



## Pengenalan dan Teknik Dasar Sel Kultur

Hevi Wihadmadyatami  
Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu  
<https://lppt.ugm.ac.id>

## Outline

- Sejarah
- Kultur Sel Primer dan Kultur Sel Line
- Morfologi Sel Kultur
- Media sel kultur
- Teknik Isolasi
- Kontaminasi & Trouble Shooting
- Safety in Cell Culture



## Sel Kultur



- Sel kultur adalah sebuah proses atau mekanisme dimana peneliti melakukan *maintenance* pada sel dalam kondisi terkontrol di luar kondisi makhluk hidup (hewan hidup = *in vivo*)
- Sel kultur adalah sebuah teknik yang sudah lama dilakukan dengan perkembangannya semenjak tahun 1885


## Cell Culture *in vitro*

- 1885: Roux maintained embryonic chick cells alive in saline solution for short lengths of time
- 1912: Alexis Carrel cultured connective tissue and showed heart muscle tissue contractility over 2-3 months
- 1943: Earle *et al.* produced continuous rat cell line
- 1962: Buonassisi *et al.* Published methods for maintaining differentiated cells (of tumour origin)
- 1970s: Gordon Sato *et al.* published the specific growth factor and media requirements for many cell types
- 1979: Bottenstein and Sato defined a serum-free medium for neural cells
- 1980 to date: Tissue culture becomes less of an experimental research field, and more of a widely accepted research tool

## Sejarah Kultur Sel

		EVENT	
1907	Harrison		Frog embryo nerve fiber outgrowth <i>in vitro</i> . (cultivated frog nerve cells in a lymph clot held by the 'hanging drop' method and observed the growth of nerve fibers <i>in vitro</i> )
1912	Alexis Carrel		Explants of chick connective tissue; heart muscle contractile for 2–3 months
1916	Rous & Jones		Trypsinization and subculture of explants
1920s /30s	Carrel & Ebeling, 1923		Subculture of fibroblastic cell lines
1925–1926	Strangeways & Fell		Differentiation <i>in vitro</i> in organ culture
1940s	Keilova, 1948; Cruikshank & Lowbury, 1952		Introduction of the use of antibiotics in tissue culture (penicillin and streptomycin)

1943	Earle		Establishment of the L-cell mouse fibroblast cell line; first continuous cell line
1949	Enders		Growth of virus in cell culture
1952	Dulbecco		Use of trypsin for generation of replicate subcultures Virus plaque assay
1952	Gey		Establishment of the first human cell line, HeLa, from a cervical carcinoma,
1955	Eagle		Development of defined media
1959	Puck & Marcus		Cloning of HeLa on a homologous feeder layer
1961	Sorieul & Ephrussi		Cell fusion–somatic cell hybridization

1962	Macpherson & Stoker		Establishment and transformation of BHK21
1964	Klein smith & Pierce		Pluripotency of embryonal stem cells
1965	Ham		Serum-free cloning of Chinese hamster cells
1967	Hoober & Cohen		Epidermal growth factor
1968	Stoker et al.		Anchorage-independent cell proliferation
1969	Metcalf		Colony formation in hematopoietic cells
1975	<b>Kohler &amp; Milstein</b>		<b>Hybridomas—monoclonal antibodies</b>
1976	Illmensee & Mintz		Totipotency of embryonal stem cells
1976	Hayashi & Sato		<b>Growth factor-supplemented serum-free media</b>
1977	Nelson-Rees & Flandermeier		Confirmation of HeLa cell cross-contamination of many cell lines
1978	Ham & McKeehan		MCDB-selective, serum-free media
1980–1987	Peehl & Ham, 1980; Hammond et al., 1984; Knedler & Ham, 1987		Development of many specialized cell lines
1982	Darnell,		Regulation of gene expression
1983	Evans		Regulation of cell cycle
1984	Collen		Production of recombinant tissue-type plasminogen activator in mammalian cells
1989	Weinberg		Oncogenes , malignancy, and transformation
1990s	Kruse et al., 1991; Collins & Kennedy, 1999		<b>Development of laminar-flow cabinets</b>
1991	Griffiths		Salk polio vaccine grown in monkey kidney cells
1998	Thomson et al.,		<b>Culture of human embryonic stem cells</b>
2000+	Dennis et al., 2001		Human Genome Project: genomics, proteomics, genetic deficiencies and expression errors

## Mengapa Kultur sel (In Vitro)?

1. Memungkinkan peneliti untuk menyederhanakan lingkungan dalam tubuh dalam sistem yang terkontrol
2. Memungkinkan kontrol yang besar terhadap perlakuan dan menurunkan intervensi atau efek sistem biologi yang lain
3. Memungkinkan eksperimen paralel dilakukan bersama dengan sejumlah sel tertentu
4. Cepat
5. Untuk eksperimen tambahan hanya membutuhkan sedikit hewan in vivo

**Mahal (???)**

# Mengapa sel primer?

## Answer:

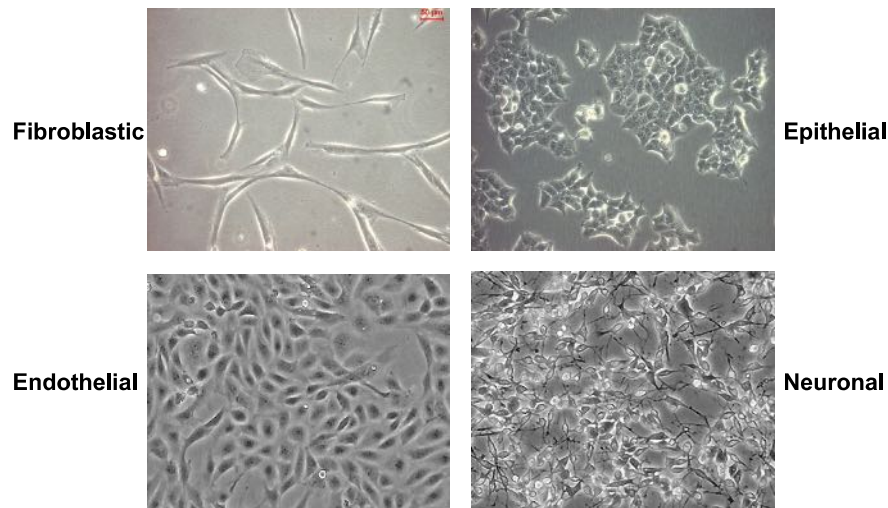
1. Lebih mudah dibuat menyesuaikan dengan kebutuhan
2. Phenotype dan genetik sama seperti dari mana berasal (originnya)
3. Sel primer tetap menjaga properti fisiologinya seperti asalnya setelah beberapa passage

## **Kultur Primer**

### **Primary cultures/ Kultur Primer**

- Diperoleh secara langsung dari jaringan hewan, embrio, maupun manusia dewasa baik normal maupun neoplasia
- Kultur primer dikulturkan dengan bantuan enzim
- Umumnya dapat survive dan berproliferasi dengan kemampuan adhesi
- Memiliki masa hidup tertentu pada kondisi kultur in vitro maksimal 8-12 kali subkultur
- Sel primer sangat sensitif

## Morfologi dari Kultur Sel Primer



## Cell Line

**Cell line** adalah kultur sel yang terbentuk secara permanen yang akan berkembang biak tanpa batas dengan media dan ruang yang sesuai

Kultur sel berkembang dari satu sel dan karena itu terdiri dari sel-sel dengan susunan genetik yang seragam

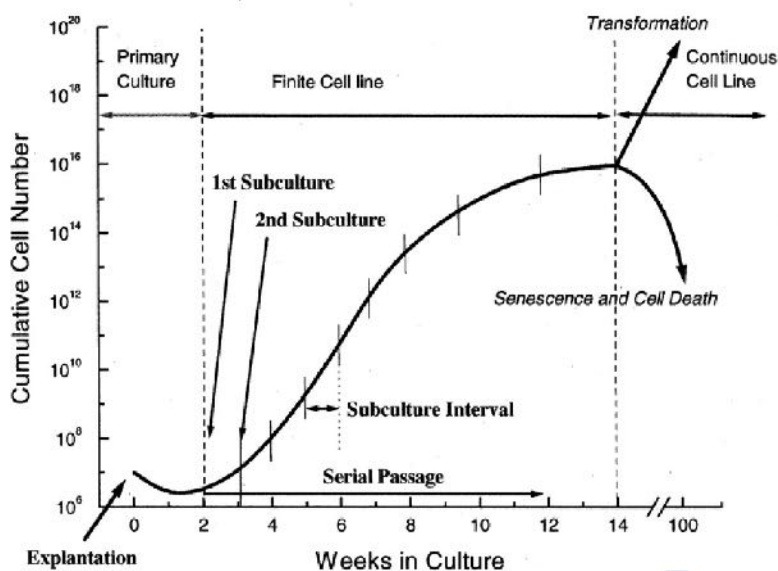
Cell line terdiri atas continuous cell line dan finite cell line

**Continuous cell line:** sel yang telah mengalami perubahan genetik dan sifat in vitro-nya tidak menggambarkan situasi in vivo, sel ini relative lebih mudah penanganannya dan tidak rentan terhadap kontaminasi.

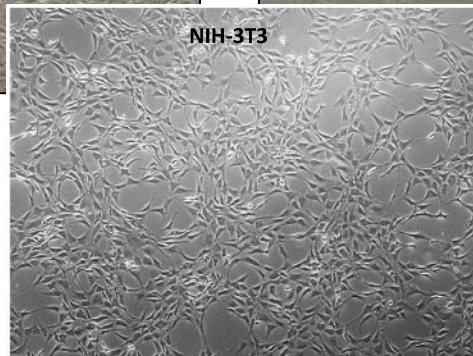
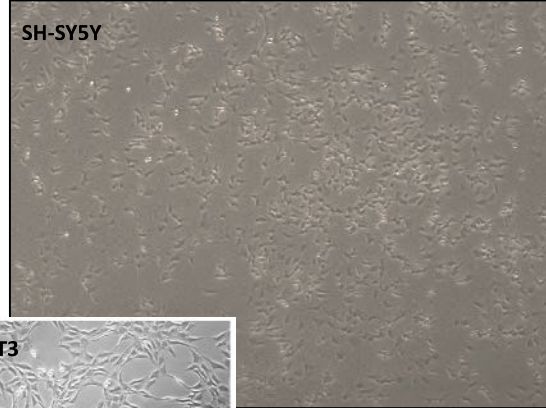
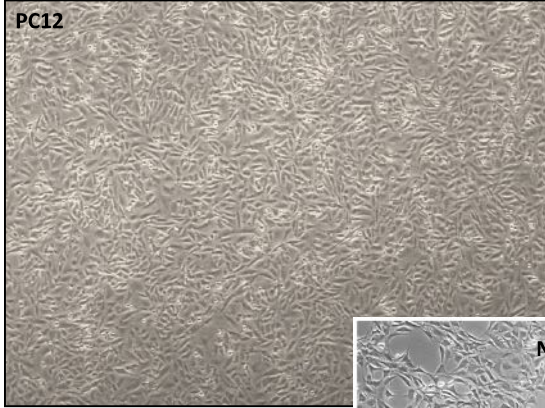
Sel ini sangat potensial utk di subkultur secara tidak terbatas (infinite cell line/ cell line abadi/ immortal cell line)

Sel memiliki pola tumbuh yang telah berubah

**Finite cell line:** kultur sel yang tumbuh setelah subkultur pertama yang pertama dari kultur primer, kultur tersebut akan berproliferasi untuk waktu tertentu, setelah itu akan berhenti membelah, dan menyerupai tahap senescence, kemungkinan sel tersebut mengalami kematian atau tumbuh secara stabil menjadi continuous cell line dan mampu melakukan proliferasi tidak terbatas perubahan tersebut diketahui sebagai in vitro transformation atau immortalization





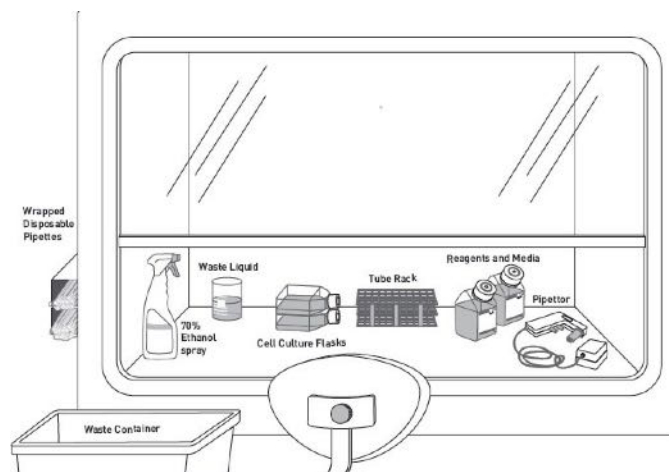


Cell culture environment (*in vitro*)

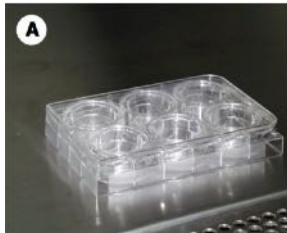
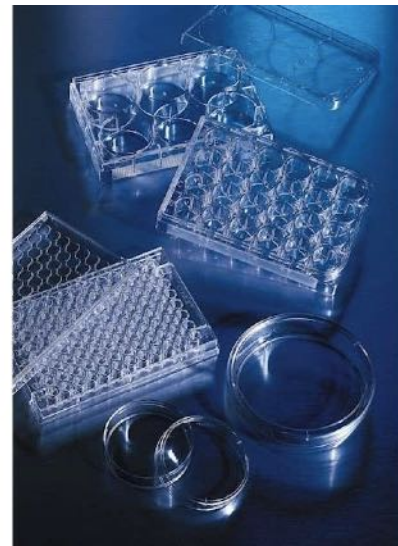
### Apakah yang dibutuhkan sel untuk tumbuh ?

- Substrate atau liquid (cell culture flask)
  - Flask : plastik yang telah dimodifikasi secara kimiawi dan yang telah dicoated dengan ECM proteins
  - Nutrients (media kultur)
  - Environment (5% CO<sub>2</sub>, temperature 37°C, kelembapan) = Inkubator CO<sub>2</sub>
  - Sterilitas (Teknik aseptik, antibiotik, antifungi dan juga analisis terhadap keberadaan mikoplasma) = biosafety hood
- Tambahan:  
Sentrifuge, waterbath, microscope, kulkas

## Cell Culture Hood



# Flask dan Plate



## Tipe flask dan plate untuk kultivasi

Tipe	Luas Permukaan (cm <sup>2</sup> )	Densitas Penanaman	Jumlah sel saat konfluen	Volume Medium (ml)
<b>Flask</b>				
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	$6,3 \times 10^6$	$30 \times 10^6$	45-68
<b>Well Plate</b>				
6 wells plate	9,6	$0,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	1 – 3
12 wells plate	3,5	$0,1 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	1 – 2
24 wells plate	1,9	$0,05 \times 10^6$	$0,24 \times 10^6$	0,5 – 1
48 wells plate	1,1	$0,03 \times 10^6$	$0,12 \times 10^6$	0,2 – 0,4
96 wells plate	0,32	$0,01 \times 10^6$	$0,04 \times 10^6$	0,1 – 0,2

## Inkubator CO2



# Cell Culture

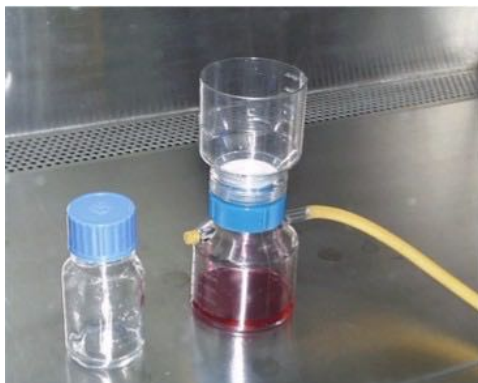


# Cell Culture



# Mikroskop

Inverted atau mikroskop cahaya sederhana



Filter Sterilisasi





# Sel Kultur Media

- Sel kultur media adalah sebuah substansi yang diperlukan oleh sel sebagai sumber energi dan mengatur regulasi atau siklus hidup dari sel (cell cycle) meliputi survival dan proliferasi
- Umumnya sel kultur media tersusun atas kombinasi antara :
  1. Asam amino
  2. Vitamin
  3. Garam inorganik dan organik
  4. Glukosa
  5. Serum

Pemilihan media yang paling tepat sangat tergantung dari jenis sel yang digunakan

## Sel Kultur Media

- Berdasarkan bagaimana pembuatannya dapat dibedakan menjadi 2 macam:

TABLE 1 Categories of animal-cell culture media

Category	Definition	Type	Example
Natural media	Consisting of natural biological substances, such as plasma, serum, and embryo extract	Coagulant or clots	Plasma separated from heparinized blood, serum, and fibrinogen
		Tissue extracts	Extracts of chicken embryos, liver, and spleen and bone marrow extract
		Biological fluids	Plasma, serum, lymph, amniotic fluid, and pleural fluid
Synthetic media	Composed of a basal medium and supplements, such as serum, growth factors, and hormones	Serum-containing media	Human, bovine, equine, or other serum is used as a supplement
		Serum-free media	Crude protein fractions, such as bovine serum albumin or $\alpha$ - or $\beta$ -globulin, are used as supplements
		Xeno-free media	Human-source components, such as human serum albumin, are used as supplements but animal components are not allowed as supplements
		Protein-free media	Undefined components, such as peptide fractions (protein hydrolysates) are used as supplements
		Chemically defined media	Undefined components, such as crude protein fractions, hydrolysates, and tissue extracts, are not appropriate as supplements, but highly purified components, such as recombinant proteins are appropriate supplements

## Sel Kultur Media

- Artificial media: media sintesis yg disiapkan dengan menambahkan berbagai macam nutrient seperti nutrients (both organic and inorganic), vitamins, salts, O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> gas phases, serum proteins, carbohydrates, cofactors.
- Terdapat berbagai macam tipe media artificial yang dibuat dengan berbagai macam tujuan antara lain:
  - 1) Mempercepat sel untuk hidup dan proliferasi
  - 2) Menjaga dan memperpanjang kemampuan survival sel
  - 3) Memacu kemampuan sel untuk adherence dan proliferasi
  - 4) Fungsi khusus seperti media spesifik untuk endothelium, neuron sel, dll.

# Media Sel Kultur yang umum digunakan

- Minimum Essential Medium (MEM)
- GMEMm (Glasgow Minimum Essential Medium)
- EMEM (Eagle's MEM)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Medium 199
- BME (Basal Medium Eagle)
- Ham's F-10 Medium
- Ham's F-12 Medium
- RPMI 1640 medium
- Leibovitz L-15 medium
- CMRL 1066
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-001)
- MCDB 131
- McCoy's 5A

Medium		
Eagle medium	Basal medium eagle (BME) 13 aa+ 8 vit	<b>Minimum essential medium (MEM)</b> eagle (1959) (konsentrasi aa dan vit 2x BME)
		<b>Dulbecco's Modified MEM (DMEM)</b> -dulbecco and freeman 1959 (High and low glucose, 4x lebih tinggi konsentrasi aa dan vit dibanding kan BME)
		<b>Alpha –MEM</b> (supplemented dng non essensial aa dan vitamin(asam ascorbat, bioton, sianocobalamin), piruvat, asam lipoic dan nukleosid
		<b>Iscove's Modified DMEM (IMDM)</b> (Iscove and Melchers 1978) Dilengkapi dng non-essential amino acids dan vitamin yg tdk ada dlm DMEM (cyanocobalamin and biotin) + selenite, pyruvate, and HEPES. Konsentrasi tinggi aa dan vit

Medium	
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) media	Berdasarkan 5A Medium (developed by McCoy et al. 1959) dan pada mulanya dibuat untuk long-term culture dari peripheral blood lymphocytes, dicirikan dengan low levels calcium dan magnesium serta high levels of phosphate.  Saat ini berbagai macam medium RPMI dibuat dengan modifikasi berdasarkan medium di tas (cth: RPMI 1629, 1630, and 1634). Digunakan utk kultur: neuron, white blood cells, lymphocytes, dan hybridomas

## Cell culture environment (*in vitro*)

### Basal Media

- Menjaga pH dan osmolarity (260-320 mOsm/L).
- Menyediakan nutrisi dan sumber energi.



### Components of Basal Media

#### Inorganic Salts

- Menjaga osmolaritas
- Regulasi membrane potential ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ )
- Ions dibutuhkan untuk cell attachment dan enzyme cofactors

#### pH Indicator – Phenol Red

- Untuk sel dapat tumbuh optimal membutuhkan pH 7.4

#### Buffers (Bicarbonate and HEPES)

- Bicarbonate buffered media membutuhkan  $\text{CO}_2$  atmosphere
- HEPES Strong chemical buffer dengan range pH 7.2 – 7.6 (tidak membutuhkan  $\text{CO}_2$ )



#### Glucose

- Sumber energi

## Cell culture environment (*in vitro*)

### Components of Basal Media

#### Keto acids (oxalacetate and pyruvate)

- Dibutuhkan untuk Glycolysis/Krebs cycle
- Keto acids merupakan sumber energi tambahan selain glukosa
- Menjaga kemampuan maksimal metabolisme sel maximum cell metabolism



#### karbohidrat atau gula

- Sumber energi
- Glucose and galactose
- Konsentrasi karbohidrat pada media adalah Low (1 g/L) and high (4.5 g/L)

#### Vitamins

- Merupakan prekursor dari co-factors
- Grup Vitamin B dibutuhkan untuk pertumbuhan sel dan proliferasi
- Vitamin yang umum ditemukan dalam basal media adalah: riboflavin, thiamine and biotin

#### Trace Elements

- Zinc, copper, selenium dan asam trikarboksilat

## Cell culture environment (*in vitro*)

### Supplements

#### L-glutamine

- Asam amino Essential (not synthesised by the cell)
- Sumber energi(citric acid cycle), digunakan dalam sintesis protein
- Tidak stabil apabila diberikan langsung dalam medium- sehingga ditambahkan sebagai suplemen



#### Non-essential amino acids (NEAA)

- Biasanya ditambahkan pada komposisi basal media
- Sumber energi, digunakan dalam sintesis protein
- Penggunaan berlebihan dapat menurunkan kemampuan metabolik dari sel



#### Growth Factors and Hormones (e.g.: insulin, VEGF, FGF)

- Menstimulasi penggunaan dan transport glukosa
- Uptake of amino acids
- Menjaga proses diferensiasi dari sel



#### Antibiotics and Antimycotics

- Penicillin, streptomycin, gentamicin, amphotericin B
- Menurunkan resiko kontaminasi bacterial dan fungi
- Resiko : Sel resisten antibiotik – perubahan fenotip
- Penggunaan dalam konsentrasi tinggi dan waktu lama sebisa mungkin dihindari

## Cell culture environment (*in vitro*)

### Foetal Calf/Bovine Serum (FCS & FBS)

- Merupakan sumber faktor pertumbuhan, adhesi, hormon, lipid, mineral bagi kultur sel
- Membantu cells attachmnet
- Mengikat dan menetralkan racun toxins
- Hati-hati Infectious agents
- Variable composition
- Mahal
- Regulasi permeabilitas dari membran sel dan juga merupakan pembawa Mikronutrien ke dalam sel



### Heat Inactivation (56°C for 30 mins) – why?

- Menghancurkan complement dan immunoglobulins
- Menghancurkan beberapa viruses

**Perhatian! Heat inactivation tidak boleh melampaui batas waktu karena dapat merusak growth factors, hormones & vitamins dan mempengaruhi pertumbuhan sel**

## Teknik Isolasi

Enzimatik = endothelial cells dari umbilical cord  
(HUVEC)

# HUVEC

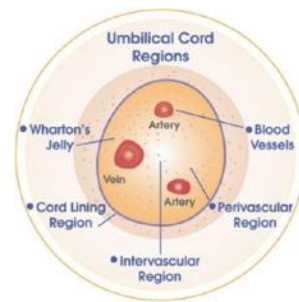
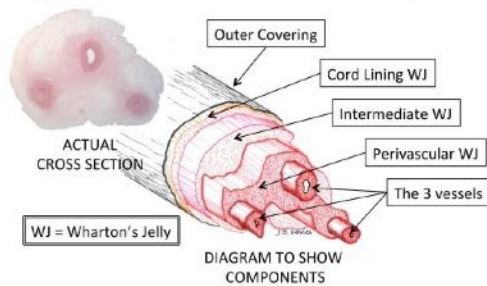
## Bahan :

umbilical 10-15 cm  
HBS buffer  
Collagenase (25 mg + 100 ml HBS buffer)  
Gelatin 0.2%  
EBM-2 (Lonza) atau medium DMEM complete

## Alat:

Cable binder /cable tie  
Spet  
Scalpel  
Homeostatic Klem  
Kasa steril

Figure 1: THE HUMAN UMBILICAL CORD

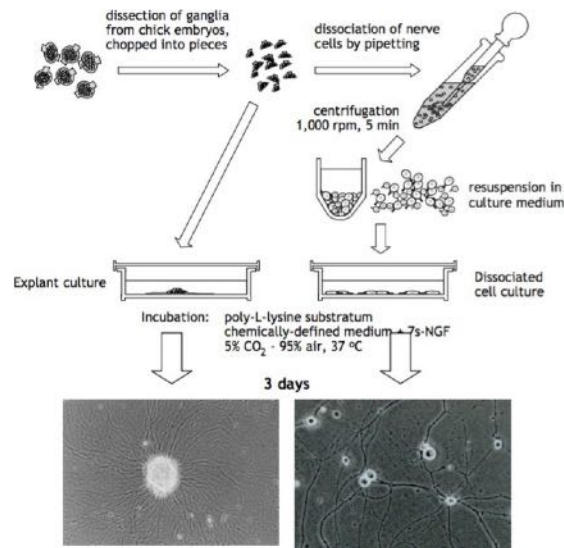


## Metode

- Umbilical dicuci dan dibersihkan cek apabila ada bagian dari umbilical yg rusak
- Ujung umbilical dibersihkan dan dirapikan
- Perhatikan posisi arteri dan vena
- Masukkan kanul dengan klem pada vena
- Cuci sebanyak 3x dengan menggunakan HBS buffer
- Masukkan 20 ml collagenase dan tutup ujung umbilical yang lain dengan homeostasis klem
- Masukkan ke dalam inkubator CO2 selama 30 menit ( ada beberapa yg diletakkan cukup di suhu ruang)
- Umbilical di message perlahan dan keluarkan isinya ke dalam falcon steril 50 ml, flushing dengan 30 ml HBS buffer
- Sentrifuge 1000-1200 rpm selama 5 hingga 7 menit
- Buang supernatan, pelet diresuspensi dengan medium 5 – 10 ml
- Masukkan ke dalam flask T-75 yang telah di coated dengan gelatin
- Simpan dalam inkubator, keesokan harinya cek sel dibawah mikroskop dan ganti medium

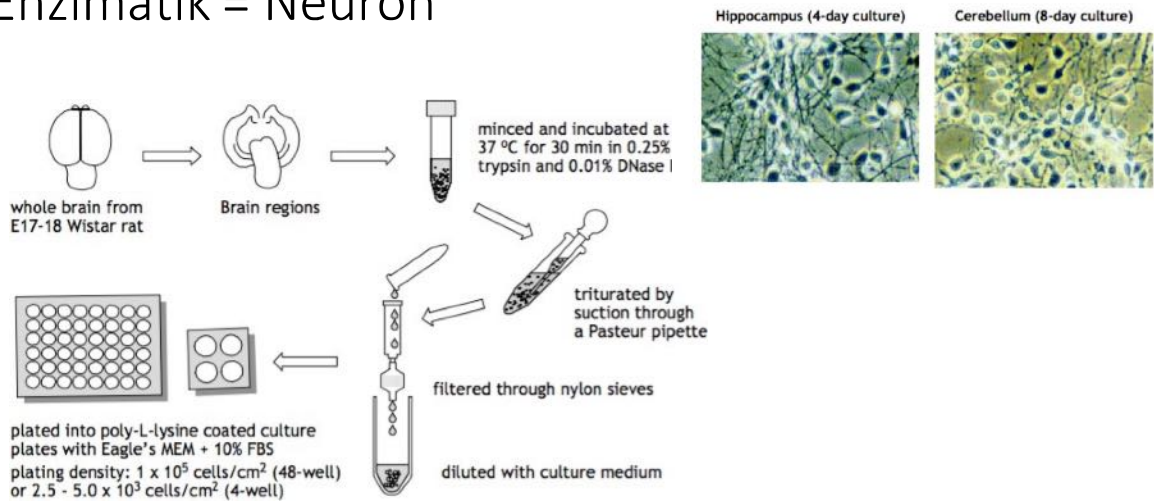


# Enzimatik = dorsal root ganglion



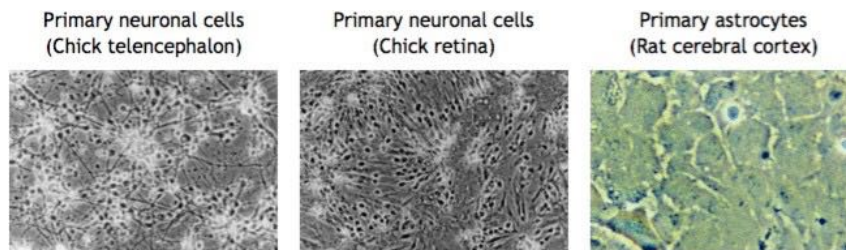
Unchern, 1999

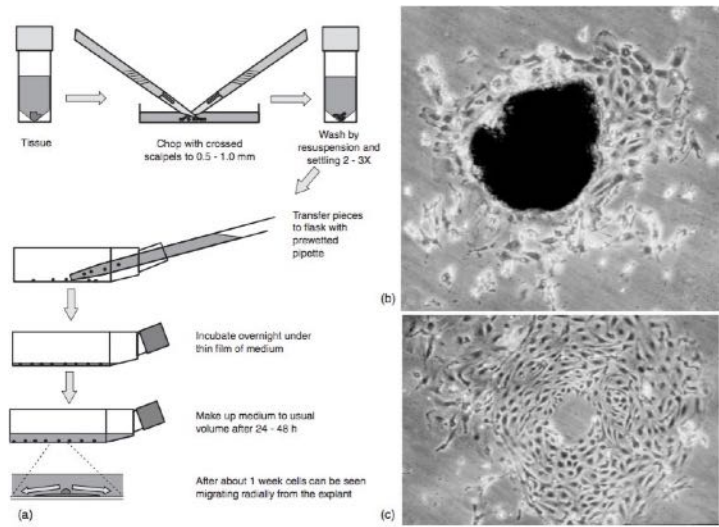
# Enzimatik = Neuron



Unchern, 1999

# Contoh sel primer

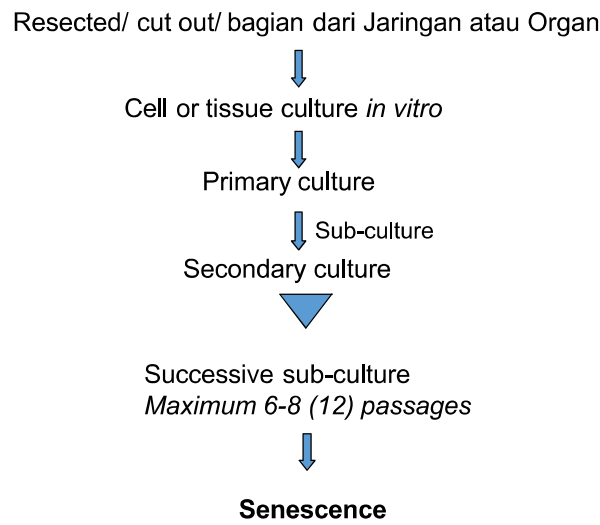




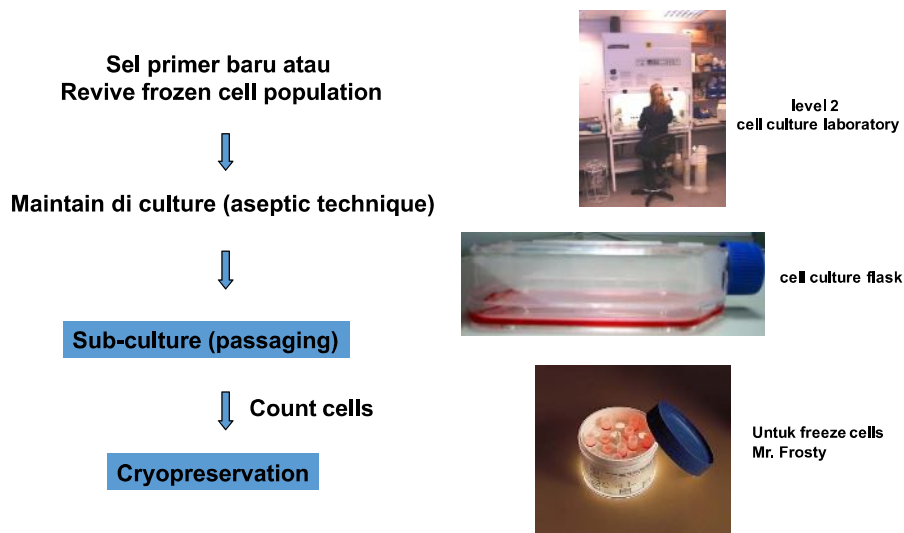
**Fig. 12.6. Primary Explant Culture.** (a) Schematic diagram of stages in dissection and seeding primary explants. (b) Primary explant culture from mouse squamous skin carcinoma; explant and early stage of outgrowth about 3 days after explantation (see also Plate 2b). (c) Outgrowth after removal of explant, about 7 days after explantation. 10x objective.

(Freshney, 2005)

### Teknik Isolasi Sel Primer



### Bagaimana Melakukan Kultur di Laboratorium



# Passaging Cells atau Sub Kultur

Check confluency of cells

↓  
Buang medium

↓  
Cuci dng PBS

↓  
Incubasi dengan  
trypsin/accutase +EDTA

↓  
Resuspensi dalam serum  
containing media

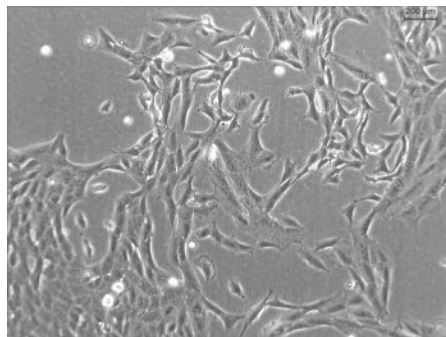
↓  
Transfer ke culture flask

## Mengapa perlu dilakukan subkultur ?

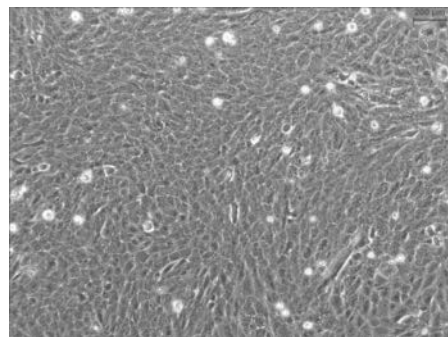
- Untuk menjaga sel di dalam kultur tidak over grow
- Untuk meningkatkan jumlah sel dalam penelitian

## Bagaimana ?

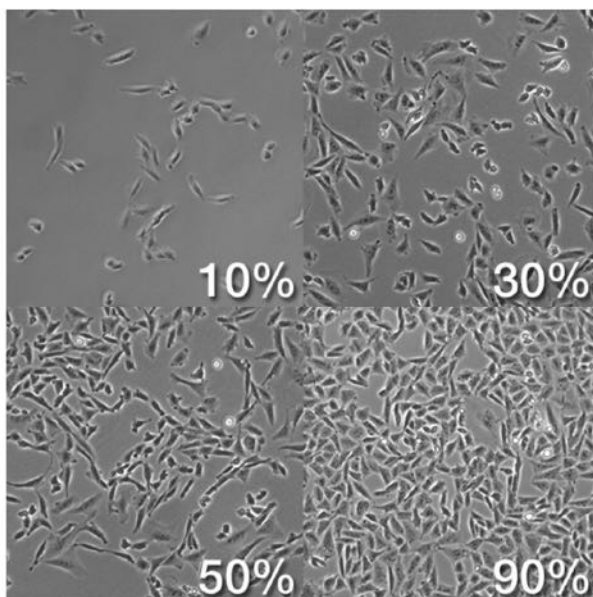
- 70-80% confluency
- Cuci dengan PBS untuk menghilangkan sel yg mati dan serum
- Trypsin atau accutase diberikan dengan tujuan memudahkan pelepasan sel dari permukaan flask (digests protein-surface interaction)
- EDTA meningkatkan aktivitas trypsin dan accutase
- Kemudian sel diresuspensi dalam media yang mengandung serum
- Pindahkan cell suspension yang telah didilusi ke dalam flask yang baru (fresh media)
- Sel akan mulai adherence setelah 3-4 jam



70-80% confluency



100% confluency



Monolayer



Fully trypsinized

# Sel Cryopreservation



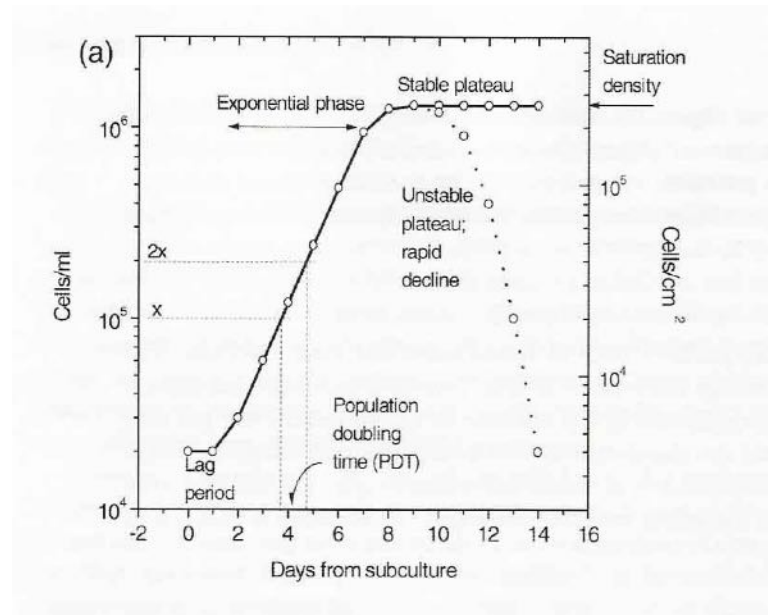
## Mengapa perlu dilakukan cryopreservasi?

- Menurunkan resiko kontaminasi
- Menurunkan resiko cross kontaminasi
- Menurunkan resiko genetic drift dan perubahan morphological
- Penggunaan sel primer pada penelitian harus selalu dijaga pada keadaan low passage.

## Bagaimana ?

- Pastikan pada subkultur >90% viability
- Digunakan Cryopreservant (DMSO) – menghindari pembentukan kristal es
- Freeze pada -80°C –slow freezing dengan menggunakan cryo box pada -80°C
- Permanen: Liquid nitrogen -196°C

## Kurva ideal pertumbuhan sel pada kultur



## Penghitungan jumlah sel

## Manual cell count (Hemocytometer)

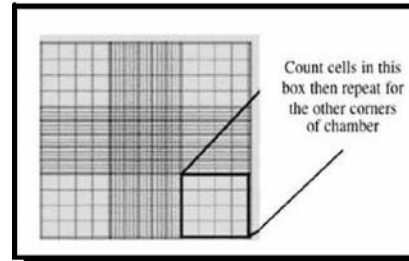


Diagram represent cell count using hemocytometer.

*cell count*

*= average of cell number*

*× dilution factor of cell suspension × 10 000*

## Prosedur Hitung Sel

1. Sebanyak 10 ul suspensi sel dicampur dengan 10 ul trypan blue homogenkan
2. Sebanyak 10 ul campuran suspensi sel dan trypan blue dimasukkan ke dalam hemocytometer melalui tepi
3. Letakkan hemocytometer di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x
4. Sel yang berada di dalam kotak dihitung (sel mati: biru; sel hidup: tdk berwarna)
5. Setelah selesai hemocytometer dan kaca penutup dibersihkan dengan alkohol 70% dan dH<sub>2</sub>O
6. Jumlah sel yang diperoleh dihitung dengan ketentuan:

Sel/ml = (rata-rata jumlah sel tiap kotak) x faktor pengencer x 10.000

Sel total = (sel/ml) x volume suspensi sel yang diambil

%sel hidup = (sel hidup/ (sel hidup+sel mati)) x100 %

## Automated cell count



Casy Ton cell counting :

Hanya membutuhkan 10 ul sel yang didilusikan  
Hingga 10 ml

Dapat menghitung 20 tipe sel primer dan line

Cepat, mudah dan data terdeskripsi dengan  
Lengkap, jumlah sel, sel yang mati dan sel yang  
Masih hidup



## Automated cell count



Countess automated Cell counter

sel dengan tripan blue diletakan pada slide

Penghitungan dilusi memungkinkan menggunakan mesin ini secara langsung

(thermofischer scientif)

## Sumber Kontaminasi Sel Kultur

### Mikroorganisme



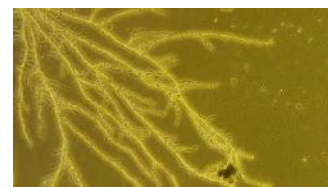
Mengapa?

1. Mikroorganisme tumbuh ~ 10-50 kali lebih cepat daripada sel mamalia, yang membutuhkan waktu ~ 8-16 jam untuk membelah diri.
2. Mikroorganisme lebih toleran terhadap variasi suhu, pH, dan suplai nutrisi daripada sel.
3. Sel-sel paling rentan terhadap kontaminasi ketika teknik aseptik jelek, dan sel terkontaminasi dapat tampak seperti sel normal
4. Mengarah pada pengembangan mikroorganisme resisten antibiotik.

## Sumber Kontaminasi Sel Kultur

Sel lebih rentan terhadap infeksi pada waktu-waktu tertentu:

1. Ketika sel mengalami stres setelah pemulihan atau thawing dari nitrogen cair
2. Sel primer sering dihasilkan oleh enzymatic disruption dan selection procedure
3. Kultur yang disiapkan dari hewan hidup sering kali disertai oleh mikro-organisme
4. Splitting sel pada pengenceran terlalu tinggi dapat memungkinkan mikroorganisme mendominasi kultur



# Kontaminasi

## 1-Chemical Contamination

Media  
Incubator  
Serum  
Air

## 2-Biological Contamination

Bacteria and yeast  
Mycoplasmas  
Cross-contamination dari kultur yang lain

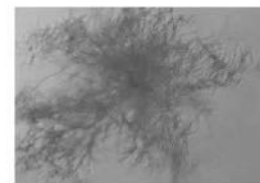
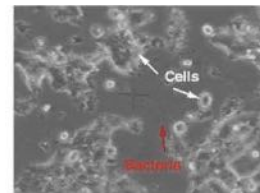
# Kontaminasi

Bakteri :

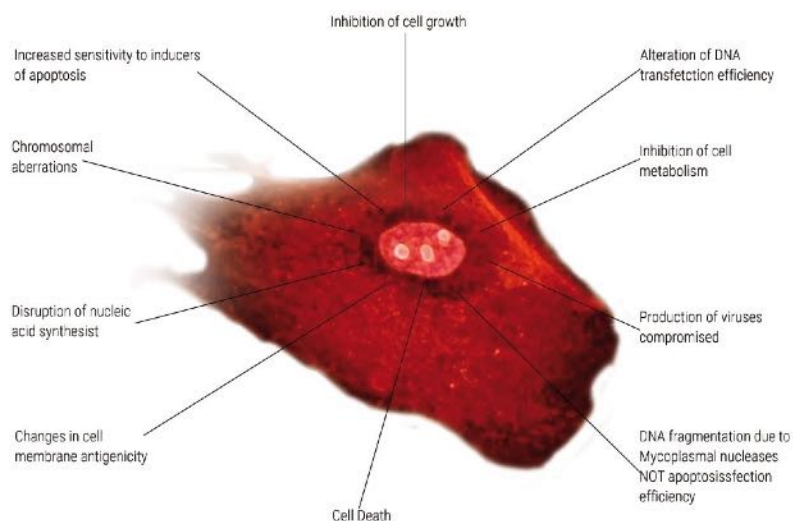
Umumnya dapat dilihat dengan mikroskop  
Terjadi perubahan warna media menjadi lebih keruh  
Tercium bau spesifik bakteri  
Sel yang tadinya adherence tampak mulai mengagup dan berbentuk bulat  
Apabila sel tetap adherence maka bakteri kontaminasi akan tampak kecil hitam membulat  
Terkadang dapat jg terlihat pergerakan dari bakteri

Fungi/ Jamur

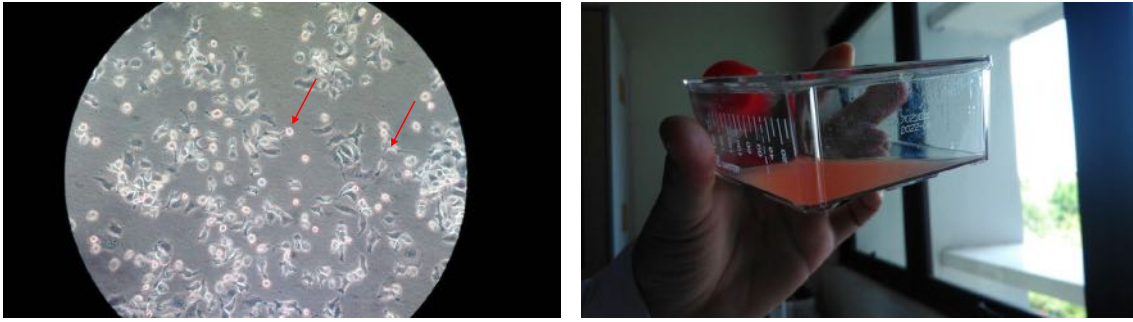
Dapat dilihat dibawah mikroskop  
Tampak seperti kapa atau filament pada kultur sel  
Terkadang ada yg berbentuk seperti jaring



22  
Apr-13



# Kontaminasi



# Kontaminasi

## Mycoplasma

Untuk mycoplasma kontaminasi tidak dapat dilihat dibawah mikroskop kecuali dengan menggunakan mikroskop Elektron baik SEM maupun TEM

Tetapi hal yang menciri ketika terjadi kontaminasi Mycoplasma adalah sel mengalami kekerdilan dibandingkan ukuran normalnya dan pertumbuhan dari sel di dalam media kultur menjadi sangat lambat dan sangat sulit untuk dapat mencapai confluent

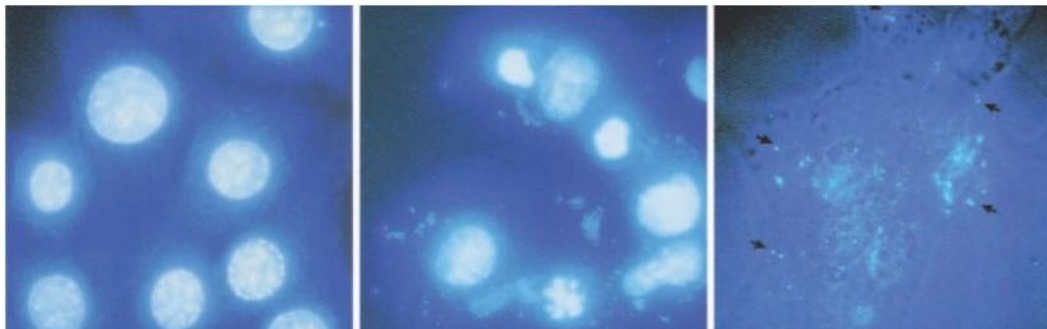
Metode tercepat:

PCR spesifik untuk mycoplasma

Metode lain:

Elisa, imunostaining, fluorescent hoechts

# Kontaminasi



Bagaimana cara mengendalikan kontaminasi pada kultur sel



## Safety in Cell Culture

### Zat Berbahaya bagi Kesehatan

1. Karsinogenik: zat yang bisa menyebabkan kanker
2. Teratogen: zat yang dapat menyebabkan kerusakan pada janin yang sedang berkembang
3. Mutagen: zat yang bisa menyebabkan mutasi pada materi genetik yang dapat ditularkan ke generasi berikutnya

Cnth:

Hygromycin: karsinogen dan teratogen ([https://www.merckmillipore.com/ID/id/product/Hygromycin-B-Streptomyces-sp.-Cell-Culture-Tested-CAS-31282-04-9-Calbiochem,EMD\\_BIO-400050?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor\\_Safety%20Information](https://www.merckmillipore.com/ID/id/product/Hygromycin-B-Streptomyces-sp.-Cell-Culture-Tested-CAS-31282-04-9-Calbiochem,EMD_BIO-400050?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor_Safety%20Information))

Streptomycin: teratogen ([https://www.merckmillipore.com/ID/id/product/msds/EMD\\_BIO-5711?Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/ID/id/product/msds/EMD_BIO-5711?Origin=PDP))

**Data Sheet/ MSDS/ CoA = Important**

# Safety

## Pembuangan limbah

1. Semua limbah yang bersentuhan dengan sel harus diautoklaf
2. Pipet, flask, wadah dan sarung tangan lainnya masuk ke kantong autoklaf di tempat sampah di samping kabinet.
3. Jangan tinggalkan cairan di dalamnya. Limbah cair dimasukkan ke dalam botol diautoklaf. Botol-botol ini mengandung desinfektan berbasis Klorin
4. Jangan memenuhi sampai terlalu penuh wadah limbah karena hal ini menyebabkan masalah dalam autoklaf
5. Sampah kertas seperti pembungkus pipet dan flask harus masuk ke dalam kantong sampah tersendiri

# Safety

## Penggunaan area Kultur Sel

1. Area kultur sel, seperti laboratorium lainnya adalah area kerja
2. Jangan makan, minum atau merokok di area ini
3. Jangan gunakan ponsel
4. Kenakan jas lab setiap saat baik di area kultur sel atau di laboratorium
5. Pakailah sarung tangan sekali pakai, dan pastikan Anda membuangnya dengan cara yang benar sebelum Anda meninggalkan area sel kultur
6. Jangan memakai sarung tangan sekali pakai di koridor atau area penulisan

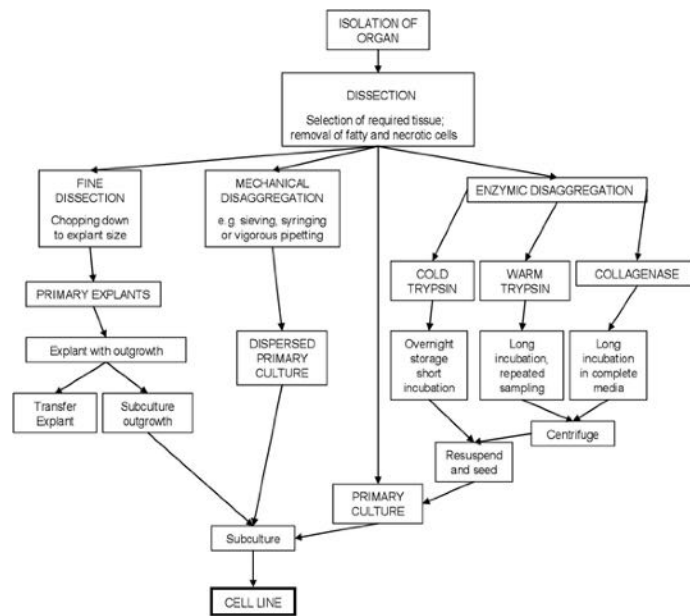
# Equipment

## BSC Class II

1. Kabinet ini dirancang untuk memberikan perlindungan operator serta lingkungan yang steril
2. Udara diarahkan ke bawah dari atas kabinet ke bawah,
3. ketika bekerja di kabinet ini, penting untuk tidak memasukkan benda-benda non-steril di atas yang steril. Karena udara juga masuk dari bagian depan kabinet, area ini tidak steril
4. Sebagian besar pekerjaan dengan sel asal human atau Primate harus dilakukan dalam BSC Class II



## Ringkasan



## Terimakasih

- Beginning to the laboratory
- <https://www.youtube.com/watch?v=x7HVw1Va4qs>
- Aseptic Teknik di sel kultur
- [https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV\\_LuqJk](https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV_LuqJk)
- Freezing cells
- <https://www.youtube.com/watch?v=tCNtKrxlZPs>

- Make huvec
  - <https://www.youtube.com/watch?v=XQtMYHE54K4>
- 
- Subculturing
  - [https://www.youtube.com/watch?v=7d\\_kDu-P964](https://www.youtube.com/watch?v=7d_kDu-P964)