



**IDENTIFIKASI RESIDU KRITIS UNTUK KATALISIS
PADA β -LAKTAMASE KELAS C SECARA IN SILICO**

SKRIPSI

Asal:	Hal Jah Pembelajaran	Klass
Terima Tgl :	13 DEC 2007	541.39
No. Induk :		ALI
KLA IP / PENYALIN:	SRS	i

Oleh

Iqbal Wildan Alifi
NIM : 0118103011128

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER

2007



IDENTIFIKASI RESIDU KRITIS UNTUK KATALISIS
PADA β -LAKTAMASE KELAS C SECARA IN SILICO

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan studi pada jurusan Kimia
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

Iqbal Wildan Alifi
NIM : 0118103011128

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2007

Persembahan

Dengan segenap ketulusan hati, penulis mempersembahkan karya tulis ini untuk:

- *Ayahanda dan Ibunda tercinta, yang selalu menyayangi, melindungi, membimbing dan mendoakan setiap langkah yang kutempuh.*
- *Adikku tersayang Ruli dan Fika, yang telah menyemangatiku dalam menyelesaikan studi.*
- *Drs. Sudarko, Ph.D, yang telah memberikan banyak pengetahuan tentang dunia Teknologi Informasi.*
- *"Adik²ku" Icho, Ncit(Met Ultah), Ullly, Aix(dewasa dikit), Ciput(dimana kau?), Dayu(makasih printernya), Dee(Kau yang paling ngertiin aku) Thanks for your spirit.*
- *Sobat-sobatku Devit(thanks for all), Ardian, Dony, Rohmad dan Rofik(cepet nyusul ya..) dan semua anak-anak Kimia, terima kasih atas bantuan dan kerja samanya selama kebersamaan kita.*
- *Teman-teman senasib dan seperjuangan, Wawa dan syscampink crew, Koko(makasih komputernya), dan warga kontrakan bengawan solo(yang rukun).*
- *Pengajar-pengajarku di SDN 2 Genteng, SLTPN 1 Genteng, SMUN 2 Genteng, dan Universitas Jember, hanya Allah yang dapat memberikan balasan atas tugasmu yang mulia.*
- *Almaterku yang kubanggakan dan kujunjung tinggi.*

Motto

*Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan yang berilmu pengetahuan
beberapa derajat.*

(Q.S. Al-Mujadillah: 11)

Siapapun yang belum pernah membuat kekeliruan tidak pernah mencoba sesuatu yang baru.

(Albert Einstein)

Sukses itu tidak final sifatnya dan kegagalan itu tidak fatal sifatnya.

(Winston Churchill)

Janganlah puas kan inspirasi dan imajinasimu, dan janganlah menjadi hamba teladan diri sendiri.

(Vincent van Gogh)

*Begitu banyak hal indah dalam dunia ini yang dapat kita peroleh selama kita bersedia bekerja
untuk mendapatkannya. Namun karena keraguan dan ketidaktahuan, kita telah kehilangan
keberanian untuk mencoba dan kehilangan semua hal yang patut kita dapatkan*

(William Shakespeare)

If You Can Think Impossible Thought, You Can Do Impossible Things

(Yoram-Jerry)

Bantulah orang lain meraih sukses dan Anda pun ikut sukses

(Zig Ziglar)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Iqbal Wildan Alifi

NIM : 011810301128

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya Ilmiah yang berjudul : *Identifikasi Residu Kritis Untuk Katalisis Pada b-Laktamase Kelas C Secara In Silico* adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi mana pun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Oktober 2007

Yang menyatakan,



Iqbal Wildan Alifi

NIM 011810301128

SKRIPSI

IDENTIFIKASI RESIDU KRITIS UNTUK KATALISIS
PADA β -LAKTAMASE KELAS C SECARA IN SILICO

Oleh

Iqbal Wildan Alifi

NIM 011810301128

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Sudarko, Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Zulfikar, Ph.D.

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul *Identifikasi Residu Kritis Untuk Katalisis Pada β -Laktamase Kelas C Secara In Silico* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada

Hari : SELASA
Tanggal : 06 NOV 2022
Tempat : Fakultas MIPA Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,



Drs. Sudarko, Ph.D.
NIP 132 005 050

Anggota I



Drs. Siswoyo, M.Sc., Ph.D.
NIP 132 056 180

Sekretaris,



Drs. Zulfikar, Ph.D.
NIP 131 660 785

Anggota II



Suwardiyanto, S.Si., M.Si.
NIP 132 206 032

Mengesahkan

Dekan,



Ir. Sumadi, MS.
NIP 130 368 784

RINGKASAN

Identifikasi Residu Kritis Untuk Katalisis Pada β -Laktamase Kelas C Secara In Silico; Iqbal Wildan Alifi, 011810301128; 2007: 53 hal; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Antibiotik β -Laktam merupakan agen antibakteri yang paling banyak digunakan di seluruh dunia, diantaranya penisilin dan cephalosporin. Mekanisme resistansi bakterial yang biasa terjadi pada antibiotik ini adalah produksi enzim β -Laktamase (Ghuysen 1991) yang menghidrolisis ikatan β -Laktam dan menyebabkan β -Laktam menjadi non-aktif. Karena hal tersebut dibutuhkan suatu cara untuk menghambat proses terhidrolisisnya β -Laktam, sehingga β -Laktamase pada suatu tingkatan molekular menarik untuk di kaji. Untuk mengidentifikasi residu β -Laktamase Shalom pada penelitiannya menggunakan metode kombinatorial, dengan membaca sekilas mutagenesis pada 122 posisi di dalam dan disekitar sisi aktif β -Laktamase *Enterobacter cloacae* P99, yang disaring dari sekitar 1000 varian P99 dalam suatu *High-throughput in vivo*, yang diuji kadar logam dan *sequenced* dengan *96-capillary electrophoresis* (Shalom D. Goldberg *et al.* 2003). Salah satu strategi dalam identifikasi residu yang penting pada β -Laktamase *Enterobacter cloacae* P99 dapat dilakukan dengan memodifikasi β -Laktamase kelas C secara *in silico* (simulasi komputer).

Modifikasi β -Laktamase dilakukan secara *in silico* dengan program Modeller 6.2 dan untuk mengetahui efek modifikasi terhadap sensitifitas dan kespesifikannya digunakan program AutoDock 3.0.5. Senyawa substrat dalam penelitian ini yaitu Ampisilin dan inhibitor yang digunakan dalam penelitian ini ada dua jenis, yaitu senyawa Amoxillin, dan Cephadrine. Dari 11 residu signifikan hasil

penelitian Shalom, hanya 7 residu yang menunjukkan efek signifikan pada percobaan ini, diantaranya G61, S64, K67, Q120, Y150, N152 dan K315. Ada 2 residu yang sangat berpengaruh pada katalisis β -Latamase yaitu residu S64 dan Y150, dimana S64 merupakan sisi aktif serin dan Y150 sebagai dasar asilasi dan deasilasi pada katalisis β -Latamase. Pengaruh 2 residu tersebut tidak dijelaskan pada penelitian Shalom.

Kata kunci: β -Latamase, antibiotik, residu, pemodelan homologi, *docking*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi. Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan program sarjana strata satu (S-1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak, untuk itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ir. Sumadi, MS., selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Jember,
2. Drs. Siswoyo, M.Sc., Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia,
3. Drs. Sudarko, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Drs. Zulfikar, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan dari awal, proses, hingga akhir dari penelitian ini,
4. Drs. Siswoyo, M.Sc., Ph.D., dan Suwardiyanto, S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik dan saran serta masukan yang berharga dalam penyempurnaan penyusunan skripsi ini,
5. Segenap Dosen, Teknisi, dan Karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember, Serta semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian dan penulisan skripsi hingga selesai.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini.

Jember, 24 Oktober 2007

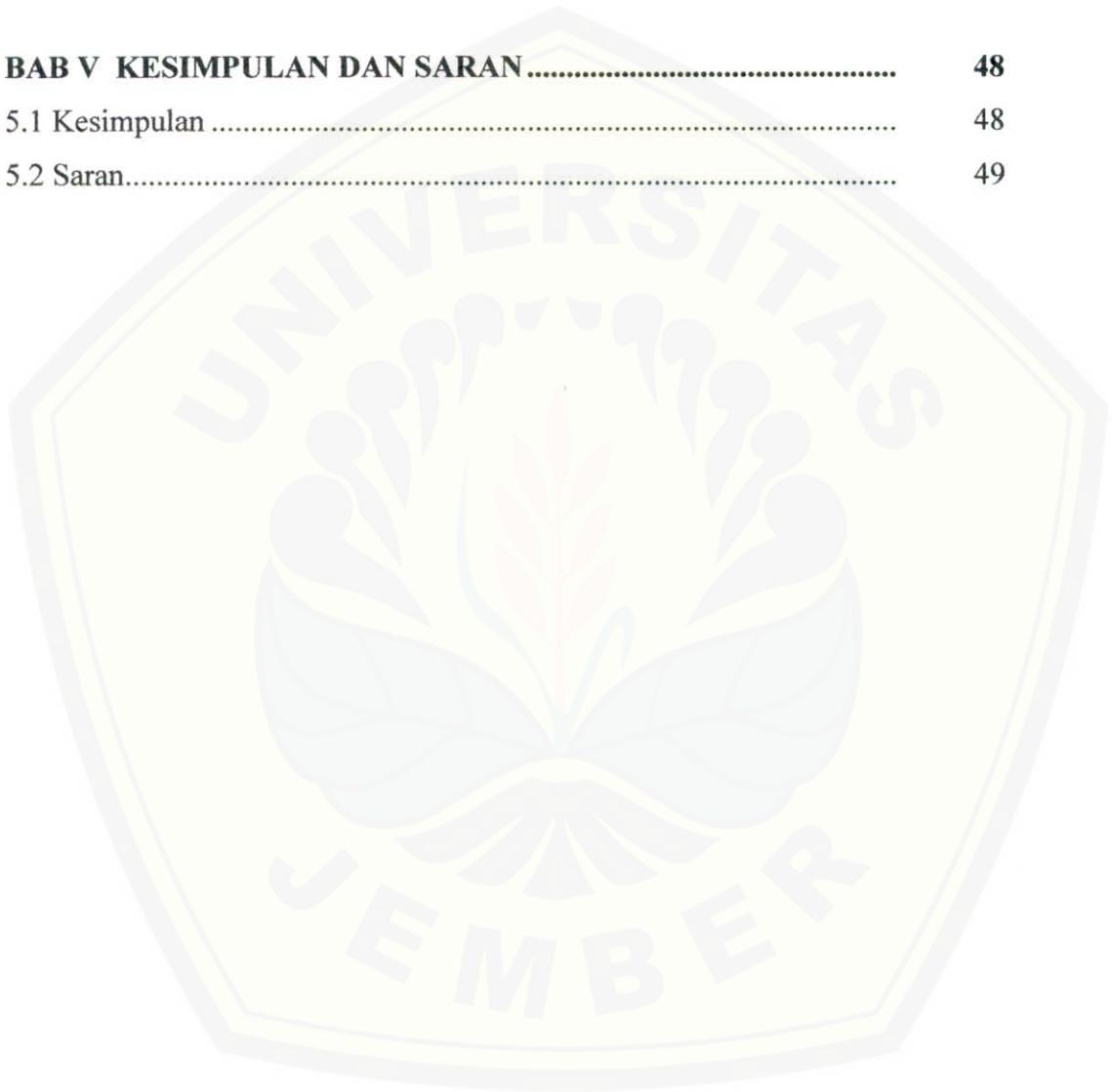
Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
HALAMAN RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Enzim	4
2.1.1 Inhibisi Enzim	6

2.1.2 β -Laktamase	8
2.2 Metode Simulasi	9
2.2.1 Pemodelan Homologi.....	11
2.2.2 Mekanika dan Dinamika Molekul.....	12
2.2.3 Energi Bebas	14
2.2.4 Grid Maps	18
2.2.5 Analisis Konformasi	21
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	27
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	27
3.2 Alat Penelitian.....	27
3.3 Diagram Alir Penelitian	28
3.3.1 Mutagenesis β -Laktamase.....	28
3.3.2 <i>Docking</i>	28
3.4 Prosedur Penelitian	29
3.4.1 Senyawa Substrat dan Inhibitor	29
3.4.2 Penyiapan Ligand.....	30
3.4.3 Penyiapan β -Laktamase	31
3.3.4 <i>Docking</i>	32
3.4.5 Visualisasi	33
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Proses Mutasi <i>in silico</i>	34
4.2 Efek Mutasi β -laktamase pada Substrat.....	36
4.3 Efek Mutasi β -laktamase pada Inhibisi Amoxilin	39

4.4 Efek Mutasi β -laktamase pada Inhibisi Chepradine	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran.....	49



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1 hasil penelitian Shalom D. Goldberg et al.....	2
Tabel 3.1 Struktur Substrat dan Inhibitor.....	29
Tabel 4.1 Data Hasil Docking Substrat.....	36
Tabel 4.2 Data Hasil Docking Substrat dengan Grid 100x100x100.....	36
Tabel 4.3 Data Hasil Docking Amoxilin	40
Tabel 4.4 Data Hasil Docking Cephadrine	42
Tabel 4.5 Data Hasil Docking Cephadrine dengan Grid 100x100x100..	43

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Plot inhibisi β -Laktamase P-99, pada hidrolisis cephalosporin	7
Gambar 2.2 Pemodelan Perbandingan Protein. Pertama, struktur 3D template dipasangkan dengan sequence target yang akan dimodelkan (SEQ). Kedua, sifat yang berhubungan, seperti jarak C_{α} - C_{α} , ikatan hidrogen, sudut dihedral, ditransfer dari template ke target. Ketiga, model 3D diperoleh dengan menyimpulkan semua hubungan yang telah diperoleh	12
Gambar 2.3 Siklus Termodinamika Pembentukan Kompleks Protein-inhibitor	16
Gambar 2.4 <i>Grid Maps</i> . Ligan terdapat dalam pusat grid map, terletak dalam sisi aktif protein. Dalam kasus ini, grid map mengelilingi protein secara keseluruhan. Spasi grid sama dalam semua dimensi (Morris, <i>et al.</i> , 2001)	19
Gambar 2.5 Interaksi Energi Potensial Van der Waals (Morris, <i>et al.</i> , 2001)	20
Gambar 2.6 Model Ikatan Hidrogen (Morris <i>et al.</i> , 2001).....	21
Gambar 2.7 Ilustrasi Pencarian Lokal Genotip dan Fenotip (Hart, 1994).....	26
Gambar 4.1 Beberapa Residu yang Disubstitusi.....	36

Gambar 4.2 Grafik k_I Ampisilin.....	37
Gambar 4.3 Grafik k_I Grid 100x100x100 dan k_{cat} Ampisilin Hasil Penelitian Shalom <i>et.al</i>	38
Gambar 4.4 Model Pengikatan Substrat dengan Sisi Aktif Serin pada β -laktamase <i>wild type</i>	39
Gambar 4.5 Model Pengikatan Subtrat dengan Sisi Aktif Serin pada Mutan S64T	40
Gambar 4.6 Grafik Konstanta Inhibisi Amoxilin.....	41
Gambar 4.7 Model Pengikatan dengan Sisi Aktif Serin pada β -laktamase <i>wild type</i>	42
Gambar 4.8 Grafik Konstanta Inhibisi Chepradine	43
Gambar 4.9 Grafik k_I Grid 100x100x100 dan k_{cat} Cephradine Hasil penelitian Shalom <i>et.al</i>	44
Gambar 4.10 Ikatan hydrogen Tyr150 dengan Lys67 dan Lys315.....	45
Gambar 4.11 Model Pengikatan Chepradine dengan Sisi Aktif Serin $\pi\alpha\delta\alpha$ β -laktamase <i>wild type</i>	45
Gambar 4.12 Perbandingan k_I ketiga senyawa β -laktam	46



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antibiotik β -Laktam merupakan agen antibakteri yang paling banyak digunakan di seluruh dunia, diantaranya penisilin dan cephalosporin. Mekanisme resistansi bakterial yang biasa terjadi pada antibiotik ini adalah produksi enzim β -Laktamase (Ghuysen 1991) yang menghidrolisis ikatan β -Laktam dan menyebabkan β -Laktam menjadi non-aktif. Karena hal tersebut dibutuhkan suatu cara untuk menghambat proses terhidrolisisnya β -Laktam, sehingga β -Laktamase pada suatu tingkatan molekular menarik untuk di kaji.

β -Laktamase dibagi menjadi empat kelas berdasarkan urutan homologinya (Bush *et al.* 1995), yaitu enzim β -Laktamase kelas A, B, C, dan D. Dari keempat kelas β -Laktamase tersebut, mekanisme reaksi dari kelas C belumlah jelas. Sedangkan pada kelas A dan kelas D yang mempunyai residu glutamate dan karbamilat lisin sebagai sisi aktif yang bertindak sebagai katalisator, yang berperan untuk hidrolisis β -Laktam (Shalom D. Goldberg *et al.* 2003). Telah banyak kajian yang menerangkan mekanisme reaksi enzim β -Laktamase kelas C. Meliputi kristalografi penyinaran tiga enzim berbeda (Oefner *et al.* 1990; Lobkovsky *et al.* 1993; Usher *et al.* 1998), dan kompleks sejumlah mutans dengan substrat yang bervariasi (Beadle *et al.* 2002), Zhang telah melaporkan urutan faktor penentu aktivitas dengan *extended-spectrum substrates* (Zhang *et al.* 2001), namun mekanisme reaksinya masih diperdebatkan.

Shalom D. Goldberg *et al.* (2003) melaporkan, untuk mengetahui residu yang terlibat dalam katalisis antibiotik dari enzim β -Laktamase kelas C *Enterobacter*

cloacae P99 dipelajari dengan membaca sekilas mutasi kombinasi pada 122 posisi dalam sisi aktif. Berbeda dengan β -Laktamase kelas A dan D dimana hanya Glu 166 yang berperan sebagai katalisator.

Tabel 1.1 hasil penelitian Shalom D. Goldberg et al.

Enzyme		k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	% Wild-type
WT	AMP	0.41 \pm 0.01	—	—	—
	CEF	153 \pm 6	5.7 \pm 1.5	2.7×10^7	—
E61Q	AMP	0.340 \pm 0.009	—	—	83
	CEF	110 \pm 3	44 \pm 4	2.5×10^6	9
S64T	AMP	ND	—	—	—
	CEF	0.07 \pm 0.01	880 \pm 230	80	0.0003
Q120E	AMP	0.079 \pm 0.004	—	—	19
	CEF	30.0 \pm 0.6	10.9 \pm 1.3	2.7×10^6	10
Y150F	AMP	ND	—	—	—
	CEF	0.107 \pm 0.008	750 \pm 100	1.4×10^2	0.0005
Y203F	AMP	0.32 \pm 0.007	—	—	78
	CEF	127 \pm 3	5.8 \pm 1.1	2.2×10^7	81
D217N	AMP	0.31 \pm 0.004	—	—	76
	CEF	164 \pm 5	8.3 \pm 1.6	2.0×10^7	74
K315R	AMP	0.42 \pm 0.005	—	—	102
	CEF	47 \pm 1	39 \pm 3	1.2×10^6	4
N346D	AMP	0.27 \pm 0.007	—	—	66
	CEF	34 \pm 3	130 \pm 28	2.6×10^5	1

Dari penelitian tersebut dapat diketahui bahwa ada 11 residu yang berperan penting sebagai katalisator, yaitu mutan F60Y, E61Q, S64T, K67R, Q120E, Y150F, N152D, Y203F, K315R, N341D, N346D. N152D, K67R, dan Y150F adalah suatu jaringan hidrogen bonding, dimana mutasi residu ini mengurangi aktivitas enzim. Jaringan hidrogen bonding tersebut di apit oleh Q120E dan K315R yang juga berperan sebagai katalisator walaupun lebih sedikit. Residu yang secara teknis sebagai penerima ion positif pada asilasi dan deasilasi.

Untuk mengidentifikasi residu β -Laktamase Shalom pada penelitiannya menggunakan metode kombinatorial, dengan membaca sekilas mutagenesis pada 122 posisi di dalam dan disekitar sisi aktif β -Laktamase *Enterobacter cloacae* P99, yang disaring dari sekitar 1000 varian P99 dalam suatu *High-throughput in vivo*, yang diuji kadar logam dan *sequenced* dengan *96-capillary electrophoresis* (Shalom D. Goldberg *et al.* 2003). Salah satu strategi dalam identifikasi residu yang penting pada β -Laktamase *Enterobacter cloacae* P99 dapat dilakukan dengan memodifikasi β -Laktamase kelas C secara *in silico* (simulasi komputer).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

- a. Bagaimana pengaruh mutasi residu-residu pada katalisis antibiotik?
- b. Bagaimana mekanisme Reaksi enzim β -Laktamase kelas C, dan keterkaitan dengan resistensi bakteri ?

1.3 Tujuan Penelitian

- a. Mengetahui residu-residu yang berpengaruh terhadap katalisis antibiotik dari enzim β -Laktamase kelas C.
- b. Mengetahui mekanisme reaksi terbentuknya ES atau EI dengan mengukur k_1 dari β -Laktamase kelas C.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mempunyai manfaat sebagai berikut :

- a. Dapat memberikan kontribusi dalam pembuatan antibiotik untuk mengurangi resistensi antibakterial,
- b. Dapat memberikan informasi tentang karakteristik β -Laktamase hasil modifikasi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan suatu unit fungsional dari metabolisme sel, bekerja dengan urutan yang teratur. Enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul-molekul nutrisi. Sifat enzim yang paling mencolok adalah daya katalitik dan spesifitasnya. Enzim mengkatalisis reaksi kimia spesifik dengan cara menurunkan energi bebas aktivasi. Kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim dapat dipelajari menggunakan kinetika enzim. Pengukuran kinetika merupakan cara kuantitatif untuk dapat menjelaskan efek toksisitas terhadap aktivitas enzim (Lehninger, 1975).

Pada tahun 1913, Leonor Michaelis dan Maud Menten mengajukan pemikiran tentang ketergantungan kecepatan reaksi pada konsentrasi substrat yang digunakan. Dasar pemikiran Michaelis-Menten merupakan model kerja enzim yang paling sederhana untuk menjelaskan sifat kinetika enzim. Michaelis-Menten mengemukakan bahwa pada reaksi yang dikatalisis enzim, enzim (E) berikatan dengan substratnya (S) membentuk kompleks enzim-substrat (ES), yang kemudian pecah menjadi enzim dan produk.



Keterangan : E = Enzim

S = Substrat

P = Produk

k = konstanta reaksi

Rasio konstanta kecepatan ditetapkan sebagai konstanta Michaelis (K_M),

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (2)$$

K_M = Konstanta Michaelis

Persamaan Michaelis-Menten juga dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M} \quad (3)$$

Keterangan : V_0 = Laju awal

V_{\max} = Laju maksimum

S = Substrat

K_M = Konstanta Michaelis

Katalis menambah kecepatan reaksi kimia dengan menurunkan energi bebas aktivasi ΔG^\ddagger . Enzim memiliki kemampuan katalisis dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kompleks pada temperatur dan tekanan normal. Hal tersebut disebabkan penurunan energi bebas aktivasi untuk reaksi yang dikatalisis enzim, dibanding reaksi yang tidak menggunakan katalis (Voet and Voet, 1995).

Enzim bekerja dengan mengikat substrat dalam sisi aktifnya dimana reaksi terjadi. Setelah reaksi terjadi, produk dibebaskan dan diperoleh enzim lagi yang siap untuk reaksi baru. Oleh sebab itu, energi dari sebuah reaksi yang dikatalisis enzim meliputi laju reaksi seperti proses pengikatan substrat atau produk.

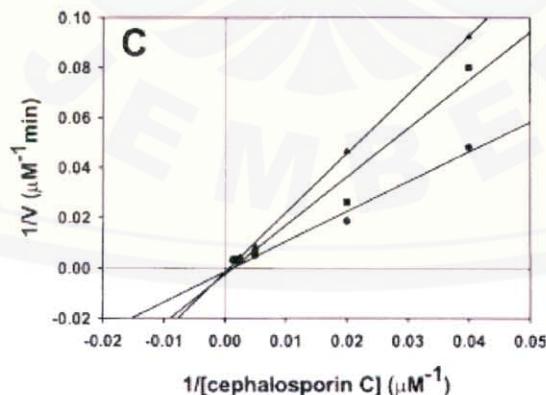
Katalisis enzim biasanya dijelaskan dengan konsep bahwa enzim lebih menyukai keadaan transisi dibanding berikatan dengan substrat. Enzim menstabilkan keadaan transisi lebih efisien daripada air. Ada beberapa teori yang berbeda mengenai katalisis enzim, yaitu: stabilisasi keadaan transisi oleh geometri/elektrostatik sisi aktif, destabilisasi substrat, desolvasi, jebakan entropi, pengontrolan orbital, pengaruh dinamika, dan lain-lain (Komoldin, 2001).

2.1.1 Inhibisi Enzim

Aktivitas enzimatis dapat dihambat (inhibisi) oleh molekul kecil spesifik atau ion logam tertentu. Pengaruh penghambat ini dapat dengan mudah diketahui dengan menggunakan prinsip kinetika enzim. Atas dasar inilah, maka saat ini banyak dikembangkan inhibitor untuk mengatasi resistensi bakteri patogen. (Wanzhi Huang, et. Al, 2003)

Inhibisi dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu inhibisi reversibel dan inhibisi irreversibel. Dalam inhibisi irreversibel, sebuah molekul berikatan kovalen pada enzim yang menyebabkan perubahan permanen pada enzim, sedangkan pembentukan inhibisi reversibel dipengaruhi oleh ikatan nonkovalen dari inhibitor dan dapat dikembalikan dengan *removal inhibitor*.

Inhibisi irreversibel terjadi karena adanya disosiasi yang lambat pada kompleks enzim-inhibitor. Kuatnya ikatan antara enzim-inhibitor baik secara ikatan kovalen maupun bukan kovalen menyebabkan lambatnya disosiasi enzim-inhibitor. Kuatnya ikatan menyebabkan inaktifnya enzim secara irreversibel. Kebanyakan semua inhibitor enzim irreversibel merupakan senyawa yang beracun (Mathews, 1990).



Gambar 2.1. Plot inhibisi β -Laktamase P-99, pada hidrolisis cephalosporin.

(Wanzhi Huang,, et. al. 2003)

Berdasarkan pengaruhnya pada sifat kinetika enzim, inhibitor dapat dibedakan menjadi dua, yaitu inhibitor kompetitif dan nonkompetitif. Pada inhibisi kompetitif, inhibitor bersaing dengan dengan substrat; yaitu inhibitor mengurangi kemungkinan substrat berikatan dengan enzim membentuk kompleks ES (pers. 4). Hal ini meningkatnya K_m enzim untuk substrat, tetapi tidak mempengaruhi V_{Max} reaksi sebab pada konsentrasi substrat yang terbatas (keadaan dimana V_{Max} diukur), substrat menjenuhkan enzim. Inhibisi kompetitif dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat.



Pada inhibisi nonkompetitif, inhibitor tidak bersaing dengan substrat pada reaksi menduduki enzim. Enzim dapat mengikat substrat dan inhibitor sekaligus (pers. 5). Ini berarti situs pengikatan keduanya berbeda, sehingga tidak mencegah pembentukan kompleks enzim-substrat. Suatu inhibitor nonkompetitif bekerja dengan cara mengurangi kecepatan produktivitas ES yang berdisosiasi menghasilkan produk reaksi.

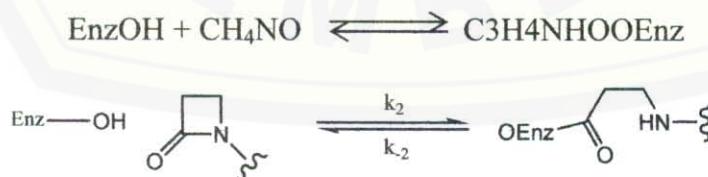


2.1.2 β -Laktamase

β -Laktamase merupakan enzim yang memiliki spesifitas menghidrolisis β -Laktam menjadi asam asetat. Enzim yang digunakan untuk penelitian ini adalah β -Laktamase, dengan keterangan sebagai berikut :

Klasifikasi	: Hydrolase
Metode eksperimen	: Difraksi sinar-X
Nomer EC	: 3.5.2.6
Kode PDB	: 1GCE
Sumber	: <i>Enterobacter cloacae</i>
Resolusi [\AA]	: 1,80
Residu	: 12-364
Atom	: 4985
Sumber primer	: Crichlow, G.V., Kuzin, A.P., Nukaga, M., Mayama, K., Sawai, T., Knox, J.R. <i>Structure of the extended-spectrum class C beta-lactamase of Enterobacter cloacae GC1, a natural mutant with a tandem tripeptide insertion</i> . Biochemistry v38 pp.10256-10261 , 1999

Mekanisme Hidrolisis :



Kelas C β -Laktamase merupakan protein monomer dengan ukuran sedang, sekitar 29.000-39.000. Di sana terdapat dua struktur utama yaitu domain α dan α/β dengan sisi aktif yang terletak di dalam diantara domain tersebut. Sisi aktif serin terletak pada N-terminus dari rantai, yang relatif hidrofobik, α -helix pertama dari semua domain. Di sana terdapat beberapa residu di sekeliling sisi aktif yang mungkin mempengaruhi posisi substrat dan proses katalisis dari proses pembentukan ikatan dan pemutusan ikatan. Pertama-tama, residu lisin selalu ada sebagai asam amino ketiga dan satu putaran helix berikutnya turun dari rantai serin menuju sisi aktif. Dua residu lain yang membentuk sisi katalitik adalah Tyr-Xaa-Asn dengan sisi rantai dari residu pertama dan ketiga menuju ke sisi aktif. (Michael I. Page and Andrew P. Laws, 1998)

2.2 Metode Simulasi

Kimia identik dengan melakukan eksperimen. Kebenaran ini berdasarkan dari sejarahnya, tapi selama dua dekade terakhir kebenaran bahwa kimia adalah melakukan eksperimen menjadi tidak seluruhnya benar. Dalam banyak area kimia, prediksi teori dari sifat-sifat kimia bisa menyamai hasil eksperimen. Metode simulasi biasanya digunakan sebelum metode eksperimen. Dalam penelitian ini metode simulasi digunakan untuk memodifikasi sisi aktif β -Laktamase *Enterobacter cloacae*. Model molekul protein mutan dibangun menggunakan software TRITON (Prokop *et al.* 2000), dan dianalisis sifat-sifatnya menggunakan software AutoDock (Morris *et al.*, 2001).

TRITON adalah software grafis yang dikembangkan untuk pemodelan mutan protein (Prokop *et al.* 2000). TRITON dilengkapi program eksternal, yaitu MODELLER, MOPAC, dan Driver. MODELLER digunakan untuk membuat protein mutan secara *in silico* dengan pendekatan pemodelan homologi (Damborský *et al.* 2001). Software MOPAC digunakan untuk optimasi geometri dan prediksi aktifitas

protein. Sedangkan software Driver digunakan untuk penelusuran mekanisme reaksi. Dalam penelitian ini yang digunakan adalah MODELLER versi 6.2.

AutoDock merupakan program yang dikembangkan untuk memprediksi interaksi ligan dengan target biomakromolekul. Dalam AutoDock, ligan pada awalnya diacak diluar protein, kemudian melakukan translasi, orientasi, dan konformasi sampai sisi ideal ditemukan (Morris *et al.*, 1998). AutoDock yang digunakan dalam penelitian ini adalah AutoDock versi 3.0.5 Selain itu digunakan juga program pembantu AutoDockTools yang berupa GUI (Graphical User Interface).

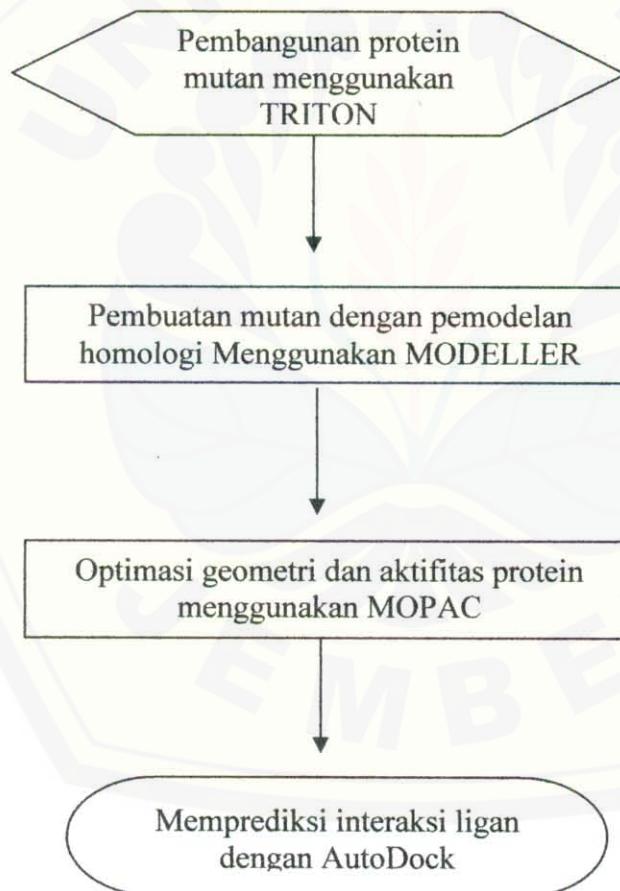
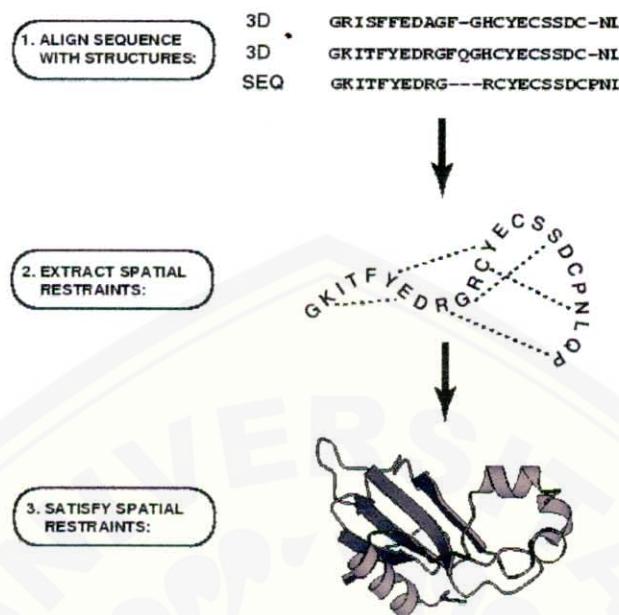


Diagram kerja pada metode simulasi.

2.2.1 Pemodelan Homologi

MODELLER mengimplementasikan pendekatan pemodelan menggunakan perbandingan struktur protein (Sali *et al.*, 1993). Prosedur pemodelan dimulai dengan penataan *sequence* yang akan dimodelkan (target) dengan struktur protein tiga dimensi yang telah diketahui (cetakan/template). Penataan tersebut merupakan input ke dalam program. Output model tiga dimensi dari target mengandung semua atom non hidrogen pada rantai utama dan rantai samping. Pertama, dilakukan penghitungan batasan pada *sequence* target yang dihitung dari penataannya dengan struktur tiga dimensi *template*. Batasan tersebut diperoleh dari analisis statistik hubungan pasangan-pasangan protein homolog. Analisis ini berdasar pada database penataan 105 famili yang termasuk 416 protein yang telah diketahui struktur tiga dimensinya (Sali *et al.*, 1994). Dengan penelusuran database, akan diperoleh tabel mengenai berbagai korelasi, seperti korelasi antara jarak ekivalen $C_{\alpha} - C_{\alpha}$, atau sudut dihedral dari dua protein yang berhubungan. Hubungan tersebut diekspresikan sebagai fungsi probabilitas kerapatan (*probability density functions*) dan dapat digunakan secara langsung sebagai batasan hubungan. Selanjutnya, batasan hubungan dan term energi CHARM memperkirakan stereokimia yang cocok, dan mengombinasikannya ke dalam fungsi objektif. Terakhir, model diperoleh dengan mengoptimasi fungsi objektif dalam ruang kartesian menggunakan program MOPAC. Selanjutnya optimasi dengan metode fungsi variabel target dan dinamika molekul dilakukan untuk memprediksi interaksi ligan dengan *simulated annealing* menggunakan AutoDock (Sali *et al.*, 2004).



Gambar 2.2. Pemodelan Perbandingan Protein. Pertama, struktur 3D template dipasangkan dengan sequence target yang akan dimodelkan (SEQ). Kedua, sifat yang berhubungan, seperti jarak C_{α} - C_{α} , ikatan hidrogen, sudut dihedral, ditransfer dari template ke target. Ketiga, model 3D diperoleh dengan menyimpulkan semua hubungan yang telah diperoleh (Sali *et al.*, 2004).

2.2.2 Mekanika dan Dinamika Molekul

Mekanika molekul memberikan model atom dan molekul yang lebih sederhana dibanding metode mekanika kuantum. Struktur molekul dimodelkan sebagai sistem lapisan yang membawa muatan parsial (atom-atom) yang dihubungkan oleh pegas (ikatan). Energi dalam sistem molekul, yang dalam kimia kuantum dijelaskan dengan fungsi gelombang, dalam mekanika molekul dijelaskan dengan fungsi yang sederhana. Fungsi energi potensial menjelaskan interaksi ikatan dan non-ikatan antara atom dan jumlah potensial yang disebut medan gaya. Fungsi energi dapat dengan cepat diketahui dan sesuai untuk perhitungan molekul kompleks seperti protein dan sistem yang mengandung banyak molekul pelarut.

$$\begin{aligned}
 V_{pot} = & \underset{\text{bonds}}{\frac{1}{2}k_b(r-r_0)^2} + \underset{\text{angles}}{\frac{1}{2}k_\theta(\theta-\theta_0)^2} + \underset{\text{torsions}}{k_\phi(1-\cos(n\phi-\delta))} + \\
 & + \underset{\text{improper torsions}}{\frac{1}{2}k_\xi(\xi-\xi_0)^2} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \underset{\text{non-bonded}}{\sum_{i<j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}} + \underset{\text{non-bonded}}{\sum_{i<j} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right]} \quad (8)
 \end{aligned}$$

Persamaan (8) menunjukkan tipe pasangan-potensial yang diturunkan akhir tahun 1960an. Persamaan tersebut masih digunakan untuk perhitungan pada molekul protein dan senyawa organik lain dan termasuk kontribusi dari tegangan ikatan, sudut ikatan, torsi rotasi dan istilah non-ikatan untuk elektrostatik dan interaksi Van der Waals. Total energi potensial sistem molekular bergantung pada posisi semua atom dan parameter k , r_0 , θ_0 , n , δ , ξ_0 , q , A , B , dan lain-lain; yang harus didefinisikan untuk semua ikatan, sudut, torsi, dan tipe atom dari sistem. Parameter ini dikalibrasi untuk memperoleh energi, frekuensi, dan geometri yang diperoleh dari eksperimen atau metode mekanika kuantum.

Medan gaya dapat digunakan menghitung energi potensial sistem molekular sebagai fungsi posisi semua atom. Sebagai tambahan, turunan negatif (dengan pengaruh pada posisi) dari energi potensial memberikan gaya pada setiap atom pada geometri partikular tersebut. Gaya yang dikerjakan pada sebuah partikel dihubungkan kecepatannya oleh Hukum II Newton:

$$F_i = \frac{\delta V_{pot}}{\delta r_i} = m_i a_i \quad (9)$$

Ini berarti bahwa partikel dengan massa m_i akan merubah posisi dan kecepatannya tergantung pada arah dan besar gaya yang diberikan. Hukum tersebut dapat diintegrasikan terhadap waktu yang menghasilkan kecepatan dan posisi semua partikel pada waktu tertentu. Proses integrasi numerik waktu dari sebuah sistem dari persamaan diferensial orde dua disebut sebagai simulasi dinamika molekular. Simulasi dinamika molekular memungkinkan kita untuk mengikuti gerakan dari sebuah sistem yang terdiri dari atom atau molekul dalam periode tertentu (jalannya sistem), dengan menentukan posisi dan kecepatan awal semua atom. Posisi awal dapat diperoleh dari

struktur kristal atau model yang telah dioptimasi dengan metode mekanika molekul atau mekanika kuantum. Kecepatan awal biasanya diperoleh dari distribusi Maxwell-Boltzmann pada temperatur yang tepat. Berdasarkan hubungan temperatur dan kecepatan atom, temperatur dari sistem simulasi dapat dengan mudah diregulasi secara periodik dengan mengukur kecepatan. Kecepatan yang terukur sebanding dengan selisih antara temperatur sebenarnya dan temperatur target menggunakan parameter *kopling* dan prosedur pengukurannya disebut sebagai *kopling thermal bath*.

Simulasi dinamika molekul dapat digunakan untuk mempelajari sifat struktur dari suatu molekul pada sisi aktif suatu protein. Selain itu, dinamika molekul dapat digunakan untuk mengetahui bentuk ruang yang kosong dari sistem molekul (Kolmodin, 2001).

2.2.3 Energi Bebas

Konsep energi bebas merupakan pusat termodinamika dan kimia selama itu berhubungan untuk mengukur kuantitas. Energi bebas dapat ditunjukkan sebagai probabilitas pengukuran dan itu menjelaskan energi rata-rata dari sejumlah molekul dalam jumlah banyak, sebagai contoh sampel dalam tabung reaksi. Dalam kimia, biasanya disebut energi bebas Gibb's, jika percobaan dilakukan dalam temperatur dan tekanan yang konstan, lain dengan energi bebas Helmholtz' yang dilakukan pada kondisi volume konstan. Energi bebas dapat didefinisikan sebagai jumlah beberapa tahap. Definisi yang paling umum adalah:

$$G = H - TS \quad (10)$$

Dimana H adalah entalpi, T temperatur dan S entropi dari sistem. Dalam statistik mekanik energi bebas Gibb's didefinisikan sebagai:

$$G = -k_B T \ln Q + k_B T V \left| \frac{\delta \ln Q}{\delta V} \right|_T \quad (11)$$

$$Q = \exp\left(\frac{-E_v}{k_b T}\right)$$

Dimana Q adalah fungsi partisi kanonik dan V volume sistem. Jumlahnya adalah semua keadaan kuantum mekanik E_v dari semua derajat kebebasan sistem, meliputi translasi, rotasi dan vibrasi. Untuk fungsi partisi partikel klasik bergantung pada susunan integral Z diatas posisi N partikel:

$$Q = C(E_{kin}).Z = \dots \exp\{-V_{pot}(r_1 \dots r_N) / k_b T\} dr_1 \dots dr_N \quad (12)$$

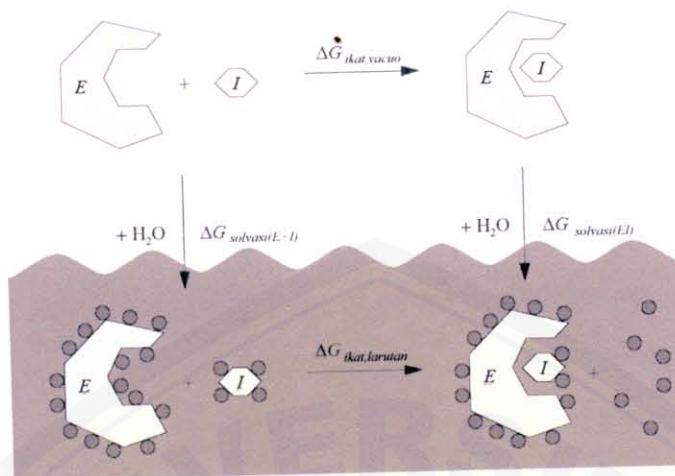
C adalah faktor yang menjelaskan kontribusi kinetik pada fungsi partisi dan V_{pot} adalah energi interaksi intermolekul.

Dari statistik mekanik kita dapat menghitung kuantitas makroskopik seperti energi bebas dari interaksi molekul mikroskopik menggunakan metode mekanika kuantum atau mekanika klasik. Penghitungan energi bebas dapat langsung dihubungkan secara langsung dengan tetapan kesetimbangan atau laju percobaan (Kolmodin, 2001).

Dalam AutoGrid dan AutoDock versi 3.0.5 digunakan parameterisasi sejumlah besar kompleks protein-inhibitor dengan K_i yang telah diketahui. Perubahan energi bebas observasi, ΔG_{obs} , dirubah menjadi tetapan inhibisi, menggunakan persamaan:

$$\Delta G_{obs} = RT \ln K_i$$

Dimana R adalah tetapan gas, $1,987 \text{ kal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, dan T merupakan temperatur absolut, yang diasumsikan pada temperatur ruang, $298,15 \text{ K}$. Persamaan ini tidak menggunakan tanda minus karena konstanta inhibisi didefinisikan untuk reaksi disosiasi, $EI \rightleftharpoons E + I$, dimana ΔG_{obs} menunjukkan arah yang sebaliknya dari proses pengikatan, $E + I \rightleftharpoons EI$; dimana E adalah enzim dan I adalah inhibitor (Morris *et al*, 1998).



Gambar 2.3. Siklus Termodinamika Pembentukan Kompleks Protein-inhibitor (Morris *et al.*, 2001).

Pada diagram diatas menunjukkan siklus termodinamika ikatan sebuah enzim, E , dan sebuah inhibitor, I , dalam fasa terlarut dan *in vacuo*. Molekul pelarut ditunjukkan oleh bulatan kecil yang mengelilingi molekul besar, tetapi ketika E dan I terikat, beberapa pelarut dibebaskan. Hal tersebut merupakan pengaruh entropi dan hidrofobik. Pelarut yang mengelilingi E dan I , ketika keduanya terikat dan tidak terikat, dipengaruhi oleh ikatan hidrogen antara molekul tersebut. Ikatan hidrogen antara pelarut dan enzim, dan pelarut dan inhibitor, menyumbang stabilisasi entalpi, dan merupakan sesuatu yang dapat kita perkirakan dalam fungsi energi bebas baru.

Berdasarkan hukum Hess, perubahan energi antara dua keadaan akan sama, bagaimanapun jalur yang ditempuh. Sehingga kita bisa menentukan energi ikatan dalam pelarut dengan persamaan berikut:

$$\Delta G_{ikat,larutan} = \Delta G_{ikat,vacuo} + \Delta G_{solvasi(EI)} - \Delta G_{solvasi(E+I)} \quad (13)$$

Kita dapat menghitung $\Delta G_{ikat,vacuo}$ dari simulasi *docking*, dan dapat memperkirakan perubahan energi bebas selama pelarutan untuk molekul terpisah, enzim dan inhibitor ($\Delta G_{solvasi(E+I)}$), dan untuk kompleks enzim-inhibitor ($\Delta G_{solvasi(EI)}$), kemudian kita bisa menghitung perubahan energi bebas selama pengikatan inhibitor ke enzim dalam

larutan ($\Delta G_{ikat,larutan}$). Dari data tersebut kita dapat memperkirakan tetapan inhibisi (K_i) untuk inhibitor (Morris *et al.*, 2001).

Dalam banyak kasus, energi aktivasi (ΔG) dari reaksi yang berhubungan adalah linier jika dikorelasikan dengan energi bebas reaksi (ΔG). Seperti lebih mudahnya reaksi terjadi jika laju reaksi bertambah. Fenomena ini diketahui sebagai hubungan linier energi bebas (Kolmodin, K. 2001). Hubungan linier energi bebas pertama kali diteliti oleh Hammett pada awal tahun 1933, dan dipublikasikan tahun 1937. Hubungan tersebut digunakan untuk menghubungkan struktur dan reaktivitas molekul organik kecil. Hammett dapat menurunkan konstanta substituen dan konstanta reaksi yang dapat digunakan untuk menghitung kecepatan reaksi senyawa tertentu. Penelitian Hammett merupakan awal dari munculnya *quantitative structure-activity relationship* (QSAR), yang dikerjakan oleh Hansch dan rekannya di awal tahun 1960an. Di sini diasumsikan bahwa jumlah pengaruh sterik, elektronik, dan hidrofobik dari substituen dalam senyawa membedakan aktifitas biologisnya.

Dalam AutoDock telah diimplementasikan pendekatan menggunakan siklus termodinamik Wesson dan Eisenberg.

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\ & + \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C'_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ & + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \\ & + \Delta G_{tor} N_{tor} \\ & + \Delta G_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2)} \end{aligned} \quad (14)$$

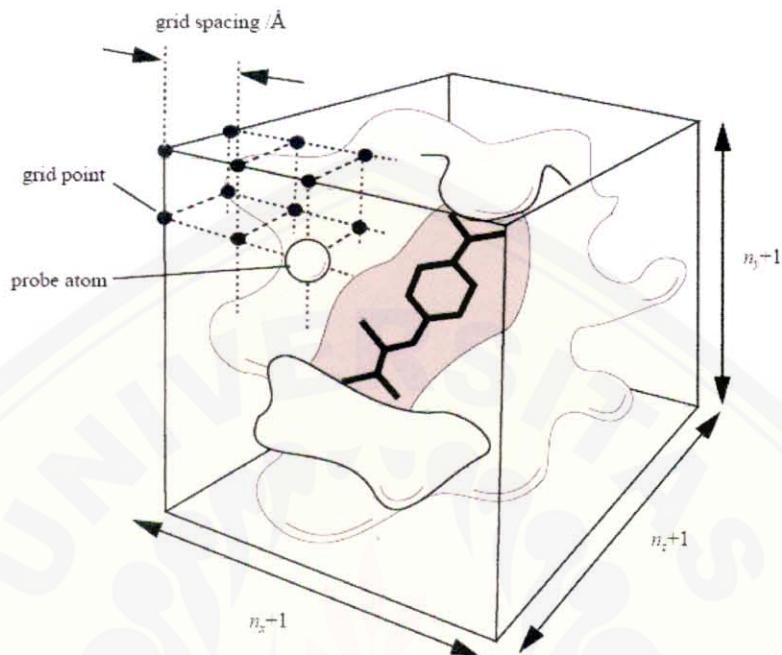
Dimana ΔG_{vdW} menunjukkan mekanika molekul untuk dispersi/tolakan, ΔG_{hbond} untuk ikatan hidrogen, ΔG_{elec} untuk gaya elektrostatik, ΔG_{tor} memodelkan rotasi internal

rotor dan rotasi global serta translasi, dan ΔG_{sol} memodelkan desolvasi selama pengikatan dan pengaruh hidrofobik (entropi pelarut berubah pada permukaan pelarut-zat terlarut). Sedangkan pada bagian lainnya adalah koefisien empiris yang diukur dengan analisis regresi linier dari sejumlah kompleks protein-ligan yang telah diketahui konstanta ikatannya. Penjumlahan dilakukan pada semua pasangan atom ligan, i , dan atom protein, j (Morris *et al*, 1998).

2.2.4 Grid Maps

Grid maps merupakan jaringan yang terdiri dari garis vertikal dan horisontal pada suatu *map* (peta) yang digunakan untuk menemukan titik tertentu. AutoDock membutuhkan *grid maps* untuk setiap tipe atom yang ada dalam ligan yang akan disimulasikan. Hal tersebut bertujuan untuk mempercepat perhitungan *docking*. *Grid maps* terdiri dari sebuah *lattice* tiga dimensi, mengelilingi dan dipusatkan pada daerah makromolekul yang akan dipelajari. Makromolekul dapat berupa sebuah protein, enzim, antibodi, DNA, RNA, polimer atau kristal ion. Spasi titik grid bervariasi dari 0,2 Å sampai 1,0 Å, dengan nilai default 0,375 Å (seperempat panjang ikatan karbon-karbon). Setiap titik dalam *grid map* terdapat sebuah probe atom yang telah dihitung potensial afinitasnya terhadap makromolekul. Energi substrat terhadap makromolekul ditemukan dengan interpolasi tri-linier dari nilai afinitas delapan titik *grid* disekeliling tiap atom dalam substrat.

Grid maps ditentukan dengan program AutoGrid 3.0 dan disimpan dalam bentuk file GPF (Grid Parameter File). AutoGrid menentukan volume fragmen dan parameter pelarutan atom untuk setiap atom dalam makromolekul, dan untuk semua atom karbon dalam ligan. Penentuan parameter pelarutan pada makromolekul menggunakan program 'addsol' untuk membuat file PDBQS. PDBQS merupakan format file PDB dengan tambahan muatan parsial dan parameter pelarutan untuk setiap atom. Parameter pelarutan ligan ditentukan dalam GPF.

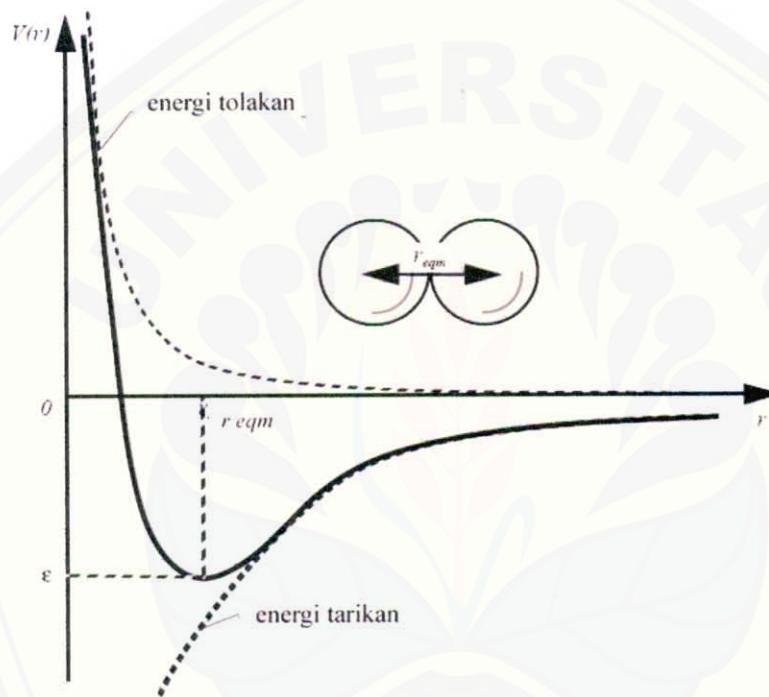


Gambar 2.4. *Grid Maps*. Ligan terdapat dalam pusat grid map, terletak dalam sisi aktif protein. Dalam kasus ini, grid map mengelilingi protein secara keseluruhan. Spasi grid sama dalam semua dimensi (Morris, *et al.*, 2001).

Selain parameter pelarutan, dalam grid maps juga ditentukan parameter potensial van der Waals. Energi potensial antara dua atom yang tidak berikatan dapat dinyatakan dalam persamaan berikut:

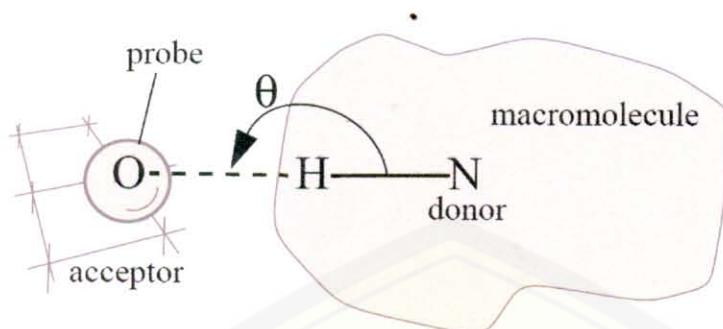
$$V(r) = \frac{\frac{m}{n-m} \epsilon_{eqm}^n}{r^n} - \frac{\frac{n}{m-n} \epsilon_{eqm}^m}{r^m} \quad (15)$$

Dimana n dan m integer, r_{eqm} adalah k setimbangan pemisahan interinti, ϵ adalah kedalaman sumur pada r_{eqm} . Parameter Lennard-Jones ($n=12$, $m=6$) digunakan untuk memodelkan gaya Van der Waals.



Gambar 2.5. Interaksi Energi Potensial Van der Waals (Morris, *et al.*, 2001).

AutoGrid mendeteksi parameter ikatan hidrogen dalam file parameter grid. Ikatan hidrogen menggunakan parameter 12-10. Potensial ikatan hidrogen tergantung pada sudut angular yang dibentuk. Ikatan hidrogen ideal memiliki sudut θ sebesar 180° antara atom reseptor, hidrogen polar dan atom donor. Ketika θ sama dengan 90° atau kurang, tidak ada ikatan hidrogen.



Gambar 2.6. Model Ikatan Hidrogen (Morris *et al*, 2001).

AutoDock juga membutuhkan sebuah *grid maps* potensial elektrostatik. Interaksi elektrostatik dihitung dengan interpolasi nilai potensial elektrostatik dan mengalikannya dengan muatan atom. Muatan parsial atom harus diberikan pada makromolekul. AutoGrid menghitung interaksi Coulomb antara makromolekul dan probe. Fungsi yang digunakan adalah fungsi sigmoid dielektrik yang diturunkan oleh Mehler dan Solmajer,

$$\varepsilon(r) = A + \frac{B}{1 + ke^{-\lambda Br}} \quad (16)$$

dimana: $B = \varepsilon_0 - A$; ε_0 = konstanta dielektrik air pada 25°C = 78,4; $A = -8,5525$, $\lambda = 0,003627$ dan $k = 7,7839$ (Morris *et al*, 2001).

Muatan harus disimpan dalam format PDBQ agar AutoGrid dapat membacanya. PDBQ merupakan perluasan bentuk dari format PDB standar, dengan tambahan kolom muatan parsial. Dalam penelitian ini menggunakan program AutoDockTools untuk menambahkan muatan pada atom ligan dan makromolekul (Morris *et al.*, 2001).

2.2.5 Analisis Konformasi

Docking otomatis adalah teknik yang berguna untuk memprediksi konformasi yang disukai oleh kompleks sebuah protein–ligand. Perbedaan jenis ikatan akan dicari dengan algoritma dan setiap konformasi dievaluasi menggunakan fungsi

penilaian. Konformasi terbaik berdasarkan nilai terbaik dari proses *docking* (Kolmodin, K. 2001). Dalam percobaan ini algoritma yang digunakan adalah algoritma genetik Lamarckian.

Algoritma genetik mengambil tema dan istilah dari genetika dan evolusi. Dalam algoritma genetik, satu set variabel keadaan, yang mengkode translasi, orientasi, dan konformasi ligan, berdasar pada genotip ligan. Koordinat atom ligan berdasar fenotip ligan. Setiap variabel keadaan merupakan gen, dan dari gen tersebut fenotip ligan dapat dihitung energinya berdasar fungsi energi bebas. Dalam *docking* molekul, *fitness* (kualitas interaksi ligan dengan enzim) merupakan total interaksi energi dari ligan dengan protein, dan dievaluasi menggunakan fungsi energi. Gen direpresentasikan oleh kromosom dan dapat mengalami mutasi dan rekombinasi. Pasangan acak individu dikawinkan menggunakan proses persilangan, menghasilkan individu baru yang mewarisi gen dari kedua induknya. Beberapa turunannya mengalami mutasi acak. Seleksi dari turunan generasi saat itu terjadi berdasar pada kondisi tiap individu. Individu yang kondisinya cocok dengan lingkungan akan bereproduksi, dan yang tidak cocok akan mati.

Dalam algoritma genetik, *mapping* terjadi satu per satu dari variabel keadaan ligan ke gen dari kromosom yang dimiliki individu. Kromosom terdiri dari rangkaian gen yang mewakili tiga koordinat kartesian untuk translasi ligan, empat variabel yang mendefinisikan *quaternion*, dan satu nilai riil untuk tiap torsi ligan. *Quaternion* digunakan untuk mendefinisikan orientasi ligan. Gen yang mengkode sudut torsi didefinisikan oleh AUTOTORS, yaitu program preparasi yang digunakan untuk menentukan ikatan dalam ligan yang mungkin berotasi.

Algoritma genetik dimulai dengan membuat populasi acak individu, dimana pengguna mendefinisikan jumlah individu dalam populasi. Untuk tiap individu acak dalam populasi awal, setiap tiga translasi gen untuk x , y , dan z diberikan nilai distribusi yang merata yaitu antara batas minimum dan maksimum *grid map*; empat

gen yang mendefinisikan orientasi diberi *quaternion* acak, terdiri dari vektor dan rotasi acak diantara -180° dan $+180^\circ$; dan gen sudut torsi diberi nilai acak diantara -180° dan $+180^\circ$. Pembuatan populasi acak awal diikuti oleh *loop* setiap generasi, diulang sampai mencapai nilai maksimum evaluasi energi. Satu generasi terdiri dari lima tingkat: evaluasi *mapping* dan *fitness*, seleksi, persilangan, dan seleksi *elitist*.

Mapping menerjemahkan genotip tiap individu berdasarkan fenotipnya, dan terjadi setiap memasuki populasi. Hal tersebut memungkinkan *fitness* individu untuk dievaluasi, yaitu jumlah energi interaksi intermolekul antara ligan dan protein, dan interaksi intramolekul pada ligan. Setiap waktu energi individu dihitung, selama pencarian global dan lokal.

Individu yang memiliki *fitness* lebih dari rata-rata akan memiliki lebih banyak turunan, yaitu berdasar persamaan berikut:

$$n_0 = \frac{f_w - f_i}{f_w - \langle f \rangle} \quad f_w \neq \langle f \rangle \quad (17)$$

Dimana n_0 adalah nilai integer dari turunan yang dialokasikan ke individu; f_i merupakan *fitness* dari individu (misal, energi ligan); f_w merupakan *fitness* individu yang buruk, atau energinya lebih tinggi di generasi N sebelumnya (N merupakan parameter yang dapat ditentukan pengguna, biasanya 10); dan $\langle f \rangle$ merupakan rata-rata *fitness* populasi. Karena *fitness* individu yang salah, f_w akan selalu lebih besar dibanding f_i atau $\langle f \rangle$, kecuali ketika $f_i = f_w$, kemudian untuk individu yang memiliki *fitness* lebih rendah dari rata-rata, $f_i < \langle f \rangle$, pembilang dalam persamaan ini, $f_w - f_i$, akan selalu lebih besar daripada penyebut $f_w - \langle f \rangle$, dan dari persamaan tersebut paling sedikit individu akan memiliki satu turunan. AutoDok memeriksa ketika mencapai nilai $f_w - \langle f \rangle$, dan jika benar, maka populasi diasumsikan telah mencapai titik yang sama, dan *docking* dihentikan.

Persilangan dan mutasi dijalankan pada anggota populasi secara acak berdasar kecepatan persilangan dan mutasi yang didefinisikan pengguna. Pertama, persilangan

dijalankan menggunakan dua titik persilangan, dengan perpotongan hanya terjadi diantara gen, tidak pernah dalam sebuah gen. Kromosom kedua induk akan dipecah menjadi tiga bagian pada posisi gen yang sama, setiap bagian mengandung satu atau lebih gen, secara singkat, ABC dan abc. Kromosom yang akan dimiliki turunannya setelah mengalami persilangan dua titik yaitu AbC dan aBc. Turunan tersebut akan menggantikan induknya dalam populasi, sehingga populasi tetap konstan. Persilangan diikuti oleh mutasi gen karena translasi, orientasi, dan torsional. Mutasi terjadi dengan penambahan nilai acak riil yang memiliki sebuah distribusi Cauchy terhadap variabel, persamaan distribusinya sebagai berikut:

$$C(\alpha, \beta, \chi) = \frac{\beta}{\pi(\beta^2 + (\chi - \alpha)^2)} \quad \alpha \geq 0, \beta > 0, -\infty < \chi < \infty \quad (18)$$

dimana α dan β adalah parameter yang mempengaruhi rata-rata dan penyebaran distribusi.

Parameter integer *elitism* yang dapat didefinisikan pengguna, untuk membedakan seberapa banyak individu atas dapat hidup ke generasi berikutnya. Jika parameter *elitism* tidak sama dengan nol, populasi baru yang dihasilkan dari seleksi, persilangan, dan mutasi dipilih berdasarkan *fitness*-nya

Algoritma genetik beriterasi tiap generasi sampai kriteria terminasi bertemu. Pada akhir setiap *docking*, AutoDock melaporkan *fitness* (energi), variabel keadaan, dan kordinat dari konformasi dock, dan perkiraan energi bebas ikatan (Morris *et al*, 1998).

Algoritma genetik bekerja dengan efisien pada eksplorasi konformasi ruang secara global, tetapi secara spesifik tidak cocok untuk menemukan minimum lokal. Lokal dalam arti operasi secara berulang-ulang yang dilakukan untuk mencari solusi yang lebih baik dalam daerah tetangga dari solusi saat itu. Sedangkan pencarian global dilakukan melalui beberapa minimum lokal. Oleh sebab itu, dalam AutoDock

telah diberi fungsi pencarian lokal, yang didesain untuk menemukan minimum lokal, yang dilakukan sebelum algoritma genetik mengalami *loop* balik ke fase *mapping*.

Pencarian lokal diturunkan dari sebuah algoritma oleh Solis dan Wets, dimana langkah-langkahnya ditentukan, dan konformasi baru yang diperoleh dievaluasi dengan fungsi energi. Perubahan energi antara dua konformasi dihitung seperti pada algoritma Monte Carlo. Jika perubahannya lebih disukai, maka diterima dan sebaliknya jika tidak, maka algoritma akan mengambil langkah yang berlawanan (Morris *et al*, 2001).

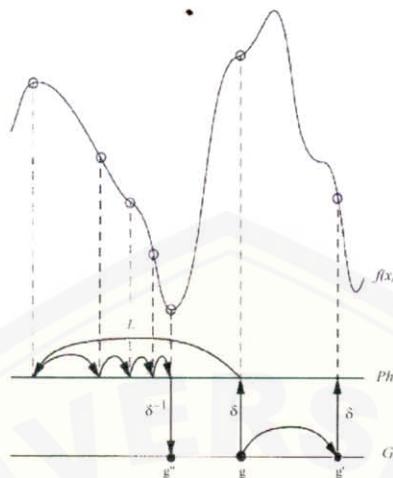
Algoritma genetik dengan penambahan fungsi pencarian lokal disebut algoritma genetik Lamarckian, karena fenotip dari tiap individu yang mengalami pencarian lokal akan ditranskripsikan balik ke dalam genotip individu sebelum dimulai algoritma genetik. Genotip dipetakan ke fenotip melalui fungsi perkembangan (*maturation*), $\delta:G \rightarrow Ph$. Dimana G menunjukkan daerah genotip dan Ph menunjukkan daerah fenotip. Fungsi *fitness*, $f(x)$ ditunjukkan oleh $f:Ph \rightarrow R$.

Algoritma pencarian lokal memberikan informasi tentang *fitness*, sehingga pencarian lokal dilakukan dalam Ph . Pergeseran pencarian lokal didefinisikan menggunakan operator pencarian lokal L :

$$Ph_0 = \delta(g), ph_1 = L(ph_0), ph_2 = L(ph_1), \dots, ph_n = L(ph_{n-1}) \quad (19)$$

Pencarian lokal akan mengeksploitasi fungsi *fitness* untuk memperkirakan nilai *fitness* yang lebih baik.

Mutasi didefinisikan oleh operator M , yang hanya bergantung pada genotip (g). Operator ini tidak dipengaruhi representasi fenotip atau individu lain dalam populasi. Pengertian mutasi di sini adalah mutasi yang dilakukan secara acak (Hart, 1994).



Gambar 2.7. Ilustrasi Pencarian Lokal Genotip dan Fenotip (Hart, 1994).

Gambar 2.7. menunjukkan bagaimana mutasi dan pencarian lokal yang diawali dari sebuah genotip g dan menghasilkan genotip baru g' dan g'' . Operator mutasi menghasilkan genotip lain, sedangkan pencarian lokal menggunakan fungsi perkembangan untuk menghasilkan fenotip. Ketika pencarian lokal digunakan, genotip g mungkin dimodifikasi atau tidak. Pencarian lokal menggantikan g dengan hasil $\delta^{-1}(p_{h_n})$ (Hart, 1994). Jika fungsi pencarian lokal telah diimplementasikan untuk menemukan local minima, maka algoritma genetik Lamarckian bergantung pada keberadaan *inverse map* (δ^{-1}) dari ruang fenotip ke ruang genotip (Morris *et al*, 2001).

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2007 sampai Mei 2007 di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

- a. Komputer AMD Athlon AM2 3200⁺ 1,8 MHz. Dengan spesifikasi :

Memori : 2x1024 MB
Sistem Operasi : Linux Ubuntu 7.0.4

Dilengkapi dengan program aplikasi :

- AutoDockTools
- AutoDock 3.05
- TRITON 3.0

- b. Komputer AMD Athlon 64 3000⁺ 2,0 MHz. Dengan spesifikasi :

Memori : 1024 MB
Sistem Operasi : Linux Ubuntu 7.0.4

Dilengkapi dengan program aplikasi :

- AutoDockTools
- AutoDock 3.05
- Pymol
- Webmo, Mopac, Gamess

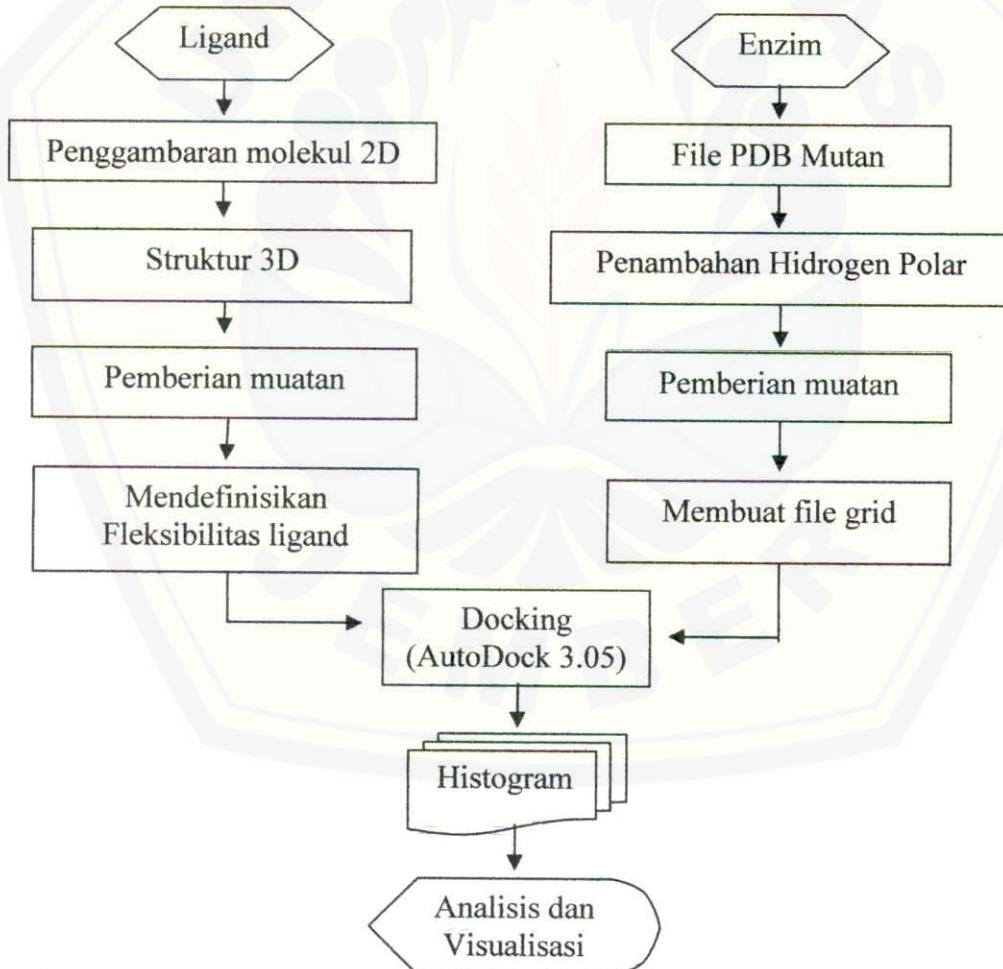


3.3 Diagram Alir Penelitian

3.3.1 Mutagenesis β -Laktamase



3.3.2 Docking



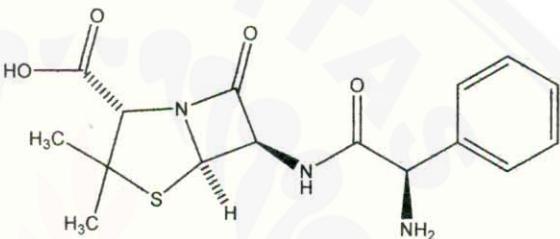
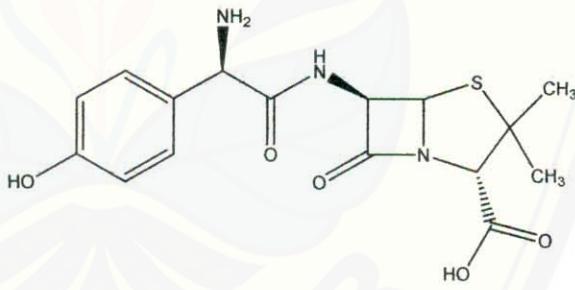
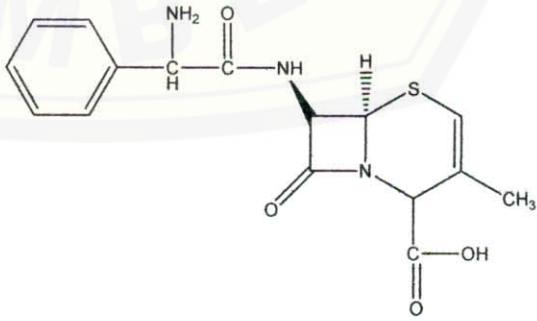
3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

3.4.1 Senyawa Substrat dan Inhibitor

Senyawa substrat dalam penelitian ini yaitu Ampisilin dan inhibitor yang digunakan dalam penelitian ini ada dua jenis, yaitu senyawa Amoxillin, dan Cephradine. Struktur molekul inhibitor dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1. Struktur Substrat dan Inhibitor.

Senyawa	Struktur
Ampicillin	 <p>The chemical structure of Ampicillin consists of a penicillin nucleus (a fused four- and five-membered ring system with a sulfur atom and a nitrogen atom) substituted with two methyl groups on the five-membered ring, a carboxylic acid group, and an amide side chain. The side chain is a phenylglycine derivative, specifically (S)-2-aminophenylglycine, where the amino group is on the same side of the phenyl ring as the attachment point to the penicillin nucleus.</p>
Amoxillin	 <p>The chemical structure of Amoxillin features a penicillin nucleus with two methyl groups on the five-membered ring and a carboxylic acid group. The side chain is a para-hydroxyphenylglycine derivative, specifically (S)-2-(4-hydroxyphenyl)glycine, where the hydroxyl group is on the opposite side of the phenyl ring from the attachment point to the penicillin nucleus.</p>
Cephradine	 <p>The chemical structure of Cephradine is a cephalosporin. It has a six-membered beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. The thiazolidine ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has a carboxamide side chain, specifically (S)-2-aminophenylglycine, where the amino group is on the same side of the phenyl ring as the attachment point to the beta-lactam ring.</p>

3.4.2 Penyiapan Ligand

Pada penggunaan *Webmo*, dan *Mopac* terbagi menjadi dua tahap, adapun tahap-tahapnya untuk gugus fenil adalah sebagai berikut :

- a. *Webmo*. Pada tahap ini menggambar struktur ampicillin, Amoxillin, dan Cephadrine, struktur yang terbentuk berupa 2 dimensi.
- b. *Webmo dan Mopac*. Struktur ampicillin, Amoxillin, dan Cephadrine dibuat dalam bentuk 3 dimensi. Optimasi geometri menggunakan *Mopac* dengan metode PM3. Struktur tiga dimensi ampicillin, Amoxillin, dan Cephadrine disimpan dengan format *PDB*.

Tahap-tahap pengeditan molekul ligan dengan AutoDockTools adalah sebagai berikut:

- a. Struktur ligand dengan format *PDB*, dimpor ke AutoDockTools.
- b. Menambahkan muatan.
- c. Mendefinisikan antara karbon siklik dan planar.
- d. Mendefinisikan ikatan yang mungkin mengalami rotasi.
- e. Menyimpan file dalam format *.pdbq.

3.4.3 Penyiapan β -Laktamase

Struktur β -Laktamase diambil dari *Protein Data Bank*, kemudian diedit menggunakan menggunakan AutoDockTools. Data struktur dari (*PDB*) perlu diedit karena biasanya terdapat masalah, meliputi atom yang hilang, penambahan molekul air, kelebihan molekul, pemutusan rantai dan lain-lain.

Tahap-tahap pengeditan molekul enzim dengan AutoDockTools adalah sebagai berikut:

- a. Membuka file struktur β -Laktamase yang diperoleh dari *PDB* dengan AutoDockTools.
- b. Mengedit ikatan berdasar jarak antar atom.

- c. Penambahan atom hidrogen.
- d. Menyimpan file dalam format *.pdb.

Mutagenesis dilakukan dengan program TRITON 3.0 yang dilengkapi paket homologi modeling MODELLER 6.2. Tahap-tahap mutagenesis dengan TRITON adalah sebagai berikut:

- a. Membuka file struktur template enzim yang telah di edit dengan AutoDockTools.
- b. Modelling protein mutan dengan MODELLER
- c. Substitusi residu F60Y, E61Q, S64T, K67R, Q120E, Y150F, N152D, Y203F,.
- d. Menyimpan file dalam format *.pdb.

Enzim yang diperoleh dengan mutagenesis diedit lagi dengan AutoDockTools. Tahap-tahap pengeditan molekul enzim dengan AutoDockTools adalah sebagai berikut:

- a. Membuka file struktur β -Laktamase yang diperoleh dari TRITON dengan AutoDockTools.
- b. Mengedit ikatan berdasar jarak antar atom.
- c. Menghapus molekul air.
- d. Menghapus atom hidrogen.
- e. Penambahan atom hidrogen polar.
- f. Menyimpan file dalam format *.pdb.
- g. Menambahkan muatan parsial.
- h. Menyimpan file dalam format *.pdbq.
- i. Menambahkan parameter pelarutan.
- j. Menyimpan file dalam format *.pdbqs.

3.4.4 Docking

a. Penyiapan Parameter Grid

Parameter grid memberikan informasi tipe *map* yang akan dikomputasikan, lokasi, dan parameter pasangan energi potensial. Secara umum, satu *map* akan dihitung untuk setiap elemen pada ligan, ditambah *map* elektrostatik.

Tahap-tahap penyiapan parameter grid adalah sebagai berikut:

1. Membuka file makromolekul dalam format *.pdbqs.
2. Membuka file ligan dengan format *.out.pdbq.
3. Menentukan parameter grid. Map dipusatkan pada atom oksigen S64, dengan titik grid 50x50x50. Spasi grid dan parameter yang lain diset *default*.
4. Untuk mengecek akurasi perhitungan dengan grid 50x50x50, dilakuakn juga *docking* dengan titik grid 100x100x100.
5. Kemudian menyimpan file dalam format *.gpf.
6. Menjalankan autogrid dengan perintah:
% autogrid3 -p macro.gpf -l macro.glg &
dimana '**-p macro.gpf**' adalah parameter grid yang telah ditentukan, dan '**-l macro.glg**' adalah file output *log* selama penghitungan grid. sedangkan '**&**' untuk menjalankan perhitungan di belakang layar.

b. Menjalankan AutoDock

Untuk menjalankan AutoDock, perlu disiapkan beberapa parameter. Tahap penyiapan parameter adalah sebagai berikut:

1. Menentukan makromolekul dan ligan.
2. Menentukan parameter algoritma pencarian. Dalam percobaan ini dipilih algoritma genetik, dengan jumlah populasi 250, jumlah *trial* 100/run, dan evaluasi energi 1×10^6 . Parameter lain diset default.
3. Menyimpan parameter Genetic Algorithm-Local Search (GA-LS) dengan format *.dpf.

4. Menjalankan perintah AutoDock, dengan perintah:

```
% autodock3 -p lig.macro.dpf -l lig.macro.dlg] &
```

c. Evaluasi Hasil Docking

Pada akhir perhitungan AutoDock menghasilkan output berupa histogram dari beberapa *job* dan energinya, yang dapat dilihat dalam file **lig.macro.dlg**. Konformasi terbaik dari setiap *cluster* (yang memiliki energi terendah) ditulis dalam format PDB pada akhir log file. Mengekstrak bentuk konformasi file docking dengan perintah:

```
% dockedtopdb lig.macro.dlg > lig.macro.dlg.pdb
```

3.4.5 Visualisasi

Visualisasi dilakukan menggunakan program Pymol. Hasil yang divisualisasikan berupa konformasi ligand dan makromolekul.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut

:

- 1) Dari 11 residu signifikan hasil penelitian Shalom, hanya 7 residu yang menunjukkan efek signifikan pada percobaan ini, diantaranya G61, S64, K67, Q120, Y150, N152 dan K315.
- 2) Ada 2 residu yang sangat berpengaruh pada katalisis β -Laktamase yaitu residu S64 dan Y150, dimana S64 merupakan sisi aktif serin dan Y150 sebagai dasar asilasi dan deasilasi pada katalisis β -Laktamase. Pengaruh 2 residu tersebut tidak dijelaskan pada penelitian Shalom.
- 3) Secara umum, perubahan k_i amoxilin, cephradine dan k_i substrat pada β -laktamase memiliki pola yang sama. Ketika k_i amoxilin dan cephradine menurun, k_i substrat juga mengalami penurunan. Hal tersebut disebabkan amoxilin, cephradine dan ampisilin memiliki gugus fungsi yang sama yaitu gugus C=O.
- 4) Residu yang berpengaruh pada proses katalisis dapat dilihat dari perubahan k_1 yang signifikan pada mutan terhadap terhadap *wild type*.
- 5) Dengan mengetahui k_1 , mekanisme reaksi yang dapat di prediksi hanya sebatas proses pembentukan kompleks enzim substrat atau pembentukan kompleks enzim inhibitor.
- 6) Pada percobaan ini inhibitor dapat mengikat enzim bebas, sehingga tidak termasuk pada reaksi inhibisi nonkompetitif.

- 7) Untuk mengetahui reaksi termasuk pada reaksi inhibisi kompetitif atau nonkompetitif harus dilakukan *docking* pada kompleks enzim-substrat dengan inhibitor.
- 8) Perbedaan hasil *docking* dengan grid 50x50x50 dengan grid 100x100x100 tidaklah terlalu signifikan. Perbedaan signifikan terlihat pada data probabilitas. Hal ini menunjukkan grid 100x100x100 memiliki ketelitian yang lebih baik.

5.2 Saran

- 1) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mempelajari mekanisme reaksi katalisis pada β -laktamase.
- 2) Untuk memprediksi mekanisme reaksi enzimatik harus dilakukan dengan *docking* kompleks enzim-substrat dengan inhibitor.
- 3) Perlu dilakukan percobaan dengan parameter lebih banyak jenis substrat dan inhibitor.

DAFTAR PUSTAKA

- Beadle, B.M. and Shoichet, B.K. 2002. *Structural bases of stability-function tradeoffs in enzymes. J. Mol. Biol.* **321**: 285–296.
- Beadle, B.M., Trehan, I., Focia, P.J., and Shoichet, B.K. 2002. *Structural milestones in the reaction pathway of an amide hydrolase: Substrate, acyl, and product complexes of cephalothin with AmpC β -lactamase. Structure* **10**:413–424.
- Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. 1995. *A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1211–1233.
- Damborský, J., Prokop, M., and Koca, J. 2001. *TRITON: graphic software for rational engineering of enzymes. Trends in Biochemical Sciences*, 26 :71-73.
- Ghuysen, J.M. 1991. *Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 37–67
- Hart, W. E. 1994. *Adaptive Global Optimization with Local Search. A dissertation in partial satisfaction of the requirements for the degree Doctor of Philosophy in Computer Science & Engineering.* San Diego: University of California.
- Kolmodin, K. 2001. *Computer Simulation of Protein Tyrosine Phosphatase Reaction Mechanisms and Dihydrofolate Reductase Inhibition. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 667. 65 pp. Uppsala. ISBN 91-554-5148-9.
- Lehninger, A.L., 1975, *BIOCHEMISTRY*, Second Edition. New York: Worth Publisher, Inc.

- Lobkovsky, E., Moews, P.C., Liu, H., Zhao, H., Frere, J.M., and Knox, J.R. 1993. *Evolution of an enzyme activity: Crystallographic structure at 2-Å resolution of cephalosporinase from the ampC gene of Enterobacter cloacae P99 and comparison with a class A penicillinase. Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 11257–11261.
- Lobkovsky, E., Billings, E.M., Moews, P.C., Rahil, J., Pratt, R.F., and Knox, J.R. 1994. *Crystallographic structure of a phosphonate derivative of the Enterobacter cloacae P99 cephalosporinase: Mechanistic interpretation of β -lactamase transition-state analog. Biochemistry* **33**: 6762–6772. Mad
- Mathew, C.K. and Holde, K.E.V. 1990. *BIOCHEMISTRY*. Canada: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Michael, I. Page and Andrew, P. Laws. 1998. *The mechanism of catalysis and the inhibition of b-lactamases. Department of Chemical and Biological Sciences, The University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield, UK HD1 3DH*
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J., 1998. *Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. J. Comp. Chem.* **19**: 1639-1662.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., Hart, W. E., Halliday, S., Belew, R., and Olson, A. J. 2001. *User's Guide : AutoDock (Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors), Version 3.0.5.*
- Oefner, C., D'Arcy, A., Daly, J.J., Gubernator, K., Charnas, R.L., Heinze, I. Hubschwerlen, C., and Winkler, F.K. 1990. *Refined crystal structure of β -lactamase from Citrobacter freundii indicates a mechanism for β -lactamhydrolysis. Nature* **343**: 284–288.

- Prokop, M., Damborský, J., and Koca, J. 2000. *TRITON: in silico construction of protein mutants and prediction of their activities. Bioinformatics Applications Note*. 16: 845-846.
- Sali, Andrej. Webb, B., Madhusudhan, M.S., Shen, M.Y., Renom, M.A.M., Eswar, N., Alber, F., Oliva, B., Fiser, A., Sanchez, R., Yerkovich, B., Badretdinov, A., Melo, F., Overington, J.P., and Feyfant, E. 2004 *Manual : MODELLER (A Program for Protein Structure Modeling), Release 7v7*.
- Sali, A. and Blundell, T. L. 1993. *Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. J. Mol. Biol.* 234: 779-815.
- Sali, A. and Overington, J. P. 1994. *Derivation of rules for comparative protein modeling from a database of protein structure alignments. Protein Science*, 3: 1582-1596.
- Shalom, D. Goldberg, et al. 2003. *Identification of residues critical for catalysis in a class C β -lactamase by combinatorial scanning mutagenesis*. 1Department of Chemistry and 2Columbia Genome Center and Department of Chemical Engineering, Columbia University, New York, New York 10027, USA
- Voet, D. and Voet, J. 1995. *BIOCHEMISTRY*, Second Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Zhang, Z., Yu, Y., Musser, J.M., and Palzkill, T. 2001. *Amino acid sequencedeterminants of extended spectrum cephalosporin hydrolysis by the class C β -lactamase. J. Biol. Chem.* 276: 46568–46574.

