|  | Disiapkan oleh: | Disetujui oleh: | **Ditetapkan oleh:** |
| --- | --- | --- | --- |
| Nama |  |  |
| Jabatan |  |  |
| Tanda Tangan |  |  |
| **STANDAR PROSEDUR OPERASIONAL** | Tanggal Terbit: | Unit Kerja:Integrated Cellular and Molecular Biology Laboratory |
| **Pengertian:**Staining sampel untuk pengamatan ROS dengan mikroskop confocal**Tujuan:**1. Memberikan petunjuk kepada petugas laboratorium mengenai staining ROS pada adherent cells
2. Menjamin pemeriksaan laboratorium dilakukan sesuai prosedur

**Prosedur:**BAHAN HABIS PAKAI:1. Coverslip
2. Poly-L-lysine
3. 2.5% Glutaraldehyde in PBS
4. PBS
5. 4% Osmium Tetroxide (OsO4)
6. Ethanol 70%
7. Ethanol 80%
8. Ethanol 90%
9. Ethanol 100%
10. Hexamethyldisilazane (HMDS)
11. Whatman filter paper

CATATAN SEBELUM MEMULAI PROSEDUR : 1. Proses preparasi harus dilakukan di dalam BSC
2. Pastikan untuk memisahkan limbah toksik sisa OsO4
3. Pastikan sampel dalam keadaan kering sebelum melanjutkan ke proses berikutnya

PREPARASI COVERSLIP:1. Bersihkan coverslip menggunakan ethanol 70%.
2. Tambahkan 500 μL Poly-L-lysine ke atas coverslip hingga seluruh bagian tertutupi, inkubasi 15 menit, suhu ruang, kemudian aspirate sisa poly-L-lysine.
3. Cuci coverslip 3x dengan PBS.
4. Tambahkan ethanol 70%, tunggu hingga kering.
5. Coverslip siap digunakan untuk *seeding* sel atau preparasi kromosom.

PREPARASI SAMPEL SEM1. Wash PBS 3x 5 menit.
2. Tambahkan 2.5% Glutaraldehyde in PBS sebanyak 1000 μL ke atas sampel pada coverslip. Inkubasi 30 menit pada suhu ruang.
3. Aspirate sisa glutaraldehyde, serap dengan filter paper.
4. Tambahkan 1000 μL PBS, inkubasi 5 menit, kemudian keringkan. Lakukan tahap pencucian PBS sebanyak 3x.
5. Tambahkan 500 μL OsO4. Inkubasi 15 menit. Aspirate sisa osmium, keringkan dengan filter paper.
6. Tambahkan 1000 μL PBS, inkubasi 5 menit, kemudian keringkan. Lakukan tahap pencucian PBS sebanyak 3x.
7. Tambahkan 1000 μL ethanol 70%, inkubasi 5 menit, kemudian keringkan dengan filter paper.
8. Tambahkan 1000 μL ethanol 80%, inkubasi 5 menit, kemudian keringkan dengan filter paper.
9. Tambahkan 1000 μL ethanol 90%, inkubasi 5 menit, kemudian keringkan dengan filter paper.
10. Tambahkan 500 μL ethanol 100%, inkubasi 10 menit, kemudian keringkan dengan filter paper.
11. Tambahkan 500 μL HMDS, tunggu hingga kering.
12. Simpan sampel SEM dalam desiccator.

**Bahan berbahaya :**Lihat MSDS (*material safety data sheet*)**Kewaspadaan keselamatan :**1. Melaksanakan prosedur kewaspadaan standar dalam menangani semua sampel dan reagen laboratorium.
2. Melaksanakan prosedur penanganan limbah laboratorium terhadap semua bahan bekas pemeriksaan.

**Prosedur/ dokument terkait :**1. SOP Penggunaan BSC
2. SOP Keselamatan Kerja
3. SOP Pembuangan limbah ICEMBIO
4. SOP Pemeliharaan dan Kalibrasi peralatan laboratorium

**Rujukan :** |