

Dampak Lama Penyimpanan Arsip Sampel *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (FFPE) dengan Konsentrasi *Ribonucleid acid* (RNA) yang Diekstraksi Menggunakan Kit Komersial

Nur Eka Wiraditya¹

¹Patologi Anatomi FKKMK Universitas Gadjah Mada
Gedung Radioputro Lantai 4, Jalan Farmako, Sekip Utara, Sleman Yogyakarta 55281
* reka09wiraditya@gmail.com

Diterima: 23 Desember 2022 | Disetujui: 4 April 2023

ABSTRAK

Formalin fixation and paraffin embedding (FFPE) merupakan salah satu metode penyimpanan arsip sampel dalam jangka waktu bertahun-tahun. Penyimpanan sampel dalam jangka waktu yang lama memungkinkan terjadinya penurunan kualitas RNA pada sampel. Penelitian ini mengetahui perbedaan konsentrasi RNA pada arsip sampel 2019 dan 2020 dengan satuan ng/L. Penelitian menggunakan sampel yang diambil dari arsip FFPE Rumah Sakit (RS) X sebanyak 20 sampel. Rincian sampel adalah 10 (sepuluh) sampel pada tahun 2019 dan 10 (sepuluh) sampel pada tahun 2020. Penelitian ini dilakukan pada tahun 2021 di laboratorium Patologi Anatomi FK-KMK UGM. Penelitian ini menunjukkan dampak signifikan terhadap lama penyimpanan arsip sampel FFPE ditunjukkan dengan penurunan konsentrasi RNA antara tahun 2019 dan 2020 dengan perbedaan konsentrasi rata-rata 12,3 ng/L.

Kata Kunci: *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (FFPE), RNA, Konsentrasi RNA.

The Effectiveness of Long Immersion of Rice Seeds in Local Microorganism Culture (MOL) of Banana Weevils on Rice Growth and Production

ABSTRACT

Formalin fixation and paraffin embedding (FFPE) is one method of storing sample records over many years. Sample storage over a long period of time allows for a decrease in RNA quality in the sample. This study determines the difference in RNA concentrations in the 2019 and 2020 sample archives with ng/L units. The sample details are 10 (ten) samples in 2019 and 10 (ten) samples in 2020. This research was conducted in 2021 at the Anatomic Pathology laboratory of FK-KMK UGM. This study shows a significant impact on the archival storage of FFPE samples shown by a decrease in RNA concentration between 2019 and 2020 with an average concentration difference of 12.3 ng/L.

Keywords: *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (FFPE), RNA, RNA Concentrate.

PENDAHULUAN

Sampel jaringan manusia dengan cara dibekukan atau jaringan beku segar merupakan salah satu metode untuk penyimpanan yang dapat digunakan untuk penelitian dan pemeriksaan molekuler, tetapi memiliki kekurangan yaitu pengumpulan sampel terbatas dan jangka waktu yang terbatas. Sebaliknya, sampel jaringan dengan metode *formalin-fixed, paraffin-embedded* (FFPE) yang terdiri dari berbagai jenis jaringan dikumpulkan secara rutin dari hasil operasi atau penelitian dan dapat disimpan pada suhu kamar (Kalmar, dkk. 2012). Arsip sampel dengan metode *formalin-fixed, paraffin-embedded* (FFPE) adalah metode pengawetan sampel jaringan manusia, hewan atau tumbuhan yang paling banyak tersedia, dengan sampel FFPE dapat diperoleh informasi yang digunakan untuk diagnosis, prognosis pasien dan penelitian (Belder, dkk 2015). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa parameter untuk mengurangi degradasi atau kerusakan sel dengan cara diberi larutan fiksasi buffer formalin 10%, selain itu juga dilakukan pembatasan waktu fiksasi. Pembatasan waktu fiksasi adalah waktu dimana jaringan operasi dimasukkan ke dalam larutan formalin berkisar antara 12 jam hingga 48 jam, dengan pH netral, dan pada suhu 4⁰ C. Berkurangnya pH pada larutan fiksasi dapat mengakibatkan degradasi asam nukleat (Huang, dkk. 2014).

Sampel FFPE dapat digunakan untuk pemeriksaan atau penelitian molekuler karena degradasi dan terjadinya modifikasi kimia RNA. RNA yang diekstraksi dari sampel FFPE terdegradasi kurang dari 300 susunan basa. Blok paraffin atau FFPE yang diarsipkan disimpan pada suhu kamar dengan durasi waktu yang sangat lama. Degradasi RNA terjadi karena gugus methylol membentuk ikatan silang dengan protein atau asam nukleat selama proses fiksasi formalin berlangsung, yang mengakibatkan kerusakan RNA (Li, dkk., 2008). Arsip sampel FFPE yang tersimpan lebih dari 15 tahun akan mengalami penurunan protein termasuk RNA atau tidak melebihi dari 15 tahun (Coscia, dkk. 2020).

Proses persiapan sampai penyimpanan FFPE memiliki dampak negatif yaitu penurunan kualitas DNA dan RNA. Penurunan yang paling umum pada sampel jaringan FFPE yang disebabkan oleh formalin memiliki proses yaitu terjadinya ikatan silang antara protein dengan asam nukleat yang mengakibatkan degradasi asam nukleat (Belder, dkk 2015). Variabel lain khusus untuk spesimen arsip FFPE, seperti penggunaan formalin buffer atau fiksatif yang tidak direkomendasikan selain formalin, ukuran specimen, durasi fiksasi, pemeriksaan patologis yang tertunda dan penundaan proses dari sampel diambil setelah operasi sampai ke pemrosesan jaringan sampel untuk pembuatan FFPE (Gaffney, dkk 2018).

RNA terbentuk berawal dari sintesis dalam inti sel atau nukleus yang berasal dari DNA. Pada proses sintesis, kedua untai molekul DNA terlepas sementara, salah satu untai molekulnya digunakan dalam pembentukan RNA. Ketiga untai molekul ini disebut kodon dari kode triplate dalam DNA yang berasal dari proses sintesis tersebut. Dia menyatakan "Kodon-kodon ini selanjutnya akan mengatur urutan asam amino dalam sebuah protein yang akan disintesis dalam sitoplasma sel". Dasar pembentukan RNA bersal dari ribosa dan urasil. Komponen ini membentuk nukleotida RNA yang terdiri dari basa adenine, guanine, sitosin dan urasil. (Hall. 2018). Total RNA ditranskripsikan terbalik untuk mensintesis untai pertama cDNA. cDNA untai tunggal ini diubah menjadi DNA untai ganda untuk transkripsi. Kemudian RNA yang diperkuat, yang disebut cRNA atau aRNA, disintesis dan diberi label dengan transkripsi in vitro yang dapat digunakan untuk penelitian ekspresi gen (Belder, dkk 2015). Beberapa penelitian terbaru menunjukkan bahwa analisis transkriptomik jaringan FFPE dapat menggunakan mikroarrays, hasilnya dapat menyerupai dengan jaringan beku segar, tetapi hasilnya tidak sebaik menggunakan jaringan beku segar (Vukmirovic, dkk. 2017).

Penelitian ini memiliki rumusan masalah antara lain, adakah pengaruh penurunan konsentrasi *Ribonucleid acid* (RNA) pada arsip sampel *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (FFPE) terhadap lama penyimpanan. Kemudian yang kedua adalah berapa perbedaan konsentrasi RNA pada arsip sampel FFPE tahun 2019 dan 2020. Tujuan Penelitian ini adalah Mengetahui penurunan konsentrasi *Ribonucleid acid* (RNA) pada arsip sampel *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (FFPE) terhadap lama penyimpanan dan mengetahui perbedaan konsentrasi RNA pada arsip sampel 2019 dan 2020 dengan satuan ng/ μ L. Keterbatasan dalam penelitian ini adalah jumlah sampel terbatas dan jumlah kit yang ada dilaboratorium terbatas

METODE PENELITIAN

Penelitian menggunakan sampel kasus kanker prostat yang diambil dari arsip FFPE RS X sebanyak 20 sampel. Rincian sampel adalah sepuluh sampel pada tahun 2019 dan sepuluh sampel pada tahun 2020. Proses fiksasi dari hasil operasi menggunakan Buffer Formalin minimal 18 jam atau semalam. Penelitian ini dilakukan pada tahun 2021 di laboratorium Patologi Anatomi FK-KMK UGM. Sampel dipotong menggunakan mikrotom merek Shandon. Langkah-langkahnya adalah

- a. Preparasi sampel.
Masing-masing sampel FFPE diambil sebesar 5 mikro dengan jumlah potongan sebanyak 10 lembar atau seberat 25 gram, kemudian dimasukkan dalam mikrotube (1,5 ml).
- b. Ekstraksi RNA
Proses selanjutnya diawali dengan deparafinisasi dan dilanjutkan dengan ekstraksi RNA menggunakan kit komersial merek GeneAll Ribospin II®.
- c. Pemeriksaan Konsentrasi RNA
Hasil ekstraksi RNA kemudian dilakukan pemeriksaan konsentrasi RNA menggunakan mesin NanoDrop.

Ekstraksi RNA diawali dengan deparafinisasi atau penghilangan paraffin sampel FFPE dengan menggunakan xylol sebanyak 1 ml, kemudian dilakukan sentrifugasi menggunakan mesin *Eppendorf Centrifuge 5417* dengan kecepatan 13.000 x g selama 3 menit pada suhu ruang yang diulang sebanyak 3 kali. Proses ekstraksi selanjutnya mengikuti buku petunjuk yang terdapat pada reagen kit yaitu, langkah pertama melisis sampel jaringan dengan buffer, kemudian memindahkan larutan tersebut ke dalam mini kolom tipe F. Langkah berikutnya adalah proses pencucian untuk menghilangkan residu yang tersisa pada kolom tipe F. Langkah terakhir dengan menambahkan 50 µl Nuclease-Free Buffer ke dalam kolom tipe F untuk mengikat RNA yang terdapat pada filter kolom tipe F, sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 x g selama 1 menit untuk mendapatkan RNA.

Langkah pertama untuk memeriksa konsentrasi RNA dilakukan dengan menambahkan Nuclease-free Buffer 1 µL digunakan untuk patokan angka 0 dan kosong, kemudian membersihkannya dengan tisu kering. Langkah kedua adalah menambahkan RNA tiap-tiap sampel dengan volume 1 µl dan hasil akan muncul di layar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi RNA menggunakan sampel tahun 2019 dan sampel 2020 yang berbeda, menunjukkan bahwa terdapat selisih nilai yang cukup signifikan antara sampel FFPE tahun 2019 dan FFPE tahun 2020. Konsentrasi RNA tahun 2020 cenderung lebih tinggi dibandingkan tahun 2019 kecuali sampel dengan kode A8 tahun 2019 yang mengalami kenaikan. Selisih konsentrasi RNA tahun 2019 dan 2020 dapat dilihat pada data tabel 1.

Tabel 1. Hasil Konsentrasi RNA Tahun 2019 dan 2020

No	Kode Sampel (2019)	Konsentrasi RNA (ng/ µl)	Kode sampel (2020)	Konsentrasi RNA (ng/ µl)
1	A1	9,24	B1	32,05
2	A2	8,60	B2	34,77
3	A3	10,23	B3	19,17
4	A4	10,61	B4	22,29
5	A5	10,49	B5	22,63
6	A6	1,92	B6	22,03
7	A7	2,03	B7	10,29
8	A8	14,45	B8	9,77
9	A9	1,89	B9	13,44
10	A10	7,11	B10	13,40

Untuk mengetahui lebih jelas nilai selisih konsentrasi sampel FFPE tahun 2019 dan 2020, maka dilakukan perhitungan dengan menggunakan aplikasi SPSS (16.0). Langkah pertama adalah uji

normalitas data. Karena jumlah sampel kurang dari 50 maka analisis yang digunakan adalah *Shapiro-Wilk*.

Tabel 2. Hasil Normalitas Data

	Tahun	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi	2019	.202	10	.200*	.883	10	.140
	2020	.179	10	.200*	.915	10	.316

Hasil menunjukkan nilai P lebih dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa distribusi sampel normal. Dapat dilanjutkan menggunakan *independent T Test* untuk mengetahui perbedaan rerata konsentrasi RNA. Didapatkan hasil sebagai berikut.

Tabel 3. Perbandingan Kelompok Rata-Rata Konsentrasi RNA

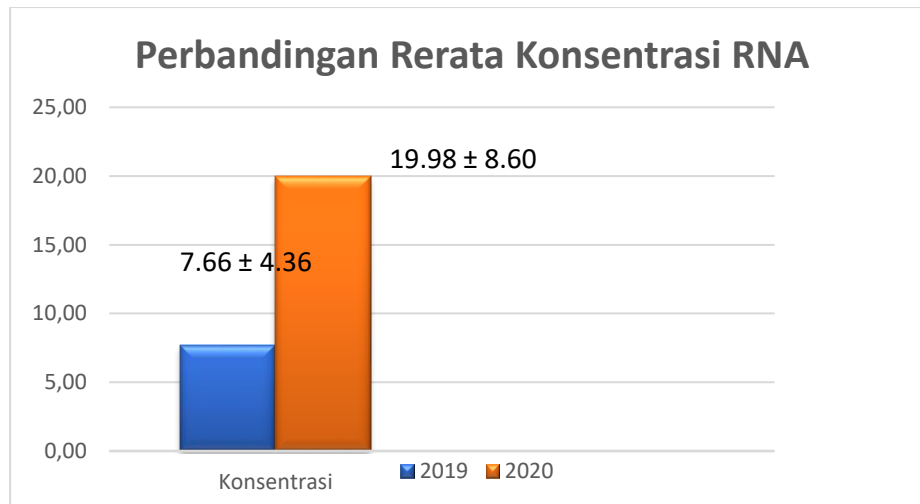
Konsentrasi	Tahun	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	2019	10	7.6570	4.35941	1.37857
	2020	10	19.9840	8.60138	2.72000

Dari hasil tabel 3 dapat disimpulkan bahwa P lebih dari 0,05 memiliki arti yaitu kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki varian yang sama. Analisis hasil *Independent T Test*, di dapatkan hasil P lebih kecil dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rerata antara arsip sampel FFPE tahun 2019 dengan arsip sampel FFPE tahun 2020 dengan perbedaan konsentrasi sebesar 12,3 ng/μl yang dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil *Independent T Test*

	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Konsentrasi Equal variances assumed	3.713	.070	-4.042	18	.001	-12.32700	3.04940	-18.73355	-5.92045
			-4.042	13.338		-12.32700	3.04940	-18.89792	-5.75608

Perbandingan rerata beserta standar deviasi konsentrasi RNA ada pada gambar 1 sebagai berikut.



Gambar 1. Perbandingan rerata Konsentrasi RNA

Hasil analisis SPSS menunjukkan bahwa terdapat perbedaan atau pengaruh yang signifikan pada konsentrasi RNA arsip sampel FFPE yang disimpan pada suhu kamar dengan perbandingan satu tahun, yaitu hasil konsentrasi RNA untuk sampel tahun 2019 dan hasil konsentrasi RNA untuk sampel tahun 2020. Hal ini sejalan dengan penelitian Li, 2008 bahwa degradasi RNA terjadi karena gugus methylol membentuk ikatan silang dengan protein atau asam nukleat selama proses fiksasi formalin berlangsung, yang mengakibatkan kerusakan RNA. Kerusakan RNA dapat kita lihat dari konsentrasi yang menurun antara tahun 2019 dengan 2020 dengan perbedaan konsentrasi rata-rata 12,3 ng/μl.

Sampel jaringan FFPE adalah metode pengawetan jaringan pada umumnya dan paling banyak tersedia, dengan sampel FFPE dapat diperoleh informasi yang digunakan untuk diagnosis dan prognosis. FFPE merupakan salah satu metode penyimpanan sampel arsip yang dapat digunakan untuk menyimpan sampel arsip dalam jangka waktu lama.

Penyimpanan dengan metode FFPE memungkinkan sampel dapat disimpan dalam jangka waktu bertahun-tahun. Penyimpanan sampel dalam jangka waktu yang lama memungkinkan terjadinya penurunan kualitas dari sampel itu sendiri. Penurunan yang dimaksud adalah konsentrasi RNA pada sampel. Untuk memeriksa konsentrasi diperlukan proses ekstraksi RNA dari sampel yang digunakan. Ekstraksi RNA dari sampel FFPE mempunyai masalah utama yaitu rendahnya hasil total RNA. Ekstraksi RNA menggunakan sejumlah kecil sampel dari FFPE yang dipotong (Amini, dkk. 2017).

RNA dapat diekstraksi dari sampel FFPE tetapi mengalami degradasi menjadi fragmen susunan basa yang lebih kecil atau lebih pendek (Gaffney dkk., 2018). Pemilihan merek kit komersial ekstraksi RNA dari sampel FFPE tidak mempengaruhi kualitas hasil dari konsentrasi RNA yang dihasilkan (Marczyk, Fu, dkk. 2019). Pada penelitian ini dilakukan pengujian konsentrasi pada sampel FFPE tahun 2019 dan 2020. Dari hasil pengujian diketahui bahwa sampel FFPE 2019 dan sampel FFPE 2020 memiliki perbedaan konsentrasi RNA. Terjadi penurunan konsentrasi RNA dalam jangka waktu penyimpanan satu tahun. Perbedaan konsentrasi rata-rata yang diperoleh adalah sebesar 12,3 ng/μl.

Hal ini menunjukkan bahwa lama penyimpanan sampel berdampak terhadap konsentrasi RNA. Sesuai dengan teori yang dikemukakan dalam penelitian sebelumnya bahwa degradasi RNA terjadi karena gugus methylol membentuk ikatan silang dengan protein atau asam nukleat selama proses fiksasi formalin berlangsung, yang mengakibatkan kerusakan RNA. (Li, dkk. 2008). Batas waktu penyimpanan arsip sampel FFPE tidak lebih dari 15 tahun (Coscia, dkk. 2020). Hasil pengujian yang didapat sejalan dengan teori yang dikemukakan diatas dengan perbedaan yang cukup signifikan. Dapat disimpulkan bahwa konsentrasi RNA dapat mengalami penurunan yang di pengaruhi oleh lama penyimpanan sampel (FFPE). RNA dapat diekstraksi dari dari sampel FFPE tetapi mengalami degradasi menjadi fragmen susunan basa yang lebih kecil atau lebih pendek. Untuk lama penyimpanan dan akan digunakan untuk penelitian molekuler selanjutnya disarankan kurang dari satu tahun.

KESIMPULAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui penurunan konsentrasi *Ribonucleid acid* (RNA) pada arsip sampel *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (FFPE) terhadap lama penyimpanan dan mengetahui perbedaan konsentrasi RNA pada arsip sampel 2019 dan 2020 dengan satuan ng/L. Terdapat pengaruh signifikan konsentrasi RNA pada sampel arsip FFPE tahun 2019 dengan tahun 2020. Diperoleh perbedaan rerata konsentrasi RNA sebesar 12,3 ng/ μ l. Hasil menunjukkan kesesuaian dengan teori dan penelitian terdahulu bahwa lama penyimpanan sampel dengan metode FFPE dapat mengakibatkan RNA terfragmentasi dan dapat mempengaruhi konsentrasi RNA.

Saran untuk penelitian selanjutnya dapat menambahkan dengan *quantitative reverse transcription real-time polymerase chain reaction* (RT-qPCR) untuk mendeteksi adakah pengaruh yang signifikan dengan penurunan konsentrasi RNA pada ekspresi gen tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Amini, P. Ettlin, J. Opitz, L. Clementi, E. Malbon, A. Markkanen, E. (2017). *An optimised protocol for isolation of RNA from small sections of laser-capture microdissected FFPE tissue amenable for next-generation sequencing.*
- Belder, N. Coskun, O. Erdogan, B. D. Ilk, O. Savas, B. Ensari, A. Ozdag, H. (2015). *From RNA Isolation to Microarray Analysis: Comparison of Methods in FFPE Tissues.*
- Coscia, F. Doll, S. Bech, J.M. Schweizer, L. Mund, A. Lengyel, E. Lindebjerg, J. Madsen, G.I. Moreira J.M.A. Mann, M. (2020). *A streamlined mass spectrometry-based proteomics workflow for large-scale FFPE tissue analysis.*
- EF Gaffney, PH Riegman, WE Grizzle & PH Watson. (2018). *Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research.*
- Hall, J. E. (2018). *Fisiologi Kedokteran Edisi-13.* Elsevier Singapore Pte. Ltd.
- Huang, W. Y. Sheehy, T. M. Moore, L. E. Hsing, A. W. Purdue, M. P. (2014). *Simultaneous Recovery of DNA and RNA from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue and Application in Epidemiologic Studies.*
- Kalmar, A. Wichmann, B. Galamb, O. Spisak, S. Toth, K. Leiszter, K. Tullasay, Z. Molnar, B. (2012). *Gene expression Analysis of Normal and Colorectal Cancer Tissue Samples from Fresh Frozen and Matched Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Specimens After Manual and Automated RNA Isolation.*
- Li, J. Smyth, P. Cahill, S. Denning, K. Flavin, R. Aherne, S. Pirotta, M. Guenther, S. M. O'Leary, J. J. Shiels, O. (2008). *Improved RNA Quality and TaqMan® Pre-amplification Method (PreAmp) to Enhance Expression Analysis from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Materials.*
- Marczyk M., Fu C., Lau, R., Du, L., Trevarton, A.J., Sinn, B.V., Gould, R.E., Puszta, L., Hatzis, C. and Symmans, W.F. (2019). *The impact of RNA extraction method on accurate RNA sequencing from formalin-fixed paraffin-embedded tissue.*
- Vukmirovic. M., Herazo-Maya, J.D., Blackmon, J., Skodric-Trifunovic, V., Jovanovic, D., Pavlovic, S., Jelena Stojic, J., Zeljkovic, V., Yan, X., Homer, R., Stefanovic B. and Kaminski, N. (2017). *Identification and validation of differentially expressed transcripts by RNA-sequencing of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) lung tissue from patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis.*