memberikan intensitas warna inti yang tidak berbeda secara signifikan dengan *xylol* pada variasi suhu dan variasi waktu, sedangkan intensitas warna sitoplasma memberikan hasil yang lebih tinggi seiring bertambahnya waktu inkubasi. Hal ini dapat diakibatkan antara lain karena kandungan dari metil salisilat dapat merubah kondisi pH dari komponen sel, dimana mekanisme pewarnaan sitoplasma adalah zat warna eosin yang bersifat asam akan mengikat komponen sel yang bersifat

basa, hal ini menunjukkan bahwa dengan meningkatnya pH sitoplasma ke arah basa dapat meningkatkan intensitas warna sitoplasma.¹³

KESIMPULAN

1. Terdapat pengaruh variasi waktu inkubasi metil salisilat sebagai *clearing agent* terhadap kualitas preparat jaringan liposarkoma.
2. Terdapat pengaruh variasi suhu inkubasi metil salisilat sebagai *clearing agent* terhadap kualitas preparat jaringan liposarkoma
3. Tidak terdapat perbedaan kualitas intensitas warna inti dan kejelasan membran sel antara *xylol* dengan metil salisilat sebagai *clearing agent*. Perbedaan terdapat pada kualitas intensitas warna sitoplasma

DAFTAR RUJUKAN

1. Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia (IAPPI). Buku Pedoman Pelayanan Patologi Anatomi Indonesia. 2015;1–10.
2. Shin et al. The differential imaging features of fat-containing tumors in the peritoneal cavity and retroperitoneum : the radiologic-pathologic correlation. Korean J Radiol, 11(3) : 333-345.
3. Folpe AL, Yinward CY. Bone of Soft Tissue Pathology: Adipocytic Tumor. 1st Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier;2010.p.63-71, 360-363
4. Liposarcoma. Available at : <http://www.sciencedirect.com>. Accessed on 30 September 2021.
5. Burusapat, C. et al. 'Atypical Lipomatous Tumor/Well-Differentiated Liposarcoma with Intramuscular Lipoma-Like Component of the Thigh', *Case Reports in Surgery*, 2020, pp. 1–6. doi: 10.1155/2020/8846932
6. Adam Walter, Andrew Lisowski,. Leica Biosystem. 2019 Processing Fatty Specimens
7. Shyamala Karnam, H C Girish, Sanjay Murgod, Vaidhehi Narayan Nayak, V K Varsha and Sarita Yanduri . Rapid tissue processing technique: A novel method using methyl salicylate J Oral Maxillofac Pathol. 2018 Sep-Dec; 22(3): 443
8. Geller, S. A. and Richard E Horowitz 'Gross Examination', *National Library Of Medicine*. doi: doi:

- 10.1007/978-1-4939-1050-2_1.
(2014)
9. Wang, H. *et al.* 'FACT or PACT : A Comparison between Free-Acrylamide and Acrylamide-Based Passive Sodium Dodecyl Sulfate Tissue Clearing for whole Tissue Imaging', 21(2). doi: 10.22074/cellj.2019.5989.Introduction.
 10. Yu, T. *et al.* 'Elevated-temperature-induced acceleration of PACT clearing process of mouse brain tissue', *Scientific Reports*, 2017 7, pp. 1–10. doi: 10.1038/srep38848.
 11. 'A comparison of routine and rapid microwave tissue processing in a surgical pathology laboratory: Quality of histologic sections and advantages of microwave processing', *American Journal of Clinical Pathology*, 115(5), pp. 703–708. doi: 10.1309/15FB-FLD1-408X-JQA3.
 12. Sehrawat, P. and Kaur, M. 'A Succinct Characterization and Comparison of Xylene and its Substitutes - Review', 8 January 2020., pp. 8–10.
 13. Khristian, E. 'Pembuatan Sediaan Mikroskopis Otak Mencit', *Prosiding Pertemuan Ilmiah Nasional Penelitian & pengabdian masyarakat 2018 (PINTAMAS 1)*, 1(1), pp. 638–645.