



A. Alat dan Bahan :

Tabel 1 Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk proses V3 Western Workflow

No	Alat/Bahan	Ket
1	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Alat
2	PowerPac™ Power Supply	Alat
3	Heat Block/Water Bath	Alat
4	Trans Blot Turbo System	Alat
5	Mikropipet Set + Tips	Alat
6	Roller	Alat
7	Microtube 1.5 ml	Alat
8	Gloves	Alat
9	Shaker	Alat
10	Geldoc EZ (Bio-Rad)	Alat
11	ddH ₂ O/aquades	Bahan
12	Laemmli sample buffer	Bahan
13	β-mercaptoethanol	Bahan
14	Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels	Bahan
15	Running Buffer Tris-Glycine-SDS	Bahan
16	Sampel Protein	Bahan
17	Marker Protein	Bahan
18	Membran PVDF	Bahan
19	Blocking Buffer	Bahan
20	Washing buffer (PBS 1X dan 0,1 % Tween 20)	Bahan
21	Tween 20	Bahan
22	HRP substrate	Bahan
23	Antibodi Primer dan Sekunder	Bahan

B. Prosedur kerja :

Protein Separation

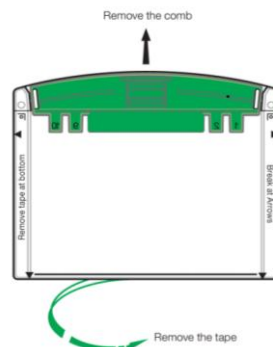
a. Sample assesment

1. Ukur konsentrasi protein dengan menggunakan metode Bradford atau Lowry.
2. Setelah diperoleh konsentrasi yang diinginkan maka tahap berikutnya adalah dengan menambahkan sample buffer yaitu laemmli sample buffer yang sudah ditambahkan β -mercaptoetanol ($50\ \mu\text{l}$ β -mercaptoetanol + $950\ \mu\text{l}$ laemmli sample buffer) sebanyak 1 : 1.
3. Selanjutnya, protein yang sudah ditambahkan laemmli sample buffer dipanaskan dalam *water bath* atau *heat block* ($>80^{\circ}\text{C}$) selama 3-5 menit.

b. Setting Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels

Mini-PROTEAN® TGX™ precast gels merupakan gel SDS-PAGE yang sudah siap digunakan untuk loading sampel. Gel ini berbasis stain-free dan non-stain free yang dapat diwarnai menggunakan coomasie brilliant blue. Setting gel dilakukan dengan tahapan ssebagai berikut :

1. Ambil gel dari penyimpanan suhu dingin ($2-8^{\circ}\text{C}$), kemudian buka plastik pelindung gel.
2. Buka sisir / *comb* dengan cara menarik ke atas pada bagian tengah *comb* (Gambar 1) secara hati-hati, agar tidak terjadi pada gel yang akan digunakan.



Gambar 1 Cara membuka Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels

3. Buka seal/ tape yang berwarna hijau pada bagian bawah cassette gel (Gambar 1) agar gel dapat digunakan.
4. Isi well dengan running buffer (Tris-Glycine-SDS) menggunakan syringe atau pippet hingga memenuhi semua well.
5. Susunlah cassette gel pada *assembli module* Mini-PROTEAN® Tetra Cell
6. Gel siap diisi dengan sample dan marker untuk proses SDS-PAGE

c. Running SDS-PAGE

1. Masukkan gel ke dalam chamber yang terdapat pada mini protean tetra cell, tambahkan running buffer kemudian comb dibuka.
2. Sample protein dan marker dimasukkan ke dalam sumur/well

3. Setelah marker protein dan sample protein dimasukkan, tutup chamber mini protean tetra cell. Hubungkan kabel mini protean tetra cell dengan power supply.
4. Running gel pada 100-120 V, selama 60-90 menit.
5. Setelah selesai, matikan power supply. Lalu angkat cassette yang mengandung gel kemudian keluarkan gel menggunakan pembuka gel (Mini-PROTEAN® Cassette Opening Lever) yang sudah disediakan.
6. Untuk verifikasi hasil SDS-PAGE dapat dilakukan dengan proses pewarnaan dengan *coomasie blue* atau menggunakan coomassie Bio-Safe
7. Setelah proses pewarnaan, lakukan langkah destaining/pencucian gel
 - a. Untuk penggunaan coomasie blue gunakan larutan destaining dengan komposisi :
 - a. Methanol 100 mL + Asam asetat glasial 100 mL + Aquades 800 mL
 - b. Untuk penggunaan coomasie bio safe bisa menggunakan aquades
8. Setelah itu visualisasi dilakukan di bawah UV transiluminator imager.

d. Visualisasi hasil SDS - PAGE

Untuk verifikasi hasil SDS-PAGE dapat dilakukan tanpa pewarnaan jika menggunakan TGX stain-free gel dan dapat langsung diamati menggunakan *imager* yang dapat mendeteksi gel stain-free (Geldoc/Chemidoc MP Biorad). Namun, jika tidak memiliki imager tersebut dapat dilanjutkan dengan proses pewarnaan dengan *coomasie blue*, tetapi gel hasil pewarnaannya tidak dapat digunakan untuk proses transfer (sehingga harus melakukan running 2 gel).

Protein Transfer

1. Siapkan alat transblot turbo, nyalakan power on pada bagian samping alat.
2. Buka penutup pada kaset (dengan cara memutar tombol hijau).
3. Siapkan membran PVDF, kertas filter (bisa menggunakan Trans blot Transfer Pack) dan gel hasil running SDS-Page.
4. Masukkan kertas filter, membran PDVF kemudian di tekan menggunakan *roller* untuk menghindari terbentuknya gelembung.
5. Gel hasil SDS-PAGE disimpan di atas membran PVDF, kemudian di tekan menggunakan *roller* untuk meratakan gel agar menempel merata pada membrane.
6. Tambahkan kertas filter, dan roller kembali.
7. Tutup kaset, sampai terdengar bunyi klik. Selanjutnya masukkan kaset yang telah diisi oleh membran transfer dan gel ke dalam mesin TBT.
8. Pilih prosedur yang sesuai dengan penelitian yang dilakukan, jika menggunakan gel buatan sendiri (hand cast) waktu yang dibutuhkan untuk transfer 7 menit sedangkan jika menggunakan TGX precast gel waktu yang dibutuhkan hanya 3 menit.
9. Tekan "Run", maka proses akan berjalan secara otomatis.

10. Setelah selesai, ambil membran PVDF dan masukkan kedalam larutan blocking atau washing buffer.
11. Untuk membersihkan alat yang telah digunakan cukup dengan membilas kaset pada air mengalir.

Verifikasi Hasil Transfer

Post transfer gel (membran PVDF) diletakkan diatas tray stain free tray (jika menggunakan metode stain free) dan jika tidak menggunakan metode stain free, verifikasi dapat dilakukan dengan mewarnai / merendam membran blot dengan menggunakan pewarna Ponceau staining selama 5 menit (lakukan pewarnaan ini sebelum melakukan blocking). Setelah proses analisis membran cuci membran larutan yang mengandung 5% asetic acid (v/v) selama 5 menit, transfer membran ke dalam air dan cuci sebanyak 2 kali. Membran siap untuk di deteksi.

Deteksi Protein

1. Membran hasil transfer diblocking dengan cara direndam dalam larutan 1x PBS + 5 % non fat dry milk + 0,1 % tween 20 selama 15-30 menit atau menggunakan blocking buffer + 0.1% tween 20.
2. Selanjutnya membran diinkubasi dengan larutan antibody primer. Larutan antibody primer dibuat dengan cara melarutkan antibody primer dalam PBS atau skim milk dengan ketentuan pengenceran tertentu (sesuai dengan petunjuk manufaktur). Inkubasi dapat dilakukan pada suhu ruang selama 1 jam atau lebih (sesuai dengan petunjuk manufaktur).
3. Setelah selesai inkubasi, membran dicuci 3X selama 10 menit dalam larutan washing buffer (PBS 1X/TBS 1X dan 0,1 % tween 20).
4. Inkubasi antibody sekunder, kemudian cuci kembali menggunakan *washing buffer* seperti pada tahap c.
5. Tahap berikutnya adalah dengan protein deteksi, bisa dilakukan dengan menggunakan colorimetry atau chemiluminascence.

Selama Mencoba