

Pengaruh Durasi Fiksasi Buffer Formalin 10 % terhadap Kualitas Pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) pada Jaringan Terduga Kanker Payudara

The Effect of 10 Formalin Buffer Fixation Duration on The Quality Of Hematoksin Eosin (HE) Staining in Tissue Suspected of Breast Cancer

Windi Astanti Fitriana¹⁾, Miftahul Mushlih^{2)*}

¹⁾Program Studi Teknologi Laboratorium Medik, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

²⁾Program Studi Teknologi Laboratorium Medik, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

*Email Penulis Korespondensi: : mif.mushlih@umsida.ac.id

Abstract. Breast cancer is a malignant condition that as a result of atypical cell division in breast tissue. Histopathological examination plays an important role in providing an accurate diagnosis. Fixation is the single most important factor in the initial procedure of histopathologic examination. The purpose of this study was to determine the optimal duration of fixation of 10% formalin buffer against suspected breast cancer tissue. This study used an analytical descriptive design, tissue samples suspected of breast cancer were fixed for 1 day, 3 days and 7 days. The research was conducted at the Anatomical Pathology Laboratory of dr. Saiful Anwar Hospital, East Java Province, in May 2024 with a total of 9 samples and 2 repetitions. Hematoksin Eosin staining was carried out automatically using a Gemini ASS Automated Slide Stainer. The positive control used appendix tissue samples stained with Hematoxylin Eosin. The staining of quality assessment data was tested with the Kruskal Wallis test shows sig. value of 0.000 (< 0.05) was obtained, indicating a significant difference between 1 day and 3 days, as well as between 1 day and 7 days. The 3-day and 7-day fixation treatments show the best results for staining.

Keywords Breast cancer, duration fixation of buffer formalin 10%, Hematoksin Eosin

Abstrak. Kanker payudara merupakan suatu kondisi keganasan yang terjadi akibat pembelahan sel secara tidak normal pada jaringan payudara. Pemeriksaan histopatologi memegang peranan penting dalam memberikan diagnosis yang akurat. Fiksasi merupakan faktor penting dalam prosedur awal pemeriksaan histopatologi. Bervariasinya durasi fiksasi mengakibatkan bervariasi pula kualitas pewarnaan Hematoksin Eosin. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh waktu fiksasi buffer formalin 10% terhadap jaringan yang terduga kanker payudara. Penelitian ini menggunakan desain Deskriptif Analitik, sampel jaringan terduga kanker payudara difiksasi selama 1 hari, 3 hari dan 7 hari. Penelitian dilakukan di Instalasi Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Saiful Anwar Prov. Jatim pada bulan Mei 2024 dengan jumlah sampel 9 dan 2 kali pengulangan. Pewarnaan Hematoksin Eosin dilakukan secara otomatis menggunakan Automated Slide Stainer Gemini ASS. Kontrol positif menggunakan sampel jaringan appendix yang diwarnai dengan Hematoksin Eosin. Data hasil penilaian kualitas pewarnaan diuji dengan uji Kruskal Wallis didapatkan nilai sig. 0,000 (< 0,05) yang menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara 1 hari dengan 3 hari dan 7 hari. Perlakuan 3 hari dan 7 fiksasi menunjukkan hasil terbaik untuk pewarnaan.

Kata Kunci Kanker payudara, durasi fiksasi, Pewarnaan Hematoksin Eosin

I. PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan suatu kondisi keganasan yang terjadinya pembelahan sel yang abnormal pada jaringan payudara, yang dapat berasal baik dari epitel duktus maupun lobulus. Dalam hal ini, keganasan dapat muncul dari sel-sel epitel yang melapisi saluran (duktus) atau lobus (lobulus) dalam payudara. Kanker payudara dapat berkembang tanpa menunjukkan gejala yang nyata, dan sebagian besar dapat teridentifikasi melalui pemeriksaan rutin[1].

Pada tahun 2019, diperkirakan terdapat 2,1 juta kasus baru kanker payudara di dunia, dan diperkirakan satu kasus baru terdiagnosis setiap 18 detik. Sementara itu, 626.679 wanita telah kehilangan nyawa mereka akibat kanker payudara [2]. Data *Global Burden of Cancer* (GLOBOCAN) menunjukkan bahwa pada tahun 2020 di Indonesia prevalensi kanker payudara mencapai 396.914 kasus [2]. Pada data penelitian yang dilakukan tentang insiden kanker payudara periode tahun 2018 hingga tahun 2020 di Instalasi Patologi Anatomi Rumah Sakit Saiful Anwar Malang, didapatkan 542 kejadian kanker payudara. Terdapat 243 kasus (45%) di tahun 2018, 270 kasus (50%) di tahun 2019 dan 29 kasus (5%) pada Januari - Maret tahun 2020 [2].

Pemeriksaan histopatologi memegang peranan penting dalam memberikan diagnosis yang tepat, komprehensif dan spesifik sehingga dokter dapat melakukan tindakan medis dan pemberian pengobatan yang sesuai pada kejadian kanker payudara [3]. Pemeriksaan histopatologi merupakan langkah rutin yang dilakukan pada setiap sampel jaringan yang diteruskan ke laboratorium patologi anatomi. Perlakuan jaringan yang optimal akan menghasilkan sediaan berkualitas tinggi, memfasilitasi penilaian patologis dengan baik.

Pada pemeriksaan histopatologi pewarnaan *hematoksilin dan eosin* (HE) adalah pewarna histologi yang paling banyak digunakan. Pewarna ini mudah digunakan, mudah diotomatisasi, dan menunjukkan struktur jaringan yang berbeda dengan jelas. Hematoksilin mewarnai inti sel menjadi biru-hitam, menunjukkan detail intranuklear yang jelas, sedangkan eosin mewarnai sitoplasma sel dan sebagian besar serat jaringan ikat dalam berbagai nuansa dan intensitas merah muda, oranye, dan merah [4].

Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas sediaan hasil pengolahan jaringan adalah fiksasi, pengolahan jaringan dan pewarnaan jaringan. Fiksasi merupakan tahap awal pengolahan jaringan yang penting untuk menghasilkan sediaan histopatologi sehingga dapat dianalisis dengan baik [4]. Larutan fiksasi yang umum digunakan di laboratorium patologi anatomi adalah buffer formalin 10%. Larutan ini merupakan larutan yang menjadi standar utama di laboratorium patologi anatomi karena mudah didapat, sederhana, dan tingkat derajat keasaman yang mendekati netral (pH). Kelebihan larutan fiksasi ini adalah pH mendekati netral, dapat disimpan dalam jumlah besar dan waktu yang lama. Kekurangan larutan fiksasi ini adalah memiliki daya fiksasi yang lama yaitu 12-24 jam [6]. Pada saat ini beberapa fasilitas kesehatan harus mengirim pemeriksaan patologi anatomi ke rumah sakit rujukan. Karena jarak dan waktu pengiriman maka sampel jaringan hasil operasi harus difiksasi terlebih dahulu menggunakan buffer formalin 10 %. Proses pengumpulan dan pengiriman menyebabkan durasi waktu fiksasi bervariasi antara fasilitas kesehatan satu dengan yang lainnya. Bervariasinya durasi fiksasi mengakibatkan bervariasi pula kualitas pewarnaan *hematoksilin eosin*. Kejadian ini berpengaruh terhadap proses pemeriksaan histopatologi secara keseluruhan. Salah satu jenis sampel tersebut adalah untuk pemeriksaan histopatologi pada kanker payudara. Oleh karena itu perlu adanya penelitian tentang durasi fiksasi pada proses fiksasi menggunakan buffer formalin 10%.

II. METODE

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif analitik dimana penelitian digunakan untuk menggambarkan dan mengetahui pengaruh durasi fiksasi buffer formalin 10 % terhadap kualitas pewarnaan *Hematoksilin Eosin* dilakukan setelah sampel jaringan terduga kanker payudara difiksasi selama 1 hari, 3 hari & 7 hari [7]. Kontrol positif menggunakan sampel jaringan appendiks yang diwarnai dengan Hematoksilin Eosin.

Penelitian dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD DR Saiful Anwar Provinsi Jawa Timur dan lulus uji etik pengambilan sampel dari instansi yang sama dengan No : 400 /043/ K.3 /102.7 /2024. Sampel jaringan pasien yang terduga kanker payudara yang diperiksa dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Sebanyak Sembilan sampel digunakan dalam penelitian ini dengan diberikan variasi waktu fiksasi. Setiap perlakuan sampel dilakukan secara duplo kemudian diamati dengan tiga lapang pandang yang berbeda. Kriteria inklusi sampel jaringan yang digunakan sebagai bahan penelitian adalah jaringan terduga kanker payudara yang berwarna putih keabuan padat kenyal dan berbatas tegas berdasarkan diagnosis awal dokter. Pewarnaan *Hematoksilin Eosin* dilakukan secara otomatis menggunakan alat pengecatan otomatis *Gemini Automated Slide Stainer* (Gemini ASS). Pemeriksaan dilakukan dengan persiapan chamber pengecatan, xylol, alkohol 80 %, alkohol 96 %, kapas, kertas saring, kaca obyek, kaca penutup, cat hematoksilin, cat eosin, canada balsam dan label. Preparat yang telah kering dideparafinasi dalam xylol sebanyak 3 kali (masing-masing 10-15 menit). Kemudian preparat direndam sebanyak 2 kali (masing-masing 5 menit) dalam alkohol 96 %. Untuk menghilangkan alkohol 96 % pada preparat, cuci preparat dengan air mengalir. Preparat yang sudah dicuci, direndam dalam cat Hematoksilin selama 7-10 menit lalu dicuci dengan air mengalir sampai cat tidak luntur. Selanjutnya preparat dicelupkan ke dalam HCL sebanyak 2 kali celup untuk dekolonisasi. Cuci preparat dengan air selama 3-5 menit, rendam preparat dalam cat Eosin. Preparat dicuci dengan air mengalir. Kemudian direndam dalam alkohol 80 % dan 96 % selama masing-masing 2 menit. Cuci kembali preparat dengan air mengalir. Preparat dikeringkan dengan dengan tisu. Kriteria penilaian pewarnaan HE seperti pada Tabel 1. Data hasil penilaian pewarnaan diuji menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis* dengan software SPSS 26.0 dengan taraf kepercayaan 95%.

Tabel 1 Kriteria Penilaian hasil Pewarnaan [8]

No	Struktur	Deskripsi	Skala nominal
1	Inti sel	Inti tidak dapat diidentifikasi	1
		Inti sel tidak jelas	2
		Inti sel kurang jelas	3
		Inti sel jelas	4
2	Sitoplasma	Sitoplasma tidak dapat diidentifikasi	1
		Sitoplasma serta jaringan ikat tidak jelas	2
		Sitoplasma dan jaringan ikat kurang jelas	3
		Sitoplasma dan jaringan ikat jelas	4
3	Keseragaman warna preparat	Keseragaman warna tidak dapat diidentifikasi	1
		Warna pada preparat tidak seragam	2
		Kesegaraman warna pada preparat kurang	3
		Warna pada preparat seragam	4

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

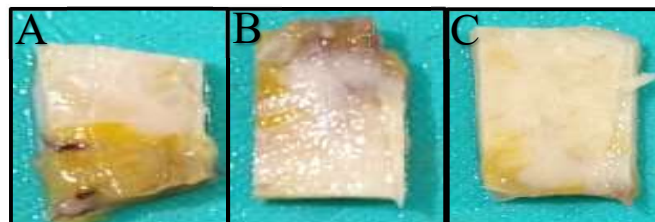
Berdasarkan tabel 2 karakteristik pasien dengan jaringan terduga kanker payudara yang digunakan dalam penelitian berdasarkan jenis kelamin, usia dan grading histopatologi.

Tabel 2 Tabel gambaran karakteristik berdasarkan usia dan grading histopatologi

Variabel	Jumlah (n)	Presentase (%)
Laki-laki	0	0
Perempuan		
Usia (tahun)		
30-39	1	11
40-49	4	44
50-59	3	33
60-70	1	11
Grading Histopatologi		
Grade 1	1	11
Grade 2	3	33
Grade 3	5	56

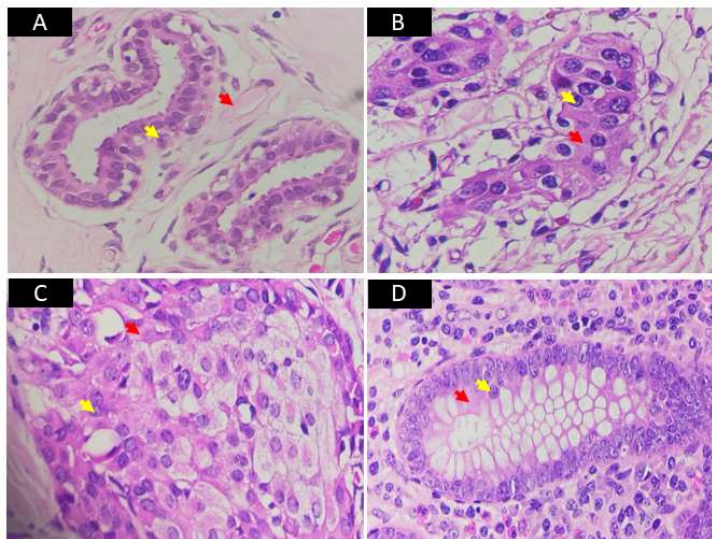
Dari tabel 2 tampak bahwa sampel jaringan terduga kanker payudara terbanyak berasal dari penderita pada rentang usia 40-49 sebesar 44 % tahun. Berdasarkan grading didapatkan sebagian besar sampel yakni 56 % termasuk dalam grade 3. Grading dilakukan untuk menilai morfologi sel yang diduga merupakan bagian dari jaringan tumor. Grade histologi pada kanker payudara dikaitkan dengan agresivitas dan prognosis tumor [6]. Penilaian histologis kanker payudara melibatkan tinjauan dan penilaian tiga fitur morfologis yang sudah terstandarisasi antara lain jumlah mitosis, *nuclear pleomorphism*, dan *tubule formation*. Ketiga fitur ini secara bersama-sama membentuk dasar Sistem Grading Nottingham yang digunakan untuk menginformasikan karakterisasi dan prognosis kanker payudara [10].

Gambar makroskopik jaringan terduga kanker payudara yang digunakan sebagai sampel penelitian, memiliki kriteria berwarna putih keabuan padat kenyal, berbatas tegas (Gambar 1).



Gambar 1. Gambaran makroskopis jaringan setelah fiksasi 1 hari (A), 3 hari (B) dan 7 hari (C)

Hasil pengamatan secara mikroskopis kualitas sediaan jaringan terduga kanker payudara yang difiksasi menggunakan larutan fiksasi buffer formalin 10% dengan durasi fiksasi 1, 3, dan 7 hari pada pewarnaan *Hematoksilin Eosin* menggunakan *Automated Slide Stainer Gemini (ASS Gemini)* dan pembacaan menggunakan lensa objektif 40 x sebanyak 3 lapang pandang pada 9 sediaan jaringan terduga kanker payudara. Pengamatan dilakukan oleh dokter spesialis Patologi Anatomi disajikan pada gambar 2



Gambar 2. analisis mikroskopis jaringan terduga kanker payudara dengan perlakuan waktu fiksasi buffer formalin 10 % yang berbeda. 1 hari (A); 3 hari (B); 7 hari (C); kontrol positif (D) Menggunakan pewarnaan HE 400x, dan analisis kualitatif. Gambaran inti dan sitoplasma (panah kuning); jaringan ikat (panah merah).

Berdasarkan hasil gambar 2 kualitas sediaan dengan perbesaran lensa obyektif 40 x pada jaringan terduga kanker payudara yang difiksasi menggunakan larutan fiksasi buffer formalin 10% dengan durasi 1, 3 dan 7 hari diperoleh hasil lebih baik pada durasi fiksasi 3 dan 7 hari. Fiksasi menggunakan larutan fiksasi buffer formalin 10% pada durasi fiksasi 3 dan 7 hari, inti sel berwarna biru, sitoplasma berwarna merah, jaringan ikat serta keseragaman warna tampak jelas. Sedangkan pada durasi fiksasi 1 hari inti sel, sitoplasma dan jaringan ikat tidak terwarnai dengan jelas. Fiksasi buffer formalin 10 % pada durasi fiksasi 3 hari dan fiksasi 7 hari menunjukkan hasil penilaian keseragaman warna yg lebih tinggi dibandingkan dengan waktu fiksasi 1 hari.

Tabel 3 nilai rata-rata \pm standar deviasi pewarnaan HE berdasarkan perlakuan (hari)

Perlakuan (hari)	Rata-rata \pm Standar Deviasi		
	Inti Sel	Sitoplasma	Keseragaman Warna
Kontrol	4a \pm 0,0000	4a \pm 0,0000	4a \pm 0,0000
1	1,2b \pm 0,4410	1,2b \pm 0,4410	1,2b \pm 0,4410
3	3,8a \pm 0,4410	3,4a \pm 0,5270	3,4a \pm 0,5270
7	3,9a \pm 0,333	3,9a \pm 0,333	3,9a \pm 0,333

PEMBAHASAN

Fiksasi adalah proses pengawetan jaringan agar tidak mengalami pembusukan, dan mempertahankan bentuk, ukuran struktur sel dengan menggunakan larutan fiksatif. Tujuan fiksasi adalah untuk Menjaga jaringan agar tetap mirip dengan keadaan hidup dan memfasilitasi pembuatan irisan jaringan yang tipis.

Buffer formalin 10 % adalah larutan fiksatif yang umum digunakan pada pemeriksaan histopatologi. Tahapan pertama pada proses fiksasi yang menggunakan buffer formalin 10 % adalah proses penetrasi cairan buffer formalin 10 % yang berdifusi ke dalam sel dan membentuk *metilen hidrat*, proses ini membutuhkan waktu 6 jam. *Metilen hidrat* yang terbentuk berikatan dengan rantai protein dari sel dan membentuk rantai *hidroksimetil* yang reaktif. Rantai ini terbentuk selama fiksasi 1 hari. Penentuan tahap optimasi fiksasi sangat di perlukan karena untuk menentukan berapa lama sebaiknya jaringan di fiksasi agar tidak terjadi reaksi *cross link* atau reaksi silang yang mengakibatkan jaringan mengeras dan susah dipotong [11].

Hasil pengamatan penilaian terhadap kualitas sediaan jaringan terduga kanker payudara yang difiksasi menggunakan larutan fiksasi buffer formalin 10 % dengan durasi fiksasi 1, 3 dan 7 hari menunjukkan gambaran mikroskopis yang sangat baik pada durasi fiksasi 3 dan 7 hari, dimana inti sel berwarna biru, sitoplasma berwarna merah serta keseragaman warna sel yang jelas. Sedangkan penelitian sebelumnya menyatakan bahwa lama waktu fiksasi sebaiknya 24 jam sampai 72 jam. Adanya kesamaan hasil antara penelitian ini dengan penelitian sebelumnya adalah dimana durasi fiksasi 3 hari atau 72 jam memberikan hasil yang sangat baik [11]. Yang ditunjukkan dengan hasil penilaian pada pewarnaan inti sel rata-rata 3,8, pewarnaan sitoplasma rata-rata 3,4 dan keseragaman warna rata-rata 3,4. Hasil pewarnaan yang baik didapatkan pada durasi fiksasi 3 hari sampai 7 hari karena proses penyerapan buffer formalin 10 % ke dalam sel berlangsung optimal sehingga penyerapan pewarna *Hematoksislin dan Eosin* menjadi adekuat [12].

Selain durasi fiksasi, faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil dalam perlakuan sitohistology adalah ketebalan pemotongan pita parafin, proses deparafinisasi (menghilangkan parafin dengan *hot plate*) yang tidak sempurna, proses dehidrasi alkohol yang terlalu lama, pH dari Cat *Hematoksilin Eosin* Hematoksilin bersifat basa akan mewarnai struktur sel yang asam sedangkan eosin yang bersifat asam akan mewarnai struktur sel yang bersifat basa [13]. Jaringan kontrol positif yang paling umum digunakan pada pewarnaan *Hematoksilin Eosin* adalah dari apendiks [14]. karena jaringan apendiks mengandung berbagai jenis jaringan termasuk epitel, otot polos, jaringan limfoid, dan menunjukkan reaktivitas yang konsisten terhadap pewarnaan HE [4].

Kanker payudara adalah keganasan pada payudara yang berasal dari sel kelenjar, saluran kelenjar, serta jaringan penunjang payudara, namun tidak termasuk kulit payudara. Sel kanker ini dapat muncul jika telah terjadi mutasi genetik yang diakibatkan dari adanya kerusakan DNA pada sel normal. Karena Kanker Gen BRCA merupakan gen yang terdapat pada DNA dan berperan sebagai pengontrol pertumbuhan sel agar berjalan dengan normal. Dalam kondisi tertentu gen BRCA mengalami mutasi menjadi BRCA1 dan BRCA2, sehingga mempengaruhi fungsinya dalam mengontrol pertumbuhan dan memberi kemungkinan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol. Seorang wanita yang memiliki mutasi gen warisan meningkatkan risiko kanker payudara secara signifikan [15].

IV. SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jaringan terduga kanker payudara yang di fiksasi dengan buffer formalin 10 % dengan durasi fiksasi 3 dan 7 hari dan diwarnai menggunakan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* menunjukkan hasil gambaran mikroskopik lebih baik dibandingkan dengan durasi fiksasi 1 hari berdasarkan penilaian kualitas sediaan menggunakan skala ordinari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih peneliti ucapkan kepada Kepala Instalalasi Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr Saiful Anwar Malang , serta pihak-pihak yang telah membantu berjalan nya penelitan ini.

REFERENSI

- [1] M. P. Ningrum and RR. S. R. Rahayu, "Determinan Kejadian Kanker Payudara pada Wanita Usia Subur (15-49 Tahun)," *Indonesian Journal of Public Health and Nutrition*, vol. 1, no. 3, pp. 362–370, 2021, [Online]. Available: <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/IJPHN>
- [2] R. Ervina, E. Norahmawati, and A. Angelina, "Profil Klinikopatologi Karsinoma Payudara di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Saiful Anwar Malang," *Jurnal Klinik dan Riset Kesehatan*, vol. 1, no. 1, pp. 12–21, 2021, doi: 10.11594/jk-risk.01.1.3.
- [3] E. Khristian and D. Inderiati, *Sitohistoteknologi-SC*, 1st ed. Jakarta: BPPSDM Kemenkes RI, 2017.
- [4] K. S. Suvarna, C. Layton, and J. D. Bancroft, *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques 8th Edition*, Eighth. Elsevier Ltd, 2018.
- [5] M. E. Faldas and J. Bruce-Gregorios, *Histopathologic Techniques*. Independently Published, 2017. [Online]. Available: <https://books.google.co.id/books?id=q4z6swEACAAJ>
- [6] M. Agustin, "Profil Mikroskopis Jaringan Hepar Mencit (*Mus musculus*) yang Difiksasi dengan Neutral Buffered Formalin (NBF 10%) dan Larutan Helly," *Jurnal Laboratorium Medis*, vol. 03, no. 02, pp. 90–95, 2021, [Online]. Available: <https://ejournal.poltekkes-smg.ac.id/ojs/index.php/JLM/>
- [7] F. Hikmawati, *Metodologi Penelitian*, 4th ed. Depok: Rajawali Pers, 2020.
- [8] T. Ariyadi and H. Suryono, "Kualitas sediaan jaringan kulit metode microwave dan conventional histoprocessing pewarnaan hematoxylin eosin," *JLabMed*, vol. 1, no. 1, pp. 7–11, 2017, [Online]. Available: <https://jurnal.unimus.ac.id/index.php/JLabMed/article/view/2393>

- [9] I. M. Nur and R. Risanti, "Hubungan Usia dengan Tipe Histopatologi , Grading , dan Metastasis Kelenjar Getah Bening pada Penderita Karsinoma Payudara di Bagian Patologi Anatomi Rumah Sakit Al-Islam Bandung Periode Relationship Between Age And The Type Of Histopathology , Grading , ," pp. 182–189, 2015.
- [10] R. Jaroensri *et al.*, "Deep learning models for histologic grading of breast cancer and association with disease prognosis," *NPJ Breast Cancer*, vol. 8, no. 1, 2022, doi: 10.1038/s41523-022-00478-y.
- [11] M. van Seijen *et al.*, "Impact of delayed and prolonged fixation on the evaluation of immunohistochemical staining on lung carcinoma resection specimen," *Virchows Archiv*, vol. 475, no. 2, pp. 191–199, 2019, doi: 10.1007/s00428-019-02595-9.
- [12] S. K. Suvarna, C. Layton, and J. D. Bancroft, *Practice of Histological Techniques Edition Bancroft ' s*, 8th ed. Elsevier Inc, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00143-5>.
- [13] Z. Musyarifah and S. Agus, "Proses Fiksasi pada Pemeriksaan Histopatologik," *Jurnal Kesehatan Andalas*, vol. 7, no. 3, p. 443, 2018, doi: 10.25077/jka.v7i3.900.
- [14] P. Garrido *et al.*, "Multidisciplinary consensus on optimising the detection of NTRK gene alterations in tumours," *Clinical and Translational Oncology*, vol. 23, no. 8, pp. 1529–1541, 2021, doi: 10.1007/s12094-021-02558-0.
- [15] Y. Suryani, *Kanker Payudara*, 1st ed. Padang: PT. Freeline Cipta Granesia, 2020.

Conflict of Interest Statement:

The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.