

Dokumen nomor : CCRC-03-016-00	Tanggal : 14 Mei 2014
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

URAIAN	DIBUAT OLEH	DIPERIKSA OLEH	DIPERIKSA OLEH	DISETUJU OLEH
Jabatan	Staf CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Ulfatul Husnaa	Ria Fajarwati	Sri Handayani	Edy Meiyanto
Tanggal	14 Mei 2014			

PROSEDUR TETAP

IMUNOFLUOROSENSE

DAFTAR ISI

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

Dokumen nomor : CCRC-03-016-00	Tanggal : 14 Mei 2014
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN

-

B. TUJUAN

Memberikan panduan secara bertahap dan detail mengenai prosedur kerja deteksi protein menggunakan metode imunofluoresens.

C. PENDAHULUAN

Eksplorasi bahan alam maupun kimia akan memberikan efek secara molekuler pada sel. Efek yang ditimbulkan dapat mempengaruhi ekspresi DNA, RNA maupun protein-protein dalam sel. Pengaruh yang ditimbulkan dapat memicu maupun menghambat dari ekspresi DNA, RNA maupun protein. Oleh karena itu diperlukan metode untuk mengetahui secara kualitatif maupun kuantitatif suatu senyawa dalam memberikan efek molekuler dalam sel.

Immunofluoresence merupakan salah satu metode yang telah dikembangkan untuk memvisualisasikan ekspresi protein spesifik dalam sel dengan menggunakan prinsip ikatan anti-gen dengan anti-bodi dan menggunakan pendaran *fluorochrome*. *Fluorochrome* merupakan senyawa *fluorescence* yang secara langsung akan mengikat anti-bodi primer contohnya, FITC (Fluorescein isothiocyanate) dan Alexa 488 yang akan memberikan sinyal warna hijau saat di amati di bawah mikroskop *fluorescence* (Odell and Cook, 2013).

Deteksi protein menggunakan immunofluoresence dapat dilakukan bersamaan dengan DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) *staining*. DAPI merupakan *fluorochrome* yang dapat mengikat dsDNA dan memberikan warna biru di bawah mikroskop fluorescence (Kapuscinski, 1995) Pewarnaan DAPI dapat digunakan untuk mengetahui tanda apoptosis pada sel dengan adanya pendaran warna biru sehingga dapat terlihat adanya fragmentasi inti dan kondensasi kromatin. Selain itu, teknik ini juga dapat digunakan untuk mendeteksi DNA sel yang terinfeksi dengan mycoplasma dan virus (Russell, *et al.*, 1975).

D. OPERASIONAL

1. Alat:

- Mikropipet 10 µl, 200 µl, 1,000 µl
- Pinset
- Cover slip
- Slide glass
- Six well plate

2. Bahan:

- Alkohol 70% dingin
- PBS 1x
- 1% BSA dalam PBS
- DAPI
- 1st Antibody
- 2nd Antibody (FITC dan Alexa 488 anti-mouse/anti-rabbit)

Dokumen nomor : CCRC-03-016-00	Tanggal : 14 Mei 2014
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

3. Penanaman sel

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Lakukan panen sel sesuai Protokol Panen Sel .	-
2.	Lakukan perhitungan sel sesuai Protokol Perhitungan Sel . Tanam sel sebanyak 50.000 sel/cover slip	- Jumlah penanaman sel disesuaikan dengan jenis sel nya dalam kecepatan proliferasinya. - Di pastikan setelah 24 h penanaman sel dalam cover slip, konfluensi sel \pm 50 %, dan jangan terlalu padat
3.	Siapkan 6 <i>well plate</i> dan <i>cover slip</i> .	- per well dapat di isi 3 buah cover slip - Isi MK per well 1500 μ l
4.	Masukkan cover slip ke dalam sumuran menggunakan pinset steril dengan hati-hati.	Setiap penggunaan coverslip, tulis di Kartu stock CCRC
5.	Transfer 200 μ l sel tepat di atas coverslip secara merata dan perlahan, kemudian inkubasi selama 30 menit dalam incubator agar sel menempel pada coverslip.	- Setiap akan mengisi sumuran, resuspensi sel kembali. - Pastikan sel sudah menempel pada coverslip dengan mikroskop inverted
6.	Tambahkan MK ke dalam well hingga 1500 μ l	inkubasi sel 24 h

4. Perlakuan Imunofluorosense Sampel pada Sel

1.	Setelah sel normal kembali, segera buat satu konsentrasi sampel yang diinginkan, misalnya $\frac{1}{2}$ IC ₅₀ untuk perlakuan sebanyak 1000 μ l/well.	<ul style="list-style-type: none"> • Untuk imunosfluorosense menggunakan antibodi, minimal diperlukan 3 perlakuan: <ol style="list-style-type: none"> a. Perlakuan dengan sampel. b. Kontrol sel tanpa antibodi primer c. Kontrol sel dengan antibodi primer. • Kontrol sel hanya ditambah MK.
2.	Ambil <i>well plate</i> yang telah berisi sel dari inkubator CO ₂ .	-
3.	Buang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.	-
4.	Cuci sel 1 x dengan 500 μ L PBS 1x	-
5.	Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.	-
6.	Masukkan sampel sebanyak 1000 μ L ke dalam sumuran	-
7.	Masukkan 1000 μ L MK untuk kontrol sel (2 kontrol sel).	-
8.	Inkubasi di dalam inkubator CO ₂	Lama inkubasi tergantung dari protein yang akan dideteksi menggunakan antibodi. Pada umumnya di inkubasi 15-18 h (untuk mengaktifkan protein dan tidak membunuh sel).
10.	Amati kondisi sel setelah waktu inkubasi	Dokumentasikan dengan kamera.
11.	Fiksasi sel menggunakan 500 μ l etanol 70% dingin	Pastikan coverslip terbasahi oleh etanol

Dokumen nomor : CCRC-03-016-00	Tanggal : 14 Mei 2014
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

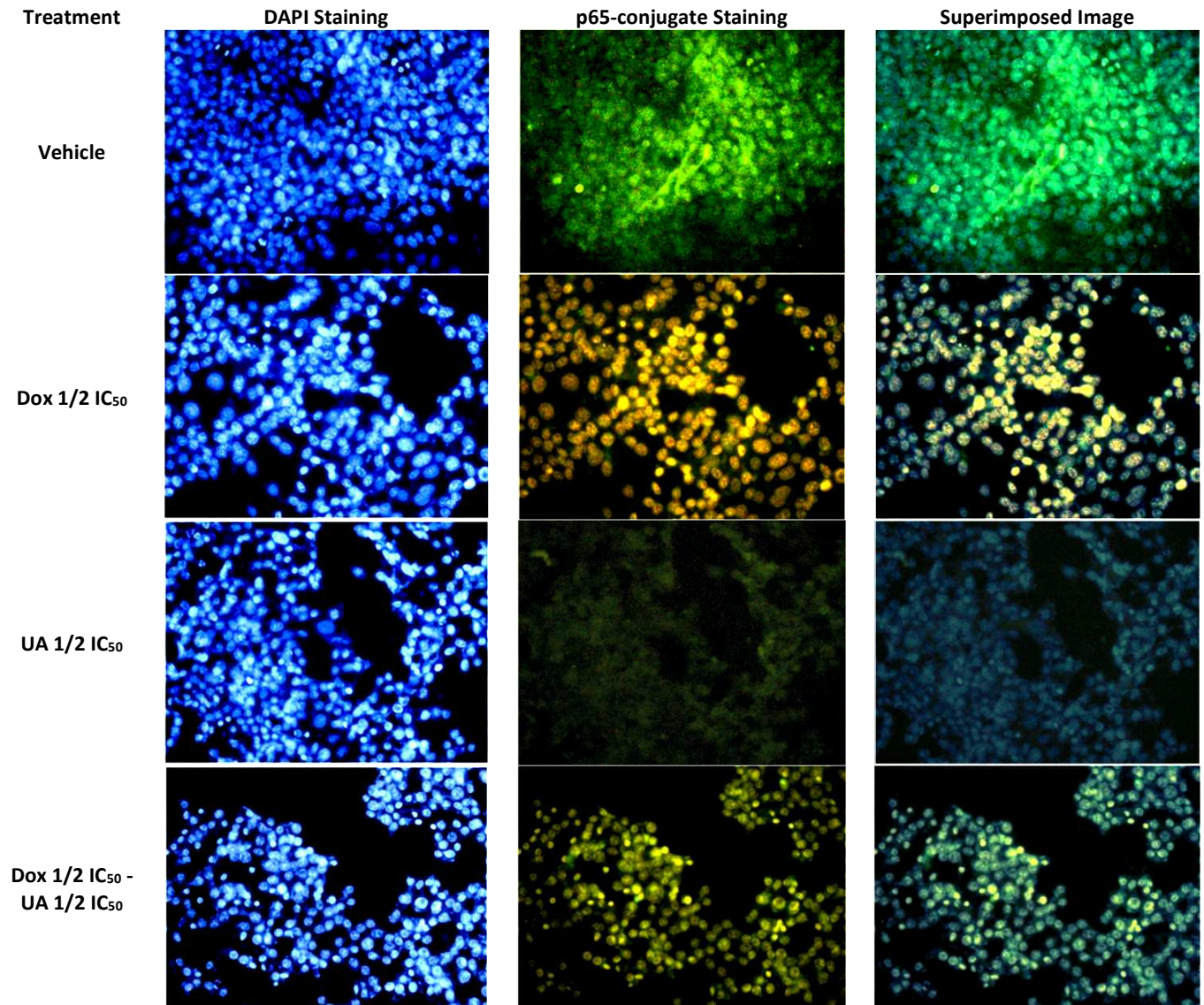
	selama 15 menit pada suhu ruang.	Pastikan dalam kondisi tertutup
12.	Buang etanol 70 % dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.	
13.	Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing-masing 5 menit	- Ambil coverslip menggunakan pipet dengan hati-hati dan kurangi kelebihan cairan pada coverslip menggunakan tisu - pindahkan di atas parafilm yang telah di tetesi blocking serum.
14.	Inkubasi sel dengan 50 μ L blocking serum (1% BSA in PBS), inkubasi 30 menit	Lakukan di atas nampan lembab dengan di alasi tisu basah dari poin 14-21
15.	Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing-masing 5 menit	lakukan dalam well plate
16.	Inkubasi sel dengan 50 μ L Ab primer, inkubasi semalam di 4°C	
17.	Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing-masing 5 menit	lakukan dalam well plate
18.	Inkubasi sel dengan 50 μ L Ab sekunder (FITC/Alexa), inkubasi 1 h di suhu ruang dalam wadah gelap	
19.	Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing-masing 5 menit, lakukan dalam wadah gelap	lakukan di dalam well plate
20.	Tambahkan 50 μ l DAPI 1 μ g/ml, inkubasi 10 menit di suhu ruang dalam wadah gelap	
21.	Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing-masing 5 menit, lakukan dalam wadah gelap.	
22.	Ambil dan letakkan <i>cover slip</i> di atas <i>object glass</i> , tetesi dengan lem (<i>mounting media: entelen</i>). Tutup <i>cover slip</i> dengan <i>cover glass</i> .	
23.	Amati dengan mikroskop imunofluorosens. FITC : Ex 494 nm, em 518 nm DAPI : Ex 341 nm, em 452 nm	- simpan hasil mounting dalam wadah gelap dan simpan di 4°C
24.	Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada Protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.	

Contoh :

Ab primer (diluted 1% BSA)	Ab sekunder (diluted 1% BSA)
HER-2 : 1/100	Goat anti mouse IgG-FITC : 1/400
Pgp : 1/100	Alexa 488 anti mouse : 1/500
p65 : 1/200 → 2.5 ul + 500 ul 1% BSA	FITC : 1/400 → 2.5 ul + 1 ml 1% BSA

Dokumen nomor : CCRC-03-016-00	Tanggal : 14 Mei 2014
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

5. Analisis dan Interpretasi Data



Ursolic acid suppressed elevated p65 expression induced by doxorubicin on MCF-7 cells.

Fifty thousand cells/well were incubated, followed by sample treatments for 24 hours. Concentration of 1/2 IC₅₀ doxorubicin and 1/2 IC₅₀ ursolic acid were used. Fixation using 70% ethanol, addition of 1% blocking serum albumin, incubation with primary (p65) and secondary antibody were done prior to addition of DAPI. Cells were then mounted and observed under fluorescence microscope, 400x magnification. Analysis was done qualitatively. Higher p65 expression showed by higher intensity of bright yellow-orange colour.

Dokumen nomor : CCRC-03-016-00	Tanggal : 14 Mei 2014
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

6. Daftar Pustaka

- Kapuscinski J. 1995. *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. Biotech Histochem **70** (5): 220-33.
- Odell, I.D and Cook, D. 2013. *Immunofluorescence Techniques*. Journal of Investigative Dermatology, **133**.
- Russell, W.C., Newman, C., Williamson, D.H. 1975. *A simple chitochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses*. Nature **253** (5491): 461-462.

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