

Dokumen nomor : CCRC-03-015-01	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 PENGAMATAN PROLIFERASI SEL (*DOUBLING TIME*)

#### 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	5

Dokumen nomor : CCRC-03-015-01	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 Fitriyasi 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 Fitriyasi 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 pengamatan proliferasi sel.

#### C. PENDAHULUAN

*Doubling time* merupakan waktu yang dibutuhkan sel kanker untuk tumbuh menjadi dua kali lipatnya. Uji ini dilakukan untuk mengetahui efek suatu senyawa uji terhadap kinetika proliferasi sel secara *in vitro*. Sel yang digunakan untuk uji sebaiknya pada saat sel berada pada *log phase* yaitu fase di mana sel sedang aktif membelah. Sel dipanen pada jam ke 0, 24, 48, dan 72 setelah penambahan suatu senyawa uji dan ditentukan jumlah sel hidup (Hanif *et al.*, 1997). Setelah inkubasi, dilakukan penghitungan terhadap jumlah sel yang hidup dengan metode tertentu, misalnya metode MTT, *direct counting* dengan tripan *blue*, dan sebagainya.

#### D. OPERASIONAL

##### 1. Alat

- Mikropipet 20, 200, 1000  $\mu$  l
- Tabung reaksi kecil
- Rak tabung kecil
- Vortex
- Conical tube
- 96-well plate
- ELISA-reader
- Tempat buangan untuk media bekas dan PBS

##### 2. Bahan

- Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf

Dokumen nomor : CCRC-03-015-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

- b. Pelarut DMSO
- c. Media Kultur (MK)
- d. Phosphat Buffer Saline (PBS) 1X
- e. MTT 0,5 mg/ml
- f. Stopper SDS 10% dalam 0.1 N HCl
- g. Tisu makan (kotak)
- h. Aluminium foil

### 3. Prosedur Kerja

No	Pekerjaan	Perhatian
1.	Ikuti <b>protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.</b>	-
2.	Ambil sel dari inkubator CO <sub>2</sub> , 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 untuk dibutuhkan untuk uji proliferasi sel adalah $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran ( $1,5 \times 10^4$ sel/100 $\mu$ l MK).
5.	Transfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 $\mu$ l.	Setiap kali mengisi 12 sumuran, resuspensi kembali sel agar tetap homogen. Cara mengisinya tiap 3 sumuran ke bawah.
6.	Sisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media (jangan diisi sel).	-
7.	Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel. Dokumentasikan dengan kamera.	-
8.	Inkubasi sel di dalam inkubator selama 24 jam.	Inkubasi ini dilakukan agar sel pulih dan kembali ke keadaan normal setelah panen sel.
9.	Jika dalam waktu 24 jam kondisi sel belum pulih, inkubasikan kembali.	Selalu amati kondisi sel sebelum perlakuan. Pastikan sel siap diberi perlakuan.
10.	Setelah sel normal kembali, buat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol DMSO) sesuai dengan protokol preparasi sampel.	-
11.	Ambil <i>plate</i> yang telah berisi sel dari inkubator.	-
12.	Buang media sel dengan cara balikkan <i>plate</i> 180° di atas tempat buangan, kemudian tekan <i>plate</i> secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan.	Tisu tidak perlu disemprot dengan alkohol 70%.

Dokumen nomor : CCRC-03-015-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

13.	Cuci sel dalam sumuran dengan masing-masing 100 $\mu$ l PBS.	-
14.	Buang PBS, tiriskan sisa cairan dengan tisu.	Lihat proses pembuangan pada no. 11.
15.	Masukkan 100 $\mu$ l seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran dengan replikasi sebanyak 3 kali (triplo).	Dari atas ke bawah mulai dari konsentrasi paling rendah ke konsentrasi paling tinggi.
16.	Inkubasi di dalam inkubator CO <sub>2</sub> .	Lama inkubasi berbeda-beda, mulai dari 0, 6, 12, 24, 48, dan 72 jam.
17.	Menjelang akhir waktu inkubasi, dokumentasikan dengan kamera untuk melihat kondisi sel pada setiap perlakuan.	-
18.	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> .
19.	Buang media sel, cuci dengan PBS sebanyak 1x.	Lihat proses pencucian pada no. 11 sampai no. 13.
20.	Tambahkan reagen 100 $\mu$ l MTT 0,5 mg/ml ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel).	-
21.	Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk kristal formazan yang ungu.	-
22.	Setelah 2-4 jam, periksa kondisi sel dengan mikroskop <i>inverted</i> . Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan <i>stopper</i> SDS 10% dalam 0,1 N HCl.	Pekerjaan tidak perlu dilakukan di dalam LAF hood.
23.	Bungkus <i>plate</i> dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.	Jangan diletakkan di inkubator!
24.	Keesokan harinya, <i>plate</i> di- <i>shaker</i> selama 10 menit untuk melarutkan formazan.	-
25.	Hidupkan ELISA <i>reader</i> , tunggu proses <i>progressing</i> hingga selesai.	-
26.	Buka pembungkus <i>plate</i> dan tutup <i>plate</i> . Masukkan ke dalam ELISA <i>reader</i> .	Posisi <i>plate</i> jangan sampai terbalik.

Dokumen nomor : CCRC-03-015-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-013-00	Tanggal : 24 Maret 2009

27.	Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA <i>reader</i> dengan $\lambda=550-600$ nm (595 nm) dengan menekan tombol <i>START</i> .	-
28.	Setelah semua sumuran terbaca, tekan tombol <i>STOP</i> dan matikan ELISA <i>reader</i> .	Setiap kali pembacaan di ELISA <i>reader</i> , catat di buku catatan pemakaian ELISA <i>reader</i> .
29.	Simpan dan tempel kertas hasil ELISA pada LOG BOOK. Segera transfer hasil ELISA ke Program Excel.	-
30.	Hitung viabilitas sel untuk masing-masing seri konsentrasi dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi. Buat grafik waktu inkubasi vs viabilitas sel.	Lihat Analisis dan Interpretasi Data. Tipe grafik <i>scatter</i> (pada Program Excel).
31.	Analisis statistik untuk mengetahui perbedaan viabilitas sel pada tiap-tiap waktu inkubasi akibat perlakuan sampel dengan berbagai seri konsentrasi terhadap kontrol sel.	Analisis menggunakan program SPSS, dengan uji One Way ANOVA taraf kepercayaan 95% dilanjutkan dengan uji <i>Tuckey</i> . Perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai signifikansi < 0,05.
32.	Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan <b>sanitasi seperti pada Protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium</b> .	-

#### 4. Analisis dan Interpretasi Data

Perhitungan prosentasi sel hidup :

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

Lihat di Protokol Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT.

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