



TINJAUAN TEKNIK DIFRAKSI UNTUK KRISTALOGRAFI PROTEIN

A. Purwanto

Puslitbang Iptek Bahan - BATAN, Kawasan Puspipetek Serpong, Tangerang
purwanto@programmer.net

ABSTRAK

TINJAUAN TEKNIK DIFRAKSI UNTUK KRISTALOGRAFI PROTEIN. Di Indonesia, pemanfaatan teknik difraksi untuk kristal protein masih relatif muda dibandingkan dengan untuk bahan industri karena ukuran butiran kristal yang relatif besar sehingga diperlukan peralatan difraksi sudut kecil dengan resolusi memadai. Di lain pihak, peningkatan publikasi protein *database* internasional di abad ke-20 mendekati kurva eksponensial. Peningkatan drastis ini merupakan akibat dari pentingnya struktur bahan untuk pemahaman sifat dan pengembangan bahan tersebut secara mikroskopik yang akhirnya menunjang bidang kedokteran dan farmasi. Metoda, peralatan, perangkat analisis dan *database* struktur kristal protein dibahas secara umum sehingga diharapkan dapat menimbulkan kerjasama pemanfaatan teknik difraksi untuk kristalografi protein baik dalam segi peralatan maupun bahannya.

ABSTRACT

AN OVERVIEW OF DIFFRACTION TECHNIQUE ON PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY. In Indonesia, the use of the diffraction technique for protein crystallography is relatively young compared to those of industrial materials, especially due to bigger grains in which small angle diffraction instruments with enough resolution are needed. On the other hand, the deposition of the international protein database has increased exponentially during the 20-th century. This dramatic increase took place due to the importance of the materials structure in order to gain the understanding of the properties and to develop better materials microscopically, which then support medical and pharmaceutical area. Methods, instruments, analysis software and database for protein crystallographic structures are highlighted in view of possible collaborations to explore the diffraction of the protein crystals from the instrumental or materials point of view.

PENDAHULUAN

Kristalografi protein merupakan cabang khusus kristalografi yang mempelajari struktur 3-D makromolekul biologi melalui teknik difraksi pada kristal tunggal bahan tersebut. Dahulu, kristal tunggal protein diperoleh hanya untuk protein globular. Sekarang, makromolekul biologi lainnya, seperti t-RNA, *polysaccharide* dan *polynucleotide* menghasilkan kristal yang sesuai untuk analisis difraksi sinar-X. Salah satu contoh sumbangan kristalografi protein berkaitan dengan virus penyebab AIDS (*Human Immunodeficiency Virus - HIV*) [1] yang sangat bermanfaat untuk kedokteran dan farmasi.

Walaupun kristal protein telah dikenal sejak awal 20, baru sekitar 1960 struktur pertama myoglobin dan haemoglobin dipahami dengan teknik difraksi. Resolusinya terutama dimungkinkan dengan pengembangan teknik penggantian isomorf. Sejak saat itu, banyak kemajuan teoritis dan teknis terjadi, diantaranya adalah penggunaan dispersi anomali, penggantian molekular dan pengembangan teknik osilasi

untuk koleksi data untuk kristal berukuran sel satuan besar. Pada akhir tahun 1970-an pengembangan kemampuan komputer memungkinkan *refinement* pada ruang kisi balik. Sementara itu, fasilitas grafik yang semakin canggih dan murah memungkinkan pengembangan perangkat lunak grafik. Sekarang, banyak informasi struktur 3-D yang berasal dari eksperimen seperti difraksi, mikroskop elektron dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) pada molekul biologi seperti protein, asam nukleat dan karbohidrat disimpan dalam arsip *database public domain* PDB [2]. PDB dikelola oleh *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB) [3], departemen kimia, *State University of New Jersey*, Amerika, yang merupakan konsorsium nirlaba dengan tujuan untuk memperbaiki pemahaman mengenai sistem biologi melalui studi struktur 3-D dari makromolekul biologi. Berbagai kerjasama seperti "*Protein Structure Initiative*" dari *National Institute of General Medical Sciences* [4], "*New York Structural Genomics Research Consortium* [5]" dan proyek genom struktural Jerman [6]

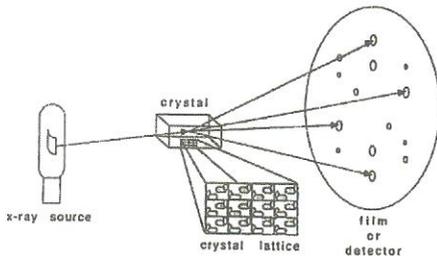
“Proteinstrukturfabrik” mengarah pada program penentuan struktur protein secara rutin, cepat dan efisien.

Pada makalah ini dibahas metoda, peralatan, perangkat lunak analisis dan *database* struktur kristal protein yang semakin berkembang dewasa ini. Hal ini diharapkan mendorong semangat kerjasama untuk memanfaatkan teknik difraksi di tanah air baik dari segi peralatan maupun bahan sehingga akhirnya turut membantu kemajuan bidang kedokteran dan farmasi, seperti yang telah dilakukan oleh Prof. Sangkot Marzuki dan timnya dari Institut Eijkman untuk Biologi Molekuler, Jakarta.

TEORI

Teknik Difraksi

Faktor struktur terdiri dari amplitudo dan fasa. Jika keduanya diketahui, kerapatan elektron yang menghasilkan gelombang difraksi dapat dibuat berdasarkan analisis Fourier. Namun, dalam eksperimen difraksi, hanya amplitudo yang dapat diukur sedangkan fasanya hilang. Oleh karenanya, kita tidak mendapatkann bayangan langsung dari struktur dalam kristal. Untuk menginterpretasikan struktur, kita perlu mengukur arah dan intensitas (atau amplitudo kuadrat) dari masing-masing sinar-X terdifraksi, dan kemudian menyimpulkan fasanya. Hal ini merupakan problem fasa dalam kristalografi.



Gambar 1. Skema konfigurasi pengukuran difraksi pada kristal.

Jika tidak ditemukan protein dengan struktur mirip yang sudah diperoleh, struktur perlu ditentukan *ab initio*. Untuk itu, kristal diturunkan dengan menggunakan atom metal berat. Jika hanya sedikit ion metal berada dalam kristal, struktur metal berat dapat ditentukan dengan analisis Patterson. Jika kristal tetap tidak terganggu (*isomorf*), teknik *Multiple Isomorphous Replacement* dapat menggali struktur metal berat untuk menentukan fasa untuk protein.

Analisis Patterson

Jika amplitudo dan fasa dari faktor struktur diketahui, distribusi atom dalam sel satuan dapat dihitung untuk semua refleksi *hkl* dalam bentuk kerapatan

elektron untuk masing-masing titik x, y, z dalam sel satuan dengan menggunakan deret Fourier:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(h, k, l)| \exp[i\phi(hkl) - 2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (1)$$

Disini, refleksi dengan indeks (*hkl*) mencakup bola dalam ruang kisi balik. Ahli kristalografi protein terkadang menyebut peta kerapatan elektron sebagai Fourier.

Namun, pada tahapan ini, hanya amplitudo faktor struktur $|F(\mathbf{h})|$ yang dapat diukur, sementara fasa $\phi(\mathbf{h})$ belum diketahui. Untungnya, fungsi Patterson dapat dihitung dengan menggunakan amplitudo teramati tanpa mengetahui fasanya. Hal ini akan menghasilkan distribusi vektor interatomik dalam sel satuan untuk semua refleksi *hkl* sebagai fungsi dari kerapatan Patterson untuk masing-masing titik u, v, w dalam sel satuan:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(h, k, l)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad (2)$$

Ahli kristalografi protein sering menyebut perhitungan peta Patterson sebagai Patterson, walaupun sintesis Fourier digunakan untuk perhitungan.

Puncak dalam fungsi Patterson terjadi pada titik ujung vektor antar semua pasangan posisi atom, sehingga berkaitan langsung dengan vektor interatomik. Misalkan dua atom berada dalam sel satuan dengan koordinat x_1, y_1, z_1 dan x_2, y_2, z_2 ; Patterson akan menunjukkan sebuah puncak pada titik uvw sesuai dengan hubungan

$$\begin{aligned} u &= x_1 - x_2 \\ v &= y_1 - y_2 \\ w &= z_1 - z_2 \end{aligned} \quad (3)$$

namun juga mempunyai sebuah puncak lain di

$$\begin{aligned} u &= x_2 - x_1 \\ v &= y_2 - y_1 \\ w &= z_2 - z_1 \end{aligned} \quad (4)$$

Karena keduanya merupakan vektor dengan panjang yang sama namun arah berlawanan, Patterson akan menampilkan simetri inversi tambahan (lihat Gambar 2). Simetri Patterson dapat diterangkan dengan grup ruang simorfik.

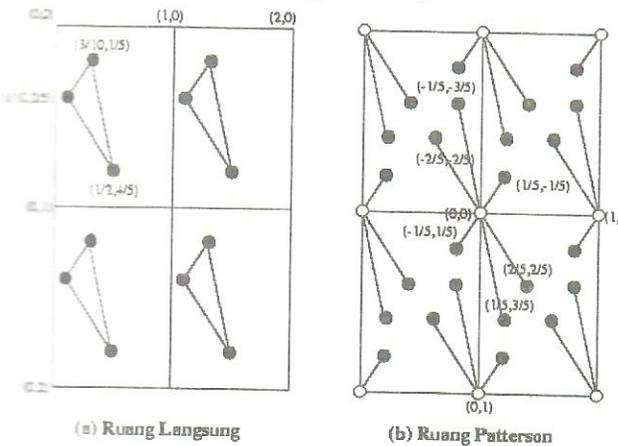
Terdapat 2 sifat Patterson yang perlu dipertimbangkan untuk membandingkannya dengan Fourier:

1. Sel satuan dalam ruang riil dan ruang Patterson adalah identik. Jika sel satuan mengandung N atom, Patterson akan menunjukkan N^2 puncak, berkaitan dengan vektor N yang muncul untuk masing-masing N atom. Vektor dari suatu atom ke dirinya sendiri

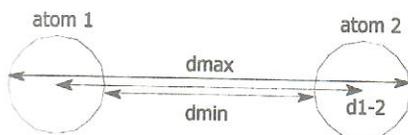
mempunyai panjang 0, sehingga atom N mempunyai puncak titik awal yang besar. Sel satuan Patterson akan mengandung $N^2 - N$ puncak tersebar diseluruh sel. Contoh dengan struktur sederhana mangandung $N=3$ atom dalam sel satuan dengan grup ruang $P1$. Hal ini menghasilkan $N^2 - N = 6$ puncak per sel tanpa memperhitungkan puncak titik awal. Untuk makromolekul, N berorder 1000 s/d 10000. Peta Patterson akan mengandung banyak puncak yang saling tumpang tindih.

Hal ini mengakibatkan puncak Patterson kurang tajam dibandingkan dengan puncak Fourier (lihat Gambar 3 untuk $N=3$).

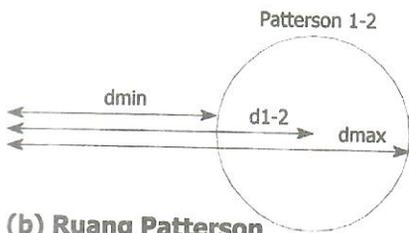
Kombinasi dari dua sifat di atas membuat Patterson untuk makromolekul tidak dapat diinterpretasikan.



Gambar 2. Empat sel satuan dengan 3 atom persel-satuan, (a) ruang langsung, (b) ruang Patterson.



(a) Ruang Riil



(b) Ruang Patterson

Gambar 3. Dua atom berjarak d_{1-2} pada (a) ruang riil menjadi sebuah titik berjarak d_{1-2} dari titik acuan pada (b) ruang Patterson. Sebuah lagi dengan jarak $-d_{1-2}$ dari titik acuan tidak digambarkan pada (b).

Namun, dengan asumsi bahwa derivatif $|F_{PH}|$ dan amplitudo $|F_P|$ asli telah diskalakan dengan benar, peta Patterson yang dihitung dari amplitudo perbedaan isomorfus $|F_{PH}| - |F_P|$ menjadi kebanyakan kosong dalam

kasus N berorder 1-5. Hal ini memungkinkan analisis Patterson.

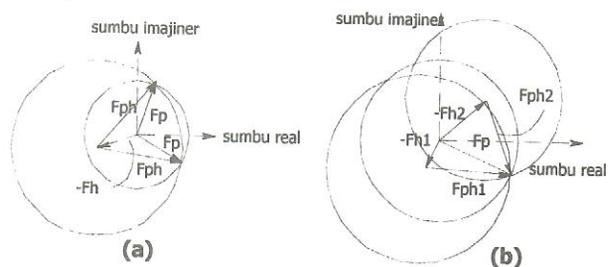
Metoda Penggantian Isomorf dan Hamburan Anomali

Pada dasarnya, metoda penggantian isomorf (*Isomorphous Replacement*) terjadi ketika metal berat direndam dalam kristal dan tidak mengganggu struktur kristal. Pada saat itu, faktor struktur dari protein F_P , turunannya F_{PH} dan atom berat F_H terhubung melalui persamaan kompleks:

$$F_H = F_{PH} - F_P \quad (5)$$

Amplitudo $|F_{PH}|$ dan $|F_P|$ dapat diukur, sehingga memberikan perbedaan isomorf $|F_{PH}| - |F_P|$. Koordinat atom metal berat dapat ditentukan dengan peta perbedaan Patterson. Hal ini akan menghasilkan F_H dan kemudian memungkinkan perhitungan fasa dari faktor struktur protein.

Karena satu turunan metal berat (*Single Isomorphous Replacement - SIR*) masih menghasilkan fasa yang belum pasti, perlu digunakan turunan kedua untuk mengatasinya. Sebenarnya secara teoritis satu turunan tambahan sudah memadai, namun karena adanya kesalahan pengamatan, biasanya dibutuhkan beberapa turunan (*Multiple Isomorphous Replacement - MIR*). Gambar 4 menunjukkan diagram perbedaan antara SIR dengan MIR.



Gambar 4. Konfigurasi ruang kisi balik untuk (a) S.I.R. dan (b) M.I.R.

Dalam hamburan anomali (*Anomalous Scattering - AS*), informasi fasa diperoleh melalui hamburan dari sebuah atom dimana frekuensi absorpsinya mendekati panjang gelombang dari radiasi datang sehingga terjadi resonansi. Misalkan, kisi absorpsi L_3 ($\approx 1,5368\text{\AA}$) dan L_2 ($\approx 1,3905\text{\AA}$) dari Holmium masing-masing sangat dekat dengan radiasi $\text{CuK}\alpha$ ($\approx 1,5368\text{\AA}$) dan $\text{CuK}\beta$ ($\approx 1,3922\text{\AA}$). Resonansi biasanya memadai untuk menghilangkan ketidak-pastian fasa dari satu turunan (*Single Isomorphous Replacement - SIRAS*). Untuk lebih dari satu turunan, perbedaan anomali lebih baik digunakan (*Multiple Isomorphous Replacement - MIRAS*).

Fungsi Kerapatan Probabilitas

Kesalahan pengamatan pada pengukuran difraksi mungkin timbul dari:

a. kesalahan pada intensitas,

- b. kesalahan pada posisi, fraksi dan faktor temperatur dari atom berat
- c. kurang isomorf, karena pergeseran atom protein dan molekul pelarut disekitar posisi atom berat, dan lain-lain.

Oleh karenanya, lingkaran pada Gambar 4 sangat mungkin tidak memotong pada titik yang tepat sehingga hasil perhitungan menjadi tidak akurat. Untuk itu digunakan fungsi kerapatan probabilitas (dengan mengabaikan faktor penguatan *zone*, sentrisitas dan non-isomorfisme):

$$P(\phi_p) = n \exp\left(-\sum_j \frac{\epsilon_j^2}{2E_j^2}\right) \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \epsilon_j &= F_{PH(obs)} - F_{PH(hitung)} \\ &= F_{PH(obs)} - \left| F_{P(obs)} \exp(i\phi_p) + F_H \right| \end{aligned} \quad (7)$$

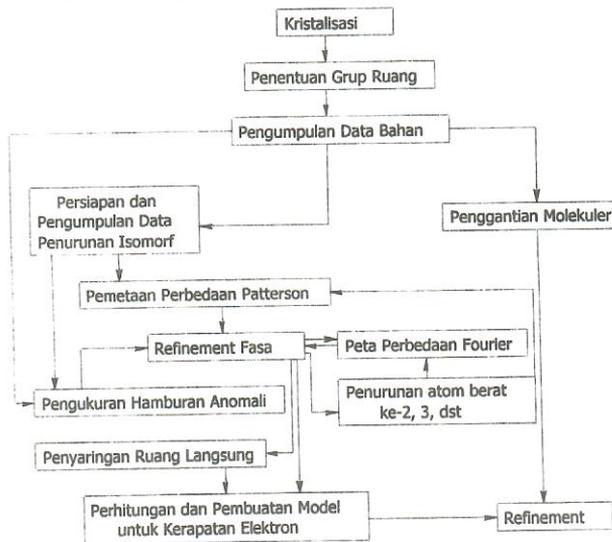
dengan n adalah faktor normalisasi dan *lack of closure* :

$$|F_{PH_j(hitung)}| = \sqrt{|F_P|^2 + |F_{H_j}|^2 + 2|F_P||F_{H_j}|\cos(\phi_{H_j} - \phi_P)} \quad (8)$$

nilai kuadrat mean dari residu *lack of closure* :

$$E_j = \left\langle \left(F_{PH(obs)} - F_{PH(hitung)} \right)^2 \right\rangle \quad (9)$$

Least-squares untuk *refinement* parameter atom berat (untuk kristalografi protein) secara rinci telah dibahas pada literatur [7]. Strategi *refinement* dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.



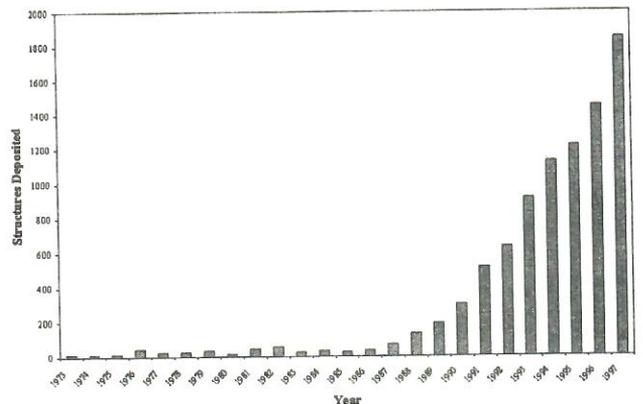
Gambar 5. Diagram sederhana dari tahapan penentuan struktur makromolekul.

Lihat Gambar 6 untuk rincian tahapan *Refinement*.



Gambar 6. Diagram *Refinement* yang merupakan bagian dari tahapan penentuan struktur makromolekul

Figure 1. Structures Deposited in the Protein Data Base



Gambar 7. Peningkatan struktur makromolekul yang disimpan dalam *database* PDB.

Database untuk Kristalografi Protein

Penggunaan *database* sangat berguna untuk pembuatan model, *refinement*, validasi dan analisis [8]. *Database* tersebut digunakan secara langsung atau tidak langsung (yaitu dengan menggunakan informasi yang diturunkan dari analisis *database*). Biasanya tahapan proyek seperti itu adalah

- a. pencarian literatur, misalnya dengan menggunakan *database* MEDLINE atau ISI.
- b. Jika urutan protein target tersedia, perbandingan urutan yang banyak dan perangkat analisis dapat digunakan. Misalkan, untuk menemukan (secara global atau lokal) protein *homologous*, program seperti BLAST [9] atau FASTA [10] dapat digunakan pada protein besar dan/atau *database*

nucleic acid seperti SWISS-PROT dan TrEMBL [11] dan GenBank [12].

- c. Untuk mengidentifikasi karakteristik urutan yang sesuai dengan struktur atau fungsi, PROSITE [13] atau ProDOM [14] dapat digunakan
- d. *Database* kristalisasi dan atom berat dapat digunakan ketika kristal dibuat untuk eksperimen difraksi.
 - Jika protein merupakan homologus dalam urutan dibandingkan dengan protein dengan struktur yang sudah diketahui, struktur tersebut dapat diambil dari Bank Data Protein [15], dan dapat digunakan untuk perhitungan penggantian molekuler.
 - Model dapat dibuat dari awal dengan menggunakan kerapatan elektron yang diperoleh dari eksperimen. Hal ini biasanya membutuhkan *database* struktur yang tidak terlalu besar.
- e. Ketika model telah siap untuk proses *refinement*, nilai target dari geometrinya dapat diturunkan dari analisis struktur kristal molekul kecil beresolusi tinggi, yang diperoleh dari CSD [16].
- f. Selama proses *rebuilding* dan *refinement*, metoda *database* dapat digunakan untuk memeriksa kemajuan dan untuk menemukan tempat dimana problem mungkin terjadi. Perangkat serupa dapat digunakan untuk mem-validasi model final, sebelum publikasi [17].
- g. Pada tahap akhir, *database* dapat digunakan untuk memeriksa kesamaan dari protein yang strukturnya sudah diketahui, misalkan berada pada level *overall fold* [18], atau pada level *loops* dan *active-site residues*.

Contoh struktur kristal protein lysozyme putih telur dari analisis sinar-X dengan resolusi 1,8Å [19] ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Struktur kristal protein lysozyme putih telur dan analisis sinar-X dengan resolusi 1,8Å [19].

FASILITAS

Secara internasional, banyak fasilitas difraksi tersedia, antara lain peralatan difraksi X-Ray biasa yang berasal dari *rotating anode*, Synchrotron X-Ray, Neutron yang berasal dari reaktor maupun dari spalasi.

Synchrotron adalah pemercepat partikel berbentuk melingkar yang menggunakan medan listrik untuk mempercepat partikel dan medan magnet untuk mengarahkan lintasannya menjadi melingkar. Ketika partikel seperti elektron atau positron berjalan sepanjang jalur melingkar dengan kecepatan cahaya, mereka kehilangan energi karena radiasi elektromagnet yang disebut sebagai radiasi synchrotron yang menghasilkan sinar-X dengan karakteristik:

- a. mempunyai distribusi spektral dengan daerah cakupan energi yang luas, sehingga memungkinkan teknik yang membutuhkan sinar-X dengan berbagai panjang gelombang,
- b. berkas berintensitas tinggi. Intensitas tersebut sering mengacu pada fluks yaitu jumlah photon persatuan waktu,
- c. berkas juga mempunyai kecermerlangan (*brilliance*) yang sangat tinggi sehingga sangat banyak jumlah photon yang dapat diarahkan pada daerah yang sangat sempit. Kecemerlangan tersebut merupakan intensitas per-satuan sudut ruang.

Keuntungan dari karakteristik tersebut untuk kristalografi makromolekuler dibandingkan dengan sumber X-Ray konvensional adalah:

- a. Penambahan besaran kecermerlangan dibandingkan generator konvensional X-Ray memungkinkan pengumpulan data yang sebelumnya memakan waktu sehari-hari menjadi menit.
- b. Peningkatan kecermerlangan juga berarti semakin kecil kristal yang dapat digunakan dibandingkan dengan kristalografi X-Ray konvensional.
- c. Struktur resolusi tinggi dapat diperoleh
- d. Karena berkas sangat terfokus, struktur dengan molekul sangat besar dapat diperoleh
- e. Teknik dispersi anomali majemuk (*Multiple Anomalous Dispersion - MAD*), yang membutuhkan pengukuran dengan panjang gelombang bervariasi, hanya dapat dilakukan di synchrotron. Pendekatan ini mempunyai banyak keuntungan terutama dikurangnya kebutuhan penggantian isomorfus.
- f. Karena intensitas tinggi, set data penuh dapat dikumpulkan dalam hitungan detik.

Studi oleh BIOSYNC (*Structural Biology Synchrotron Users Organization*) menunjukkan peningkatan struktur protein yang di publikasi (tidak terbatas dari data yang dari Synchrotron saja) dalam *Database Protein (PDB)* [20] (lihat Gambar 7) pada abad 20.

Peralatan difraksi sinar-X (konvensional) sudut kecil dapat pula digunakan, namun dengan modifikasi goniometer untuk cuplikan kristal tunggal sehingga dapat digunakan untuk mengukur difraksi sudut kecil beresolusi 700Å dengan cuplikan kristal tunggal. Contoh instrumen tersebut adalah SSRL BL 4-2, Universitas Stanford, Amerika yang telah digunakan untuk mengukur difraksi dari sistem kristal virus (grup ruang $R3$ dengan $a=325,7\text{\AA}$ dan $c=61,25\text{\AA}$).

Pertanyaan pertama yang diselesaikan dengan difraksi neutron adalah mengenai posisi atom H (seperti

deuterium) dan air atau molekul *surfactant* dalam kristal protein yang menghamburkan berkas sinar-X terlalu lemah untuk resolusi yang memadai [21]. Kedua, berdasarkan posisi atom H, diperoleh pemahaman mengenai pola ikatan hidrogen dan keadaan proton dari residue katalis yang merupakan hal penting untuk memahami reaktivitas enzim. Contoh yang baik mengenai lokalisasi dan *refinement* dari posisi atom H dengan menggunakan neutron diperoleh pada *refinement* struktur *cyclodextrin inclusion complexes* [22]. Contoh lokalisasi *surfactant* dengan difraksi neutron, yang tidak dapat diperoleh dengan difraksi sinar-X, adalah mengenai struktur *detergent* dalam OmpF porin dari *Eshericia coli* [23].

Difraktometer neutron resolusi tinggi (1,5Å) diperoleh dengan pengembangan *neutron-sensitive image plate*. Difraktometer pertama yang menggunakannya adalah difraktometer neutron Laue LADI di ILL (Grenoble, Perancis) yang menggunakan berkas neutron polikromatik [24]. Instrument kedua yang menggunakannya adalah difraktometer kristal tunggal

BIX-3 dengan berkas neutron monokromatik [25]. Perbandingan *signal-to-noise* meningkat karena pengurangan drastis dari sensitifitas γ pada *image plate*.

PERANGKAT LUNAK ANALISA DATA

Banyak perangkat lunak analisis tersedia di internet secara gratis dalam public domain, antara lain:

- Rasmol yang dikembangkan oleh Roger Sayle dari Glaxo, Inggris [26]. Alamat website <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>
- Protein Explorer, merupakan pengembangan lebih lanjut oleh Eric Martz pada tahun 2000 dengan kemampuan lebih dibandingkan Rasmol. Alamat website <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>
Lihat Gambar 9 untuk contoh keluarannya.

Input dari program tersebut adalah file ASCII Text dengan *file extension* pdb.

The screenshot displays the Protein Explorer software interface. The main window shows a 3D molecular model of the GAL4 protein-DNA complex. A 'Molecule Information - Netscape' window is open, displaying the following text:

GAL4 (RESIDUES 1 - 65) COMPLEX WITH 19MER DNA * [TRANSCRIPTION REGULATION]
*COMPND record from the PDB file may be truncated before [HEADER record])

For PDB ID Code **1D66**:
PDB file header.
RCSB Structure Explorer.
Nature of 3D Structural Data

PE: Sequences, Seq3D.

At the bottom of the interface, a status bar shows 'All 1,762' and 'Ready'. The 'Molecule Information' window also includes a 'Water' button and an 'S-S Bond' button.

The main interface includes a 'FirstView: 1d66.pdb' header, 'Protein Explorer © 2000 by Eric Martz', and a list of controls and instructions:

- Rotate the molecule by dragging on it with the mouse.
- Toggle Spinning
- Hide/Show Water
- Chains: Each chain of protein, DNA, or RNA is shown in a different color as a backbone trace.
- Ligands: When present, ligands, metals, carbohydrate, water, etc. ("hetero atoms") are spheres colored to identify the elements: C O N P S Fe (More elements)
- Disulfide bonds, when present, are shown between backbone traces, sulfur-colored.
- Identify any atom by clicking on it, noting the report in the window below.
- Explore More! About 1d66

At the bottom, there is a command window with the following data:

```
# Enter Commands Here
Clear ? Recall ^ v Message Control **
Number of Bridges ... 0
Number of Helices ... 6
Number of Bonds ..... 1812
Number of Atoms ..... 1707 (55)
Number of Groups .... 152 (55)
Number of Chains .... 5
Brookhaven Code ..... 1D66
```

Gambar 8. Contoh keluaran Protein Explorer

KESIMPULAN

Protein terbukti sangat berperan dalam kehidupan dan melibatkan pengetahuan lintas bidang antara lain: biologi, kedokteran dan farmasi untuk penelitian dan pengembangannya. Teknik penyiapan cuplikan dan pembuatan kristal tunggalnya sangat membutuhkan pemahaman dan pengalaman dalam bidang tersebut. Dilain pihak, teknik difraksi sangat bermanfaat untuk mempelajari struktur bahan termasuk bahan molekul dimana protein merupakan molekul khusus. Fasilitas teknik difraksi mulai dari sinar-X dan neutron dari reaktor sudah tersedia di Indonesia. Peralatan SANS dari BATAN secara prinsip dapat dimanfaatkan untuk kristalografi protein, walaupun lingkungan cuplikan termasuk goniometranya masih perlu dilengkapi. Kerjasama antara pihak yang mempunyai pengalaman dan pemahaman mengenai protein dan sintesisnya dengan pihak fasilitas difraksi sangat diperlukan untuk lebih meneliti dan mengembangkan protein secara khusus atau biologi molekuler secara umum. Hal ini diharapkan dapat menunjang bidang kedokteran dan farmasi di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] J. LESCAR, J. BRYNDA, P. REZACOVA, R. STOURACOVA, M. M. RIOTTOT, V. CHITARRA, M. FABRY, M. HOREJSI, J. SEDLACEK, DAN G. A. BENTLEY. *Protein Science*, 8, 2686-2696 (1999).
- [2] A. SALI. *Nature Struct. Biol.* 5, 1029-1032 (1998).
- [3] <http://www.rcsb.org/index.html>,
- [4] A. ZAPP MACHALEK. NIGMS - Structural Genomics Lay Summary, http://www.nigms.nih.gov/funding/psi/lay_summary.html
- [5] S. K. BURLEY, *Biophys. J.* 78, 19A (2000).
- [6] P. Bork. *Biophys. J.* 78, 19A (2000).
- [7] *Fundamentals of Crystallography*, edited by C. Giacovazzo, IUCr, Oxford Univ. Press, 1992, p. 549-551.
- [8] G. J. KLEYWEGT AND T. A. JONES, *Databases in protein crystallography*, *Acta Cryst. D*54, 1119-1131 (1998).
- [9] S. F. ALTSCHUL, W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS DAN D. J. LIPMAN, *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990).
- [10] W. R. PEARSON DAN D. J. LIPMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85, 2444-2448 (1988).
- [11] A. BAIROCH DAN R. APWEILER, *Nucl. Acids Res.* 25, 31-36 (1997).
- [12] D. A. DENSON, M. S. BOGUSKI, D. J. LIPMAN, DAN J. OSTELL, *Nucl. Acids Res.* 25, 1-6 (1997).
- [13] A. BAIROCH DAN P. BUCHER, *Nucl. Acids Res.* 22, 3583-3589 (1994).
- [14] E. L. L. SONNHAMMER DAN D. KAHN, *Prot. Sci.* 3, 482-492 (1994).
- [15] F. C. BERNSTEIN, T. F. KOETZLE, G. J. B. WILLIAMS, E. F. MEYER JR., M. D. BRICE, J. R. RODGER, O. KENNARD, T. SHIMANOUCI DAN M. TASUMI. *J. Mol. Biol.* 112, 535-542
- [16] F. H. ALLEN, S. BELLARD, M. D. BRICE, B. A. CARTWRIGHT, A. DOUBLEDAY, H. HIGGS, T. HUMMELINK, B. G. HUMMELINK-PETERS, O. KENNARD, W. D. S. MOTHERWELL, J. R. RODGERS, DAN D. G. WATSON. *Acta Cryst. B*35, 2331-2339 (1979).
- [17] M. W. MACARTHUR, R. A. LASKOWSKI DAN J. M. THORNTON. *Cur. Opin. Struct. Biol.* 4, 731-737 (1994).
- [18] L. HOLM DAN C. SANDER. *Prot. Struct. Funct. Genet.* 19, 165-173 (1994).
- [19] W. R. RYPNIEWSKI, H. M. HOLDEN, I. RAYMENT. *BIOCHEMISTRY* 32, 9851(1993).
- [20] <http://www.pdb.bnl.gov>, juga lihat H.M.BERMAN, J.WESTBROOK, Z.FENG, G.GILLILAND, T.N.BHAT, H.WEISSIG, I.N.SHINDYALOV, P.E.BOURNE, *The Protein Data Bank, Nucleic Acids Research* 2000, 28, 235-242.
- [21] U. MUELLER, D. PERL, F. X. SCHMIDT DAN U. HEINEMANN. *J. Mol. Biol.* 297, 975-988 (2000).
- [22] W. SAENGER DAN T. STEINER. *Acta Cryst. A*54, 798-805(1998).
- [23] E. PEBAY-PEYROULA, R. M. GARAVITO, J. P. ROSENBUSCH, M. ZULAUF DAN P. A. TIMMINS. *Structure*, 3, 1051-1059 (1995).
- [24] J. HABASH, et. al., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 93, 4313-4317 (1997).
- [25] N. NIIMURA, *Neutron in Biology*, edited by B. P. Schoenborn dan R. B. Knott, pp. 415-422, New York: Plenum Press (1996).
- [26] ROGER A. SAYLE DAN E. J. MILNER-WHITE, *RasMol: Biomolecular graphics for all*, *Trends in Biochemical Science (TIBS)*, September 1995, Vol. 20, No. 9, p.374.)

TANYA - JAWAB

Penanya : Marsongkohadi (Fisika - ITB)

Sifat makroskopik dan mikroskopik sangat berguna untuk penurunan sifat-sifat bahan dari konstanta, sehingga diperlukan model dan asumsi-asumsi. Bagaimana untuk kasus protein ?

Jawaban :

Secara umum, kasus protein dapat dikatakan analog dengan kasus logam untuk penurunan sifatnya. Teknik difraksi masih harus dikombinasikan dengan teknik lain berikut dengan penggunaan model yang sesuai untuk penurunan sifat bahan secara lengkap. Penerapan teknik difraksi secara langsung misalnya adalah penentuan posisi atom hidrogen yang banyak terdapat pada protein. Posisi atom hidrogen tersebut berperan dalam proses osmosis yang merupakan sifat makroskopik.

Penanya : Sri Wahyono (Universitas Sebelas Maret – Surakarta)

Seberapa jauh / Apa yang sudah dilakukan untuk mempelajari protein di P3IB tentang analisa Rietveld ?

Jawaban :

Kami di P3IB belum membuat/menerima cuplikan untuk dianalisis. Cuplikan tersebut diperlukan dalam bentuk kristal tunggal untuk memungkinkan pengambilan data dengan resolusi yang tinggi. Kami tidak mungkin membuat sendiri cuplikan protein tersebut, karena tingkat kesulitan yang cukup tinggi. Hal ini memerlukan kerjasama antar-instansi, misalnya dengan institut Eijkmann ataupun Puslitbang Bioteknologi. Untuk analisis, kita dapat menggunakan teknik difraksi dengan menggunakan SANS untuk penentuan butiran kristal atau sifat mesoscopic lainnya. Untuk penentuan posisi atom, peralatan difraksi kami masih harus di tingkatkan untuk memperoleh data dengan resolusi tinggi, misalnya dengan penggunaan *imaging plate* sebagai detektor. Perangkat lunak yang digunakan biasanya bukan menggunakan metoda Rietveld karena cuplikannya merupakan bahan kristal tunggal.

Penanya : Krisna Lumbanraja (P3TIR – BATAN)

Fasilitas apa saja yang dimiliki untuk penelitian protein di P3IB ?

Jawaban :

Selain SANS dan difraktometer neutron yang masih harus ditingkatkan resolusinya, kita mempunyai SAXS walaupun belum pernah digunakan. Kita dapat pula menggunakan incubator yang tersedia di P3IB untuk penyimpanan sementara cuplikan yang akan dianalisis.
