

Dokumen nomor : CCRC-03-013-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

<b>URAIAN</b>	<b>DIBUAT OLEH</b>	<b>DIPERIKSA OLEH</b>	<b>DIPERIKSA OLEH</b>	<b>DISETUJU OLEH</b>
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

### UJI KOMBINASI DENGAN AGEN KEMOTERAPI

#### DAFTAR ISI

	HALAMAN
DAFTAR ISI	1
A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN	2
B. TUJUAN	2
C. PENDAHULUAN	2
D. OPERASIONAL	3
1. Alat	3
2. Bahan	3
3. Prosedur Kerja	3
4. Analisis dan Interpretasi Data	7

Dokumen nomor : CCRC-03-013-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	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
<b>Isi</b>	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 Fitriasaki Staff CCRC	Adam Hermawan Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
<b>Isi</b>	Menggunakan format baru Sudah ada penomoran dokumen Menyebutkan prosedur pencatatan pada buku komunikasi harian				
CCRC-03-011-01	26 April 2010	Aditya Fitriasaki Staff CCRC	Dyaningtyas Dewi Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
<b>Isi</b>	Menggunakan penomoran baru				

### B. TUJUAN

Memberikan panduan secara detail dan bertahap mulai dari persiapan, pembuatan sampel, perlakuan, deteksi, dan interpretasi data hasil uji kombinasi senyawa kemoprevensi dengan agen kemoterapi.

### C. PENDAHULUAN

Saat ini perkembangan terapi kanker modern memberi peluang pemberian kombinasi kemoterapi. Kombinasi kemoterapi (ko-kemoterapi) merupakan strategi terapi dengan mengkombinasikan suatu senyawa dengan agen kemoterapi. Kombinasi kemoterapi bertujuan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan dan menurunkan efek samping agen kemoterapi. Idealnya obat yang dikombinasi memiliki efek sinergis melawan sel kanker namun toksisitasnya dapat ditoleransi sehingga secara klinik akan lebih efisien dibandingkan dengan agen tunggal. Oleh karenanya desain kombinasi yang tepat diperlukan untuk memperoleh manfaat yang lebih optimal.

Metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi kombinasi obat adalah Isobologram dan *Combination Index* (CI). Analisis CI menghasilkan suatu nilai parameter kuantitatif yang menggambarkan efikasi kombinasi menggunakan persamaan :

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2$$

Dengan Dx adalah konsentrasi satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi, yaitu IC<sub>50</sub> terhadap pertumbuhan sel kanker payudara, dan (D)<sub>1</sub>, (D)<sub>2</sub> adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama. CI digunakan untuk menentukan efek aditif yang diberikan dua kombinasi senyawa, apakah berupa efek sinergis, aditif atau antagonis.

Dokumen nomor : CCRC-03-013-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

#### D. OPERASIONAL

##### 1. Alat

- a. Mikropipet 20, 200, 1000  $\mu$ l
- b. Tabung reaksi kecil
- c. Rak tabung reaksi kecil
- d. Vortex
- e. *Conical tube* 15 ml
- f. White tip
- g. Yellow tip
- h. Blue tip
- i. 96-well plate
- j. Tisu makan (kotak)
- k. Tempat buangan untuk media bekas dan PBS

##### 2. Bahan

- a. Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf
- b. Pelarut DMSO
- c. Media Kultur (MK)
- d. Phosphat Buffer Saline (PBS)
- e. Reagen MTT 0,5 mg/ml
- f. SDS 10% dalam HCl 0,1 N

##### 3. Prosedur Kerja

No	Pekerjaan	Perhatian
1.	Ikuti <b>protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.</b>	-
2.	Ambil dish berisi sel dari inkubator CO <sub>2</sub> , amati kondisi sel di bawah mikroskop.	Gunakan kultur sel dalam kondisi 70-80% konfluen untuk dipanen.
3.	Jika sel sudah siap dipanen, siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.	Lihat bagian Alat dan Bahan.
4.	Panen sel sesuai dengan protokol Panen Sel.	-
5.	Hitung jumlah sel sesuai dengan protokol penghitungan sel.	Jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji kombinasi adalah $5 \times 10^3$ sel/sumuran ( $5 \times 10^3$ sel/100 $\mu$ l MK).
6.	Buat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir $5 \times 10^3$ sel/100 $\mu$ l MK.	-
7.	Transfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 $\mu$ l.	Lihat keterangan contoh desain plate. Setiap kali mengisi 12 sumuran, resuspensi sel agar tetap homogen.

Dokumen nomor : CCRC-03-013-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

8.	Sisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) untuk kontrol media.	-
9.	Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel. Dokumentasikan dengan menggunakan kamera.	Pastikan sel dalam setiap sumuran homogen.
10.	Inkubasi sel di dalam inkubator, setelah 2 jam dokumentasikan dan laporkan ke staff atau pimpinan apakah sel sudah siap untuk ditreatment.	Inkubasi ini dilakukan agar sel pulih dan kembali ke keadaan normal setelah panen sel.
11.	Setelah sel normal kembali, segera buat seri konsentrasi sampel dan agen kemoterapi (misal: Doxorubicin) untuk perlakuan.	Seri konsentrasi terdiri dari 4 konsentrasi: $\frac{1}{2}$ IC <sub>50</sub> , $\frac{3}{8}$ IC <sub>50</sub> , $\frac{1}{4}$ IC <sub>50</sub> , dan $\frac{1}{8}$ IC <sub>50</sub> .
12.	Ambil plate yang telah berisi sel dari inkubator.	-
13.	Buang media sel dengan cara balikkan plate 180° di atas tempat buangan, kemudian tekan plate secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan.	Jarak pembuangan dengan plate sekitar 15 cm. Tisu tidak perlu disemprot dengan alkohol 70%.
14.	Cuci sel dalam sumuran dengan masing-masing 100 µl PBS.	-
15.	Buang PBS, tiriskan sisa cairan dengan tisu.	Lihat proses pembuangan pada no. 12
16.	Untuk kelompok perlakuan kombinasi : Masukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran @ 50 µl dengan replikasi 3 kali (triplo), kemudian tambahkan seri konsentrasi Doxorubicin untuk kombinasi @ 50 µl.	-
17.	Untuk kelompok perlakuan tunggal : Masukkan seri konsentrasi sampel atau agen kemoterapi ke dalam sumuran @ 50 µl dengan replikasi 3 kali (triplo), kemudian tambahkan MK @ 50 µl ke dalam sumuran.	-
18.	Untuk kontrol sel : Tambahkan MK ke dalam sumuran yang berisi sel @ 100 µl dengan replikasi 3 kali (triplo).	-
19.	Untuk kontrol media : Tambahkan MK ke dalam sumuran yang kosong	-

Dokumen nomor : CCRC-03-013-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

	(tanpa sel) @ 100 $\mu$ l dengan replikasi 3 kali (triplo).	
20.	Inkubasi di dalam inkubator CO <sub>2</sub> .	Lama inkubasi tergantung pada efek perlakuan terhadap sel. Jika dalam waktu 24 jam belum terlihat efek sitotoksik, inkubasi kembali selama 24 jam (waktu inkubasi total 24-48 jam).
21.	Menjelang akhir waktu inkubasi, dokumentasikan dengan kamera untuk melihat kondisi sel pada setiap perlakuan.	-
21.	Buat stok MTT 5 mg/ml dengan cara timbang 50 mg serbuk MTT, larutkan dalam 10 ml PBS (dengan bantuan vortex).  Buat reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara ambil 1 ml stok MTT 5 mg/ml, encerkan dengan MK ad 10 ml.	Gunakan sarung tangan! (MTT – karsinogenik).  Reagen ini dibuat untuk 1 buah 96 <i>well plate</i> .
22.	Buang media sel, cuci masing-masing dengan 100 $\mu$ L PBS 1x.	Lihat proses pencucian pada no. 12 sampai no. 14.
23.	Tambahkan 100 $\mu$ l reagen MTT 0,5 mg/ml 100 $\mu$ l ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel).	
24.	Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk kristal formazan yang ungu.	-
25.	Setelah 2-4 jam, periksa kondisi sel dengan mikroskop <i>inverted</i> . Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan <i>stopper</i> SDS 10% dalam HCl 0,1 N.	Pekerjaan tidak perlu dilakukan di dalam LAF hood.
26.	Bungkus <i>plate</i> dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap dan suhu kamar selama semalam.	Jangan diletakkan di inkubator!
27.	Keesokan harinya, <i>plate</i> di- <i>shaker</i> selama 10 menit untuk melarutkan formazan.	
28.	Hidupkan ELISA <i>reader</i> , tunggu proses <i>progressing</i> hingga selesai.	

Dokumen nomor : CCRC-03-013-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

29.	Buka pembungkus <i>plate</i> dan tutup <i>plate</i> . Masukkan ke dalam ELISA reader.	Posisi plate jangan terbalik.
30.	Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA reader dengan =550-600 nm (□□595 nm) dengan cara tekan tombol <i>START</i> .	-
31.	Setelah semua sumuran dibaca, tekan tombol <i>STOP</i> , dan matikan ELISA reader.	Setiap kali pembacaan di ELISA reader, catat di buku catatan pemakaian ELISA reader.
32.	Simpan dan tempel kertas hasil ELISA pada LOG BOOK. Segera transfer hasil ELISA ke Program Excel.	
33.	Hitung prosentase sel hidup akibat perlakuan kombinasi senyawa.	Lihat Analisis dan Interpretasi Data.
34.	Hitung harga CI ( <i>Combination Index</i> ).	Lihat Analisis dan Interpretasi Data.
35.	Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan <b>sanitasi seperti pada Protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.</b>	-

Dokumen nomor : CCRC-03-013-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

**Contoh desain plate**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	Seri konsentrasi 1-4 sampel			Seri konsentrasi 1-4 Sampel + Doxo kons 1			Seri konsentrasi 1-4 Sampel + Doxo kons 3								
B															
C															
D															
E	Seri konsentrasi 1-4 Doxorubicin			Seri konsentrasi 1-4 Sampel + Doxo kons 2			Seri konsentrasi 1-4 Sampel + Doxo kons 4			Kontrol Sel					
F															
G													Kontrol Media		
H															

**4. Analisis dan Interpretasi Data**

a. Perhitungan prosentasi sel hidup

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

b. Perhitungan harga CI (*Combination Index*)

Metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi kombinasi obat adalah *Combination Index* (CI) menggunakan persamaan :

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2$$

Dx : Konsentrasi satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi

(D)<sub>1</sub>, (D)<sub>2</sub> : Konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama

**Interpretasi nilai CI**

Nilai CI	Interpretasi
< 0,1	efek sinergis sangat kuat
0,1 – 0,3	efek sinergis kuat
0,3 – 0,7	efek sinergis
0,7 – 0,9	efek sinergis ringan – sedang
0,9 – 1,1	mendekati efek aditif
1,1 – 1,45	efek antagonis ringan – sedang
1,45 – 3,3	efek antagonis
> 3,3	efek antagonis kuat – sangat kuat

Dokumen nomor : CCRC-03-013-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

**Contoh hasil penelitian :**

Viabilitas sel MCF-7 pada Pelakuan Kombinasi Senyawa Z dan Doxorubicin

Senyawa		Doxorubicin (nM)			
		50	100	150	200
Z (uM)	62.5	86.30	87.75	45.67	3.04
	125	78.69	65.95	15.85	22.28
	187.5	64.64	57.72	25.05	16.40
	250	66.99	53.43	21.80	14.53

Persamaan Regresi Linear Doxorubicin :  $y = -79.671x + 252.28$

Dx			
Doxorubicin (nM)			
50	100	150	200
121.16	116.17	391.95	1343.70
150.97	218.13	928.13	770.59
226.58	276.75	711.35	913.39
211.69	313.29	781.46	964.08

Persamaan Regresi Linear Senyawa Z :  $y = -73.565x + 246.09$

Dx			
Senyawa Z (uM)			
62.5	125	187.5	250
148.64	142.03	530.06	2012.86
188.63	280.99	1348.28	1102.28
292.80	363.62	1010.80	1325.12
272.01	415.88	1119.12	1404.93

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2$$

CI		Doxorubicin (nM)			
		50	100	150	200
-	62.5	0.83*	1.30	0.50*	0.18*
	125	0.99	0.90	0.25*	0.37*
	187.5	0.86*	0.88*	0.40*	0.36*
	250	1.16	0.92	0.42*	0.39*

\* Menunjukkan efek sinergis antara senyawa Z dan doxorubicin.

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