

Dokumen nomor : CCRC-03-017-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

URAIAN	DIBUAT OLEH	DIPERIKSA OLEH	DIPERIKSA OLEH	DISETUJU OLEH
Jabatan	Staf CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Sri Handayani	Ulfatul Husnaa		Edy Meiyanto
Tanggal	21 Mei 2015			

PROTOKOL

PENGAMATAN MIGRASI DENGAN SCRATCH WOUND HEALING ASSAY

DAFTAR ISI

	HALAMAN
DAFTAR ISI	1
A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN	2
B. TUJUAN	2
C. PENDAHULUAN	2
D. OPERASIONAL	3

Dokumen nomor : CCRC-03-017-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN

No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
-		Sri Handayani Staff CCRC	/	Riris Istighfari J Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi					
No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
Isi					
Isi					

B. TUJUAN

Memberikan panduan secara detail dan bertahap mulai dari persiapan, pembuatan sampel, perlakuan, deteksi, dan interpretasi data hasil pegamatan migrasi sel dengan metode wound healing.

C. PENDAHULUAN

Migrasi sel merupakan fenomena yang kompleks yang berhubungan dengan banyak proses seluler. Salah satu metode untuk mempelajari kemampuan sel untuk bermigrasi melalui *in vitro* adalah wound healing. Keuntungan menggunakan wound healing assay yaitu biaya murah dan mudah dilakukan. Pengujian migrasi dengan scratch wound healing assay biasanya dilakukan dengan menggores sel monolayer menggunakan yellow tip steril hingga terbentuk goresan dengan ukuran tertentu. Penentuan kemampuan migrasi sel dilakukan dengan mengkuantifikasi lebar goresan pada jam ke-0 dan pada interval waktu yang ditentukan hingga sel bermigrasi untuk menutup goresan. Pengukuran ini secara langsung memungkinkan untuk mengetahui efek suatu senyawa dengan konsentrasi yang berbeda terhadap kemampuan interaksi sel-sel selama melakukan migrasi sel (Rodriguez et al., 2005).

Goresan pada sel monolayer akan mengaktifkan espon antar sel terhadap rusaknya kontak antar sel. Adanya *growth factor* pada batas goresan memicu sel-sel untuk menutup goresan tersebut dengan kemampuan proliferasi dan migrasi sel. Proses tersebut merefleksikan kebiasaan sel baik secara individu maupun kelompok terhadap jaringan disekitarnya. Proses tersebut dapat digunakan untuk penelitian polarisasi sel, matrix remodeling, migrasi sel, dan proses-proses lainnya.

D. OPERASIONAL

NB. Untuk penghematan. Persiapan untuk uji migrasi ini bersamaan dengan uji apoptosis flowcytometry.

1. Alat

- Mikropipet 20, 200, 1000 µl
- Tabung reaksi kecil
- Rak tabung kecil
- 24-well plate
- Yellow tip

Dokumen nomor : CCRC-03-017-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

2. Bahan

Stok sampel dengan konsentrasi tertentu
DMSO/aquabidest (pelarut sampel)
Medium Kultur (DMEM/RPMI)
PBS 1x

3. Penanaman Sel

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Ambil sel dari inkubator CO ₂ , amati kondisi sel.	Gunakan kultur sel dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen.
2.	Lakukan panen sel sesuai Protokol Panen Sel	-
3.	Lakukan perhitungan sel sesuai Protokol Perhitungan Sel	• Karena saat pengujian dibutuhkan sel 80% konfluen maka jumlah sel yang digunakan untuk 24 wellplate adalah 7.5×10^4 sel/sumuran.
4.	Siapkan 24 well plate	-
5.	Tanam sel @500 μ l /well	• Setiap akan mengisi sumuran, resuspensi sel kembali.
6.	Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.	-
7.	Inkubasi sel di dalam inkubator sampai 80% konfluen.	Dilihat 24 jam setelah inkubasi, jika belum konfluen, inkubasi kembali
8.	Pencucian sel menggunakan PBS 1x	
9.	Ganti media MK dengan 0.5% FBS	jika menggunakan sel MCF-7 maka perlu penambahan estradiol
10.	Inkubasi 24 jam	

2. Wound healing dan treatment Sel

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Siapkan yellow tip steril	
2.	Buat scratch dengan yellow tip tegak lurus dengan bantuan tutup plate yg sudah dilap tissue alkohol	-usahakan dengan arah scratch dan penekanan yang sama tiap sumuran
3.	Buang semua MK dari sumuran	-
4.	Cuci sel dalam sumuran dengan PBS 1x masing-masing 500 μ l.	- pastikan pencucian sel benar-benar bersih sehingga bagian goresan tidak ada sel yang menempel dan tidak sel-sel yang melayang.
5.	Dokumentasikan hasil scratch dengan perbesaran yang sama	Untuk meminimalisir subjektivitas, gunakan mikroskop yang sama, perbesaran yang sama, dan kamera yang sama, settingan yang sama. Minimal 5 lapang pandang
6.	Buang PBS dari sumuran dengan pipet secara perlahan-lahan.	-ulangi cuci dengan PBS sampai bersih (tidak ada sel yang melayang)
7.	Masukkan sampel dengan konsentrasi tertentu sebanyak 500 μ l ke dalam sumuran.	-Jika kombinasi disesuaikan

Dokumen nomor : CCRC-03-017-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

8.	Masukkan media ke dalam sumuran untuk kontrol sel dan pelarut DMSO ke dalam sumuran untuk kontrol pelarut DMSO.	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrol sel hanya ditambah MK. • Kontrol pelarut DMSO hanya ditambah pelarut DMSO dalam MK.
9.	Inkubasi <i>plate</i> di dalam inkubator.	
10.	Amati kondisi sel setelah inkubasi 0, 18, 24 dan 42 jam, dokumentasikan. Jika belum ada perubahan, lihat sampai 48 jam	Konsultasikan untuk menentukan akhir waktu inkubasi.
11.	Dokumentasikan hasil scratch setiap waktu pengamatan dengan perbesaran yang sama	Untuk meminimalisir subjektivitas, gunakan mikroskop yang sama, perbesaran yang sama, dan kamera yang sama, settingan yang sama. Minimal 5 lapang pandang
12.	Lakukan analisis data	-

3. Interpretasi Data

Dibandingkan jarak goresan antara kontrol sel dengan perlakuan pada tiap waktu pengamatan.

4. Daftar Rujukan

Rodriguez, L.G., Wu X., and Guan J.L. 2005. *Wound-healing assay*. Mol Biol 294: 23-9.

Jika ada sesuatu dalam SOP ini tidak bisa dilakukan atau tidak sesuai dengan kenyataan dilapangan, segera laporkan kepada Staff/Supervisor CCRC