

UJI DYNAMIC BINDING CAPACITY KOLOM MONOLITH POLY (MATE-CO-VBC-CO-EDMA) PADA SAMPEL BIOMOLEKUL BOVINE SERUM ALBUMIN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Eko Malis¹, Dimas Priagung Banar²,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas PGRI Banyuwangi
Email: malisgsn@gmail.com

Abstract

Kolom monolith poly(MATE-co-VBC-co-EDMA) dengan %T 35, dan %C 50 merupakan komposisi total monomer dan komposisi cross linker yang ideal, yaitu mempunyai kestabilan mekanis dan mekanis yang baik, molecular recognition sites memadai (ditandai dengan binding capacity 22,208 mg mL⁻¹), serta proporsi *flow-through pores* dan *mesopores* seimbang yaitu 24,24% dan 44,32%. Kolom Monolith %T 35% dan %C 50% mampu memisahkan secara akurat sampel biomolekul oligo(dT₁₂-dT₁₈) dan fragmen DNA dengan resolusi masing-masing 1,4 dan 1,0. Dari aplikasi model sampel oligo(dT₁₂-dT₁₈) dan fragmen DNA, pada pemisahan oligo(dT₁₂-dT₁₈) mekanisme pemisahan adalah penukar ion, sedangkan pada DNA termetilasi mekanisme pemisahan adalah interaksi hidrofobik, sehingga monolith poly(MATE-co-VBC-co-EDMA). Memberikan dua mekanisme pemisahan yang berbeda (dual-mode) pada aplikasisampel-sampel DNA.

Keywords: Polimer, Dynamic Binding Capacity, Protein, Monolith

1. Introduction

Monolith adalah material berpori kontinyu lapis tunggal dengan struktur pori bimodal yang terdiri dari *mesopore* dan *flow-through pores*. Sebagai media pemisahan, monolith telah mendapatkan perhatian yang sangat besar sebagai pengganti kolom konvensional (*conventional packed-column*) yang selama ini digunakan dalam KCKT. Kolom monolith dan aplikasinya telah berkembang dengan pesat dalam decade terakhir ini dan bahkan saat ini memainkan peranan yang sangat penting dalam ilmu pemisahan (*separation science*) dan lebih jauh lagi dalam bidang kimia lainnya seperti reactor mikro untuk sintesis bahan berkhasiat, ekstraksi fase padat, *peptide mapping*, pemekatan *phosphor peptide*, *wide-genome analysis*, *catalyst support*, dan lain-lain (Sabarudinet *al.*, 2012).

Pada umumnya, monolith dibuat dengan menekan proporsi *mesopore* dan memaksimalkan proporsi macropore (*flow-through pores*) agar dapat memberikan kinetika transfer massa secara konvektif. Akan tetapi keberadaan *mesopore* dan *micropore* harus dipertimbangkan juga karena dapat menyediakan luas permukaan yang besar untuk interaksi antara fase diam dan molekul analit, disamping dapat meningkatkan gugus-gugus fungsi pada post-modifikasi monolith secara kimia sehingga menghasilkan *binding capacity* yang memadai terhadap target molekul. Dalam mempersiapkan monolith dioptimalkan terbentuknya *mesopore* daripada *micropore*, karena *micropore* ini dapat menyebabkan adsorpsi irreversibel yang tidak diinginkan dan resistansi transfer massa. Jaringan *mesopore* merepresentasikan 10–15% dari total porositas. Oleh karena itu, monolith harus mempunyai porositas yang optimum

yaitu keseimbangan antara proporsi *flow-through pores* (untuk transfer massa secara konvektif) dan luas permukaan yang memadai (ditandai dengan proporsi *mesopore*) sehingga mendapatkan *dynamic binding capacity* (kapasitas pengikatan dinamis) yang baik dan pemisahan dengan segala keuntungan dan kerugiannya.

2. Methodology

Preparasi Kolom Monolith Poly(MATE-co-VBC-co-EDMA)

Monolith Poly(MATE-co-VBC-co-EDMA) disusun oleh satu langkah termal dimulai pada metode poli merisasi *insitu* sesuai dengan dioptimasi %T dan %C seperti pada tabel 4.3.2. Prosesedur preparasi larutan polimer secara berurutan porogen organik 1-propanol dan 1,4-buta nediol dicampur kemudian divortex sampai kedua nyahomogen. Selanjutnya, MATE, VBC dan EDMA secara berurutan ditambahkan dalam ditambahkan dan divortex sampai homogeny sebelum ditambahkan inisiator AIBN 1% v/v.

Kemudian larutan yang dihasilkan dimasukkan kedalam kolom sili costeel tubing dengan panjang 100 mm dan diameter 1/16 inch. Kedua ujung kapiler disegel oleh karet silicon untuk polimerisasi pada suhu 60 °C selama 20 jam. Setelah itu kolom monolith dicuci dengan methanol/air (50:50) selama 1 jam untuk untuk menghilangkan sisa reagen yang tidak bereaksi. Kolom monolith disimpan dalam desikator sebelum dikarakterisasi.

Tabel. 4.3.2 Komposisi monolith MATE-co-VBC-co-EDMA

Monolith	% T	%C	EDMA	MATE	VBC (mL)	Poroge	Poroge	AIBN 1%(w/v)
----------	-----	----	------	------	----------	--------	--------	--------------

			(mL)	(mL))	n (mL)	n (mL))	
								1 prop	1,4 BTD
1	20	25	0.100	0.075	0.225	1.60	1.018	0.582	0.004
2	20	50	0.200	0.050	0.150	1.60	1.018	0.582	0.004
3	25	50	0.250	0.063	0.188	1.50	0.955	0.545	0.005
4	30	50	0.300	0.075	0.225	1.40	0.891	0.509	0.006
5	35	50	0.350	0.088	0.263	1.30	0.827	0.473	0.007
6	40	50	0.400	0.100	0.300	1.20	0.764	0.436	0.008

Waktu polimerisasi 20 jam dan suhu polimerisasi 60°C

a. Perhitungan derajat Cross linker yaitu :
% C (v/v)

$$= \frac{(volume\ crosslinker)}{(volume\ total\ monomers + solvent)} \times 100\%$$

$$= \frac{(volume\ EDMA)}{((MATE + VBC + EDMA + 1 - propanol + 1,4 - butanediol))} \times 100\%$$

Rasio pelarut = v/v

Inisioator = 1 wt% Jumlah AIBN sebagai inisiator adalah 1% w/v yang dihitung berdasarkan total monomer (volume MATE + volume VBC + volume EDMA).

Jumlah AIBN sebagai inisiator adalah 1% (w/v) yang dihitung berdasarkan total monomer (Volume Mate + Volume VBC + Volume EDMA). Volume total campuran dibuat konstan 2 mL.

DBC ditentukan melalui elusi frontal dengan sampel bovin serum albumin (BSA).

Mula-mula kolom dielusi dengan solvenaquades. Kemudian 2 mg/mL BSA dalam aquades dengan kecepatan alir yang diatur berturut-turut 0.05 mL/menit dan 0.1 mL/menit yang dideteksi pada panjang gelombang 280 nm. DBC dihitung pada 10% dari nilai absorbansi akhir pada kenaikan kurva absorbansi yang dihasilkan. Perhitungan DBC menggunakan persamaan yang dijelaskan pada bagian 4.5.2. elusi frontal selain menentukan DBC, juga dapat menentukan Static Binding Capacity (SBC). SBC dapat dihitung dengan persamaan berikut.

$$SBC = \frac{(V_e - \epsilon V_{Monolith})_{cf} - \int_0^{V_e} C_{out} dV_e}{V_{monolith}}$$

V_e = Volume elusi (mL)

$V_{monolith}$ = total volume monolith (mL)

c_f, c_{out} = feed dan outlet konsentrasi terlarut

ϵ = porositas dari monolith

Berikut ilustrasi kurva break-through hubungan DBC dengan SBC.

3. Results and Discussion

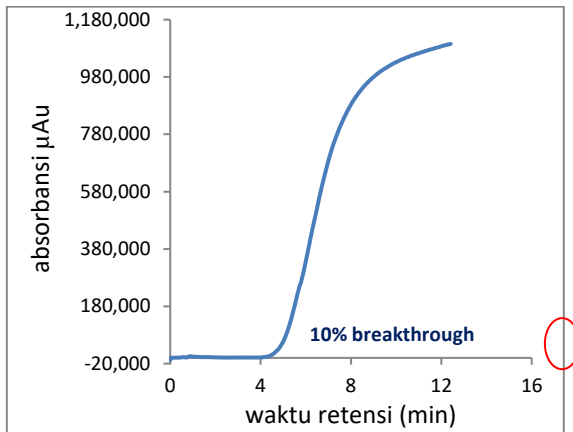
DBC dilakukan untuk mengetahui jumlah molecular recognition sites pada permukaan monolith Poly(MATE-co-VBC-co-EDMA) mempunyai gugus ammonium kuarterner yang merupakan penukar ion dan gugus fenil yang bersifat hidrofobik. Semakin besar nilai *molecular recognition sites* pada permukaan monolith efisiensi pemisahan monolith semakin baik. Perhitungan DBC sesuai dengan persamaan 4.2 a subbab 4.3.3.4 dengan elusi secara frontal sampel biomolekul Bovine Serum Albumin/BSA (sampel BSA 2 mg/mL dalam H₂O demineralisasi) diinjeksikan 2 μ mL dalam

kolom monolith. Nilai void diperoleh dengan mengalirkan sampel BSA tanpa kolom monolith. Volume total kolom dihitung sesuai dengan persamaan 4.6 diperoleh 0,02 mL.

Untuk kolom %T20 dan %C25 ; %T20 dan %C 50; %T 25 dan %C50, kemudian fase gerak Acetonitrile : air (95:5 v/v) dialirkan kedalam kolom monolith poly(MATE-co-VBC-co-EDMA) dengan laju alir 0,05 mL/menit. Volume v_0 sekitar 0,316 mL yang merupakan nilai void (volume kosong tanpa kolom) pada sistem KCKT. Sedangkan %T30, dan %T 35, %C 50 dialirkan fase gerak dengan laju alir 0,1 ml/menit. Volume void yang dihasilkan sekitar 0,366 mL. Perbedaan laju alir dipilih karena nilai %T tinggi pada sampel BSA lebih terikat kuat dibandingkan dengan nilai %T kecil.

Dynamic binding capacity (DBC) dari kolom monolith ditentukan oleh fungsional group yang secara kimia terikat dan teradsorpsi pada matriks/penyokong monolith. Ketika sampel BSA teradsorpsi dalam fase diam, konsentrasi outlet = 0, ketika kolom mulai jenuh dengan BSA, maka BSA akan menerobos pori-pori dalam kolom (*breakthrough*), pada saat itulah konsentrasi outlet BSA mulai meningkat terhadap konsentrasi inlet BSA. Analisa frontal digunakan untuk mengetahui limit difusi pada DBC. Pada saat BSA berikatan/teradsorpsi pada fase diam (ketika konsentrasi garam rendah) pada saat itulah data *break-through* direkam/dicatat. Kurva DBC meningkat seiring peningkatan konsentrasi dan waktu retensi.

Berikut ini salah satu plot kurva *break-through* monolith dengan laju alir 0,1 mL/menit. Data dan kurva uji DBC dapat dilihat pada lampiran 3 sub bab L.3.3



Gambar 5.6 Plot analisa frontal DBC wakturetensi vs intensitas absorbansi, sampel 2mg/mL BSA dalam H₂O, laju alir 0.1mL/menitacetonitrile:air 95:5v/v)

Dari data penelitian pada lampiran 1. Diperoleh perhitungan DBC dari kolom monolith poly(MATE-co-VBC-co-EDMA) ditunjukkan pada tabel 5.3 perhitungan DBC.

Tabel 5.4 Data Perhitungan DBC

Uji DBC	% T - %C				
	20 - 25	20 - 50	25 - 50	30 - 50	35 - 50
1.	15,086	21,641	20,262	20,856	21,365
2.	16,55	17,207	20,007	21,266	19,922
3.	15,088	22,655	20,135	21,061	22,042
rata-rata DBC	15,62	20,501	20,135	21,266	22,978

% T : %C20 : 25 = monolith I, 20 : 50 = monolith II, 25 : 50 = monolith III, 30 : 50 monolith IV dan 35 50 monolith V, %T : C % (40:50) =Monolith VI = tidak dipakai karena tidak dapat diluui oleh fasegerak.

Data pada tabel 5.4 dengan membandingkan data uji DBC kolom %T20, %C25 dan %T20, %C 50 mempunyai nilai DBC berturut-turut 15,62 dan 20,501. Peningkatan nilai DBC diduga karena

dipengaruhi peningkatan ukuran *globule* monolith. Ukuran *globule* yang lebih besar akan memudahkan sampel BSA teradsorpsi pada fasediam dan terikat kuat pada *molecular recognition sites*. Peningkatan jumlah crosslinker dalam monomer dalam volume polimer yang sama akan menyebabkan polimer semakin padat, kaku dan ukuran *globule* semakin menurun. Nilai %C yang tinggi artinya jumlah EDMA yang terlibat dalam proses polimerisasi besar, sedangkan jumlah MATE dan VBC (sebagai fungsional monomer) kecil. Maka jumlah gugus ammonium kuartener dari MATE dan gugus phenil dari VBC juga sedikit, sehingga *molecular recognition sites* juga lebih sedikit. Akan tetapi peningkatan %C tidak berpengaruh secara kontinyu pada peningkatan nilai DBC.

Dari data tabel 5.4 secara keseluruhan peningkatan %T diikuti dengan peningkatan nilai DBC, pada %T 25, 30, dan 35 nilai DBC mengalami peningkatan berturut-turut yaitu 20,135; 21,266; 22,978. Nilai %T yang besar berarti jumlah fungsional monomer yang terlibat dalam polimerisasi semakin banyak, sehingga *molecular recognition sites* menjadi lebih tinggi. . Akan tetapi dengan membandingkan %T20, %C50 dengan %T25, %C50. Terjadi penurunan nilai DBC. Sehingga dapat diasumsikan peningkatan %T tidak berpengaruh secara kontinyu pada peningkatan nilai DBC.

Kenaikan nilai DBC terjadi karena peningkatan jumlah monomer yang bereaksi pada proses polimerisasi. Fenomena tersebut mengindikasikan eksistensi gugus phenil dan ammonium kuartener juga semakin banyak, sehingga *molecular recognition sites* menjadi lebih tinggi. Nilai *molecular recognition sites* terlalu besar

tidak diharapkan, karena sampel biomolekul tidak akan terekspos secara maksimal. Peningkatan %T akan menyebabkan kepadatan dan kerapatan monolith meningkat, sehingga permeabilitas kolom monolith menurun. Semakin tinggi %T, nilai rata-rata DBC juga meningkat. Profil ketajaman kurva *break-through* tergantung dari efisiensi transfer massa dengan pori-pori dalam kolom monolith.

Dari pengujian DBC pada seluruh kolom monolith poly-(MATE-co-VBC-co-EDMA) menghasilkan kurva DBC dengan kenaikan tajam, diasumsikan kolom monolith dapat mengikat protein dengan resolusi yang cukup tinggi. Hal tersebut menunjukkan eksistensi gugus ammonium quartener pada permukaan kolom monolith. Kenaikan Gradien/kemiringan pada kurva mengindikasikan transfer massa dalam pori-pori monolith. Efisiensi kolom tertinggi ketika terjadi peningkatan 10% kurva breakthrough, yang mengindikasikan sampel BSA terikat pada padakolom monolith.

DBC dari BSA yang telah dioptimasi menunjukkan nilai yang lebih tinggi dari kolom konvensional Dionex yaitu 18 mg mL⁻¹, kolom Pro Swift WAX⁻¹S (<http://www.dionex.com>). Dari hasil uji DBC ditentukan monolith dengan %T30 dan 35 diaplikasikan pada sampel dan Oligo(dT)₁₂₋₁₈ dan DNA termetilasi. sesuai kebutuhan.

4. Conclusion

Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan beberapa optimasi lebih lanjut untuk menghasilkan monolith dengan sensitivitas dan versalitas lebih baik, antara lain, Perludioptimasi %T (komposisi total monomer dan %C komposisi crosslinker dengan range lebih lebar. Untuk

menghasilkan proporsi yang memadai antara *flow-trough pores* dan *mesopores* dan menekan proporsi *micropores*, perlu dioptimasi waktu dan suhu polimerisasi. Untuk menghasilkan struktur pori seragam perlu dioptimasi jenis dan komposisi porogen, dan persentase inisiator AIBN.

References

- Al-Bokari, M., Cherrak, D., Guiochon, G., (2002), Determination of the porosities of monolithic columns by inverse size-exclusion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 975, 275-284.
- Cabera, K., Lubda, D., Eggenweiler, H.M., Minakuchi, H., Nakanishi, K., (2000), A new monolithic-type HPLC column for fast separations, *Journal of High Resolution Chromatography*, 23, 93-99
- Hsieh, T. F. dan R. L. Fischer. (2005). *Biology of chromatin dynamics. Annual Review of Plant Biology* 56: 327-351.
- Falck, E., Groenhagen, A., Muhlisch, J., Hempel, G., Wunsch, B., (2012), Genome-wide DNA methylation level analysis by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection after treatment of cell lines with azacytidine and antifolates, *Analytical Biochemistry*, 421, 439-445
- Fu, L.M., Lin, C.H., (2004), High-resolution DNA separation in microcapillary electrophoresis chips utilizing double-L injection techniques, *Electrophoresis*, 25, 3652-3659.
- Hjerten, S., Liao, J.L, Zhang, R., (1989), High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, *Journal of Chromatography*, 473, 273-275.

- Huber, C.G., Oefner, P.J., Preuss, E., Bonn, G.K., (1993), High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles, *Nucleic Acids Research*, 21, 1061-1066.
- K. D. Robertson, *Nat. Rev. Genet.* (2005), 6, 597.
- Kim, S.J., Kelly, W.K., Fu, A., Haines, K., Hoffman, A, Zheng, T, Zhu, Y., (2011), Genomewide methylation analysis identifies involvement of TNF- α mediated cancer pathways in prostate cancer, *Cancer Letters*, 302, 47-53.
- Lubbad. S., Mayr., B., Huber, C.G., Buchmeiser, M.R., (2002), Micropreparative fractionation of DNA fragments on metathesis-based monoliths: influence of stoichiometry on separation, *Journal of Chromatography A*, 959, 121-129
- Lu.YQ, Lin.Z.X., Svec. F (2012) Hypercrosslinked large surface area porous polymer monoliths for hydrophilic interaction liquid chromatography of small molecules featuring zwitterionic functionalities attached to gold nanoparticle shield in layered structure. *Anal Chem* 84: 8457-8460.
- Lubbad, S., Mayr, B., Huber, C.G., Buchmeiser, M.R., 2002, Micropreparative fractionation of DNA fragments on metathesis-based monoliths: influence of stoichiometry on separation, *Journal of Chromatography A*, 959, 121-129.
- Morris, M.R., Ricketts, C. J., Gentle, D., McRonald, F., Carli, N., Khalili, H., Brown, M., Kishida, T., Yao, M., Banks, R.E., Clarke, N., Latif, F., Maher, E. R., 2011, Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma, *Oncogene* 30, 1390-1401.
- Nakanishi, K., Soga, N., (1991), Phase separation in gelling silica-organic polymer solution: systems containing Ppoly(sodium styrenesulfonate), *Journal of American Ceramic Society*, 74, 2518
- Nischang I, Teasdale I, Brüggemann. O(2010), Towards porous polymer monoliths for the efficient, retention-independent performance in the isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography *Journal of Chromatography A*: 7514-7522
- Plass, C. and P. D. Soloway. (2002). DNA methylation, imprinting, and cancer. *European Journal of Human Genetics* 10: 6-16.
- Sabarudin, A.,(2012), Development of monolithic micro-extraction system for online collection/ concentration of trace elements: study on the substances circulation in the hydrosphere , JSPS report (unpublished).
- Sabarudin, A., Huang, J., Sakagawa, S., Umemura, T., (2012), Preparation of Methacrylate-Based Anion-Exchange Monolithic Microbore Column for Chromatographic Separation of DNA Fragments and Oligonucleotides, *Analytica Chimica Acta*, 736, 108-114.
- Sabarudin, A., Shu, S., Umemura, T., (2013), Microbore Monolithic Microreactor for High-Speed Suzuki-

- Miyaura Cross-Coupling Reaction, *Angewandte Chemie* (in submission).
- Sabarudin, A., Rahmi, D., Takasaki, Y., Umemura, T., (2010), Development of monolithic chelating adsorbent for solid phase microextraction of trace elements in water samples, Annual Meeting of Japan Society For Analytical Chemistry, 15-17 September, Sendai, Japan.
- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., Strait, et al , (2007), Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits, *J. PLoS Genetics*, 3, e115.
- Shabo, A., (2008), Integrating genomics into clinical practice: standards and regulatory challenges, *Current opinion in molecular therapeutics*, 10, 267–272.
- Shu, S., Kobayashi, H., Kojima, N., Sabarudin, A., Umemura, T.,(2011), Preparation and characterization of lauryl methacrylate-based monolithic microbore column for reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5228-5234.
- Shu, S., Kobayashi, H., Okubo, M., Sabarudin, A., Butsugan, M., Umemura, T., (2012), Chemical anchoring of lauryl methacrylate-based reversed phase monolith to 1/16" o.d. polyetheretherketone tubing, *Journal of Chromatography A*, 1242, 59-66.
- Svec, F., (2004), Porous monoliths: emerging stationary phases for HPLC and related methods, *LCGC LC Column Technology Supplement*, June, 18–21
- Takasaki, Y., Sakagawa, S., Inagaki, K., Fujii, S.I., Sabarudin, A., Umemura, T., Haraguchi, H., (2012), Development of salt-tolerance interface for an high performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry system and its application to accurate quantification of DNA sample, *Analytica Chimica Acta* ,713, 23.
- Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., (2008), Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer, *Cancer Research*, 68, 4123.
- Ueki, Y., Umemura, T., Li, J., Otake, T., Tsunoda, K., (2004), Preparation and application of methacrylate-based cation-exchange monolithic columns for capillary ion chromatography, *Analytical Chemistry* ,76, 7007-7012.
- Umemura, T., Ueki, Y., Tsunoda, K-I., Katakai, A., Tamada, M., Haraguchi, H., (2006), Preparation and characterization of methacrylate-based semi-micro monoliths for high-throughput bioanalysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 566-571.
- Urban J, Svec F, Frechet JMJ (2010) Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column. *Anal Chem* 82: 1621–1623.
- Yang, I., Fortin, M.C., Richardson, J. R., Buckley, B., (2011), Fused-core silica column ultraperformance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status, *Analytical Biochemistry*, 409, 138-14.

- Yin, H., Zhou, Y., Xu, Z., Chen, L., Zhang, D., Ai, S., (2013), An electrochemical assay for DNA methylation, methyltransferase activity and inhibitor screening based on methyl binding domain protein, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 492-497.
- Li Y., Huang C., Zheng J., Qi H. (2012) Electrogenerated chemiluminescence biosensing method for the detection of DNA methylation and assay of the methyltransferase activity *Biosensors and Bioelectronics* 38 407–410.
- Svec. F. (2010) Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation *Journal of Chromatography A*, 1217 902–924.
- Nischang. I, Svec. F., Fréchet .J (2009)., Effect of capillary cross-section geometry and size on the separation of proteins in gradient mode using monolithic poly(butyl methacrylate-co-ethylenedimethacrylate) columns *J. Chromatogr. A* 1216 2355–236.
- Chen. M.L., Liu. Y.L., Xing. X.W., Zhou. X., Feng. Y.Q., *, Yuan.B.Q., (2013) Preparation of a Hyper-cross-linked Polymer Monolithic Column and Its Application to the Sensitive Determination of Genomic DNA Methylation *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 1035 – 1041