

Dokumen nomor : CCRC-03-014-02	Tanggal : 23 April 2014
Mengganti nomor : CCRC-03-014-01	Tanggal : 26 April 2012

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 2014			

PROTOKOL

PREPARASI SAMPEL UNTUK SIKLUS SEL DENGAN METODE FLOWCYTOMETRY

DAFTAR ISI

	HALAMAN
DAFTAR ISI	1
A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN	2
B. TUJUAN	2
C. PENDAHULUAN	2
D. OPERASIONAL	2
1. Alat	2
2. Bahan	3
3. Prosedur Kerja	3
4. Analisis dan Interpretasi Data	6

Dokumen nomor : CCRC-03-014-02	Tanggal : 23 April 2014
Mengganti nomor : CCRC-03-014-01	Tanggal : 26 April 2012

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	Mengggunakan 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-02-012-00	24 Maret 2009	Aditya Fitriasari Staff CCRC	Adam Hermawan Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Mengggunakan format baru Sudah ada penomoran dokumen Menyebutkan prosedur pencatatan pada buku komunikasi harian				
CCRC-03-012-01	26 April 2012	Dyaningtyas Dewi PP Staff CCRC	Nunuk Nurulita Staff CCRC	Adam Hermawan Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Mengggunakan penomoran baru Mengggunakan format baru Sudah ada halaman Ganti logo CCRC Digunakan untuk mengetahui uji siklus sel Memperlengkap cara kerja untuk perlakuan kombinasi				
CCRC-03-012-02	23 April 2014	Herwandhani Putri Staff CCRC	Staff CCRC	Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Ganti logo CCRC Perubahan proses preparasi sampel untuk <i>flowcytometry</i>				

B. TUJUAN

Memberikan panduan secara detail dan bertahap mulai dari persiapan, pembuatan sampel dan reagen, perlakuan, preparasi sampel untuk mengetahui siklus sel dengan metode *flowcytometry*, analisis dan interpretasi data hasil *flowcytometry*.

C. PENDAHULUAN

Flowcytometry merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menganalisis jenis-jenis sel yang terdapat pada suatu populasi sel. Sel dilabel fluoresen, dilewatkan celah sempit, dan ditembak sinar. Pada suatu populasi sel yang sejenis, misal pada sel kanker yang diberi perlakuan suatu senyawa sitotoksik, dapat dilakukan analisis terhadap fase-fase daur sel, sel apoptosis, serta sel yang mengalami poliploidi. Masing-masing jenis sel tersebut memiliki perbedaan pada jumlah set kromosom di mana pada fase G0/G1, fase S, fase G2/M berturut-turut memiliki 2, 3, dan 4 set kromosom. Semakin banyak jumlah set kromosom, maka intensitas sinyal optik yang diberikan semakin kuat karena kemampuan fluoresen untuk berinterkalasi pada DNA semakin besar. Pada sel

Dokumen nomor : CCRC-03-014-02	Tanggal : 23 April 2014
Mengganti nomor : CCRC-03-014-01	Tanggal : 26 April 2012

yang mengalami apoptosis (sub G0), intensitas fluoresen sangat lemah karena kromosom telah mengalami fragmentasi. Sedangkan pada sel poliploidi, intensitas yang diberikan sangat kuat karena jumlah set kromosom yang lebih dari 4 set.

D. OPERASIONAL

1. Alat

- 6 *well plate* atau TCD
- Mikropipet 10, 20, 200, 1.000 μ l
- Tabung sentrifus 1,5 ml
- Rak tabung kecil
- Sentrifugator
- Penangas air (37°C)
- FACS-Calibur

2. Bahan

- Sampel dengan konsentrasi tertentu
- PBS
- Media kultur (MK)
- Trypsin-EDTA 0,25%
- RNase
- Propidium iodide
- Triton-X
- Buangan basah dan kering

3. Prosedur Kerja

a) Perlakuan (*treatment*)

No	Pekerjaan	Perhatian
1.	Ikuti protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.	-
2.	Ambil sel dari inkubator CO ₂ , amati kondisi sel.	Gunakan kultur sel dalam kondisi 70-80% konfluen untuk dipanen.
3.	Panen sel sesuai dengan protokol panen.	-
4.	Hitung jumlah sel dan buat pengenceran sel dengan MK sesuai kebutuhan mengikuti protokol penghitungan sel.	Jumlah sel yang dibutuhkan untuk 6 <i>well plate</i> adalah 5×10^5 sel/sumuran (5×10^5 sel/1000 μ L).
5.	Transfer sel ke dalam sumuran 6 <i>well plate</i> , masing-masing 1000 μ l (untuk perlakuan dan untuk kontrol sel).	-
6.	Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel. Dokumentasikan dengan kamera.	-
7.	Inkubasi sel di dalam inkubator selama semalam (agar sel pulih kembali setelah panen).	Jika dalam waktu semalam kondisi sel belum pulih, ganti media dan sel diinkubasikan kembali. Selalu amati kondisi sel sebelum perlakuan. Jika siap diberi perlakuan, sel didokumentasikan

Dokumen nomor : CCRC-03-014-02	Tanggal : 23 April 2014
Mengganti nomor : CCRC-03-014-01	Tanggal : 26 April 2012

8.	Setelah sel normal kembali, segera buat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan. Contoh : Seri konsentrasi terdiri dari 2 konsentrasi: $\frac{1}{4}$ IC ₅₀ dan $\frac{1}{10}$ IC ₅₀ .	<ul style="list-style-type: none"> • Untuk masing-masing konsentrasi sampel dibuat volume 500 μL (bisa dilebihkan sedikit). • Perlakuan kombinasi : konsentrasi sampel dan agen kemoterapi (misal : Cisplatin) dibuat dua kali konsentrasi untuk perlakuan, karena di dalam sumuran akan mengalami pengenceran oleh sampel/Cisplatin atau MK. • Seri konsentrasi dibuat berdasarkan hasil <i>cell viability</i> yang diperoleh ketika uji tunggal dan atau uji kombinasi
9.	Ambil plate yang telah berisi sel dari inkubator.	-
10.	Buang media sel dengan menggunakan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.	-
11.	Cuci dengan 500 μ l PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel.	-
12.	Buang PBS dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.	-
13.	Untuk kelompok perlakuan kombinasi : Masukkan 500 μ l seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran. Kemudian tambahkan 500 μ l seri konsentrasi Cisplatin untuk kombinasi.	Jika akan uji kombinasi dengan senyawa kokemoterapi, konsentrasi senyawa dan kokemoterapi dapat dikalikan 2 dan cara perlakuannya : Masukkan 500 μ l seri konsentrasi sampel atau Cisplatin ke dalam sumuran. Kemudian tambahkan 500 μ l MK.
14.	Untuk perlakuan tunggal : Masukkan 1.000 μ l seri konsentrasi sampel atau Cisplatin ke dalam sumuran.	-
15.	Untuk kontrol sel : Tambahkan 1000 μ l MK ke dalam sumuran.	-
16.	Inkubasi di dalam inkubator CO ₂ .	Waktu inkubasi tergantung dari hasil sitotoksik sampel yang diujikan. Misal : senyawa A memberikan potensi sitotoksik pada sel MCF-7 dengan inkubasi perlakuan 24 jam, sehingga ketika akan menganalisis siklus selnya juga diinkubasi 24 jam. Dan begitu seterusnya.
17.	Menjelang akhir waktu inkubasi, dokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan dengan kamera.	-

Dokumen nomor : CCRC-03-014-02	Tanggal : 23 April 2014
Mengganti nomor : CCRC-03-014-01	Tanggal : 26 April 2012

b) Pembuatan reagen flowcytometry

- 1) Stok awal reagen :
 - a) Propidium Iodide (PI) : 1 mg/ml / 50x
 - Timbang 0,7 mg PI, larutkan dalam 700 µl PBS.
 - Fungsi : Mewarnai DNA sel (*fluorochrome*).
 - Penyimpanan : Dibungkus aluminium foil dan di *freezer*.
 - b) RNase : 10 mg/ml
 - Fungsi : Mendegradasi RNA.
 - Penyimpanan : Di *freezer*.
 - c) Triton-X 100 (pro GC - Merck): 1x
 - Fungsi : Melisis membran sel.
 - Penyimpanan : Di temperatur kamar.
- 2) Reagen *flowcytometry* untuk 1 sampel :
 - 25 µl PI (50x) + 1 µl RNase + 0,5 µl Triton-X + PBS ad 500 µl
 - Untuk 6 sumuran, buat untuk 6 sampel (dibuat berlebih untuk 7 sampel).
 - Bungkus aluminium foil.
 - Perhatian : Senyawa karsinogen (interkalasi DNA), pakai sarung tangan!
- 3) Konsentrasi akhir reagen dalam PBS 500 µl :
 - a) Propidium Iodide (PI) : 50 µg/ml
 - b) RNase : 20 µg/ml
 - c) Triton-X 100 (pro GC - Merck) : 0.1 %

c) Preparasi sampel untuk flowcytometry

No	Pekerjaan	Perhatian
1.	Siapkan 1 konikel untuk 1 jenis perlakuan.	• Beri keterangan pada konikel tiap masing-masing perlakuan
2.	Ambil media dari sumuran dengan mikropipet 1 ml, transfer ke konikel	-
3.	Isikan @ 500 µl PBS ke dalam sumuran.	-
4.	Ambil PBS dengan mikropipet dan transfer ke dalam konikel	-
5.	Tambahkan 200 µl tripsin-EDTA 0,25%, inkubasi di inkubator selama 3 menit.	Hati-hati, jangan lebih dari 3 menit.
6.	Tambahkan @ 1 ml MK, resuspensi sampai sel lepas satu per satu, amati di bawah mikroskop.	MK untuk menginaktivasi tripsin.
7.	Setelah sel terlepas satu-satu, transfer sel ke konikel	-
8.	Tambahkan kembali 500 µl PBS ke dalam sumuran untuk mengambil sisa sel, kemudian transfer ke dalam konikel	-
9.	Sentrifus konikel dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit.	-

Dokumen nomor : CCRC-03-014-02	Tanggal : 23 April 2014
Mengganti nomor : CCRC-03-014-01	Tanggal : 26 April 2012

10.	Buang MK/PBS dengan cara dituang, cuci <i>pellet</i> sel dengan @ 500 µl PBS dingin.	-
11.	Sentrifus dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit.	-
12.	Buang PBS dengan cara dituang.	-
13.	Teteskan 500 µl alkohol 70%, 1 tetes/ detik kedalam konikel yang digoyang perlahan.	Tujuan pemberian alkohol untuk memfiksasi sel.
14.	Simpan konikel pada <i>room temperatur</i> 37°C selama 30 menit.	Jika akan dilanjutkan hari berikutnya, simpan konikel di 4°C.
15.	Sentrifus dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit	
16.	Buang alkohol dan tambahkan 500 µl PBS kemudian sentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 3 menit. Lakukan pencucian dengan PBS 2 kali.	Pencucian ini dimaksudkan untuk menghilangkan alkohol.
17.	Bungkus konikel dengan aluminium foil. Beri penandaan pada konikel.	
18.	Tambahkan reagen <i>flowcytometry</i> dan diamkan selama 30 menit.	Urutan untuk analisis lebih baik kontrol sel terlebih dahulu.
18.	Transfer suspensi sel ke dalam <i>flowcyto-tube</i> Jika diperlukan di filter (kain nylon/kain kaca) menggunakan mikropipet 1 ml.	Tutup <i>flowcyto-tube</i> dilubangi terlebih dahulu.
19.	Baca dengan <i>flowcytometer</i> FACS Calibur untuk mengetahui profil <i>cell cycle</i> (Gambar B).	Deteksi dilakukan terhadap 10.000 atau 20.000 sel.
20.	Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada Protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.	-



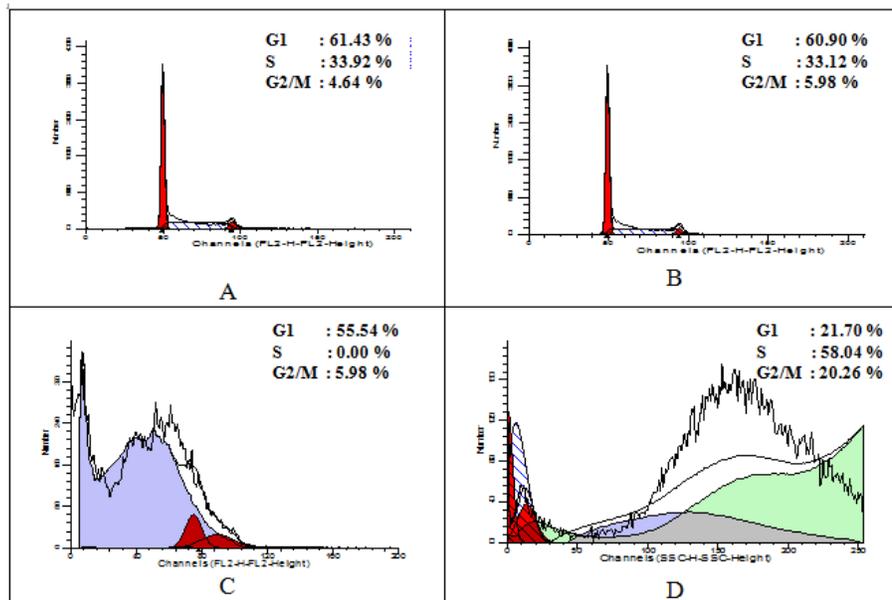
Gambar. Flowcytometer FACS-Calibur.

Dokumen nomor : CCRC-03-014-02	Tanggal : 23 April 2014
Mengganti nomor : CCRC-03-014-01	Tanggal : 26 April 2012

d) Analisis dan Interpretasi Data

Data *flowcytometry* dianalisis dengan program *cell quest* untuk melihat distribusi sel pada fase-fase daur sel sub G1 (apoptosis), S, G2/M, dan sel yang mengalami poliploidi. Penghambatan daur sel yang terjadi dapat diketahui dengan membandingkan antara efek perlakuan larutan uji dengan kontrol.

Contoh Hasil *Flowcytometry* :



Cell cycle profile of lacton, cisplatin and their combination on WiDr using flow cytometry. Cells (1×10^6) were cultured in 6 well plate then treated for 24 hour and stained using propidium iodide. Each cell cycle profile was analyzed using ModFit LT 3.0. (A) cell control, (B) 8-hydroxyisocapnolactone-2',3'-diol ($1/2IC_{50}$), (C) Cisplatin ($1/2IC_{50}$), (D) 8-hydroxyisocapnolactone-2',3'-diol ($1/2IC_{50}$) and Cisplatin ($1/2IC_{50}$). Combination of lacton and cisplatin induced S phase on WiDr cell.

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