UNIVERSITAS INDONESIA

STUDI PENGEMBANGAN SENSOR BOD BERBASIS *RHODOTORULA MUCILAGINOSA UICC Y - 181*

NETRA DEWANGGA
0806421861

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
DEPOK
DESEMBER 2010

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

UNIVERSITAS INDONESIA

STUDI PENGEMBANGAN SENSOR BOD BERBASIS *RHODOTORULA MUCILAGINOSA UICC Y - 181*

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains

NETRA DEWANGGA
0806421861

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
DEPOK
DESEMBER 2010

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama	: Netra Dewangga
NPM	: 0806421861
Tanda Tangan	: .....
Tanggal	: 28 Desember 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh	:	
Nama	:	Netra Dewangga
NPM	:	0806421861
Program Studi	:	Magister Kimia
Judul Tesis	:	Studi Pengembangan Sensor BOD Berbasis *Rhodotorula Mucilaginosa UICC Y - 181*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing	: Dr. Ivandini Tribidasari A.	(.....)
Pembimbing	: Dr. Endang Saepudin	(.....)
Penguji	: Prof. Dr. Sumi Hudiyono PWS	(.....)
Penguji	: Dr. Asep Saefumillah	(.....)
Penguji	: Dr. Ridla Bakri,MPhil	(.....)
Penguji	: Dr. Jarnuzi Gunlazuardi	(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 28 Desember 2010

KATA PENGANTAR

Allah S.W.T atas rahmat dan karunianya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Jurusan Ilmu Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Pada proses penelitian dan penyusunan tesis ini, saya mendapat banyak bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Tanpa bantuan dan bimbingan tersebut sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada:

1. Dr. Ivandini Tribidasari A. dan Dr. Endang Saepudin selaku dosen pembimbing tesis yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan, membimbing saya dalam penelitian dan penyelesaian tesis ini;
2. Dr. Emil Budianto selaku pembimbing akademis;
3. Dr. Aryanti yang telah memberi ijin penggunaan khamir koleksi UICC;
4. Para Dosen Departemen Kimia yang memberi masukan dan pengarahan dalam rangka penyempurnaan tesis ini;
5. Kepala Dinas Pendidikan DKI Jakarta dan staf yang telah memberikan dukungan perijinan dan dana dalam masa perkuliahan dan penelitian;
6. Ibunda dan istriku Subaeti, yang dengan sabar selalu menemani dan memberi dukungan.
7. Bapak Hedi Surachman yang telah mengajarkan penggunaan alat potensiostat.
8. Ibu Ema, ibu Tri di Lab Biokimia, Departemen Kimia-UI, yang telah memberikan pelatihan pemeliharaan khamir;
9. Teman-teman seangkatan, para mahasiswa S2 Kimia angkatan 2008,
10. Para karyawan Departemen Kimia, Bapak Hadi dan teman-teman yang telah memberikan bantuannya.

Akhir kata, saya berharap Allah S.W.T berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

PENULIS

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	:	Netra Dewangga
NPM	:	0806421861
Program Studi	:	Magister Kimia
Departemen	:	Kimia
Fakultas	:	Matematika san Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya	:	Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Studi Pengembangan Sensor BOD Berbasis *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181*

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada Tanggal : 28 Desember 2010
Yang menyatakan

(Netra Dewangga)

ABSTRAK

Nama : Netra Dewangga
Program Studi : Magister Kimia
Judul : Studi Pengembangan Sensor BOD Berbasis *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181*

Biosensor untuk penentuan BOD secara amperometrik telah dikembangkan dengan menggabungkan elektroda pengukur oksigen terlarut dengan khamir *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181* terimobilisasi. Sensor dibuat dari elektroda emas yang dilapisi membran nafion 50 mikron dan biofilm gelatin yang mengandung khamir *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181* terimobilisasi. Hubungan linear antara respon sensor dan konsentrasi glukosa sebagai larutan standar BOD dalam bufer fosfat pH 7, terlihat dalam rentang antara 10 sampai 70 mg/L, dengan nilai BOD berdasarkan larutan standar glukosa dengan nilai R^2= 0,98. Namun respon ini masih lebih rendah dibandingkan dengan pengukuran menggunakan *free cell Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181* yang menghasilkan respon pada rentang 10 sampai 90 mg/L BOD dengan R^2= 0,96. Penentuan BOD membutuhkan waktu minimal 5 menit.

Kata kunci : Sensor mikrobial; Thick film sensor; *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181*; Biochemical oxygen demand (BOD); sensor oksigen
xii+57 halaman : 32 gambar; 6 tabel
Daftar Acuan : 41 (1975-2008)

ABSTRACT

Name	:	Netra Dewangga
Program Study	:	Chemistry
Title	:	Studies of BOD Sensor Development Based on *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181*

Biosensor for amperometric determination of *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) was developed using combination of electrode for oxygen sensor and immobilized *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181*. This sensor made from gold electrode installed with a 50 micron nafion membrane and a gelatin biofilm containing immobilized yeast, *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181*. A linear relationship between the sensor response and the concentration of glucose as standar solution for BOD in phosphate buffer of pH 7, was observed in range 10 to 70 mg/L BOD standard glucose solution with R^2= 0,98 . This response was still low in comparing to the *free cell* yeast that show better response in the range 10 to 90 mg/L BOD standard glucose solution with R^2= 0,96. The minimal measuring time for BOD determination was 5 minute.

Key Words	:	Microbial sensor; Thick film sensor; *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181*; Biochemical oxygen demand (BOD); oxygen sensor
xii+57 pages	:	32 pictures; 6 tables
Bibliography	:	41 (1975-2008)

DAFTAR ISI

JUDUL i

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS ii

LEMBAR PENGESAHAN iii

KATA PENGANTAR iv

LEMBAR PERSETUJUAN KARYA ILMIAH v

ABSTRAK vi

ABSTRACT vii

DAFTAR ISI viii

DAFTAR GAMBAR x

DAFTAR TABEL xii

1. Pendahuluan **1**

1.1. Latar belakang 1

1.2. Rumusan masalah 2

1.3. Tujuan Penelitian 2

1.4. Manfaat penelitian 2

2. Tinjauan Pustaka **3**

2.1. *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) 3

2.2. Sensor BOD 5

2.3. Fungsi sensor BOD 7

2.4. Sensor oksigen amperometrik 10

2.5. Khamir sebagai sensing biologi 14

2.6. Teknik imobilisasi 15

2.7. Penelitian terkait 17

3. Metode Penelitian **18**

3.1. Waktu dan tempat penelitian 18

3.2. Bahan dan peralatan 18

3.2.1. Bahan 18

3.2.1.1. Mikroorganisma 18

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

3.2.1.2. Medium 18
3.2.1.3. Bahan kimia 18
3.2.2. Peralatan 18
3.3. Cara kerja 19
3.3.1. Rancangan sel elektrokimia 19
3.3.2. Uji sensor oksigen 20
3.3.2.1. Uji sensor O_2 20
3.3.2.2. Penentuan potensial kerja 21
3.3.2.3. Uji korelasi kuat arus dengan konsentrasi oksigen 21
3.3.3. Pembuatan medium dan larutan stok glukosa 22
3.3.3.1. *Yeast Malt Agar* (YMA) 22
3.3.3.2. *Yeast Peptone Glucose Broth* (YPGB) 22
3.3.3.3. Pembuatan bufer fosfat 22
3.3.3.4. Pembuatan larutan standar glukosa 22
3.3.4. Pembuatan biomassa khamir 23
3.3.4.1. Pemeliharaan biakan khamir 23
3.3.4.2. Peremajaan biakan khamir 24
3.3.4.3. Persiapan biomassa khamir 24
3.3.5. Uji potensi khamir sebagai *biosensing element* 24
3.3.5.1. Uji aktifitas *free cell* khamir 25
3.3.5.2. Absorpsi khamir pada kertas saring 25
3.3.5.3. Imobilisasi khamir dalam gelatin 26
3.3.5.4. Pengujian sel khamir terimobilisasi gelatin. . . 26
3.3.5.5. Pengukuran berulang pada imobilisasi gelatin 27

4. Pembahasan 29
4.1. Sensor oksigen 29
4.2. Produksi biomasa khamir 35
4.3. Uji potensi khamir sebagai biosensing element 36
4.3.1. Uji aktifitas *free cell* khamir 37
4.3.2. Absorpsi khamir pada kertas saring 40
4.4. Imobilisasi dalam gelatin dan uji responnya 42
4.4.1. Proses imobilisasi 42
4.4.2. Penentuan waktu minimal pengukuran 44
4.4.3. Pengujian respon sensor 45

5. KESIMPULAN DAN SARAN 52
5.1. Kesimpulan 52
5.2. Saran 53
Daftar Acuan 54
LAMPIRAN 58
A. Lampiran Tabel 58

DAFTAR GAMBAR

2.1. Lembar perhitungan BOD_5 4
2.2. Bagan Biosensor (Eggins, 2007) 5
2.3. konfigurasi sensor BOD 8
2.4. Pengukuran : 1. *endpoint* (R_s) dan 2. *kinetic measurement(A)* 8
2.5. Bagan Sensor Oksigen Clark 10
2.6. Skema Elektroda Clark yang di modifikasi 11
2.7. Sensor Oksigen portabel 11
2.8. Tipikal *Cyclic Voltammogram* 13

3.1. Model Sel elektrokimia 1 19
3.2. Model Sel elektrokimia 2 20
3.3. Pengenceran larutan stok 1 $\rightarrow$ stok 2 $\rightarrow$ larutan standar 23

4.1. Voltamogram sel elektrokimia model 1 29
4.2. voltamogram sel elektrokimia model 2 30
4.3. Voltamogram Uji Sensor O_2 33
4.4. Amperogram Kuat Arus pada variasi konsentrasi O_2 terlarut . . 34
4.5. Korelasi kuat arus dengan konsentrasi O_2 terlarut 34
4.6. r. mucilaginosa pada agar miring umur 24 jam dan 3 hari 36
4.7. r. mucilaginosa dalam YPGB dan hasil sentrifugasi 36
4.8. Prinsip sensor mikroba yang menggunakan elektroda oksigen . . 36
4.9. Korelasi selisih kuat arus dengan konsentrasi glukosa 39
4.10. Amperogram arus I_0 dan I_5 pada variasi konsentrasi glukosa . . 40
4.11. Korelasi $\triangle I$ (mA) dengan kons. glukosa (absorpsi kertas saring) 41
4.12. Amperogram arus I_0 dan I_5 pada variasi konsentrasi glukosa 42
4.13. histogram penentuan waktu minimal pengukuran 44
4.14. (a). penentuan waktu pengukuran minimal 45
4.15. R. mucilaginosa terimobilisasi dalam gelatin di dasar sel elektrokimia 45
4.16. Amperogram khamir terimobilisasi gelatin pada variasi konsentrasi glukosa 47
4.17. Korelasi $\triangle I(mA)$ vs kons. glukosa pada khamir di imobilisasi gelatin 48

4.18. Perbandingan *free cell*, khamir absorpsi kertas saring 49
4.19. Pengulangan pengukuran sebanyak 4 kali 50
4.20. Perbandingan $\triangle I$ (mA) selang 3 hari 50
4.21. Amperogram pengulangan 4 kali 51

DAFTAR TABEL

3.1. Pembuatan Larutan Standar 23

A.1. Korelasi waktu aerasi dengan kuat arus 58
A.2. Kuat arus pada variasi konsentrasi O_2 terlarut 58
A.3. Selisih $I_0 - I_5$ di berbagai konsentrasi glukosa pada khamir . . . 59
A.4. $\triangle I$(mA) pada 4 kali pengulangan pengukuran 59
A.5. Pengukuran selang 3 hari 59

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Kelestarian air sebagai pendukung kehidupan harus tetap dipelihara dan dijaga. Berbagai sumber pencemar menyebabkan menurunnya kualitas air. Kontrol kualitas air sangat diperlukan, baik sebagai parameter kelayakan untuk di konsumsi, maupun digunakan untuk keperluan aktifitas manusia lainnya seperti sebagai sarana rekreasi. Sumber daya air di lingkungan dalam bentuk aliran sungai, danau, air terjun dan *reservoir* air lainnya, selayaknya dipantau kualitasnya secara periodik, sehingga dapat diketahui karakteristik polutan, sumbernya serta penanganannya. Salah satu parameter kualitas air adalah *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) yang menyatakan kebutuhan oksigen akibat penguraian zat organik oleh mikroorganisma. Hasil uji BOD merepresentasikan kandungan polutan organik yang terdapat dalam air. BOD menjadi salah satu parameter penting untuk memantau taraf ketercemaran air. Namun penentuan BOD secara konvensional memiliki beberapa kendala antara lain:

1. Waktu yang lama (5 hari), sehingga kurang praktis untuk penggunaan lapangan yang membutuhkan informasi yang cepat, seperti pada penentuan taraf polusi di tempat rekreasi air, yang datanya diperlukan untuk menjamin keselamatan wisatawan.
2. Skill yang tinggi. Diperlukan operator dengan skill yang tinggi untuk menentukan BOD suatu sampel, yang kadang tidak bisa dipenuhi oleh pihak yang membutuhkan analisis kadar BOD tersebut.

Salah satu cara mengatasi masalah tersebut adalah penggunaan sensor mikrobial yang sudah lazim dilakukan di negara-negara maju. Keunggulan sensor mikrobial adalah waktu pengukuran yang lebih singkat dan hasil yang tidak jauh berbeda dengan proses konvensional. Sensor BOD berbasis mikrobial yang di imobilisasi diatas permukaan elektroda oksigen menggunakan prinsip bahwa laju konsumsi oksigen yang di butuhkan oleh

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

mikroorganisma untuk mengurai zat polutan organik dalam air pada selang waktu tertentu setara dengan nilai BOD sampel. Sebagai standar nilai BOD digunakan larutan glukosa 1 mM yang setara dengan nilai BOD sebesar 100 mg/mL (Miller & Miller, 1993). Sensor oksigen yang umum digunakan adalah jenis sensor oksigen Clark.

Walau penelitian sensor BOD berbasis mikrobial sudah banyak dilakukan, namun pengembangan sensor jenis ini masih diperlukan di Indonesia dengan menggunakan mikroorganisma lokal. Kekayaan keanekaragaman hayati yang dimiliki Indonesia dapat di manfaatkan untuk mencari *biosensing element* yang sesuai dengan kondisi iklim negara kita .

1.2. Rumusan masalah

Dibutuhkan sensor BOD yang dapat digunakan dengan waktu pengukuran lebih singkat dengan menggunakan khamir lokal yang diasumsikan tahan terhadap kondisi ekstrim.

1.3. Tujuan Penelitian

Mendisain sensor BOD menggunakan khamir lokal *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y-181* sebagai *biosensing element*. Sel khamir terimobilisasi gelatin akan dilekatkan dipermukaan elektroda oksigen terbuat dari emas dan digunakan untuk mempelajari sistem sensor elektrokimia dalam pengukuran *biochemical oxygen demand* (BOD)

1.4. Manfaat penelitian

Dengan penelitian pendahuluan ini diharapkan bisa didisain suatu alat pengukur BOD yang lebih cepat.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Biochemical Oxygen Demand* (BOD)

Tes BOD adalah prosedur bioasay yang mengukur konsumsi oksigen oleh mikroba pada penguraian zat-zat organik(C. Sawyer & McCarty, 1978, p.416-432). Sedangkan kebutuhan oksigen atau *oxygen demand* di ukur sebagai jumlah zat yang dapat teroksidasi (*oxidizable substances*) dalam suatu sampel air yang dapat menurunkan konsentrasi oksigen terlarut (Nemerow, 1974; Tchobanoglous & Schroeder, 1985). Karena nilai BOD diukur berdasarkan penurunan konsentrasi oksigen, maka keakuratan pengukuran BOD membutuhkan keakuratan pengukuran DO (*Dissolve Oxygen*) yaitu jumlah oksigen terlarut dalam sampel.

Pada prosedur penentuan BOD standar dibutuhkan waktu selama 5 hari pada 20^oC, sehingga disebut BOD_5. Hasil uji BOD_5 merupakan representasi sebagian dari total BOD. Untuk proses oksidasi biokimiawi sempurna zat-zat organik dalam sampel air menurut konvensi di butuhkan waktu selama 20 hari. Hal tersebut tentu tidak praktis untuk kebutuhan lapangan, sehingga yang banyak digunakan adalah tes BOD_5. Hasil uji BOD merupakan pendekatan kebutuhan oksigen perairan, karena lingkungan laboratorium tidak dapat mereproduksi kondisi alami perairan sebenarnya seperti suhu, sinar matahari, populasi biologis dan pergerakkan air. Penentuan waktu inkubasi selama 5 hari tidak memiliki dasar teoritis, hanya merupakan konvensi historis (Delzer & McKenzie, 1999, p.5) .

Bias pengukuran BOD_5 bisa terjadi karena penanganan sampel sebelum pengukuran. Bias terjadi karena penyimpanan jangka panjang yang mengakibatkan degradasi sampel. Untuk meminimalisir degradasi sampel dilakukan pendinginan tidak sampai membeku pada suhu antara 1 sampai 4 ^oC . Pendinginan tidak diperlukan bila rentang pengambilan sampel dan uji BOD_5 hanya 2 jam saja. Bila akan dilakukan analisa terhadap sampel yang telah di dinginkan maka sampel tersebut perlu di hangatkan kembali sampai suhu 20 ^oC. Rentang waktu maksimum penyimpanan sampel untuk di analisa tidak lebih dari 24 jam(Delzer & McKenzie, 1999).

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

Berdasarkan panduan dari *American Public Health Association,* agar tidak terjadi kesalahan pengukuran BOD, terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan antara lain:

- Perairan tak terpolusi memiliki nilai BOD_5 dalam range 1 sampai 8 mg/L .
- Konsentrasi *DO* setelah 5 hari sekurangkurangnya 1 mg/L.
- Perbedaan konsentrasi *DO* awal dan *DO* akhir pengukuran (5 hari), paling rendah 2 mg/L(American Public Health Association , 1995) .

Perhitungan nilai BOD_5 dari data *Dissolve Oxygen* beserta tabel data *sampling* dapat dilihat pada gambar 2.1.

5-Day Biochemical Oxygen Demand (BOD_5) worksheet

Site/station: Collection date and time:
Project: Personnel:

Dilution-water blanks

Bottle number	Initial DO reading (D_1)	Date/time of reading	Final DO reading (D_2)	Date/time of reading	BOD (D_1-D_2)	BOD average (<0.2 mg/L)

Environmental sample

Bottle number	Sample size (mL)	Initial DO reading (D_1)	Date/time of reading	Final DO reading (D_2)	Date/time of reading	BOD $\frac{D_1 - D_2}{P}$	BOD average

If dilution water demand is <0.2 milligrams per liter (mg/L), use

$$BOD_5\ (mg/L) = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

where

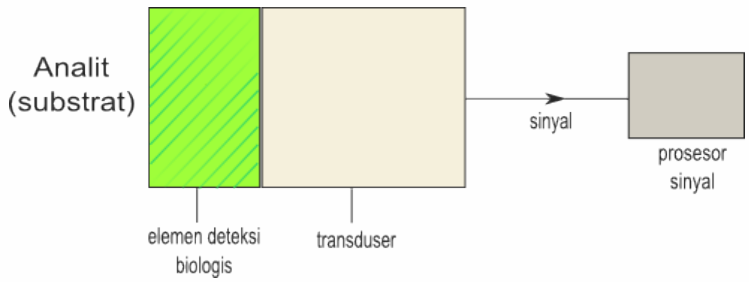
D_1 = initial sample dissolved-oxygen (DO) concentration (in mg/L)
D_2 = sample DO (in mg/L) after 5 days
P = decimal volumetric fraction of sample used

Gambar 2.1.: Lembar perhitungan BOD_5
(Delzer & McKenzie, 1999)

Pada pengukuran ulang, uji BOD_5 menghasilkan nilai bervariasi dengan deviasi antara $\pm 10\%$ sampai $\pm 20\%$ dari nila rata-rata (Hammer, 1975, p.88). Nilai BOD_5 untuk air limbah domestik yang diolah melalui *three-stage process* yang efisien berkisar 20 mg/L atau kurang. Air limbah domestik yang tidak diolah memiliki nilai BOD_5 sekitar 600 mg/L (di Eropa), sedangkan di Amerika berkisar 200 mg/L. Nilai lebih rendah disebabkan oleh konsumsi air perkapita di Amerika tertinggi di dunia (C. N. Sawyer, McCarty, & Parkin, 2003).Untuk kondisi di Indonesia, baku mutu air kelas I, II, III, dan IV untuk parameter BOD_5 masing-masing adalah 2, 3, 6, dan 12 mg/L (Peraturan Pemerintah RI, No.82 , 2001). Baku mutu air limbah golongan I yang boleh dibuang pada badan air kelas I adalah 30 mg/L, dengan pengecualian beberapa jenis industri boleh mencapai 100 mg/L. Pengecualian tersebut berlaku juga untuk limbah domestik.

2.2. Sensor BOD

Pengertian sensor menurut kamus bahasa Inggris Oxford (Eggins, 2007), adalah perangkat yang mendeteksi atau mengukur sifat fisik serta mencatat, menunjukkan atau meresponnya. Sedangkan pengertian biosensor adalah perangkat yang menyertakan elemen sensing biologis yang dihubungkan dengan transduser. Bagan dalam gambar 2.2 berikut menjelaskan bagian utama biosensor:



Gambar 2.2.: Bagan Biosensor (Eggins, 2007)

Bagian utama biosensor antara lain:

1. **Elemen Pengenal (Recognition Elements):** bagian yang memiliki selektifitas agar sensor dapat merespon secara selektif terhadap analit sasaran atau kelompok analit dan menjauhkan interferen zat-zat lain. Merupakan bagian kunci dari sebuah sensor. Dalam biosensor, elemen pengenal yang umum di gunakan adalah enzim, mikroba, asam nukleat dll.
2. **Transduser :**bagian atau perangkat pendeteksi yang dapat menggunakan prinsip elektrokimia atau fotometrik. Transduser elektrokimia populer karena konstruksinya simple dan murah.

Pada tulisan ini akan di gunakan transduser yang menggunakan prinsip elektrokimia karena konstruksinya yang lebih sederhana dan murah. Terdapat beberapa macam transduser elektrokimia antara lain:

1. **Potensiometrik:** mengukur potensial (emf) dari sel elektrokimia. Nilai emf proporsional dengan logaritma konsentrasi zat yang ditentukan.
2. **Konduktometri:** mengukur perubahan hantaran listrik larutan ketika terjadi perubahan komposisi larutan akibat berlangsungnya suatu reaksi. **Voltametrik:** Peningkatan (penurunan) potensial secara bertahap di terapkan pada sel elektrokimia sampai tercapai oksidasi (atau reduksi) dari zat yang dianalisa. Hal tersebut nampak dari kenaikkan tajam (atau penurunan) arus puncak (*peak current*). Tinggi *peak current* proporsional dengan konsentrasi material elektroaktif. Bila potensial oksidasi (reduksi) analit sasaran telah diketahui dan langsung dapat mengukur arus listrik, maka transdusernya **disebut amperometrik**.
3. **Sensor berbasis FET**: sensor berbasis *silicon-chip. FET merupakan kepanjangan dari field-effect transistor*, sensor jenis ini adalah miniaturisasi ketiga sensor diatas.

Keunggulan sensor mikrobial yang dapat mengenali beragam senyawa diaplikasikan untuk menentukan variabel yang kompleks seperti jumlah senyawa yang dapat mengalami biodegradasi dalam limbah (penentuan BOD) dan mengenali senyawa-senyawa bersifat mutagenesis (aplikasinya sebagai sensor toksisitas). Bila pemanfaatannya pada jalur metabolisme tertentu yang dimiliki oleh mikroba tersebut, aplikasi sensor yang dapat dibuat adalah sensor mikrobial pengenal senyawa-senyawa tertentu seperti fenol, nitrit, nitrat atau

amonia untuk keperluan analisis. Parameter yang sangat umum diukur adalah konsumsi oksigen yang ditentukan secara elektrokimia menggunakan sensor oksigen Clark(Kress-Rogers, 1997).

Sensor BOD pertama kali diperkenalkan oleh Karube pada tahun 1977 yang menggunakan elektroda mikrobial yang dibuat dari bakteri yang di imobilisasi dalam membran kolagen dan sensor oksigen sebagai transdusernya. Dengan menggunakan larutan standar glukosa-asam glutamat, nilai BOD dapat ditentukan dalam waktu 15 menit dengan standar deviasi 7,5%. Sensor BOD ini dapat digunakan selama 10 hari(Karube, Matsunaga, & Suzuki, 1977).

Penggunaan sensor BOD masih belum berkembang di banyak negara, karena regulasi mengharuskan pengujian standar dengan BOD_5, seperti terjadi di Jerman. Hanya di Jepang sejak tahun 1990 penggunaan sensor BOD di dukung dengan regulasi dan di standarisasi oleh JIS (*Japanese Industrial Standard Committe*) melalui JISK 3602. Dua tahun sejak saat itu pertumbuhan pasar sensor BOD mencapai $2,5 \times 10^8$ Yen (Kress-Rogers, 1997, p.325).

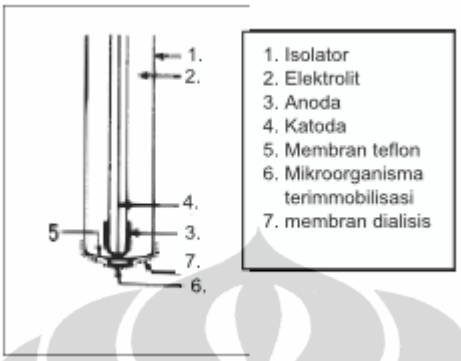
Menurut Kress-Rogers (1997), perbedaan mendasar sensor BOD dengan pengujian BOD_5 yang standar, antara lain:

1. Biosensor umumnya menggunakan satu spesies mikroorganisma sedangkan metode konvensional menggunakan banyak spesies yang berasal dari *activated sludge* atau instalasi pengolahan limbah.
2. Sensor BOD memberikan pandangan *snapshot* tentang proses metabolisasi zat organik yang tengah berlangsung. Berbeda dengan metoda konvensional BOD_5 yang mengukur gabungan beragam proses biokimia yang terjadi pada *biosludge* selama 5 hari (antara lain hidrolisis polimer, semisal zat pati, juga perubahan komposisi populasi, dll).
3. Sebagai tes aktifitas biokimia, sensor BOD harus dikalibrasi sesering mungkin.

2.3. Fungsi sensor BOD

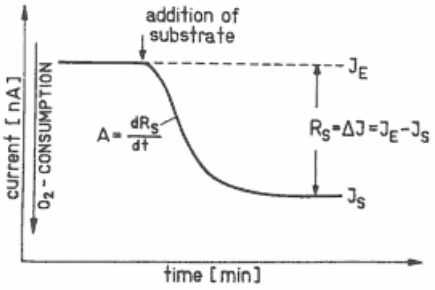
Disain sensor mikrobial umumnya seperti terlihat pada gambar 2.3. Secara prinsip tidak jauh berbeda dengan disain sensor enzimatik(Riedel, 1998). Bagian utama dari sensor tersebut adalah elemen pengenal yaitu mikroorganisma dan elektroda oksigen sebagai transduser. Kedua bagian

tersebut dipisahkan oleh membran yang permeabel terhadap gas. Sel mikroba di imobilisasi melingkupi sensor.



Gambar 2.3.: konfigurasi sensor BOD

Perbedaan sensor mikrobial dengan sensor berbasis enzim terletak pada dibutuhkannya transportasi substrat melalui membran sel. Pada proses tersebut transport aktif lebih banyak berperan. Transport aktif membutuhkan protein *carrier* spesifik dan membutuhkan energi metabolisme. Sehingga transport substrat di *coupling* dengan sistem penghasil energi, melalui rantai respirasi(Riedel, 1998). Bila konsentrasi substrat meningkat, secara proporsional akan meningkatkan respirasi yang bisa di deteksi melalui perubahan konsentrasi oksigen dengan sensor oksigen.



Gambar 2.4.: Pengukuran : 1. *endpoint (R_s)* dan 2. *kinetic measurement(A)* (Riedel, 1998)

Lebih lanjut Riedel (1998) menyatakan fungsi sensor respiratori mikrobial sebagai berikut:

1. Oksigen terdifusi dari larutan jenuh udara melalui membran dialisis, dimana mikroorganisma di imobilisasi, kemudian melalui membran teflon dan akhirnya direduksi dikatoda. Sebagian proporsi oksigen di konsumsi oleh mikroorganisma. Maka *steady state current* yang terbaca detektor mencerminkan arus difusi oksigen melalui komposisi membran dan respirasi *endogenus* mikroorganisma.
2. Bila substrat yang dapat diasimilasi oleh mikroorganisma ditambahkan kedalam larutan, substrat menembus membran dialisis dan di degradasi oleh mikroorganisma. Proses ini menyebabkan meningkatnya laju respirasi yang menghasilkan penurunan konsentrasi oksigen terlarut. Kuat arus akan turun untuk mencapai kondisi *steady state* berikutnya.

Menurut Riedel (1998), terdapat dua metode pengukuran BOD (gambar 2.4):

1. *End point Measurement* (*steady state mode*): pengukuran kuat arus dimulai saat posisi *steady state* pertama dimana mikroorganisma mengalami respirasi *endogenus*. Kemudian substrat di introduksi kedalam larutan, dan didegradasi oleh mikroorganisma. Kuat arus mencapai posisi *steady state* berikutnya. Perbedaan kuat arus ($\triangle I$) mencerminkan laju respirasi substrat (RS).
2. *Kinetic measurement*: merupakan turunan pertama kurva arus-waktu. Pengukuran ini mencerminkan akselerasi dari respirasi substrat (A).

Metode pertama paling banyak digunakan dalam aplikasi sensor berbasis mikrobial. Pada metode ini di butuhkan konsentrasi tinggi biomasa mikroorganisma yang di imobilisasi dan membran yang tebal. Konfigurasi ini menyebabkan besarnya resistensi difusi, mengakibatkan dibutuhkan waktu respon yang lebih lama dibandingkan dengan sensor berbasis enzim. Waktu respon yang sebanding dengan sensor enzim dicapai oleh pengukuran secara kinetik. Pada pengukuran jenis ini di permukaan sensor di imobilisasi mikroba dengan jumlah sedikit dengan membran yang tipis. Sensitifitas sensor jenis ini dipengaruhi oleh aktifitas mikroba, bukan dibatasi oleh difusi. Sehingga transport substrat kedalam sel dan asimilasi substrat menjadi *rate-limiting process*.

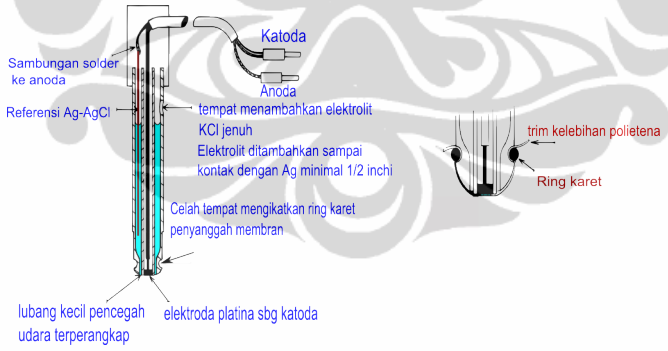
2.4. Sensor oksigen amperometrik

Konsentrasi oksigen terlarut dalam sampel dapat di ukur dengan metode elektrokimia yang memiliki keunggulan dari segi waktu dibanding metode konvensional. Sensor oksigen tersebut akan berfungsi sebagai transduser dalam perangkat biosensor. Berdasarkan sumber listriknya terdapat dua macan sensor oksigen berbasis elektrokimia, yaitu sensor Clark yang menggunakan sumber listrik dari luar, menggunakan prinsip kerja elektrolisis dan sensor galvani yang mendapatkan sumber listrik dari sel galvani.

Sensor oksigen berbasis elektrolisis dikembangkan oleh Leland Clark pada tahun 1953. Pada sensor Clark digunakan elektroda platina. Di permukaan elektroda tersebut terjadi reaksi reduksi oksigen dengan persamaan bersih:

$$O_2 + 4e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^-$$

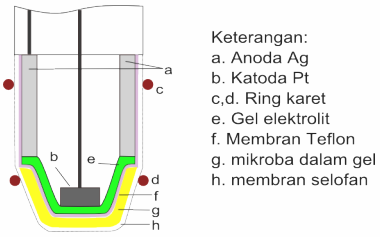
Jumlah oksigen yang tereduksi pada katoda platina proporsional dengan kuat arusnya, sehingga besar kuat arus bisa dijadikan parameter konsentrasi oksigen. Bagan elektroda Clark terlihat pada gambar 2.5:



Gambar 2.5.: Bagan Sensor Oksigen Clark (National Academy of Engineering, n.d.)

Pada permukaan katoda platina di lapisi dengan membran teflon yang memisahkan antara elektroda dan analit. Sebagai anoda di gunakan perak dan Ag/AgCl sebagai elektroda referensi. Larutan elektrolit yang di gunakan adalah KCl.

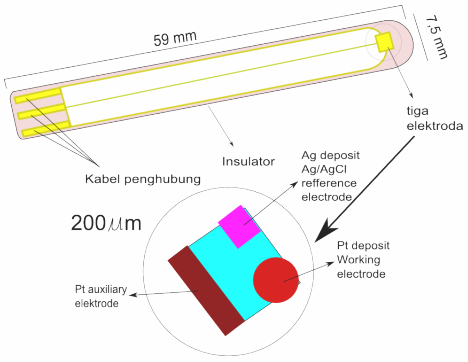
Modifikasi elektroda Clark sebagai transduser pada sensor biologi di perlihatkan pada gambar 2.6.



Gambar 2.6.: Skema Elektroda Clark yang di modifikasi (Eggins, 2007)

Modifikasi yang terlihat adalah penggunaan elektrolit gel, yang di lapisi oleh membran teflon. Lapisan berikutnya adalah gel dimana mikroba di imobilisasi serta membran selofan pelapis terakhir yang memisahkan elektroda dengan analit. Bagan ini memungkinkan dijadikan miniaturisasi elektroda sehingga dapat di gunakan untuk peralatan portabel.

Terdapat pula elektroda portabel yang menggunakan teknologi nano untuk membuatnya(Chan et al., 2000). Bagan sensor tersebut terlihat dalam gambar 2.7, elektroda tersebut dapat di gunakan secara portabel, dengan larutan elektrolit yang di campurkan ke analit. Elektrolit yang di gunakan adalah buffer fosfat dengan KCl.



Gambar 2.7.: Sensor Oksigen portabel (Chan et al., 2000)

Sensor oksigen amperometrik bekerja berdasarkan pengukuran arus reduksi oksigen pada elektroda kerja pada potensial kerja tertentu. Sebelum pengukuran amperometrik dapat dilakukan, diperlukan penentuan potensial kerja terlebih dahulu dengan menggunakan pengukuran *Cyclic Voltametry.* Teknik ini berguna sebagai permulaan studi elekrokimia bagi sistem yang belum dikenal (Yu, 2008). Untuk menghasilkan sebuah voltamogram, variasi voltase diberikan kedalam larutan (medium) yang diuji, perubahan kuat arus diukur selama terjadi perubahan voltase tersebut. Salah satu informasi yang bisa di analisis dari hasil voltamogram adalah reaksi redoks dari zat yang diamati.

Tipikal hasil voltamogram pengukuran CV seperti terlihat pada gambar 2.8 . Puncak arus (*current peak*) yang terlihat pada voltamogram dapat merupakan oksidasi atau reduksi dari analit dalam jangkauan potensial yang berlangsung. Sebagai contoh, pada saat terjadi reduksi ketika potensial menjangkau potensial reduksi analit, kuat arus akan meningkat, tetapi kuat arus akan menurun ketika konsentrasi analit pada permukaan elektroda berkurang karena reduksi. Hal yang sama berlaku pula pada *peak current* untuk oksidasi analit. Bila transfer elektronik pada permukaan elektroda berlangsung cepat, dan kuat arus dibatasi oleh difusi spesi ke permukan elektroda, maka kuat arus puncak proporsional dengan akar dari *scan rate* . Besarnya *peak current* dapat ditentukan melalui persamaan(Bard & Faulkner, 2001) :

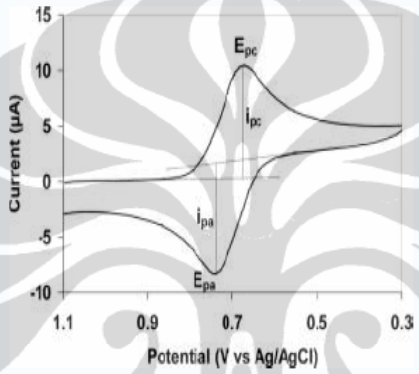
$$i_p = cn^{3/2} A D_0^{1/2} C_0^* v^{1/2} \tag{2.1}$$

dimana c adalah konstanta, n jumlah elektron yang ditransfer, A luas area elektroda kerja. D_o koefisien difusi analit, C_0^* konsentrasi *bulk* dan v adalah *scan rate.* Voltase dimana terdapat *peak current* dapat digunakan sebagai potensial kerja dalam pengukuran amperometrik.

Secara teknis nilai *peak current* dapat di korelasikan dengan konsentrasi analit. Bila daerah potensial kerjanya (*potential window*) cukup lebar, kuat arus reduktif atau oksidatif dapat mencapai sebuah kondisi *diffusion-controlled equilibrium limit*, yang ditentukan oleh gradien konsentrasi antar muka *double layer* pada permukaan elektroda. Besarnya *diffusion-limited current* ditentukan oleh kombinasi Hukum Fick dan Faraday :

$$i_L = -nAFD_0\frac{C_0^*}{\delta} \tag{2.2}$$

Dimana $i_L$adalah *limiting current*, n jumlah elektron yang ditransfer, A adalah luas permukaan elektroda kerja, F adalah konstanta Faraday, D_0 adalah koefisien difusi analit, C_0^* konsentrasi *bulk* , δ ketebalan lapisan *double layer.* Berdasarkan standar konvensi elektrokimia, arus reduktif katodik bertanda negatif.



Gambar 2.8.: Tipikal *Cyclic Voltammogram*

Metode pengukuran konsentrasi oksigen dapat dilakukan dengan metode potensiometrik maupun amperometrik. Metode potensiometrik unggul pada penentuan konsentrasi oksigen yang rendah, namun membutuhkan konsentrasi oksigen referensi yang agak sulit dilakukan dalam lingkungan larutan, sehingga metode penentuan amperometrik yang dipilih (Yu, 2008, p.103).Sebuah sensor oksigen amperometik akan mereduksi oksigen pada permukaan elektroda kerja (katoda), dimana potensialnya di tahan pada potensial reduksi oksigen. Potensial elektroda kerja ditentukan melalui *cyclic voltametry*. Potensial tersebut dapat berupa potensial reduktif atau potensial dimana *diffusion controlled limiting current* berlangsung .

Terdapat dua mekanisme reduksi oksigen dikatoda. Mekanisme pertama mengikutkan hidrogen peroksida sebagai intermedit dan memerlukan 2 elektron, seperti pada persamaan berikut (Sohn & Kim, 1996):

$$O_2 + 2H_2O + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2 + 2OH^- \quad (2.3)$$

$$H_2O_2 + 2e^- \rightleftharpoons 2OH^- \quad (2.4)$$

Mekanisme yang kedua melibatkan empat elektron, dimana terjadi reduksi oksigen secara langsung:

$$O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightleftharpoons 4OH^- \quad (2.5)$$

Reaksi tersebut berlangsung secara cepat sehingga keadaan *steady state* hanya ditentukan laju difusi oksigen melalui lapisan *double layer* atau difusi oksigen melalui membran permeabel. Transpor molekul oksigen ke katoda ditentukan oleh proses difusi terbatas (*diffusion-limited process*). Pada permukaan katoda, konsentrasi oksigen bisa menjadi nol, hal tersebut membatasi kuat arus difusi yang ditentukan oleh gradien konsentrasi oksigen.

2.5. Khamir sebagai sensing biologi

Mikroorganisma yang dapat di aplikasikan pada sensor BOD bisa dari berbagai jenis, asalkan saat melakukan proses metabolisme zat organik atau anorganik dapat melaksanakan transfer elektron kedalam sistem transpor elektron *(electron transport system)*. Ketika terdapat zat organik dalam larutan sampel yang akan di uji, mikroorganisma yang diimobilisasi dipermukaan sensor BOD akan melakukan metabolisasi untuk mendapatkan energi. Selama proses metabolisis, akan terjadi transfer elektron pada *electron transport system* yang berhubungan dengan rantai respirasi sel. Hal yang sama berlaku pula pada metabolisasi zat anorganik. Laju respirasi dapat dipantau dengan sensor oksigen(Karube, Yano, Yoshida, & Morita, 1997).

Khamir merupakan bagian dari kingdom fungi, bersel tunggal dengan reproduksi aseksual. Khamir memiliki kelebihan sebagai sensor mikrobial antara lain karena kecepatan pertumbuhannya tinggi, mudah dimanipulasi serta mampu tumbuh pada berbagai variasi sumber karbon. Selain itu memiliki dinding sel yang kuat dan toleran terhadap pH dan suhu(Akyilmaz & Dinčkaya, 2005).

Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181 adalah khamir koleksi milik laboratorium mikrobiologi UI yang di isolasi dari perairan tanjung priok. Khamir jenis ini dilaporkan pada penelitian sebelumnya, dapat digunakan sebagai elemen biosensing untuk penentuan konsentrasi Cu^{2+} . *Rhodotorula mucilaginosa* adalah khamir kelompok *basidiomycetes* yang memiliki koloni berwarna jingga sampai merah, bertekstur mengkilat dan berlendir, tepi koloni rata, permukaan licin dan menggunung (Yarrow, 1998). Berikut adalah taksonomi dari *Rhodotorula mucilaginosa* :

Scientific name	:	*Rhodotorula rubra*
Synonym	:	*Rhodotorula mucilaginosa, Rhodotorula pilimanae, Sporobolomyces albo-rubescens*
Kingdom	:	*Fungi*
Sub Kingdom	:	*Dikarya*
Phylum	:	*Basidiomycota*
Subphylum	:	*Pucciniomycotina*
sub kelas	:	*Microbotryomycetes*
Ordo	:	*Sporidiobolales*
no rank	:	*mitosporic Sporidiobolales*
Genus	:	*Rhodotorula*

(National Center for Biotechnology Information (NCBI) , n.d.)

Kurva pertumbuhan khamir ini memiliki fase logaritma dalam rentang 0 sampai 20 jam. Pada jam ke 24 pertumbuhan khamir mencapai *fase akhir log* (Rianasari, 2004). Pada fase inilah khamir potensial sebagai elemen sensing biologi.

2.6. Teknik imobilisasi

imobilisasi sel mikroorganisma dalam matrik pendukung memungkinkan penggunaan yang lebih lama. Beragam teknik imobilisasi dapat dilakukan baik dengan menggunakan polimer sintetik maupun alami. Tetapi teknik *entrapment* sel dengan menggunakan material alami seperti alginat atau karaginan memiliki keunggulan yaitu tidak beracun bagi sel (Muscat, Prube, & Vorlop, 1996). Gel polimer alami tersebut direkomendasikan sebagai matrik imobilisasi sel karena pada proses pembentukan gel tidak menyebabkan

integritas dan aktifitas sel menurun seperti pada penggunaan polimer sintetis (Cheetham, 1979). Sehingga tidak perlu dilakukan inaktifasi terlebih dahulu terhadap material biologi yang digunakan sebagai elemen sensor (Nishida, Sato, Tosa, & Chibata, 1979).

Peneliti lain mengusulkan penggunaan gelatin sebagai matrik imobilisasi sel karena metode imobilisasinya yang relatif sederhana. Gelatin adalah hidrogel alami yang di hasilkan dari hidrolis parsial kolagen. Gelatin komersial mengandung air sebesar 10-12% , protein antara 80-85% dan mineral 5-7% . Pembentukkan gel gelatin berlangsung pada suhu dibawah 30^{o}C. Tetapi gel tersebut dapat mengembang dan terlarut pada pemanasan diatas 30^{o}C. Gel gelatin dapat dibuat menjadi tak terlarut dengan proses *crosslinking* menggunakan glutaraldehid atau formaldehid (Alteriis, Parascandola, Pecorella, & Scardi, 1987).

Gianfreda et.al menggunakan gelatin sebagai matrik imobilisasi *Saccharomyces cerevisiae* (Gianfreda, Parascandola, & Scardi, 1980). Pada metode ini suspensi khamir sebanyak 1% dicampur dengan larutan gelatin 20% (dalam air) pada suhu 40^{o}C , sehingga didapatkan rasio sel dan gelatin sebesar 1 : 10. Campuran didinginkan dalam pendingin agar proses gelatinisasi berlangsung dengan cepat. Pada proses terakhir campuran dicelupkan dalam larutan formalin 20% dalam alkohol 50% dingin selama 1 menit. Setelah itu dilakukan pembilasan beberapa kali dengan alkohol 50% dingin, kemudian disimpan pada suhu 5^{o}C. Sebelum di gunakan, gel yang mengandung sel ter-imobilisasi, dicuci terlebih dahulu dengan akuades beberapa kali. Cara ini menghasilkan aktifitas sebesar 34,3 % ($\frac{sel\,terimobilisasi}{sel\,bebas}$ x 100), dengan persen *loss* sel pada saat pencucian sebesar 0,43.

Mikroorganisma yang di imobilisasi dalam matrik tidak dapat langsung mendapatkan oksigen dari sekitarnya, yang biasanya dalam bentuk oksigen terlarut (medium berair). Oksigen harus ditransfer melalui mikrofilm matrik imobilisasi. Perbedaan ketebalam film dapat menyebabkan perbedaan konsentrasi oksigen dalam zona ini. Model yang dikembangkan oleh Riley (R.Riley, Muzzio, M.Buettner, & C.Reyes, 1995) mengusulkan bahwa difusi dan proses reaksi yang berlangsung didalam sistem sel terimobilisasi bergantung pada konsentrasi metabolit (dapat berupa oksigen atau glukosa), kemampuan difusi efektif dari metabolit dan laju konsumsi metabolit oleh sel

mikroorganisma. Dengan menggunakan model ini diperkirakan penetrasi maksimum oksigen pada matrik imobilisasi sel yang sangat rapat berkisar antara 50 sampai 200 μm .

2.7. Penelitian terkait

Penelitian sensor BOD berbasis khamir jenis *Arxula adeninivorans (Arxula)* yang di imobilisasi dalam Poly(carbamoyl)sulfonate (PCS) menunjukkan potensinya sebagai sensor BOD dengan hasil yang memuaskan(Chan et al., 2000). Dalam penelitian tersebut digunakan pendekatan kinerja enzim untuk mengevaluasi hubungan antara arxula dengan substratnya. Dengan menentukan nilai KM *free cell* arxula dari *plot Lineweaver–Burk*, di gunakan sebagai data pembanding untuk mencari optimasi imobilisasi *arxula.* Optimasi imobilisasi menyebabkan sensor dapat mendeteksi lebih cepat.

Upaya lain yang di lakukan Chan et al. (2000) pada penelitian tersebut adalah menggunakan pendekatan *quasi-kinetics measurement* sebagai acuan pengukuruan dibandingkan dengan *end-point measurement.* Pendekatan ini menyebabkan lebih singkatnya waktu pengukuran yaitu hanya 100 detik, dibanding pada acuan *end-point measurement* yang membutuhkan waktu 30 menit. Pada pengukuran *end-point measurement* pengukuran di hentikan saat kuat arus menjadi tetap, dimana aktifitas penguraian mikroba memiliki laju tetap . Nilai inilah yang kemudian di korelasikan dengan nilai BOD (korelasi antara $\Delta kuat\ arus_{end-point}$ vs BOD). Sedang pada *quasi-kinetics measurement* di cari korelasi antara nilai selisih kuat arus pada selang waktu tertentu (100 detik) yang dibagi dengan selang waktunya, dibandingkan dengan nilai BOD (Korelasi antara $\frac{\Delta kuat\ arus}{\Delta t}$ vs BOD). Pendekatan ini ternyata menghasilkan nilai BOD tidak jauh berbeda dengan penentuan menggunakan sel khamir yang bebas.

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia pada bulan Januari 2010 hingga November 2010.

3.2. Bahan dan peralatan

3.2.1. Bahan

3.2.1.1. Mikroorganisma

Jenis khamir yang digunakan dalam penelitian yang dilakukan adalah *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y-181*. Isolat murni didapat dari departemen Biologi FMIPA UI, Depok. Strain *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y-235* telah diketahui memiliki kemampuan sebagai elemen sensing untuk menentukan konsentrasi Cu^{2+} (Mumtahinah, 2007). Strain *Rhodotorula mucilaginosa UICC - 181* berasal dari perairan teluk Jakarta juga, dan diharapkan memiliki kemampuan sebagai elemen pengenal pada biosensor BOD.

3.2.1.2. Medium

Sebagai medium pembiakkan digunakan *Yeast Malt Agar* (YMA): pepton, *yeast extract, malt extract*, glukosa, agar (media agar miring). Untuk medium persiapan biomassa khamir digunakan *Yeast Peptone Glucose Broth* (YPGB): *yeast extrac*t, pepton, Glukosa.

3.2.1.3. Bahan kimia

Akuades, KH_2PO_4 [Merck], K_2HPO_4 [Merck], Gelatin [Merck], Glukosa [Merck], Formalin, membran Nafion, Gas Nitrogen, KCl, Agar, lem epoxy dextone

3.2.2. Peralatan

eDac Potensiostat, HSV-100 (Hokuto Denko) potensiostat, *Lutron DO meter* (DO-5509), lempeng elektroda emas (1 cm x 1 cm x 1 mm), elektroda *refference* Ag/AgCl, aerator, erlenmeyer 50 mL, buret 25 mL, jarum ose,

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

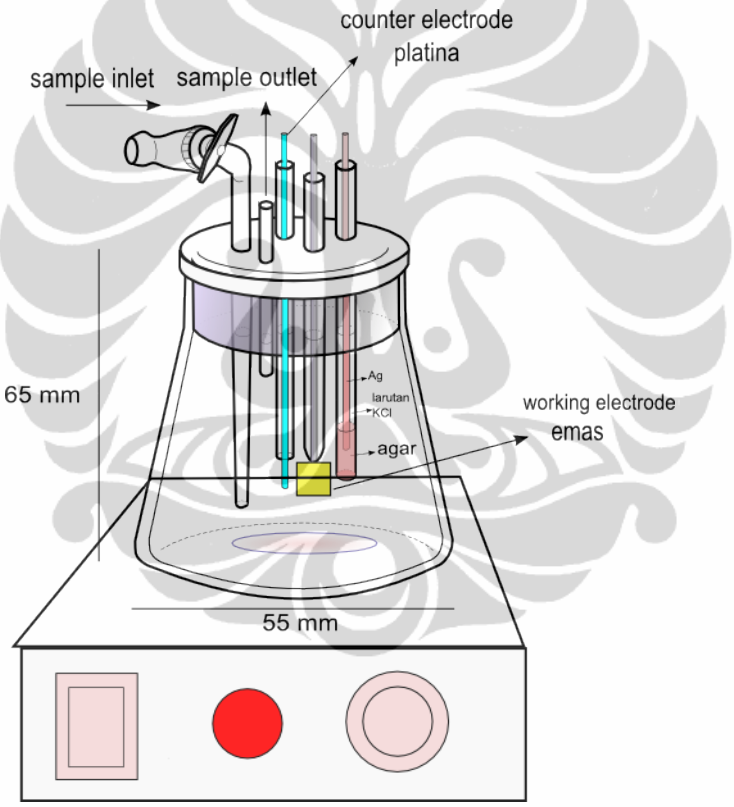
bunsen, tabung reaksi, batang pengaduk, pipet tetes, pipet mikro, botol semprot, pipet bulb, beaker glass 100 mL, alat sentrifugasi, autoklaf, timbangan analitis, pH indikator, *shaker incubator*.

3.3. Cara kerja

3.3.1. Rancangan sel elektrokimia

Didisain dua model sel elektrokimia sebagai instrumen penentuan nilai BOD sampel.

1. Rancangan pertama terlihat pada gambar 3.1 :

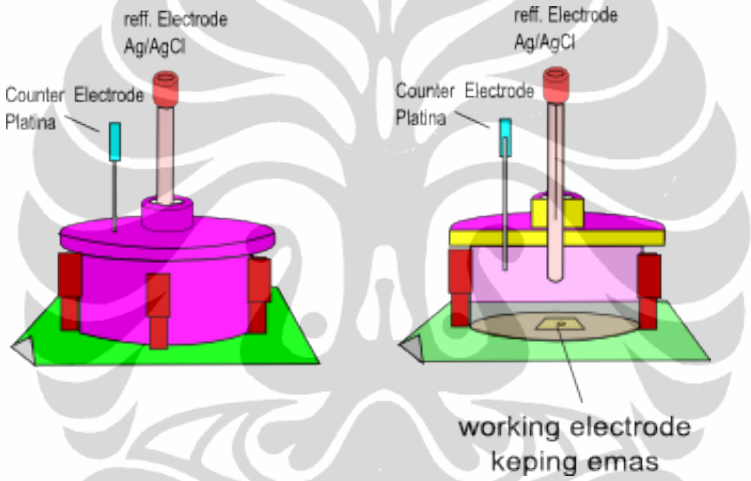


Gambar 3.1.: Model Sel elektrokimia 1

Pada model ini diharapkan pengujian sampel dapat berlangsung simultan. Model terdiri dari: (1). *sample inlet* (2). *sample outlet* (3). elektroda kerja (4). *Counter electrode* (5). *Refference electrode*. Sebagai elektroda kerja digunakan keping emas berukuran 1 cm x 1 cm dengan ketebalan 1 mm. Untuk *refference electrode* digunakan Ag/AgCl (*saturated* KCl) no seri

AS 002058 RE-1C buatan BAS Inc, Jepang. Sedangkan *counter electrode* digunakan kawat platina.

2. Rancangan kedua terlihat pada gambar 3.2:
   Pada model ini pengujian sample tidak berlangsung simultan. Model terdiri dari: (1). elektroda kerja. (2).*Counter Electrode* (3). *Refference Electrode*. Sebagai elektroda kerja digunakan keping emas berukuran 1 cm x 1 cm dengan ketebalan 1 mm. Diameter elektroda kerja yang kontak dengan larutan sebesar 3 mm. Sebagai *refference electrode* digunakan Ag/AgCl (saturated KCl) no seri AS 002058 RE-1C buatan BAS Inc, Jepang. Sedangkan counter electrode digunakan kawat platina.



Gambar 3.2.: Model Sel elektrokimia 2

3.3.2. Uji sensor oksigen

Untuk menguji apakah sensor yang di buat dapat mendeteksi oksigen dengan baik, dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:

3.3.2.1. Uji sensor O_2

Larutan bufer fosfat pH 7 dimasukkan kedalam model sel elektrokimia yang akan diuji. Bufer fosfat kemudian di *purging* dengan gas nitrogen selama 5 menit untuk mengusir gas oksigen. Setelah itu dilakukan pengukuran *cyclic voltametry* (CV) dengan potensial antara -1000 mV sampai +1000 mV. Kemudian dilakukan peningkatan konsentrasi oksigen terlarut dalam larutan buffer fosfat, dengan cara di aerasi selama 2 menit dengan aerator *aquarium*

pump dan diikuti dengan pengukuran CV dalam rentang potensial yang sama. Aerasi dilakukan kembali selama 2 menit sehingga akumulasi aerasi menjadi 4 menit dan dilakukan pengukuran CV dalam rentang potensial yang sama. Grafik voltamogram yang dihasilkan digunakan untuk melihat reaksi reduksi dan oksidasi oksigen yang terjadi pada permukaan elektroda emas.

3.3.2.2. Penentuan potensial kerja

Untuk menentukan potensial kerja yang akan digunakan pada pengukuran amperometrik, dilakukan pengukuran CV dengan daerah potensial kerja antara -200 mV sampai dengan -600 mV (Yu, 2008). Larutan bufer fosfat pH 7 dimasukkan kedalam model sel elektrokimia yang akan diuji. Bufer fosfat kemudian di *purging* dengan gas nitrogen selama 5 menit untuk mengusir gas oksigen. Setelah itu dilanjutkan dengan pengukuran *cyclic voltametry* (CV) dengan daerah potensial kerja antara -200 mV sd -600 mV. Langkah berikutnya larutan bufer fosfat diaerasi selama 30 detik, dan diukur kembali CV -nya dalam rentang potensial yang sama. Aerasi dilanjutkan dengan penambahan waktu 30 detik kembali, dan diukur kembali CV-nya. Langkah ketiga di ulang sebanyak 2 kali sehingga seri akumulasi aerasi menjadi 30 s, 60 s, 90 s dan 120 s. Hasil voltamogram digunakan untuk menentukan potensial kerja elektroda.

3.3.2.3. Uji korelasi kuat arus dengan konsentrasi oksigen

Uji ini untuk mengetahui apakah sensor oksigen yang dibuat memiliki korelasi antara kuat arus reduksi dengan konsentrasi oksigen.

Larutan bufer fosfat pH 7 dimasukkan kedalam model sel elektrokimia yang akan diuji. Bufer fosfat kemudian di *purging* dengan gas nitrogen selama 5 menit untuk mengusir gas oksigen. Setelah itu dilakukan pengukuran *chrono amperometric* (CA) dengan potensial kerja di set -554 mV . Larutan bufer fosfat dalam sel elektrokimia diukur konsentrasi oksigen terlarutnya menggunakan *Lutron DO meter*. Langkah selanjutnya adalah aerasi larutan bufer fosfat selama 30 detik, dan diukur kembali CA -nya dalam potensial kerja yang sama diikuti pengukuran oksigen terlarut. Aerasi dilanjutkan dengan penambahan waktu 30 detik kembali, dan diukur kembali CA dan oksigen terlarut. Langkah ketiga di ulang sebanyak 2 kali sehingga seri akumulasi aerasi menjadi 30 s, 60 s, 90 s dan 120 s.

3.3.3. Pembuatan medium dan larutan stok glukosa

3.3.3.1. *Yeast Malt Agar* (YMA)

Pembuatan medium YMA berdasarkan (Yarrow, 1998). Medium YMA dibuat sebanyak 250 mL, sehingga yang digunakan adalah seperempat formulasi. Sebanyak 0,75 g yeast extract, 0,75 g malt extract, 1,25 g pepton, 2,5 g glukosa, 5 g *bacto* agar dilarutkan ke dalam akuades hingga volume mencapai 250 mL, kemudian dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Medium dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 6 ml kemudian disterilisasi selama 15 menit dengan autoklaf pada suhu 121 ^oC dan tekanan 2 atm.

3.3.3.2. *Yeast Peptone Glucose Broth* (YPGB)

Pembuatan medium YPGB berdasarkan Yarrow (1998. p.79). Sebanyak 1 g yeast extract, 8 g glukosa, dan 1 g pepton dilarutkan dalam 100 mL akuades, kemudian dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Medium selanjutnya ditambahkan akuades sampai volume 200 mL, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Medium YPGB yang dibuat dimasukkan kedalam 4 buah erlenmeyer 100 mL, masing-masing sebanyak 50 mL . kemudian disterilisasi pada suhu 121 ^oC , tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.3.3.3. Pembuatan bufer fosfat

Larutan buffer fosfat pH 7 dibuat dengan cara menimbang K_2HPO_4 sebanyak 4,355 g dan KH_2PO_4 sebanyak 3,402 g kemudian dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 500 mL

3.3.3.4. Pembuatan larutan standar glukosa

Larutan standar glukosa dibuat dari larutan stok glukosa konsentrasi 10 mM sebanyak 500 mL dengan cara menimbang 0,9 gram glukosa dan melarutkannya dalam akuades sampai volume 500 mL. Larutan ini disebut larutan stok 1, yang di gunakan untuk membuat larutan stok 2, yang kemudian diencerkan dengan bufer fosfat dalam sel untuk membuat larutan standar (gambar 3.3)

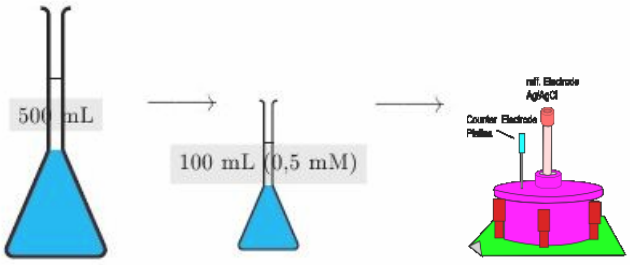


Figure 3.3.: Pengenceran larutan stok 1 → stok 2 → larutan standar

Table 3.1.: Pembuatan Larutan Standar

No	Volume larutan glukosa stok 1 (Kons =10 mM) dalam mL	Volume larutan glukosa stok 2 (mL)	Konsentrasi larutan glukosa stok 2 (mM)	Konsentrasi dalam sel (1 mL stok 2 + 4 mL aquades)	Nilai BOD Setara (mg/L)
	A	B	C	D	E
1	5	100	0,5	0,1	10
2	15	100	1,5	0,3	30
3	25	100	2,5	0,5	50
4	35	100	3,5	0,7	70
5	45	100	4,5	0,9	90

Penghitungan konsentrasi stok 2 (C)

$$C = \frac{D \times 5\ mL}{1\ mL}$$

Penghitungan konsentrasi stok 1 (A)

$$A = \frac{B \times C}{10\ mM}$$

Ket:
A = Volume larutan glukosa stok 1 (Kons =10 mM) dalam mL
B = Volume larutan glukosa stok 2 (mL)
C = Konsentrasi larutan glukosa stok 2 (mM)
D = Konsentrasi dalam sel (1 mL stok 2 + 4 mL aquades)

3.3.4. Pembuatan biomassa khamir

Khamir *Rhodotorula mucilaginosa* yang akan digunakan, terlebih dahulu di perbanyak dengan cara sebagai berikut:

3.3.4.1. Pemeliharaan biakan khamir

Stock culture biakan murni dalam medium PDA berasal dari UICC Lab. Mikrobiologi Departeman Biologi UI. Biakan *stock culture* disimpan pada suhu 4 ^{o}C . Dari *stock culture* dibuat biakan *working culture* dalam medium YMA yang disimpan pada suhu ruang dan diremajakan setiap bulan.

3.3.4.2. Peremajaan biakan khamir

Fungsi peremajaan biakan adalah untuk memperoleh sel khamir pada fase logaritmik(Mumtahinah, 2007). Strain khamir yang berasal dari *working culture* dipindahkan secara aseptik dengan jarum *ose* kedalam medium YMA miring, kemudian di inkubasi dalam inkubator pada suhu 30 ^{o}C selama 24 jam. Biakan khamir berumur 24 jam digunakan untuk persiapan biomassa khamir (butir 3.3.4.3).

3.3.4.3. Persiapan biomassa khamir

Dua buah tabung berisi biakan khamir yang berumur 24 jam dalam medium YMA miring disuspensikan dengan 5 mL medium YPGB (*Yeast Pepton Glucose Broth*) . Suspensi sel khamir kemudian dipindahkan secara aseptik kedalam 50 mL medium YPGB pada erlenmeyer berukuran 100 mL. Medium yang telah diinokulasi dengan khamir selanjutnya diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm selama 24 jam pada suhu 30 ^{o}C. Kemudian disentrifugasi selama 10 menit untuk memisahkan biomassa dari medium. Biomassa yang diperoleh dicuci dengan akuades dan disentrifugasi, pencucian dilakukan sebanyak dua kali. Biomassa disimpan dalam larutan bufer fosfat dan digunakan untuk prosedur imobilisasi. Sisa biomassa disimpan pada suhu 5 ^{o}C untuk digunakan pada percobaan pengulangan.

3.3.5. Uji potensi khamir sebagai *biosensing element*

Untuk menguji potensi khamir ***Rhodotorula mucilaginosa UICC Y - 181*** sebagai elemen biosensing di lakukan uji sebagai berikut:

1. Uji aktifitas *free cell* khamir: bertujuan untuk mengetahui kemampuan asimilasi khamir dalam mengurai zat organik, sebagai standar awal di gunakan variasi konsentrasi glukosa (BOD standar) dan diamati kuat arus yang merepresentasikan konsumsi oksigen. Akan dibuat grafik konsentrasi vs kuat arus yang di amati(Chan et al., 2000). Dalam proses ini di buat lima variasi konsentrasi glukosa sebagai substrat dan khamir dalam bentuk *free cell* sebagai bioelemen.
2. imobilisasi khamir dalam matrik kertas saring (*filter paper)* termasuk kedalam metode imobilisasi fisikal. Metode sederhana ini banyak digunakan, caranya menyaring suspensi mikrobial melalui kertas saring.

Mikroorganisma yang diabsorpsi dalam kertas saring dilaporkan memiliki sentifitas yang tinggi dibandingkan dengan metode *entrapment* mikroba (Riedel, 1998).

Cara kerja yang akan di lakukan adalah sebagai berikut:

3.3.5.1. Uji aktifitas *free cell* khamir

Hasil langkah kerja 3.3.4.3 berupa suspensi khamir yang telah dicuci dua kali, dibagi menjadi 5 bagian dengan massa 0,2 g. Pada percobaan pertama 0,2 g suspensi khamir ditambahkan 3 mL bufer fosfat pH 7, kemudian dimasukkan ke dalam sel elektrokimia yang telah diuji pada langkah 3.3.2, kemudian diaerasi selama 5 menit. Setelah itu diukur dengan *chrono amperometry (CA)* pada potensial kerja -554 mV. Nilai kuat arus dianggap sebagai I_0. Suspensi khamir dalam bufer fosfat ditambahkan 1 mL larutan glukosa 0,5 mM sehingga konsentrasi glukosa dalam sel elektrokimia menjadi 0,1 mM yang setara dengan 10 mg/ L BOD, Sistem dibiarkan selama lima menit sehingga terjadi asimilasi substrat yang diberikan. Setelah 5 menit, diukur kembali dengan CA, kemudian dicatat kuat arusnya sebagai I_5. Selisih kuat arus antara I_0 dan I_5 dikorelasikan dengan konsentrasi substrat. Langkah diulang sampai seluruh seri konsentrasi glukosa mulai dari 0,1; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 ; 0,9 mM selesai di uji. Dibuat grafik korelasi selisih kuat arus dengan konsentrasi glukosa.

3.3.5.2. Absorpsi khamir pada kertas saring

Dengan menggunakan pipet tetes, suspensi khamir dipindahkan dipermukaan kertas saring ukuran 1 cm^2. Dilakukan beberapa kali sampai suspensi khamir cukup banyak di permukaan kertas saring. Kertas saring di anginkan di udara terbuka, sampai khamir cukup teradsorsi di permukaan kertas. Kertas saring kemudian di *sandwich* dengan kertas saring yang lebih bersih. *Sandwich* kertas saring berisi khamir yang terabsorpsi dilekatkan diatas nafion, setelah nafion dilekatkan elektroda emas. Susunan elektroda ini kemudian dipasangkan ke sel elektrokimia. Sebelum digunakan sel elekrokimia di isi dengan bufer fosfat pH 7 sebanyak 5 mL selama 10 menit. Setelah itu di lakukan pengukuran CA dengan seri konsentrasi glukosa mulai dari 0,1; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 ; 0,9 mM.

Sebanyak 4 mL bufer fosfat pH 7 dimasukkan ke dalam sel elektrokimia yang telah di pasangkan *sandwich filter paper* teradsorsi khamir, kemudian

diaerasi selama 5 menit. Setelah itu diukur dengan *chrono amperometry (CA)* pada potensial kerja -554 mV selama 6 detik. Nilai kuat arus dianggap sebagai I_0.Sel elektrokimia kemudian ditambahkan 1 mL larutan glukosa 0,5 mM sehingga konsentrasi glukosa dalam sel elektrokimia menjadi 0,1 mM yang setara dengan 10 mg/ L BOD. Sistem dibiarkan selama lima menit sehingga terjadi asimilasi substrat yang diberikan. Setelah 5 menit, sistem diukur kembali nilai kuat arusnya dengan CA, kemudian dicatat kuat arusnya sebagai I_5. Selisih kuat arus antara I_0 dan I_5 dikorelasikan dengan konsentrasi substrat. Setelah itu sel elektrokimia di bilas dengan akuades sebanyak dua kali. Pengujian dengan prosedur sama dilakukan untuk seluruh seri konsentrasi glukosa mulai dari 0,1; 0,3 ; 0,5 ; 0,7; 0,9 mM. Setelah itu dibuat grafik korelasi selisih kuat arus dengan konsentrasi glukosa.

3.3.5.3. Imobilisasi khamir dalam gelatin

Proses imobilisasi dengan gelatin merupakan modifikasi dari metode yang digunakan oleh Alteriis (1987), berikut cara kerjanya:

Sebanyak 5 mL larutan gelatin 10 % dalam air dipanaskan sampai suhu 90 ^oC selama 10 menit. kemudian didinginkan sampai suhu 40 ^oC, baru ditambahkan formaldehid dalam alkohol sebagai *crosslinking agent*, larutan didiamkan selama 20 menit baru di campurkan 1 g suspensi khamir yang berumur 24 jam, diaduk hingga homogen, kemudian di *casting* dan di simpan dalam suhu -4 ^oC. Dalam penelitian ini khamir dalam gelatin di *casting* didasar sel elektrokimia. Setelah 4 jam, sel elektrokimia dibilas dengan akuades sebanyak dua kali kemudian di isi dengan larutan bufer fosfat pH 7 selama 1 jam. Khamir terimobilisasi kemudian digunakan untuk proses selanjutnya.

3.3.5.4. Pengujian sel khamir terimobilisasi gelatin.

Pengujian diawali dengan penentuan waktu optimum pengukuran BOD. Dilakukan dengan teknik *chrono amperometry (CA)* dengan memvariasikan waktu pengukuran selama 5 menit, 10 menit, 20 menit dan 25 menit, dengan potensial kerja -554 mV. Sebanyak 4 mL bufer fosfat pH 7 dimasukkan ke dalam sel elektrokimia yang telah memiliki khamir terimobilisasi pada dasarnya, kemudian diaerasi selama 5 menit. Nilai kuat arus dianggap sebagai I_0, setelah itu ditambahkan 1 mL larutan glukosa 0,5 mM sehingga konsentrasi glukosa dalam sel elektrokimia menjadi 0,1 mM yang setara dengan 10 mg/ L

BOD. Sistem dibiarkan selama lima menit sehingga terjadi asimilasi substrat yang diberikan. Setelah 5 menit, diukur kembali dengan CA, kemudian dicatat kuat arusnya sebagai I_5. Pengukuran dilanjutkan dengan selang waktu 5 menit sampai 25 menit, sehingga dihasilkan kuat arus I_{10} ;I_{15} ;I_{20} ;I_{25} . Untuk mencari waktu optimum pengukuran, selisih kuat arus antara I_0 - I_5;I_0 - I_{10};I_0 - I_{15};I_0 - I_{20};I_0 - I_{25} dibandingkan, nilai selisih kuat arus terbesar menandakan waktu optimum pengukuran BOD.

Waktu optimum pengukuran yang didapatkan, digunakan sebagai waktu pengukuran sampel. Dengan teknik *chrono amperometry (CA)*, dilakukan pengukuran selisih kuat arus I_0 - $I_{optimum}$ untuk larutan standar glukosa 0,1 mM sampai 0,9 mM. Dengan cara sebagai berikut: sebanyak 4 mL bufer fosfat pH 7 dimasukkan ke dalam sel elektrokimia yang telah memiliki khamir terimobilisasi pada dasarnya, kemudian diaerasi selama 5 menit. Nilai kuat arus dianggap sebagai I_0, setelah itu ditambahkan 1 mL larutan glukosa 0,5 mM sehingga konsentrasi glukosa dalam sel elektrokimia menjadi 0,1 mM yang setara dengan 10 mg/ L BOD. Sistem dibiarkan sampai waktu optimum tercapai sehingga terjadi asimilasi substrat yang diberikan. Setelah itu diukur kembali dengan CA. Nilai selisih kuat arus dikorelasikan dengan konsentrasi substrat. Setelah itu sel elektrokimia di bilas dengan akuades sebanyak dua kali. Pengujian dengan prosedur sama dilakukan untuk seluruh seri konsentrasi glukosa mulai dari 0,1; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 mM; 0,9 mM. Setelah itu dibuat grafik korelasi selisih kuat arus dengan konsentrasi glukosa.

Sel elektrokimia yang telah dibilas dua kali dengan akuades di isi larutan bufer fosfat sebanyak 5 mL dan disimpan dalam lemari pendingin. Dihari ketiga sel elektrokimia di ukur kembali aktifitasnya , sesuai prosedur diatas.

3.3.5.5. Pengukuran berulang pada imobilisasi gelatin

Untuk melihat konsistensi hasil pengukuruan, dilakukan pengukuruan berulang sebanyak 4 kali, dengan prosedur sebagai berikut; sel elektrokimia di *casting* dengan gelatin berisi khamir *Rhodotorula mucilaginosa* dengan konsentrasi 1g/mL berumur 24 jam. Proses imobilisasi sesuai dengan prosedur 3.3.5.3. Kemudian dilakukan pengukuran CA pada potensial kerja -554 mV. Konsentrasi yang diuji adalah 0 mM; 0,1 mM dan 0,3 mM.

Sebanyak 5 mL bufer fosfat pH 7 dimasukkan ke dalam sel elektrokimia yang telah memiliki khamir terimobilisasi pada dasarnya, kemudian diaerasi

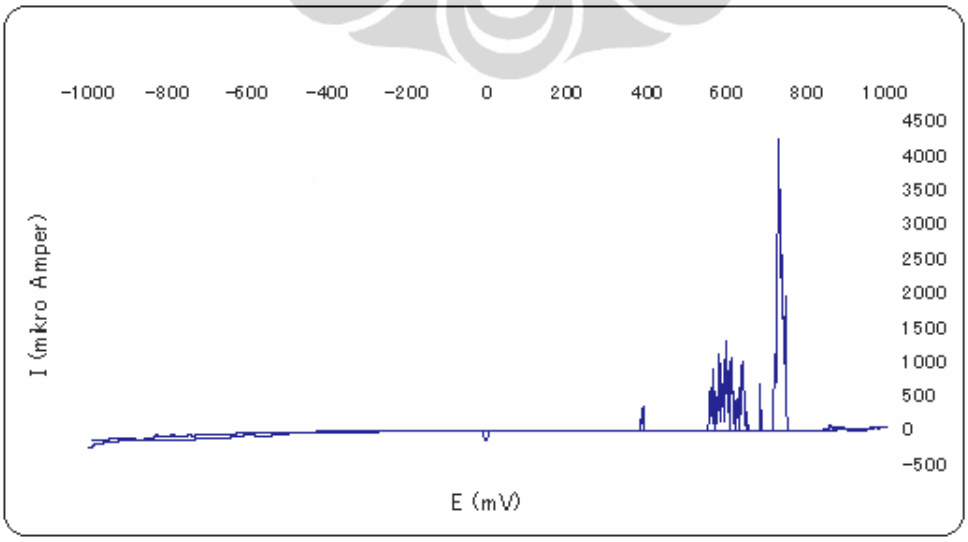
selama 5 menit. Nilai kuat arus dianggap sebagai I_0, setelah itu sistem dibiarkan selama lima menit sehingga khamir terlihat melakukan respirasi *endogenus*. Setelah 5 menit, diukur kembali dengan CA, kemudian dicatat kuat arusnya sebagai I_5. Selisih kuat arus antara I_0 dan I_5 dikorelasikan dengan konsentrasi nol substrat .

Kemudian dilakukan pengujian untuk konsentrasi glukosa 0,1 mM, sesuai prosedur 3.3.5.3 yaitu sebanyak 4 mL bufer fosfat pH 7 dimasukkan ke dalam sel elektrokimia dan diaerasi selama 5 menit. Nilai kuat arus dianggap sebagai I_0, setelah itu ditambahkan 1 mL larutan glukosa 0,5 mM sehingga konsentrasi glukosa dalam sel elektrokimia menjadi 0,1 mM yang setara dengan 10 mg/ L BOD. Sistem dibiarkan selama lima menit sehingga terjadi asimilasi substrat yang diberikan. Setelah 5 menit, diukur kembali dengan CA, kemudian dicatat kuat arusnya sebagai I_5. Selisih kuat arus antara I_0 dan I_5 dikorelasikan dengan konsentrasi substrat. Langkah tersebut diulangi untuk konsentrasi 0.3 mM. Pengukuran pengulangan dilakukan setelah sel elektrokimia di rendam dalam bufer fosfat selama 5 menit, sampai seluruh seri konsentrasi 0; 0,1 dan 0,3 mM selesai diuji.

BAB 4
PEMBAHASAN

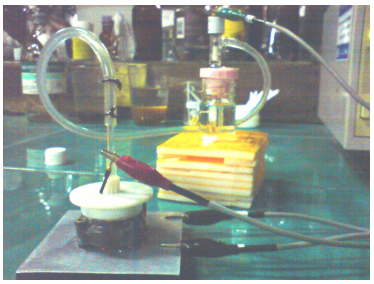
4.1. Sensor oksigen

Merujuk pada *dictionary of chemistry* (Licker, 2003) pengertian "sel" kurang lebih adalah wadah yang mengandung larutan elektrolit dan elektroda logam untuk menghasilkan arus listrik atau untuk elektrolisis. Tujuan pembuatan sel elektrokimia sampel dengan sensor oksigen terpasang, agar memudahkan pengerjaan pengujian yang dilakukan secara berulang. Telah dilakukan pengujian kelayakan dua model sel elektrokimia menggunakan pengukuran CV dengan alat *eDAC potentiostat*. Larutan bufer fosfat pH 7 digunakan larutan elektrolit. Larutan bufer fosfat sebelumnya di *purging* dengan gas nitrogen selama lima menit. Pada model pertama, saat dilakukan pengukuran CV ternyata tidak menghasilkan grafik yang diharapkan. *Scan window* untuk pengukuran oksigen dimulai dari +1000 mV ke arah -1000 mV. Grafik CV yang dihasilkan bergelombang tidak beraturan (gambar 4.1), menandakan perubahan potensial secara periodik, tidak di ikuti kuat arus yang proporsional. Prosedur pengukuran CV dengan variasi waktu aerasi tidak dilakukan, karena tidak sempurnanya voltamogram yang dihasilkan.

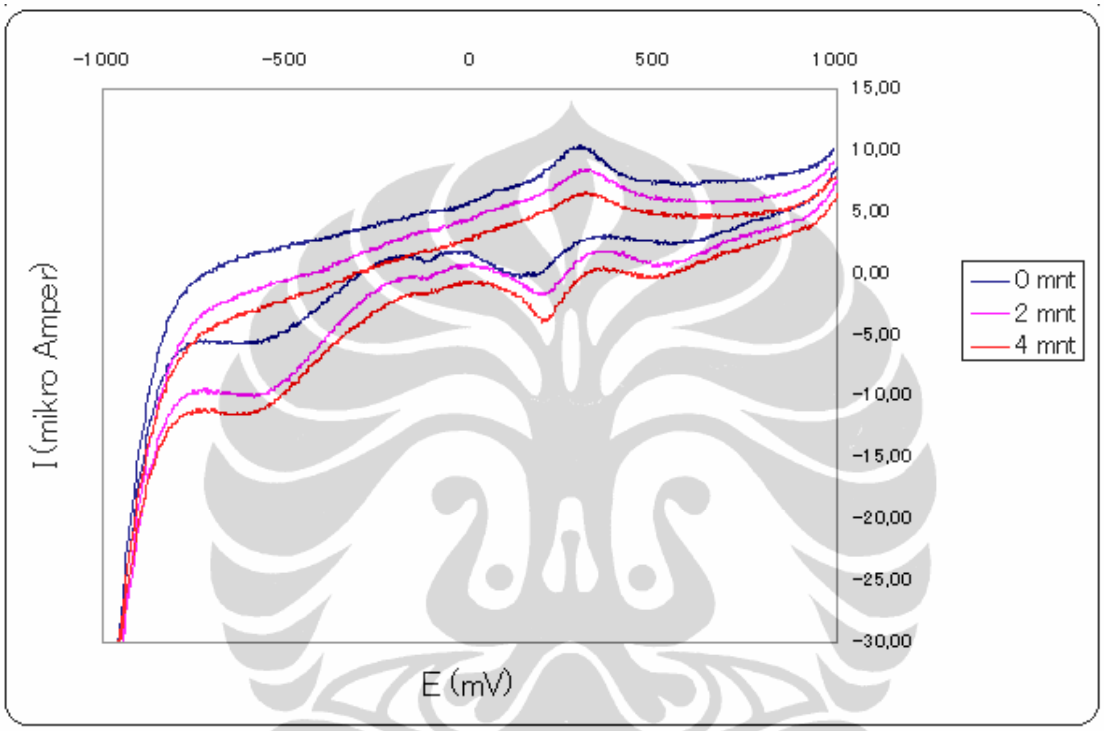


Gambar 4.1.: Voltamogram sel elektrokimia model 1

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.



(a) sel elektrokimia model ke 2



(b) Hasil voltamogram sel elektrokimia model 2 menunjukkan terdapat tiga buah puncak.

Gambar 4.2.: voltamogram sel elektrokimia model 2

Pengukuran CV pada model kedua menghasilkan voltamogram seperti pada gambar 4.2. Pengukuran dilakukan dengan *scan window* mulai dari +1000 mV kearah -1000 mV kemudian kembali lagi ke +1000 mV, *scan rate* 10 mV/s. Susunan elektroda yang di gunakan adalah emas berdiamater 3 mm sebagai *working electrode* yang dilapisi membran nafion 50 mikron. Membran nafion adalah membran yang *permeable* terhadap gas oksigen. Membran ini memisahkan elektrolit dari permukaan elektroda (Dupont, n.d.), sehingga diharapkan hanya gas oksigen saja yang tereduksi di elektroda emas. Sebagai *reference electrode* digunakan Ag/AgCl (saturated KCl) no seri AS 002058 RE-1C buatan BAS Inc, Jepang. Sedangkan *counter electrode* menggunakan

kawat platina. Dari hasil voltamogram terlihat dalam *range* 0 sampai 500 mV terdapat sebuah reaksi *reversible,* ditandai sebuah puncak oksidasi dan reduksi. Untuk reaksi oksidasinya berlangsung pada potensial 318 mV, sedangkan reaksi reduksi (puncak dibawah) berlangsung pada potensial 184 mV. Pada rentang potensial 0 mV sampai -1000 mV terdapat satu puncak reduksi, dengan potensial reduksi -518 mV. Puncak reduksi dan oksidasi meningkat dengan penambahan waktu aerasi. Hal ini menandakan reaksi oksidasi dan reduksi yang berlangsung berhubungan dengan oksigen, dimana saat konsentrasi oksigen meningkat akibat aerasi, ketinggian puncak bertambah. Adanya puncak yang sama saat dilakukan *purging* nitrogen kemungkinan disebabkan gas nitrogen yang digunakan masih mengandung oksigen. Berdasarkan data pada label yang disertakan di tabung gas, gas nitrogen yang digunakan masih mengandung oksigen dengan konsentrasi 2 ppm. Pengukuran terpisah konsentrasi oksigen terlarut dalam larutan bufer fosfat pH 7 setelah di *purging* dengan gas nitrogen selama 5 menit, menghasilkan nilai 1,1 sampai 1,2 ppm.

Reduksi oksigen di katoda dapat melalui dua mekanisme, yaitu reaksi yang melibatkan dua elektron dengan hidrogen peroksida sebagai hasil intermediat(Sohn & Kim, 1996):

$$O_2 + 2H_2O + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2 + 2OH^- \quad (4.1)$$

$$H_2O_2 + 2e^- \rightleftharpoons 2OH^- \quad (4.2)$$

Mekanisme berikutnya melibatkan empat elektron:

$$O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightleftharpoons 4OH^- \quad (4.3)$$

Namun untuk menentukan secara pasti reaksi reduksi dan oksidasi yang terjadi pada *peak* potensial yang ditemukan agak sulit. Analisis mekanistik reaksi reduksi oksigen melibatkan banyak *step* reaksi dan reaksi intermediat dengan energi absorpsi beragam bergantung potensial elektrodanya. Reduksi oksigen dapat melalui proses dua elektron menghasilkan hidrogen peroksida atau dengan proses empat elektron menghasilkan air. Hidrogen peroksida yang dihasilkan dapat terurai menjadi air atau terdekomposisi secara katalitik

(Damjanovic, 1969). Menurut Urgeghe (2006), hidrogen peroksida terdekomposisi secara katalitik dengan persamaan :

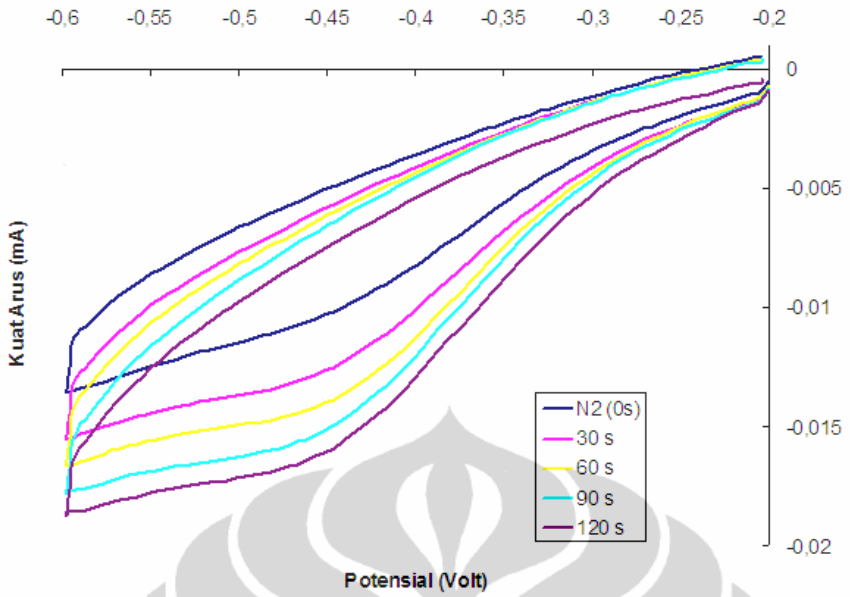
$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O \tag{4.4}$$

Selain itu daerah potensial kerja (*potential window*) saat *scanning* juga dilaporkan menghasilkan beragam rute. Keadaan sebenarnya lebih rumit karena adanya interaksi permukaan elektroda dan interaksi dengan lingkungan(Urgeghe, 2006).

Bila dilihat dari hasil voltamogram, reaksi irreversibel yang terjadi pada potensial -518 mV kemungkinan mengikuti mekanisme reaksi reduksi yang melibatkan dua elektron dengan intermediat hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida dapat tereduksi berdasarkan persamaan 4.2 dengan potensial reduksi yang berbeda dan dekomposisi katalitik hidrogen peroksida , menyebabkan tidak dapat baliknya reaksi reduksi oksigen, sehingga menghasilkan voltamogram yang menunjukkan reaksi irreversibel pada potensial -518 mV.

Pengujian sensor oksigen menggunakan *potential scan window* di atur pada -200 mV sampai -600 mV dengan alat HSV-100 (Hokuto Denko) potensiostat. Elektroda-elektroda yang digunakan sama dengan percobaan pertama. Untuk mengatur konsentrasi oksigen, Yu (2008) menggunakan alat *MKS Mass-flow Controller System* yang mengatur laju alir antara udara murni dan gas nitrogen. Dalam penelitian ini digunakan aerator *aquarium pump* untuk mengatur konsentrasi oksigen dengan mengatur waktu aerasi. Kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi oksigen terlarut dengan alat DO meter merk *Lutron*. Hasil voltamogram seperti terlihat pada gambar 4.3.

Larutan bufer fosfat dengan pH 7 yang di *purging* dengan gas nitrogen menghasilkan voltamogram yang lebih ramping, dengan puncak reduksi oksigen yang rendah. Aerasi selama 30 detik menghasilkan voltamogram yang lebih lebar dengan potensial di puncak reduksi berkisar -500 mV. Aerasi menyebabkan kuat arus reduksi makin besar yang terlihat dalam grafik makin negatif, sesuai konvensi arus untuk reduksi berlambang negatif, sedangkan kuat arus untuk oksidasi berlambang positif.

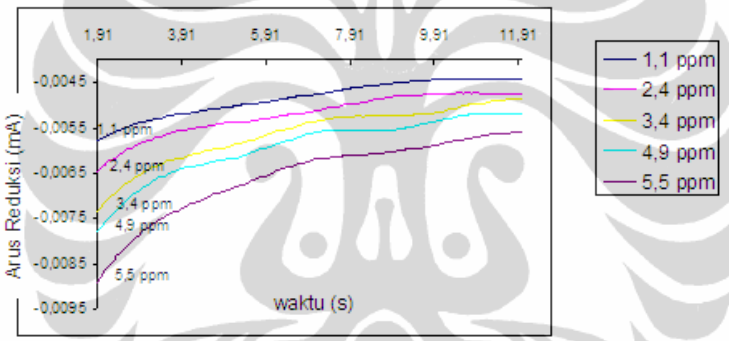


Gambar 4.3.: Voltamogram Uji Sensor O_2

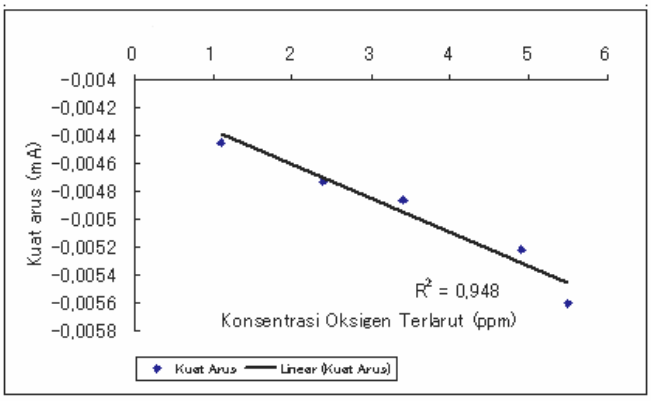
Jadi makin tinggi konsentrasi oksigen menyebabkan bertambahnya kuat arus reduksi yang di butuhkan. Semakin bertambahnya akumulasi waktu aerasi memperlihatkan semakin negatifnya kuat arus reduksi. Ini menandakan bahwa konsentrasi oksigen terlarut dalam bufer fosfat proporsional dengan kuat arus reduksi yang di butuhkan. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Yu (2008, p. 108) .

Tabel A.1 pada halaman lampiran adalah ringkasan korelasi kuat arus reduksi dengan waktu aerasi. Tabel tersebut merupakan hasil olahan voltamogram gambar 4.3. Tabel tersebut berguna untuk meninjau potensial kerja yang memberikan korelasi tertinggi antara kuat arus dengan konsentrasi oksigen. Dari data tersebut terlihat bahwa nilai potensial -554 mV menghasilkan korelasi tertinggi (0,991). Hasil penelitian Yu (2008,p. 108) memperlihatkan *peak voltage (potential)* dan *limiting voltage* antara -600 mV dan -450 mV. Yu menggunakan sensor oksigen *thick film printed Au* sebagai elektroda kerja, Ag/AgCl sebagi *reference electrode* dan emas sebagai *counter electrode*. Dengan menggunakan elektroda ini didapatkan potensial kerja untuk sensor oksigen sebesar - 550 mV, hasil yang tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan.

Selanjutnya pada potensial -554 mV dilakukan pengukuran *chrono amperometry* untuk melihat hubungan konsentrasi oksigen dengan kuat arus, menggunakan alat HSV-100 (Hokuto Denko) potensiostat. Hasil pengukuran dapat terlihat pada gambar 4.4, Lamanya aerasi menghasilkan kuat arus reduksi yang lebih tinggi. Pengukuran konsentrasi oksigen terlarut pada bufer fosfat yang di *purging* gas N_2 dengan alat *Lutron DO meter* menghasilkan kadar oksigen terlarut sebesar 1,1 ppm. Untuk melihat hubungan antara konsentrasi oksigen terlarut dengan kuat arus, diambil data kuat arus pada detik ke 18, yang diringkas dalam tabel A.2. pada lampiran. Amperogram pada gambar 4.4 memperlihatkan hubungan kuat arus reduksi dengan konsentrasi oksigen terlarut.



Gambar 4.4.: Amperogram Kuat Arus pada variasi konsentrasi O_2 terlarut



Gambar 4.5.: Korelasi kuat arus dengan konsentrasi O_2 terlarut

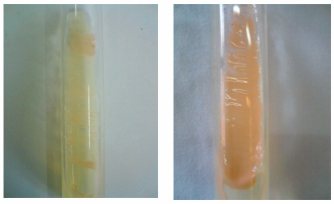
Gambar 4.5 memperlihatkan korelasi sebesar 0,948 antara konsentrasi oksigen terlarut dengan kuat arus reduksi oksigen. Hal ini menunjukkan sensor cukup baik mendeteksi oksigen dan dapat digunakan sebagai transduser pada sensor BOD.

4.2. Produksi biomasa khamir

Beberapa penelitian BOD sensor menggunakan khamir sebagai *biosensing element* (Chan et al., 2000; K.Riedel, 1990). Khamir memiliki keunggulan karena stabil secara genetik. Selain itu produksi biomassa khamir relatif mudah dan cepat. Pada penelitian ini sel khamir dalam bentuk biomassa basah digunakan sebagai elemen sensing pada biosenseor. Perolehan biomassa yang optimal memerlukan komposisi medium pertumbuhan, faktor lingkungan, dan waktu inkubasi. *Medium Yeast Peptone Glucose Broth* (YPGB) yang mengandung ekstrak khamir 0,5%; pepton 0,5% ; dan glukosa 4% (Yarrow, 1998, p.79), telah mengandung semua komponen yang diperlukan untuk pertumbuhan khamir yang optimal. Pada penelitian ini tidak ditambahkan konsentrasi NaCl 1,5% seperti dalam prosedur yang dikemukan Mumtahinah (2007) dengan pertimbangan penggunaan sensor nanti di lingkungan dengan kadar NaCl rendah, sehingga dilakukan pembiasaan khamir terhadap konsentrasi NaCl rendah. Diharapkan peneliti selanjutnya dapat melakukan pengujian pada kadar garam tinggi, sehingga bisa tercipta sensor BOD yang mampu bekerja di perairan dengan kadar garam tinggi.

Konsentrasi glukosa 4% merupakan konsentrasi yang cukup tinggi karena umumnya medium pertumbuhan seperti YMA dan PDA hanya mengandung glukosa 1%. Pada penelitian ini, inkubasi khamir dalam medium YPGB dengan suhu 30^oC termasuk kisaran suhu optimal pertumbuhan khamir. Khamir juga merupakan organisma aerob yang memerlukan ketersediaan oksigen untuk pertumbuhannya. Pengocokkan medium pertumbuhan dalam *shaker incubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm bertujuan meningkatkan kontak antara sel dengan nutrien serta meningkatkan ketersediaan oksigen. Berdasarkan kurva pertumbuhan *Rhodotorula mucilaginosa* hasil penelitian Rianasari (2004, p.64), pertumbuhan khamir memasuki fase akhir log setelah 24 jam inkubasi (gambar 4.6). Pada fase akhir log pertumbuhan khamir mencapai tahap optimal(Cappuccino & Sherman, 2002). Riedel (1998) mengunakan khamir berusia 24 jam untuk proses imobilisasi sebagai elemen

sensing BOD sensor(gambar 4.7). Riedel menggunakan istilah *stationary phase* untuk menggambarkan kondisi ini.

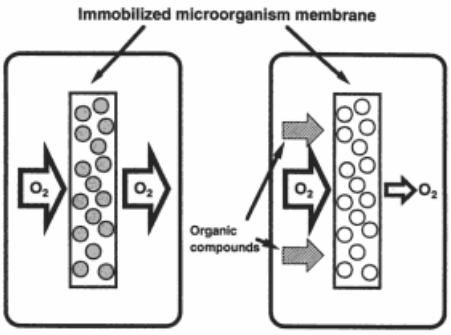


Gambar 4.6.: r. mucilaginosa pada agar miring umur 24 jam dan 3 hari

Gambar 4.7.: r. mucilaginosa dalam YPGB dan hasil sentrifugasi

4.3. Uji potensi khamir sebagai biosensing element

Prinsip kerja sensor mikrobial yang menggunakan elektroda oksigen dapat dilihat pada gambar 4.8.



Gambar 4.8.: Prinsip sensor mikroba yang menggunakan elektroda oksigen (Arikawa, Ikebukuro, & Karube, 1998)

Tipikal sensor mikrobial terdiri atas elektroda oksigen, tempat dimana sebuah membran yang mengandung mikroorganisma aerobik terpasang. Respirasi dan fungsi metabolik mikroorganisma digunakan untuk mendeteksi substrat. Ketika analit terdegradasi oleh mikroorganisma yang terimobilisasi, aktifitas respirasi akan meningkat dan oksigen terlarut akan di konsumsi(Arikawa et al., 1998). Konsentrasi oksigen dimonitor oleh elektroda oksigen. Konsentrasi oksigen yang tinggi akan mengeluarkan respon kuat arus reduksi tinggi, seperti terlihat pada sub bab sebelumnya (sub bab 4.1). Penurunan kuat arus relatif tinggi yang berasal dari elektroda oksigen mengindikasikan aktifitas metabolik dari mikroba yang terimobilisasi, sebagai pertanda konsentrasi analit yang tinggi.

4.3.1. Uji aktifitas *free cell* khamir

Pengujian potensi khamir sebagai elemen sensing BOD sensor melalui uji mikroba bebas (*free cell*) tanpa di imobilisasi, dilakukan dengan tujuan mengetahui karakteristik mikroba bersangkutan. Informasi yang didapat juga berguna untuk mengetahui apakah respon kuat arus yang terdeteksi mencerminkan perubahan laju respirasi substrat oleh khamir bukan karena akibat difusi substrat yang terhambat(Riedel, 1998). Khamir yang terimobilisasi dalam matrik tidak secara bebas memperoleh nutrien dari lingkungan sekitarnya. Substrat harus terdifusi dahulu kedalam matriks dan baru mencapai sel khamir. Respon kuat arus tidak mencerminkan laju respirasi bila laju asimilasi substrat oleh khamir lebih cepat dari difusi substrat kedalam matriks. Saat laju asimilasi menurun karena ketiadaan substrat, respon kuat arus reduksi oksigen akan meningkat karena konsumsi oksigen oleh khamir menurun. Dengan menggunakan sel khamir bebas dan memantau aktifitas respirasinya terlebih dahulu dapat digunakan sebagai acuan efektifitas imobilisasi.

Penggunaan glukosa sebagai larutan standar penentuan nilai BOD berdasarkan Miller yang menggunakan kesetaraan 1 mM glukosa = 100 mg/L BOD (Miller & Miller, 1993). Kurva kalibrasi berdasarkan glukosa digunakan dalam penelitian Chan et.al (2000). Konsentrasi glukosa yang digunakan bisa dimulai dari 0,01 mM - 2 mM (Riedel 1998, p.215). Menurut Riedel penggunaan glukosa dan asam glutamat sebagai larutan standar BOD konvensional memungkinkan digunakan. Namun kemungkinan kontaminasi mikroba lain dapat terjadi. Kontaminasi mikroba dapat berupa pertumbuhan

lapisan tipis mikroba di dinding sel elektrokimia yang mempengaruhi hasil pengukuran.

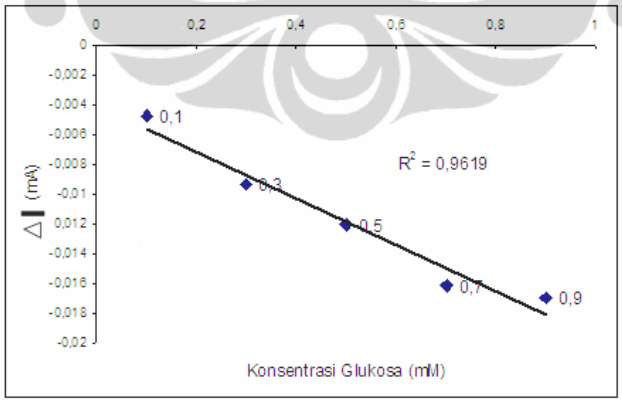
Berdasarkan prosedur 3.3.5.1 diukur aktivitas *free cell* khamir sebagai *sensing element* sensor BOD . Prosedur tersebut menentukan konsentrasi oksigen terlarut sebagai respon kuat arus reduksi, pada saat sebelum dan sesudah penambahan substrat. Kelayakan *Rhodotorula mucilaginosa* sebagai *sensing element* dapat di pelajari dari respon kuat arus yang berubah saat sebelum penambahan substrat dan sesudahnya. Sebelum penambahan substrat, khamir melakukan respirasi *endogenus*, sehingga kebutuhan oksigen untuk respirasi masih rendah. Konsentrasi oksigen terlarut yang masih tinggi dapat dilihat dari respon kuat arus reduksi yang tinggi. Saat substrat dimasukkan kedalam sistem, menurut Riedel (1998) khamir akan berusaha melakukan transportasi substrat kedalam *inner cell*, aktifitas ini terpantau dari meningkatnya laju respirasi sel, karena transpor aktif substrat membutuhkan energi. Semakin banyak substrat yang ditranspor, semakin banyak kebutuhan oksigen sebagai akibat laju respirasi yang meningkat. Besarnya kuat arus reduksi akan menurun pada saat terjadi penurunan konsentrasi oksigen terlarut. Selang waktu pengukuran setelah penambahan substrat adalah 5 menit yang dihasilkan dari prosedur 3.3.5.4 . Penentuan waktu minimal pengukuran dapat dilihat pada gambar 4.14.

Dari prosedur 3.3.5.1, didapatkan serangkaian amperogram berdasarkan variasi konsentrasi glukosa. Untuk konsentrasi glukosa 0,1 mM ditunjukan oleh grafik amperogram kiri atas pada gambar 4.10. Konsentrasi berikutnya adalah 0,3 mM, kemudian kebawah 0,5 mM dan 0,7 mM serta terakhir amperogram untuk konsentrasi 0,9 mM. Amperogram tersebut menggunakan skala 10 μA dan di perbesar dengan mengambil rentang waktu antara 0,4 sampai 6 detik. Grafik amperogram pengukuran kuat arus setelah aerasi 5 menit antara campuran *free cell* dan bufer fosfat terlihat pada gambar 4.10 (garis kurva berwarna biru tua). Setelah 5 menit penambahan substrat glukosa dengan variasi konsentrasi 0,1 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 0,7 mM dan 0,9 mM, terlihat besar kuat arus menurun, proporsional dengan peningkatan konsentrasi glukosa (garis kurva warna merah muda). Dari gambar 4.10 dapat di lihat bahwa peningkatan konsentrasi larutan glukosa menyebabkan perbedaan antara I_0 dan I_5 makin besar. Untuk konsentrasi glukosa 0,1 mM (setara dengan 10 mg/L

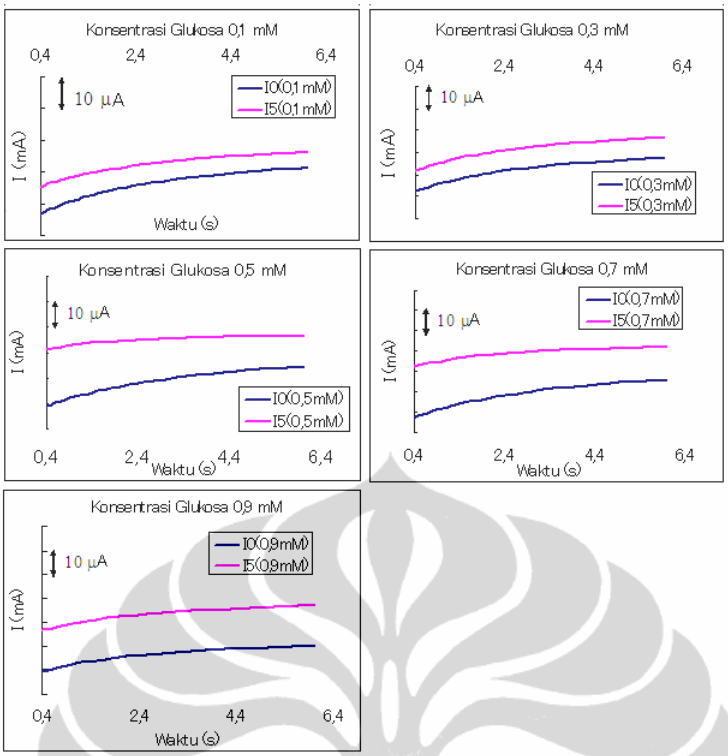
BOD) menghasilkan selisih kuat arus sebesar 4,77 μA dan untuk konsentrasi 0,9 mM menghasilkan selisih kuat arus 16,9 μA. Nilai kuat arus terukur yang dicatat adalah kuat arus detik ke enam yaitu akhir proses pengukuran CA.

Pada saat terjadi pengukuran kuat arus awal disimbolkan sebagai I_0 , khamir belum memulai aktifitas metabolisasi. Setelah penambahan glukosa sebesar 0,1 mM dan dibiarkan 5 menit, kuat arus yang didapatkan disimbolkan sebagai I_5 yaitu kuat arus pada metabolisasi 5 menit. Menurut Riedel (1998) dengan menggunakan akselerasi laju respirasi, lama pengukuran bisa dipersingkat hingga 15 sampai 30 detik. Namun dalam penelitian ini tidak berhasil mencapainya. Hasil pengukuran untuk seri konsentrasi dalam sel elektrokimia : 0,1; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 ; 0,9 mM dalam bentuk amperogram terlihat pada gambar 4.10. Sedangkan korelasi antara selisih kuat arus ($I_0 - I_5$) diperlihatkan dalam gambar 4.9.

Hasil korelasi menunjukkan khamir *Rhodotorula mucilaginosa* bebas (*free cell*) menunjukkan respon yang baik ($R^2 = 0,96$). Sehingga proses asimilasinya dapat di monitor dengan elektroda oksigen yang digunakan. Melalui hasil pengukuran *free cell* ini, *Rhodotorula mucilaginosa* bebas memiliki potensi sebagai *biosensing element*.



Gambar 4.9.: Korelasi selisih kuat arus dengan konsentrasi glukosa pada *Free Cell*



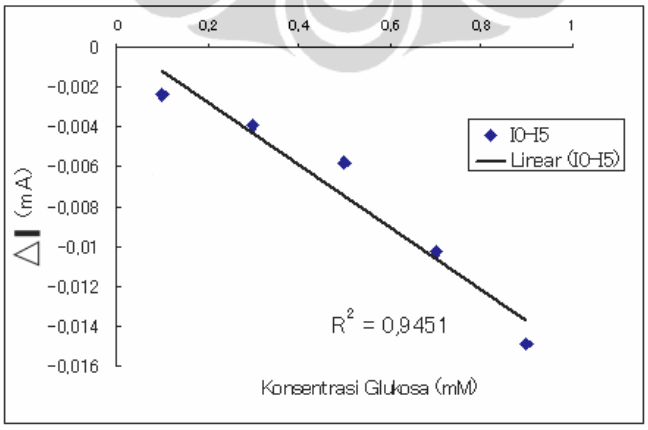
Gambar 4.10.: Amperogram arus I_0 dan I_5 pada variasi konsentrasi glukosa pada *free cell , potensial -554 mV, elektroda emas diameter 3 mm.*

4.3.2. Absorpsi khamir pada kertas saring

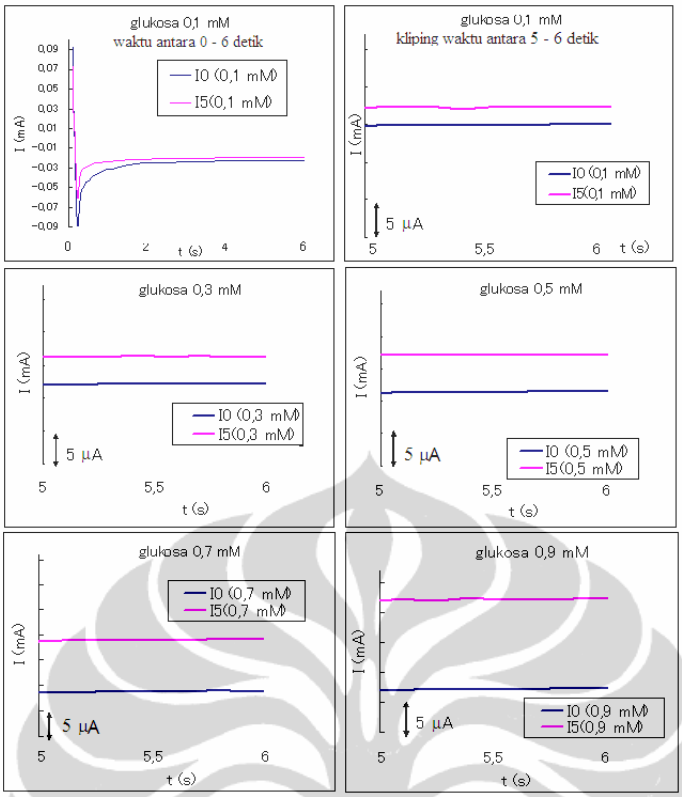
Pada penelitian ini, khamir di imobilisasi dalam gelatin, dengan menggunakan *cross lingking agent* formaldehid dalam etanol, setelah itu dilakukan pendinginan dalam *freezer* selama 4 jam. Untuk mengetahui sejauh mana proses tersebut berpengaruh terhadap aktifitas khamir *Rhodotorula mucilaginosa*, dilakukan proses imobilisasi sederhana dengan kertas saring (*filter paper*) sebagai pembanding. Absorpsi khamir dalam kertas saring dapat memperlihatkan karakteristik khamir dalam keadaan terimobilisasi tanpa menggunakan proses kimia yang kemungkinan bisa menurunkan aktifitasnya. Metode imobilisasi dalam kertas saring telah digunakan dalam beberapa penelitian (Eggenstein et al., 1999; Reshetilov et al., 1997). Riedel menyatakan bahwa imobilisasi dalam kertas saring memiliki sensitifitas yang tinggi. Selain kertas saring, Riedel (1998,p.217) menggunakan kertas yang tipis seperti kertas rokok (*cigaret paper* or *Joseph paper*) sebagai matriks imobilisasi khamir, untuk mengkarakterisasi keadaan fisiologi mikroorganisma (*Physiological state*

of microorganisme) dengan melihat respirasi *endogenus* mikroorganisma dalam keadaan tanpa substrat.

Dari prosedur 3.3.5.2 didapatkan serangkaian amperogram berdasarkan variasi konsentrasi glukosa. Untuk konsentrasi glukosa 0,1 mM ditunjukan oleh grafik amperogram paling atas pada gambar 4.12. Gambar pertama adalah amperogram dengan skala 20 μA untuk konsentrasi glukosa 0,1 mM. Gambar disebelah kanannya adalah tampilan diperbesar, menggunakan skala 5 μA dengan mengambil rentang waktu antara 5 sampai 6 detik. Amperogram selanjutnya adalah untuk konsentrasi glukosa yang lebih tinggi. Dari data amperogram gambar 4.12, dibuat grafik korelasi selisih kuat arus dengan konsentrasi glukosa yang diperlihatkan pada gambar 4.11. Untuk konsentrasi glukosa 0,1 mM menghasilkan selisih kuat arus antara 0 menit dengan 5 menit sebesar 2,33 μA. Bila dibandingkan dengan *free cell*, hanya sebesar 49% yaitu sebesar 4,7 μA, . Sedangkan untuk konsentrasi 0,9 mM menghasilkan selisih kuat arus 14,8 μA, perbandingan dengan *free cell* yang 16,9 μA sebesar 87,6%. Ini menunjukkan bahwa untuk konsentrasi rendah, imobilisasi dalam kertas saring kurang sensitif dibanding *free cell*. Untuk konsentrasi tinggi, perbedaannya tidak begitu jauh. Dari tabel di buat grafik korelasi antara selisih kuat arus dengan konsentrasi glukosa menghasilkan nilai R^2=0,945, Korelasi ini lebih rendah dibandingkan dengan *free cell* (0,96).



Gambar 4.11.: Korelasi $\triangle I$ (mA) dengan kons. glukosa (absorpsi kertas saring)



Gambar 4.12.: Amperogram arus I_0 dan I_5 pada variasi konsentrasi glukosa pada kertas saring
, potensial -554 mV, elektroda emas diameter 3 mm.

4.4. Imobilisasi dalam gelatin dan uji responnya

4.4.1. Proses imobilisasi

Menurut Riedel (1998) perhitungan *biomass loading* sebagai berikut :

$$L = (MW \times V)(4\pi \times r^2) \qquad (4.5)$$

Dimana :
L = adalah *biomass loading* ($^{mg\,berat\,kering}/_{cm^2}$)
MW = berat basah (*moist weight*)
V = volume
r = radius area imobilisasi

Faktor kalkulasi antara berat basah dengan berat kering adalah 4 (MW/4=DW)

Konsentrasi biomassa yang dapat digunakan pada proses imobilisasi antara 0,2 - 1,0 g berat basah (wt/mL)(Riedel, 1998). Konsentrasi lebih tinggi menyebabkan difusi substrat terhambat oleh massa khamir, akibatnya respon sensor lambat.

Rhodotorula mucilaginosa UICC Y-181 adalah khamir lokal yang belum pernah di evaluasi penggunaannya sebagai elemen sensing BOD sensor. Pemanfaatan khamir lokal sebagai elemen sensing akan menjadi nilai tambah , karena harga elemen sensingnya akan menjadi lebih murah dan memiliki daya tahan yang lebih baik di kondisi iklim indonesia. Khamir yang berasal dari perairan teluk jakarta ini, terbukti tahan terhadap logam berat dan tahan kadar garam yang tinggi(Rianasari, 2004). Imobilisasi khamir dan evaluasi aktifitasnya, adalah langkah krusial pemanfaatan khamir ini sebagai sensing BOD. Menurut Riedel (1987) tujuan imobilisasi mikroorganisma untuk tujuan analitik /analisa harus memenuhi beberapa kriteria antara lain:

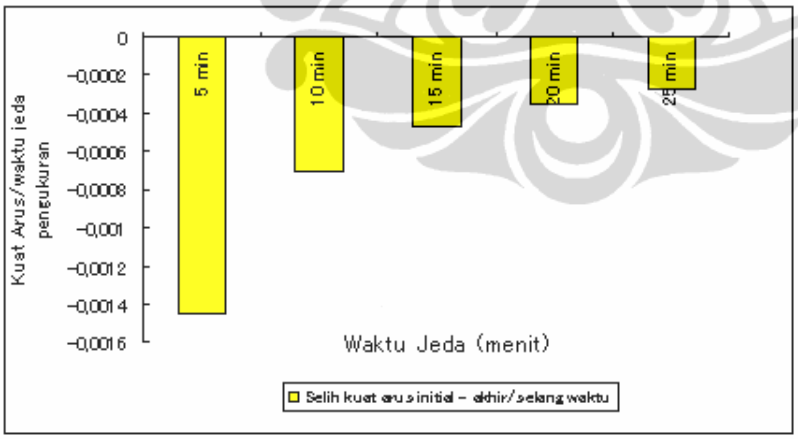
1. meningkatkan stabilitas kerja (*working stability*) organisma dan biosensor
2. penggunaan kembali (*reusability*) organisma karena meningkatnya stabilitas penyimpanan.
3. umur aktifitas yang terprediksi dari organisma yang di imobilisasi. karena menjadi bagian terintegrasi dengan peralatan analitik.
4. permeabilitas oksigen melalui membran terimobilisasi harus baik.

Penggunaan gelatin sebagai matriks imobilisasi telah dilakukan dalam beberapa penelitian(Parascandola, Scardi, & Alteriis, 1990; Akyilmaz & Dinčkaya, 2005). Akyilmaz menggunakan matrik gelatin dengan glutaraldehid sebagai *crosslingking agent* dalam sensor alkohol. Gelatin dianggap mudah tersedia dan murah, serta proses imobilisasinya yang mudah. Dalam dunia farmasi, gelatin juga sudah umum digunakan. Sifat gelatin yang tidak meracuni mikroorganisma, sangat mendukung pemanfaatannya sebagai matriks imobilisasi khamir, sifat ini diharapkan akan memperpanjang umur khamir yang di imobilisasi. Salah satu metode imobilisasi khamir menggunakan gelatin menggunakan formaldehid sebagai *crosslinking agent* (Alteriis et al., 1987).

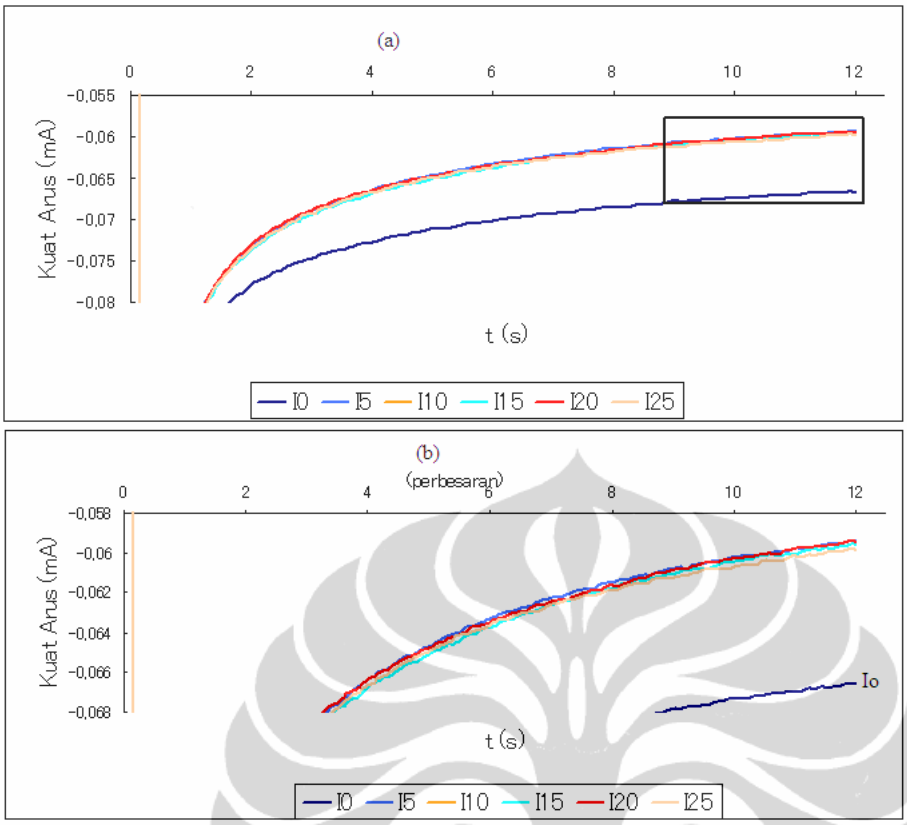
Percobaan imobilisasi khamir *Rhodotorula mucilaginosa* pada gelatin berdasarkan prosedur 3.3.5.3 hanya berhasil untuk masa khamir sebesar 0,2 g/mL larutan gelatin (gambar 4.15). Masa yang lebih besar menyebabkan larutnya matrik gelatin dalam air. Perlakuan penambahan formaldehid dan pendingin selama 4 jam, menghasilkan matriks imobilisasi seperti agar yang tak larut dalam air.

4.4.2. Penentuan waktu minimal pengukuran

Penentuan waktu minimal pengukuran BOD menggunakan sel elektrokimia yang terdiri dari matrik gelatin yang mengandung masa 0,2 g/mL khamir *Rhodotorula mucilaginosa* yang di *casting* diatas elektroda emas berlapis nafion (gambar 4.15), ditentukan dengan prosedur 3.3.5.4. Hasil pengujian dapat dilihat pada gambar 4.14. Grafik amperogram berwana biru tua menunjukan kuat arus I_0, pada saat larutan bufer fosfat hanya diaerasi dengan udara selama 5 menit tanpa substrat. Terlihat kuat arus reduksi yang tinggi (lebih negatif) menandakan konsumsi oksigen oleh khamir masih rendah. Kemudian diberi substrat dan dibiarkan selama 5 menit dan terlihat arus reduksi menurun, menandakan meningkatnya konsumsi oksigen akibat aktifitas respirasi meningkat. Penambahan waktu yang lebih lama ternyata tidak meningkatkan laju respirasi khamir. Terlihat bahwa waktu pengukuran yang melebihi 5 menit menghasilkan kuat arus yang tidak begitu jauh berbeda. Bila besarnya kuat arus pada akhir pengukuran dibagi dengan waktu pengukuran, maka seperti tergambar pada histogram 4.13, waktu pengukuran 5 menit setelah pemberian substrat adalah waktu minimal yang bisa digunakan sebagai dasar pengukuran model sensor BOD yang diteliti.



Gambar 4.13.: histogram penentuan waktu minimal pengukuran



Gambar 4.14.: (a). penentuan waktu pengukuran minimal , grafik (b) adalah perbesarannya

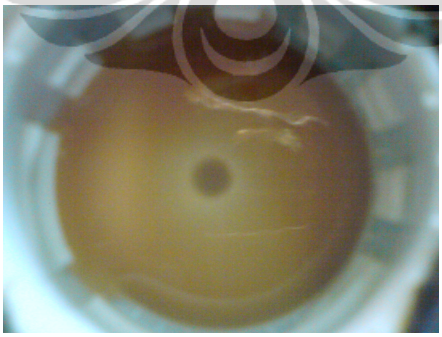


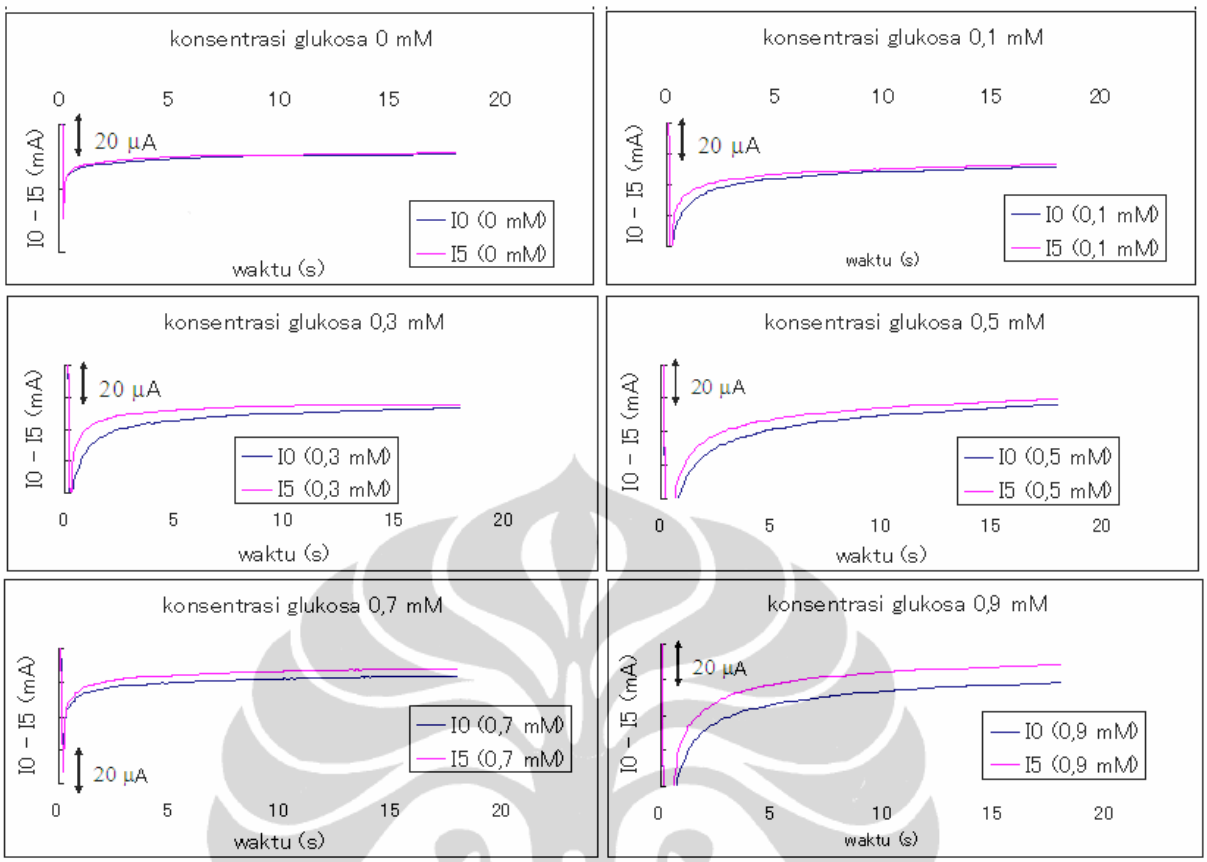
Figure 4.15.: R. mucilaginosa terimobilisasi dalam gelatin di dasar sel elektrokimia

4.4.3. Pengujian respon sensor

Selanjutnya dengan menggunakan waktu pengukuran selama 5 menit dilakukan pengukuran kuat arus I_0dan I_5 untuk konsentrasi glukosa 0,1 mM

sampai dengan 0,9 mM. Gambar 4.16 memperlihatkan hasil pengujian *chrono amperometry (CA)* dengan potensial kerja -554 mV. Selisih kuat arus $I_0 - I_5$ pada berbagai konsentrasi glukosa diringkaskan dalam tabel A.3. Dari data tabel A.3 pada lampiran, dibuat korelasi antara konsentrasi glukosa dengan selisih kuat arus $I_0 - I_5$. Hasilnya memperlihatkan bahwa imobilisasi khamir dengan gelatin hanya bisa digunakan dalam rentang konsentrasi larutan glukosa standar sebesar 0,1 mM sampai dengan 0,7 mM yang setara dengan nilai BOD 10 mg/L sampai dengan 70 mg/L. Dalam kisaran konsentrasi ini korelasi antara selisih kuat arus $I_0 - I_5$ versus konsentrasi glukosa dengan nilai R^2= 0,9978 (gambar 4.17.b). Rentang konsentrasi 0,1 mM sampai dengan 0,9 mM memberikan korelasi yang lebih rendah dengan nilai R^2= 0,8536 (gambar 4.17.a).Korelasi antara selisih kuat arus dengan konsentrasi glukosa pada khamir di imobilisasi pada gelatin linear pada konsentrasi 0,1 mM sampai 0,7 mM glukosa saja dengan nilai R^2=0,98; yang setara dengan nilai BOD dari 10 - 70 mg/L. Bila dibandingkan penelitian lain, *range* deteksi ini lebih rendah. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Velling dihasilkan sensor BOD dengan *range* deteksi 10 - 90 mg/L (Velling, Orupold, & Tenno, 2007) .

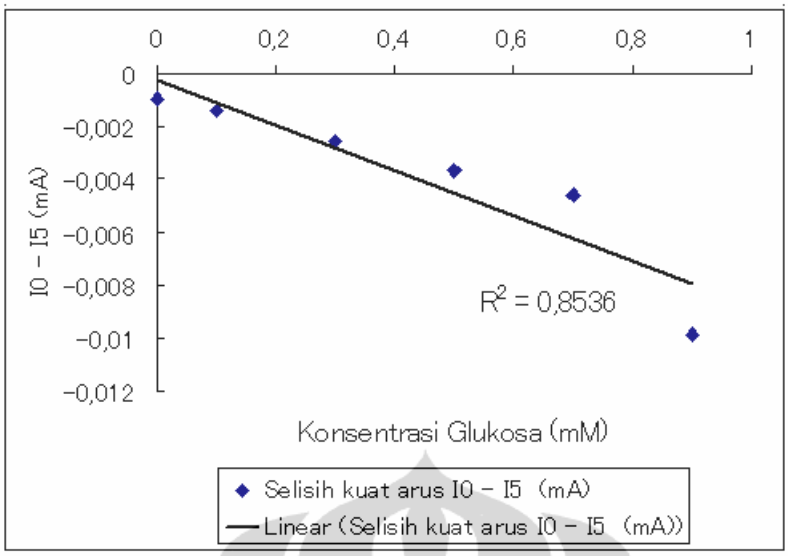
Perbandingan aktifitas antara *free cell*, khamir terabsorpsi dalam kertas saring dan imobilisasi gelatin terlihat dalam gambar 4.18. Secara umum imobilisasi dalam gelatin menghasilkan respon kuat arus yang lebih rendah. Respon *free cell* dan khamir yang terabsorpsi pada kertas saring memiliki korelasi yang tinggi pada rentang konsentrasi 0,1 mM sampai 0,9 mM. Pada rentang konsentrasi 0,1 mM sampai 0,7 mM, khamir yang diimobilisasi dalam gelatin memang menunjukkan korelasi tertinggi, namun dapat dilihat bahwa respon kuat arusnya masih terendah dibanding kedua metode tersebut. Kemungkinan proses imobilisasi menyebabkan aktifitas khamir *Rhodotorula mucilaginosa* menurun. Kondisi khamir yang di absorpsi pada kertas saring memang lebih *fresh* dan tanpa melalui proses penambahan formaldehid, sehingga dapat dilihat pada gambar 4.18 absorpsi khamir dalam kertas saring menghasilkan respon arus dengan korelasi tinggi seperti *free cell*, hanya aktifitasnya lebih rendah. Fenomena ini tidak terlihat pada khamir yang di imobilisasi dalam gelatin.



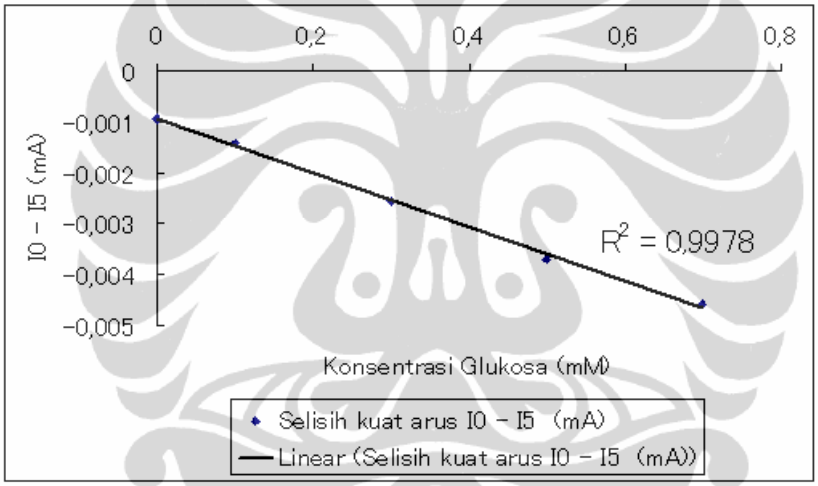
Gambar 4.16.: Amperogram khamir terimobilisasi gelatin pada variasi konsentrasi glukosa

Lebih lanjut Riedel (1998) menyatakan bahwa tujuan imobilisasi adalah agar mikrorganisma dapat digunakan berkali-kali. Untuk mengujinya dilakukan pengukuran berulang sebanyak 4 kali, pada khamir yang di imobilisasi dalam gelatin. Karena pengukuran BOD pada konsentrasi rendah sangat diperlukan untuk mengecek baku mutu air yang dapat dibuang pada badan air kelas I, yaitu sebesar 30 mg/L(Peraturan Pemerintah RI, No.82 , 2001) , maka pengujian pengukuran berulang di fokuskan pada konsentrasi glukosa 0 sampai dengan 0,3 mM yang setara dengan konsentrasi BOD mulai dari 0 sampai 30 mg/L (Miller & Miller, 1993). Dalam penelitian yang dilakukan, konsentrasi glukosa 0 mM menggunakan larutan bufer fosfat pH 7. Prosedur pengukuran dituangkan dalam cara kerja 3.3.5.5.

Amperogram hasil pengukuran empat kali pengulangan dapat dilihat pada gambar 4.21. Hasil pengukuran kuat arus tersebut diringkaskan dalam tabel A.4. yang terdapat dalam halaman lampiran. Pengulangan sebanyak



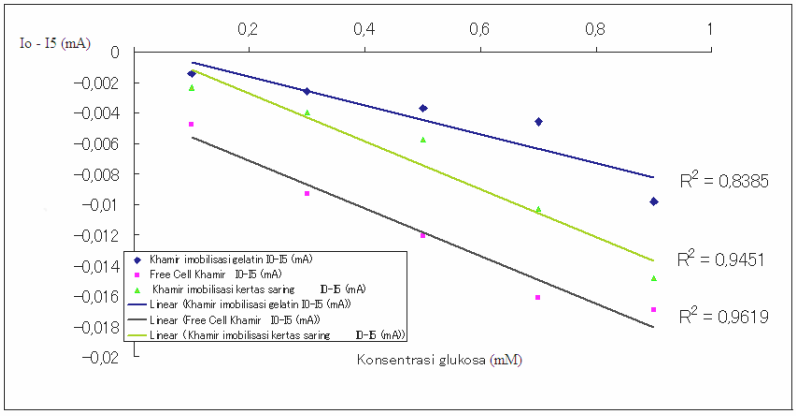
(a) Pada konsentrasi 0,1 mM sd 0,9 mM



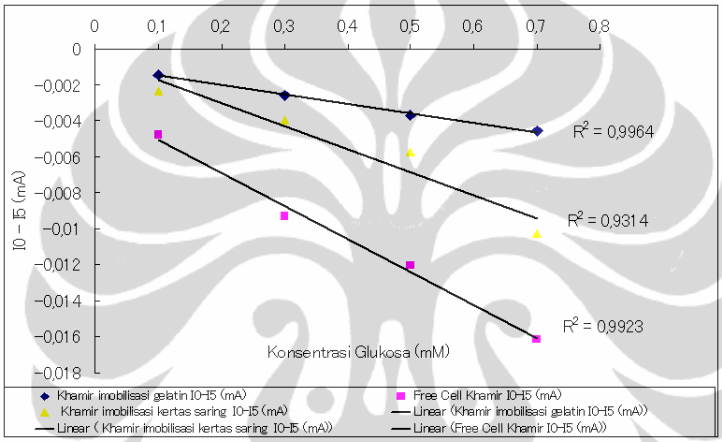
(b) Pada Konsentrasi 0,1 sd 0,7 mM

Gambar 4.17.: Korelasi $\triangle I(mA)$ vs kons. glukosa pada khamir di imobilisasi gelatin

empat kali menghasilkan nilai korelasi yang bervariasi (gambar 4.19). Dari gambar terlihat bahwa pada pengukuran awal, korelasi antara konsentrasi glukosa dengan selisih kuat arus lebih rendah ($R^2 = 0,8$). Walau nilai korelasi meningkat pada pengukuran berikutnya, namun peningkatan tidak konstan dan konsisten dengan respon kuat arus yang makin melemah, ini menandakan khamir yang di imobilisasi dalam gelatin belum memiliki stabilitas kerja yang baik. Stabilitas kerja yang baik diperlukan untuk menghasilkan pengukuran yang dapat dipercaya. Rendahnya hasil pengukuran ulang ini, menyebabkan tidak dilakukannya pengukuran BOD dengan sampel alami yang diambil dari perairan. Ketidak stabilan pengukuran bisa terjadi akibat terlepasnya sel khamir



(a) Korelasi *free cell*, khamir absorpsi kertas saring dan imobilisasi gelatin vs konsentrasi glukosa 0,1 mM sd 0,9 mM

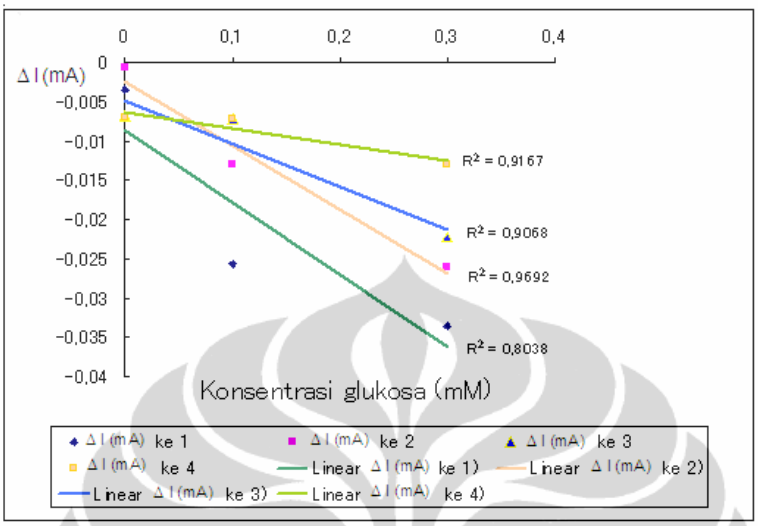


(b) Korelasi *free cell*, khamir absorpsi kertas saring dan imobilisasi gelatin vs Konsentrasi glukosa 0,1 mM sd 0,7 mM

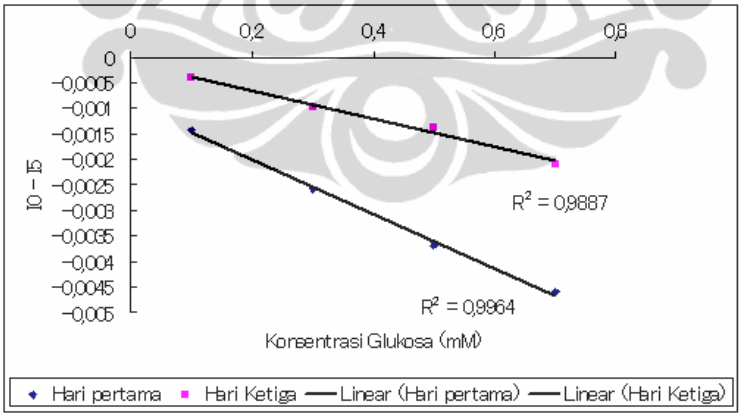
Gambar 4.18.: Perbandingan *free cell*, khamir absorpsi kertas saring dan imobilisasi gelatin

ke dalam sampel selama pengukuran atau selama proses pembilasan, disebabkan karena tidak kuatnya matrik imobilisasi gelatin. Ini menyebabkan jumlah biomassa khamir yang di *upload* berkurang sehingga responnya pun berkurang. Dalam imobilisasi khamir sebagai komponen sensor, faktor penting lainnya yang bisa di evaluasi adalah umur aktifitas dari organisma yang di imobilisasi. Untuk melihat aktifitas khamir terimobilisasi setelah 3 hari, dilakukan kembali pengukuran CA dengan prosedur 3.3.5.3 . Hasil pengukuran diringkaskan dalam tabel A.5 halaman lampiran dan korelasinya dapat dilihat pada gambar 4.20. Terlihat bahwa setelah 3 hari aktifitas khamir yang di imobilisasi dalam gelatin menurun drastis. Setelah 3 hari selisih kuat arus

rata-rata tinggal 37%. Imobilisasi khamir *Rhodotorula* dalam gelatin belum begitu efektif untuk penyimpanan jangka panjang.



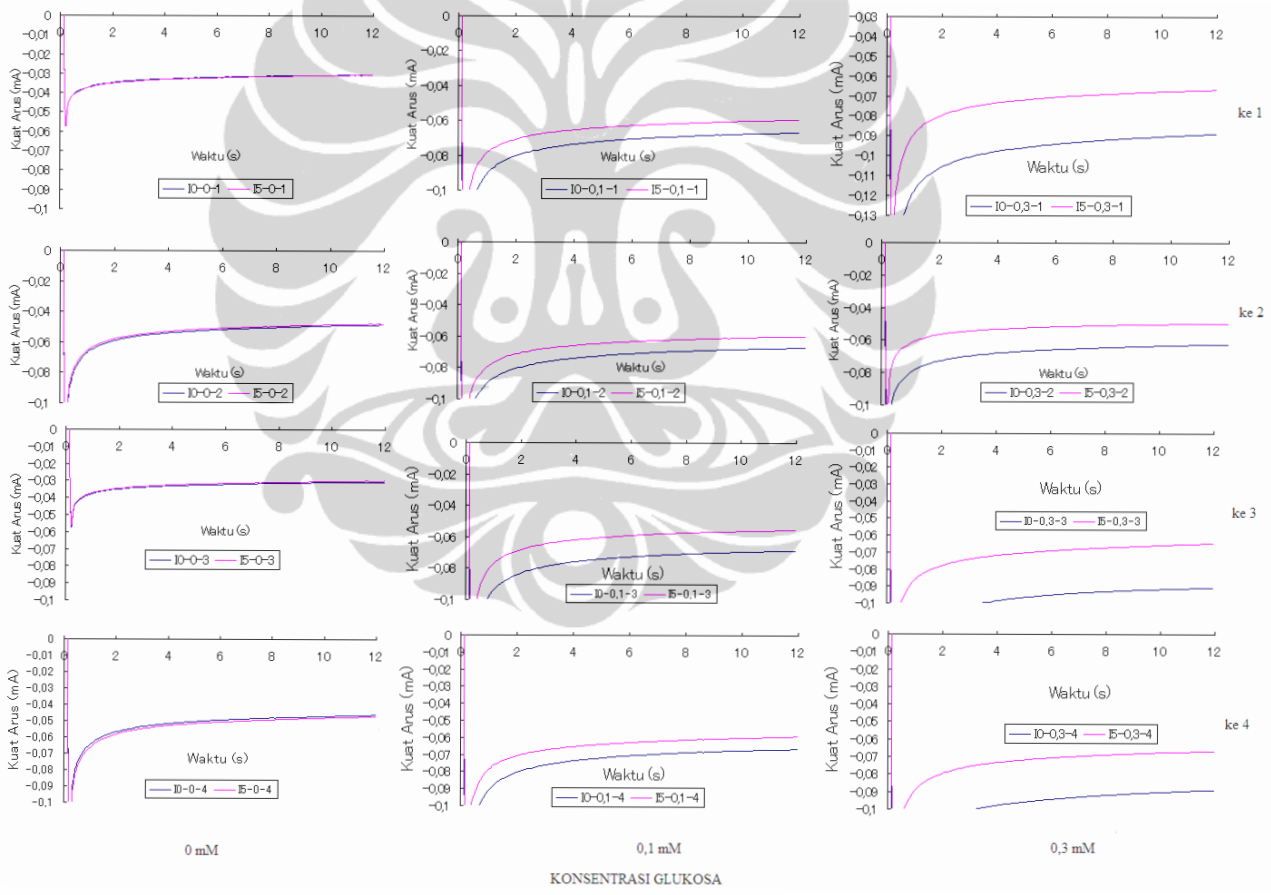
Gambar 4.19.: Pengulangan pengukuran sebanyak 4 kali



Gambar 4.20.: Perbandingan $\triangle I$ (mA) selang 3 hari

Riedel (1998) menyatakan bahwa tujuan imobilisasi adalah untuk meningkatkan stabilitas kerja mikroorganisma dalam sensor, hasil ini menunjukkan imobilisasi dalam gelatin yang dilakukan belum berhasil mencapai hal tersebut. Belum stabilnya imobilisasi dalam gelatin bisa terjadi

karena adanya massa khamir terlepas selama proses pengukuran. Penurunan respon arus menandakan aktifitas mikroba yang terus menurun. Aktifitas mikroba yang menurun dapat terjadi karena proses penyimpanannya. Pada penelitian ini belum dilakukan upaya untuk mempertahankan aktifitas khamir selama proses penyimpanan. Tetapi tidak tertutup kemungkinan bahwa khamir yang digunakan mengalami penurunan aktifitas dalam penyimpanan jangka panjang. Penelitian yang dilakukan oleh Ciuciu yang menggunakan khamir *Rhodotorula sp.* sebagai biosensing element untuk mendeteksi fenol dengan elektroda oksigen, menyebutkan bahwa aktifitas khamir tersebut menurun 90% setelah 12 hari (Kress-Rogers, 1997).



Gambar 4.21.: Amperogram pengulangan 4 kali

BAB 5
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa khamir *Rhodotorula mucilaginosa* dapat digunakan sebagai *biosensing element* pada sensor BOD yang menggunakan transduser sensor oksigen yang terbuat dari elektroda emas dengan waktu pengukuran selama 5 menit. Pengukuran dengan menggunakan sel elektrokimia yang dibuat mendapatkan bahwa:

1. Uji respon kuat arus untuk khamir *Rhodotorula mucilaginosa* dalam bentuk free cell menghasilkan respon kuat arus vs konsentrasi glukosa dengan nilai $R^2 = 0,96$. Selisih kuat arus ($\triangle I$) untuk konsentrasi glukosa terendah 0,1 mM sebesar 4,77 μA, sedangkan untuk konsentrasi 0,9 mM sebesar =16,9 μA.
2. Khamir *Rhodotorula mucilaginosa* yang diabsorpsi pada kertas saring menghasilkan respon kuat arus vs konsentrasi glukosa dengan nilai $R^2 = 0,945$. Selisih kuat arus ($\triangle I$) untuk konsentrasi glukosa terendah 0,1 mM sebesar 2,33 μA, sedangkan untuk konsentrasi 0,9 mM sebesar =14,8 μA. Khamir yang diabsorpsi di kertas saring lebih rendah respon arusnya dibandingkan *free cell* dan korelasinya pun lebih rendah.
3. Proses imobilisasi yang dilakukan belum dapat mempertahankan viabilitas sel khamir. Hal ini dapat terlihat dari respon kuat arus *Rhodotorula mucilaginosa* yang di imobilisasi dalam gelatin menghasilkan respon kuat arus paling rendah dibandingkan dengan *free cell* dan khamir yang diabsorpsi di kertas saring. Selisih kuat arus ($\triangle I$) untuk konsentrasi glukosa terendah 0,1 mM hanya sebesar 1,4 μA, sedangkan untuk konsentrasi tertinggi 0,7 mM sebesar =4,5 μA. Namun korelasi respon kuat arus vs konsentrasi glukosa lebih tinggi dibandingkan dua metode lainnya, yaitu dengan nilai $R^2 = 0,98$.
4. Hasil pengukuran nilai BOD menggunakan sel elektrokimia dengan khamir *Rhodotorula mucilaginosa* yang di imobilisasi di dasar, belum menghasilkan respon kuat arus yang stabil. Terlihat dari hasil pengukuran ulang sebanyak empat kali pada khamir yang di imobilisasi gelatin

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

menghasilkan nilai R^2 yang bervariasi, dan respon arus lebih rendah pada pengulangan pengukuran.

5. Aktifitas khamir yang di imobilisasi dalam gelatin mengalami penurunan setelah disimpan selama 3 hari. Setelah tiga hari respon kuat arus berkurang hingga 37% dibanding semula.

5.2. Saran

1. Perlu dikembangkan teknik imobilisasi terhadap khamir *Rhodotorula mucilaginosa UICC Y-181* dan khamir lokal lainnya untuk keperluan sensor berbasis mikroba.
2. Perlu dilakukan penelitian intensif terhadap elektroda oksigen agar didapatkan sensor oksigen yang lebih sensitif yang berguna bagi pembuatan sensor BOD dengan keakuratan tinggi.

DAFTAR ACUAN

Akyilmaz, E., & Dinčkaya, E. (2005). An amperometric microbial biosensor development based on candida tropicalis yeast cells for sensitives determination of ethanol. *Biosensors and Bioelectronics*, *20*, 1263–1269. 14, 43

Alteriis, E. de, Parascandola, P., Pecorella, M. A., & Scardi, V. (1987). Entrapment of microbial cells within a gelatin matrix: A comparison of three procedures. *Biotechnology Techniques*, *1*, 109–114. Received March 3. 16, 43

American Public Health Association . (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, D.C.: American Public Health Association. 4

Arikawa, Y., Ikebukuro, K., & Karube, I. (1998). Microbial biosensors based on respiratory inhibition. In A. Mulchandani & K. R. Rogers (Eds.), *Enzyme and microbial biosensors: techniques and protocols.* Humana Press. 36, 37

Bard, A., & Faulkner, L. (2001). *Electrochemical methods: fundamentals and applications* (2nd ed.). John Wiley and Sons Inc. 12

Cappuccino, J., & Sherman, N. (2002). *Microbiology:A laboratory manual* (6th ed.). San Fransisico: Pearson Education. 35

Chan, C., Lehmann, M., Chan, K., Chan, P., Chan, C., Gruendig, B., et al. (2000). Designing an amperometric thick-film microbial BOD sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *15*, 343–353. Received 30 July 1999. 11, 17, 24, 35

Cheetham, P. (1979). Physical studies on the mechanical stability of columns of calcium alginate gel pellets containing entrapped microbial cells. *Enzyme Microbiol Technol*, *1*, 183–188. 16

Damjanovic, A. (1969). The kinetics of the mechanism of the oxygen reduction. In J. O. Bockris & B. Conway (Eds.), *Modern aspect of electrochemistry* (Vol. 5, p. 369). New York: Plenum Press. 32

Delzer, G., & McKenzie, S. (1999). Subchapter 7.2. five-day biochemical oxygen demand. In D. Myers & F. Wilde (Eds.), *Book 9. handbooks for water-resources investigations* (p. Variously paged). New York: U.S.

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

Geological Survey. 3, 4

Dupont. (n.d.). Dupont fuel cell. Retrieved 18 januari 2010, jam 19.00 WIB, from http://www2.dupont.com/FuelCells/en_US/ 30

Eggenstein, C., Borchardt, M., Diekmann, C., Grdig, B., Dumschat, C., Cammann, K., et al. (1999). A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer. *Biosensors and Bioelectronics*, *14*(1), 33 - 41. 40

Eggins, B. R. (2007). *Chemical sensors and biosensors*. Chichester, England: John Wiley and Sons. 5, 11

Gianfreda, L., Parascandola, P., & Scardi, V. (1980). A new method of whole microbial cell immobilization. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *11*, 6–7. 16

Hammer, M. J. (1975). *Water an waste-water technology*. John Wiley and Sons. 5

Karube, I., Matsunaga, T., & Suzuki, S. (1977). Microbial electrode BOD sensor. *Biotechnol. Bioeng.*, *19*, 1535–1547. 7

Karube, I., Yano, K., Yoshida, N., & Morita, T. (1997). Microbial electrode and microbial sensor. *European Patent Application EP0811838*. Filling date 21 February 1996. Available from http://www.freepatentsonline.com/EP0811838.html 14

Kress-Rogers, E. (1997). *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and the environment*. CRC Press. Available from http://books.google.com/books?id=A-qQ-NZAeaYC 7, 51

K.Riedel. (1990). A microbial sensor for BOD. *Water Research*, *24*(7), 883 - 887. 35

Licker, M. D. (2003). *Dictionary of chemistry*. McGraw-Hill Companies. 29

Miller, J., & Miller, J. (1993). *Statistics for analytical chemistry* (3rd ed.). West Sussex: Ellis Horwood. 2, 37

Mumtahinah, N. (2007). *Potensi biomassa khamir rhodotorula mucilaginosa (Jorgensen) F.C. Horrison UICC Y-235 sebagai elemen biologi pada biosensor logam berat cuprum (II)*. Tesis Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok. 18, 24

Muscat, A., Prube, U., & Vorlop, K. (1996). Stable support materials for the immobilization of viable cells. In R. Wijffel, R. Buitelaar, C. Bucke, & J. Tramper (Eds.), *Immobilized cells: Basics and applications* (pp. 55–61).

Elsevier Science B.V. 15

National Academy of Engineering. (n.d.). Clark oxygen electrode, presursor to today's modern biosensors. Retrieved 17 januari 2010, jam 19.00 WIB, from http://www.nae.edu/cms/9078.aspx 10

National Center for Biotechnology Information (NCBI) . (n.d.). Taxonomy browser. Retrieved 10 oktober 2010, jam 20.00 WIB, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser 15

Nemerow, N. (1974). *Scientific stream pollution analysis*. New York: McGraw-Hill. 3

Nishida, Y., Sato, T., Tosa, T., & Chibata, I. (1979). Immobilization of escherichia coli cells having aspartase activity with carrageenan and locust bean gum. *Enzyme Microbiol Technol*, *1*, 95–99. 16

Parascandola, P., Scardi, V., & Alteriis, E. de. (1990). Immobilizatio of viable yeast cells within polyaldehyde-hardened gelatin gel. *Biotechnology Techniques*, *4*, 237–242. Received 15th March. 43

Peraturan Pemerintah RI, No.82 . (2001). *Pengelolaan kualitas air dan pengendalian pencemaran air*. 5, 47

Reshetilov, A. N., Iliasov, P. V., Donova, M. V., Dovbnya, D. V., Boronin, A. M., Leathers, T. D., et al. (1997). Evaluation of a gluconobacter oxydans whole cell biosensor for amperometric detection of xylose. *Biosensors and Bioelectronics*, *12*(3), 241 - 247. 40

Rianasari, S. (2004). *Penapisan kemampuan biosorpsi Cr,Cu,Hg, dan Pb oleh strain-strain khamir toleran logam berat dari perairan teluk Jakarta, Jakarta utara*. Skripsi S1 Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok. 15, 43

Riedel, K. (1998). Microbial biosensors based on oxygen electrodes. In A. Mulchandani & K. R. Rogers (Eds.), *Enzyme and microbial biosensors: techniques and protocols.* Humana Press. 7, 8, 25, 37, 42

R.Riley, M., Muzzio, F. J., M.Buettner, H., & C.Reyes, S. (1995). A simple correlation for predicting effective diffusivities in immobilized cell systems. *Biotech. And Bioeng.*, *49*, 223–227. 16

Sawyer, C., & McCarty, P. (1978). *Chemistry for environmental engineering*. New York: McGraw-Hill. 3

Sawyer, C. N., McCarty, P. L., & Parkin, G. F. (2003). *Chemistry for environmental engineering and science* (5th ed.). New York: McGraw-Hill. 5

Sohn, B., & Kim, C. (1996). A new pH-ISFET based dissolved oxygen sensor by employing electrolysis of oxygen. *Sensors and Actuators*, *B 34*, 435–550. 13, 31

Tchobanoglous, G., & Schroeder, E. (1985). *Water quality:characteristics, modeling, modification*. Menlo Park, California: Addison-Wesley Publishing Company. 3

Urgeghe, C. (2006). *Oxygen evolution and oxygen reduction in electrochemical energy conversion*. Unpublished doctoral dissertation, Universitá degli Studi di Ferrara, Ferra, Italia. 32

Velling, S., Orupold, K., & Tenno, T. (2007). BOD sensor for wastewater analysis: Design and calibration methods. *Kalmar ECO-TECH '07 and The Second Baltic Symposium on Environmental Chemistry*. KALMAR, SWEDEN, November 26-28, 2007. 46

Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation , maintenance and identification of yeast. In C. Kurtzman & J. Fell (Eds.), *The yeasts:A taxonomic study* (4th ed., pp. 77–100). Amsterdam: Elsevier B.V. 15, 22

Yu, J. (2008). *Development of microfabricated electrochemical sensors for environmental parameter measurements applicable to corrosion evaluation and gaseous oxygen detection.* Unpublished doctoral dissertation, Case Western Reserve University. Available from http://etd.ohiolink.edu (UMI No. 3301446) 12, 13, 21

LAMPIRAN A
LAMPIRAN TABEL

Tabel A.1.: Korelasi waktu aerasi dengan kuat arus

Waktu Aerasi	E = -394 mV	E = -404 mV	E = -414 mV	E = -424 mV	E = -434 mV	E = -444 mV	E = -454 mV
0	-0,008056641	-0,008555094	-0,009016249	-0,009443495	-0,009830051	-0,010169135	-0,010464138
30	-0,009863959	-0,010494656	-0,011086358	-0,011620416	-0,012090047	-0,012495253	-0,012824164
60	-0,011003282	-0,011711968	-0,01236301	-0,012949626	-0,013441298	-0,013858371	-0,014183892
90	-0,011723836	-0,01252577	-0,013261583	-0,013907539	-0,014475505	-0,014960395	-0,015345256
120	-0,012623836	-0,01342577	-0,014161583	-0,014807539	-0,015375505	-0,015860395	-0,016245256
Korelasi (R^2)	-0,982679733	-0,982229157	-0,981510187	-0,980682304	-0,980716794	-0,980848136	-0,981376996

Waktu Aerasi	E = -464 mV	E = -474 mV	E = -484 mV	E = -494 mV	E = -504 mV	E = -514 mV	E = -524 mV
0	-0,010721842	-0,010969374	-0,011186388	-0,011386447	-0,01159668	-0,011789958	-0,011996799
30	-0,013093736	-0,013309055	-0,013487074	-0,013637967	-0,013770209	-0,013890584	-0,014041477
60	-0,014434814	-0,014614529	-0,014770508	-0,014892578	-0,014994303	-0,015082465	-0,015218099
90	-0,015638563	-0,015886095	-0,016059028	-0,016206529	-0,016333686	-0,016455756	-0,016557482
120	-0,016538563	-0,016786095	-0,016959028	-0,017106529	-0,017233686	-0,017355756	-0,017457482
Korelasi (R^2)	-0,981922288	-0,983677917	-0,984638833	-0,985868467	-0,987548919	-0,989134104	-0,989654035

Waktu Aerasi	E = -534 mV	E = -544 mV	E = -554 mV	E = -564 mV	E = -574 mV	E = -584 mV	E = -594 mV
0	-0,01220025	-0,012417263	-0,012641059	-0,012864855	-0,013098823	-0,013336182	-0,013512505
30	-0,014194065	-0,014366998	-0,014556885	-0,014768812	-0,014997694	-0,015248617	-0,015528361
60	-0,015360514	-0,015519884	-0,015702989	-0,01590644	-0,016130235	-0,016381158	-0,016659207
90	-0,016674466	-0,016808404	-0,016991509	-0,017152574	-0,017384847	-0,017584907	-0,017718845
120	-0,017574466	-0,017708404	-0,017891509	-0,018052574	-0,018284847	-0,018484907	-0,018618845
Korelasi (R^2)	-0,990200244	-0,990627881	-0,991176891	-0,990893475	-0,991064892	-0,990222011	-0,985903529

Tabel A.2.: Kuat arus pada variasi konsentrasi O_2 terlarut

Konsentrasi Oksigen (ppm)	Kuat Arus (mA)
1,1	-0,004445394
2,4	-0,004730225
3,4	-0,004859077
4,9	-0,005215115
5,5	-0,005603366

Studi pengembangan..., Netra Dewangga, FMIPA UI, 2010.

Tabel A.3.: Selisih $I_0 - I_5$ di berbagai konsentrasi glukosa pada khamir imobilisasi gelatin

Konsentrasi glukosa (mM)	Selisih kuat arus I0 – I5 (mA)
0	−0,000952827
0,1	−0,001427544
0,3	−0,00257704
0,5	−0,0036960 18
0,7	−0,004577637
0,9	−0,009833442

Tabel A.4.: $\triangle I$(mA) pada 4 kali pengulangan pengukuran

Konsentrasi glukosa (mM)	ΔI(mA) ke 1	ΔI(mA) ke 2	ΔI(mA) ke 3	ΔI(mA) ke 4
0	-0,003390842	-0,000678168	-0,006849501	-0,006951226
0,1	-0,025702582	-0,01308865	-0,007256402	-0,007222493
0,3	-0,033603244	-0,026109484	-0,022243924	-0,012851291

Tabel A.5.: Pengukuran selang 3 hari

Glukosa (mM)	Hari pertama (I0 – I5) dalam mA	Hari Ketiga (I0 – I5) dalam mA	% hari ke 3/hari ke 1
0,1	−0,001427544	−0,000403754	28%
0,3	−0,00257704	−0,00096625	37%
0,5	−0,0036960 18	−0,001372501	37%
0,7	−0,004577637	−0,002091252	46%
		Rata−rata	37%