



Dokumen nomor : CCRC-04-011-01	Tanggal : 26 April 2010
Mengganti nomor : CCRC-00-000-00	Tanggal : 26 Februari 2009

URAIAN	DIBUAT OLEH	DIPERIKSA OLEH	DIPERIKSA OLEH	DISETUJU OLEH
Jabatan	Staf CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Edison Chrisnanto	Sarmoko	Muthi' Ikawati	Edy Meiyanto
Tanggal	26 Februari 2009	26 April 2010		

PROSEDUR TETAP

UJI ANTIANGIOGENESIS *IN SITU*

DAFTAR ISI

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



Dokumen nomor : CCRC-04-011-01	Tanggal : 26 April 2010
Mengganti nomor : CCRC-00-000-00	Tanggal : 26 Februari 2009

A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN

No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
CCRC-00-000-00	26 Februari 2009	Edison Chrisnanto	Adam Hermawan	Muthi' Ikawati	Edy Meiyanto
		Staff CCRC	Staff CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Isi					
No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
CCRC-04-011-01	26 April 2010	Edison Chrisnanto	Adam Hermawan	Muthi' Ikawati	Edy Meiyanto
		Staff CCRC	Staff CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Isi					
Menggantikan penomoran baru Sudah ada halaman					

B. TUJUAN

Mengatur standar kerja antiangiogenesis *in situ* yang ada di laboratorium penelitian CCRC.

C. PENDAHULUAN

Angiogenesis menjadi tahap penentu karsinogenesis kanker menuju metastasis dimana sel kanker mulai menyebar ke jaringan lain. Oleh karena itu penghambatan pembentukan pembuluh darah baru dapat menjadi salah satu strategi terapi kanker yang potensial sehingga banyak senyawa-senyawa maupun bahan alam yang dikembangkan sebagai agen antiangiogenesis.

Dalam pengembangannya, tentu saja calon agen-agen tersebut memerlukan pengujian. Metode paling dasar yang digunakan adalah metode *Chorio Allantois Membrane* (CAM). Metode ini menggunakan membran korio alantois telur ayam. Pertimbangannya adalah bahwa pada membran tersebut terdapat banyak pembuluh darah. Jadi jika terjadi perubahan baik itu berupa penambahan maupun pengurangan jumlah pembuluh darah baru dapat dijadikan salah satu indikator untuk mengetahui pengaruh suatu senyawa terhadap pertumbuhan pembuluh darah baru.

D. OPERASIONAL

1. PERSIAPAN

No	Prosedur kerja	Perhatian
1	Kenakan peralatan kerja lab standar seperti jas lab, masker dan gloves	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pastikan semua peralatan sudah terpakai dengan benar
2	Siapkan perlengkapan kerja yang akan digunakan seperti pipet mikro, pH meter, sentrifugator, autoklaf, dan pinset	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Semua alat yang diperlukan untuk perlakuan CAM harus disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf
3	Lakukan orientasi kelarutan dan pembuatan seri kadar ekstrak/senyawa uji menggunakan pelarut <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) dan <i>co-solvent</i> DMSO	<ul style="list-style-type: none"> • Konsentrasi DMSO pada seri kadar senyawa/ekstrak uji tertinggi yang boleh digunakan adalah 2 %.
4	Lakukan preparasi bFGF dalam Tris HCl	<ul style="list-style-type: none"> • Timbang 60 mg Tris HCl, larutkan dalam aquades ad 60 ml (konsentrasi Tris HCl 10 mM pH 7,5)



Dokumen nomor : CCRC-04-011-01	Tanggal : 26 April 2010
Mengganti nomor : CCRC-00-000-00	Tanggal : 26 Februari 2009

	<ul style="list-style-type: none">• Timbang 10 μg bFGF larutkan dengan Tris HCl ad 10 ml (konsentrasi 10 ng/μl)• Dosis bFGF untuk tiap telur perlakuan adalah 30 ng• Preparasi dilakukan secara aseptis di <i>Laminair Air Flow</i>
--	---

2. OPERASIONAL

Perlakuan pada *Chorio Allantois Membrane* (CAM) atau membran korio alantois telur ayam dilakukan pada telur berusia 9 hari (setelah dilakukan pengadaptasian). Perlakuan dilakukan secara aseptis dibawah *Laminar Air Flow*.

No	Prosedur kerja	Perhatian
1	Lakukan pengadaptasian telur ayam <i>Specific Pathogen Free</i> (SPF) berusia 7 hari dikondisikan selama 1 atau 2 hari sampai usia 8 atau 9 hari	Adaptasi dilakukan dalam inkubator pada suhu 39 °C selama 2 hari agar telur terbiasa dengan lingkungan barunya.  Telur berembrio dalam inkubator
2	<p>Lakukan <i>Candling</i> pada telur ayam.</p> <p>Cari posisi pada telur yang pada bagian tersebut terdapat embrio dan rongga udara.</p> <p>Ciri-ciri embrio: seperti terdapat ada dua titik (titik ini adalah organ mata dari embrio tersebut)</p> <p>Gambarlah bidang pada permukaan cangkang telur berbentuk persegi 1x1cm² (Dari persegi ini nantinya akan dibuat sebuah jendela untuk implantasi paper disc yang sudah mengandung ekstrak/senyawa uji, bFGF, maupun bahan-bahan lainnya).</p> <p>Ciri-ciri rongga udara: biasanya terdapat di salah satu kutub telur, terlihat seperti terdapat ruang kosong.</p> <p>Sedot udara (menggunakan karet penghisap pipet) di bagian rongga udara pada telur sampai embrio bergeser ke daerah itu.</p> <p>Ciri-ciri: pada bagian kutub yang tadinya tampak kosong, sekarang tampak berisi. Sedangkan di bagian yang</p>	 Proses Candling Lakukan di dalam LAF hood



Dokumen nomor : CCRC-04-011-01	Tanggal : 26 April 2010
Mengganti nomor : CCRC-00-000-00	Tanggal : 26 Februari 2009

	sudah ditandai kotak persegi akan tampak kosong.	
3	Buatlah window pada telur Setelah posisi embrio bergeser, buat sebuah pintu pada cangkang yang ditandai dengan gambar persegi berukuran 1x1 cm ² .	 <p>Perhatian! Karena window ini adalah sebuah pintu, pastikan terdapat engsel pada salah satu sisi pada pintu tersebut. Setelah pintu terbuat, letakkan telur diatas sebuah penyangga. Sementara itu lakukan langkah berikutnya. Lakukan dengan hati-hati! Lakukan di dalam LAF hood</p>
4	Ambil ekstrak dan bahan-bahan uji lain (misalnya bFGF dan kontrol pelarut). <i>Loading</i> -kan bahan-bahan tersebut dalam sebuah <i>paperdisc</i> menggunakan mikropipet.	

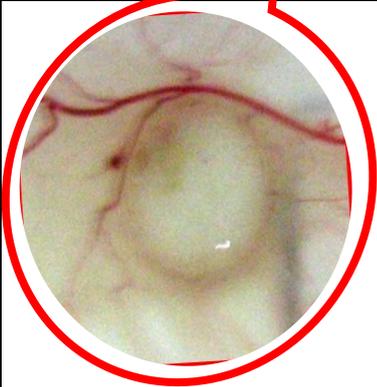


Dokumen nomor : CCRC-04-011-01	Tanggal : 26 April 2010
Mengganti nomor : CCRC-00-000-00	Tanggal : 26 Februari 2009

5	Masukkan/implantasikan <i>paperdisc</i> yang telah termuati bahan-bahan tadi ke dalam telur secara hati-hati melalui pintu yang telah dibuat	 <p>Lakukan di dalam LAF hood</p>
6	Tutup pintu pada telur dengan segera dan hati-hati. Kemudian segel pintu tersebut dengan parafin cair.	 <p>Parafin cair ini agak panas. Tunggu sampai agak dingin namun jangan sampai parafin tersebut membeku lagi.</p>
7	Sesegera mungkin masukkan telur ini ke dalam <i>incubator</i> . Inkubasikan telur selama 3 hari.	 <p>Lakukan dengan hati-hati!</p>
8	Saat telur mencapai usia 12 hari, inkubasikan telur ayam pada suhu <math><10^{\circ}\text{C}</math> selama 24 jam	Telur didinginkan di <i>freezer</i>



Dokumen nomor : CCRC-04-011-01	Tanggal : 26 April 2010
Mengganti nomor : CCRC-00-000-00	Tanggal : 26 Februari 2009

9	Pada usia telur mencapai 13 hari, buka telur secara vertikal seperti disamping. Buang isinya (termasuk embrio).	 <p>Hati-hati! Jangan sampai membran korio alantoisnya juga ikut terbuang.</p>
10.	Lakukan pengamatan secara makroskopis dan pendokumentasikan membran korio alantois yang berada di atas <i>paper disc</i> .	 <p>Gunakan bantuan kaca pembesar</p> <ul style="list-style-type: none">• Dokumentasikan dengan kamera
11.	Ambil membran yang ada di atas <i>paper disc</i> dan lakukan pengawetkan dalam formalin, selanjutnya buat preparat histologi dan lakukan pengecatan untuk mempermudah pengamatan secara makroskopis.	 <ul style="list-style-type: none">• Pastikan penandaan pada wadah membran sudah sesuai• Lakukan pengecatan Haematoxyllen & Eosin untuk mempermudah pengamatan secara mikroskopis.



Dokumen nomor : CCRC-04-011-01	Tanggal : 26 April 2010
Mengganti nomor : CCRC-00-000-00	Tanggal : 26 Februari 2009

3. SANITASI

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Bersihkan peralatan yang telah digunakan, pastikan jumlahnya sesuai dengan jumlah pada saat mengambil peralatan, kemudian simpan pada tempat penyimpanannya	<ul style="list-style-type: none">• Pastikan jumlah peralatan sebelum dan sesudah bekerja sama, jika ada kerusakan pada peralatan segera laporkan.
2.	Bersihkan area meja di bawah <i>Laminar Air Flow</i> dengan alkohol 70 %	
3.	Bersihkan ruangan lab dengan sapu dan pel dengan sabun jika perlu.	<ul style="list-style-type: none">• Pastikan ruangan bebas dari kotoran sisa perlakuan.

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