



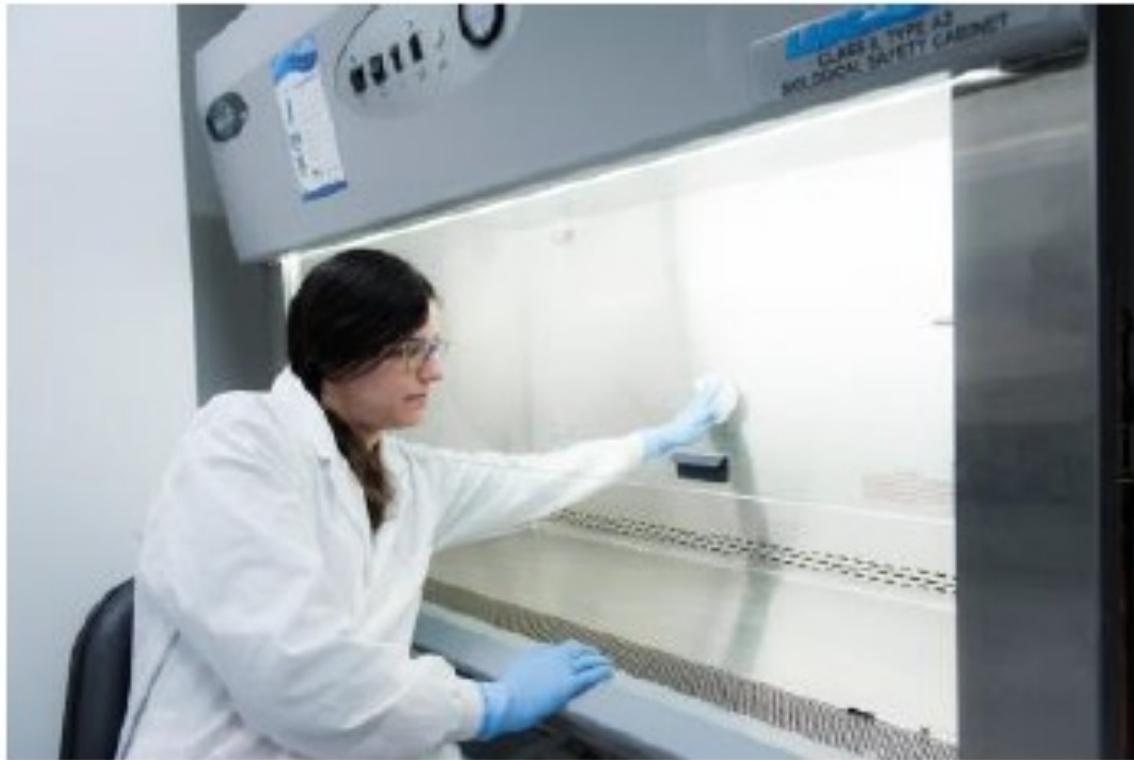
UNIVERSITAS
GADJAH MADA

Pelatihan Kultur Sel Dasar

Puspa Hening
LPPT UGM



Teknik Aseptik untuk Kultur Sel

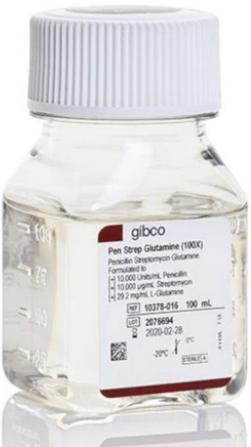


- Menggunakan konsumabel dan reagen yang sudah disterilisasi selama prosedur dan berada di BSC.
- Area kerja harus dibersihkan, disinfeksi dan dekontaminasi setelah pekerjaan selesai.
- Cek tanggal kedaluwarsa reagen, termasuk alkohol.
- Batasi personel untuk mengakses area kerja selama pekerjaan berlangsung.

Media Kultur Sel



UNIVERSITAS GADJAH MADA



- Media kultur adalah cairan atau gel yang dirancang untuk mendukung pertumbuhan kultur sel.
- Komposisi medium komplit:
 1. Medium basal
 2. Serum (10%)
 3. Antibiotik (1-2%)
 4. Antifungi (0.5%)
 5. Suplemen lainnya (vitamin, growth factor, hormone)



pH yang sesuai untuk sebagian besar sel adalah 7.2-7.4. Oleh karena itu, media kultur harus memiliki kemampuan menyangga pH. Medium sintesis menggunakan sistem buffer $\text{NaHCO}_3\text{-CO}_2$ untuk mengatasi hal tersebut.



Figure 4.3.3 Phenol red in basal medium indicates pH. **(A)** At high pH, basic conditions, phenol red becomes more purple-red in color indicating the medium is basic. This may occur if there is a problem with the CO_2 level in the incubator. **(B)** At optimal physiological pH, phenol red in a freshly fed culture is a warm red color. **(C)** At low pH, acidic conditions, phenol red becomes orange and then yellow in color. Medium of this color usually indicates build up of acidic waste products, possibly from overgrowth of the cultured cells or from growth of contaminating organisms.



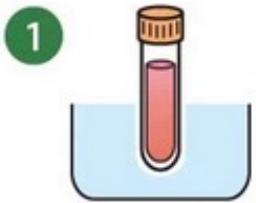
Kultur sel di dalam aneka vessels



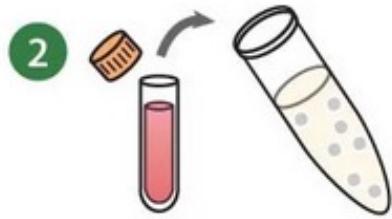
Thawing



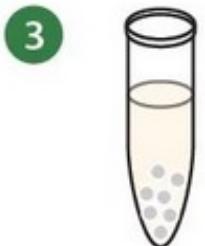
UNIVERSITAS GADJAH MADA



Place cryovial into
a 37°C waterbath



Transfer vial contents to
a 15ml conical tube with
pre-warmed medium



Centrifuge at 200 x g
for 3 mins to pellet
the cells

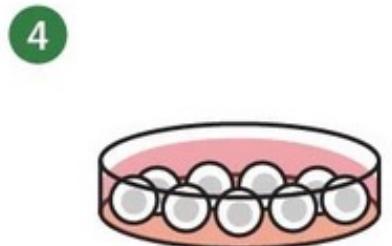


Plate cells once resuspended
with culture medium into
culture vessel

- Cairkan cryovial berisi sel pada water bath suhu 37 °C sekitar 2 menit dengan agitasi (diputar-putar).
- Semprot vial dengan etanol 70%.
- Pindahkan ke konikel 15 ml yang berisi 9 ml media kosong.
- Sentrifus untuk memisahkan pellet sel dan media. Buang media untuk menghilangkan DMSO.
- Resuspensi pellet sel dengan media komplit baru.
- Transfer suspensi ke flask.



Terdapat berbagai metode untuk menghitung sel.

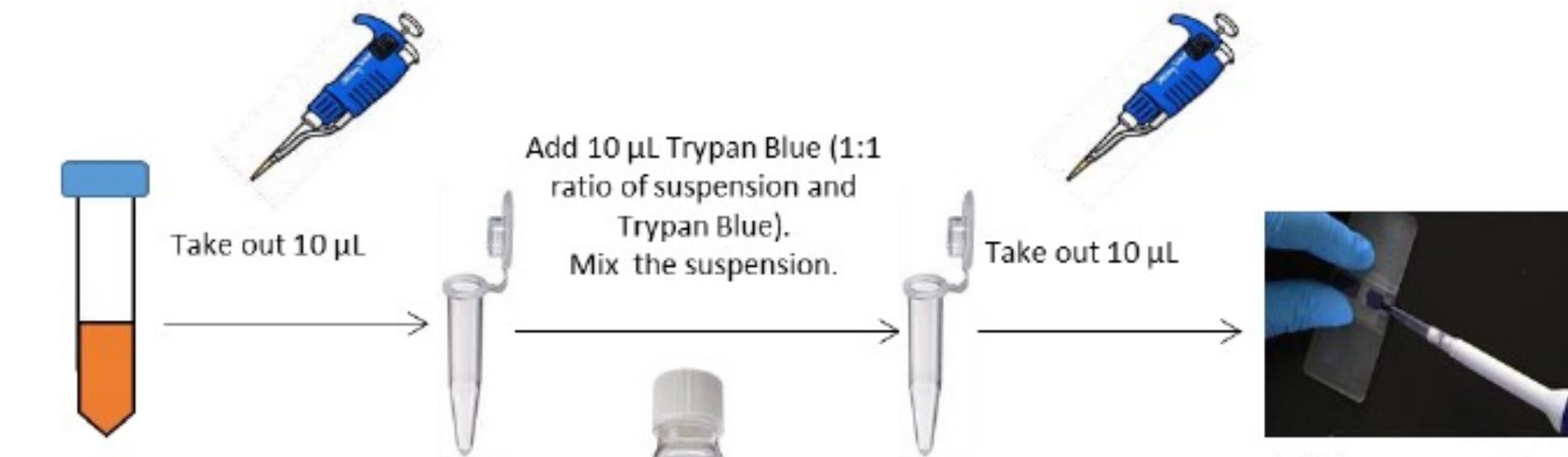
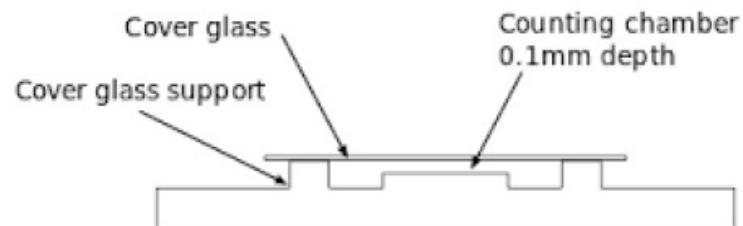
Penghitungan secara langsung:

1. Hemositometer
2. Alat penghitung elektronik
3. Flow cytometry

Penghitungan secara tidak langsung

1. Crystal violet
2. Trypan blue
3. MTT assay

Cell Counting Procedure using Haemocytometer

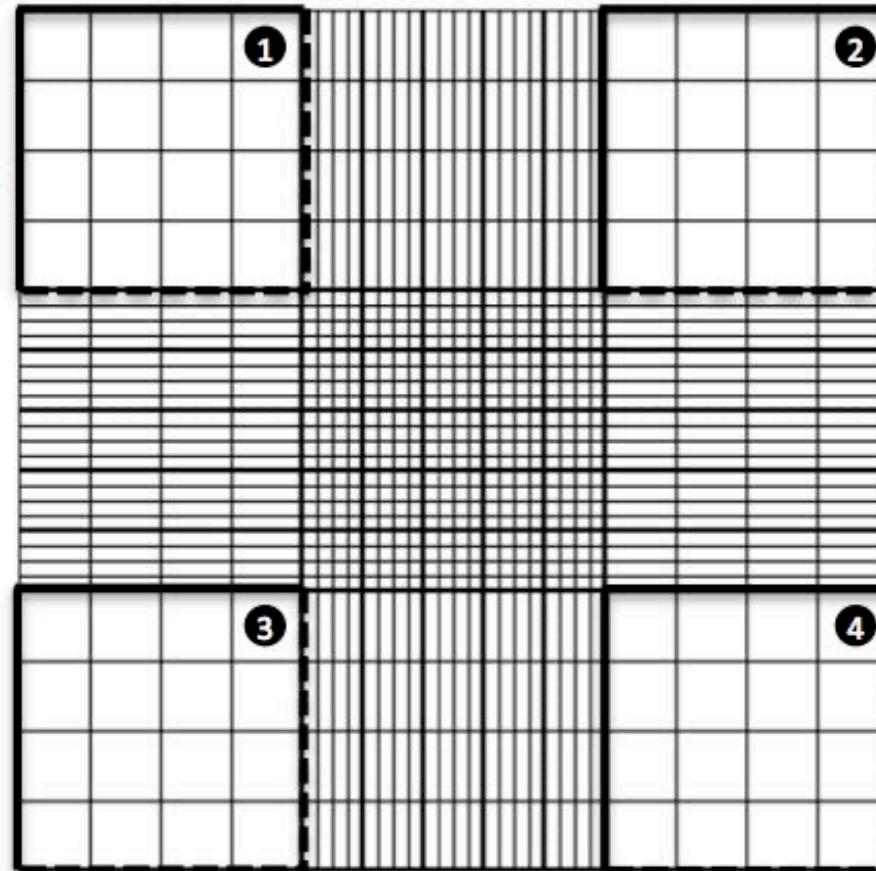


Cell
suspension



Hitung sel dengan Hemositometer

— count
--- don't count



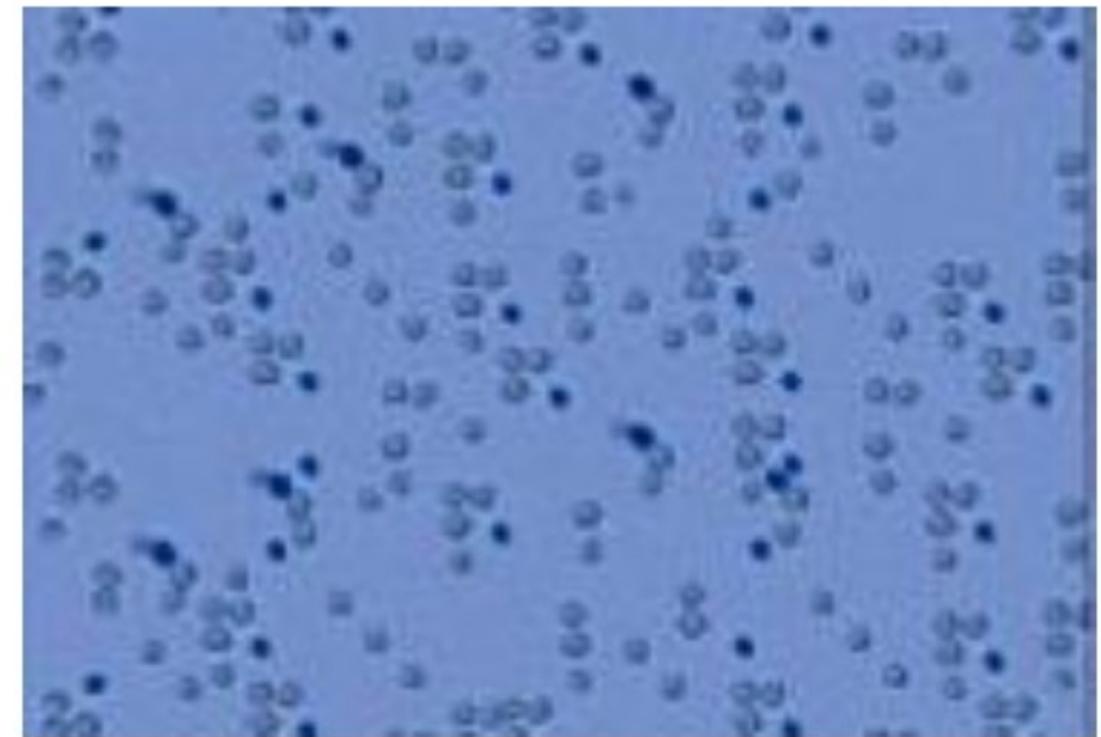
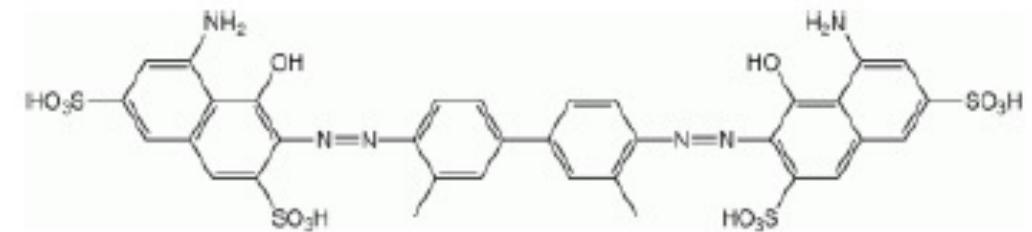
Kuadran	Jumlah Sel
1	
2	
3	
4	
Rata-rata jumlah sel/kuadran	

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{Rata}^2 \text{ jumlah sel/kuadran} \times \\ \text{faktor pengenceran}^* \times 10^4$$



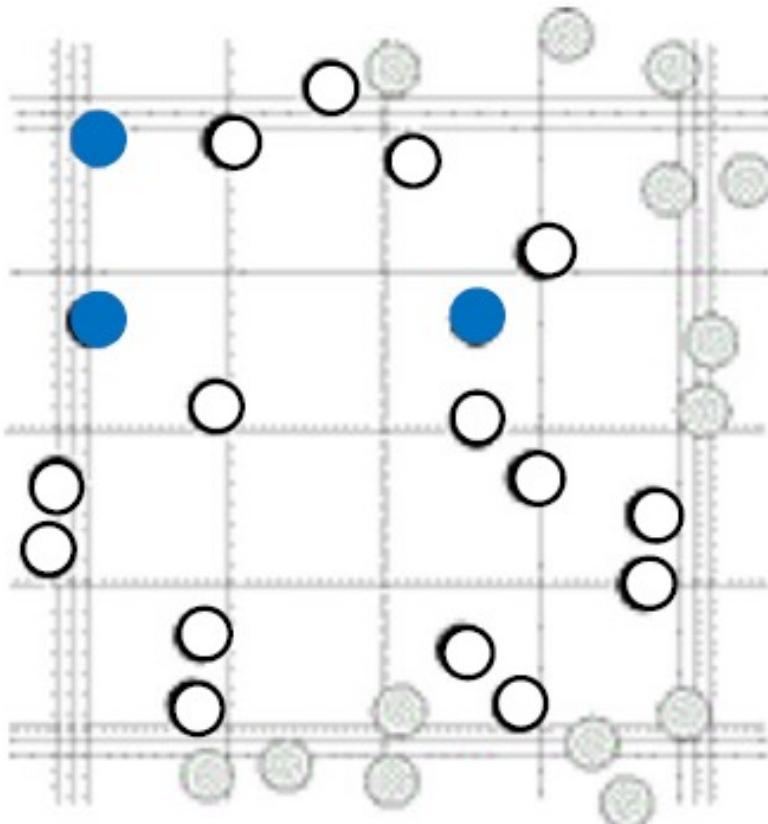
Menghitung Sel Viabel

- Viabilitas sel ditentukan dengan pengecatan sel menggunakan trypan blue.
- Penggunaan trypan blue:
 1. Tidak permeable untuk sel hidup → bening
 2. Permeable pada sel mati → biru gelap
- Sel diwarnai dengan trypan dan dihitung jumlah sel viabelnya dengan hemositometer.





Menghitung Sel Viabel dengan Hemositometer



Perhitungan sel viable dapat dilakukan dengan menghitung sel hidup yang berwarna putih/bening dan tidak terwarnai oleh trypan blue.

$$\text{Persentase viabilitas} = \frac{\text{Total sel hidup}}{\text{Total sel}} \times 100\%$$

Hitung Sel



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Kuadran	Sel Hidup	Sel Mati
1	25	1
2	26	2
3	34	1
4	26	1
Rata-rata	27,75	1,25



Jumlah sel/ml = Rata² jumlah sel/kuadran x faktor pengenceran* x 10⁴

$$\text{Jumlah sel hidup/ml} = 27,75 \times 2 \times 10^4 = 55,5 \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Jumlah sel mati/ml} = 1,25 \times 2 \times 10^4 = 2,5 \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

Misal, akan seeding di flask dengan densitas 7×10^5 , maka volume sel yang dibutuhkan untuk diambil dari stok

$$\text{Volume sel yang dibutuhkan} = \frac{\text{Jumlah sel yang akan ditanam}}{\text{Jumlah sel terhitung}}$$

$$\text{Volume sel yang dibutuhkan} = \frac{7 \times 10^5}{55,5 \times 10^4} = 1260 \text{ ul}$$

Misal, dalam 1 flask total akan diisi 5 ml medium+suspensi sel, maka volume medium yang ditambahkan

$$\text{Volume medium} = 5000 \text{ ul} - 1260 \text{ ul} = 3740 \text{ ul}$$



Seeding

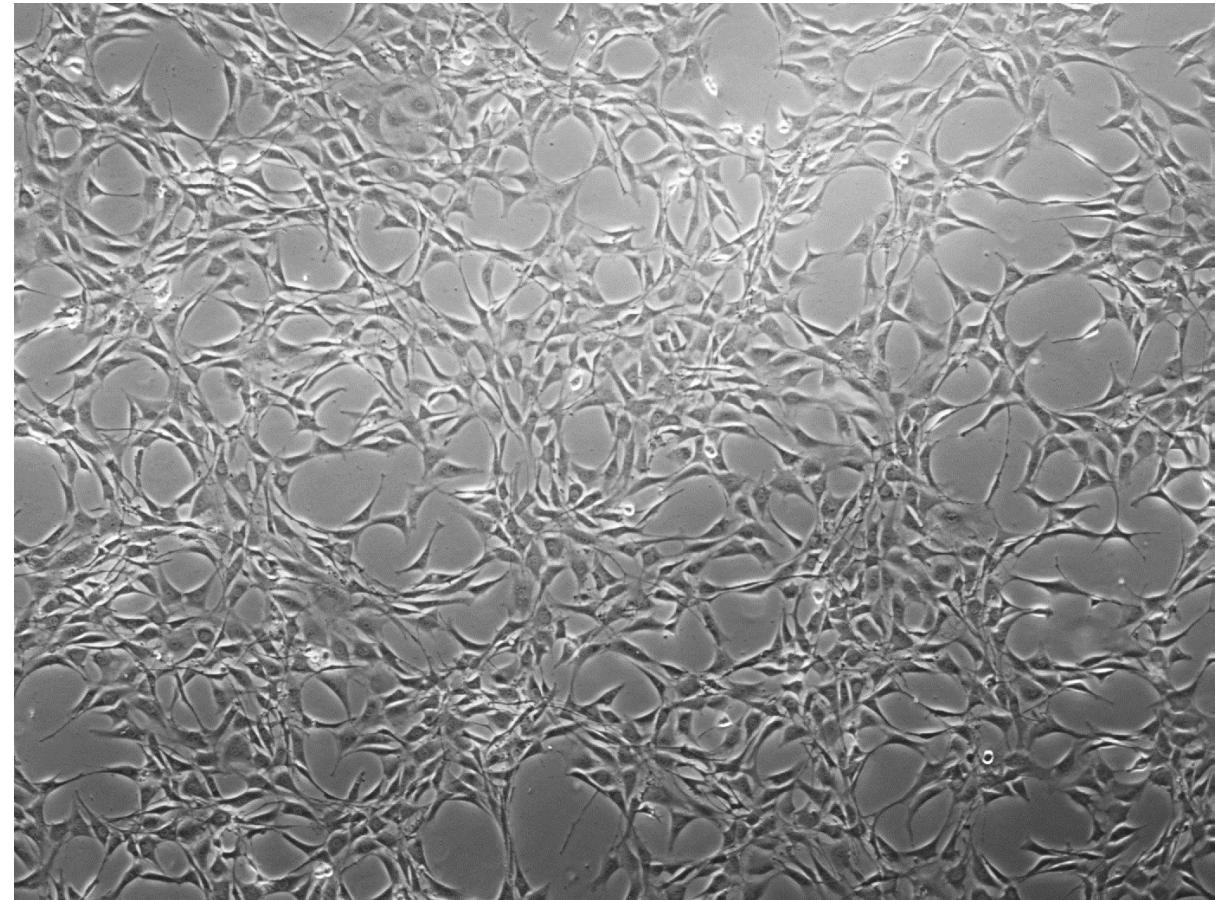
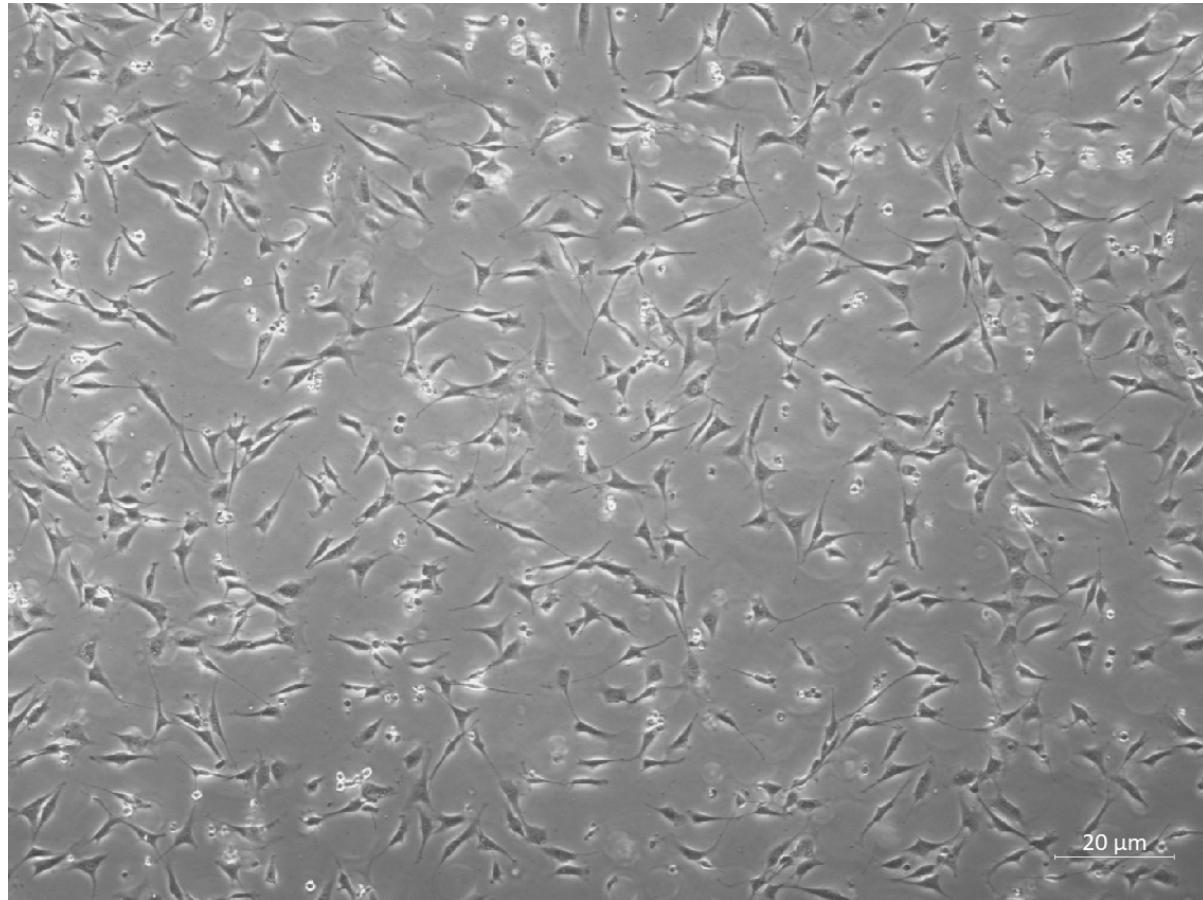


- Setelah thawing, sel harus ditempatkan di cell culture vessel dengan media komplit.
- Media komplit, mengandung: media basal, serum, antibiotik dan antifungi.
- Setelah 24 jam penumbuhan, cek konfluensinya.
- Beberapa sel membutuhkan waktu beberapa hari untuk mencapai 80% konfluensi dan disubkultur.

NIH-3T3



UNIVERSITAS GADJAH MADA



Tipe Vessels



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Tipe	Luas Permukaan (cm ²)	Densitas Penanaman	Jumlah sel saat konfluen	Volume Medium (ml)
Flask				
T-25	25	$0,7 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	3-5
T-75	75	$2,1 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$	8-15
T-175	175	$4,9 \times 10^6$	$23,3 \times 10^6$	35-53
T-225	225	$6,3 \times 10^6$	30×10^6	45-68
Well Plate				
6 wells plate	9,6	$0,3 \times 10^6$	1.2×10^6	1 – 3
12 wells plate	3,5	$0,1 \times 10^6$	0.5×10^6	1 – 2
24 wells plate	1,9	$0,05 \times 10^6$	0.24×10^6	0,5 – 1
48 wells plate	1,1	$0,03 \times 10^6$	0.12×10^6	0,2 – 0,4
96 wells plate	0,32	$0,01 \times 10^6$	0.04×10^6	0,1 – 0,2



Tujuan:

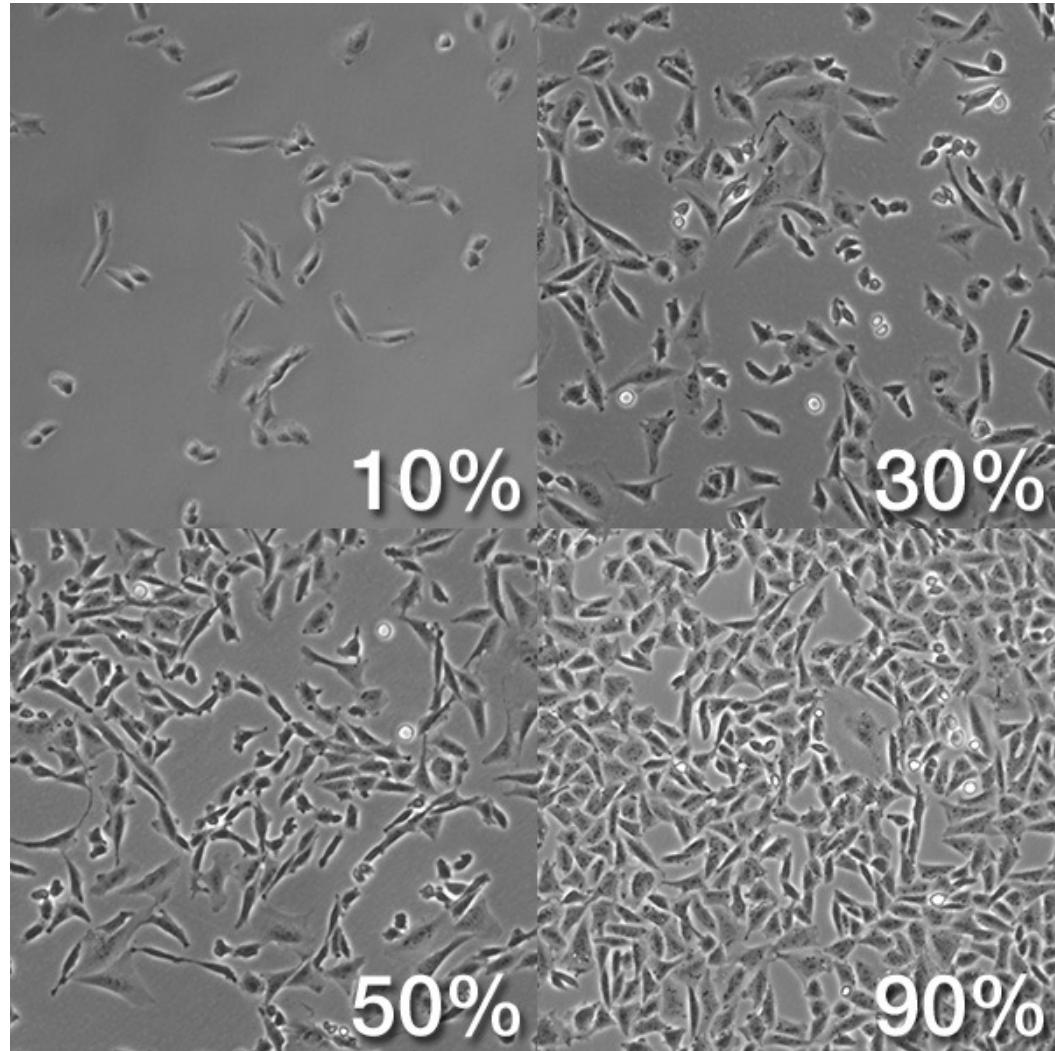
1. Menjaga populasi sel di dalam kultur, agar tidak overgrow.
 2. Meningkatkan jumlah sel untuk eksperimen dan penyimpanan.
- Pada konfluensi 80% sel dapat dipanen menggunakan Trypsin-EDTA selama 3-5 menit, sel akan terlepas.
 - Kemudian flask digoyang-goyang untuk membantu sel terlepas secara mekanis.



Konfluensi



UNIVERSITAS GADJAH MADA



Monolayer



Fully trypsinized



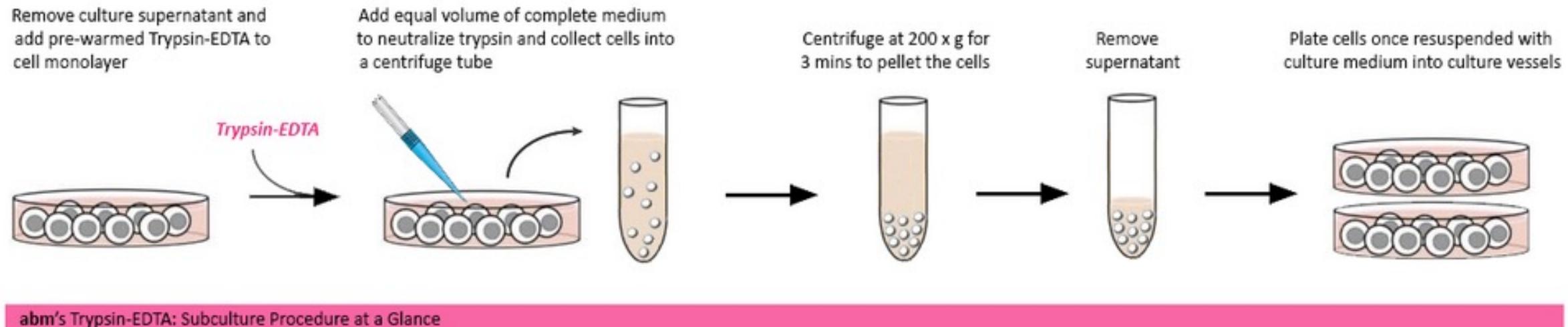


Figure 5 – Subculture procedure

Cryopreservation



- Cell Cryopreservation (simpan beku sel) adalah teknologi yang digunakan untuk menyimpan sel hidup dengan mempertahankan viabilitas seluler dan fungsi di dalam suhu kriogenik (suhu rendah, sekitar -80 hingga -196 °C).
- Pada suhu ultra-rendah, proses kimia, biologis dan fisika yang secara normal terjadi pada level seluler akan terhambat dalam waktu yang lama.



contain • organize • preserve

Komposisi Agen Cryopreservation



UNIVERSITAS GADJAH MADA



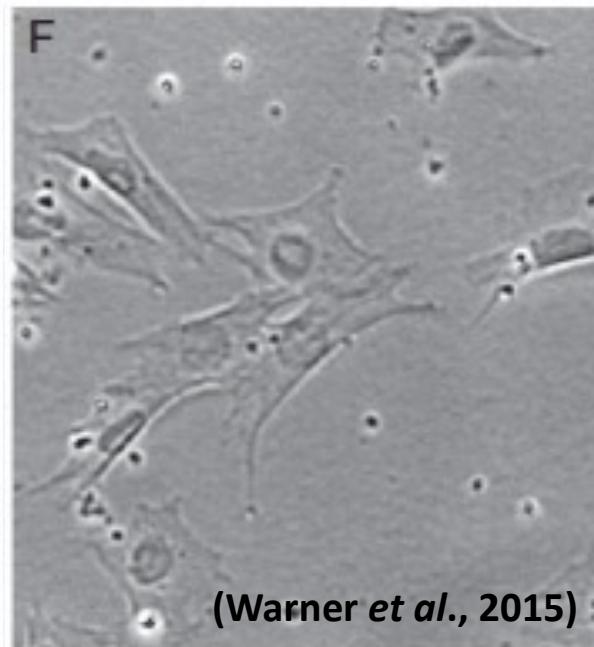
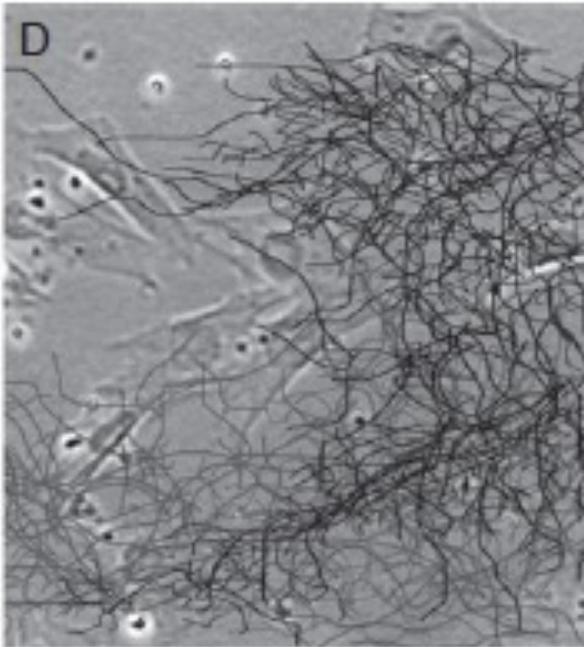
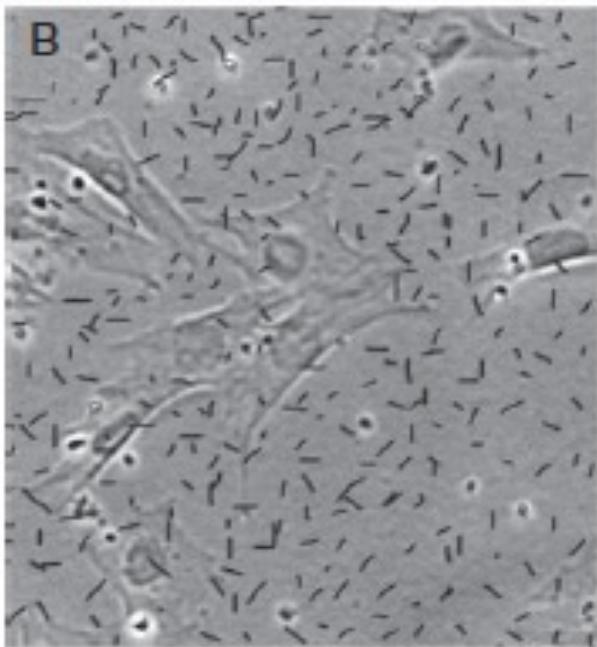
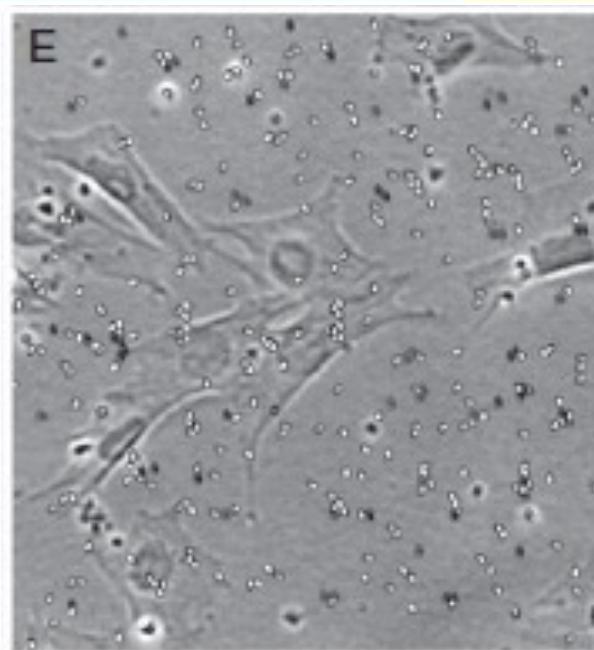
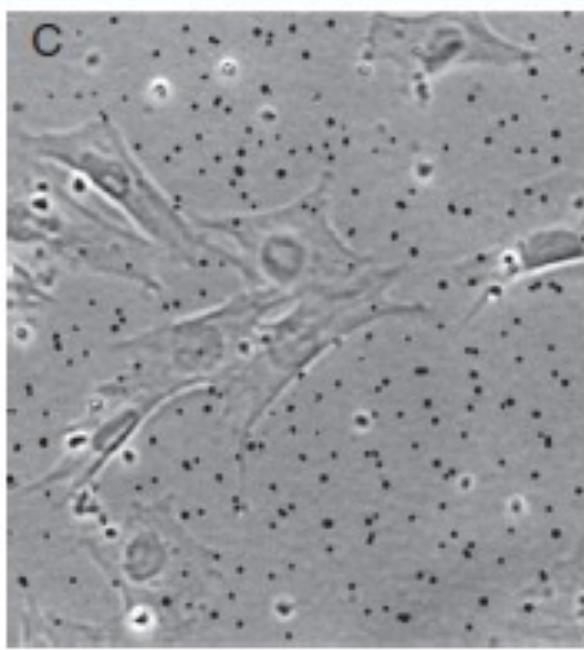
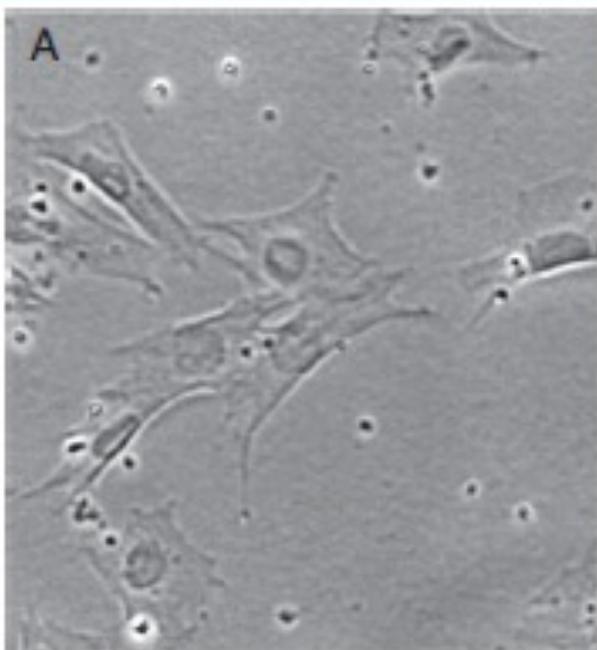
Komposisi

1. Medium Komplit/Serum
2. DMSO 10%
 - Penyimpanan jangka panjang dilakukan pada suhu di bawah -140 °C.
 - Vial disimpan di tangki nitrogen cair..
 - Temperatur sebaiknya berada di antara -140 °C dan -180 °C.



Sumber Kontaminasi Kultur Sel

- Konsumabel – flask, pipet, tip
- Reagen – medium, buffer
- Sampel – sumber sel
- Instrumen – BSC, incubator, sentrifus
- Operator – personel
- Lingkungan – heating, ventilation, dan air condition



(Warner et al., 2015)

Berbagai gejala kontaminasi yang teramat melalui mikroskop pada kultur sel adherent:

- A. Kultur yang tidak terkontaminasi
- B. Sel adherent yang terkontaminasi bakteri basil
- C. Sel yang terkontaminasi bakteri cocci
- D. Sel yang terkontaminasi fungi berfilamen
- E. Sel yang terkontaminasi yeast
- F. Sel yang terkontaminasi dengan sel lain atau mycoplasma

Pencegahan



UNIVERSITAS GADJAH MADA

- Menerapkan teknik aseptik.
- Menambahkan antibiotik dan antifungi ke dalam medium tumbuh.
- Membersihkan lingkungan laboratorium dan peralatan yang digunakan untuk kultur secara rutin.
- Menggunakan indikator sterilisasi untuk memastikan bahwa alat dan konsumbel telah melalui proses sterilisasi dengan benar.
- Melakukan karantina pada sel yang terkontaminasi agar tidak mengontaminasi lingkungan laboratorium dan melakukan screening pada setiap sel baru dan reagen yang akan digunakan dalam kultur.



From the cells we can learn that,
"In order to grow we have to keep on dividing
and separating.
That's the rule of living."

-Thank you-

LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED