

Dokumen nomor : CCRC-03-010-02	Tanggal : 23 April 2013
Mengganti nomor : CCRC-03-010-01	Tanggal : 26 Februari 2009

URAIAN	DIBUAT OLEH	DIPERIKSA OLEH	DIPERIKSA OLEH	DISETUJU OLEH
Jabatan	Staf CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Herwandhani Putri			Edy Meiyanto
Tanggal	23 April 2013			

PROTOKOL

UJI SITOTOKSIK METODE MTT

DAFTAR ISI

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

Dokumen nomor : CCRC-03-010-02	Tanggal : 23 April 2013
Mengganti nomor : CCRC-03-010-01	Tanggal : 26 Februari 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 gambar tentang prosedur kerja dan contoh perhitungan IC ₅₀				
No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
CCRC-02-010-00	26 Februari 2009	Sendy Junedi Staff CCRC	Adam Hermawan Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Menggunakan format baru Sudah ada penomoran dokumen Sudah dicantumkan gambar tentang prosedur kerja dan contoh perhitungan IC ₅₀				
CCRC-03-009-01		Sendy Junedi Staff CCRC	Dyaningtyas Dewi Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Menggunakan penomoran baru, lama inkubasi setelah panen minimal 4 jam, pemisahan tahapan cara kerja				
CCRC-03-010-02	23 April 2014	Herwandhani Putri Staff CCRC	Staff CCRC	Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Ganti logo CCRC Larutan <i>stopper</i> : 100 µL SDS 10% dalam 0,01 N HCl				

B. TUJUAN

Memberikan panduan secara bertahap dan detail mengenai uji sitotoksik dengan metode MTT.

C. PENDAHULUAN

Dalam pengembangan obat antikanker baru sebagai agen-agen kemoterapi kanker, evaluasi preklinik merupakan salah satu hal yang penting untuk mengetahui potensi aktivitas neoplastiknya. Evaluasi ini tidak hanya digunakan untuk obat-obat antikanker, tetapi juga untuk obat-obat lainnya, kosmetik, zat tambahan makanan, pestisida dan lainnya. Evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis disebut uji sitotoksitas.

Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji sitotoksitas diantaranya adalah sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduibel dengan variabilitas yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan jumlah sel serta informasi yang didapat dari kurva dosis-respon harus sejalan dengan efek yang muncul pada *in vivo*. Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode MTT.

Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk

Dokumen nomor : CCRC-03-010-02	Tanggal : 23 April 2013
Mengganti nomor : CCRC-03-010-01	Tanggal : 26 Februari 2009

dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.

D. OPERASIONAL

1. Alat:

- Mikropipet 200, 1000 μ L
- Tabung reaksi kecil
- Rak tabung kecil
- 96-well plate
- Conical tube
- ELISA reader

2. Bahan:

- PBS
- MK (DMEM/RPMI)
- DMSO
- MTT 5mg/mL PBS (50 mg MTT and 10 mL PBS)
- SDS 10% dalam 0,01 N HCl (larutan stopper)
- Aluminium foil

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	Jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik dengan metode MTT adalah 5×10^4 sel/sumuran.
4.	Transfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 μ l.	Setiap kali mengisi 12 sumuran, resuspensi kembali sel agar tetap homogen.
5.	Sisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel).	Untuk kontrol media.
6.	Amati keadaan sel di mikroskop <i>inverted</i> untuk melihat distribusi sel dan dokumentasikan.	-
7.	Inkubasi sel di dalam inkubator selama minimal 4 jam (agar sel <i>attach</i> kembali setelah panen).	Jika sel belum attach, maksimal waktu inkubasi adalah 24 jam
8.	Perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali dalam keadaan normal	Selalu amati kondisi sel sebelum perlakuan.

Dokumen nomor : CCRC-03-010-02	Tanggal : 23 April 2013
Mengganti nomor : CCRC-03-010-01	Tanggal : 26 Februari 2009

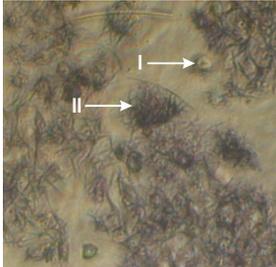
4. Perlakuan Sampel pada Sel

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Cek kondisi sel, jika sudah siap buat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan	<ul style="list-style-type: none"> • Lihat Protokol Preparasi Sampel. • Buat peta perlakuan terlebih dahulu
2.	Ambil plate dari inkubator CO ₂ untuk di bawa ke LAF.	-
3.	Buang media sel (balikkan plate 180°) di atas tempat buangan dengan jarak 10 cm, kemudian tekan plate secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan.	-
4.	Masukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik plate seperti point 3 Tiriskan sisa cairan dengan tisu.	-
5.	Masukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran (triplo).	Dimulai dari konsentrasi sampel paling rendah sesuai peta perlakuan
6.	Inkubasi di dalam inkubator CO ₂ . 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).	-

5. MTT dan Stopper

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Menjelang akhir waktu inkubasi, dokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan	Semua kelompok perlakuan difoto kecuali kontrol media
2.	Siapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara ambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5mg/mL), encerkan dengan MK ad 10 mL (untuk 1 buah 96 well plate).	<ul style="list-style-type: none"> • Stok MTT dibuat dengan cara: timbang 50 mg serbuk MTT, larutkan dalam PBS ad 10 ml. Simpan dalam freezer tertutup aluminium foil • Gunakan sarung tangan saat menggunakan reagen MTT (bersifat karsinogen).
3.	Buang media sel, cuci PBS (seperti pada point 3 perlakuan sampel pada sel), dan tambahkan reagen MTT 100 µL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel).	Inkubasi dilakukan sampai terbentuk formazan
4.	Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator CO ₂ .	-
5.	Periksa kondisi sel dengan mikroskop <i>inverted</i> . Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan <i>stopper</i> 100 µL SDS 10% dalam 0,01 N HCl.	Pekerjaan tidak perlu dilakukan di dalam LAF hood.

Dokumen nomor : CCRC-03-010-02	Tanggal : 23 April 2013
Mengganti nomor : CCRC-03-010-01	Tanggal : 26 Februari 2009

		
6.	Bungkus <i>plate</i> dengan kertas atau alumunium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam	Plate yang telah dibungkus jangan diletakkan di inkubator.

6. ELISA Reader

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Hidupkan ELISA <i>reader</i> , tunggu proses <i>progressing</i> hingga selesai.	Cek apakah kertas print masih ada
2.	Buka pembungkus <i>plate</i> dan tutup <i>plate</i> . Masukkan ke dalam ELISA <i>reader</i> Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA <i>reader</i> dengan $\lambda=550-600$ nm (595 nm, tekan tombol <i>START</i>).	Pastikan posisi <i>plate</i> pada ELISA <i>reader</i> tidak terbalik. 
3.	Matikan kembali ELISA <i>reader</i> . Simpan dan tempel kertas hasil ELISA pada LOG BOOK. Setiap kali pembacaan di ELISA <i>reader</i> , catat di buku catatan pemakaian ELISA <i>READER</i> .	Segera fotokopi hasil ELISA karena tinta cepat luntur
4.	Buat grafik absorbansi (setelah dikurangi kontrol media) vs konsentrasi.	Konsentrasi sampel TIDAK dalam log untuk melihat profil sel hidup.
5.	Hitung prosentase sel hidup dan analisis harga IC_{50} dengan Excell (Regresi linear dari log konsentrasi) atau SPSS (Probit/Logit).	Lihat Cara perhitungan IC_{50}

7. Cara Perhitungan IC_{50}

Pada percobaan diperoleh absorbansi 3 macam kontrol dan senyawa uji meliputi :

- Kontrol sel : berisi media kultur + sel
- Kontrol pelarut : berisi media kultur + sel + DMSO dengan konsentrasi terbesar pada seri konsentrasi) % DMSO terbesar dilihat dari konsentrasi DMSO dalam seri konsentrasi sampel yang paling pekat.
- Kontrol media : berisi media kultur
- Senyawa uji berisi : media kultur + sel + senyawa uji.

Dokumen nomor : CCRC-03-010-02	Tanggal : 23 April 2013
Mengganti nomor : CCRC-03-010-01	Tanggal : 26 Februari 2009

Langkah-langkah perhitungan IC50 :

1. Lihat apakah absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari kontrol sel atau sama dengan kontrol sel.
Jika absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel maka hitung prosentase sel hidup dengan rumus berikut :

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

Jika absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel maka hitung prosentase sel hidup dengan rumus berikut :

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

2. Buat grafik log konsentrasi vs prosentase sel hidup dengan *chart type scatter* dan *chart subtype compare pairs of values*.
3. Cari persamaan regresi linier dari grafik tersebut dengan menambalkan *add trendline-regresi linier*.
4. Lihat parameter r pada persamaan regresi linier. Jika r lebih besar dari r tabel maka persamaan regresi linier memenuhi standar untuk mencari IC₅₀.
5. Masukkan y = 50% pada persamaan regresi linier dan cari x nya kemudian dihitung antilog dari konsentrasi tersebut sehingga diperoleh IC₅₀.

Contoh perhitungan:

Data Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak Etanolik Daun X terhadap Sel Kanker Payudara T47D

1. Kontrol sel dan kontrol media

Absorbansi kontrol sel	Rata-rata absorbansi kontrol sel	Absorbansi kontrol media	Rata-rata absorbansi kontrol media	Absorbansi kontrol sel dikurangi kontrol media
0.290		0.113		
0.318		0.111		
0.307	0.304	0.132	0.118	0.186
0.286		0.115		
0.317		0.120		
0.305		0.117		

Dokumen nomor : CCRC-03-010-02	Tanggal : 23 April 2013
Mengganti nomor : CCRC-03-010-01	Tanggal : 26 Februari 2009

2. Ekstrak etanolik daun X

Kadar (µg/ml)	Absorbansi*			% Sel hidup			% Sel hidup rata- rata	SD
500	0.103	0.105	0.107	-8.06	-6.99	-5.91	-6.98	1.07
400	0.109	0.104	0.108	-4.84	-7.53	-5.38	-5.91	1.42
300	0.096	0.101	0.107	-11.83	-9.14	-5.91	-8.96	2.96
200	0.110	0.126	0.130	-4.30	4.30	6.45	2.15	5.69
100	0.194	0.210	0.204	40.86	49.46	46.24	45.52	4.34
50	0.270	0.261	0.264	81.72	76.88	78.49	79.03	2.46
10	0.284	0.310	0.327	89.25	103.22	112.36	101.61	11.64

* data diperoleh dari replikasi sebanyak tiga kali untuk masing-masing kadar

3. Kontrol pelarut

Absorbansi kontrol pelarut kadar 0,125 %	Rata-rata absorbansi	% sel hidup	Rata- rata % sel hidup	Absorbansi kontrol pelarut kadar 0,025%	Rata-rata absorbansi	% sel hidup	Rata- rata % sel hidup
0.277		81.18		0.269		85.483	
0.292		97.31		0.299		93.54	
0.305	0.303	89.25	92.29	0.284	0.28	100.53	94.98
0.306		94.62		0.294		101.07	
0.299		96.23		0.297		97.31	
0.289		95.16		0.295		91.93	

A = 184.2549088

B = -72.67280501

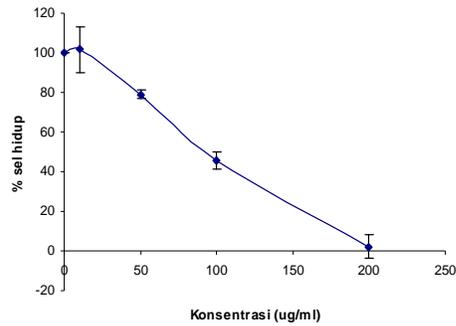
R = -0.935840465

R² = 0.875797376

Persamaan : $y = -72.067x + 184.255$

Dimasukkan pada y nilai 50 %, cari antilog ketemu hasil 70 µg/ml.

Dokumen nomor : CCRC-03-010-02	Tanggal : 23 April 2013
Mengganti nomor : CCRC-03-010-01	Tanggal : 26 Februari 2009



Profil efek sitotoksik ekstrak etanolik daun X terhadap sel T47D dengan metode MTT.

Sel T47D diletakkan pada 96 *well-plate* kemudian diperlakukan dengan ekstrak dengan kadar (10; 50; 100; 200; 300; 400; 500) $\mu\text{g/ml}$ dilanjutkan dengan pembacaan dengan *ELISA reader* pada λ 595 nm setelah inkubasi 24 jam. Sitotoksitas ekstrak dinyatakan dengan % kehidupan yang ditampilkan sebagai rata-rata \pm SD dari tiga eksperimen. Semakin tinggi konsentrasi larutan uji semakin rendah persentase kehidupan yang terjadi

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