






MANUAL PROSEDUR
PEMERIKSAAN SITOGENETIKA SAMPEL DARAH
LABORATORIUM PUSAT RISET BIOMEDIK (CEBIOR)
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO

Kode Dokumen	: SPMI-UNDIP/MP/04.07/05
Revisi ke	: -
Tanggal	: 15 Januari 2018
Disiapkan oleh	: Ketua Laboratorium CEBIOR
Dikaji ulang oleh	: Wakil Dekan Riset dan Inovasi
Dikendalikan oleh	: Tim Penjaminan Mutu Fakultas
Disahkan oleh	: Dekan Fakultas Kedokteran

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO	MANUAL PROSEDUR Pemeriksaan Sitogenetika Sampel Darah SPMI-UNDIP/MP/04.07/05	Disetujui oleh  Dekan
---	---	--

		<p style="text-align: center;">MANUAL PROSEDUR Pemeriksaan Sitogenetika Sampel Darah</p>	<p style="text-align: center;">Disetujui oleh:</p>  <p style="text-align: center;">Dekan</p>

Tujuan

Memberikan arahan kepada laboran dalam proses pemeriksaan sitogenetika sampel darah.

Definisi

1. Laboran adalah tenaga kependidikan yang bekerja di laboratorium, bertugas untuk membantu proses pembelajaran mahasiswa tingkat S1-S3, membantu peneliti dalam mengerjakan penelitiannya dan mengerjakan pemeriksaan di laboratorium.
2. Pemeriksaan sitogenetika adalah pemeriksaan bahan genetik pada tingkat sel (kromosom), yang dapat diperiksa dengan mikroskop cahaya.

Syarat Administrasi

1. darah vena/ kapiler berheparin
2. Media
3. PHA
4. Fetal Bovine Serum (FBS) atau Fetal Calf serum (FCS)
5. Colchicine atau Colcemid
6. Thymidine sebagai folat inhibitor, digunakan khusus pada kultur dengan tujuan untuk ekspresi "fragile site"
7. KCl 0,075M
8. Larutan Carnoy's (3 methanol: 1 acetic acid)

RUANG LINGKUP

Ruang lingkup MP Pemeriksaan Sitogenetika Sampel Darah ini meliputi:

- a. Persyaratan yang diperlukan pada saat pemeriksaan sitogenetika sampel darah;
- b. Tahap kegiatan dalam prosedur pemeriksaan sitogenetika sampel darah;
- c. Pihak-pihak yang terlibat dalam pemeriksaan sitogenetika sampel darah;
- d. Waktu yang dibutuhkan dalam pemeriksaan sitogenetika sampel darah;
- e. Dokumen yang diperlukan atau dihasilkan dalam pemeriksaan sitogenetika sampel darah.

PROSEDUR

1. **Penanaman :**

- Teteskan masing-masing 7 tetes "buffy coat" atau 10 tetes darah dalam 2 tube berisi 5 ml media yang berebeda (TC199 dan RPMI1640) yang mengandung 10% FBS dan 100 µl PHA-P.
- Inkubasi pada suhu 37°C selama 72-96 jam dengan sudut kemiringan tabung ~ 45° agar memberin peluang pada tumbuhnya sel dipermukaan, dalam incubator biasa atau incubator yang mengandung 5% CO₂. Bila kultur menggunakan incubator biasa tutup tabung ditutup kencang sedang bila menggunakan incubator CO₂ tutup tabung dikendorkan.
- Darah dari semua kasus selalu ditanam dalam 2 tube dengan media yang berbeda, selain sebagai cadangan ("backup") juga untuk tujuan deteksi adanya fragile-site pada kromosom yang peka terhadap media rendah folat atau media cukup folat dengan tambahan folat inhibitor (thymidine).

2. **Pemanenan :**

- Teteskan 3 tetes colchicines atau colcemid pada setiap tabung, teruskan inkubasi selama 30 menit. Kemudian pusingkan selama 10 menit pada 1000 RPM.
- Buang supernatan, resuspensikan endapan (pelet) dan tambahkan larutan hipotonik hangat KCl 0,075M, resuspensi homogen dan inkubasi 37°C dalam waterbath selama 15-30 menit.
- Pusingkan 1000 RPM selama 10 menit, buang supernatan dan tambahkan 5ml larutan fiksasi Carnoy's pelan-pelan melalui dinding tabung, kemudian kocok. Pemberian larutan fiksasi diulangi 3 kali sampai didapatkan presipitat yang jernih.
- Suspensikan residu dengan larutan Carnoy's secukupnya sesuai dengan banyaknya pelet. Sebarkan pada gelas obyek dengan meneteskan 2 tetes suspensi pada lokasi yang berbeda.

3. **Pengecatan:**

- **Pengecatan Giemsa** (pengecatan solid) : Preparat dicat dengan Giemsa 10 % dalam larutan bufer Phosphate pH 6.8 selama 1 menit. Pembuatan larutan kerja Giemsa selalu baru untuk setiap periode pengecatan (1 staining jar). Pengecatan solid hanya dipakai untuk skrining sel, tidak dapat digunakan untuk analisis/diagnosis.
- **Pengecatan Banding** (G-Banding)

4. **Analisis :**

- Analisis harus dikerjakan oleh dokter ahli sitogenetika. Siapkan format analisis untuk mencatat koordinat dan jumlah metafase yang dihitung dan dianalisis.
- Analisis untuk semua kasus harus dengan pengecatan G-banding, paling sedikit enam metafase dan penghitungan untuk 20 metafase. Bila didapatkan kelainan


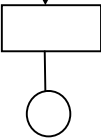
mosaik, analisis paling sedikit harus didapatkan perbedaan pada 3 metafase dan bila didapatkan hanya 1 metafase yang berbeda maka penghitungan harus ditambah paling sedikit 40 metafase.

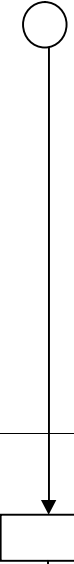
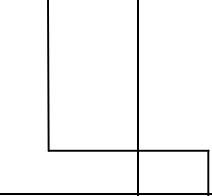
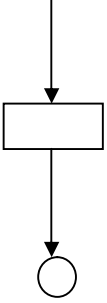
- Analisis untuk kasus Fragile-X (retardasi mental) diawali dengan pengecatan solid dengan sidikan 50 sel, bila didapatkan positif fragile-X, penghitungan diteruskan sampai 100 sel. Slide yang positif fragile-X dicatat koordinatnya, di-destaining kemudian dicat G-banding untuk konfirmasi fragile-X positif dan dianalisis paling sedikit 6 sel.



5. Pelaporan :

- Cara melaporkan bentuk/konstitusi kromosom adalah mengikuti cara yang diharuskan oleh ISCN. Singkatan dan symbol yang menunjukkan beberapa macam kelainan kromosom baik structural (bentuk) maupun numerical (jumlah) terlampir dibuku ini. Standar penulisan konstitusi kromosom adalah: pertama kali tulis jumlah kromosom kemudian diikuti koma dan jenis kromosom seks, diikuti koma lagi dan selanjutnya jenis kelainan struktur (bila ada). Bila pada kelainan kromosom yang melibatkan 2 kromosom maka tulislah jenis kromosom secara urut dari nomer yang kecil (lihat contoh-contoh kelainan kromosom pada lampiran).
- Semua metafase yang sudah dianalisis difoto hitam putih, tiap-tiap kromosom digunting dan ditempel pada kertas yang sudah disediakan sesuai dengan urutan nomernya. Dokter ahli sitogenetika menentukan kariotipnya dan memberikan kesimpulan dari hasil pemeriksaan

BAGAN ALIR MANUAL PROSEDUR
Pemeriksaan Sitogenetika Sampel Darah

No	Kegiatan	PELAKSANA		BAKU MUTU		Keterangan
		Laboran	Supervisor	Waktu	Output	
1	<p>Penanaman :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Teteskan masing-masing 7 tetes "buffy coat" atau 10 tetes darah dalam 2 tube berisi 5 ml media yang berebeda (TC199 dan RPMI1640) yang mengandung 10% FBS dan 100 µl PHA-P. - Inkubasi pada suhu 37• selama 72-96 jam dengan sudut kemiringan tabung ~ 45° agar memberin peluang pada tumbuhnya sel dipermukaan, dalam incubator biasa atau incubator yang mengandung 5% CO2. Bila kultur menggunakan incubator biasa tutup tabung ditutup kencang sedang bila menggunakan incubator CO2 tutup tabung dikendorkan. - Darah dari semua kasus selalu ditanam dalam 2 tube dengan media yang berbeda, selain sebagai cadangan ("backup") juga untuk tujuan deteksi adanya fragile-site pada kromosom yang peka terhadap media rendah folat atau media cukup folat dengan tambahan folat inhibitor (thymidine). 			72-96 jam		
2	<p>Pemanenan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Teteskan 3 tetes colchicines atau colcemid pada setiap tabung, teruskan inkubasi selama 30 menit. Kemudian pusingkan selama 10 menit pada 1000 RPM. - Buang supernatan, resuspensikan endapan (pelet) dan tambahkan larutan hipotonik hangat KCl 0,075M, 			2 jam		

	<p>resuspensi homogen dan inkubasi 37°C dalam waterbath selama 15-30 menit.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pusingkan 1000 RPM selama 10 menit, buang supernatan dan tambahkan 5ml larutan fiksasi Carnoy's pelan-pelan melalui dinding tabung, kemudian kocok. Pemberian larutan fiksasi diulangi 3 kali sampai didapatkan presipitat yang jernih. <p>Suspensikan residu dengan larutan Carnoy's secukupnya sesuai dengan banyaknya pelet. Sebarkan pada gelas obyek dengan meneteskan 2 tetes suspensi pada lokasi yang berbeda.</p>					
3	<p>Pengecatan:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pengecatan Giemsa (pengecatan solid) : Preparat dicat dengan Giemsa 10 % dalam larutan bufer Phosphate pH 6.8 selama 1 menit. Pembuatan larutan kerja Giemsa selalu baru untuk setiap periode pengecatan (1 staining jar). Pengecatan solid hanya dipakai untuk skrining sel, tidak dapat digunakan untuk analisis/diagnosis. - Pengecatan Banding (G-Banding) 		5 hari			
4	<p>Analisis :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analisis harus dikerjakan oleh dokter ahli sitogenetika. Siapkan format analisis untuk mencatat koordinat dan jumlah metafase yang dihitung dan dianalisis. - Analisis untuk semua kasus harus dengan pengecatan G-banding, paling sedikit enam metafase dan penghitungan untuk 20 metafase. Bila didapatkan kelainan mosaik, analisis paling sedikit harus didapatkan perbedaan pada 3 metafase dan bila didapatkan hanya 1 metafase yang berbeda maka penghitungan harus ditambah paling sedikit 		1-2 minggu			

	<p>40 metafase.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analisis untuk kasus Fragile-X (retardasi mental) diawali dengan pengecatan solid dengan sidikan 50 sel, bila didapatkan positif fragile-X, penghitungan diteruskan sampai 100 sel. Slide yang positif fragile-X dicatat koordinatnya, di-destaining kemudian dicat G-banding untuk konfirmasi fragile-X positif dan dianalisis paling sedikit 6 sel. 					
5	<p>Pelaporan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cara melaporkan bentuk/konstitusi kromosom adalah mengikuti cara yang diharuskan oleh ISCN. Singkatan dan symbol yang menunjukkan beberapa macam kelainan kromosom baik structural (bentuk) maupun numerical (jumlah) terlampir dibuku ini. Standar penulisan konstitusi kromosom adalah: pertama kali tulis jumlah kromosom kemudian diikuti koma dan jenis kromosom seks, diikuti koma lagi dan selanjutnya jenis kelainan struktur (bila ada). Bila pada kelainan kromosom yang melibatkan 2 kromosom maka tulislah jenis kromosom secara urut dari nomer yang kecil (lihat contoh-contoh kelainan kromosom pada lampiran). - Semua metafase yang sudah dianalisis difoto hitam putih, tiap-tiap kromosom digunting dan ditempel pada kertas yang sudah disediakan sesuai dengan urut-urutan nomernya. Dokter ahli sitogenetika menentukan kariotipnya dan memberikan kesimpulan dari hasil pemeriksaan 			1 hari		