



**MODUL PRAKTIKUM MATA KULIAH
STEM CELL (IBP 651)**

Disusun Oleh

Dr. Titta Novianti, M.Biomed

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
2025**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga buku Modul Praktikum Fermentasi ini dapat hadir dihadapan pembaca. Modul ini disusun sebagai salah satu pedoman pelaksanaan praktikum yang berisi teori dan konsep disertai dengan langkah-langkah percobaan dari suatu materi praktikum.

Modul ini diharapkan praktis dan representatif untuk pedoman belajar dan praktikum fermentasi. Perbaikan secara terus menerus dilakukan demi kesempurnaan modul ini untuk penyesuaian dengan silabus mata kuliah Teknologi Fermentasi.

Semoga modul ini dapat memberikan manfaat bagi mahasiswa, khususnya mahasiswa Bioteknologi, Universitas Esa Unggul.

Jakarta, 2022

Penyusun

Dr. Titta Novianti, M.Biomed

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI.....	iii
TATA TERTIB PRAKTIKUM.....	iv
Bab 1. Pengenalan alat dan bahan praktikum.....	1
Bab 2 Isolasi sel mesenkimal dari darah manusia	4
Bab 3 Thawing cell dan Passage	8
Bab 4 penghitungan cell dan viabilitas sel	11
Bab 5 Stimulasi proliferasi dan diferensiasi sel	14
Bab 6 Evaluasi	17

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Mahasiswa yang boleh mengikuti praktikum fermentasi adalah mahasiswa yang telah mengambil atau sedang menempuh mata kuliah Stem Cell serta telah mengisi rencana studi untuk mata kuliah praktikum Stem Cell
2. Setiap peserta harus hadir tepat waktu pada waktu yang telah ditentukan. Apabila peserta terlambat lebih dari 15 menit dari waktu yang ditentukan, maka tidak diperkenankan mengikuti praktikum
3. Selama mengikuti praktikum, peserta harus memakai jas praktikum serta diwajibkan memakai sepatu tertutup (dilarang mengenakan sandal atau sepatu sandal)
4. Setiap peserta wajib membuat laporan akhir praktikum yang dibuat sesuai dengan format yang sudah ditentukan dengan melampirkan data hasil praktikum. Pengumpulan laporan resmi praktikum maksimal 1 minggu setelah kegiatan praktikum yang bersangkutan
5. Setiap peserta harus memeriksa alat praktikum sebelum dan sesudah praktikum kemudian mengembalikan alat yang telah dipakai dalam keadaan bersih dan kering. Botol bahan kimia yang telah selesai digunakan harus ditutup rapat dan dikembalikan ketempat semula
6. Peserta praktikum yang memecahkan alat kaca atau tanpa sengaja merusak peralatan di laboratorium wajib untuk mengganti
7. Peserta praktikum dilarang membawa makanan/minuman ke dalam laboratorium
8. Setiap peserta harus menjaga kebersihan laboratorium, bekerja dengan tertib, tenang dan teratur. Selama praktikum, peserta harus bersikap sopan
9. Setiap peserta harus melaksanakan semua mata praktikum dan mematuhi budaya Kesehatan dan Keselamatan Kerja (K3), seperti memakai Alat Pelindung Diri (jas praktikum, sepatu, sarung tangan, masker, gogle) dan membuang limbah praktikum sesuai dengan kategorinya pada wadah tertentu yang sudah disediakan
10. Apabila peserta praktikum melanggar hal yang telah diatur pada butir di atas, maka peserta akan dikenakan sanksi berupa teguran lisan sebanyak dua kali. Jika masih melanggar maka yang bersangkutan akan dikeluarkan Dari laboratorium dan tidak diperkenankan melanjutkan praktikum pada hari itu
11. Hal yang belum disebutkan diatas dan diperlukan untuk kelancaran praktikum akan diatur kemudian

Jakarta, Agustus 2022

Penyusun

BAB 1

PENGENALAN ALAT DAN BAHAN LABORATORIUM STEM CELL

A. Pengantar

Praktikum Stem cell merupakan salah satu kompetensi yang wajib dimiliki oleh para mahasiswa Program Studi Bioteknologi. Laboratorium Stem Cell wajib memiliki peralatan yang lengkap yang akan berperan menumbuhkan sel, memindahkan sel, membuat medium sel secara steril, menghitung jumlah dan viabilitas sel, serta penyimpanan sel untuk menjadi dorman.

Penelitian stem cell berkembang sangat pesat dan sangat dibutuhkan di dunia kedokteran untuk terapi berbagai penyakit degeneratif atau penyakit infeksius agar jaringan suatu organ yang rusak atau berkurang fungsinya dapat diperbaharui kembali oleh stem cell. Oleh karena itu beberapa perusahaan di bidang farmasi dan vaksin membutuhkan lulusan Program studi Bioteknologi yang terampil di bidang stem cell.

Bidang stem cell menjadi trend dalam bidang kedokteran dan kompetensi di bidang ini sangat dibutuhkan. Oleh karena itu lulusan Program Studi Bioteknologi diwajibkan memiliki kompetensi dibidang stem cell, Sebelum melakukan praktikum Mata Kuliah, mahasiswa wajib mengenal beberapa peralatan serta bahan yang akan digunakan dalam praktikum stem cell. Pada pertemuan pertama Praktikum Stem Cell ini membahas pengenalan alat dan bahan yang digunakan di laboratorium Stem Cell.



Gambar 1. Biosafety Cabinet (BSC) Kelas II



Gambar 2. Mikroskop inverted



Gambar 3. Inkubator CO2



Gambar 4. Mr Frosty



Gambar 5. Freezer -80°C



Gambar 6. Shaking Inkubator

B. Kompetensi dasar Yang dibutuhkan

Mahasiswa mampu menjelaskan dan menganalisis berbagai alat dan bahan yang akan digunakan dalam praktikum Stem Cell serta memahami fungsi dan perannya masing-masing di laboratorium Stem Cell.

C. Kompetensi akhir yang diharapkan

Mahasiswa mampu memahami cara kerja dan mampu mengoperasikan berbagai alat dan bahan yang akan digunakan di laboratorium Stem Cell sehingga praktikum dapat berjalan dengan lancar.

D. Alat dan Bahan beserta Fungsinya

Alat

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| 1. Biosafety Cabinet II | 2. Mikroskop |
| 3. Sentrifuse | 4. Spektrofotometer |
| 5. Incubator CO2 | 6. Autoclave |
| 7. Mikropipet | 8. Shacking incubator |
| 9. Freezer -80 | 10. pH meter |
| 11. Mr. Frosty | |

E. Cara Kerja

Perhatikan dan analisis setiap fungsi alat laboratorium di laboratorium stem cell dan bagaimana cara kerjanya.

F. Tugas

Buat laporan cara kerja dari setiap alat yang terdapat di laboratorium stem cell

BAB 2

ISOLASI SEL MESENKIMAL DARI DARAH TEPI MANUSIA

A. Pengantar

Sel punca (stem cells/SCs) dapat berproliferasi dan menghasilkan sel-sel dengan karakteristik yang sama dengan dirinya, serta dapat berdiferensiasi menjadi sel dengan bentuk dan fungsi yang lebih spesifik. Dikenal dua golongan sel punca, yaitu sel punca embrionik dan sel punca dewasa. Sel punca embrionik berasal dari embrio stadium blastosis, sedangkan sel punca dewasa seperti sel punca hematopoetik berasal dari jaringan yang mengalami maturasi seperti sumsum tulang, darah perifer, dan darah tali pusat (DTP).

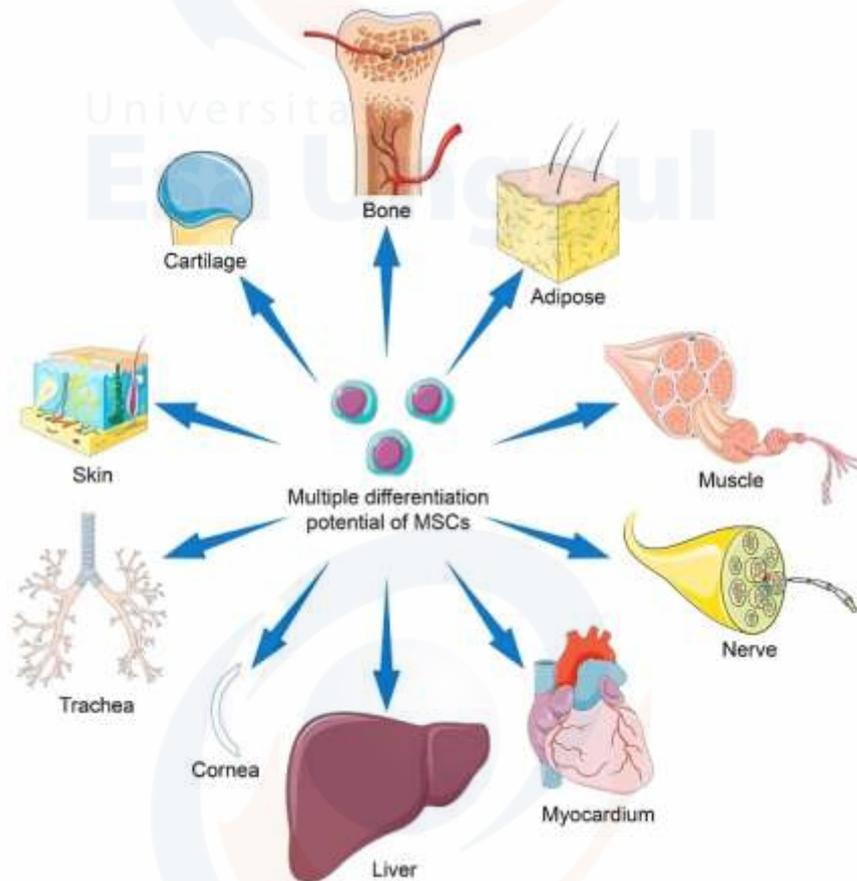
Sel punca memiliki tiga ciri utama, yaitu: (1) berada dalam keadaan yang primitif, (2) mampu berproliferasi dan menghasilkan sel dengan karakteristik yang sama dengan sel induknya (self renewal), dan (3) mampu berdiferensiasi menjadi sel dengan bentuk dan fungsi yang lebih spesifik. Walaupun memiliki potensi diferensiasi dan proliferasi yang lebih dibandingkan sel punca dewasa, sel punca embrionik terus menghadapi hambatan, terutama masalah etik.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) merupakan stem sel dewasa yang memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel jaringan ikat sehingga menjadikan sel tersebut sebagai kandidat sumber sel dalam pengobatan regenerasi jaringan (Kaiin & Djuwita 2016). Penggunaan MPC dari darah perifer memiliki keuntungan yaitu prosedurnya kurang invasif dibandingkan dengan aspirasi sumsum tulang (Maurice et al. 2007). CD271+ merupakan salah satu marker untuk sel progenitor dari MSC. CD271+ terdapat pada mioblas dan jaringan asal mesenkim yang sedang berkembang (Kuçi 2011).

Hambatan tersebut diatasi dengan ditemukannya sumber sel punca dewasa oleh Broxmeyer dkk.4 yang menunjukkan sel darah tepi kaya akan sel punca dewasa. Tahap penyimpanan sel darah tepi merupakan langkah penting yang menentukan kualitas dan jumlah sel punca untuk digunakan di kemudian hari. Terkait dengan hal tadi, efektivitas protokol simpan beku dipengaruhi oleh beberapa faktor utama, seperti laju pendinginan (freezing), laju penghangatan (thawing), jenis komposisi krioprotektan, serta suhu penambahan atau pembuangan krioprotektan.

Faktor-faktor tersebut perlu disesuaikan dengan sifat dan karakteristik setiap spesimen biologis yang akan disimpan beku. Darah tali pusat mengandung banyak sel muda, termasuk di dalamnya sel eritrosit berinti. Hal ini mengakibatkan potensi terjadinya kontaminasi pada hasil isolasi mononuclear cells (MNCs) DTP dibandingkan dengan mengisolasi MNCs dari darah tepi orang dewasa. Bila mengikuti protokol yang ada, akan didapatkan banyak sekali sel eritrosit muda yang mengontaminasi MNCs DTP.9 Dalam rangka mengoptimalkan teknik isolasi, kami memodifikasi metode isolasi serta menguji

keberhasilan vitrifikasi pada MNCs DTP, jenis protokol uji lainnya, seperti colony forming unit-culture (CFU-C), uji fungsi, dan karakteristik dilakukan pada percobaan ini.



Gambar 7. Kemampuan multipoten sel mesenkimal

B. Kompetensi Dasar

Mahasiswa diharapkan memiliki kemampuan dasar dalam pemahaman dan kompetensi secara komprehensif mengenai teknik isolasi sel mesenkim dari sampel darah.

C. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan mampu :

1. Melakukan teknik isolasi sel mesenkim dari sel darah serta jaringan lainnya
2. Melakukan pengamatan sel mesenkim hasil isolasi

D. Alat dan Bahan

- | | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 1. Biosafety Cabinet II | 2. Mikroskop inverted |
| 3. Sentrifuse | 4. Mikropipet |
| 5. Shacking incubator | 6. Autoclave |
| 7. pH meter | 8. Jarum suntik |
| 9. Tube 15 ml | 10. Media kultur |
| 11. Incubator CO ₂ | 12. Informed concern |
| 13. Sel darah tepi | 13. tabung antikoagulan EDTA 15 ml |

E. Cara kerja

1. Siapkan informed concern untuk donor darah
2. Tenaga kesehatan mengambil 10 cc darah dari pembuluh darah tepi pendonor
3. Simpan darah dalam tabung dalam tabung yang berisi antikoagulan EDTA dan simpan di dalam refrigerator 4°C
4. Keluarkan sampel darah jika akan dikultur
5. Sampel darah tepi sebanyak 10 mL dalam tabung antikoagulan EDTA, disentrifugasi pada kecepatan 700 x g selama 15 menit.
6. Plasma dikoleksi, kemudian lapisan *buffy* yang mengandung sel berinti diambil.
7. Kemudian diresuspensi menggunakan 10 mL PBS steril, lalu ditambahkan pada larutan Ficoll dengan metode *overlayer*.
8. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 1100 x g selama 30 menit.
9. Lapisan cincin putih yang mengandung sel-sel berinti tunggal diambil dan dipindahkan ke tabung baru, serta ditambahkan media tanpa serum, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 700X g selama 10 menit.
10. Supernatan dibuang, dan ke dalam pelet sel ditambahkan media tanpa serum.
11. Tabung kembali disentrifugasi dengan kecepatan 700X g selama 10 menit.
12. Supernatan dibuang kembali. Pelet sel ditambahkan 5 mL media tanpa serum, kemudian jumlah sel dihitung menggunakan hemasitometer.
13. Sel ditumbuhkan pada pelat kultur jaringan 6 sumur dengan konsentrasi 10^7 sel per sumur dalam media kultur endotelial (LonzaTM).
14. Sel diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C dan konsentrasi CO₂ 5% selama 24 jam dan amati.

F. Tugas

Buat laporan dari mulai latar belakang, alat dan bahan, cara kerja dan hasil pengamatan, serta pembahasan dan daftar pustaka

BAB 3. THAWING CELL

A. Pendahuluan

Pencairan sel punca mengacu pada proses pengembalian sel punca beku (biasanya dikriopreservasi dalam nitrogen cair pada suhu -196°C) ke kondisi yang layak untuk penggunaan klinis atau penelitian secara aman dan efektif. Proses ini sangat penting untuk mempertahankan viabilitas dan fungsi sel. Thawing adalah proses pencairan atau pemanasan kembali sel-sel yang telah dibekukan (cryopreserved) agar dapat digunakan kembali dalam penelitian atau terapi. Proses ini sangat penting karena bertujuan menjaga viabilitas (daya hidup) dan fungsi biologis sel setelah dibekukan dalam suhu ekstrem (biasanya -196°C di dalam nitrogen cair).

Tujuan Thawing

- Mengembalikan sel ke kondisi aktif dari keadaan beku.
- Menghindari kerusakan akibat kristal es yang terbentuk saat pencairan lambat.
- Menjaga kemampuan diferensiasi dan regenerasi sel, terutama untuk sel punca.

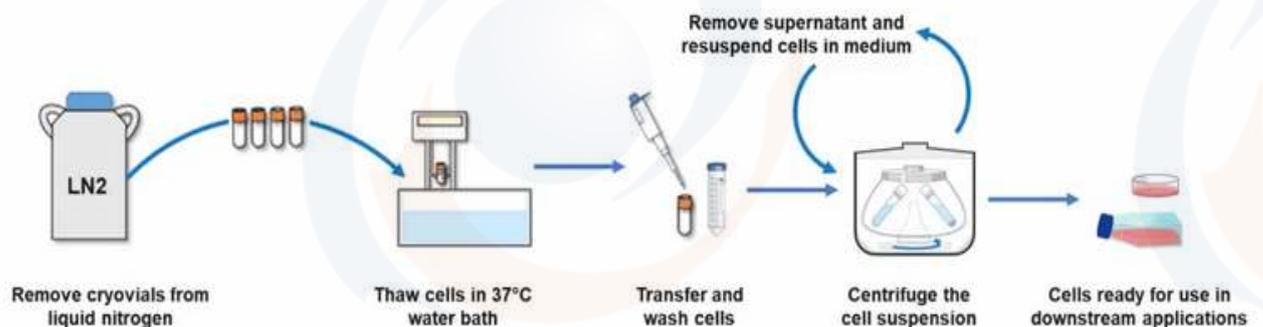
Prosedur Umum Thawing Sel

1. Persiapan Alat dan Bahan:
 - Air bath suhu 37°C .
 - Media kultur sel hangat.
 - Tabung sentrifugasi steril, pipet, dan alat pelindung diri.
2. Proses Pencairan:
 - Keluarkan vial sel dari tangki nitrogen cair.
 - Masukkan vial tertutup ke dalam water bath 37°C selama 1–2 menit.
 - Goyangkan perlahan sampai es mencair seluruhnya.
3. Pengenceran DMSO:
 - DMSO (dimetil sulfoksida) adalah zat pelindung saat pembekuan, tapi bersifat toksik setelah thawing.
 - Segera pindahkan isi vial ke tabung berisi media kultur hangat untuk mengencerkan DMSO.
 - Lakukan sentrifugasi (biasanya 300–400g selama 5–10 menit).
4. Pembuangan Supernatan & Resuspensi:
 - Buang supernatan (bagian atas), lalu resuspensi sel dalam media segar.
5. Evaluasi Viabilitas Sel:
 - Gunakan pewarna seperti Trypan Blue untuk mengecek apakah sel hidup atau mati.

- o Viabilitas yang baik biasanya >80%.

Hal-Hal yang Harus Diperhatikan

Aspek	Penjelasan
Pembekuan Lambat, Pencairan Cepat	Untuk menghindari pembentukan kristal es besar yang bisa merusak membran sel.
DMSO	Harus segera diencerkan/dihilangkan setelah thawing karena bisa merusak sel.
Sterilitas	Pastikan lingkungan dan alat kerja steril untuk mencegah kontaminasi.
Suhu	Hindari perubahan suhu drastis setelah thawing. Gunakan media hangat.



Gambar 8. Thawing stem cells

B. Kemampuan Dasar

Mahasiswa mampu melakukan thawing dengan baik sesuai dengan tata cara standar laboratorium stem cell

C. Kemampuan Akhir

Mampu menganalisis proses thawing cell dan menganalisis segala sesuatu yang terjadi yang akan menghambat proses thawing sehingga sel dapat digunakan untuk proses selanjutnya

D. Alat dan Bahan

1. Biosafety Cabinet II
2. Conical tube
3. Nitrogen cair
4. Mikropipet

- | | |
|-----------------------|---------------------|
| 5. Shacking incubator | 6. Autoclave |
| 7. pH meter | 8. medium basal MSC |
| 9. Incubator CO2 | 10. Media kultur |
| 11. FGF-2 stok | 12. EGF |
| 13. heparin | 13, accutase |

E. Cara Kerja

1. Pastikan seluruh peralatan dan media sudah disiapkan sebelum *thawing* dilakukan.
2. Sel stem cell dalam hal ini sel mresenkimal darah tepi manusia yang dikeluarkan dari nitrogen cair dan inkubasi dalam *waterbath* 37°C.
3. Segera setelah *thawing* MSC human, desinfeksi bagian luar *vial* dengan etanol 70%. Dalam *Biosafety Cabinet* (BSC) menggunakan mikropipet 1 atau 2 mL digunakan untuk memindahkan sel ke *conical tube* 15 mL steril.
4. Sebanyak 9 mL *mesenkimal Basal Medium* yang telah dihangatkan sebelumnya pada suhu 37°C secara perlahan ditambahkan ke dalam tabung 15 mL.
5. Mesenkimal stem cell (MSC) disuspensi dengan cara memipet perlahan sebanyak dua kali.
6. Sentrifugasi tabung berisi suspensi MSC pada 300 xg selama 2-3 menit kemudian supernatan dibuang untuk mendapatkan endapan sel.
7. Langkah tersebut diperlukan untuk menghilangkan sisa *cryopreservative* (DMSO).
8. Sel diresuspensi dalam volume total 10 mL MSC *Basal Medium* dengan menambahkan *growth factor*.
9. *Growth factor* ditambahkan ke dalam 10 mL MSC Basal Medium sebanyak masing-masing 2 µL FGF-2 stok (100 µg/mL) 2 µL FGF stok (100 µg/mL), 2 µL EGF stok (100 g/mL) dan 2 µL heparin stok (10mg/mL).
10. Suspensi sel dipipet di atas *culture* T75 dilapisi poli-L-ornitin dan laminin. Sel diinkubasi pada suhu 37°C dalam CO₂ inkubator dengan kelembapan 5%.
11. Hari berikutnya, media *MSC Basal* diganti dengan medium baru (sebelumnya dihangatkan di suhu 37°C) yang mengandung *growth factor* baru.
12. Media segar yang mengandung *growth factor* diganti setiap hari sesudahnya. Ketika kepadatan sel mencapai sekitar 80% konfluen, MSC dapat dipisahkan dengan larutan Accutase untuk *passage* atau *freezing*.

F. TUGAS

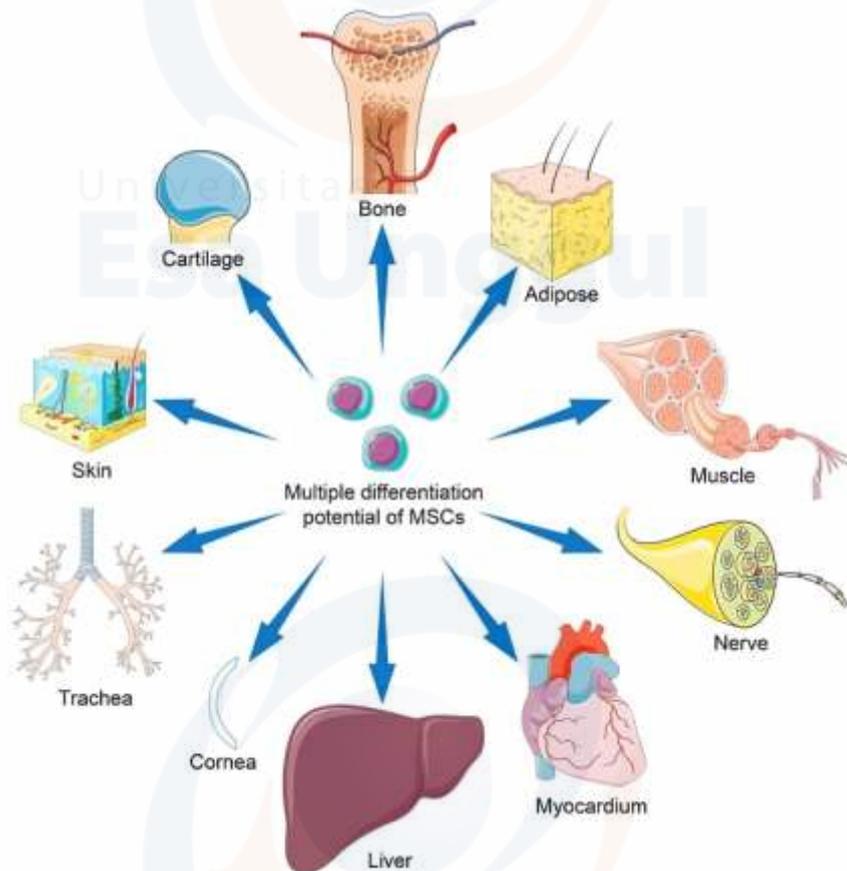
Buat laporan dari mulai latar belakang, alat dan bahan, cara kerja dan hasil pengamatan, serta pembahasan dan daftar pustaka

BAB 4. KULTUR SEL

A. Pendahuluan

Kultur sel adalah teknik pemindahan sel ke lingkungan buatan yang kondusif untuk kelangsungan hidup atau pertumbuhan sel tersebut. Penggunaan serum pada medium kultur penting untuk pertumbuhan sel. Namun, penggunaan serum dapat memicu mekanisme diferensiasi spontan sehingga mempengaruhi identitas suatu sel. Pada penelitian (Kaiin & Djuwita 2016), hingga kultur dipasase tiga kali, sel menjadi lebih stabil dan kemampuan berproliferasinya lebih cepat. Namun, pada pasase ke-4 menunjukkan nilai yang menurun. Belum diketahui apa yang menyebabkan menurunnya homogenitas dan kemampuan proliferasi dari sel tersebut.

Sel Punca Mesenkim (SPM) atau Mesenchymal Stem cell (MSC) termasuk sel punca dewasa yang dapat diisolasi dari jaringan dewasa maupun jaringan fetus. Dari jaringan dewasa, SPM dapat diisolasi dari sumsum tulang, gigi, darah perifer, dan jaringan lemak, sedangkan dari jaringan fetus, SPM dapat diisolasi dari membran amnion, plasenta, darah tali pusat dan WJ tali pusat. Bila dikultur, morfologi SPM mirip seperti fibroblast (fibroblast like cell).



Gambar 9. Proliferasi Mesenkimial Stem cell menjadi berbagai jaringan dan organ

B. Kemampuan Dasar Yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan memiliki kemampuan dasar dalam pemahaman dan kompetensi secara komprehensif mengenai teknik isolasi sel mesenkim dari sampel darah.

C. Kemampuan Akhir

Mahasiswa diharapkan mampu:

1. Melakukan kultur sel mesenkim
2. Melakukan pengamatan dan menghitung jumlah sel
3. Melakukan analisis persentase confluence sel kultur

D. Alat dan Bahan

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 1. Biosafety Cabinet II | 2. Mikroskop inverted |
| 3. Sentrifuse | 4. Mikropipet dan tips |
| 5. Tripsin | 6. Autoclave |
| 7. pH meter | 8. Jarum suntik |
| 9. Tube 15 ml | 10. Media kultur |
| 11. Incubator CO ₂ | 12. Informed concern |
| 13. Sel darah tepi | 14. tabung antikoagulan EDTA 15 ml |
| 15. Pipet gun | 16. Water bath |
| 17. Hemositometer | 18. T25 flask |
| 19. Syringe | 20. Medium RBM MDC |
| 21. Penisilin –streptomycin 1 % | 22. DMEM |
| 23. FBS 10 % dan 20% | 24. Trypan bkue |

E. Cara Kerja

1. Subkultur sel dilakukan setelah kultur mencapai 80% konfluensi.
2. Media dibuang dan sel dicuci dengan 2 mL PBS. Ke dalam setiap sumur ditambahkan 1 mL tripsin 0,25% untuk melepaskan sel dari sumur.
3. Pelat kultur diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C dan konsentrasi CO₂ 5% hingga sel lepas.
4. Ditambahkan 1 mL media pertumbuhan untuk menginaktivasi tripsin.
5. Sel diresuspensi dan dipindahkan seluruhnya ke dalam tabung sentrifuse 15 mL.
6. Suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 700x g selama 10 menit.
7. Supernatan dibuang lalu pelet sel diresuspensi menggunakan media pertumbuhan. Sel dihitung dengan hemasitometer.
8. Sel ditumbuhkan kembali dengan konsentrasi 10⁶ sel per sumur,

F. Tugas

Buat laporan dari mulai latar belakang, tujuan praktikum, cara kerja, hasil pengamatan dan pembahasan

BAB 5. PASASE KULTUR SEL

A. Pendahuluan

Passase sel adalah proses memindahkan sel dari wadah kultur lama ke wadah baru (biasanya dengan pemindahan sebagian sel) untuk Mencegah kepadatan berlebih, (overconfluency), Menjaga viabilitas dan pertumbuhan sel, dan Mempertahankan karakteristik sel (morfologi, fungsi). Biasanya dilakukan saat sel mencapai 80–90% confluent (permukaan media kultur hampir tertutup seluruhnya oleh sel).

Tujuan Passase yaitu Mendukung pertumbuhan optimal sel dengan menyediakan ruang baru., Memperpanjang umur kultur sel (sel bisa dikultur selama beberapa passase), Mencegah difrensiasi atau kematian sel karena stres lingkungan akibat terlalu padat.

Prosedur Umum Passase Sel Adheren (menempel di permukaan)

1. Persiapan

Media kultur baru (hangat, steril), Larutan PBS (tanpa Ca^{2+} dan Mg^{2+}), Trypsin-EDTA (untuk melepaskan sel dari permukaan), serta Tabung sentrifugasi, mikropipet, inkubator CO_2

2. Pencucian

Buang media lama dari flask/kultur dan Tambahkan PBS untuk mencuci sisa serum yang bisa menghambat kerja tripsin.

3. Penambahan Tripsin

Tambahkan larutan tripsin-EDTA secukupnya (biasanya 0,25%), Inkubasi 1–5 menit di inkubator 37°C sampai sel terlepas (bisa diamati dengan mikroskop).

4. Inaktivasi Tripsin

Tambahkan media kultur (yang mengandung serum/FBS) untuk menghentikan kerja tripsin.

5. Pemisahan dan Pemindahan

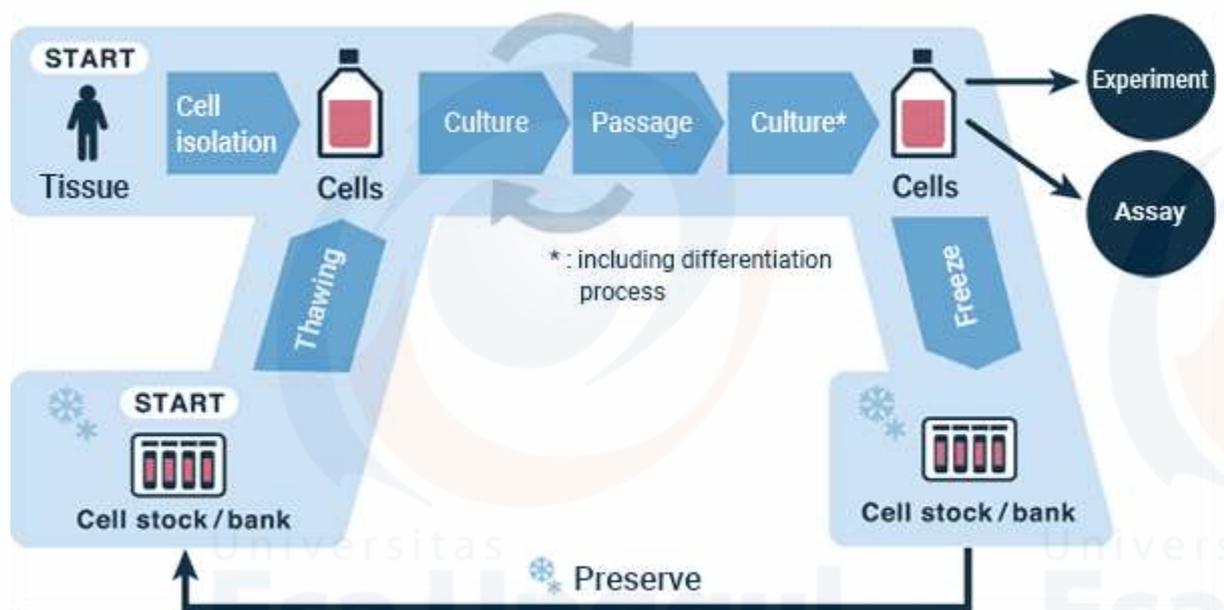
Kumpulkan suspensi sel ke dalam tabung, Sentrifugasi (biasanya 300g selama 5 menit), Buang supernatan, resuspensi pellet sel dengan media segar.

6. Subkultur

Hitung sel (opsional) menggunakan hemocytometer, dan Pindahkan sel ke flask baru dengan rasio tertentu (misalnya 1:3 atau 1:5).

Catatan Penting

Aspek	Penjelasan
Jumlah Passase	Dicatat sebagai P1, P2, dst. Semakin tinggi, sel bisa mengalami perubahan karakter.
Sel Primer vs Sel Imortal	Sel primer biasanya memiliki batas passase (senescence), sedangkan sel imortal (seperti HeLa) bisa bertahan lebih lama.
Sterilitas	Wajib menjaga teknik aseptik untuk menghindari kontaminasi.
Indikasi Sel Siap Passase	Sel mencapai 80–90% confluency dan mulai tampak berhimpitan/memadat.



Gambar 10. Tahapan Pasase Stem Cell

B. Kemampuan Dasar Yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan memiliki kemampuan dasar dalam pemahaman dan kompetensi secara komprehensif mengenai teknik pasase sel mesenkim dari hasil thawing sel.

C. Kemampuan Akhir

Mahasiswa diharapkan mampu:

1. Melakukan kultur sel mesenkim
2. Melakukan pengamatan dan menghitung jumlah sel
3. Melakukan analisis persentase confluence sel kultur

D. Alat dan Bahan

1. Biosafety Cabinet II
2. Mikroskop inverted
3. Sentrifuse
4. Mikropipet dan tips
5. Tripsin
6. Autoclave
7. pH meter
8. Jarum suntik
9. Tube 15 ml
10. Media kultur
11. Incubator CO2
12. Informed concern
13. Sel darah tepi
14. tabung antikoagulan EDTA 15 ml
15. Pipet gun
16. Water bath
25. Hemositometer
26. T25 flask
27. Syringe
28. Medium RBM MDC
29. Penisilin –streptomycin 1 %
30. DMEM
31. FBS 10 % dan 20%
32. Trypan buke

E. Cara Kerja

1. Untuk melakukan *passaging*, media dikeluarkan dengan hati-hati dari *flask* T75 berlapis poli-L-ornitin dan laminin yang mengandung MSC.
2. Sebanyak 3 mL larutan Accutase ditambahkan dan inkubasi dalam inkubator 37°C selama 3 menit.
3. Sebanyak 5 mL MSC *Basal Medium* yang sebelumnya telah dihangatkan di suhu 37°C ditambahkan kedalam T75.
4. Sel yang telah terdisosiasi dipindahkan ke dalam *conical tube* 15 mL.
5. Tabung berisi suspensi sel disentrifugasi pada 300 xg selama 2-3 menit kemudian supernatan dibuang untuk mendapatkan *pellet* ke dalam *conical tube* tersebut dimasukkan 2 mL
6. MSC *Basal Medium* yang mengandung *growth factor* yang sesuai dan *pellet* sel disuspensikan kembali secara menyeluruh.
7. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan hemositometer. Sel dengan kepadatan yang diinginkan dimasukkan kedalam plate atau flask berlapis poli-L-ornitin dan laminin yang sesuai dalam MSC *Basal Medium* yang mengandung *growth factor* dengan konsentrasi yang sesuai.
8. Sekitar 2 juta sel pada plate 10-cm berlapis poli- L-ornithine dan laminin atau flask T75.

F. Tugas

Buat laporan dari mulai latar belakang, tujuan praktikum, cara kerja, hasil pengamatan pasase sel dan pembahasannya

BAB 6. PENGHITUNGAN JUMLAH SEL

A. Pendahuluan

Tujuan penghitungan jumlah sel hasil kultur stem cell sangat penting dalam berbagai konteks penelitian dan aplikasi klinis. Berikut adalah beberapa tujuan utama dari penghitungan jumlah sel setelah kultur stem cell:

1. Menentukan Densitas Sel untuk Subkultur atau Passaging

- Agar kultur tetap sehat, sel stem cell harus dipindahkan (dipassaging) sebelum terlalu padat (over-confluent).
- Penghitungan sel membantu menentukan:
 - Kapan waktu yang tepat untuk passaging
 - Berapa volume suspensi sel yang perlu diinokulasikan ke flask/wadah baru
 - **Contoh:** Menanam 1×10^5 sel per cm^2 pada flask T-25

2. Menyesuaikan Jumlah Sel untuk Eksperimen

- Banyak eksperimen in vitro (uji diferensiasi, stimulasi faktor pertumbuhan, uji sitotoksik, dsb) memerlukan jumlah sel yang terstandar.
- Tanpa perhitungan yang akurat, data bisa menjadi tidak konsisten atau tidak valid.

3. Menentukan Viabilitas Sel (Sel Hidup vs Mati)

- Biasanya dilakukan dengan Trypan Blue exclusion atau pewarna lain.
- Penting untuk:
 - Mengetahui kualitas kultur
 - Menghindari kontaminasi atau apoptosis tinggi
 - Evaluasi hasil thawing (pencairan dari kriopreservasi)

4. Monitoring Pertumbuhan dan Proliferasi

- Menilai kecepatan proliferasi (growth curve) dari stem cell.
- Parameter seperti Population Doubling Time (PDT) digunakan untuk menilai kemampuan replikasi sel.
- Ini penting untuk:
 - Karakterisasi stem cell
 - Mengetahui perubahan biologis akibat manipulasi genetik, lingkungan, dll

5. Menentukan Efisiensi Diferensiasi

- Pada eksperimen diferensiasi (misalnya stem cell menjadi osteosit, kardiomyosit, dsb), jumlah awal sel sangat mempengaruhi hasil.
- Dibutuhkan perhitungan untuk:
 - Menyusun protokol diferensiasi yang konsisten

- Menilai berapa persen sel yang berhasil terdiferensiasi
6. Persiapan untuk Aplikasi Klinis (Cell Therapy / Transplantasi)
 - Untuk aplikasi klinis, jumlah sel harus sesuai dosis terapi (misalnya: 1×10^6 sel/kg berat badan pasien).
 - Harus akurat untuk menjamin efektivitas dan keamanan terapi.
 7. Validasi Kualitas Produk Stem Cell (dalam GMP atau Riset Translasi)
 - Dalam riset translasi atau produksi klinis (Good Manufacturing Practice/GMP), perhitungan sel adalah bagian dari kontrol mutu (QC).
 - Jumlah dan viabilitas harus sesuai standar sebelum sel digunakan atau disimpan.

B. Kemampuan Dasar Yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan memiliki kemampuan dasar dalam penghitungan jumlah sel hasil kultur serta analisis hasil perhitungan

C. Kemampuan Akhir

Mahasiswa diharapkan mampu:

1. Melakukan kultur sel mesenkim
2. Melakukan pengamatan dan menghitung jumlah sel yang hidup dan mati
3. Melakukan analisis persentase sel yang hidup

D. Alat dan Bahan

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 1. Biosafety Cabinet II | 2. Mikroskop inverted |
| 3. Sentrifuse | 4. Mikropipet dan tips |
| 5. Trypsin | 6. Autoclave |
| 7. pH meter | |
| 8. Tube 15 ml | 9. Media kultur |
| 10. Incubator CO2 | 11. Informed concern |
| 12. Sel darah tepi | 13. tabung antikoagulan EDTA 15 ml |
| 14. Pipet gun | 15. Water bath |
| 16. Hemositometer | 17. T25 flask |
| 18. Syringe | 19. Medium RBM MDC |
| 20. Penisilin –streptomycin 1 % | 21. DMEM |
| 22. FBS 10 % dan 20% | 23. Trypan bkue |

E. Cara Kerja

1. Dalam proses penghitungan sel, reagen yang dibutuhkan adalah *trypan blue*.
2. Bahan habis pakai yang dibutuhkan adalah *microtips* dan *microtubes*. Sedangkan alat yang digunakan antara lain BSC II, *inverted microscope*, *micropipette*, dan *hemocytometer*.

3. Pewarnaan *trypan blue* dibuat dengan cara mencampurkan 10 μL suspensi sel dan 10 μL *trypan blue*, dihomogenkan, kemudian diinkubasi selama 2 menit.
4. Sebanyak 10 μL campuran kemudian diaspirasi dan dimasukkan ke dalam *hemocytometer* melalui sisi dari *cover glass*.
5. *Hemocytometer* diletakkan dibawah *inverted microscope* dengan perbesaran 40x. Sel yang hidup dan mati dihitung di kotak 1, 2, 3, dan 4.
6. Sel yang mati ditandai dengan warna biru. Setelah dihitung, *hemocytometer* dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70 dan RO *water*. Jumlah dan viabilitas sel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Number of cells} = \frac{\text{Number of cell count} \times 2 \times 10^4}{\text{number of square}}$$

$$\text{Viable cells} = \frac{\text{Number of unstained cell}}{\text{number of square}} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{Non-viable cells} = \frac{\text{Number of stained cell} \times 2 \times 10^4}{\text{number of square}}$$

$$\text{Viabel cells (\%)} = \frac{\text{Number of viable cells}}{\text{Number of viable+non viable cells} \times 100}$$

F. Tugas

Buat laporan dari mulai latar belakang, tujuan praktikum, cara kerja, hasil pengamatan penghitungan sel dan pembahasannya

BAB 7. CRYOPRESERVASI CELL

A. Pendahuluan

Cryopreservation adalah teknik penyimpanan sel, jaringan, atau organ dalam suhu sangat rendah (biasanya -196°C menggunakan nitrogen cair) untuk menghentikan aktivitas biologis sehingga sel bisa disimpan dalam jangka panjang tanpa kehilangan viabilitas atau fungsi.

Tujuan Cryopreservation

1. Menyimpan stem cell untuk penggunaan di masa depan
 - o Misalnya: stem cell mesenkimal (MSC), hematopoietik, atau iPSC.
2. Menjaga stok sel yang stabil untuk penelitian
3. Mendukung terapi sel dan regeneratif
4. Mengurangi kebutuhan subkultur terus-menerus (menghindari senescence akibat terlalu sering dibelah)

Prinsip Dasar

Cryopreservasi bekerja dengan:

- Membekukan air di dalam dan di luar sel secara perlahan untuk mencegah kerusakan membran akibat kristal es.
- Menggunakan cryoprotectant (bahan pelindung beku) seperti:
 - o DMSO (Dimethyl Sulfoxide) – paling umum
 - o Glycerol
 - o Serum (FBS) atau albumin manusia
- Biasanya sel dibekukan dalam cooling rate $\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ hingga suhu -80°C , lalu dipindahkan ke nitrogen cair (-196°C).

Langkah-Langkah Umum Cryopreservation Stem Cell

1. Persiapan Sel

- Sel dipanen dari kultur (biasanya dengan Trypsin atau TrypLE)
- Dihitung dan disesuaikan densitasnya (biasanya $1-5 \times 10^6$ sel/mL)

2. Penambahan Cryoprotectant

- Campurkan sel dengan media cryopreservation:

Contoh:

90% FBS + 10% DMSO

atau

Xeno-free cryomedium (untuk aplikasi klinis)

3. Pembekuan Bertahap

- Gunakan alat controlled-rate freezing atau Mr. Frosty™ box di -80°C
- Setelah 12–24 jam, pindahkan ke tangki nitrogen cair (-196°C)

4. Penyimpanan

- Simpan dalam vial cryo berlabel
- Di nitrogen cair (fase cair atau uap)

Thawing (Pencairan Kembali)

- Cepat! Biasanya 37°C selama 1–2 menit
- Langsung diencerkan dalam media kultur hangat
- Cuci sel untuk menghilangkan DMSO (beracun jika dibiarkan)

Tantangan dan Risiko:

Risiko	Penjelasan
Kristal es	Merusak membran dan organel sel
Toksisitas DMSO	Harus dibuang segera setelah thawing
Penurunan viabilitas	Akibat freezing rate tidak tepat atau medium tidak optimal
Perubahan sifat biologis	Bisa terjadi jika proses tidak sesuai SOP, terutama pada iPSC atau ESC

B. Kemampuan Dasar Yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan memiliki kemampuan dasar dalam pemahaman dan kompetensi secara komprehensif mengenai cryopraservasi cell

C. Kemampuan Akhir

Mahasiswa diharapkan mampu:

1. Melakukan persiapan sel yang akan dikrioservasi
2. Melakukan krioservasi cell

D. Alat dan Bahan

1. Biosafety Cabinet II
2. Mikroskop inverted
3. Sentrifuse
4. Mikropipet dan tips
5. Trypsin
6. Autoclave
7. pH meter
8. Tube 15 ml
9. Incubator CO2
10. Media kultur
11. Sel darah tepi
12. Informed concern
13. Pipet gun
14. tabung antikoagulan EDTA 15 ml
15. Hemositometer
16. Water bath
17. Syringe
18. T25 flask
19. Penisilin–streptomycin 1 %
20. Medium RBM MDC
21. FBS 10 % dan 20%
22. DMEM
23. Trypan bkue

E. Cara Kerja

1. Proses *cryopreservation/freezing* akan menggunakan *Mesenkimal Cell Freezing Medium* (Millipore Cat. No. SCM014).
2. Setelah *Mesenkimal Cell Freezing Medium* dihangatkan, harus disimpan di atas es selama digunakan.
3. Sel yang akan dibekukan harus dalam fase pertumbuhan akhir log.
4. Setelah disosiasi, sel disuspensi kembali dalam *Mesenkimal Cell Basal Medium* dan dihitung untuk menentukan viabilitas dan jumlahnya.
5. Selyang dikriopreservasi kemudian disentrifugasi sel dengan kecepatan 300 xg selama 3 menit, dan supernatant dibuang.
6. Jumlah sel yang dikriopreservasi antara $\pm 5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ sel/mL di dalam 1 mL sel/vial. Setelah sel disuspensikan kembali dan dimasukkan ke dalam botol penyimpanan kriogenik yang sesuai, sel tersebut dapat ditempatkan dalam wadah pembekuan. Sel disimpan pada suhu -80°C . Hari berikutnya, sel dalam kriovial dipindahkan dalam nitrogen cair (-196°C) untuk penyimpanan jangka panjang.

F. Tugas

Daftar Pustaka

- Maharani.2023.*Effect of Manggu Leuweung (Garcinia celebica L.) Leaves Ethanol Extract on CCL 171 Cell Line Proliferation*. Jawa Barat: Universitas Padjajaran.
- Merck.2024.*Dulbecco's Eagle Medium (DMEM)*. Germany.
- Mariya S, Lydwina, Permanawati, Iskandriati D, Pamungkas J 2017. Kultur Primer Sel Endotelial Asal Darah Tepi Berinti Tunggal pada Beruk (*Macaca nemestrina*), *Jurnal Primatologi Indonesia*, Vol. 14, No. 2, hlm. 15-20
- Vishwakarma, S. K., Bardia, A., Tiwari, S. K., Paspala, S. A. B., & Khan, A. A. (2014). Current concept in neural regeneration research: NSCs isolation, characterization and transplantation in various neurodegenerative diseases and stroke: A review. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 5, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.04.005>
- Nikon Healthcare. (2020). *Cell Culture Assessment and Observation Verification of Cell Proliferation*. <https://www.healthcare.nikon.com/en/ss/cell-image-lab/knowledge/growth.html>