

QSAR STUDY OF 1,10-PHENANTHROLINE DERIVATIVES AS THE ANTIMALARIAL COMPOUNDS USING ELECTRONIC DESCRIPTORS BASED ON SEMIEMPIRICAL AM1 CALCULATION

Kajian QSAR Senyawa Antimalaria Turunan 1,10-Fenantrolin Menggunakan Deskriptor Elektronik Hasil Perhitungan Metoda Semiempirik AM1

Mustofa

Laboratorium Farmakologi & Toksikologi/Pusat Kedokteran Tropis,
Fakultas Kedokteran UGM

Iqmal Tahir, Jumina

Pusat Kimia Komputasi Indonesia Austria
Jurusan Kimia Fakultas MIPA UGM Jogjakarta

ABSTRACT

Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) analysis of 1,10-phenanthroline analogs as antimalarial drug has been conducted using atomic net charges (q) as predictors of their activity. Data of predictors are obtained from computational chemistry method using semi-empirical molecular orbital AM1 calculation. Antimalarial activities are taken as the activity of the drugs against plasmodium falciparum (FcM29-Cameroun) strain and are presented as the value of $\ln(1/IC_{50})$ where IC_{50} is an effective concentration inhibiting 50 % of the parasite growth. The results show that there is correlation between antiplasmodial activity and electronic structure as represented by a linear function of activity versus atomic net charges of N_1 , C_7 , C_{10} , C_{14} atoms on the 1,10-phenanthroline skeleton and is expressed by :

$$\log IC_{50} = -3,4398 - 14,9050 qN_1 - 8,5589 qC_{10} - 14,7565 qC_7 + 5,0457 qC_{11}$$

The equation is significant at 95% level with statistical parameters : $n = 13$; $r = 0,96275$; $r^2 = 0,92689$; $SE = 0,61578$ and $F(4,8) = 25,3556$.

Keywords: antimalarial drug; 1,10-phenanthroline; QSAR; antiplasmodial activity.

PENDAHULUAN

Penyebaran parasit yang resisten terhadap antimalaria, utamanya klorokuin, yang begitu cepat dan luas di hampir seluruh daerah endemik malaria, mendorong perlunya usaha untuk menemukan obat antimalaria baru [1]. Salah satu usaha menemukan antimalaria baru dapat dilakukan melalui farmakomodulasi senyawa antimalaria yang sudah dikenal aktivitasnya. Halofantrin merupakan antimalaria baru yang dikembangkan dari golongan fenantren. Halofantrin aktif melawan plasmodium yang resisten terhadap klorokuin [2.3]. Namun demikian karena ketersediaan hayatinya yang rendah, profil kinetiknya bervariasi, dan efek sampingnya pada jantung yang cukup membahayakan maka penggunaan halofantrin terbatas di negara tertentu utamanya di Afrika [4.5].

Dalam usaha menemukan antimalaria baru golongan fenantren yang lebih poten dan aman, Yapi *et al.* [6] dan Mustofa [7] berhasil melakukan modifikasi struktur senyawa tersebut dengan memasukkan atom nitrogen pada kerangka

fenantren. Dari 5 turunan diaza analog fenantren yang dievaluasi, golongan fenanthrolin-1,10 mempunyai aktivitas antiplasmodial paling baik dengan nilai IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) berkisar 2 μ M terhadap strain *Plasmodium falciparum* yang resisten klorokuin (strain FcB₁) maupun yang sensitif klorokuin (strain Nigerian). Pada penelitian selanjutnya, sekitar 13 senyawa baru turunan fenantrolin-1,10 telah berhasil disintesis dan diuji aktivitas antimalariannya. Namun demikian bagaimana Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas (HKSA) dari antimalaria baru turunan 1,10-fenantrolin tersebut belum pernah dikaji.

Kajian terhadap HKSA digunakan untuk mempelajari interaksi molekul suatu obat dengan reseptornya atau aktivitas biologis suatu molekul obat dengan peninjauan struktur elektronik atau aspek kimia kuantum molekul tersebut. Telah diketahui secara luas bahwa struktur elektronik suatu senyawa memiliki keterkaitan secara kuantitatif dengan aktivitas biologis atau sifat fisiknya. Kajian terhadap HKSA sangat membantu peneliti untuk memprediksi aktivitas biologis suatu

senyawa baru sebelum dilakukan studi eksperimental. Lebih jauh kajian ini sangat membantu dari segi ekonomis dan waktu dibandingkan apabila dilakukan langsung studi eksperimental [8]. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji HKSA senyawa turunan fenantrolin-1,10 yang hasilnya akan digunakan sebagai dasar untuk merancang senyawa baru yang mempunyai aktivitas antimalaria yang lebih aktif dan aman.

METODA

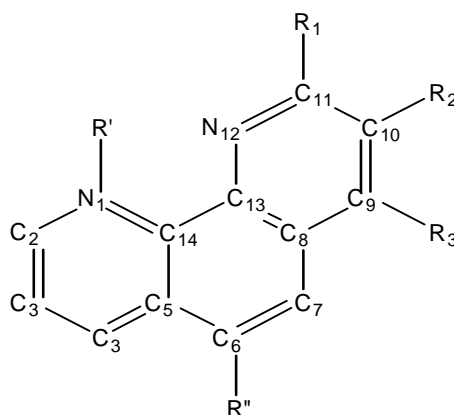
Bahan

Pada penelitian ini digunakan database struktur molekul dan aktivitas antiplasmodial (IC₅₀) dari 13 (tiga belas) senyawa turunan 1,10-fenantrolin tersubstitusi hasil penelitian penulis

sebelumnya [7]. Senyawa-senyawa tersebut selengkapnya disajikan dalam Tabel 1 dan strukturnya disajikan dalam Gambar 1.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini berupa perangkat lunak *HyperChem for Window versi 5.0* (Hypercube) dan *Statistica for Window versi 5.0*. Perangkat lunak *HyperChem* digunakan dalam perhitungan kimia kuantum untuk memperoleh data struktur elektronik setiap senyawa. Perangkat lunak *Statistica* digunakan untuk mengkaji HKSA. Perangkat keras yang digunakan berupa komputer Pentium II 400 MHz dengan RAM 64 MB.



Gambar 1 Struktur senyawa 1,10-fenantrolin tersubstitusi dan penomoran atom penyusun kerangka utama

Tabel 1 Data struktur turunan fenantrolin-1,10 dan aktivitas antiplasmodialnya (IC₅₀ dalam μM) pada strain Nigerian setelah 24 jam inkubasi.

No.	Substituen					IC ₅₀ (μM)
	R'	R''	R ₁	R ₂	R ₃	
1.	H	H	H	H	H	1,28
2.	H	NO ₂	H	H	H	1,37
3.	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	Cl	2,32
4.	CH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	Cl	0,16
5.	C ₂ H ₅	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	Cl	0,16
6.	C ₂ H ₄ OH	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	Cl	1,06
7.	C ₃ H ₇	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	Cl	0,15
8.	C ₇ H ₁₅	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	Cl	0,37
9.	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	Cl	0,71
10.	H	H	CH ₃	C ₂ H ₃	Cl	3,29
11.	CH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₃	Cl	0,35
12.	H	H	CH ₃	C ₂ H ₃	OH	6,08
13.	H	H	CH ₃			19,84

Prosedur Penelitian

Perhitungan struktur elektronik senyawa.

Untuk setiap senyawa turunan fenantrolin-1,10 yang digunakan sebagai bahan penelitian, dibuat struktur secara 2D dengan paket program *Hyperchem*. Selanjutnya ditambah dengan atom hidrogen pada setiap atom untuk melengkapi struktur sebenarnya dan dibentuk menjadi struktur 3D. Proses dilanjutkan dengan optimisasi geometri struktur berupa minimisasi energi molekul untuk memperoleh konformasi struktur molekul paling stabil. Metode semiempirik yang digunakan adalah AM1 dan batas konvergensi ditentukan berdasarkan pengamatan orientasi. Metode optimisasi berdasarkan metode Polak-Ribiero atau metode gradien sekawan. Setelah diperoleh struktur terstabil dilakukan perhitungan satu langkah dan selama perhitungan data direkam. Perhitungan *single point* ini juga menggunakan metode semiempirik AM1 dan kemudian dilakukan perhitungan muatan atom dengan metode analisis populasi Mulliken. Data yang diperoleh bisa dilihat pada file rekaman.

Kajian hubungan kuantitatif struktur aktivitas

Untuk kajian HKSA ini maka digunakan data logaritmik konsentrasi senyawa yang memberikan nilai log CI_{50} maksimal sebagai variabel tidak bebas dan sebagai variabel bebas muatan bersih atom pada rantai utama senyawa fenantrolin-1,10 tersubstitusi.

Muatan bersih atom yang dilibatkan hanya untuk atom pada struktur utama yaitu cincin diaza fenantren yang meliputi atom-atom N_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , N_{12} , C_{13} , dan C_{14} . Analisis statistika dilakukan dengan bantuan paket program *Statistica* dengan dasar analisis regresi multilinear dengan metode *stepwise-regression*.

Analisis statistik pertama kali dilakukan berupa analisis korelasi untuk variabel-variabel bebas dan dikaitkan dengan harga variabel tak bebas. Hasil perhitungan digunakan untuk menunjukkan urutan variabel bebas penting yang berfungsi sebagai prediktor. Analisis regresi multilinear dilakukan terhadap data output berupa parameter statistik meliputi koefisien korelasi r

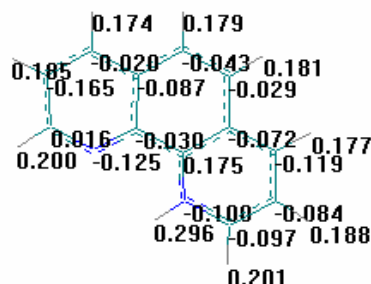
dan r^2 , standar deviasi (SE) dan harga F dengan memperhatikan harga p -level. Model persamaan regresi akan diperoleh dengan variabel terpilih untuk setiap kombinasi. Model-model ini sebagai persamaan prediksi alternatif untuk kajian HKSA. Semua model persamaan prediksi alternatif dianalisis dengan melakukan pengujian tiap model terhadap tiga belas senyawa fenantrolin-1,10 untuk memperoleh persamaan terbaik. Analisis dilakukan sehingga diperoleh model hubungan yang dinyatakan secara matematik untuk merepresentasikan nilai log CI_{50} sebagai fungsi linear dari harga-harga muatan bersih atom. Hubungan akhir dari kajian HKSA ini secara umum dinyatakan dengan persamaan regresi sebagai berikut :

$$\log(CI_{50}) = \sum_{j=1}^n k_j q_{j,i} + k_{j=n+1}$$

Notasi $q_{j,i}$ menyatakan harga muatan bersih atom untuk atom ke- j yang diperoleh dari perhitungan kuantum untuk setiap senyawa; i , k_j adalah konstanta persamaan regresi multilinear yang terkait dengan muatan atom ke- j , sedangkan n adalah jumlah atom pada kerangka struktur yang dilibatkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap-tahap yang dikerjakan dalam kajian HKSA meliputi (1) Rekapitulasi data aktivitas senyawa fenantrolin-1,10; (2) Rekapitulasi data struktur elektronik; (3) Korelasi struktur elektronik dan aktivitas antiplasmodial dan (4) Evaluasi model persamaan HKSA. Kajian ini diharapkan dapat menghasilkan jawaban tentang korelasi antara aktivitas antiplasmodial dari senyawa fenantrolin-1,10 dan struktur elektronik serta dapat menemukan persamaan yang menghubungkan secara kuantitatif antara aktivitas dan struktur elektronik. Pada Gambar 2 disajikan model struktur elektronik secara tiga dimensional untuk senyawa No. 4 turunan 1,10-fenantrolin (dalam bentuk ball & stick). Geometri struktur sudah teroptimisasi dengan nilai energi potensial permukaan mendekati keadaan global minimum.



Gambar 2 Struktur elektronik senyawa 1,10-fenantrolin

Tabel 2. Data log IC_{50} dan muatan bersih atom-atom penyusun senyawa fenantolin-1,10

No.	C_{log}	Log C_{log}	Muatan bersih atom (Coulomb)													
			N1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	N12	C13	C14
1	1,28	0,10721	-0,1046	-0,0952	-0,0848	-0,1218	-0,0694	-0,0305	-0,0374	-0,0911	-0,0174	-0,1674	0,0191	-0,1264	-0,0280	0,1746
2	1,37	0,13672	-0,0457	-0,0838	-0,1015	-0,0567	-0,0968	0,0085	-0,0970	-0,0001	-0,0288	-0,1485	0,0093	-0,1270	-0,0285	0,1363
3	2,32	0,36549	-0,1067	-0,0933	-0,0858	-0,1220	-0,0871	-0,0292	-0,0638	-0,0773	0,0105	-0,1058	0,0834	-0,1268	-0,0218	0,1667
4	0,16	-0,79588	-0,0517	-0,1060	-0,0834	-0,1246	-0,0878	-0,0356	-0,0553	-0,0799	0,0089	-0,1052	0,0444	-0,1334	-0,0048	0,1667
5	0,16	-0,79588	-0,0511	-0,1045	-0,0829	-0,1192	-0,0724	-0,0357	-0,0586	-0,0785	0,0087	-0,1039	0,0692	-0,1232	-0,0244	0,1728
6	1,06	0,02531	-0,0569	-0,0895	-0,0829	-0,1034	-0,0516	-0,0309	-0,0424	-0,0198	0,0189	-0,1422	0,0934	-0,1449	-0,0011	0,1638
7	0,15	-0,82391	-0,0491	-0,1047	-0,0864	-0,1201	-0,0203	-0,0363	-0,0684	-0,0785	0,0086	-0,1041	0,0698	-0,1236	-0,0228	0,1721
8	0,37	-0,43180	-0,0460	-0,1062	-0,0865	-0,1185	-0,0741	-0,0347	-0,0622	-0,0750	0,0011	-0,1019	0,0675	-0,1223	-0,0239	0,1718
9	0,71	-0,14874	-0,0939	-0,0967	-0,0853	-0,1120	-0,0739	-0,0258	-0,0567	-0,0631	0,0130	-0,0711	0,0715	-0,1262	-0,0213	0,1674
10	3,29	0,51720	-0,1303	0,0345	-0,1676	-0,0566	0,0001	-0,1212	-0,0589	-0,1040	0,0344	-0,0850	0,0878	-0,1842	-0,0268	0,0280
11	0,35	-0,45593	-0,0963	-0,0940	-0,0902	-0,1315	-0,0801	-0,0429	-0,0403	-0,0931	0,0191	-0,0617	0,0814	-0,1369	-0,0089	0,1678
12	6,08	0,78390	-0,1227	-0,0884	-0,0904	-0,1322	-0,0575	-0,0392	-0,0749	-0,1127	0,1809	-0,1304	0,0704	-0,1174	-0,0435	0,1789
13	19,84	1,29754	-0,0155	-0,0700	-0,1069	-0,1476	-0,0346	-0,0801	-0,0870	-0,0854	0,1831	-0,1202	0,0111	-0,0971	-0,0737	0,1539

Tabel 3. Korelasi variabel log IC_{50} terhadap muatan bersih atom.

Korelasi	q N1	q C2	q C3	q C4	q C5	q C6	q C7	q C8	q C9	q C10	q C11	q N12	q C13	q C14	log C_{log}
q N1	1,000	-0,526	0,468	0,212	-0,445	0,640	0,101	0,394	-0,698	-0,063	0,170	-0,011	0,352	0,327	-0,825
q C2		1,000	-0,982	0,601	0,670	-0,806	-0,130	-0,209	0,185	0,142	0,100	-0,723	0,470	-0,969	0,482
q C3			1,000	-0,616	-0,649	0,796	0,231	0,091	-0,163	-0,181	-0,026	0,671	-0,461	0,977	-0,425
q C4				1,000	0,067	-0,064	-0,233	0,409	-0,445	-0,110	-0,010	-0,697	0,662	-0,735	0,017
q C5					1,000	-0,845	0,111	-0,563	0,343	0,242	0,289	-0,438	0,276	-0,568	0,248
q C6						1,000	-0,068	0,549	-0,428	-0,336	-0,211	0,463	-0,241	0,713	-0,399
q C7							1,000	-0,575	-0,422	0,231	0,566	-0,371	0,482	0,166	-0,448
q C8								1,000	-0,418	-0,104	-0,546	0,250	-0,105	0,039	-0,161
q C9									1,000	-0,044	-0,140	0,370	-0,611	0,009	0,716
q C10										1,000	0,568	-0,241	0,320	-0,171	-0,308
q C11											1,000	-0,530	0,614	-0,102	-0,379
q N12												1,000	-0,925	0,783	0,110
q C13													1,000	-0,597	-0,455
q C14														1,000	-0,313
log C_{log}															1,000

Dalam perhitungan kimia komputasi digunakan metode semiempirik AM1. Metode ini dipilih karena merupakan metode perbaikan dari metode sebelumnya seperti MNDO [9] yang dapat memprediksi senyawa-senyawa yang mempunyai valensi banyak dengan ketepatan yang lebih baik [10]. Salah satu hasil perhitungan dengan menggunakan paket program *Hyperchem* versi 6.01 akan memberikan keluaran data berupa muatan bersih atom. Pada Tabel 2 disajikan data muatan bersih atom untuk atom karbon dan nitrogen dari cincin diaza fenantren pada tigabelas senyawa yang akan digunakan untuk analisis HKSA. Tabel 2 juga memuat nilai aktivitas antiplasmodial (IC₅₀) pada *P. falciparum* (strain nigerian) setelah inkubasi selama 24 jam antara kultur plasmodium dengan senyawa turunan fenantrolin-1,10, beserta nilai logaritmik dari harga IC₅₀.

Untuk melihat hubungan antar variabel lebih jauh maka dilakukan tinjauan korelasi antar variabel yang terlibat. Hal ini dilakukan utamanya untuk melihat tingkat pengaruh tiap-tiap muatan bersih atom terhadap nilai log IC₅₀. Nilai antar variabel dihitung dengan bantuan paket program statistika dan nilai korelasi antar variabel disajikan pada Tabel 3. Kualitas korelasi antara variabel ditunjukkan oleh nilai mutlak yang tersaji dalam tabel. Korelasi akan semakin kuat untuk data yang mendekati nilai |1|.

Dari tabel terlihat bahwa variabel bebas yang berpengaruh relatif cukup besar terhadap nilai log IC₅₀ adalah muatan atom qC₂-qC₃; qC₃-qC₁₄; qC₂-qC₁₄; qN₁₂-qC₁₃; qC₅-qC₆ dan qC₂-qC₈ dengan harga korelasi berturut-turut sebesar -0,982; 0,977; -0,969; -0,925; -0,846 dan 0,806. Harga korelasi

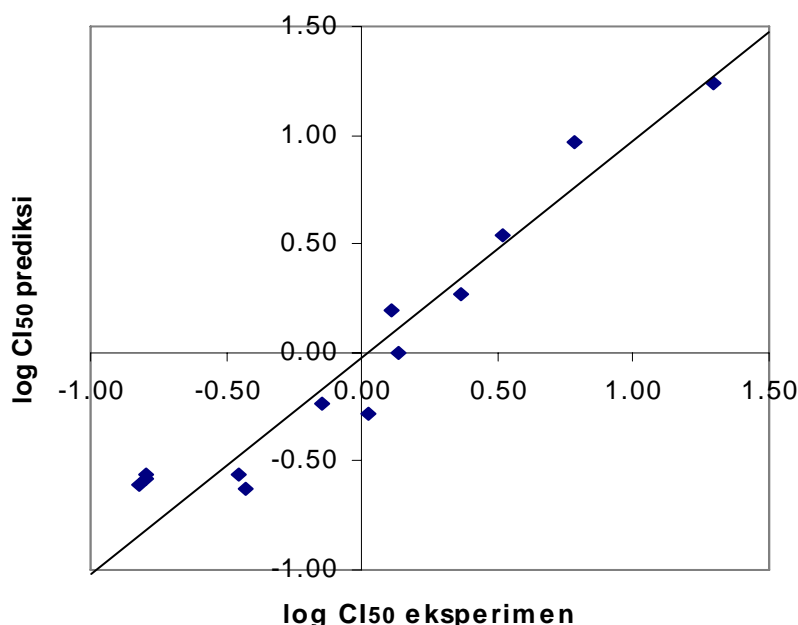
negatif menunjukkan keterkaitan secara negatif artinya efek variabel yang satu berbanding terbalik dengan variabel yang lain. Apabila dikaitkan dengan nilai log aktivitas antiplasmodial (log IC₅₀) maka yang mempunyai korelasi tertinggi adalah variabel muatan atom untuk atom-atom N₁; C₉; C₂; C₁₃; C₇; dan C₃ dengan harga korelasi berturut-turut masing-masing sebesar -0,825; 0,716; 0,482; -0,455; -0,448 dan -0,425.

Pemilihan model persamaan HKSA tidak cukup kuat hanya dengan menarik kesimpulan berdasarkan variabel yang berpengaruh terhadap aktivitas dengan melihat korelasi antar variabel. Untuk itu analisis statistik dilanjutkan dengan analisis regresi silang multilinear. Dari hasil analisis dengan metode *stepwise regression*, maka dapat ditentukan bahwa variabel berpengaruh adalah qN₁; qC₁₀; qC₇ dan qC₁₁. Persamaan HKSA yang diperoleh adalah :

$$\log IC_{50} = -3,4398 - 14,9050 qN_1 - 8,5589 qC_{10} - 14,7565 qC_7 + 5,0457 qC_{11}$$

Data statistik yang terkait adalah n = 13; r = 0,96275; r² = 0,92689; SE = 0,61578 dan F (4,8) = 25,3556.

Hasil perhitungan secara prediksi dekat dengan hasil perhitungan secara eksperimen. Perbandingan data nilai log IC₅₀ eksperimen dan log IC₅₀ prediksi disajikan dalam Gambar 3. Garis lurus yang ditunjukkan grafik merupakan garis hubungan ideal log IC₅₀ prediksi dengan log IC₅₀ eksperimen.



Gambar 3 Grafik hasil prediksi aktivitas senyawa 1,10-fenantrolin

Aktivitas antimalaria golongan diaza fenantren (1,10-fenantrolin) pertama kali diungkapkan oleh Yapi *et al* [6]. Sebelumnya 1,10-fenantrolin dikenal sebagai antibakteri yang bekerja dengan menghambat metalprotease pada bakteri tersebut [11, 12]. Penelitian mengenai HKSA senyawa ini menunjukkan bahwa aktivitas penghambat metalproteasenya ditentukan oleh substituen pada atom N pada posisi 1 (N_1) dan atom N pada posisi 10 (N_{10}) pada cincin diaza fenantren. Namun demikian menurut Yapi *et al* [6] dan Mustofa [7] aktivitas 1,10-fenantrolin sebagai antimalaria berbeda dengan aktivitasnya sebagai antibakteri dalam arti aktivitas antimalariannya tidak ditentukan oleh substituen pada dua atom N (N_1 dan N_{10}) pada cincin diaza fenantren. Hasil kajian HKSA pada penelitian ini mendukung hipotesis tersebut yang menunjukkan, sesuai dengan persamaan yang diperoleh, bahwa aktivitas antimalaria 1,10-fenantrolin ditentukan oleh substituen pada atom N_1 ; C_{10} ; C_7 dan C_{14} .

Berdasarkan persamaan hasil kajian HKSA di atas maka senyawa 1,10-fenantrolin dikatakan mempunyai aktivitas antiplasmodial yang menguntungkan apabila harga variabel tidak bebas $\log CI_{50}$ kecil. Hal tersebut dapat dipenuhi oleh senyawa turunan 1,10-fenantrolin yang memberikan pengurangan negatif muatan atom bersih pada N_1 ; C_{10} dan C_7 dan/atau peningkatan nilai negatif muatan atom bersih pada C_{14} .

KESIMPULAN

Setelah dilakukan penelitian dan pembahasan terhadap hasil penelitian maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Muatan bersih atom pada cincin fenantrolin-1,10 hasil perhitungan semiempirik AM1 dapat digunakan sebagai prediktor pada kajian HKSA.
2. Hubungan kuantitatif antara muatan bersih atom pada atom-atom penyusun kerangka utama senyawa 1,10-fenantrolin sebagai gambaran struktur elektronik menunjukkan hubungan kuantitatif linearistik yang nyata terhadap aktivitas antiplasmodial mengikuti persamaan :

$$\log IC_{50} = -3,4398 - 14,9050 qN_1 - 8,5589 qC_{10} - 14,7565 qC_7 + 5,0457 qC_{14}$$

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian UGM atas biaya penelitian yang diberikan melalui DIK MAK 5250.

DAFTAR PUSTAKA

1. Vial, H., and Ancelin, M. L., 1994, *Pathol. Biol.*, 42, 138-144.
2. Falade, C. O., Salaka, L. A., Sowunmi, A., Oduola, A. M., and Larcier, P., 1997, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91(1), 58-62.
3. Pradines, B., Mabika Mamfoumbi, M., Parzy, D., Owono Medang, M., Lebeau, C., Mourou Mbina, J. R., Doury, J. C., and Kombila, M., 1998, *Parasitology*, 117, 541 – 545.
4. Humberstone, A. J., Porter, C. J., and Charman, W. N., 1996, *J. Pharm. Sci.*, 85(5), 525 – 529.
5. Sowunmi, A., Falade, C. O., Oduola, A. M., Ogundahunsi, O. A., Fehintola, F. A., Gbotosho, G. O., Larcier, P., and Salako, L. A., 1998, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92(4), 446 – 448.
6. Yapi, A. D., Mustofa, Valentin, A., Chavignon, O., Teulade, J. C., Mallie, M., Chapat, J. P., and Blache, Y. 2000, *Chem. Pharm. Bull.*, 48(12), 1886-1889.
7. Mustofa, 2000, *In Vitro and In Vivo Activity of the Divers of Natural and Synthetic Antimalarial : Effect of Potentialisator and The Possibility of Mechanism of Actions. Disertasi*, University of Montpellier I, France.
8. Vinter, J. G. & Gardner, M, 1994, *Molecular Modeling and Drug Design*, The Macmillan Press Ltd., Houndmills.
9. Leach, A. R., 1996, *Molecular Modelling : Principles and Application*, Addison Wesley Longman Limited, Singapore.
10. Dewar, M. J. S., Zebisch, E. G., Healy, E. F., and Stewart, J. J. P., 1985, *J. Am. Chem. Soc.*, 10, 3902-3909.
11. Wallace, R. J., and McKain, N, 1996, *J. Appl. Bacteriol.*, 81(1), 42 - 47.
12. Wallace, R. J., Newbold, C. J., and McKain, N., 1996, *J. Appl. Bacteriol.*, 80, 425-430.