



CANCER CHEMOPREVENTION RESEARCH CENTER FAKULTAS FARMASI UGM

Dokumen nomor :	Tanggal :
Mengganti nomor :	Tanggal :

URAIAN	DIBUAT OLEH	DIPERIKSA OLEH	DIPERIKSA OLEH	DISETUJU OLEH
Jabatan	Peneliti CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Larasati	Adam Hermawan	Muthi' Ikawati	Edy Meiyanto
Tanggal				

PROSEDUR TETAP

PENGECATAN TUNEL

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI

	HALAMAN
1. TUJUAN	2
2. PENDAHULUAN	2
3. OPERASIONAL	2



CANCER CHEMOPREVENTION RESEARCH CENTER FAKULTAS FARMASI UGM

Dokumen nomor :	Tanggal :
Mengganti nomor :	Tanggal :

A. TUJUAN

Mengatur standar kerja pengecatan preparat TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*) pada penelitian laboratorium CCRC.

B. PENDAHULUAN

Apoptosis (kematian sel secara terprogram) berperan penting dalam perkembangan biologis dan pemeliharaan jaringan yang aktif membelah supaya selalu dalam kondisi *steady state*. Metode untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis dapat didasarkan pada karakteristik apoptosis itu sendiri, contohnya adalah fragmentasi DNA.

Metode yang umum untuk mendeteksi fragmentasi DNA secara enzimatik adalah TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*). Reagen TUNEL terdiri dari enzim terminal transferase yang bertugas mengenali ujung-ujung 3'OH (*nick end*) yang dihasilkan oleh fragmentasi DNA dan fluorescein-dUTP untuk memvisualisasikan ujung 3'OH tersebut yang dapat diamati menggunakan mikroskop fluoresensi atau *flow cytometry*.

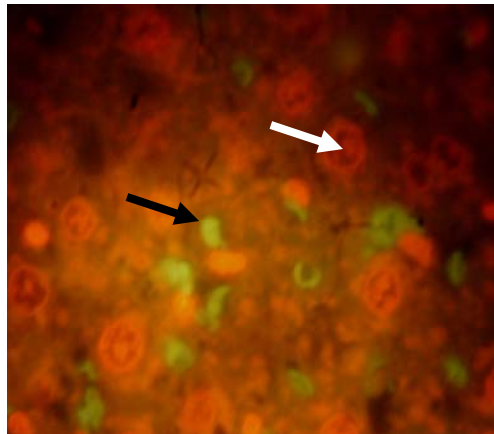
Untuk memvisualisasikan perbandingan sel apoptosis dengan sel non-apoptosis dalam satu lapang pandang pengamatan, digunakan metode *double staining* menggunakan reagen TUNEL dan propidium iodida. TUNEL hanya akan mendeteksi sel apoptosis dan memberikan fluoresensi hijau, sedangkan propidium iodida akan mendeteksi sel non-apoptosis dan memberikan fluoresensi merah

C. OPERASIONAL

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Lakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan <i>xylene</i> sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.	
2.	Rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95 % dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit	
3.	Rehidrasi preparat dengan aquadest steril	
4.	Tetesi preparat dengan 50 µl TUNEL <i>labeling mix</i> (terdiri dari 5 µl enzim terminal deoxynucleotidyl transferase dan 45 µl fluorescein-dUTP)	

5.	Tutup preparat dengan <i>siliconize cover slip</i>	
6.	Inkubasi preparat pada suhu 37° C selama 30 menit di dalam <i>moist chamber</i>	
7.	Cuci preparat dengan PBS (<i>Phosphate Buffer Saline</i>) sebanyak 3 kali	
8.	Inkubasi dengan <i>Rnase solution</i> pada suhu 37°C selama 30 menit	
9.	Cuci preparat dengan PBS sebanyak 3 kali	
10.	Inkubasi preparat dengan larutan propidium iodide pada suhu ruang selama 10 menit.	
11.	Cuci preparat dengan PBS sebanyak 3 kali	
12.	Tutup preparat dengan <i>cover slide</i> diameter 18 mm	
13.	Amati sel apoptosis (fluoresensi hijau) menggunakan mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 1000x (Gambar 1)	
14.	Dokumentasi setiap pengamatan	Lakukan pemotretan tiap preparat

Contoh hasil pengamatan preparat TUNEL



Gambar 1. Ekstrak etanolik kulit *Citrus reticulata* memacu apoptosis sel hepar tikus yang diinduksi 7,12 dimetilbenz[*a*]antrasen. Pengecatan dilakukan dengan TUNEL *assay kit* dan propidium iodide (*double staining*). Sel yang mengalami apoptosis berfluoresensi hijau (anak panah hitam) sedangkan sel yang tidak mengalami apoptosis berfluoresensi merah (anak panah putih). Preparat diamati di bawah mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 1000x.

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