

Spesifitas dan Sensitifitas Antibodi Anti eRF3 Ragi *Saccharomyces cerevisia*

Sandra Hermanto

Program Studi Kimia FST UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
Shmt75@yahoo.com

Abstrak

Protein eRF3 (*eukaryotic release factor-3*) merupakan salah satu protein yang berperan pada proses terminasi translasi. Protein ini bersama-sama dengan eRF1 (*eukaryotic release factor-1*) saling berinteraksi membentuk kompleks *release factor* dalam memediasi pelepasan rantai polipeptida dari ribosom. Untuk memahami mekanisme terminasi translasi dalam sistem eukariot telah dilakukan studi struktur fungsi eRF1 yang dilanjutkan dengan studi interaksi *in vitro* eRF1 mutan dan eRF1 *wild type* dengan eRF3. Namun demikian, hasil deteksi dari studi interaksi *in vitro* sulit terdeteksi secara kuantitatif. Untuk dapat mengkuantifikasi pita-pita eRF3 hasil studi interaksi *in vitro* diperlukan antibodi anti eRF3. Konstruksi antibodi anti eRF3 telah dilakukan, tetapi antibodi ini belum terkarakterisasi dengan baik. Tahapan selanjutnya dilakukan analisa *Western blot* dengan cara mengukur tingkat spesifitas dan sensitifitas antibodi anti eRF3 terhadap protein eRF3. Spesifitas antibodi ditentukan berdasarkan kemampuan antibodi ini dalam mengenali epitop protein eRF3 dari berbagai protein yang terdapat pada *crude extract* ragi, sedangkan sensitifitasnya ditentukan melalui variasi jumlah antigen (eRF3) yang berinteraksi dengan antibodi tersebut. Hasil analisa *Western blot* menunjukkan spesifitas antibodi anti eRF3 masih relatif baik dimana antibodi ini mampu mengenali epitop protein eRF3 yang ditandai dengan munculnya pita tunggal (76,6 kDa) setelah antibodi ini direaksikan dengan *crude extract* ragi yang mengandung protein eRF3. Sensitifitas antibodi ini juga relatif tinggi, karena antibodi ini mampu mendeteksi protein eRF3 hingga jumlah yang relatif rendah (0,77 ng). Namun demikian antibodi ini belum cukup mampu mendeteksi protein eRF3 yang secara alamiah terdapat pada *crude extract* ragi. Hal ini kemungkinan besar disebabkan karena level ekspresi eRF3 dalam sel ragi yang relatif rendah jika dibandingkan dengan protein ribosom.

Kata kunci : eRF3, interaksi *in vitro*, analisis *Western blot*, *crude extract*, antibodi anti eRF3

Abstract

eRF3 (*eukaryotic release factor-3*) was one of proteins which has role of translation termination in eucaryotic system. This protein together with eRF1 forms an active release factor *complex* to mediate the release of polypeptide chain from ribosome. To elucidate the mechanism of translation termination in eukaryotic system, the structure function of eRF1 was studied through the construction and characterization of eRF1 mutants, followed by *in vitro* interaction assay. However, the eRF3 bands, resulted from *in vitro* interaction assay was slightly hard to quantify. In order to quantify the eRF3 bands from *in vitro* interaction, it need an anti eRF3 antibody. This antibody was constructed and prepared. However, the characterization of antibody was not carried out yet. This research was focused on the characterization of the antibody through *Western blot* analysis to measure the specificity and sensitivity of the antibody. Specificity of antibody measured by the ability of antibody to recognize an *epitope* of eRF3 from the mixture of proteins in the *crude extract*. In another way, sensitivity measured by variation of the level of antigen can be detected with the antibody. To get the high level of specificity and sensitivity, the anti eRF3 antibody used in this research was purified. *Western blot* analysis show that the specificity of anti eRF3 antibody was selectively recognized an *epitope* of eRF3 in the *crude extract* proved by the present of a single band detected on the exposed hyper film. The sensitivity of an anti eRF3 antibody has been able to detect down to 0.77 ng of an over expressed eRF3. However, this antibody could not satisfied a detection of endogenous eRF3 contained in the *crude extract* of wild type yeast.

Keyword : eukaryotic release factor (eRF3), *in vitro* interaction assay, *Western blot*, *crude extract*, anti eRF3 antibody.

1. PENDAHULUAN

eRF3 (*eukaryotic release factor-3*) merupakan salah satu protein yang berperan penting dalam proses terminasi translasi pada sistem eukariot. Protein ini bersama-sama dengan eRF1 (*eukaryotic release factor-1*) saling berinteraksi membentuk *complex release factor* untuk memediasi pelepasan rantai polipeptida dari ribosom (Stansfield, *et. al.*, 1995).

Sejauh ini mekanisme terminasi translasi dalam sistem eukariot belum banyak memberikan informasi yang memadai untuk mengungkap mekanisme tingkat molekuler. Hasil studi difraksi sinar X yang dilakukan terhadap kristal eRF1 manusia telah menemukan adanya kemiripan struktur antara molekul eRF1 dengan molekul tRNA^{Phe} ragi (Song, *et. al.*, 2000). Kemiripan kedua molekul bukan hanya pada bentuknya secara keseluruhan tetapi juga pada ukuran (27x71 Å untuk eRF 1 manusia dan 22x70 Å untuk tRNA^{Phe} ragi) dimana domain satu, dua dan tiga molekul eRF1 masing-masing mirip dengan daerah *anticodon loop*, tangkai penerima gugus amino asil dan t pada molekul tRNA.

Kemiripan masing-masing domain diduga juga mencerminkan kemiripan fungsinya. Kedua gugus dapat berinteraksi dengan pusat aktif enzim *peptidil transferase*, meskipun hasil reaksinya berbeda. Sementara itu adanya motif urutan residu asam amino NIKS pada ujung domain 1 dari eRF1 diduga merupakan bagian yang berperan dalam pengenalan kodon terminasi dan domain 3 yang berada pada ujung C molekul eRF1 diperkirakan merupakan bagian yang berinteraksi dengan eRF3, (Song, *et. al.*, 2000).

Selanjutnya, untuk mengungkap lebih jauh mekanisme interaksi yang terjadi antara eRF1 dengan eRF3 telah dilakukan studi interaksi *in vivo* eRF1 dengan eRF3 yang dilanjutkan dengan studi interaksi *in vitro* (Stansfield, *et. al.*, 1995; Pauskin *et. al.*, 1997). Hasil studi tersebut menunjukkan adanya interaksi yang dapat dibuktikan secara eksperimen. Pengkajian selanjutnya dengan mutan-mutan hasil delesi (Merkulova, *et. al.*, 1999), mengindikasikan bahwa interaksi antara eRF1 yang berasal dari manusia dengan eRF3 terjadi pada ujung-ujung karbonilnya. Bahkan lebih rinci disebutkan bahwa daerah yang penting untuk interaksi tersebut terletak pada residu asam amino ke 478-530 dan 628-637

pada eRF3, serta residu 411-415 pada eRF1.

Tahapan berikutnya dari studi yang telah dilakukan untuk mengungkap mekanisme interaksi eRF1 dan eRF3 adalah dengan menginteraksikan eRF1 mutan yang merupakan produk dari gen SUP45 dan eRF1 *wild type* dengan eRF3 secara *in vitro* (Subandi, 2002). Interaksi ini bertujuan untuk menguji keberartian mutasi pada protein eRF1 dan pengaruhnya terhadap interaksi dengan eRF3.

Interaksi *in vitro* antara eRF1 mutan dan eRF1 *wild type* dengan eRF3 telah dilakukan melalui modifikasi metode kromatografi afinitas dengan resin Talon, dimana eRF1 mutan dan eRF1 *wild type* dimodifikasi dengan ujung (His)₆ agar dapat terikat pada resin sebelum diinteraksikan dengan eRF3. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya penurunan interaksi antara eRF1 mutan dengan eRF3 dibandingkan dengan eRF1 *wild type*. Walaupun demikian, secara kuantitatif penurunan interaksi ini belum dapat ditentukan secara pasti karena pita-pita yang muncul relatif tipis. Untuk itu diperlukan antibodi anti eRF1 dan antibodi anti eRF3 agar dapat dilakukan analisis *Western blot* sehingga diharapkan dapat mengkuantisasi hasil interaksi antara kedua protein tersebut.

Untuk dapat mengkuantisasi hasil interaksi ini, kedua antibodi tersebut harus dikarakterisasi dengan cara menguji tingkat spesifitas dan sensitifitasnya. Karakterisasi antibodi anti eRF3 dilakukan melalui analisis *Western blot* dengan menguji spesifitas dan sensitifitas antibodi ini terhadap protein eRF3 yang terdapat pada *crude extract* ragi *Saccharomyces cerevisiae*.

2. METODE PENELITIAN

Alat-alat

Peralatan gelas dan bukan gelas yang meliputi *erlenmeyer*, *becker glass*, *tabung Eppendorf* 1.5 mL *pipet mikro* 0.5-2.5 µL, 0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, untuk pengambilan larutan dalam skala mikro.

Autoclave (H7101 China) untuk sterilisasi peralatan gelas dan bahan tahan panas serta *Millipore* (Miller-GP, 0,22 µM) untuk sterilisasi bahan cair tidak tahan panas. *Laminar flow* (Labonco Co., USA), *Spektrofotometer UV-Vis* (Hitachi, Model 100-60) untuk penetapan OD dan analisa kuantitatif protein. *Sentrifuge* (Beckman J2-HS dan Jouan MR-

1822), *Mikrosentrifuge* (Biofuge Fresco Heraus, Germany) untuk pemisahan sel dari suspensi dan pengendapan sel, *Vortex* (Fisher Vortex Genie) untuk pemecahan sel, *Mini-Protean II Slab Cell Electrophoresis* (Bio Rad), *Inkubator* (Thermolyne ROSI 1000), *Shaker Incubator* (Dubnoff GCA) untuk menginkubasi biakan dalam media padat dan cair, *Freezer* model 8571 (forma Scinetific Inc., USA) untuk menyimpan kultur pada suhu -70°C . *Trans-blot semi dry Western blot* seri 221 BR17045 (Bio Rad).

Bahan

Bahan mikrobiologi : *Saccharomyces cerevisiae*, S6 killer sensitive strain, *wild type*. Bahan-bahan kimia pro-analisa (p.a) yang biasa digunakan dalam penelitian rekayasa genetik seperti media YEPD (1% yeast extract, 2% bacto peptone dan 2% D-glukosa), Tris-HCl pH 7.4, PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoride), Reagen Lowry, *Folin-ciocalteu* 1N, Tris-Cl pH 8.8 dan 6.8, SDS 10%, APS 10%, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlen diamin), akrilamid dan bis-akrilamid, *Coomassie Blue* 0,1% untuk staining protein, *Western blot Enhanced Chemiluminescence* (ECL) RPN2108 (Amersham pharmacia biotech).

Peremajaan ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Peremajaan ragi dilakukan dengan menumbuhkan sel ragi pada media padat YEPD (*yeast extract bacto peptone D-glucose*) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 jam.

Isolasi protein *crude extract* ragi

Satu koloni tunggal ragi ditumbuhkan dalam media cair YEPD dan diinkubasi pada suhu 30°C dengan pengocokan 150 rpm sampai mencapai OD_{600} : 0.5. Biakan dipindahkan ke dalam 50mL media produksi dan diinkubasi kembali hingga OD_{600} : 1.5-2. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 2300g selama 10 menit, pellet sel dicuci dengan buffer lisis dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2300g selama 15 menit. Pelet sel diresuspensi dengan buffer lisis + PMSF dan dimasukkan ke dalam tabung sorval. Kedalam suspensi ditambahkan *glass bead* sampai batas miniskus bawah dan di vortex selama 10 menit. Setelah itu suspensi dimasukkan ke dalam pendingin dengan suhu -70°C selama 30 menit dan dicairkan perlahan-lahan, kemudian divortex

kembali selama 10 menit. Suspensi disentrifugasi kembali dengan kecepatan 16000g pada suhu 4°C selama 30 menit. Selanjutnya supernatan dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C .

Pemurnian protein eRF3 dengan elektroelusi (Biorad, 2000)

Protein hasil isolasi dimurnikan dalam tabung elektroeluter yang dilengkapi dengan membrane yang telah dicuci dalam buffer elusi yang mengandung NaN_3 (Natrium azida) pada suhu 60°C selama ± 1 jam. Protein yang akan dimurnikan dipisahkan terlebih dahulu dengan elektroforesis SDS-PAGE. Potongan gel dari protein target dimasukkan ke dalam tabung elektroeluter. Elusi dilakukan dengan arus 8-10 mA selama 3-5 jam. Hasil elektroelusi yang terdapat di bagian atas membran diambil dengan menggunakan mikropipet dan disimpan dalam tabung eppendorf.

Penentuan Kadar Protein eRF3

Penentuan kadar protein dilakukan menurut metode Lowry et. Al., 1959 (*Method of Enzymology*, vol. 182), yakni dengan menggunakan 1 mL larutan A (20mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 30mM Na-sitrat) dan 50 mL larutan B (0,1M Na_2CO_3 dan 0,1M NaOH). Campuran reaksi dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya larutan D (regen Folin ciocalteu 1 N) sebanyak 0,25 mL ditambahkan ke dalam campuran reaksi, dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan selama 30 menit. Campuran reaksi diukur pada λ 750nm dan konsentrasi protein ditentukan dengan kurva standar bovine serum albumin (BSA).

Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate poliacrilamide gel electrophoresis*) dilakukan dengan menggunakan metode standar (Sambrook, 1989) dengan menggunakan alat *Mini-Protean II Slab Cell Electrophoresis* (Bio Rad). Sampel protein didenaturasi dengan buffer sample (Tris-Cl 150mM pH 6.8, SDS 6.25%, β -merkaptotanol, gliserol 25%, bromophenol blue 2,5 mM) dengan perbandingan protein dan buffer 4:1, dan dididihkan selama 10 menit serta disentrifugasi selama 5 menit. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 150

volt selama 45 menit. Untuk staining protein digunakan *Coomassie brilliant blue* 0.1% (w/v).

Analisis Western blot (Biorad, 2000)

Analisis *Western blot* dilakukan melalui tiga tahap yaitu tahap pertama, transfer protein dari gel ke matriks dengan menggunakan *Trans-blot semi dry Western blot* seri 221 BR17045 (Bio Rad). Membran yang digunakan adalah nitroselulosa ECL. Transfer protein dilakukan pada tegangan 150 volt selama 30-45 menit. Proses transfer ini harus bebas dari gelembung udara. Membrane dicuci dengan buffer TBS (*Tris buffer Saline*) selama 2x10 menit. Tahap kedua, immunoblotting dengan antibody primer dan antibody sekunder dimana membran yang telah dicuci dengan buffer TBS diinkubasi dengan antibody primer (1/1000 v/v) dalam *blocking buffer* selama 1 jam pada suhu kamar. Membran hasil inkubasi dengan antibody primer dicuci kembali dengan buffer TBS selama 2x10 menit dan diinkubasi kembali dengan antibody sekunder (1/10000 v/v) dalam *secondary antibody dilution buffer*. Selanjutnya tahap ketiga adalah deteksi hasil immunoblotting dengan reagen ECL (*Enhanced Chemiluminescence*). Membran yang telah terbungkus dalam plastic diletakkan dalam hiperkaset dan diekspos pada negative film dalam ruang gelap selama 10-15 menit dan direndam dalam larutan *developer* selama 5 menit, air 1 menit dan larutan *fixer* 2 menit.

Pengenceran antibody primer dan antibody sekunder

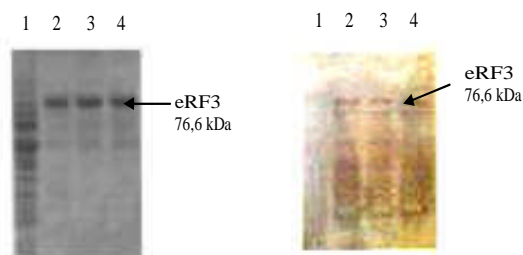
Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi anti eRF3 yang diperoleh dari kelinci yang telah disuntik dengan antigen (eRF3) hasil overekspresi gen SUP35 ragi *Saccharomyces cerevisiae* dalam sel *E. coli* BL21. Selama proses immunoblotting antibodi ini diencerkan dengan blocking buffer (3% BSA dalam TBS dan 0.05% Tween 20) dengan perbandingan 1:500 – 1:1.000 (v/v). Sedangkan antibodi sekunder (antibodi anti IgG) yang telah dikonjugasikan dengan enzim *Horse Raddish Peroxidase* (*HRP-conjugated secondary antibody*) diencerkan dalam *dilution buffer* (10% skim milk dalam TBS (10 mL tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *crude extract* ragi

Isolasi *crude extract* ragi S6 *wild type* dilakukan dalam media YEPD dimana dari 100 mL kultur yang telah diinkubasi dengan OD₆₀₀ :1.8 diperoleh ekstrak kasar sebanyak 3.5 mL dengan konsentrasi 1.7 mg/mL. Penggunaan nilai OD₆₀₀:1,8 dimaksudkan agar kultur sel ragi sudah mendekati fase stasioner, dimana pada keadaan tersebut protein eRF3 sudah terekspresi secara optimal, sedangkan penggunaan *crude extract* ragi yang masih segar dilakukan untuk menguji tingkat spesifitas antibodi anti eRF3 dalam mengenali epitop protein eRF3.

Dari hasil elektroforesis SDS-PAGE yang telah dilakukan terlihat adanya pita-pita protein yang muncul pada posisi antara 20 – 220 kDa dengan level ekspresi protein yang beragam (gambar 1a). Hal ini mengindikasikan bahwa protein yang diperoleh dari hasil isolasi kemungkinan besar masih utuh dan belum terdegradasi sehingga bisa digunakan untuk pengujian spesifitas dan sensitifitas antibodi.



Gambar 1. (a) Hasil elektroforesis SDS-PAGE (b) Hasil Western Blot (1: crude extract, 2-4 : eRF3 hasil IMAC)

Pemurnian Protein eRF3

Untuk menguji tingkat sensitifitas antibodi anti eRF3 diperlukan protein eRF3 dengan tingkat kemurnian yang tinggi. Protein eRF3 yang digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian tingkat sensitifitas antibodi adalah eRF3 hasil pemurnian dengan kromatografi IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*).

Prinsip pemurnian protein dengan IMAC didasarkan pada interaksi reversibel antara rantai samping residu asam amino pada suatu protein dengan ion logam transisi yang teramobilisasi. Pada proses pemurnian ini digunakan residu asam amino histidin yang difusikan pada protein eRF3 sebagai protein target yang akan dimurnikan. Sebagai

pengkhat ion logam digunakan *Cobalt based IMAC resin* yang dirancang khusus untuk memurnikan protein rekombinan yang berekor His₆ atau dikenal dengan resin Tallon (Clontech, 1999). Resin Tallon mengandung sepharose 6B sebagai fase diam, pengkhat NTA dan ion Co²⁺.

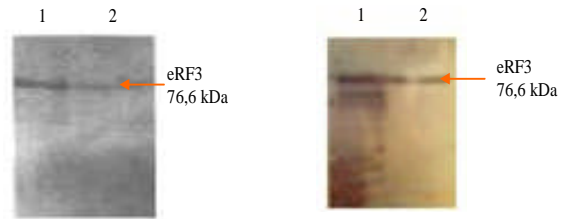
Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan tingkat kemurnian eRF3 yang relatif tinggi jika dibandingkan dengan protein *crude extract* ragi. Walaupun demikian, dari hasil pemurnian ini masih terdapat pita-pita lain yang muncul selain pita eRF3. Hal ini mengindikasikan kemungkinan adanya protein selain eRF3 atau protein eRF3 tersebut yang sudah terdegradasi secara parsial. Dengan analisa *Western blot* (1b) terlihat bahwa antibodi anti eRF3 mampu mengenali protein eRF3 yang ditandai dengan munculnya pita-pita yang cukup jelas pada kisaran 76,6 kDa. Namun demikian selain dapat mendeteksi pita-pita eRF3, antibodi tersebut mampu mengenali pita-pita lain yang terdeteksi dibawah 76,6 kDa sedangkan pada *crude extract* tidak ada pita yang muncul.

Hal ini mengindikasikan bahwa protein eRF3 sudah terdegradasi secara parsial sehingga bagian-bagian protein ini masih dikenali oleh antibodi anti eRF3 sebagai bagian dari epitop eRF3. Dugaan ini diperjelas dengan tidak munculnya pita-pita lain selain pita eRF3 di atas kisaran 76,6 kDa, sedangkan untuk analisa *Western blot* pada *crude extract* mengindikasikan kemungkinan jumlah protein eRF3 yang relatif sangat rendah atau tidak ada sehingga sukar dikenali oleh antibodi anti eRF3. Untuk mengkonfirmasi hal tersebut, perlu dilakukan pengujian antibodi anti eRF3 terhadap protein eRF3 murni atau yang telah dimurnikan lebih lanjut sampai batas minimal hasil deteksi yang masih dapat dikenali oleh antibodi tersebut (kontrol positif).

Protein hasil pemurnian dengan IMAC dimurnikan lebih lanjut dengan cara elektroelusi dengan harapan agar pita-pita yang muncul relatif lebih spesifik dan sensitifitas antibodi dapat diketahui secara lebih baik. Sebelum proses elektroelusi, protein hasil pemurnian IMAC dielektroforesis terlebih dahulu dengan SDS-PAGE dan hasilnya dibandingkan dengan protein hasil pemurnian dengan elektroelusi.

Hasil elektroforesis SDS-PAGE (2a) dilanjutkan dengan analisa *Western blot* (2b)

menunjukkan bahwa eRF3 hasil kromatografi IMAC masih menunjukkan pita-pita lain yang

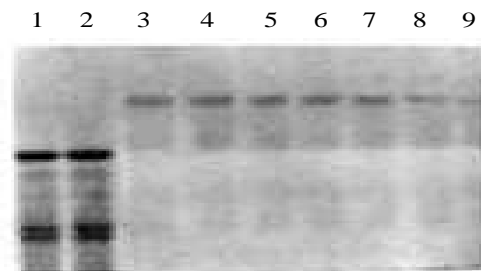


Gambar 2. (a) SDS-PAGE eRF3 hasil IMAC (1) & elektroelusi (2), (b) Hasil Western Blot eRF3 hasil IMAC (1) dan elektroelusi (2)

muncul selain pita eRF3 sedangkan untuk hasil elektroelusi, pita protein eRF3 yang muncul adalah tunggal dan tidak ada pita-pita lain di atas maupun bawah kisaran 76,6 kDa. Hal ini merepresentasikan bahwa protein eRF3 hasil elektroelusi sudah relatif murni dan belum terdegradasi, sehingga pada tahapan berikutnya protein ini dapat digunakan untuk pengujian tingkat sensitifitas antibodi anti eRF3.

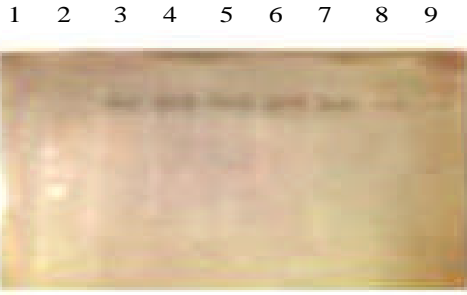
Pengujian tingkat spesifitas dan sensitifitas antibodi anti eRF3

Pengujian tingkat spesifitas antibodi anti eRF3 dilakukan dengan menambahkan protein eRF3 hasil elektroelusi terhadap *crude extract* ragi. Cara ini dilakukan dengan harapan tingkat spesifitas antibodi dapat diketahui dengan melihat ada tidaknya interaksi yang terjadi antara antibodi anti eRF3 dengan protein target dalam lingkungan protein-protein lain dengan jumlah yang lebih beragam. Hasil



Gambar 3a. SDS-PAGE eRF3 pengenceran 1-10 kali (1-2) *crude extract* 34µg, (3-4) eRF3 7,7µg, (5-7) eRF3 3,85µg, (8) eRF3 1,54µg (9) eRF3 0,77µg

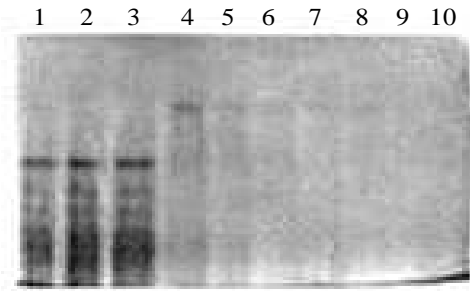
elektroforesis SDS-PAGE (3a) yang dilanjutkan dengan analisa *Western blot* (3b) menunjukkan adanya pita tunggal (76,6 kDa) yang muncul dari hasil analisa *Western blot*. Hal ini menyarankan bahwa antibodi anti eRF3 cukup spesifik dalam mengenali epitop eRF3.



Gambar 3b. Hasil Western Blot (1-2) crude extract 34 μ g, (3-4) eRF3 7,7 μ g, (5-7) eRF3 3,85 μ g, (8) eRF3 1,54 μ g (9) eRF3 0,77 μ g

Tahapan selanjutnya adalah pengujian tingkat sensitifitas antibodi anti eRF3, dimana parameter sensitifitas antibodi ini dapat ditentukan berdasarkan level deteksi antibodi tersebut terhadap antigennya. Oleh karena itu untuk menguji adanya eRF3 dalam *crude extract* ragi diperlukan eRF3 murni sebagai kontrol positif. Pengujian pertama dilakukan dengan menggunakan pengenceran eRF3 murni 1 kali sampai 10 kali. Protein hasil pengenceran tersebut selanjutnya dilektroforesis dalam SDS-PAGE (gambar 3a) dan dilakukan analisa *Western blot*. Hasil analisis *Western blot* (gambar 3b) menunjukkan pita tunggal yang cukup jelas untuk protein eRF3 hasil pengenceran 10 kali (0,77 μ g). Namun demikian untuk pengujian terhadap protein *crude extract* tanpa penambahan eRF3 murni belum menunjukkan tingkat sensitifitas yang cukup signifikan dimana dari hasil analisis yang diperoleh tidak ada pita yang muncul untuk kedua lajur tersebut.

Untuk mengkonfirmasi tingkat sensitifitas dan level deteksi antibodi anti eRF3 selanjutnya dilakukan pengujian terhadap protein hasil pengenceran sampai 1000 kali dan hasilnya menunjukkan bahwa intensitas pita hasil deteksi masih menunjukkan tingkat sensitifitas antibodi yang cukup baik hingga pengenceran 1000 kali (gambar 4). Hal ini mengindikasikan bahwa antibodi anti eRF3 masih mengenali protein eRF3 walaupun dalam jumlah yang relatif rendah (7,7 ng). Sebaliknya untuk pengujian terhadap *crude extract* ragi tanpa penambahan eRF3 murni (lajur 2) masih belum menunjukkan adanya pita yang terdeteksi



Gambar 4. SDS-PAGE eRF3 pengenceran 10-1000 kali (1-2) crude extract 34 μ g, (3) crude extract + eRF3 7,7 ng (4) eRF3 1,54 μ g, (5) eRF3 0,77 μ g, (6-8) eRF3 77ng (9) eRF3 7,7ng

sebagai representasi pita eRF3. Ada dua kemungkinan yang dapat dijadikan alasan, pertama jumlah eRF3 yang terdapat pada *crude extract* kemungkinan secara alamiah terdapat dalam jumlah yang relatif rendah. Hal ini diperkuat dengan informasi hasil penelitian lain yang menyebutkan bahwa level ekspresi eRF3 ragi secara alamiah hanya sekitar (1:20) jika dibandingkan dengan protein ribosom (Stansfield, et. Al., 1995).

Sebagai perbandingan dari beberapa studi literatur yang telah dilakukan, diperoleh tingkat sensitifitas beberapa antibodi terhadap masing-masing antigennya (Tabel 4.1). Tingkat sensitifitas antibodi relatif berbeda bergantung pada jumlah antibodi primer dan jenis protein yang digunakan sebagai antigennya. Antibodi dengan level deteksi relatif paling tinggi (anti β -galaktosidase) memiliki sensitifitas 30 kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan antibodi anti eRF3 yang hanya dapat mendeteksi sampai 0,77 ng. Namun demikian jika dibandingkan dengan antibodi anti MAP-Kinase, sensitifitas antibodi anti eRF3 jauh lebih sensitif (130 kali), sehingga untuk keperluan studi interaksi eRF1 dengan eRF3, sebaiknya penggunaan antibodi ini perlu diperhatikan terutama dalam jumlah, waktu inkubasi, pencucian dan waktu expose agar diperoleh kualitas hasil deteksi yang lebih baik. Disamping itu juga penggunaan antigen yang digunakan sebaiknya tidak terdegradasi secara molekuler agar hasil deteksi yang diperoleh dapat lebih optimal.

Tabel 1. Tingkat Sensitifitas Beberapa Antibodi

Antigen	Antibodi primer	Level deteksi	Jumlah Ab primer	Sumber
Protein Kinase	Anti-MAP Kinase	0,1 µg	0,5 µg/mL (1:2000)	http://www.upstate.com/Western
Tubulin	Antibodi anti tubulin (RPN1169)	1,6 ng	5 µg/mL (1:200)	Amersham Biotech Inst Manual, p. 547. 1999
β-galaktosidase	Anti β-galaktosidase	25 pg	0,2 µg/mL (1:5000)	Promega note Magazine 35, Feb 1992

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa data yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa antibodi anti eRF3 memiliki tingkat spesifitas yang relatif baik karena antibodi ini mampu mengenali epitop protein eRF3 dari sekian banyak protein yang terdapat pada *crude extract* ragi *Saccharomyces cerevisiae*. Antibodi anti eRF3 juga memiliki tingkat sensitifitas yang relatif tinggi karena antibodi ini terbukti mampu mendeteksi eRF3 hingga 0,77 ng. Namun demikian sensitifitas antibodi anti eRF3 ini belum cukup baik dalam mendeteksi keberadaan protein eRF3 yang secara alamiah terdapat dalam *crude extract* ragi. Hal ini kemungkinan besar disebabkan karena level ekspresi eRF3 dalam sel ragi yang relatif rendah jika dibandingkan dengan protein ribosom.

DAFTAR PUSTAKA

- Biorad, (2000), *Electroeluter Instruition Manual*, Biorad Laboratories, USA.
- Hames, B. D., (1998), *Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach*, 3rd ed., Oxford University Press, New York, USA.
- Harlow, E. D., and Lane, D., (1999), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour aboratory, USA.
- Eaglestone, S., Cox, B., and Tuite, M.F. (1999). *Translation Termination Efficiency can be Regulated in Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *The EMBO Journal*, 18, 1974-1881.
- Merkulova, T. I., Frolova, Lazar, M., Camons, J., and Kisselev, L., (1999), *Terminal Domains of Human Translation Factor eRF1 and eRF3 Mediate Their In Vitro Interaction*, *IFEBs Letters*, 443, 41-47.
- Frolova, L., Simonsen, J., Merkulova, T., and Litvinov, D., (1998). *Functional Expression of Eukaryotic Polypeptide Release Factors 1 and 3 By Means of Baculovirus/insect Cells and Complex Formation Between the Factors*, *J. Biochem.*, 256, 36-44.
- Stansfield I., John, K.M., and Tuite, M.F., (1995). *The end in sight terminating translation in eukaryotic*, trend in *Biochemistry Science*, 20, 489-491.
- Merkulova, T.I., Frolova, Lazar, M., Camons, J., and Kisselev, L., (1999). *Termination domains of human translation factor eRF1 and eRF3 mediate their in vitro interaction*, *IFEBs Letters*, 443, 41-47.
- Suharti, (2002). *Construction of Anti eRF3 Antibody from eRF3 Saccharomyces cerevisiae*, Thesis Magister, ITB.
- Song, H. P., Mugnier, A. K., H. M. Webb, Evan D. R., and Tuite, M. F., (2000), *The Crystal Structure of Human Eukaryotic Release Factor eRF1 – Mechanism of Stop Codon Recognition and Peptidyl-tRNA Hidrolysis*, *Cell* 100, 311-321.