

Dokumen nomor : CCRC-03-011-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-011-00	Tanggal : 24 Maret 2009

URAIAN	DIBUAT OLEH	DIPERIKSA OLEH	DIPERIKSA OLEH	DISETUJU OLEH
Jabatan	Staf CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Aditya Fitriasaki	Dyaningtyas Dewi	Muthi' Ikawati	Edy Meiyanto
Tanggal	26 April 2010	26 April 2010		

PROSEDUR TETAP

PENGAMATAN APOPTOSIS DENGAN METODE *DOUBLE STAINING*

DAFTAR ISI

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

Dokumen nomor : CCRC-03-011-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-011-00	Tanggal : 24 Maret 2009

A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN

No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
-		Endah P Septi Staff CCRC		Riris Istighfari J Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Menggunakan format lama Belum ada penomoran dokumen Belum ada prosedur pencatatan pada buku komunikasi harian				
No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
CCRC-02-011-00	24 Maret 2009	Aditya Fitriasari Staff CCRC	Adam Hermawan Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Menggunakan format baru Sudah ada penomoran dokumen Menyebutkan prosedur pencatatan pada buku komunikasi harian				
CCRC-03-011-01	26 April 2010	Aditya Fitriasari Staff CCRC	Dyaningtyas Dewi Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Menggunakan penomoran baru, penggunaan kartu <i>stock</i>				

B. TUJUAN

Memberikan panduan secara detail dan bertahap mulai dari persiapan, pembuatan sampel, perlakuan, deteksi, dan interpretasi data hasil uji apoptosis dengan metode double staining.

C. PENDAHULUAN

Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang menghasilkan perubahan karakteristik morfologi dan biokimia sel. Stimulasi proses apoptosis meliputi kerusakan DNA, adanya TNF (*Tumor Necrosis Factor*) atau tidak adanya faktor pertumbuhan. Apoptosis ditandai dengan adanya membran *blebbing* tanpa hilangnya integritas membran, kondensasi dan fragmentasi kromatin, pematatan organela sitoplasma, dilatasi dari retikulum endoplasma, penurunan volume sel dan pembentukan badan apoptosis.

Apoptosis dapat dideteksi dengan pengecatan akridin oranye – etidium bromida. Metode ini berdasarkan pada perbedaan fluoresensi DNA pada sel yang hidup dan mati karena pengikatan akridin oranye – etidium bromida. Akridin oranye akan menembus seluruh bagian sel dan nukleus akan tampak berwarna hijau. Sedangkan etidium bromid hanya dapat berinterkalasi dengan sel yang membrannya sudah rusak dan nukleus akan berwarna merah. Warna yang ditimbulkan oleh etidium bromida pada sel mati lebih dominan jika dibandingkan dengan akridin oranye sehingga nukleus pada sel mati akan berwarna oranye. Sel hidup dengan membran yang masih utuh memiliki nukleus dengan warna hijau yang seragam. Selama sel mengalami proses apoptosis dan membran *blebbing* mulai terjadi, etidium bromida dapat masuk ke dalam sel dan memberikan warna oranye.

Dokumen nomor : CCRC-03-011-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-011-00	Tanggal : 24 Maret 2009

D. OPERASIONAL

1. Alat

Mikropipet 20, 200, 1000 μ l
 Tabung reaksi kecil
 Rak tabung kecil
 Vortex
 Cover slip
 24-well plate

2. Bahan

Stok sampel dengan konsentrasi tertentu dalam DMSO
 DMSO
 MK (DMEM/RPMI)
 PBS
 Reagen etidium bromida-akridin oranye (karsinogen)
 Perhatian : Reagen mudah menguap! Gunakan sarung tangan dan masker saat pengecatan.

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	<ul style="list-style-type: none"> Jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji apoptosis dengan metode double staining adalah 5×10^4 sel/sumuran. Membuat suspensi sel 5×10^4 sel masing-masing 200 μl/sumuran.
4.	Siapkan 24 well plate dan cover slip.	-
5.	Masukkan cover slip ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati.	Setiap penggunaan coverslip, tulis di Kartu stock CCRC
6.	Transfer 200 μ l suspensi sel tepat di atas coverslip secara merata dan perlahan, kemudian diamkan selama 3-30 menit dalam inkubator agar sel menempel pada coverslip.	<ul style="list-style-type: none"> Setiap akan mengisi sumuran, resuspensi sel kembali. Pastikan sel sudah menempel pada coverslip dengan mikroskop inverted
7.	Tambahkan 800 μ l MK ke dalam sumuran secara perlahan.	-
8.	Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.	-
9.	Inkubasi sel di dalam inkubator selama semalam.	Inkubasi ini dilakukan agar sel pulih dan kembali dalam keadaan normal setelah panen, ditandai dengan sel sudah menempel di dasar sumuran.
10.	Jika dalam waktu semalam kondisi sel belum pulih, ganti media sel (MK) dan inkubasikan kembali.	Selalu amati kondisi sel sebelum perlakuan.
11.	Setelah sel normal kembali, segera buat satu konsentrasi sampel, yaitu pada IC ₅₀ untuk perlakuan dan satu kontrol sel, masing-masing sebanyak 1000 μ l.	-

Dokumen nomor : CCRC-03-011-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-011-00	Tanggal : 24 Maret 2009

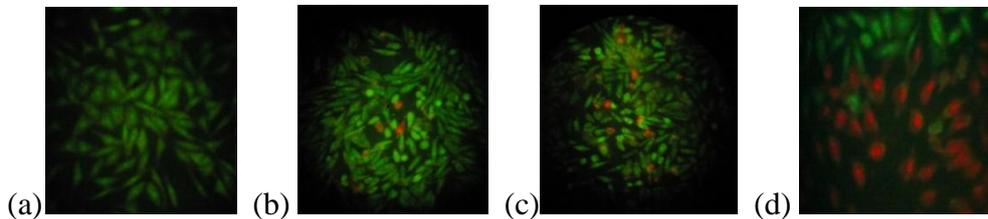
2. Perlakuan *Double Staining* Sampel pada Sel

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Ambil 24 well plate yang telah berisi sel dari inkubator.	-
2.	Buang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.	-
3.	Cuci sel dalam sumuran dengan PBS masing-masing 500 µl.	-
4.	Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.	-
5.	Masukkan sampel dengan konsentrasi tertentu sebanyak 1000 µl ke dalam sumuran.	-
6.	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.
7.	Inkubasi <i>plate</i> di dalam inkubator.	Lama inkubasi tergantung pada efek perlakuan dalam mengakibatkan apoptosis (10-24 jam).
8.	Amati kondisi sel setelah inkubasi 10 jam, dokumentasikan.	Konsultasikan untuk menentukan akhir waktu inkubasi.
9.	Setelah inkubasi selesai, keluarkan plate dari inkubator.	-
10.	Buang semua media dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.	-
11.	Cuci sel dalam sumuran dengan PBS masing-masing 500 µl.	-
12.	Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.	-
13.	Ambil <i>cover slip</i> menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati.	-
14.	Letakkan <i>cover slip</i> di atas <i>object glass</i> (kaca obyektif).	Posisi sel harus berada di atas, jangan sampai terbalik.
15.	Beri label pada <i>object glass</i> .	-
16.	Teteskan 10 µl reagen campuran etidium bromida-akridin oranye di atas <i>cover slip</i> . Ratakan dengan cara menggoyang secara perlahan.	Gunakan sarung tangan dan masker
17.	Amati di bawah mikroskop fluoresen.	-
18.	Jika pewarnaan belum optimal, tunggu beberapa menit dan amati kembali.	-
19.	Dokumentasikan.	Set kamera dengan <i>setting</i> khusus untuk fluoresen.
20.	Setelah selesai, buang <i>cover slip</i> dan cuci kembali <i>object glass</i> .	-
21.	Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada Protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.	

Dokumen nomor : CCRC-03-011-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-011-00	Tanggal : 24 Maret 2009

3. Interpretasi Data

Sel yang berfluorosen hijau menunjukkan sel yang hidup, sedangkan sel yang berfluorosen merah menunjukkan sel yang mati. Sel utuh berfluoresen merah menunjukkan sel nekrosis sedangkan sel yang terfragmentasi menunjukkan sel yang mengalami apoptosis.



Effects of doxorubicin, EASF and their combination on apoptosis induction in T47D cells after 24 hours incubation. The cell was stained by etidium bromide-acridine Orange and viewed with a microscope fluorescence. (a) control cells, (b) EASF 7 µg/ml (c), doxorubicin 8 nM (d) and combination of doxorubicin 8 nM and EASF 7 µg/ml. Viable and death cell were represented by green and orange fluorescence, respectively.

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