

Pengembangan instrumen pendukung identifikasi protein berbasis *molecularly imprinted polymer* melalui *imprinted PMAA-BSA*

(Development of supported instrument protein identification based on molecularly imprinted polymer with imprinted PMAA-BSA)

Annisa Fillaeli dan Marfuatun

Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA UNY

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk memudahkan identifikasi protein atau turunannya dalam matriks yang kompleks dengan *molecularly imprinted polymer* (MIP) yaitu *imprinted PMAA-BSA*. PMAA-BSA disintesis dengan Asam Metakrilat (MAA) sebagai monomer, Etilen Glikol Dimetakrilat (EDMA) sebagai *cross-linker*, BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai *template* pencetak molekul protein dengan benzoil peroksida (dalam kloroform dan benzena) dengan metode polimerisasi *bulk* secara termal. *Imprinted PMAA-BSA* terbentuk setelah tahap ekstraksi *template* BSA dari PMAA-BSA dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa PMAA-BSA berhasil disintesis dengan komposisi MAA : EDMA : BSA (20 mg/ml) = 5 : 1 : 1 (mol) dengan konsentrasi benzoil peroksida sebesar 0.5 mg/ml. PMAA-BSA memiliki BM 3440 g/mol, meleleh pada 131,73⁰C, dan terdegradasi secara termal pada 374,98⁰C dengan kehilangan berat hingga 69,78%. Pada spektra IR PMAA-BSA terdapat pita serapan penciri gugus amida sekunder, pada 1634 cm⁻¹, sedangkan spektra IR PMAA tidak menunjukkan profil tersebut. Pita serapan penciri amida sekunder pada spektra IR *imprinted PMAA-BSA* menunjukkan masih ada penciri amida sekunder dengan intensitas yang lebih rendah. Pengukuran filtrat BSA pada tahap pembentukan *imprinted PMAA-BSA* dan tahap ekstraksinya menunjukkan recovery dan reproducibility terbaik 94,85% dan 8,029%.

Kata kunci: polimer, MIP, BSA

Abstract

This research aimed at simplifying protein identification or its derivate in complex matrices by molecularly imprinted polymer (MIP). The MIP was imprinted PMAA-BSA. PMAA-BSA were synthesized with MAA as monomer, EDMA as cross-linker, BSA as template, and initiated with benzoyl peroxide (in chloroform and benzene) by using thermally bulk polymerisation method. The results showed that PMAA-BSA was successfully synthesized with MAA:EDMA:BSA (20 mg/ml) 5:1:1 (mole) composition. Benzoyl peroxide concentration best performance was at 0.5 mg/ml. The PMAA-BSA profile has a molecular weight 3440 g/mol, melting point at 131.73⁰C, and thermal degradation at 374.98⁰C with weight loss up to 69.78%. IR spectra of PMAA-BSA showed the characteristic band as secondary amide group at 1634 cm⁻¹ while the spectra of pure PMAA has no the band. The band was still found in imprinted PMAA-BSA spectra and indicated that secondary amide character still bound to the polymer although in less intensity. BSA filtrate was measured while imprinted PMAA-BSA was synthesized and the extraction showed that recovery and reproducibility were 94.85% and 8.029% respectively.

Key words: polymer, MIP, BSA

Pendahuluan

Setiap molekul memiliki ciri khas. Ciri khas suatu molekul jika dijadikan sebagai cetakan pada suatu material maka akan terbentuk rongga komplemen yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan molekul tersebut dengan cara memerangkapnya ketika berada di dalam campuran. Menggunakan suatu molekul sebagai pencetak merupakan dasar bagi pembuatan *molecularly imprinted polymer* (MIP). MIP merupakan teknologi yang memudahkan kita untuk mensintesis material dengan sisi reseptor yang sangat spesifik terhadap molekul target, karena polimer tersebut disiapkan dengan adanya molekul target sebagai cetakan (templat) [1].

Keunggulan dari MIP ini adalah lebih mudah dikarakterisasi dan memiliki pendekatan desain yang rasional [2]. Rasionalisasi penggunaan MIP ini terletak pada sensor yang berasal dari zat yang akan ditentukan kandungannya di dalam sampel, stabilitas teknis dan kimia yang baik, berbiaya murah dan mudah preparasinya. Kombinasi dari kemampuan MIP yang spesifik, selektif, stabil, murah dan mudah preparasinya merupakan nilai tambah yang diinginkan dalam analisis kimia.

Penggambaran pengenalan molekul secara spesifik dan selektif tersebut merupakan proses dasar yang dapat dikembangkan untuk mengontrol langkah pemisahan pada material biologi. Untuk sampel biologi, secara umum teknik MIP akan efektif pada molekul target yang kecil ($M_r < 1500$), sementara teknik untuk molekul yang lebih besar seperti protein lebih sulit [3].

Usaha sintesis MIP untuk pemisahan protein telah dilakukan dengan menggunakan HSA (*Human Serum Albumin*) sebagai sarana mediasi untuk membantu menyeleksi molekul target yang mengandung protein atau turunan protein dalam sampel darah dengan bantuan material berpori. Pembuatan MIP ini membutuhkan standar protein (HSA) sebagai molekul *template*, suatu monomer (Akrilamid atau Aam) dan *cross-linker* (Meten bisakrilamid) dengan metode

polimerisasi suspensi secara termal menggunakan pengemban silika [4]. Namun demikian, MIP dapat dibuat secara polimerisasi *bulk* [5]. Polimerisasi *bulk* dengan radikal bebas merupakan cara paling sederhana, tidak membutuhkan keahlian dan instrumentasi khusus untuk membuat MIP [6].

Selain HSA, penggunaan BSA (*Bovine Serum Albumin*) juga umum digunakan sebagai standar protein. Dengan karakter yang sama, penelitian ini menitikberatkan pada penggunaan BSA sebagai standar template untuk sintesis MIP. Polimer yang akan dicetak menggunakan BSA adalah poli(asam metakrilat) (PMAA) dengan MAA sebagai monomer fungsional dan EDMA sebagai *cross-linker* dalam pendekatan non kovalen melalui proses polimerisasi *bulk*. MAA dapat berperan baik sebagai donor maupun akseptor ikatan hidrogen [7], membentuk ikatan yang kuat dengan pelarut yang dipilih, sehingga dapat meningkatkan kapasitas dan homogenitas rongga yang terbentuk [8]. PMAA juga telah digunakan untuk MIP guna mengenali ion uranil [9].

Metode Penelitian

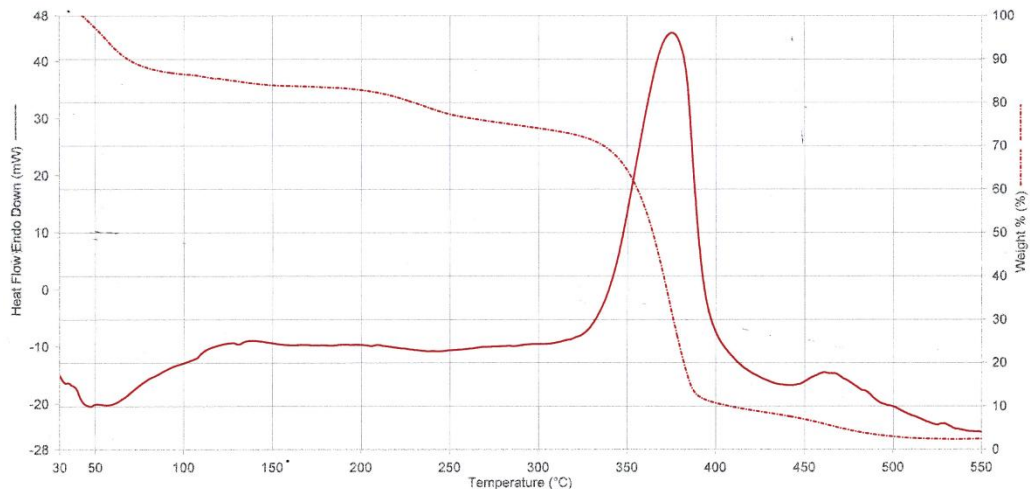
Methacrylic Acid (MAA), *Etilen Glycol Dimethacrylate* (EDMA) dan *Benzoyl Peroxide* dari Merck, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *chloroform*, *benzene*, *reagen biuret* dan *akuades* dalam grade pro analisa. Penentuan BM dengan viscometer Ostwald, Spektrometer IR digunakan untuk penentuan gugus fungsi, TGA/DTA untuk profil termal polimer, dan Spektrometri D-20 untuk kuantifikasi kadar protein. Sintesis MIP dimulai dengan mencampurkan MAA dan BSA (dalam akuades dan buffer fosfat) dengan perbandingan 1:1, dihomogenkan dengan EDMA dan benzoil peroksida (dalam pelarut kloroform dan benzene dengan konsentrasi 0,1-1 mg/ml) dengan perbandingan 1:1 secara berurutan. Proses polimerisasi dilakukan dengan waterbath pada suhu 37°C selama 20 jam. Polimer yang terbentuk dicuci dengan akuades dan buffer pospat hingga protein tak terdeteksi. Kadar BSA diukur menggunakan metode

biuret pada panjang gelombang 520 nm pada filtrate polimerisasi dan proses ekstraksi. Kontrol dibuat dengan cara yang sama namun tanpa menambahkan BSA.

Hasil dan Diskusi

Ada tiga macam polimer yang dipelajari dalam penelitian ini. Yang pertama adalah PMAA, kemudian PMAA-BSA dan yang terakhir adalah *imprinted* PMAA-BSA yang merupakan bentuk akhir dari MIP. PMAA dipelajari sebagai kontrol polimer tanpa penambahan BSA. PMAA-BSA merupakan polimer yang disintesis bersama antara MAA, EDMA dan BSA.

Sehingga, dalam PMAA-BSA, diharapkan karakter BSA nampak sebagai wujud dari keberhasilan memasukkan templat BSA ke dalam polimer. Proses ekstraksi yang dilakukan pada PMAA-BSA dimaksudkan untuk menghilangkan BSA dari badan polimer, sehingga akan diperoleh *imprinted* PMAA-BSA. Karakter polimer yang dipelajari untuk menggambarkan terbentuknya PMAA-BSA dalam studi ini dilakukan dengan menggunakan cara Ostwald menggunakan pelarut DMF. Keberhasilan sintesis PMAA-BSA ditandai dengan berat molekul yang terbentuk sebesar sebesar 23440 g/mol. Profil sifat termal PMAA-BSA dipelajari menggunakan DTA-TGA. Termogram DTA-TGA dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Profil DTA-TGA PMAA-BSA (laju pemanasan 5⁰C/min)

Termogram PMAA-BSA menunjukkan titik leleh polimer pada temperatur 131,73⁰C dan mengalami degradasi termal pada 374,98⁰C. Pada 71,50⁰C polimer mengalami kehilangan berat sebesar 10,89%, yang mengindikasikan adanya reaksi dehidrasi. Pada (100 – 300)⁰C PMAA-BSA menunjukkan kestabilan relatif untuk aplikasi PMAA-BSA. Degradasi termal yang ditandai kehilangan berat kembali teramati dalam jumlah besar mulai 338,10⁰C-380⁰C sebesar 60,22%. Setelah itu menurun secara gradual hingga suhu pengamatan terakhir yaitu 550⁰C berat polimer tertinggal sebesar 2,44%.

Studi MIP melalui PMAA-BSA dapat diinisiasi melalui 2 tahapan dasar, yaitu

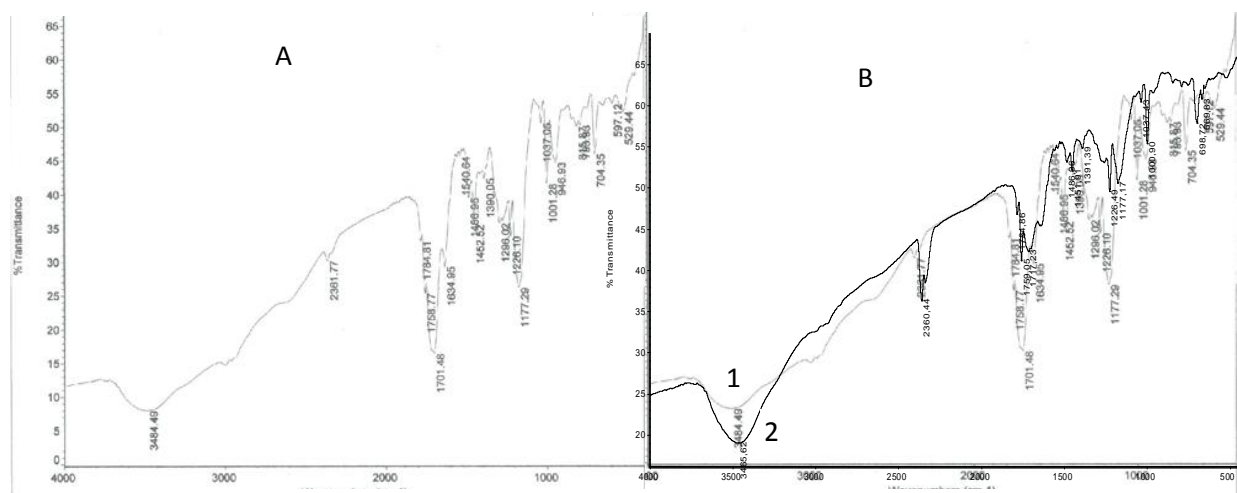
proses pencetakan (*imprinting*) melalui penambahan molekul *template* saat polimerisasi, dan proses ekstraksi molekul *template* dari badan polimer yang terbentuk. Pencetakan molekul dapat dilakukan pada suatu bidang permukaan yang telah tersedia untuk membentuk karakter baru pada permukaan tersebut. Jika bidang permukaan tersebut berongga atau merupakan sisi suatu rongga, maka molekul pencetak akan mempengaruhi rongga tersebut baik secara fisika maupun kimia.

Proses pencetakan dilakukan melalui interaksi *template* secara langsung dengan monomer. Interaksi antara monomer dan molekul *template* pada cara ini membuka kemungkinan adanya interaksi gugus aktif dari monomer maupun molekul

template yang saling terhubung silang. Hal ini berarti molekul *template* diharapkan memiliki interaksi yang lebih kuat terhadap polimer yang terbentuk. Profil petunjuk adanya interaksi hubung silang terlihat pada hasil spektra IR untuk polimer yang masih mengandung protein (PMAA-BSA), yaitu adanya vibrasi *stretching* gugus OH yang menandakan adanya ikatan hidrogen.

Potensi ikatan hidrogen dapat berasal dari hubung silang gugus utama polimer dari monomer asam metakrilat, maupun interaksi antara polimer dengan protein, karena gugus ujung protein juga memungkinkan adanya ikatan hidrogen.

Spektra polimer PMAA, PMAA-BSA dan *imprinted* PMAA-BSA dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. A. Spektra IR PMAA; B(1). Spektra IR PMAA-BSA; B(2). Spektra IR *imprinted* PMAA-BSA

Ada beberapa spektra utama pola spektra IR BSA [10] yang dijadikan perhatian yaitu pada bilangan gelombang 3430, 3062, 1715, dan 1595 cm^{-1} yang masing-masing bersesuaian dengan vibrasi *stretching* gugus OH, vibrasi *stretching* gugus amida A (NH utama), vibrasi *stretching* untuk C=O, dan pasangan vibrasi *bending* NH dan vibrasi *stretching* CN gugus amida II. Pada gambar 1 terdapat pita tajam pada 1701 cm^{-1} sebagai penciri gugus C=O karbonil. Pita lebar pada 3484 cm^{-1} timbul dari rentangan OH. Pita pada bilangan gelombang di atas 3400 dan di bawah 3600 cm^{-1} menandakan bahwa gugus OH dengan ikatan hidrogen. Terdapat pita penciri C=C pada 1634 cm^{-1} dengan frekuensi sedang. Terdapat penciri serapan CH_3 pada 1452 cm^{-1} . Pita pada 2361 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan rangkap 3, namun terlalu lemah untuk menunjukkan adanya gugus nitril atau asetilen tersubstitusi tunggal, karena tidak terdapat pita tajam pada 3300 cm^{-1} untuk CH tunggal dari gugus $-\text{C} \equiv \text{C} - \text{H}$. Pita

kuat di daerah 1200 – 1000 cm^{-1} menunjukkan jika pita tersebut mengindikasikan adanya eter. Hal ini menunjukkan system pelarut eter dari monomer dan cross-linker.

Tahap ke-2 pencetakan molekul dalam polimer menghendaki pembersihan molekul templat dalam rongga polimer agar modifikasi rongga terjejak molekul templat yang komplemen. Rongga tersebut selanjutnya dapat digunakan untuk memerangkap molekul identik dengan molekul templat. Total protein terekstrak dari dalam rongga polimer yang dimulai dari perhitungan filtrate BSA tahap sintesis PMAA-BSA dan filtrate BSA tahap ekstraksi BSA dari PMAA-BSA sebagai tahap ke-2 sintesis untuk mencapai terbentuknya *imprinted* PMAA-BSA tidak menampakkan adanya penghilangan total protein dalam polimer. Hal ini mengindikasikan terbentuknya kopolimer protein-PMAA, karena BSA itu sendiri merupakan protein globular dengan berat molekul besar yang merupakan polimer. Didukung pula oleh hasil spektra IR B(2) yang menunjukkan

bahwa proses ekstraksi BSA dari polimer hanya menurunkan intensitas spektra penciri BSA. Artinya, dugaan atas relasi hubung silang yang kuat antara *template*-polimer ditunjukkan oleh spektra tersebut, dengan masih adanya penciri BSA sebagai pita amida sekunder pada 1634 cm^{-1} dengan pergeseran pengaruh matriks. Hasil kuantifikasi BSA dalam filtrat yang dapat dilihat pada tabel 1 juga menunjukkan masih adanya protein dalam polimer setelah

ekstraksi ke-4, yang tidak dapat diperoleh kembali (recovery) hingga 100%, melainkan paling besar hingga 94,85% pada *imprinted* PMAA-BSA dengan inisiator benzoil peroksida dalam pelarut kloroform. Jika dibandingkan dengan profil *imprinted* PMAA-BSA dengan inisiator benzoil peroksida dalam pelarut benzene, maka benzoil peroksida dalam kloroform memiliki recovery yang lebih baik.

Tabel 1. Profil filtrat tahap sintesis dan tahap ekstraksi

Sistem pelarut BP*	Kadar BSA	Filtrate BSA tahap sintesis	Filtrat BSA tahap ekstraksi (mg/ml)				Total BSA terekstrak	Recovery	Reproducibility
			I	II	III	IV			
Kloroform	20 mg/ml	7,91 mg/ml	7,17	1,74	1,78	0,37	18,97	94,85%	8,029%
Benzene	20 mg/ml	6.19 mg/ml	0,68	0,35	0,16	0,90	8,28	41.4%	11,32%

Tabel 1 menunjukkan bahwa *imprinted* PMAA-BSA dalam BP-kloroform memiliki performa recovery yang lebih baik karena memiliki angka di atas 90%, namun kurang *reproducible* karena menunjukkan angka *reproducibility* 8,029% yang berarti lebih dari 5,6% untuk orde konsentrasi 10^{-3} dengan metode standar. Namun demikian hasil ini juga mengindikasikan bahwa MIP yang disintesis menggunakan molekul besar seperti protein sebagai templat dapat digunakan untuk memodifikasi rongga protein, sehingga jalan menuju sintesis MIP dengan recovery dan reproducibility yang lebih baik semakin terbuka.

Kesimpulan

Studi pengembangan instrumen pengidentifikasi protein melalui sintesis *imprinted* PMAA-BSA berhasil dilakukan dengan komposisi MAA:EDMA:BSA (20 mg/ml) = 5:1:1 (mol) dengan konsentrasi BP sebesar 0.5 mg/ml (dalam kloroform dan benzene). Karakter polimer yang dihasilkan adalah BM sebesar 3440 g/mol, terdapat penciri amida sekunder pada PMAA-BSA dan mengalami degradasi termal pada 374,98%. Recovery dan reproducibility

sintesis *imprinted* PMAA-BSA terbaik sebesar 94,85% dan 8,029%.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh DIPA UNY dalam skim penelitian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dosen junior.

Pustaka

- [1]. C.M. Lok, R. Son. International Food Research Journal 16(2009) 127-140.
- [2]. Huang Yong-xing, Lian Hui-ting, Sun Xiang-ying and Liu Bin. Chem. Res. Chinese Universities 2011, 27(1), 28—33
- [3]. Turner, N.W., Christopher W. Jeans, Keith R. Brain, Christopher J. Allender, Vladimir Hlady, and David W. Britt. Biotechnol Prog. 2006; 22(6): 1474–148.
- [4]. Ali Nematollahzadeh, Wei Sun, Carla S.A. Aureliano, Dirk Lutkemeyer, Jorg Stute, Mohammad J. Abdekhodaie, Akbar Shojaei, and Borje Sellergren. Angewandte Chemie International Edition 50(2011) 495-498.

- [5]. Pérez-Moral, N dan Mayes, A.G. *Analytica Chimica Acta* 504 (2004) 15–21.
- [6]. Hongyuan Yan dan Kyung Ho Row. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *Int. J. Mol. Sci.* 2006,7, 155-178.
- [7]. Patrick T. Valano, Vincent T. Remcho. *Journal of Chromatography A*, 887 (2000) 125-135.
- [8]. Christine Widstrand, Ecevit Yilmaz, Brian Boyd, Johan Billing, dan Anthony Rees. *American Laboratory News*. October 2006.
- [9]. Galiya S. Azhgozhinova, Olgun Güven, Nursel Pekel, Artem V. Dubolazov, Grigoriy A. Mun, Zauresh S. Nurkeeva. *Journal of Colloid and Interface Science* 278 (2004) 155–159.
- [10]. J. Grdadolnik, *Bull. Chem. Technol. Macedonia*. 21(2002) 23-24.