


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 IMUNOHISTOKIMIA p53
DAFTAR ISI

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



CANCER CHEMOPREVENTION RESEARCH CENTER FAKULTAS FARMASI UGM

Dokumen nomor :	Tanggal :
Mengganti nomor :	Tanggal :

A. TUJUAN

Mengatur standar kerja pengecatan preparat Imunohistokimia (IHC) p53 pada penelitian laboratorium CCRC.

B. PENDAHULUAN

Protein p53 merupakan protein *tumor suppressor* yang berperan sebagai regulator siklus sel. Protein p53 berperan penting dalam respon adanya stress selular, misalnya paparan karsinogen. Protein tersebut akan menghambat proliferasi sel abnormal yang telah terinisiasi karsinogen untuk mencegah berkembangnya neoplasma. Tidak aktifnya protein tersebut dapat menimbulkan malignansi sampai kanker yang ganas. Selain berfungsi meregulasi proliferasi sel, p53 juga meregulasi apoptosis, menghambat angiogenesis, dan meregulasi DNA *repairment*.

Pada penyakit kanker, umumnya p53 mengalami mutasi. Mutasi p53 yang paling banyak terjadi adalah *missense mutation*. Mutasi tersebut dapat berupa degradasi p53, hilangnya kemampuan p53 menginduksi *cell cycle arrest* atau apoptosis, dan hilangnya afinitas p53 untuk mengikat DNA yang rusak.

Imunohistokimia merupakan suatu proses mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel dengan menggunakan antibodi. Tempat pengikatan antara antibodi dengan protein spesifik diidentifikasi dengan marker yang biasanya dilekatkan pada antibodi dan bisa divisualisasi secara langsung atau dengan reaksi untuk mengidentifikasi marker. Marker dapat berupa senyawa berwarna, zat berfluoresensi, logam berat, label radioaktif, atau enzim.

Terdapat dua metode dasar identifikasi antigen dalam jaringan dengan imunohistokimia, yaitu metode langsung (*direct method*) dan tidak langsung (*indirect method*).

a. Metode langsung (*direct method*)

Metode langsung merupakan metode pengecatan satu langkah karena hanya melibatkan satu jenis antibodi, yaitu antibodi yang terlabel, contohnya antiserum terkonjugasi *fluorescein isothiocyanate* (FITC) atau rodhamin.

b. Metode tidak langsung (*indirect method*).

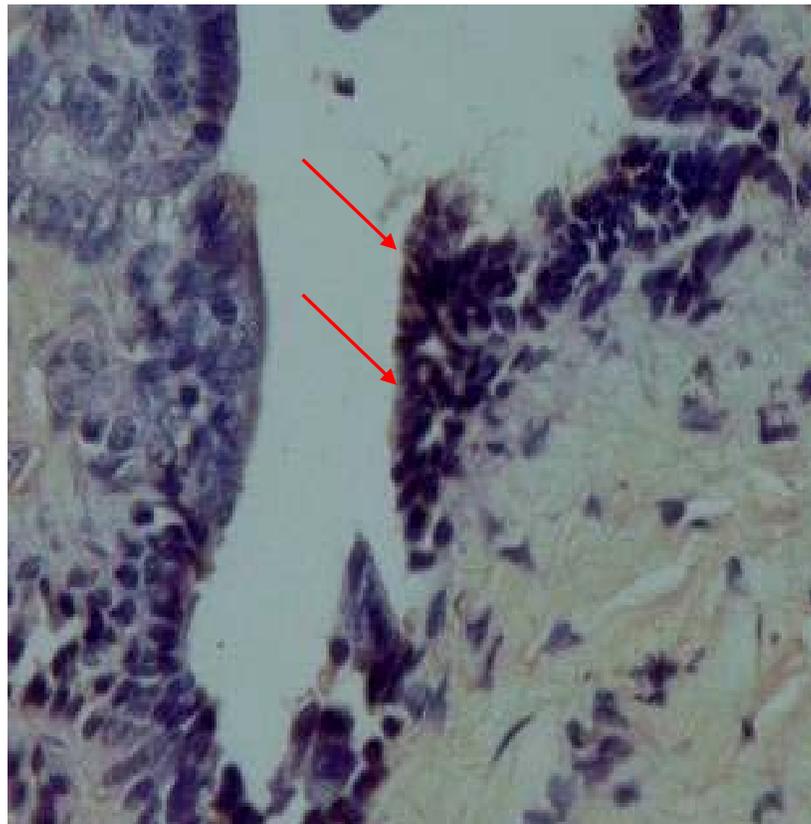
Metode ini menggunakan dua macam antibodi, yaitu antibodi primer (tidak berlabel) dan antibodi sekunder (berlabel). Antibodi primer bertugas mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (*first layer*), sedangkan antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer (*second layer*). Antibodi kedua merupakan anti-antibodi primer. Pelabelan antibodi sekunder diikuti dengan penambahan substrat berupa kromogen. Kromogen merupakan suatu gugus fungsi senyawa kimiawi yang dapat membentuk senyawa berwarna bila bereaksi dengan senyawa tertentu. Penggunaan kromogen *fluorescent dye* seperti FITC, rodhamin, dan *Texas-red* disebut metode

immunofluorescence, sedangkan penggunaan kromogen enzim seperti peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase disebut metode *immunoenzyme*.

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.	Rendam dalam <i>peroxidase blocking solution</i> pada suhu kamar selama 10 menit	
4.	Inkubasi preparat dalam <i>prediluted blocking serum</i> 25°C selama 10 menit.	
5.	Rendam preparat di dalam antibodi monoklonal anti-p53 25°C selama 10 menit	
6.	Cuci preparat dengan <i>Phospate Buffer Saline</i> (PBS) selama 5 menit.	
7.	Inkubasi preparat dengan antibodi sekunder (<i>conjugated to horse radish peroxidase</i>) 25°C selama 10 menit	
8.	Cuci preparat dengan PBS selama 5 menit.	
9.	Inkubasi preparat dengan peroksidase 25°C selama 10 menit	
10.	Cuci preparat dengan PBS selama 5 menit.	
11.	Inkubasi preparat dengan kromogen DAB (<i>Diaminobenzinidine</i>) 25°C selama 10 menit	
12.	Inkubasi preparat dengan Hematoxylin Eosin selama 3 menit	
13.	Cuci preparat dengan air mengalir	
14.	Bersihkan preparat dan tetesi dengan <i>mounting media</i>	
15.	Tutup preparat dengan <i>coverslip</i>	
16.	Amati ekspresi p53 (warna coklat) pada sel menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 x (Gambar 1).	
17.	Dokumentasi setiap pengamatan	Lakukan pemotretan tiap preparat

Contoh hasil pengamatan preparat p53



Gambar 1. Ekstrak etanolik kulit *Citrus reticulata* 750 mg/kg BB menginduksi ekspresi p53 pada sel epitel kelenjar payudara tikus yang diinduksi DMBA. Pengecatan dilakukan dengan imunohistokimia *indirect method* yang menunjukkan sel yang mengekspresikan protein p53. Sel yang mengekspresikan p53 ditunjukkan dengan sel yang berwarna coklat diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Preparat diligasikan antibodi monoklonal p53, antibodi sekunder terlabel peroksidase, kemudian dikarakterisasi dengan *double staining* menggunakan DAB dan hematoxylin eosin
→ menunjukkan sel yang mengekspresikan p53

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