



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

ISO/IEC 17025 accredited by
KAN
Komite Akreditasi Nasional

LP-1502-IDN
LK-324-IDN

Uji Sitotoksitas secara In Vitro

<https://lppt.ugm.ac.id/id/>

Dr.med.vet.drh. Hevi Wihadmadyatami, M.Sc.
Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu
Laboratorium Histologi, Fak. Kedokteran Hewan
Universitas Gadjah Mada

Disampaikan pada WS Merck-LPPT, 11 September 2023



Sitotoksisitas

Sitotoksisitas dapat didefinisikan sebagai kemampuan dari sebuah substansi untuk dapat menyebabkan kematian dari sel hidup (*living cells*);

Efek sitotoksisitas dapat ditimbulkan karena pemberian:

1. Bahan kimia (obat, kandidat obat, kosmetik, biomaterial, material dll)
2. Bahan-bahan alami (kandidat obat herbal atau obat herbal)
3. Lingkungan (paparan UV untuk photo aging, temperature, radiasi, dll)



Sitotoksisitas pada sel hidup yang sehat akan memberikan beberapa efek seperti:

1. Nekrosis : sel mengalami lisis dan *rapid loss* dari membrane integrity -- kematian sel yang mendadak
2. Apoptosis : lebih lambat, terkontrol, --- kematian sel terprogram
3. *Cytostasis* : sel tetap hidup tetapi sel mengalami kegagalan untuk membelah dan tumbuh --- penurunan sel viabilitas



Dua alasan utama:

1. Apabila ingin mengetahui atau mencari senyawa/kondisi yang memadai untuk menyebabkan kematian sel misal: kanker dan imunoterapi
2. Apabila ingin mengecualikan sitotoksitas dengan menggunakan sel missal: bahan kimia, obat-obatan, material/biomaterial

Penerapan:

1. Penemuan obat baru (*Drug Discovery*)
2. Penelitian terkait tumor atau kanker
3. Evaluasi keamanan pestisida, biomaterial, ekstrak tumbuhan, bahan tambahan makanan, kosmetik dan bahan kimia industri

Uji Sitotoksisitas secara In Vitro



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Sebelum munculnya teknologi kultur jaringan, seluruh studi berbasis hewan model dilakukan untuk mengukur sitotoksisitas, dimana:

- Proses ini memerlukan waktu yang panjang, dan saat ini dengan prinsip animal welfare atau 3R (replace, reduce, dan refinement) dlmana penggunaan hewan model pada uji menyebabkan kematian pada hewan model tdk direkomendasikan (pembatasan penggunaan hewan)
- Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi kultur jaringan telah memungkinkan pengukuran sitotoksisitas pada sel line sehingga juga memberikan hasil yang akurat.





1. Dapat dilaksanakan dengan cepat
2. Ada potensi otomatisasi
3. Reliabilitas dan Reproduksibilitas yang tinggi
4. Apabila sudah ada uji pendahuluan mudah untuk dilakukan prediksi hasil uji dengan sel line jenis tertentu
5. Tidak memerlukan pengujian dengan menggunakan hewan model dalam jumlah besar
6. Berguna untuk menguji sampel dalam jumlah besar



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Bagaimana mengukur sitotoksitas?

Diasumsikan bahwa sel yang hidup akan menunjukkan tanda-tanda kehidupan dan fungsionalitas seperti :

1. Metabolisme
2. Sel berproliferasi
3. Memiliki integritas membran yang utuh

LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED

Bagaimana mengukur sitotoksitas?



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Berdasarkan sifat-sifat ini berbagai pengujian telah dikembangkan yang mengukur sitotoksitas dan viabilitas sel berdasarkan fungsi seluler seperti:

- permeabilitas membran sel,
- aktivitas enzim,
- kemampuan adhesi sel,
- produksi ATP,
- produksi ko-enzim,
- uptake aktivitas dari nukleotida



Sitotoksisitas Assay atau Uji Sitotoksisitas dapat diklasifikasikan berdasarkan end points dari uji tersebut yaitu misalnya berdasarkan indicator perubahan warna, fluorescence, luminescent dll.

- 1. Dye exclusion:** Trypan blue, eosin, Congo red, erythrosine B assays.
- 2. Colorimetric assays:** MTT assay, MTS assay, XTT assay, WST-1 assay, WST-8 assay, LDH assay, SRB assay, NRU assay and crystal violet assay.
- 3. Fluorometric assays:** alamarBlue assay and CFDA-AM assay.
- 4. Luminometric assays:** ATP assay and real-time viability assay



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Calorimetric Assay:

1. Reagen yang digunakan dalam pengujian kolorimetri menghasilkan warna sebagai respons terhadap kelangsungan hidup dan aktivitas metabolisme sel
2. Dapat digunakan untuk sel line yang adherence maupun suspensi
3. Mudah untuk diaplikasikan

➤ MTT Assay

➤ WST-1 Assay

LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED



Digunakan untuk mengetahui:

- 1. Efek sitotoksitas**
2. Viabilitas dari sel
3. Proliferasi dari sel

MTT : 3-(4,-5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

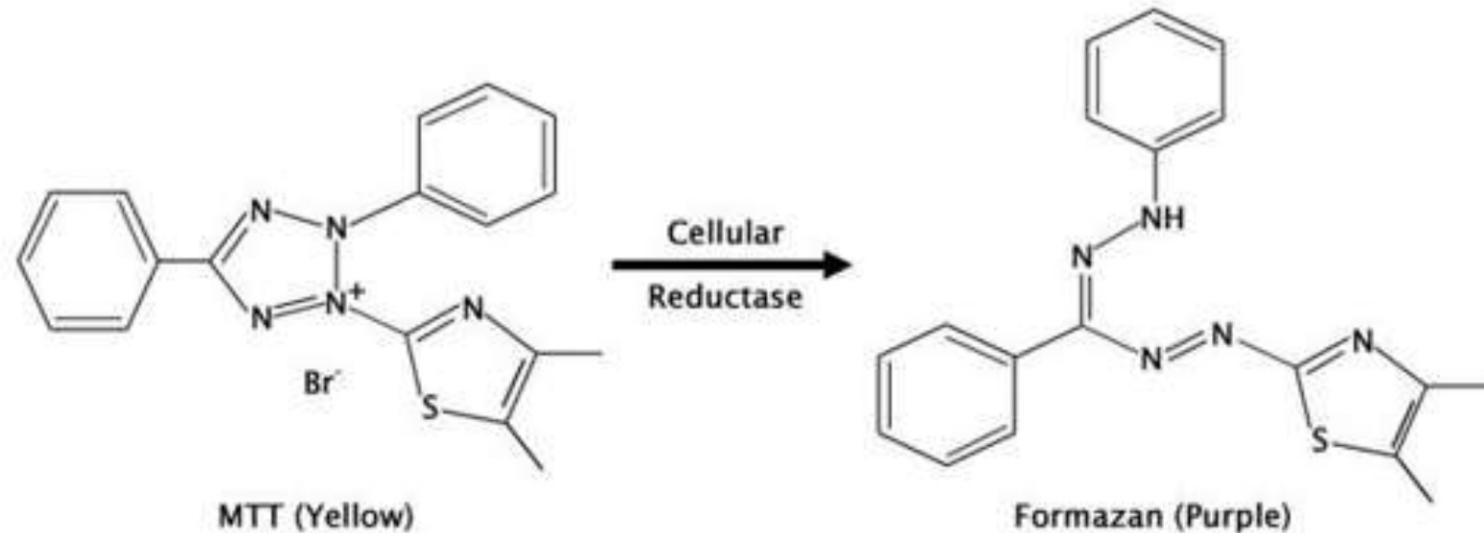
MTT assay diperkenalkan pertama kali oleh Mosmann (1983) untuk mengukur chemosensitasi dari human lung cancer cell line

Tim Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods, Volume 65, Issues 1–2, 1983.

MTT Assay



UNIVERSITAS GADJAH MADA



Prinsip: Reagent MTT yang digunakan akan mengukur aktivitas enzim yang dilepaskan oleh mitokondria seperti succinate dehydrogenase, dimana MTT (kuning) akan memasuki mitokondria dan merupakan suatu tetrazole yang direduksi oleh NADH menjadi formazan (ungu) di mitokondria sel hidup. Sel kemudian dilarutkan dengan penambahan solvent organic (DMSO/Isopropanol), kemudian formazan yang terlarut akan diukur dengan menggunakan spektrophotometri



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Sekilas Langkah pengujian dengan MTT:

- Sel sebanyak $1,5 \times 10^4$ cell ditumbuhkan pada culture test 96 well plate.
- Sel diinkubasi selama 24-48 jam (tergantung jenis sel), kelompok dibagi menjadi beberapa kelompok perlakuan sebagai contoh non-treated (NT), kontrol positif, dan kelompok perlakuan, masing-masing perlakuan diujikan sebagai triplicate.
- Perlakuan diinkubasi selama 24 jam (optimasi tergantung perlakuan), kemudian 100 μl reagen MTT 5 mg/ml diberikan pada tiap sampel dan diinkubasi selama 2 jam,
- kemudian dilanjutkan dengan pemberian DMSO 100 μl /sumuran.
- Pembacaan optical density dilakukan dengan ELISA Reader pada Panjang gelombang (λ) 595 nm (560 nm-700 nm).
- Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung dengan rumus untuk memperoleh persentase viabilitas.

LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Langkah pengujian dengan MTT:

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{Treated\ abs-negative\ control\ abs}{non\ treated\ cell\ abs-negative\ control\ abs} \times 100\%$$

Warna formazan berbanding lurus dengan sel yang hidup, semakin pekat warna tersebut maka semakin banyak sel yang hidup.



LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED

InSilico Molecular Docking and in Vitro analysis of Ethanolic Extract
Ocimum sanctum Linn Sel yang digunakan A549

Figure 11

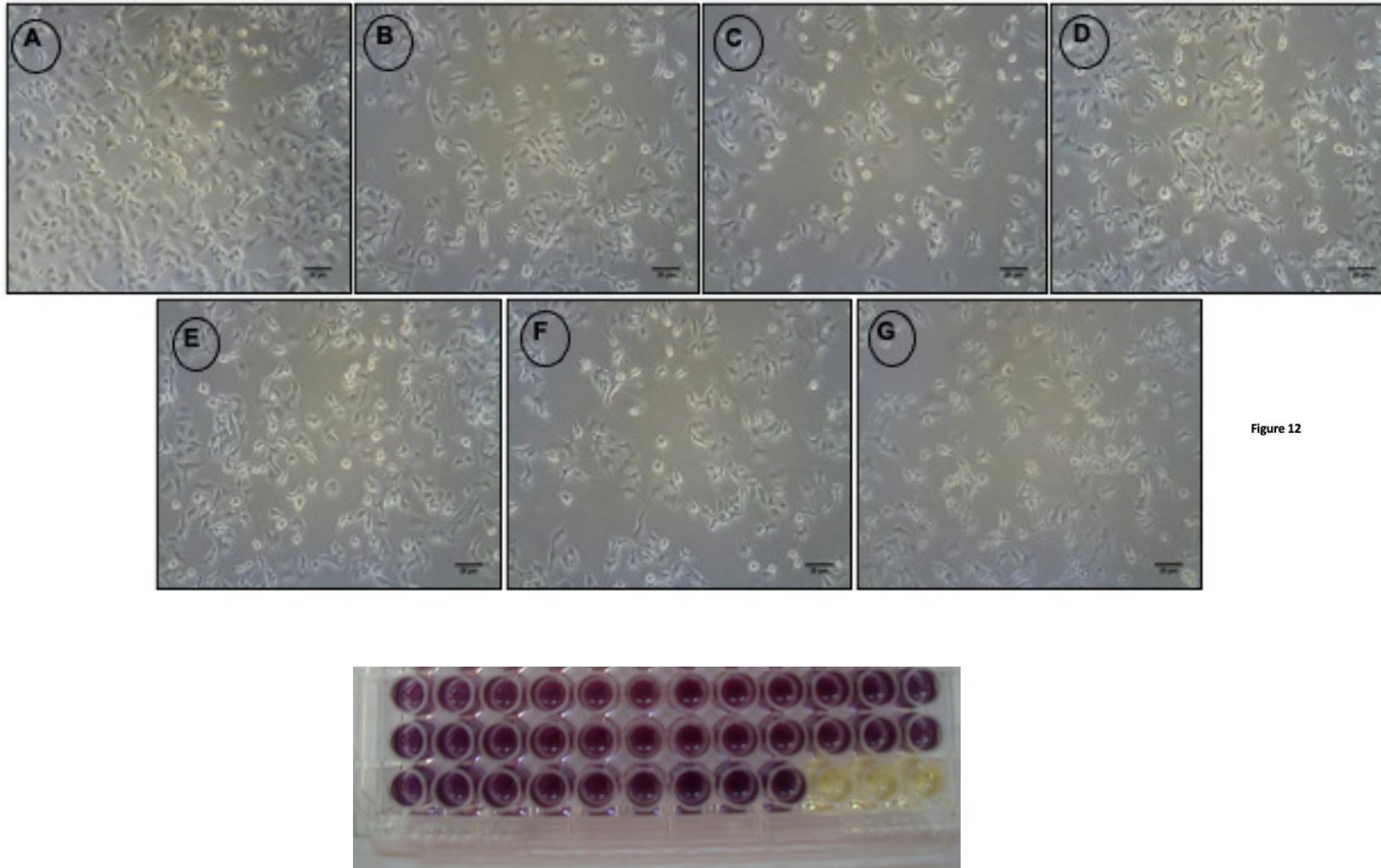
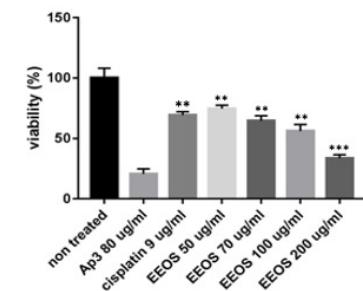


Figure 12





UNIVERSITAS GADJAH MADA

MTT ASSAY

Kelemahan dari uji MTT disbandingkan WST (*Water Soluble Tetrazolium Salt*):

Reagent MTT insoluble pada medium, sehingga kristal formazan yang diprosuksi selama proses reduksi harus dilarutkan dengan DMSO atau Isopropanol

Karena hal ini MTT assay merupakan end point assay, tidak dapat dilakukan monitoring lebih lanjut misalnya untuk mengetahui proliferasi lebih lanjut

LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED

Water Soluble Tetrazolium Salt (WST)



UNIVERSITAS GADJAH MADA

- **WST-1** (WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H* tetrazolium monosodium salt) dan lebih lanjut khususnya **WST-8** (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H* tetrazolium, monosodium salt)
- Merupakan garam tetrazolium generasi kedua yang dikemukakan pertamakali oleh Tominaga (1999)

Issue 2, 1999

[Previous Article](#)

[Next Article](#)



From the journal:
Analytical Communications

A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay

[Hideyuki Tominaga](#), [Munetaka Ishiyama](#), [Fumio Ohseto](#), [Kazumi Sasamoto](#), [Tomoyuki Hamamoto](#),
[Keiji Suzuki](#) and [Masami Watanabe](#)

Abstract

The application of a tetrazolium salt, 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H* tetrazolium, monosodium salt (WST-8), to cell viability assays and *in vitro* drug sensitivity tests is described. With a higher sensitivity as a chromogenic indicator for cell viability compared with conventional tetrazolium salts, WST-8 produced results of cell viability and IC₅₀ values that were in good agreement, respectively, with the MTT method and [³H]thymidine uptake method.



UNIVERSITAS GADJAH MADA

Water Soluble Tetrazolium Salt

- lebih menguntungkan dibandingkan MTT karena dapat direduksi di luar sel, dikombinasikan dengan mediator elektron dan menghasilkan formazan yang larut dalam air.
- uji WST-1 dapat dibaca secara langsung (tanpa langkah solubilisasi yang ada di MTT)
- memberikan sinyal yang lebih efektif dibandingkan MTT, dan
- menurunkan toksitas terhadap sel, menurunkan formazan yang terakumulasi di dalam sel
- Sel dapat bertahan 24-48 jam apabila diperlukan untuk pengamatan lebih lanjut missal proliferasi

LOCALLY ROOTED, GLOBALLY RESPECTED



- Prinsip: uji kolorimetri untuk penentuan viabilitas sel dan dapat digunakan untuk uji **sitotoksitas**.
- Garam tetrazolium akan direduksi oleh enzim dehydrogenase pada mitokondria dan akan terbentuk produk berwarna oranye.
- WST menginduksi intracellular mitochondrial dehydrogenase, dimana proses reduksi bergantung pada NADH-dependent enzim, reaksi ini melepaskan produk berupa water-soluble methyl benzene.
- Produk formazan berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup. Warna formazan berbanding lurus dengan sel yang hidup, semakin pekat warna tersebut maka semakin banyak sel yang hidup.
- Viabilitas sel dibaca nilai absorbansi dengan panjang gelombang 450-630 nm (reference).

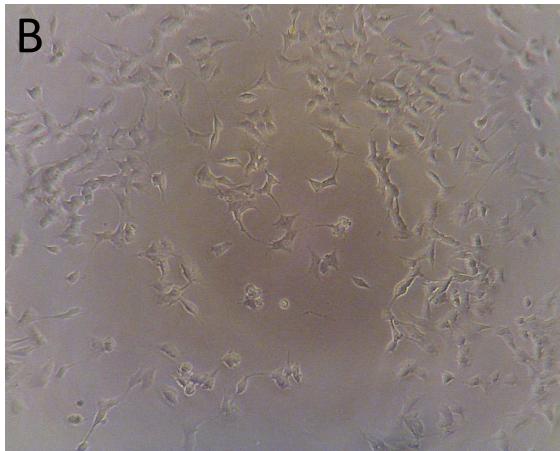


UNIVERSITAS GADJAH MADA

TMT



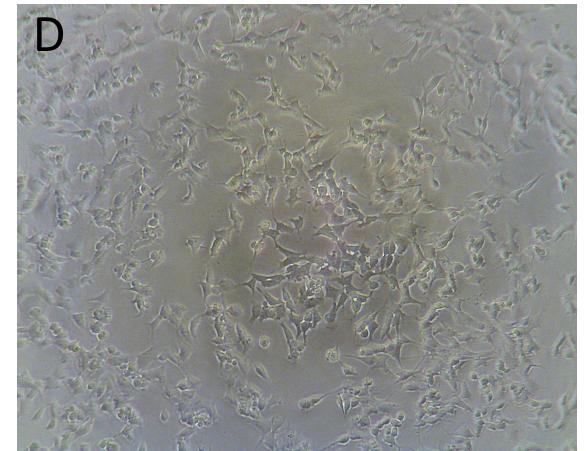
TMT + CM 25%



TMT + CM 50%



TMT + CM 75%



TMT + CM 100%

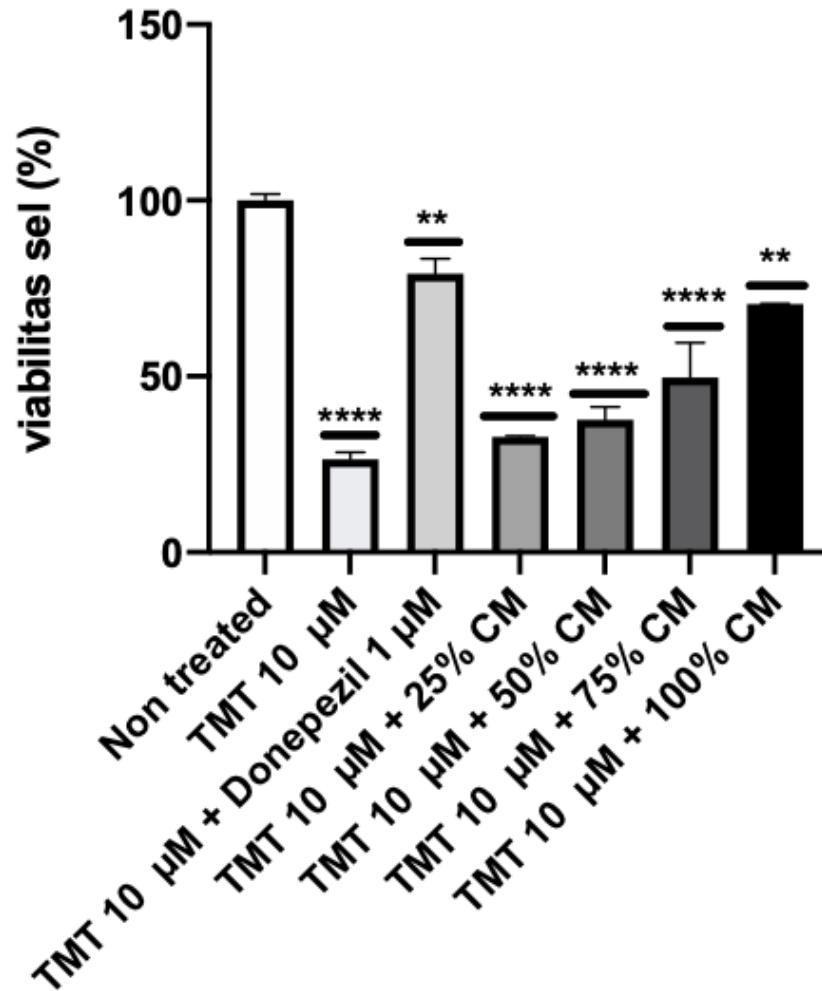


TMT + Donepezil



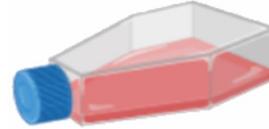
Non treated

WST-8



Saragih, et al. 2023

Accepted



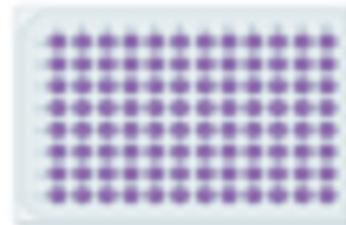
Sel +
Perlakuan



Tidak memerlukan solven Organik, direct pembacaan

1

MTT Assay

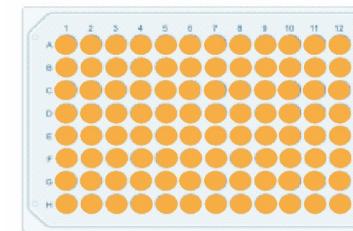


Formazan purple dye

Memerlukan solven organic untuk melarutkan

2

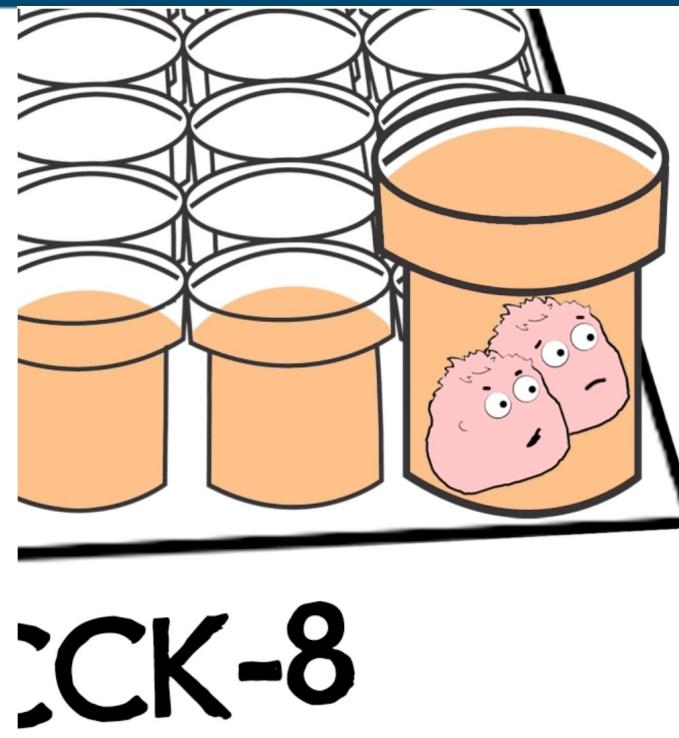
WST-1/ WST-8 Assay



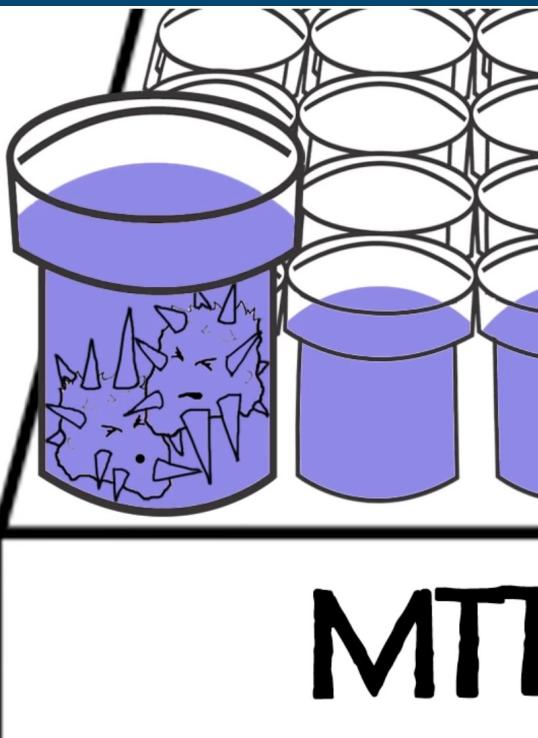
Formazan orange dye



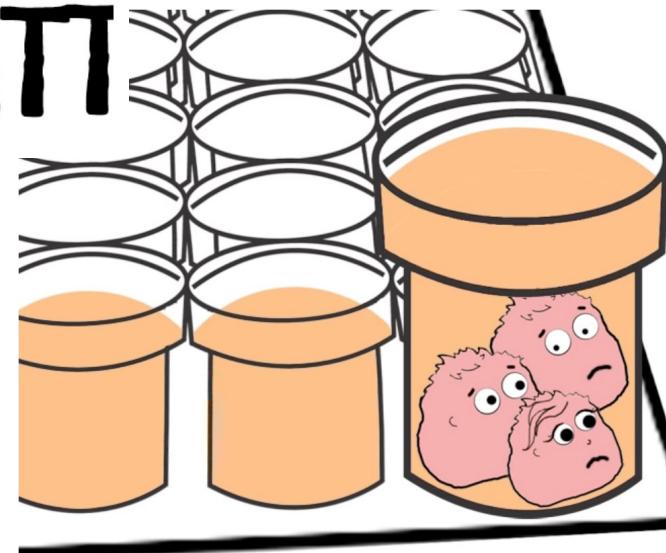
UNIVERSITAS GADJAH MADA



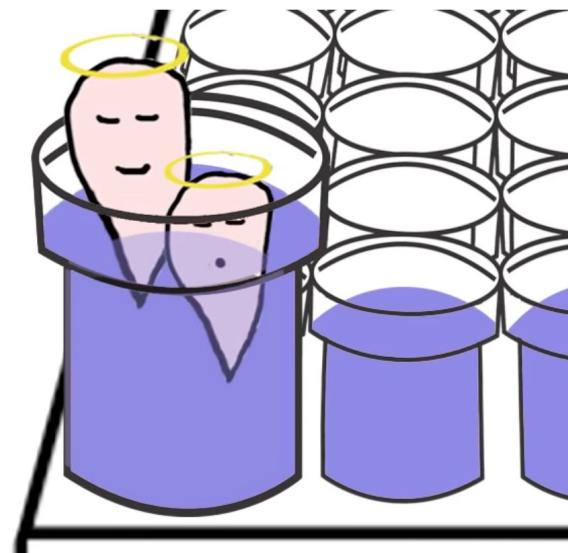
:CK-8



MTT



:CK-8



MTT

<https://www.youtube.com/watch?v=7u7cMZYKG9E>



UNIVERSITAS
GADJAH MADA



A detailed pencil-style sketch of a large, multi-story building with a prominent arched entrance and a tiled roof. In the foreground, there's a street lamp with multiple globes and some potted plants. The background shows a hilly landscape with trees and a road.
TERIMA KASIH

