Pemanfaatan *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* Sebagai Biosensor untuk Mengukur Kadar BOD_5 Dalam Air

Sri Sugiarti [1)*], Setyawan P. Sakti [2)], Unggul P. Juswono [2)]

[1)]Progam Studi Magister Fisika, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang
[2)]Jurusan Fisika, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

Diterima 15 Agustus 2013, direvisi 08 Oktober 2013

ABSTRAK

Seiring dengan pertambahan penduduk, kebutuhan akan air bersih pun semakin meningkat. Ketersediaan air bersih saat ini sudah mulai berkurang karena penurunan kualitas maupun kuantitas air di lingkungan. Penurunan kualitas air dapat disebabkan pencemaran air akibat pembuangan limbah industri. Untuk mengetahui tingkat pencemaran air dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya adalah penentuan kadar BOD (*Biological Oxygen Demand*) dan metode pengukuran BOD yang paling umum adalah metode titrasi. Selain titrasi, metode biosensor merupakan metode yang dikembangkan dalam mengukur BOD. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk merancang sebuah biosensor berbasis mikroorganisme yang dapat digunakan untuk mengukur kadar *Biochemical Oxygen Demand* (BOD_5) dengan memanfaatkan mikroelektroda sebagai tranduser dengan *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* sebagai bioreseptor. Pengaturan tingkat BOD dilakukan dengan penambahan fenol dengan berbagai konsentrasi. Dalam penelitian ini konsentrasi yang dipergunakan adalah 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L dan 250 mg/L. Kadar BOD dari air dalam penelitian diukur dengan metode titrasi dan menggunakan biosensor yang dikembangkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan tegangan keluaran biosensor berkorelasi linier dengan peningkatan kadar BOD dalam air. Sedangkan perubahan luas permukaan membran tidak memiliki pengaruh terhadap nilai tegangan keluaran biosensor. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* dapat dipergunakan sebagai bahan aktif biologis untuk pengukuran kadar BOD dalam air.

Kata kunci : Fenol, BOD, mikroelektroda, tegangan biosensor.

ABSTRACT

Along with population growth, the need for clean water is increasing. The availability of clean water is starting to decrease due to the decline in quality and quantity of water in the environment. Water quality degradation can be caused by water pollution from industrial waste disposal. One of the parameters to measure the level of pollution is the biochemical oxygen demand (BOD). Beside titration, biosensor method is a method developed to measure the BOD. The purpose of this study is to design a microorganism-based biosensors that can be used to measure levels of Biochemical Oxygen Demand (BOD_5) using a microelectrode transducer with *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* as bioreceptor on phenol wastes. BOD concentration was controlled by adding phenol in water with concentration of 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L and 250 mg/L. BOD concentration as measured by using titration method and developed biosensor. Experimental result shows that the potential of the biosensor linearly correlated to the concentration of BOD in water. Membrane surface area does not contribute any effect to the output potential of the biosensor. We can conclude that both *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* can be use as material for measuring BOD concentration in water.

Keywords : Phenol, BOD, microelectrode, biosensor voltage.

---

*Coresponding author :
E-mail: srisugiarti2717@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Ketersediaan air bersih saat ini sudah mulai berkurang karena penurunan kualitas maupun kuantitas air di lingkungan. Penurunan kualitas air dapat disebabkan pencemaran akibat pembuangan limbah industri. Salah satu limbah organik yang sangat berbahaya dan menyebabkan pencemaran air adalah limbah fenol. Senyawa ini banyak digunakan sebagai campuran pada perekat (50%), plastik (20%), antiseptik, desinfektan, sintesis zat warna, dan obat-obatan serta ditemukan pada limbah industri pengilangan minyak, tekstil dan kayu lapis [1].

Dampak langsung dari pencemaran air adalah terjadi degradasi air di mana-mana, baik itu di air tanah, air sungai, maupun air laut [2]. Dalam upaya untuk pengendalian kualitas air, langkah awal yang perlu dilakukan diantaranya adalah penentuan tingkat pencemaran. Untuk mengetahui tingkat pencemaran air dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya adalah penentuan kadar BOD (*Biological Oxygen Demand*). Penentuan BOD digunakan untuk menaksir oksigen yang dipakai dalam proses dekomposisi oksidatif oleh bakteri aerob di dalam perairan alami dan merupakan ukuran banyaknya kandungan bahan organik yang terlarut dalam perairan tersebut [3]. Kadar BOD yang berlebih di perairan menunjukkan bahwa dalam perairan tersebut banyak mengandung bahan organik sebagai sumber polutan.

Metode pengukuran BOD secara tradisional dilakukan dengan mengukur konsumsi oksigen oleh mikroorganisme yaitu dengan titrasi kimia. Pengukuran dengan metode ini memerlukan waktu yang cukup lama karena harus menunggu selama 5 hari. Metode biosensor merupakan metode lain yang dikembangkan dalam mengukur kadar BOD. Biosensor ini memanfaatkan bakteri *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* sebagai bioreseptor dan mikroelektroda sebagai alat pengukuran kadar BOD yang praktis. Sudah banyak penelitian yang menunjukkan bahwa genus *Pseudomonas sp.* merupakan genus bakteri yang paling banyak dilaporkan kemampuannya dalam mendegradasi fenol [4,5]. Proses degaradasi fenol oleh bakteri melibatkan reaksi oksidasi fenol menjadi senyawa lain yang lebih sederhana yang dikenal sebagai respirasi. Kenaikan respirasi dapat diukur berdasarkan tingkat konsumsi oksigen dalam menguraikan senyawa organik (fenol) yang dikenal sebagai BOD [6]. Kemampuan mikroelektroda yang akurat dalam pengukuran potensial membran merupakan dasar biosensor dalam mengukur reaksi oksidasi reduksi dari proses respirasi berdasarkan prinsip elektrokimia. Elektrokimia merupakan energi yang terkandung dalam cairan intraseluler dan ekstraseluler. Energi ini merupakan kombinasi antara energi listrik yang merupakan hasil dari pengaruh membran karena adanya pergerakan ion dan juga energi kimia yang berasal dari akibat gradien konsentrasi ion. Biosensor juga menggunakan membran selulosa ester karena mempunyai ciri khusus yang tidak dimiliki membran yang lain yaitu sensitif untuk kondisi panas, kimia, dan degradasi biologis sehingga sangat cocok untuk mengimobilisasi bakteri pada tranduser [7].

METODE PENELITIAN

Pembuatan media pertumbuhan. Pembuatan media pertumbuhan dibagi menjadi dua yaitu (a) *Pseudomonas putida* dan (b) *Pseudomonas fluorescens* dengan komposisi sebagai berikut:

a) 1 gram NH_4NO_3; 0,5 gram $(NH_4)_2SO_4$; 0,5 gram NaCl; 0,5gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,5 gram K_2HPO_4; 0,5 gram KH_2PO_4; 0,014 gram $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,01 gram $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ dan larutan *trace element* (1 ml/L)
b) 2,44 gram Na_2HPO_4; 1,52 gram KH_2PO_4; 0,50 gram $(NH_4)_2SO_4$; 0,2 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05 gram $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ dan (10 ml/L) larutan *trace element* [8].

Media mineral sederhana dilarutkan dalam 1 liter aquades, disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit dan ditambahkan fenol 100 mg/l [4].

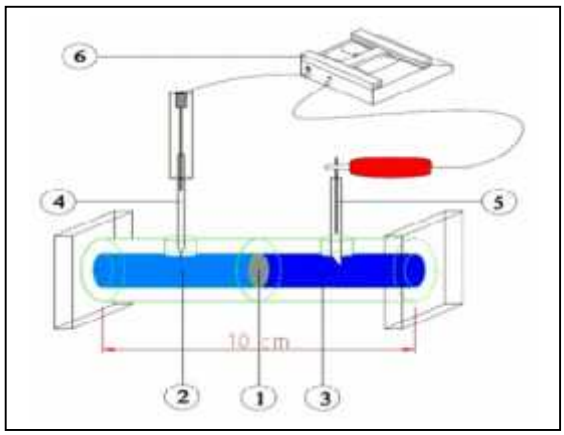
Pembuatan kurva pertumbuhan. Sebanyak 3 ose subkultur *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* hasil peremajaan ditanam dalam 60 ml MMS dan diinkubasi dalam shaker pada suhu 30°C selama 24 jam. Tiap jamnya diambil 6 ml dan

diukur *optical density*-nya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm hingga diperoleh *trend* pertumbuhan bakteri.

Pengukuran BOD dengan metode titrasi. Limbah fenol dengan konsentrasi 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L dan 250 mg/L disimpan dalam botol BOD terang dan gelap. Botol BOD terang langsung dititrasi sebagai DO_0 sedangkan botol BOD gelap disimpan dalam inkubator suhu 20^{o}C dan dititrasi pada hari ke-5 sebagai DO_5. Nilai BOD_5 didapatkan dari hasil pengurangan antara DO_0 dengan DO_5.

Imobilisasi *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens.* Metode immobilisasi dilakukan dengan cara menjebak diantara membran semipermiabel (selulosa ester), dimana satu bagian berisi biakan bakteri pada fase logaritmik dan bagian yang lain berisi limbah fenol.

Pengujian biosensor. Elektroda referensi dipotong sepanjang ± 4 cm yang telah disisipi kawat perak sepuhan dimasukkan ke dalam bagian *chamber* limbah fenol dan dihubungkan dengan kutup negatif *plotter*. Mikroelektroda dihubungkan dengan kutup positif *plotter* dan dimasukkan pada larutan inokulum bakteri. Hasil pengukuran tegangan dapat dilihat pada *plotter*.

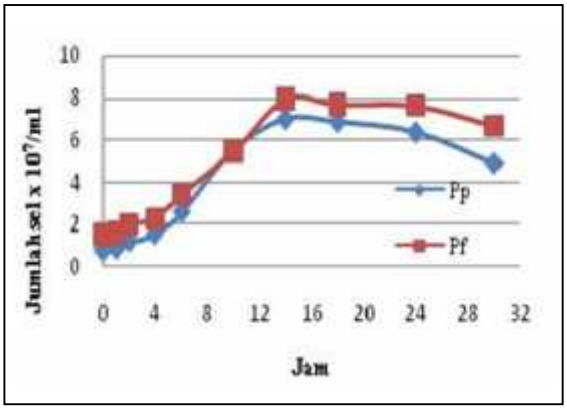


Gambar 1. Sketsa alat penelitian (**Keterangan**: 1 = membran selulosa ester, 2 = larutan inokulum, 3 = limbah fenol, 4 = mikroelektroda, 5 = elektroda referensi dan 6 = Plotter).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri di dalam pembiakan dan pertumbuhan terjadi karena adanya energi yang diperoleh dari reaksi kimia dalam air, antara lain pemecahan bahan-bahan organik dan proses oksidasi reduksi yang dikatalisis oleh bakteri. Kecepatan pembiakan dan pertumbuhan akan bergantung pada kultur media tempat tumbuh, pH dan suhu. Bakteri yang hidup di lingkungan perairan umumnya memiliki suhu optimum 20-45 ^{o}C dan pH 6-9,3 [9].

Pada penelitian ini menggunakan dua macam bakteri yang berfungsi sebagai bioreseptor yaitu *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens*. Perancangan bioreseptor harus memperhatikan bagaimana membuat biakan dari *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* yang telah aktif dan mampu melakukan pendektesian terhadap analit. Studi pertama yang harus dilakukan adalah mengetahui kurva pertumbuhan bakteri dalam media mineral sederhana dengan penambahan fenol 100 mg/L. Kurva pertumbuhan *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* dalam 60 ml MMS yang diinkubasi pada suhu 30^{o}C dengan kecepatan 120 rpm dapat dilihat pada Gambar 2.

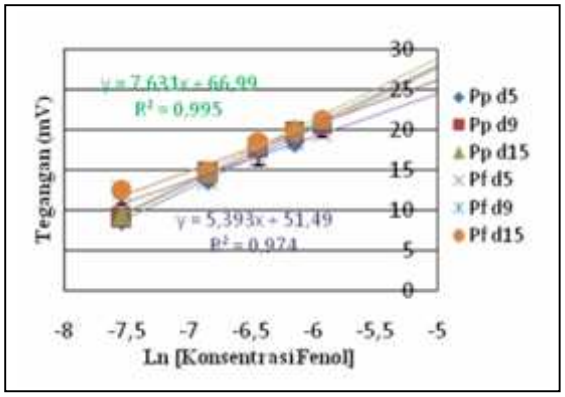


Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri pada media mineral sederhana. (**Keterangan**: Pp = *Pseudomonas putida* dan Pf = *Pseudomonas fluorescens*).

Proses pertumbuhan bakteri terjadi dalam empat fase yakni fase penyesuaian diri (*lag phase*), fase pertumbuhan cepat (*log phase*),

fase tetap (*stationary phase*) dan fase kematian (*death phase*) [10]. Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* dapat diketahui bahwa pada jam ke-0 sampai jam ke-4 sebagai fase lag, jam ke-4 sampai jam ke-14 sebagai fase logaritmik, jam ke-14 sampai jam ke-24 sebagai fase stasioner dan setelah jam ke-24 sebagai fase kematian.

Pengaruh Konsentrasi fenol terhadap nilai BOD. Hasil penelitian pengaruh konsentrasi fenol dengan penambahan *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* terhadap nilai BOD_5 dapat dilihat pada Gambar 3.



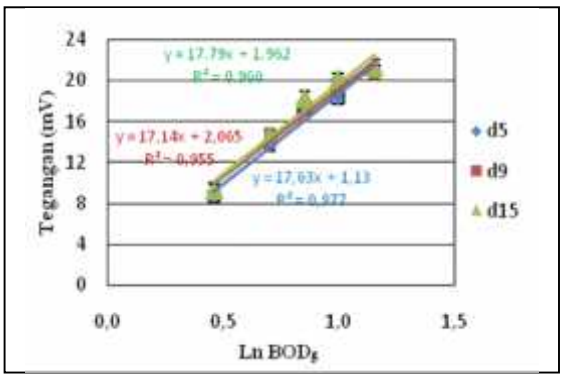
Gambar 3. Grafik hubungan konsentrasi fenol terhadap nilai BOD_5 pada limbah fenol (**Keterangan** : Pp = *Pseudomonas putida* dan Pf = *Pseudomonas fluorescens*).

Gambar 3 menunjukkan bahwa nilai BOD_5 akan semakin meningkat dengan peningkatan konsentrasi fenol. Hal ini disebabkan peningkatan konsentrasi fenol akan meningkatkan konsumsi oksigen *Pseudomonas putida* maupun *Pseudomonas fluorescens* dalam mendegradasi fenol. Degradasi bahan organik adalah proses alami yang dilakukan oleh bakteri aerob. Proses ini dapat terjadi jika limbah mengandung oksigen yang cukup, oleh karena itu dilakukan aerasi terlebih dahulu sebelum dilakukan uji pada limbah. Nilai BOD merupakan jumlah oksigen yang digunakan oleh bakteri untuk menguraikan hampir semua zat organik yang terlarut dan sebagian zat organik yang tersuspensi dalam air limbah [6]. Peningkatan nilai BOD terjadi karena adanya meningkatnya jumlah bahan organik sebagai sumber subtrat dan meningkatnya jumlah bakteri yang menguraikan bahan organik dalam limbah menjadi CO_2 dan H_2O. Menurut [9] hancurnya bahan organik menjadi CO_2 dan H_2O oleh aktivitas bakteri yang terjadi pada tahap awal akan mengakibatkan penurunan nilai oksigen terlarut, sehingga meningkatkan nilai BOD.

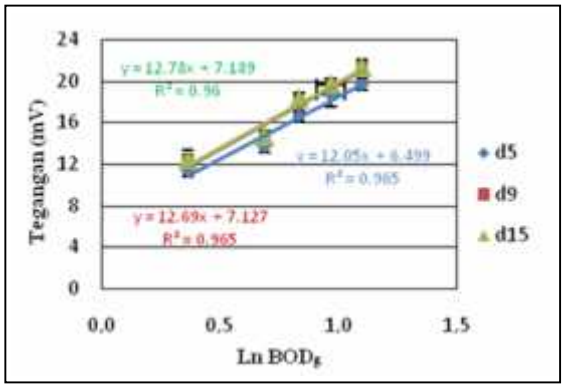
Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa limbah fenol dengan penambahan *Pseudomonas putida* mempunyai nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan *Pseudomonas fluorescens*. *Pseudomonas putida* mempunyai kemampuan yang lebih baik dalam mendegradasi fenol dibandingkan *Pseudomonas fluorescens* [12] sehingga mempunyai nilai BOD_5 lebih tinggi. *Pseudomonas putida* merupakan bakteri yang agresif dan efektif serta mempunyai waktu generasi yang cepat. Hal ini diduga karena keperluan nutrisinya yang mudah karena mampu menggunakan berbagai sumber karbon serta kemampuannya membentuk berbagai senyawa penghambat, sehingga *Pseudomonas putida* mampu berkembang biak dengan cepat. *Pseudomonas putida* yang diaplikasikan pada degradasi akan memperbanyak diri dan bertahan selama beberapa waktu untuk berkompetisi dengan mikroorganisme lain [4].

Hubungan antara konsentrasi BOD5 hasil titrasi dan tegangan keluaran biosensor dapat dilihat pada Gambar 4 dan Gambar 5.

Berdasarkan Gambar 4 dan Gambar 5 dapat diketahui bahwa peningkatan nilai BOD_5 juga diikuti oleh peningkatan tegangan yang dihasilkan. Meningkatnya kadar BOD_5



Gambar 4. Grafik hubungan antara BOD_5 dengan tegangan biosensor pada limbah fenol *Pseudomonas putida* (**Keterangan**: d5 = diameter membran 5 mm, d9 = diameter membran 9 mm dan d15 = diameter membran 15 mm).



Gambar 5. Grafik hubungan antara BOD_5 dengan tegangan biosensor pada limbah fenol *Pseudomonas fluorescens* (**Keterangan**: d5 = diameter membran 5 mm, d9 = diameter membran 9 mm dan d15 = diameter membran 15 mm).

menunjukkan kenaikan respirasi rata-rata mikroorganisme sebagai bioreseptor dalam menguraikan/mendegradasi senyawa organik dalam limbah. Terdapat tiga cara *transport* (fenol) ke dalam sel bakteri, yang pertama melalui interaksi sel dengan fenol yang terlarut dalam fase air, umumnya rata-rata kelarutan fenol oleh proses fisika sangat rendah sehingga tidak dapat mendukung. Yang kedua melalui kontak langsung (perlekatan) sel dengan permukaan tetesan fenol yang lebih besar daripada sel mikroba. Pada kasus yang kedua ini, perlekatan dapat terjadi karena sel bakteri bersifat hidrofobik. Sel mikroba melekat pada permukaan tetesan fenol yang lebih besar daripada sel dan pengambilan substrat dilakukan dengan difusi atau transport aktif. Perlekatan ini terjadi karena adanya biosurfaktan pada membran sel bakteri dan yang terakhir melalui interaksi sel dengan tetesan fenol yang telah teremulsi atau tersolubilisasi oleh bakteri. Pada kasus ini sel mikroba berinteraksi dengan partikel fenol yang lebih kecil daripada sel. Fenol dapat teremulsi dan tersolubilisasi dengan adanya biosurfaktan yang dilepaskan oleh bakteri ke dalam medium [13].

Sel-sel yang melakukan respirasi pada umumnya mempunyai kecenderungan menggunakan oksigen sebagai aseptor donor terakhir. Elektron-elektron di dalam sistem respirasi berasal dari $DPNH^+H^+$, yaitu hasil oksidasi dari subtrat. Pasangan elektron ini melalui flavoprotein atau pembentukan FAD dan sitokrom menjadi energi dalam bentuk ATP (Adenosin-ribosatripospat). Proses oksidasi tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut, pertama oksidasi sebagian limbah menjadi produk akhir untuk mendapatkan energi guna memelihara sel, serta pembentukan serat-serat baru. Kedua beberapa bagian limbah diubah menjadi serat sel baru dengan menggunakan sebagian energi yang dilepaskan. Akhirnya pada saat bahan organik dipakai, sel-sel yang baru mulai memakan serat selnya sendiri dan tahap ini yang disebut sebagai pernafasan atau respirasi endogen [13].

Hasil penelitian menunjukkan tingkat ketelitian biosensor bernilai antara 1,79% sampai 4,81%. Waktu respon antara 20 sekon sampai 80 sekon dan *recovery time* antara 2,3 menit sampai 9 menit. Waktu respon ini relatif lebih lama karena *chamber* yang digunakan tidak mempunyai saluran pembuangan sehingga pergantian sampel harus menggunakan pipet. Kelinieran antara BOD_5 dengan tegangan biosensor mencapai 96,7% pada bioreseptor *Pseudomonas putida* dan 98,3% pada *Pseudomonas fluorescens* serta dapat bekerja pada luasan membran terkecil yaitu diameter 5 mm. Biosensor ini mampu bekerja pada range nilai BOD_5 antara 0,897 mg/L sampai 3,169 mg/L.

KESIMPULAN

Biosensor pada penelitian ini memanfaatkan *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* sebagai bioreseptor. Membran selulosa ester digunakan untuk mengimobilisasi bioreseptor pada permukaan mikroelektroda yang berfungsi sebagai tranduser. Teknik imobilisasi dilakukan dengan cara menjebak bakteri diantara membran sehingga bakteri tetap terkukung pada tempatnya sedangkan fenol mengalir menuju bakteri tersebut. *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* dapat mendegradasi limbah fenol yang berfungsi sebagai subtrat untuk melakukan respirasi. Pada proses respirasi juga diikuti oleh reaksi reduksi oksidasi yang terukur oleh traduser berdasarkan prinsip elektrokimia dan menghasilkan sinyal listrik berupa beda potensial.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui pengaruh konsentrasi fenol, semakin

tinggi konsentrasi fenol akan menghasilkan nilai BOD_5 dan tegangan yang semakin besar. Biosensor ini dapat melakukan pendektesian dengan baik pada nilai BOD_5 0,897-3,169 mg/L. Biosensor yang dikembangkan ini mempunyai tingkat ketelitian atau deviasi antara 1,79% sampai 4,81% dan waktu respon antara 20 sekon sampai 80 sekon serta *recovery time* antara 2,3 menit sampai 9 menit.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Rocha, L.L. (2007), Isolation and characterization of phenol-degrading yeasts from an oil refinery wastewater in Brazil, *Mycophatologia,* **64**, 183– 188.

[2] Wardoyo, S.T.H. (1978), Kriteria kualitas air untuk keperluan pertanian dan perikanan. Dalam: *Prosiding Seminar Pengendalian Pencemaran Air*. (eds Dirjen Pengairan Dep. PU.), 293– 300.

[3] Tan T.C. and Lim E.W.C. (2005), Thermally killed cells of complex microbial culture for biosensor measurement of bod of wastewater, *Sens Actuators B Che.*,**107**, 546–551.

[4] Agarry S.E, Solomon B.O., Layokun S.K. (2008), Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous binary mixed culture of pseudomonas aeruginosa and pseudomonas fluorescence, *Afr J Biotechnol.,* **7**, 2417–2423.

[5] Annadurai G and Lee J.F. (2007), Application of artificial neural network model for the development of optimized complex medium for phenol degradation using Pseudomonas pictorum (NICM 2074), *Biodegradation.*,**18**, 383–392.

[6] Salmin (2005), Oksigen terlarut (DO) dan kebutuhan oksigen biologi (BOD) sebagai salah satu indikator untuk menentukan kualitas perairan, *Oseana*.,**3**, 21 – 26.

[7] Mulder, M. (1991),*Basic Principles Of Membrane Technology*, Kluwer, Netherland, 78 – 86.

[8] Timur S, Pazarlioglu, R. Pilloton, A. Telefoncu, (2003), Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on Pseudomonas putida, *Talanta*. **61**, 87–93.

[9] Van Ginkel, C.G. (1996), Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganism, *Biodegradation.*,**7**,151–164.

[10] Cai W, Li J, Zhang Z. (2007), The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by Fusarium sp, *J Hazard Mat.*, **148**, 38–42

[11] El-Naas M, Al-Muhtaseb S.A., Makhlouf S. (2009), Biodegradation of phenol by Pseudomonas putida immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel, *J Hazard Mat.*, **164**, 720–725.

[12] Tang, J. Xiaowei, N. Qing, S. Rugang Wang (2010), Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of ryegrass with effective microorganisms, *Journal of Environmental Technology and Engineering*, **3**, 80–86.