

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

URAIAN	DIBUAT OLEH	DIPERIKSA OLEH	DIPERIKSA OLEH	DISETUJU OLEH
Jabatan	Staf CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Sri Handayani			Edy Meiyanto
Tanggal	21 Mei 2015			

PROTOKOL

WESTERN BLOT

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	HALAMAN
A. TUJUAN	2
B. PENDAHULUAN	2
C. OPERASIONAL	
1. PERSIAPAN REAGEN DAN GEL ELEKTROFORESIS	2
2. PREPARASI LISAT	8
3. ELEKTROFORESIS	9
4. BLOTTING	11
5. DETEKSI VISUAL	13
6. DETEKSI FLUORESENSI	13

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN

No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
-		Sri Handayani Staff CCRC	/	Riris Istighfari J Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi					
No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
Isi					
Isi					

B. TUJUAN

Memberikan panduan secara detail dan bertahap mulai dari persiapan reagen, gel, lisat sel dan pelaksanaan western blot dari protein sel kanker dengan deteksi protein secara visual maupun fluoresensi.

C. PENDAHULUAN

Western blot adalah proses pemindahan protein dari gel hasil elektroforesis ke membran. Membran ini dapat diperlakukan lebih fleksibel daripada gel sehingga protein yang terblot pada membran dapat dideteksi dengan cara visual maupun fluoresensi.

D. OPERASIONAL

1. PERSIAPAN REAGEN DAN GEL ELEKTROFORESIS

a. SDS- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

b. Komposisi Resolving Gel/ Gel pemisah 10% (1 gel) :

Aquabidest	2950 μ L
30% Bis/Acrylamide (BA)	2500 μ L
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1900 μ L
10% SDS (pH 7,2)	75 μ L
10% Amonium persulfat (APS)	75 μ L
TEMED	7.5 μ L

Ket : Acrylamide merupakan neurotoksin yang dapat terakumulasi. Jadi selalu gunakan sarung tangan selama preparasi dan aplikasi SDS-PAGE gel.

Komposisi Stacking Gel/ Gel penumpuk 5% (1 gel):

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

Aquabidest	1350 μ L
30% Bis/Acrylamide (BA)	335 μ L
1 M Tris-HCl pH 6,8	250 μ L
10% SDS (pH 7,2)	20 μ L
10% Amonium persulfat (APS)	20 μ L
TEMED	2 μ L

Komposisi 30% Bis/Acrylamide:

Akrilamid	29 g
Bisakrilamid	1 g
Aquabidest (warm, heating)	ad 100 mL

Ket: Bis/Acrylamide disimpan pada temperature 4°C dengan dibungkus aluminium foil.

Formula SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis :

Komposisi	Penyimpanan	Volume \pm 7.5 mL (2 gel)		
		12 %	10 %	8 %
Aquabidest	RT	2.45 mL	2.95 mL	3.45 mL
30 % Bis/acrylamide	4°C	3 mL	2.5 mL	2 mL
1,5M Tris HCl pH 8,8	RT	1.9 mL	1.9 mL	1.9 mL
10 % SDS	RT	75 μ L	75 μ L	75 μ L
10 % APS	-20°C	75 μ L	75 μ L	75 μ L
TEMED	4°C	7.5 μ L	7.5 μ L	7.5 μ L

Komposisi 1,5 M Tris HCL pH 8,8 :

Tris (BM : 121,1)	18.17 g
Aquabidest	75 mL
HCL	ad pH 8,8
Aquabidest	ad 100 mL

Ket : Tris HCl disimpan pada temperatur kamar.

Komposisi 1 M Tris HCL pH 6,8 :

Tris (BM: 121,1)	12.1 g
Aquabidest	75 mL
HCL	ad pH 6,8
Aquadest	ad 100 mL

Ket : Tris HCl disimpan pada temperatur kamar.

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

Komposisi 10% SDS

SDS 1 g
Aquabidest ad 10 mL

Ket : 10% SDS disimpan pada temperatur kamar.

Komposisi 10% APS

APS 1 g
Aquadest ad 10 mL

Ket : APS disimpan pada temperatur -30°C. 10 mL dipisahkan dalam 10 tube 1,5 mL.

TEMED disimpan pada temperatur 4°C

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Bersihkan lempeng pencetak gel dan semprot dengan alkohol dan dikeringkan dengan tisu.	Jangan sampai tertinggal serabut tissue pada lempeng.
2.	Tangkupkan sepasang pencetak gel, ratakan pada alas yang rata	-
3.	Pasang pencetak gel pada alat dan putar pengunci sampai terkunci	-
4.	Untuk membuat 1 gel: siapkan conical tube 15 mL untuk <i>resolving gel</i> dan 15 mL untuk <i>stacking gel</i> .	Pastikan kebersihan tube dari kotoran atau sabun yang kemungkinan masih menempel.
5.	Buat <i>resolving</i> dan <i>stacking gel</i> dengan masukan secara berturut turut aquadest, BA, Tris HCl dan SDS sesuai formula.	-
6.	Tambahkan secara berurutan APS dan TEMED pada <i>resolving gel</i> kemudian campur homogen.	APS dan TEMED diberikan terakhir dan dengan cepat karena mudah memadat. APS disimpan pada freezer. TEMED disimpan di suhu 4°C
7.	Segera masukkan ± 5 mL larutan <i>Resolving Gel</i> pada pencetak gel dengan blue tip.	Masukan perlahan-lahan dan diusahakan tidak timbul gelembung. Pencetak gel disisakan sedikit di atas untuk <i>Stacking gel</i> sesuai lebar sisir cetakan.
8.	Tambahkan 1 ml aquadest sampai menutup seluruh permukaan gel. Aquadest digunakan untuk menghilangkan gelembung dan meratakan permukaan gel.	aquadest dibiarkan di dalam pencetak gel sampai gel mengeras.

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

9.	Biarkan <i>Resolving Gel</i> mengeras pada temperatur kamar.	Waktu yang diperlukan kira-kira 5-15 menit.
10.	Periksa mengerasnya gel dengan melihat sisa gel yang di conical tube.	Jika sudah mengeras, biasanya yang di pencetak gel juga sudah mengeras.
11.	Ambil aquadest dengan cara pencetak gel dimiringkan dan dibantu tissue	
12.	Tambahkan pada larutan <i>stacking gel</i> secara berurutan APS dan TEMED kemudian campur homogen.	APS dan TEMED diberikan terakhir dan dengan cepat karena mudah memadat.
13.	Segera masukan ± 1.2 ml larutan <i>stacking gel</i> dengan blue tip ke pencetak gel sampai pencetak gel penuh dan segera pasang sisir pelan-pelan.	<i>Stacking gel</i> cepat mengeras sehingga harus cepat dimasukan pencetak gel begitu ditambahkan TEMED. Tidak boleh ada gelembung pada gel.
14.	Biarkan <i>Stacking Gel</i> mengeras pada temperatur kamar.	Waktu yang diperlukan kira-kira 15-15 menit.
15.	Periksa mengerasnya gel dengan melihat sisa gel yang di conical tube.	Jika sudah mengeras, biasanya yang di pencetak gel juga sudah mengeras.

b. Media Kultur Sel

Dibuat dalam kondisi steril.

Komposisi (100 mL)

FBS	10 mL
Pen-Strep	1.5 mL
Fungizon	0.5 mL
DMEM	ad 100 mL

c. Larutan Preparasi Sampel

Terdiri dari buffer lisis sel yaitu buffer RIPA (Buffer Radio Immuno Precipitation Assay) dan inhibitor protease dan phosphatase.

Komposisi

> Buffer RIPA :

Tris HCl pH 7.6	25 mM
NP 40	1 %
Na deoxycholate	1 %,
NaCl	150 mM
SDS	0,1 %

Ket : Buffer RIPA disimpan pada temperatur 4°C selama beberapa minggu atau selama setahun pada temperatur -20°C. Atau dengan kit sesuai petunjuk yang ada di petunjuk.

> 100 mM PMSF :

PMSF (BM : 174,19)	17,42 mg
--------------------	----------

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

f. PVDF Transfer Buffer 10x

Komposisi untuk semi dry (1 L)

Tris base	30.3 g
Glycine	140.4 g
Aquadest	ad 1 L
Metanol	1% (semi dry) ditambahkan pada saat membuat PVDF 1x
Metanol	20% (wet) ditambahkan pada saat membuat PVDF 1x

Ket : Metanol ditambahkan sebelum digunakan.

PVDF transfer buffer disimpan pada temperatur kamar.

PVDF transfer buffer dapat disimpan selama 6 bulan

g. Tris Buffer Saline (TBS) 10x

Komposisi (4 L)

Tris HCl	24,22 g → 50 mM
NaCl	58,5 g → 250 mM
Aquadest	ad 4 L
pH dibuat 7,5 – 7,6	

Ket : TBS disimpan pada temperatur kamar.

h. 20% Tween

Tween	4 g
Aquabidest	20 ml

Ket: Masukkan dalam conical 50 ml. Simpan di suhu 4 °C

i. Tris Buffer Saline Tween 20 (TBST)

Buat TBS 1x sebanyak ± 300 ml untuk 1 gel

Tambahkan Tween 20 0.15 mL → 0,05% → diambil dengan yellow tip dipotong sedikit di ujung

Ket : TBST disimpan pada temperatur kamar.

j. Phosphate Buffer saline (PBS) 10x pH 7,4

NaCl	80 gram
KCl	2 gram

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

KH₂PO₄ 2 gram
 Na₂HPO₄ 14.4 gram (atau Na₂HPO₄.7H₂O 25.6 gram)
 Aquabidest ad 1 Liter

Ket : PBS disimpan pada temperatur kamar.

k. Phosphate Buffer Saline Tween (PBST) 1x
sama dengan pembuatan TBST.

l. Blocking Buffer

1. Skim Milk 5%

Komposisi (8 mL)

Susu skim 0,4 g → 5%
 PBST ad 8 mL

Ket : Susu skim higroskopis sehingga setelah menimbang segera dilarutkan dalam PBST 1x dan tutup wadah susu skim dengan cling wrap rapat. Blocking buffer disimpan pada temperatur 4°C.

2. Bovine serum albumin 5 %

Komposisi (14 mL)

BSA 0,7 g
 PBST ad 14 mL

Ket : Blocking buffer BSA disimpan pada temperatur 4°C.

k. Antibodi Primer 1:1000 (Disesuaikan dengan antibodi yang digunakan)

Antibodi primer 8 µL
 Blocking Buffer 8 mL

Ket : Antibodi primer disimpan dalam temperatur - 30° C dan dialiquot 5 µL pada eppendorf. Antibodi primer dalam BSA disimpan dalam temperatur 4° C dan dapat dipakai sampai 5x. Antibodi primer dalam skim milk tidak bisa disimpan, langsung dibuang, sehingga volume pengenceran sesuaikan dengan kebutuhan.

l. Antibodi Sekunder (antirabbit IgG-HRP) 1:5000

Antibodi sekunder 1,6 µL
 Blocking Buffer skim milk 8 mL

Ket : Antibodi sekunder disimpan dalam temperatur 4° C dan dialiquot 10 µL pada eppendorf. Antibodi dalam skim milk tidak bisa disimpan, langsung dibuang, sehingga volume pengenceran sesuaikan dengan kebutuhan.

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

m. Substrate BCIP/NBT

Komposisi larutan NBT (1 mL)- disimpan pada temperatur 4°C

Nitro blue tetrazolium 0,05 g
Dimethyl formamide (DMF) 70% ad 1 mL

Ket : Pengambilan DMF dengan pipet pasteur.
Wadah diselubungi aluminium foil.

Komposisi larutan BCIP (1 mL) - disimpan pada temperature -20°C

Bromodhloroindoyl phophate 0,05 g
Aquadest ad 1 mL

Ket : Wadah diselubungi aluminium foil

Komposisi ... - disimpan pada temperatur 4°C

0,1 M Tris-HCl (pH 9,5)
0,1 M NaCl
5 mM MgCl₂

Komposisi larutan substrat BCIP/NBT – dibuat baru

Larutan NBT 66 µL
Larutan BCIP 33 µL
Alkaline fosfatase buffer 10 mL

Ket : Wadah diselubungi aluminium foil
Gunakan larutan ini dalam jangka waktu 1 jam.

n. Larutan Stopper

Komposisi : 20 mM EDTA dalam PBS.

2. PREPARASI LISAT

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Tanam 1×10^6 sel pada Tissue Culture Dish (TCD) diameter 6 cm	Sel dihitung dengan hemocytometer dan dijaga sterilitas sel.
2.	Sel ditumbuhkan sampai 80% konfluen.	Jaga sterilitas sel. Konfluen sel dilihat dengan mikroskop.
3.	Tambahkan senyawa uji : - seri konsentrasi diinkubasi dengan waktu sama yaitu 24 jam. - Seri waktu yaitu 0, 6, 12, 24 atau 0, 24, 48 dengan konsentrasi sama.	Jaga sterilitas.
4.	Siapkan <i>conical tube</i> 15 mL, PBS, larutan	-

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

	preparasi sampel, alkohol, scraper, eppendrof, parafin sheet.	
5.	Siapkan blok es di box.	Blok es digunakan untuk mencegah denaturasi protein dengan menjaga temperatur 4°C.
6.	Buang media yang ada pada TCD dengan blue tip.	Dilakukan di atas blok es di luar LAF
7.	Cuci TCD dengan 3 mL PBS sebanyak 2 kali.	Dilakukan di atas blok es di luar LAF
8.	Tambahkan larutan preparasi sampel pada TCD sebanyak 300 µL dan diamkan selama 5 menit.	Dilakukan di atas blok es dan akan menghasilkan suspensi lengket yang menunjukkan benang-benang protein sel. Saat resuspensi jangan sampai timbul buih. Buih akan menyebabkan denaturasi protein.

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

No	Prosedur Kerja	Perhatian
9.	Larutan preparasi sampel pada TCD discrap dengan scraper dan dipindahkan ke eppendorf dengan mikropipet 1 mL.	Sebelum dan setelah digunakan, scraper harus dibersihkan dengan aquadest, lalu disemprot alkohol dan dikeringkan dengan tissue. Scrap dilakukan di atas blok es.
10.	Resuspensi menggunakan mikropipet 1 mL sebanyak 20 kali.	Jangan sampai ada buih pada eppendorf.
11.	Sentrifuge 12.000 rpm di 4°C selama 20 menit	Untuk menghilangkan debris sel
12.	Masukan supernatan ke eppendorf yang baru	
12.	Selubungi eppendorf dengan parafilm dan pindahkan segera ke di -80 ° C	Simpan di -80 ° C

7. PROTEIN ASSAY (A260/A280)

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Siapkan eppendorf untuk sampel, dan blanko (berisi aquabidest)	-
2.	Hidupkan spektrofotometri UV-Vis dan set $\lambda = 260$ nm	Alat dapat digunakan setelah proses <i>warming up</i> selesai.
3.	Pada eppendorf sampel, masukkan 10 μ l lisat sel + 990 μ l aquabidest	fp =100x (pengenceran tidak harus 100x, tergantung absorbansi yang didapatkan (biasanya min 0.2 nm)
4.	Ukur absorbansi sampel terhadap blanko	Bersihkan kuvet sebelum digunakan, Selalu cek dan catat absorbansi sampel dan blanko
5.	Set spektrofotometri pada $\lambda = 280$ nm	
7.	Ukur absorbansi sampel terhadap blanko	Selalu cek dan catat absorbansi sampel dan blanko setiap ganti sampel. Satu sampel diukur dulu di λ 260 dan 280 baru ganti sampel berikutnya.
8.	Hitung volume lisat yang akan di-loading ke sumuran gel*	-

*Cara menghitung:

1. Jumlah protein (mg/mL) = (Abs 280 x 1.55) - (Abs 260 x 0.76) x fp

2. Volume lisat yang akan di loadingkan

Misalkan: sel WIDR butuh 306 ug untuk mendapatkan band yang bagus. Konsentrasi protein sampel kita 17 mg/ml. Volume akhir di sumuran 20 ul. Loading buffer 10x.

Maka: volume lisat yang diloadkan = $306/17 = 18$ ul sampel + 2 ul loading buffer/ sumuran.

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

8. PROTEIN ASSAY METODE BRADFORD

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Siapkan eppendorf untuk sampel, kontrol reagen, dan blanko (berisi aquabidest)	-
2.	Hidupkan spektrofotometri UV-Vis dan set $\lambda = 595 \text{ nm}$	Alat dapat digunakan setelah proses <i>warming up</i> selesai.
3.	Pada eppendorf kontrol reagen, masukkan 200 μl reagen Bradford + 800 μl aquabidest	-
4.	Pada eppendorf sampel, masukkan 2 μl lisat sel + 200 μl reagen Bradford + 798 μl aquabidest	-
5.	Diadakan eppendorf kontrol reagen dan eppendorf sampel selama 5 menit pada temperatur kamar	-
6.	Ukur absorbansi kontrol reagen terhadap blanko	Bersihkan kuvet sebelum digunakan
7.	Ukur absorbansi sampel terhadap blanko	-
8.	Hitung volume lisat yang akan di-loading ke sumuran gel	-

9. ELEKTROFORESIS

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Panaskan waterbath 95°C, Siapkan gabus berlubang untuk eppendorf tube, dan Buffer SDS Page 1x sebanyak 1 L.	
2.	Ambil lisat sel sesuai perhitungan dari protein assay dan pindahkan ke eppendorf baru kemudian tambahkan loading buffer 10x.	Volume loading buffer tergantung konsentrasi loading buffer.
3.	Panaskan sampel di waterbath temperatur 95 °C selama 5 menit	-
4.	Gel yang sudah mengeras diambil sisirnya.	Lakukan dengan hati-hati jangan sampai merusak sumuran yang terbentuk.
5.	Cuci busa di sumuran dengan aquadest	
6.	Pasang gel pada chamber	
7.	Masukkan Buffer SDS Page 1x perlahan-lahan sampai chamber elektroforesis bagian tengah terpenuhi.	Jangan sampai timbul buih di bagian bawah. Buih dapat mengganggu aliran arus.
8.	Isi chamber di bagian atas gel dengan SDS page 1x sampai kawat chamber paling atas tergenangi.	Jika muncul buih dibagian bawah, miringkan chamber pelan-pelan sampai buih hilang. Jika belum hilang

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

		juga, keluarkan dari chamber, masukan kembali pelan-pelan.
9.	Loading sampel dengan menggunakan white tip dan <i>prestained marker</i> 10 μ L dengan menggunakan white tip. <i>Prestained marker</i> diletakkan di sumuran tengah.	Lakukan loading sampel pada sumuran perlahan-lahan dan setetes-setetes. Sampel pekat akan lebih sulit turunnya dibanding sampel encer. Pilih <i>prestained marker</i> yang sesuai dengan BM protein yang kita inginkan.
10.	Run dengan setting selama 50 menit dengan voltase 100 volt.	Kabel merah +, hitam - Lihat sampai blue dye melewati stacking gel
11.	Jika blue dye mencapai stacking gel, stop elektroforesis	-
12.	Tambahkan voltase menjadi 200 V selama 60 menit, start lagi	-
13.	Setelah marker hampir mencapai batas bawah matikan power supply dan keluarkan lempeng gel dari chamber.	-
14.	Cuci lempeng gel dengan aquadest	agar tidak terlalu licin saat dipegang.
15.	Buka lempeng dengan menggunakan spatel pipih kecil. Potong bagian sumuran (stacking gel) hingga rapi dan potong sedikit bagian ujung kiri gel sebagai penanda sumuran 1.	Gunakan sarung tangan karet bersih dan spatel bersih. Buka lempeng dengan kaca bagian dalam dibawah.
16.	gel dilepas dengan spatel perlahan-lahan, ambil dengan tangan dan ditampung pada wadah PVDF Transfer buffer.	Gunakan wadah plastik yang seukuran dengan gel, jangan wadah yang terlalu besar. Bersihkan lempeng gel dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquadest.

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

10. BLOTTING

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Ambil membran PVDF dengan pinset bersih pada bagian ujungnya dan lepaskan dari pembungkus atasnya.	Pembungkus membran berupa kertas atas dan bawah. Jangan sampai membrane tersentuh tangan. Jangan menggunakan pinset yang berkarat.
2.	Tandai ujung membran dengan pensil. Contoh tanda: 2/ 4/ 5/ 7. Tanda ini sebagai petunjuk permukaan yang terkena gel.	Tanda dibuat kecil pada ujung membran. Jangan gunakan tanda yang simetris seperti 1, 8, A.
3.	Basahi membran PVDF dengan metanol pada wadah plastik selama 5 menit pada temperatur kamar. Pendiaman dilakukan di atas shaker.	Gunakan wadah plastik yang seukuran dengan membran, jangan wadah yang terlalu besar. Tutup wadah saat pendiaman. Metanol dapat digunakan lebih dari 1 kali sehingga harus ditutup rapat setelah digunakan.
4.	Ambil membran dan pindahkan ke wadah yang telah diisi dengan PVDF Transfer buffer. Kemudian diamkan di atas shaker selama 60 menit.	Gunakan wadah plastik yang seukuran dengan membran, jangan wadah yang terlalu besar. Tutup wadah saat pendiaman.
5.	Gel yang ditampung pada wadah yang berisi PVDF transfer buffer didiamkan di atas shaker selama 15 menit.	-
6.	Setelah 15 menit pada wadah yang sama masukan 6 kertas saring dan diamkan di atas shaker selama 2 menit.	-
7.	Siapkan blotting machine dan bersihkan permukaan yang akan terkena kertas saring dengan PVDF Transfer Buffer.	Gunakan lap kanebo bersih/ tissue bebas serat satu arah
8.	Susun dari bawah (elektroda +) ke atas (elektroda -) : 3 kertas saring, membran, gel, 3 kertas saring. Ratakan/rapikan tiap susunan dengan tabung reaksi 50 mL bersih yang digulung-gulung.	Susunan jangan sampai terbalik antara gel dan membran. Arus listrik dari + ke -. Pada blotting machine kabel merah adalah +, sedangkan kabel hitam adalah -. Gunakan sarung tangan bersih untuk memindahkan dan merapikan membran, gel dan kertas saring. Jangan sampai ada gelembung udara yang terperangkap pada susunan tersebut.

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

9.	Setting power supply pada 15 V dan 120 mAmpere (1 membran) kemudian run selama 1 jam.	Set alat 60 menit. 1 jam terhitung dari tercapainya voltase. Siapkan blocking buffer skim milk 50 mL.
10.	Jika <i>prestained marker</i> telah terlihat pada membran berarti sampel protein telah berpindah ke membran pula.	-
11.	Masukan membran ke wadah yang berisi blocking buffer 7 mL. Diamkan di atas shaker selama 1 jam pada temperatur kamar	Gunakan wadah plastik yang seukuran dengan membran, jangan wadah yang terlalu besar. Tutup wadah saat pendiaman.
12.	Pindahkan membran dengan pinset ke plastik tebal yang bersih kemudian tambahkan 4 mL antibodi primer tepat di bagian atas membran yang diduga terdapat protein pada plastik tsb. Tutup plastik sesuai ukuran membran dengan <i>hot sealer</i> . Inkubasi <i>over night</i> pada temperatur 4°C.	Plastik yang digunakan seukuran dengan membran untuk mencegah adanya udara pada plastik. Antibodi primer dilarutkan dalam blocking buffer dengan perbandingan tertentu, banyaknya disesuaikan dengan besarnya membran dan dimasukkan ke blok es.
13.	Ambil membran dengan pinset dan cuci dengan TBST/PBST 1x sebanyak 3 kali @5 menit. Cara mencuci : letakan membran pada wadah yang berisi TBST/PBST kemudian goyang atau diamkan di atas shaker.	Membran terendam oleh TBST/PBST. Bersihkan pinset yang digunakan untuk mengambil membran antibodi pertama. Shaker pelan-pelan
14.	Pindahkan membran dengan pinset ke plastik tebal yang bersih kemudian tambahkan 4 mL antibodi sekunder tepat di bagian atas membran yang diduga terdapat protein. Tutup plastik sesuai ukuran membran dengan <i>hot sealer</i> . Inkubasi pada temperatur kamar selama 1 jam.	Dinginkan skim milk 5% untuk melarutkan antibodi sekunder pada suhu 4-8° C. Plastik yang digunakan seukuran dengan membran untuk mencegah adanya udara pada plastik. Antibodi sekunder dilarutkan dalam skim milk 5% (perbandingan tergantung Ab) dan dimasukkan ke blok es karena Ab sekunder sensitif suhu dan cahaya.
15.	Ambil membran dengan pinset dan cuci dengan TBST/PBST sebanyak 3 kali @ 5 menit. Cara mencuci : letakan membran pada wadah yang berisi TBST/PBST kemudian goyang diamkan di atas shaker.	Membran terendam oleh TBST/PBST. Bersihkan pinset yang digunakan untuk mengambil membran antibodi sekunder.

Ket : Untuk deteksi visual digunakan ALP-conjugated secondary

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

antibodies (alkaline phosphatase) sedangkan deteksi fluoresensi digunakan HRP-conjugated secondary antibodies.

6. DETEKSI VISUAL

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Siapkan wadah plastik seukuran membran kemudian bungkus wadah dan tutup dengan aluminium foil sampai tidak ada cahaya yang bisa masuk.	Cahaya akan mengganggu reaksi kromogen BCIP/NBT.
2.	Ambil membran dari wadah pencucian PBST kemudian pindahkan ke wadah yang telah ditutup al foil. Masukkan larutan substrat BCIP/NBT, tutup wadah kemudian diselubungi lagi wadah dengan al foil. Diamkan di atas shaker antara 10 – 15 menit. Jika belum terlihat garis ungu selama 15 menit diamkan kembali sampai terlihat garis.	Jangan sering membuka wadah selama pendiaman.
3.	Ambil membran dengan pinset dan pindahkan ke wadah yang berisi larutan stopper sampai membran terendam.	-
4.	Lakukan dokumentasi dengan foto dibawah lampu neon.	-

11. DETEKSI FLUORESENSI (ECL Plus Detection System-Amersham)

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Campur dengan solution A dan B dengan perbandingan 1:1 dalam eppendorf	1 ml untuk membran 6x9 cm 200 uL untuk setengah membran
2.	Larutan ECL diratakan di atas plastic wrap yang diratakan di atas meja.	Plastic wrap harus rata tanpa lipatan.
3.	Ambil membran dari TBST/PBST, tiriskan, dan segera letakan membran di atas larutan ECL selama 1 menit.	Dibalik, sisi membran yang mengandung protein harus kontak dengan ECL. Jangan sampai ada gelembung di bawah membran.
4.	Pindahkan membran ke plastic wrap baru dan tutup dengan rapi. Jika membran dipotong-potong karena inkubasi Ab berbeda, susun kembali seperti semula, baru ditutup bersamaan.	Plastic wrap harus rata dan pastikan tidak ada gelembung di dalam plastic wrap. Jangan sampai membran terlalu kering

Dokumen nomor : CCRC-03-019-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

5.	Letakan membran yang terbungkus plastic wrap ke dalam kaset dan bawa ke ruang gelap.	
6.	Siapkan developer, as asetat 2%, fixer, dan aquadest berturut-turut dalam wadah.	Developer dan fixer baru bisa diencerkan 1:4 dengan aquadest.
	Siapkan timer dan hapalkan inkubasi film di masing-masing larutan	
7.	Matikan lampu ruang gelap	
8.	Ambil selembat film (ukuran kecil) dan masukkan ke dalam kaset	Diruang gelap
9.	Ekspose dengan beberapa durasi waktu. misal 1 menit, 10 menit, 1 jam	Dilakukan di ruang gelap. Ekspose dilakukan dengan beberapa durasi waktu untuk mendapatkan gambar yang paling baik.
10.	Setiap 1 durasi waktu pindahkan membran ke sisi film yang lain. Setelah selesai ekspose, ambil membran dari kaset.	Dilakukan di ruang gelap. Ekspose jangan terlalu lama sebab membran akan kering.
11.	Ambil film dari kaset kemudian masukan ke larutan developer sambil digoyang-goyang selama 2 menit.	Dilakukan di ruang gelap. Gunakan sarung tangan bening/tanpa tepung. Film jangan sampai kena bak, akan menimbulkan goresan.
12.	Masukan film ke larutan asam asetat 2% selama 30 detik	Dilakukan di ruang gelap.
13.	Masukan film ke larutan fixer selama 6 menit	Dilakukan di ruang gelap.
14.	Cuci film dalam aquadest selama 10 menit	Dilakukan di ruang gelap.
15.	Hidupkan lampu. Pita protein akan berwarna hitam	Latar belakang film berwarna abu-abu transparan

End of file