

Penggunaan Khamir *Rhodotorula mucilaginosa* untuk Biosensor BOD Menggunakan Elektroda Emas

Rame

BBTPPI Semarang, Jl Ki Mangunsarkoro No. 6 Semarang
rame@kemenperin.go.id

Abstrak

Biosensor BOD berdasarkan metabolisme khamir dikembangkan dalam rangka mempersingkat waktu pengukuran nilai BOD untuk monitoring lingkungan. Pengembangan biosensor dibuat melalui imobilisasi khamir pada film tipis dalam matrik *agarose* dengan *Nafion* sebagai membran untuk proses pertukaran ion. Khamir diambil dari fermentasi *Rhodotorula mucilaginosa*. Film tipis kemudian dilekatkan pada emas sebagai elektroda kerja. Biosensor BOD dikalibrasi menggunakan larutan yang mengandung glukosa yang setara sebagai sampel standar. Kondisi optimum diamati dengan waktu tunggu pengukuran 20 menit pada potensial 500 mV (vs Ag/AgCl). Untuk analisis glukosa, waktu tunggu adalah 20 menit dengan batas deteksi 1 mg/l. Hubungan linier yang baik diperoleh dari larutan standar glukosa yaitu, R^2 0.99. Nilai BOD yang diperoleh dari biosensor menunjukkan perbandingan yang baik dengan konvensional.

Kata kunci: biosensor BOD, *Rhodotorula mucilaginosa*, elektroda emas, lingkungan.

Abstract

A BOD biosensor based on khamir metabolism was developed in order to shorten the measurement time of BOD value for environmental monitoring. The developed biosensor was fabricated by immobilizing khamir on a thin film in agarose matrix with Nafion® acting as the membrane for ion exchange process. The khamir was harvested from the fermentation *Rhodotorula mucilaginosa*. The film was then attached to gold as the working electrodes. The BOD biosensor was calibrated by using a solution containing the equivalent amount of glucose a standard sample solution. Optimum condition was observed in a waiting measurement time of 20 min at an applied potential of 500 mV (vs. Ag/AgCl). For analysis of glucose, the response time was observed 20 minutes with detection limit 1 mg/l. Good linear range with oxygen standard solution was observed, R^2 0.99. The observed BOD value by biosensor showed a good comparison with the conventional.

Keywords: BOD biosensor, *Rhodotorula mucilaginosa*, gold electrode, environmental.

PENDAHULUAN

Kontrol kualitas air sangat diperlukan, baik sebagai parameter kelayakan untuk dikonsumsi, maupun digunakan untuk keperluan aktifitas manusia lainnya. Sumber daya air di lingkungan dalam bentuk aliran sungai, danau, air terjun dan reservoir air lainnya, selayaknya dimonitoring kualitasnya secara periodik, sehingga dapat diketahui karakteristik polutan, sumbernya serta penanganannya. Sumber polutan dapat berasal dari proses alamiah atau merupakan konsekuensi dari perilaku manusia (*antropogenic*). Salah satu sumber utama limbah cair sebagai material polutan adalah kegiatan industri. Limbah cair mempunyai sifat mudah tersebar pada media lingkungan air, baik pada air permukaan atau air tanah sehingga sangat berbahaya bagi keberlangsungan suatu ekosistem, jika tidak dilakukan usaha pencegahan dan pengolahan (Cossu, Lai et al. 2012).

Salah satu parameter kualitas air adalah *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) yang menyatakan kebutuhan oksigen oleh mikroorganisme dalam penguraian zat organik. Hasil uji BOD merepresentasikan kandungan polutan organik yang terdapat dalam air (Raud, Tenno et al. 2012). Berbagai sumber polutan menyebabkan menurunnya kualitas air. Polutan mempunyai efek mengganggu atau merusak kualitas suatu lingkungan. BOD menjadi salah satu parameter penting untuk monitoring tingkat pencemaran air. Pada metode BOD konvensional dibutuhkan waktu selama 5 hari pada 20°C, sehingga disebut BOD₅. Hasil uji BOD₅ merupakan representasi sebagian dari total BOD (Raud, Tenno et al. 2012). Untuk proses oksidasi biokimiawi sempurna zat-zat organik dalam sampel air menurut konvensi dibutuhkan waktu selama 20 hari. Hal tersebut tentu tidak praktis untuk kebutuhan lapangan, sehingga yang banyak digunakan adalah tes BOD₅. Hasil uji BOD₅ merupakan estimasi kebutuhan oksigen alami, karena lingkungan laboratorium tidak dapat mereproduksi kondisi alami sebenarnya seperti suhu, sinar matahari, populasi biologis dan pergerakan air (Cossu, Lai et al. 2012).

BOD bisa digunakan sebagai indikator kualitas air pada kegiatan monitoring lingkungan. Namun beberapa masalah muncul dari pengujian BOD sesuai standard SNI 6989-72-2009 tentang cara uji kebutuhan oksigen biokimia (BOD) di Indonesia yaitu, (1) Pengujian laboratorium yang memerlukan alat, bahan, dan skill operator. (2) Waktu pengujian relatif lama yaitu 5 hari. (3) Hasil pengulangan untuk sampel yang sama (*repeatability*) relatif rendah. (4) Bias pengukuran dari penanganan sampel atau terjadi degradasi sampel.

Di sisi lain, kenaikan permintaan monitoring dan pengujian dari kalangan industri maupun Instansi lingkungan hidup mengakibatkan makin meningkatnya jumlah layanan pengujian BOD yang harus dilakukan. Beberapa kondisi darurat juga memerlukan hasil analisa BOD harus keluar dalam interval waktu relatif cepat. Misal pengujian yang dilakukan di sistem distribusi air konsumsi, produksi, maupun lingkungan sekitar. Sehingga tindakan preventif terkini sebagai reaksi terhadap masalah operasional sebelum berdampak pada konsumen dan untuk mengurangi biaya operasional harus secepatnya dilakukan. Pentingnya mengetahui kondisi terkini suatu proses industri sudah

menjadi suatu keharusan, dalam rangka menciptakan proses yang efisien, hemat energi, dan sedikit polusi.

Pengukuran BOD dapat dilakukan dengan lebih cepat menggunakan bantuan sensor. Sensor mikroba sudah lazim digunakan di negara-negara maju. Keunggulan sensor mikroba adalah waktu pengukuran yang lebih singkat dan hasil yang tidak jauh berbeda dengan metode konvensional (Raud, Tenno et al. 2012). Mikroorganisme yang sudah dimanfaatkan untuk pengukuran BOD antara lain *Clostridium butyricum* (Karube, Matsunaga et al. 2009), *Arxula adenivorans* (Chan, Lehmann et al. 2000), *Bacillus polymyxa D-21* (Su, Huang et al. 1986), *Photobacterium phosphoreum* (Hyun, Tamiya et al. 1993), *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis 7B* (Li, Tan et al. 1994), yeast (SPT1 dan SPT2) (Trosok, Driscoll et al. 2001), *Trichosporon cutaneum* (Suriyawattanakul, Surareungchai et al. 2002), *Escherichia coli* (Sakaguchi, Kitagawa et al. 2003), *Saccharomyces cerevisiae* (Nakamura, Suzuki et al. 2007), *Vibrio fischeri* (Cheng, Kuo et al. 2010), *Candida maltosa VKM Y-2359*, *Candida blankii VKM Y-2675*, dan *Debaryomyces hansenii VKM Y-2482* (Arlyapov, Kamanin et al. 2012), *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens* (Raud, Tenno et al. 2012).

Sensor BOD secara elektrokimia merupakan metode yang menjanjikan karena waktu pengukuran lebih singkat. Selain itu metode elektrokimia mempunyai beberapa keuntungan yang relatif lebih unggul dibanding metode lain, yaitu kompatibilitas secara lingkungan, versatilitas, efisiensi energi, aman, selektivitas, otomatisasi, dan efektivitas harga. Material elektroda merupakan kunci utama keberhasilan sensor. Material ini harus mempunyai sifat: (1) stabil secara kimia atau fisika, (2) kapasitas oksidasinya besar, (3) konduktif, (4) overpotensial oksigen tinggi untuk sistem dalam air. Jenis material yang mempunyai sifat di atas adalah platina (Pt), emas (Au), dan karbon yang sangat sesuai untuk sensor. Elektroda kerja yang telah digunakan untuk pengukuran BOD adalah platina (Karube, Matsunaga et al. 2009), MnO₂ (Wu, Liu et al. 2009), *graphite* (Oota, Hatae et al. 2010), serta *glassy carbon* (Liu, Zhang et al. 2012).

Elektroda emas akan dikembangkan sebagai sensor oksigen untuk pengukuran BOD menggunakan khamir lokal *Rhodotorula mucilaginosa* sebagai biosensor. Imobilisasi khamir akan dilakukan dengan media *agarose*. Dengan sistem tersebut diharapkan dapat dihasilkan sensor BOD menggunakan bahan baku lokal dengan akurasi dan presisi yang tinggi, ekonomis, cepat, mudah dioperasikan, dan tahan terhadap kondisi ekstrim.

METODE

A. Bahan yang digunakan

Bahan penelitian yang digunakan:

1. Mikroorganisme yang digunakan: *Rhodotorula mucilaginosa*.
2. Bahan medium terdiri dari medium pembiakan menggunakan *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 extract*, pepton, glukosa.
3. Bahan kimia terdiri dari: kawat Pt, kawat Ag/AgCl, lempeng Au, KH_2PO_4 [Merck], K_2HPO_4 [Merck], *agarose* [Merck], glukosa [Merck], 1- propanol, akuademin, membran nafion, gas nitrogen, gas oksigen, KCl dan aquades.

B. Alat yang Digunakan

Alat penelitian yang digunakan:

1. Peralatan laboratorium seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, botol timbang, batang pengaduk, kaca preparat, labu ukur, pipet tetes, pipet ukur, beaker glass, spatula, *crusible* tong, dan jarum ose.
2. Peralatan pendukung terdiri dari: autoklaf, inkubator, *shaker*, oven, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, *power supply* DC, sonikator, pH meter
3. Peralatan analisis terdiri dari: Spektrofotometer UV-Vis.
4. Peralatan uji kinerja sensor BOD: Potensiostat dengan Ag/AgCl sebagai elektroda standar, Lutron DO meter (DO-5509), reaktor sel elektrokimia, pompa paristaltik, flow meter.

C. Prosedur Kerja

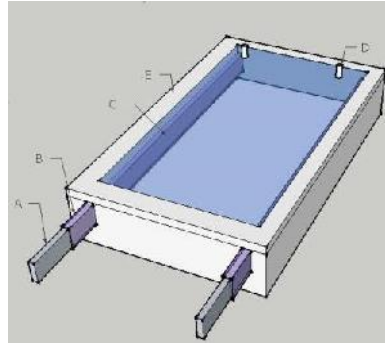
Pembuatan biomassa khamir

1. *Yeast Malt Agar* (YMA). Medium YMA dibuat sebanyak 250 mL. 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 °C dan tekanan 2 atm.
2. *Yeast Peptone Glucose Broth* (YPGB). 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 °C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

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.
4. Pembuatan larutan standar glukosa. Larutan standar glukosa dibuat dari larutan glukosa yang divariasikan konsentrasinya 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM; dan 0,5 mM dari larutan stok glukosa (1 mM glukosa setara dengan nilai BOD sebesar 100 mg/mL).
5. Khamir *Rhodotorula mucilaginosa*. Dari *stock culture* dibuat biakan *working culture* dalam medium YMA yang disimpan pada suhu ruang dan diremajakan setiap bulan. Untuk memperoleh sel khamir pada fase logaritmik, strain khamir yang berasal dari *working culture* dipindahkan secara aseptik dengan jarum ose kedalam medium YMA miring, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam. Biakan khamir berumur 24 jam digunakan untuk 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 inkubator dengan kecepatan agitasi 120 rpm selama 24 jam pada suhu 30 °C. Kemudian disentrifugasi selama 10 menit untuk memisahkan biomassa dari medium. Biomassa yang diperoleh dicuci dengan akuades dan disentrifugasi. Biomassa disimpan dalam larutan bufer fosfat dan digunakan untuk prosedur imobilisasi. Sisa biomassa disimpan pada suhu 5 °C untuk digunakan pada percobaan pengulangan.
6. Penentuan kurva pertumbuhan. Dalam penentuan kurva pertumbuhan dilakukan fermentasi dengan menyiapkan sejumlah erlenmeyer berisi 25 mL sesuai dengan waktu pengamatan yaitu 6, 12, 18, 24, 30, dan 36 jam. Masing-masing erlenmeyer berisi 15 mL media fermentasi cair YPGB dan 1 mL suspensi sel. Fermentasi dilakukan pada suhu 30°C selama 2 hari dengan kecepatan 100 rpm. Setiap 6 jam, jumlah sel diamati dengan melihat kekeruhan medium fermentasi menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.

Elektroda kerja biosensor BOD

Rancangan sel yang dibuat adalah seperti pada Gambar 1. Sel terbuat dari fiber dan memiliki tutup. Biomembran diletakkan pada elektroda kerja. Elektroda kerja yang digunakan adalah tipe Clark dan diletakkan pada salah satu dinding. Sebagai elektroda pendukung digunakan Pt dan diletakkan pada dinding sel yang berseberangan dengan elektroda kerja Au. Sebagai elektroda pembanding digunakan kawat Ag yang dioksidasi dalam larutan HCl.



Gambar 1. Skema biosensor: A. elektroda kerja, B. membran semipermeabel, C. elektrolit, D. sampel inlet, E. badan sel

Pembersihan secara mekanik dilakukan dengan mengamplas salah satu sisi permukaan dengan Alpha-alumina 0,5 mikrometer sampai permukaannya mengkilap seperti kaca. Setelah itu elektroda disonikasi dalam 1-propanol dan akuademin masing-masing selama 10 menit. Selanjutnya elektroda dikeringkan.

Larutan bufer fosfat pH 7 dimasukkan kedalam model sel elektrokimia yang akan diuji. Bufer fosfat kemudian di purging dengan gas nitrogen selama 1 menit untuk mengusir gas oksigen. Setelah itu dilakukan pengukuran *cyclic voltametry* (CV) dengan potensial antara - 1000 mV sampai +1000 mV dengan *scan rate* 100 mV/s. Kemudian dilakukan peningkatan konsentrasi oksigen terlarut dalam larutan buffer fosfat, dengan cara di aerasi selama 10 detik dan diikuti dengan pengukuran CV dalam rentang potensial yang sama. Aerasi dilakukan kembali dengan interval tiap 10 detik.

Uji korelasi kuat arus 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 1 menit untuk mengusir gas oksigen. Setelah itu dilakukan pengukuran *chrono amperometric* (CA) dengan potensial kerja di set -500 mV. Larutan bufer fosfat dalam sel elektrokimia diukur konsentrasi oksigen terlarutnya menggunakan Lutron DO meter. Langkah selanjutnya adalah aerasi larutan bufer fosfat selama 10 detik, dan diukur kembali CA -nya dalam potensial kerja yang sama diikuti pengukuran oksigen terlarut. Aerasi dilanjutkan dengan penambahan waktu 10 detik kembali, dan diukur kembali CA dan oksigen terlarut. Perlakuan diulang sehingga seri akumulasi aerasi menjadi 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 detik.

Pengukuran kurva kalibrasi linier. Lapisan imobilisasi *Rhodotorula mucilaginosa* pada media *agarose* dilekatkan pada permukaan elektroda kerja. Di dalam sel elektrokimia diisi 10 mL larutan glukosa. Larutan glukosa divariasikan konsentrasinya 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM; dan 0,5 mM. Larutan tersebut dijenuhkan oleh oksigen dengan mengalirkan 2 menit gas nitrogen dan 5 menit gas oksigen. Sistem elektrokimia diukur dengan menggunakan teknik MPA pada potensial 500 mV terhadap Ag/AgCl dengan waktu 20 menit.

Penentuan waktu optimum pengukuran BOD

Elektroda emas diaplikasikan untuk sensor BOD dengan mendeteksi waktu optimum nilai BOD. Tahap ini dilakukan dengan menggunakan teknik *Multi Pulse Amperometry* (MPA) dengan memvariasikan waktu pengukuran selama 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit dan 25 menit, dengan potensial 500 mV terhadap Ag/AgCl.

Pengukuran repeatability

Biosensor di uji dalam larutan glukosa 0,5 mM dalam buffer fosfat pH 7 tanpa dengan menggunakan lapisan imobilisasi *Rhodotorula mucilaginosa* pada media *agarose* sebanyak lima belas kali dengan teknik *cyclic voltametry* pada kisaran potensial -1000 mV sampai 1000 mV dengan *scan rate* optimum 100 mV/s.

Pengujian kesetaraan pengukuran BOD konvensional

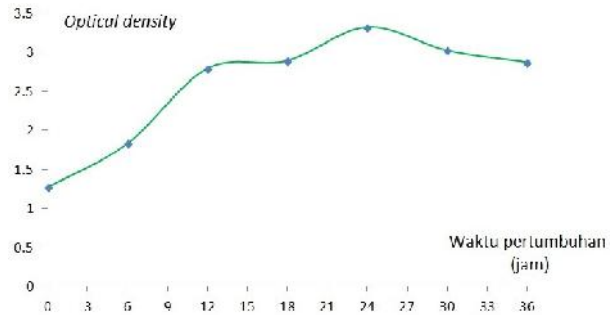
Pengujian perbandingan pengukuran nilai BOD konvensional dengan metode biosensor, dilakukan dengan menguji sampel dengan cara uji analisis BOD (dilakukan di laboratorium) dan dengan sensor kimia, menggunakan teknik *Multi Pulse Amperometry* pada potensial 500 mV dengan waktu optimum 20 menit dengan tiga contoh sampel, yaitu sampel glukosa dengan nilai BOD 25, 50, dan 75.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan biomassa khamir

Rhodotorula mucilaginosa banyak digunakan untuk sensor karena sifatnya yang tahan terhadap kondisi ekstrim, seperti sampel dengan kadar Cu tinggi (Irazusta, Estevez et al. 2012), *nitrobenzene* (Zheng, Zhou et al. 2009), inulin (Zhao, Chi et al. 2011), tellurium (Ollivier, Bahrou et al. 2011).

Pada penelitian ini, waktu maksimum pertumbuhan khamir *Rhodotorula mucilaginosa* ditentukan dengan metode *optical density* (OD) dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Pada awal pertumbuhan, khamir memasuki fase lag atau fase adaptasi. Selanjutnya khamir memasuki fase eksponensial, dimana terjadi penambahan khamir seiring bertambahnya waktu. Kemudian mikroorganisme memasuki fase stasioner dimana jumlah khamir yang hidup sama dengan jumlah khamir yang mati atau jumlah sel tetap. Sebelum memasuki fase stasioner, khamir mengalami pertumbuhan yang optimum sehingga waktu untuk fase ini digunakan dalam penumbuhan khamir dalam penelitian. Sementara fase kematian merupakan fase berkurangnya khamir karena nutrisi dalam lingkungan mulai menurun. Dari kurva pertumbuhan *Rhodotorula mucilaginosa* pada Gambar 2., pertumbuhan optimum terjadi pada saat memasuki waktu 24 jam.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Rhodotorula mucilaginosa*

Suspensi khamir yang telah didapatkan dari proses fermentasi, kemudian dilakukan perlakuan imobilisasi dengan membuat biomembran dari 2% agarose dalam larutan buffer fosfat. Larutan agarose dipanaskan sampai mendidih kemudian didinginkan pada 36 °C dan 2 mL suspensi khamir ditambahkan ke dalamnya. Hasil campuran kemudian disebar ke membran Nafion dengan ukuran 2 cm x 3 cm. Dua buah potongan kaca digunakan untuk meratakan sejumlah 0,3 mL campuran. Lapisan imobilisasi kemudian disimpan dalam larutan buffer fosfat untuk disimpan dalam temperatur ruang. Setiap kali akan dipakai, membran dipotong dan dilekatkan ke sel elektrokimia.

Elektroda kerja biosensor BOD

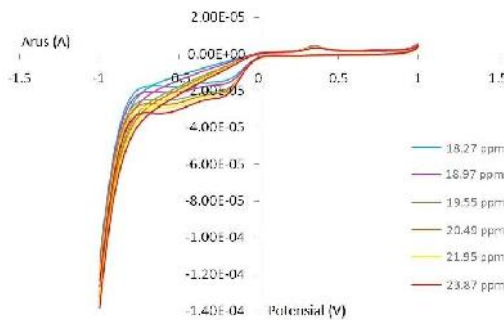
Rancangan sel elektrokimia menggunakan dengan tiga elektroda. Sel elektrokimia terdiri dari elektroda kerja (*working electrode*), elektroda pembanding (*reference electrode*), dan elektroda pendukung (*counter electrode*). Elektroda kerja berupa kepingan Au. Kepingan Au memiliki dimensi 1 cm x 1 cm x 1 mm dimana diameter elektroda kerja yang kontak dengan larutan sebesar 3 mm. Ag/AgCl (KCl jenuh) digunakan sebagai elektroda pembanding, sedangkan kawat platina berbentuk spiral digunakan sebagai elektroda pendukung. Potensiostat digunakan untuk pengukuran sensor BOD pada khamir terimobilisasi dalam matriks agarose.

Elektroda Au dan elektroda Pt harus dibersihkan dari pengotor sebelum digunakan karena pengotor dapat mempengaruhi data yang dihasilkan. Elektroda Au dan Pt disonikasi dalam sonikator dengan pelarut 2-propanol dan akuademin selama dua puluh menit. Akuademin memiliki sifat polar sehingga dapat digunakan untuk melarutkan pengotor yang memiliki sifat polar, sedangkan 2- propanol memiliki sifat nonpolar sehingga dapat digunakan untuk melarutkan pengotor yang sifatnya nonpolar. Sel elektrokimia terdiri dari elektroda Au sebagai elektroda kerja, elektroda Pt sebagai elektroda pendukung dan elektroda Ag/AgCl sebagai elektroda pembanding yang dihubungkan ke potensiostat. Sensor BOD berbasis mikroba yang diimobilisasi di atas permukaan elektroda menggunakan prinsip bahwa laju konsumsi oksigen yang di butuhkan oleh mikroorganisma untuk mengurai zat polutan organik dalam air pada selang waktu tertentu setara dengan nilai BOD sampel.

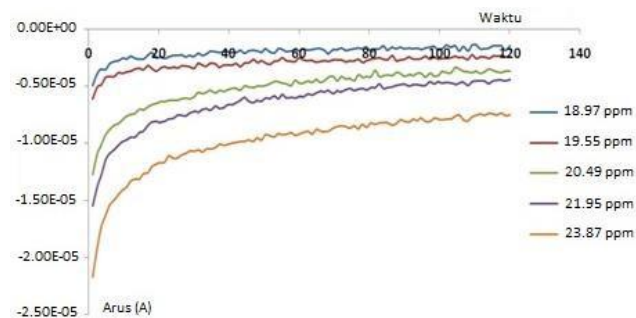
Uji sensor oksigen dilakukan dengan pendekatan *Cyclic voltammetry* (CV) sebagai salah satu teknik analisis yang dapat menghasilkan data arus terukur saat dilakukan variasi potensial dalam sel elektrokimia. Arus yang

terukur berbanding lurus terhadap konsentrasi oksigen. CV dilakukan pada sel elektrokimia yang terdiri atas tiga elektroda. Susunan elektroda yang di gunakan adalah emas berdiameter 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, sehingga diharapkan hanya gas oksigen saja yang tereduksi di elektroda emas. Sebagai *reference electrode* digunakan Ag/AgCl (*saturated* KCl). Sedangkan *counter electrode* menggunakan kawat platina.

Potensial reduksi oksigen dapat ditentukan dengan *cyclic voltametry*. Saat dilakukan perubahan potensial maka diamati perubahan arus yang terjadi pada sel elektrokimia. Potensial divariasikan secara sistematis sehingga zat kimia tersebut mengalami oksidasi dan reduksi di permukaan elektroda. Arus diukur selama *scanning* (penyapuan) dari potensial awal (-1000 mV) ke potensial akhir (1000 mV) untuk mendapatkan arus anodik dan kembali ke potensial awal lagi untuk mendapatkan arus katodik. Potensial yang akan ditentukan adalah nilai potensial reduksi dari O₂ sehingga arus yang diamati adalah arus katodik. Potensial reduksi dari O₂ dapat ditentukan dari nilai puncak katodik yang merupakan puncak yang terbentuk saat terjadi arus reduksi paling negatif. Penentuan potensial reduksi oksigen dilakukan pada larutan buffer fosfat dengan oksigen terlarut pada berbagai variasi konsentrasi. Scan rate yang digunakan adalah 100 mV/s. Hasil dari *cyclic voltametry* dapat dilihat pada Gambar 3. Dari gambar tersebut terlihat bahwa cyclic voltamogram memiliki puncak katodik sekitar $-1,50 \times 10^{-5}$ V dan $-3,50 \times 10^{-5}$ V.

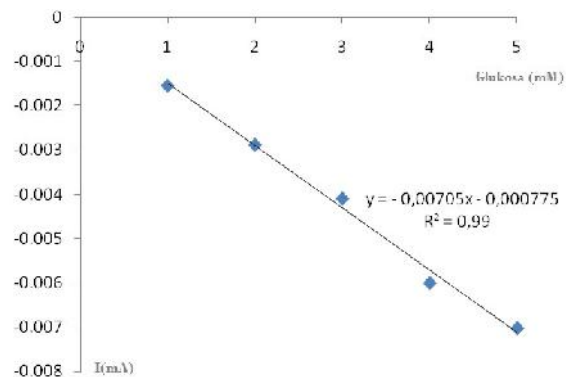


Gambar 3. *Cyclic* voltamogram larutan oksigen dengan elektroda emas



Gambar 4. Amperogram respon arus reduksi dan konsentrasi oksigen

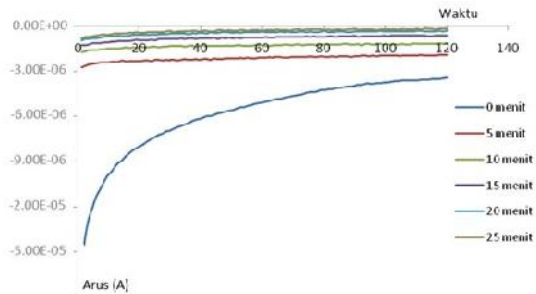
Dari Gambar 4 diketahui bahwa respon arus reduksi semakin bernilai negatif seiring dengan pertambahan konsentrasi oksigen dalam larutan. Jumlah sel khamir yang digunakan pada setiap larutan adalah sama sehingga jumlah oksigen sisa atau oksigen yang tidak dikonsumsi oleh mikroorganismenya semakin banyak seiring dengan bertambahnya kadar oksigen terlarut dalam larutan. Kurva kalibrasi linear ditentukan dengan mengukur konsentrasi oksigen. Larutan glukosa divariasikan konsentrasinya 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM; dan 0,5 mM. Dari Gambar 5 diperoleh hubungan bahwa semakin besar konsentrasi oksigen terlarut maka semakin negatif nilai arus reduksinya.



Gambar 5. Kurva kalibrasi standard Larutan Glukosa

Penentuan waktu optimum sensor BOD

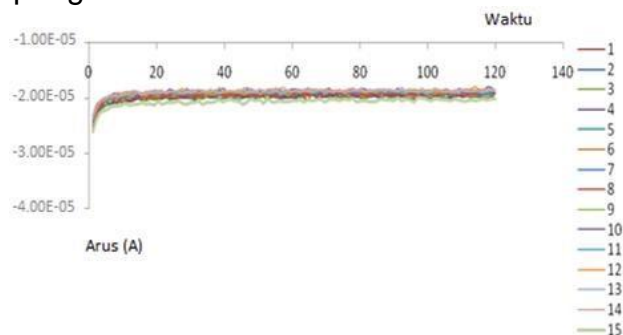
Sensor BOD tidak dapat digunakan secara langsung karena mikroorganismenya memerlukan waktu untuk beradaptasi dengan lingkungan barunya dan membutuhkan waktu untuk mengonsumsi oksigen yang terlarut dalam sistem. Semakin lama konsentrasi oksigen dalam larutan semakin berkurang dan sistem elektrokimia akan mendeteksi penurunan konsentrasi oksigen terlarut. Penentuan waktu optimum sensor BOD dilakukan dengan memvariasikan waktu pengukuran yaitu 5, 10, 15, 20 dan 25 menit. Waktu 0 menit merupakan saat sel khamir belum bereaksi, sedangkan waktu 5 menit sampai 25 menit adalah waktu saat sel khamir menggunakan oksigen untuk metabolisme. Pengukuran dilakukan dengan teknik multi pulse amperometry pada potensial -500 mV selang waktu 5 menit. Gambar 6 menunjukkan waktu pengukuran sensor BOD untuk khamir *Rhodotorula mucilaginosa* dan didapat waktu optimum pengukuran sensor BOD pada waktu 20 menit.



Gambar 6. Amperogram penentuan waktu optimum pengukuran sensor BOD

Repeatability biosensor BOD

Pengukuran *repeatability* elektroda emas yang diimobilisasi *Rhodotorula mucilaginosa* dilakukan dalam media agarose pada 4,5 mL larutan buffer fosfat pH 7 yang mengandung oksigen terlarut 23,87 ppm dan 0,5 mL glukosa 1 ppm. Pengukuran reproducibility dilakukan dengan metode *Multi Pulse Amperometry*. Amperogram hasil pengukuran menunjukkan presisi data yang baik selama 15 kali pengukuran.



Gambar 7. *Repeatability* elektroda emas diimobilisasi *Rhodotorula mucilaginosa*

Kesetaraan BOD konvensional

Metode konvensional yang digunakan adalah metode titrimetri yang mengukur nilai BOD_5 berdasarkan perubahan konsentrasi oksigen. Hasil pengujian dengan cara uji analisis BOD konvensional dan estimasi biosensor menunjukkan korelasi linier yang baik dengan nilai regresi $R^2 = 0,99$. Pengukuran memberikan nilai yang baik untuk rentang konsentrasi oksigen <75 ppm. Kesamaan yang baik antara nilai BOD dari metode konvensional dan estimasi biosensor menunjukkan bahwa biosensor BOD berpotensi untuk diaplikasikan sebagai metode alternatif untuk pengukuran BOD pada monitoring lingkungan.

KESIMPULAN

Biosensor BOD berdasarkan metabolisme khamir *Rhodotorula mucilaginosa* dapat mempersingkat waktu pengukuran nilai BOD sehingga memiliki potensi untuk aplikasi nyata dalam monitoring lingkungan. Kondisi optimum biosensor dengan waktu tunggu pengukuran 20 menit dengan potensial yang diterapkan sebesar 500 mV (vs Ag / AgCl). Hubungan linier yang baik diperoleh dari larutan standar glukosa dengan nilai R^2 0,99. Nilai BOD yang diperoleh dari biosensor menunjukkan kesamaan yang baik antara nilai BOD dari metode konvensional dan estimasi biosensor dengan waktu pengukuran yang lebih singkat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ivandini Tribidasari Anggraningrum dan Dr. Endang Saepudin di Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia yang telah memberi dukungan teknis dan finansial terhadap penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Arlyapov, V., S. Kamanin, et al. (2012). "Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *Candida blankii*, and *Debaryomyces hansenii*." *Enzyme Microb Technol* 50(4-5): 215-220.
2. Chan, C., M. Lehmann, et al. (2000). "Designing an amperometric thick-film microbial BOD sensor." *Biosens Bioelectron* 15(7-8): 343-353.
3. Cheng, C. Y., J. T. Kuo, et al. (2010). "Comparisons of *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, and recombinant luminescent using *Escherichia coli* as BOD measurement." *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 45(2): 233-238.
4. Cossu, R., T. Lai, et al. (2012). "Standardization of BOD₍₅₎/COD ratio as a biological stability index for MSW." *Waste Manag*.
5. Hyun, C. K., E. Tamiya, et al. (1993). "A novel BOD sensor based on bacterial luminescence." *Biotechnol Bioeng* 41(11): 1107-1111.
6. Irazusta, V., C. Estevez, et al. (2012). "Proteomic study of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 under copper stress." *Biometals* 25(3).
7. Karube, I., T. Matsunaga, et al. (2009). "Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnol Bioeng*. Vol. XIX, Pgs. 1535-47 (1977)." *Biotechnol Bioeng* 102(3): 660-672.
8. Li, F., T. C. Tan, et al. (1994). "Effects of pre-conditioning and microbial composition on the sensor efficacy of a BOD biosensor." *Biosens Bioelectron* 9(3): 197-205.
9. Liu, L., S. Zhang, et al. (2012). "A co-immobilized mediator and microorganism mediated method combined pretreatment by TiO₂ nanotubes used for BOD measurement." *Talanta* 93: 314-319.
10. Nakamura, H., K. Suzuki, et al. (2007). "A new BOD estimation method employing a double-mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*." *Talanta* 72(1): 210-216.

11. Ollivier, P. R., A. S. Bahrou, et al. (2011). "Aeration controls the reduction and methylation of tellurium by the aerobic, tellurite-resistant marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa*." *Appl Environ Microbiol* 77(13): 4610-4617.
12. Oota, S., Y. Hatae, et al. (2010). "Development of mediated BOD biosensor system of flow injection mode for shochu distillery wastewater." *Biosens Bioelectron* 26(1): 262-266.
13. Raud, M., T. Tenno, et al. (2012). "Comparative study of semi-specific *Aeromonas hydrophila* and universal *Pseudomonas fluorescens* biosensors for BOD measurements in meat industry wastewaters." *Enzyme Microb Technol* 50(4-5): 221-226.
14. Sakaguchi, T., K. Kitagawa, et al. (2003). "A rapid BOD sensor system using luminescent recombinants of *Escherichia coli*." *Biosens Bioelectron* 19(2).
15. Su, Y. C., J. H. Huang, et al. (1986). "A new biosensor for rapid BOD estimation by using immobilized growing cell beads." *Proc Natl Sci Coun Repub China B* 10(2): 105- 112.
16. Suriyawattanakul, L., W. Surareungchai, et al. (2002). "The use of coimmobilization of *Trichosporon cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor." *Appl Microbiol Biotechnol* 59(1): 40-44.
17. Trosok, S. P., B. T. Driscoll, et al. (2001). "Mediated microbial biosensor using a novel yeast strain for wastewater BOD measurement." *Appl Microbiol Biotechnol* 56(3-4): 550-554.
18. Wu, F., Z. Liu, et al. (2009). "[Development of a low-cost single chamber microbial fuel cell type BOD sensor]." *Huan Jing Ke Xue* 30(10): 3099-3103.
19. Zhao, C. H., Z. Chi, et al. (2011). "Direct conversion of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke into single cell oil by co-cultures of *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a and immobilized inulinase-producing yeast cells." *Bioresour Technol* 102(10): 6128-6133.
20. Zheng, C., J. Zhou, et al. (2009). "Aerobic degradation of nitrobenzene by immobilization of *Rhodotorula mucilaginosa* in polyurethane foam." *J Hazard Mater* 168(1):298-303.
21. Zihnioglu, F. (2003). "Immobilization of glutathione-s-transferase within cross-linked gelatin cylindrical molds." *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 31(1): 47-57.