

## Seleksi Sel Bakteri dari Minyak Bumi sebagai Molekul Pengenal dalam Biosensor Benzena

Alfiah Alif<sup>1\*</sup>, Dyah Iswantini<sup>2</sup>, Henny Purwaningsih<sup>2</sup>, Novik Nurhidayat<sup>3</sup>, Amalyah Febryanti<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Sembilanbelas November Kolaka, Kolaka, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Kima, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

<sup>3</sup>Divisi Mikrobiologi R&D Biologi, Laboratorium Mikrobiologi Kesehatan Puslit Biologi LIPI Cibinong, Bogor, Indonesia

<sup>4</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, Makassar, Indonesia

\*Corresponding Author : [fhyaaalfiah@gmail.com](mailto:fhyaaalfiah@gmail.com)

Received: November,10,2021 /Accepted: December,31,2021  
doi: 10.24252/al-kimiav9i2.24378

**Abstract:** Benzene is one of the harmful compounds which can affect both healthcare and environmental quality. Conventionally the effort of detecting this compound still requires several sample pre-treatments, contributing to a long analysis time and sophisticated instrumentation. Therefore, this study was aimed to determine the potency of bacteria as the bioreceptor for detecting benzene electrochemically. The bacteria isolate was immobilized on the working electrode surface. Four bacteria isolates from the petroleum sample were evaluated. The results showed that isolate II produced high oxidation and reduction peak currents as much as 150  $\mu\text{A}$  and -490  $\mu\text{A}$  respectively. The selected bacteria showed characteristics to *Pseudomonas* sp. physiologically. Since the bacteria can degrade benzene, thus hypothetically it can produce benzene dioxygenase. Through the catechol formation, 3 mM benzene produced 108.7  $\mu\text{A}$  after 11.4 s from the starting scan. This result suggested that the excreted enzyme from the selected bacteria could react with benzene enzymatically.

**Key word:** benzena, biosensor, *Pseudomonas* sp.

### PENDAHULUAN

Benzena merupakan senyawa hidrokarbon aromatik dengan struktur molekul berbentuk siklik terdiri dari satu cincin. Benzena dapat mencemari lingkungan. Senyawa ini dapat mencemari lingkungan tanah, air permukaan, sedimen dan air tanah. Pada umumnya teknik laboratorium dalam penentuan senyawa hidrokarbon menggunakan instrumen yang lebih canggih seperti HPLC, UPLC (Vinci G dkk., 2013), spektrometer Raman (Moreau & Rinnert 2015) dan teknik bioasai (Xu Z dkk., 2003). Teknologi pengukuran tersebut mampu memberikan tingkat akurasi yang baik, namun membutuhkan waktu analisis lebih lama dan biaya yang mahal. Oleh karena itu dibutuhkan metode yang lebih mudah, cepat, dan sensitif seperti metode biosensor.

Biosensor merupakan metode pengukuran menggunakan komponen biologis sebagai elemen reseptor perubahan sinyal analit, seperti enzim, antibodi, DNA, sel, dan mikroorganisme (Kivirand K dkk., 2013). Teknologi biosensor sekarang ini berkembang dengan pesat dalam bidang kesehatan, obat-obatan dan lingkungan (Moretto and Kalcher 2014). Seperti biosensor berbasis bioluminescence dalam mendegradasi senyawa BTEX dalam tanah (Dawson JJC dkk., 2007), biosensor elektrokimia dalam mendeteksi glukosa

dengan *E. coli* sebagai bioreseptornya (Iswantini D dkk., 2011), dan biosensor elektrokimia berbasis biofilm *Deinococcus radiodurans* dalam mendeteksi kadar antioksidan (Febryanti A dkk., 2018), serta biosensor berbasis laju alir potensiometri dalam mendeteksi toksitas dalam air melalui oksidasi amonia oleh bakteri (Zhang Q dkk., 2013). Tingkat spesifitas biosensor dihasilkan tinggi, namun teknik yang digunakan masih sangat sulit dan memerlukan biaya yang mahal.

Salah satu pengembangan biosensor adalah jenis biosensor elektrokimia. Biosensor elektrokimia merupakan peralatan analisis yang mengubah respon biologi menjadi respon listrik (Gu X dkk., 2010). Pengembangan biosensor asam urat dengan ekstrak enzim urikase bakteri *L. plantarum* melalui teknik elektrokimia (Iswantini D dkk., 2017). Komponen penting dalam transmisi sinyal dalam biosensor elektrokimia ini adalah elektrode. Terdapat berbagai macam elektrode salah satunya menggunakan *Screen-Printed Carbon Elektrode* (SPCE). SPCE merupakan elektrode sekali pakai yang terbuat dari keramik dan dapat digunakan sebagai pengganti elektrode pasta karbon konvensional. Ariyanti (2020) telah menggunakan komponen pengenal biologis berupa bakteri yang diimobilisasi pada SPCE

Molekul pengenal atau bioreseptor untuk sensor benzena adalah benzena dioksigenase (Obayori OS & Lateef BS 2010). Namun demikian, penggunaan enzim memerlukan biaya mahal. Dalam mengatasi masalah ini, digunakan bakteri yang menghasilkan enzim ekstraselular. Bakteri diimobilisasi pada SPCE hingga membentuk biofilm. Biofilm merupakan sekelompok mikroorganisme yang terdiri dari satu atau beberapa jenis mikroorganisme yang menempel pada suatu permukaan. Biofilm akan terbentuk bila bakteri menempel pada suatu permukaan yang lembab dan mulai menghasilkan suatu cairan seperti lendir yang dapat melekatkan mikroorganisme tersebut pada permukaan (Davey ME & George AO, 2000). Di dalam lapisan biofilm, bakteri cenderung tumbuh dalam mengekskresikan enzimnya sebagai molekul pengenal dan berkembang dengan pesat hingga membentuk koloni dan mempertahankan hidupnya.

Salah satu jenis enzim untuk sensor benzena adalah benzena dioksigenase yang berasal dari bakteri *Pseudomonas* menggunakan biosensor berbasis bakteri jenis *Pseudomonas putida* ML2 melalui teknik amperometri dalam air tanah (Lanyon, Tothill, and Mascini 2006). Penelitian lain juga telah mengukur kualitas air dari polutan hidrokarbon menggunakan *P. putida* (Digabel YL dkk., 2015). Evaluasi bakteri *Pseudomonas aerogenosa* juga mampu digunakan sebagai bioreseptor dalam mendeteksi senyawa hidrokarbon poliaromatik menggunakan biosensor elektrokimia (Iswantini D dkk., 2021). Melihat potensi komponen biologis tersebut sebagai salah satu metode pengukuran polutan, maka perlunya langkah awal dalam menyeleksi bakteri dari minyak bumi sebagai bioreseptor dalam biosensor benzena yang berbasis biofilm menggunakan SPCE.

## METODE PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah minyak bumi koleksi LIPI berasal dari Kalimantan, benzena 97.7% (Merck), larutan penyangga fosfat 50 Mm pH 6.8, air destilat, ekstrak khamir (Difco™), tripton (Himedia, ref RM 014), NaCl (Himedia, ref RM 3949), agar (Himedia, ref RM 026), etanol 70% dan 96%, dan *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA) (Difco™), *plastic wrap*, dan aluminium foil.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah SPCE refs. 110 produksi DropSens Spanyol, konektor SPCE DRP-CAC71190 Metrohm, kompartemen elektrode volume 8 mL, neraca analitik, alat-alat kaca, pipet mikro 1000 µL Gilson, tips biru, lup inokulasi, spektrofotometer UV-Vis berkas ganda BioSpec-1601 Shimadzu, inkubator

SanyoMIR-162, autoklaf Hirayama HVE 50, sentrifugal 5415C, tabung eppendorf, laminar air flow CVB 1300M, microtiter plate dengan 96 sumur Costar, microplate reader BIO-RAD iMark, oven gelombang mikro Sanyo, pH meter TOA DK HM-250, lemari pendingin LG, Mikroskop Nikon Ys100, Scanning Microscop Electron (SEM) JEOL JSM-5310LV, seperangkat alat potensiostat/galvanostat eDAQ dengan sistem 3 elektrode, dan komputer yang telah dilengkapi program pengolahan data *Echem v.2.1.0* dan *Origin Pro 7.0*.

## Prosedur

### **Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Minyak bumi**

Bakteri diisolasi menggunakan jarum ose steril yang dimasukkan ke dalam sampel minyak bumi asal Balikpapan, Kalimantan Selatan dan ditanamkan pada media agar padat *Luria Bertani*. Selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 30 °C selama tiga hari. Empat isolat yang tumbuh diseleksi dengan metode biosensor elektrokimia. Suspensi sel diambil sebanyak 100 µL dan diteteskan ke atas permukaan elektrode karbon (SPCE *Dropsense DRP 110*). Prosedur ini merupakan modifikasi dari prosedur yang dilaporkan oleh Iswantini tahun 2017. Metode ini menggunakan buffer fosfat 50 mM pH 6.8 sebagai blanko dan simulasi benzena 10 mM sebagai sampel. Pengukuran dilakukan dengan perangkat alat potensiostat/galvanostat eDAQ dan komputer yang telah terpasang program *Echem.v.2.0.1*.

### **Pencirian dan Identifikasi Bakteri Terpilih**

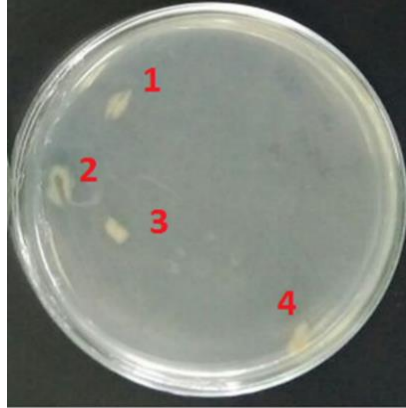
Bakteri yang terpilih dari hasil pengukuran biosensor elektrokimia selanjutnya dikarakterisasi melalui metode pewarnaan Gram. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya untuk dengan perbesaran 1000×. Kemudian untuk memastikan bakteri *Pseudomonas* sp. yang tumbuh dilakukan pemanenan bakteri pada media selektif *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA)

### **Uji Pembentukan dan Pertumbuhan Biofilm *Pseudomonas* sp**

Uji pembentukan dan pertumbuhan biofilm *Pseudomonas* sp. dilakukan dengan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* (Merritt, Kadouri, and O'Toole 2011). Sebanyak 200 µL suspensi bakteri terpilih hasil karakterisasi yaitu *Pseudomonas* sp. (OD 0.7) dengan kerapatan sel  $1.4 \cdot 10^{11}$  sel/ml dipipet dan dimasukkan ke dalam sumur pada *microtiter plate* steril. Buffer fosfat pH 6.8 dan air destilat masing-masing digunakan sebagai kontrol negatif dan blanko. Karakterisasi biofilm pada permukaan SPCE menggunakan *Scanning Microscop Electron* (SEM)

### **Konstruksi Pengukuran Biosensor Benzena**

Komponen biosensor dibuat dengan cara mengimobilisasi *Pseudomonas* sp. yang mampu membentuk biofilm pada permukaan SPCE. Suspensi sel diambil sebanyak 100 µL dan diteteskan ke atas permukaan elektrode karbon sebagai elektroda kerja (SPCE *Dropsense DRP 110*). Pengukuran arus menggunakan metode voltametri siklik. Pengukuran dilakukan dengan perangkat alat potensiostat/galvanostat eDAQ dan komputer yang telah terpasang program *Echem.v.2.0.1*. Pengukuran arus diatur dengan program sebagai berikut: *Mode* : Cyclic; *Step W*: 8 ms; *Initial E*: -1000 mV; *Upper E*: 1000 mV; *Final E*: -1000 mV; *Lower E*: -1000 mV; *Rate*: 100 mV/s; *Range*: 1 V

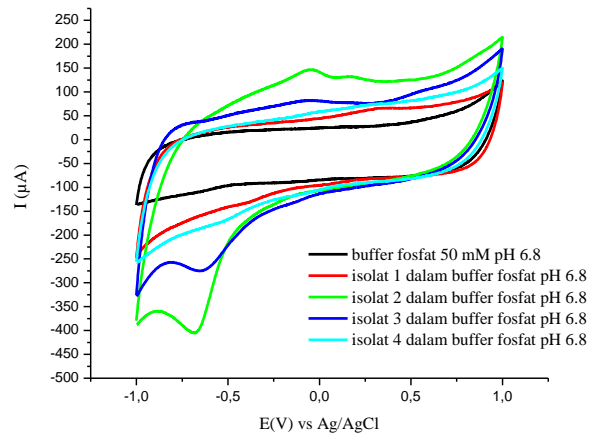
**HASIL DAN PEMBAHASAN*****Isolasi, Seleksi dan Karakterisasi Sel Bakteri sebagai Biosensor Benzena***

**Gambar 1** Pertumbuhan isolat bakteri dari sampel minyak bumi

Gambar 1 menunjukkan empat isolat yang tumbuh pada media agar padat *Luria Bertani*. Keempat isolat yang didapat dimurnikan dengan metode penggoresan kuadran, sampai didapatkan koloni bakteri yang tunggal dan seragam. Setiap isolat dicampurkan ke dalam bufer fosfat 50 mM pH 6.8 diseleksi melalui metode biosensor elektrokimia. Teknik ini dilakukan dengan mengimobilisasi keempat isolat bakteri murni ke permukaan masing-masing SPCE. Dalam pengukuran menggunakan buffer fosfat 50 mM pH 6.8 sebagai blanko dan simulasi benzena 10 mM sebagai sampel. Berikut ini nilai arus yang dihasilkan dari setiap isolat melalui metode biosensor elektrokimia (tabel 1).

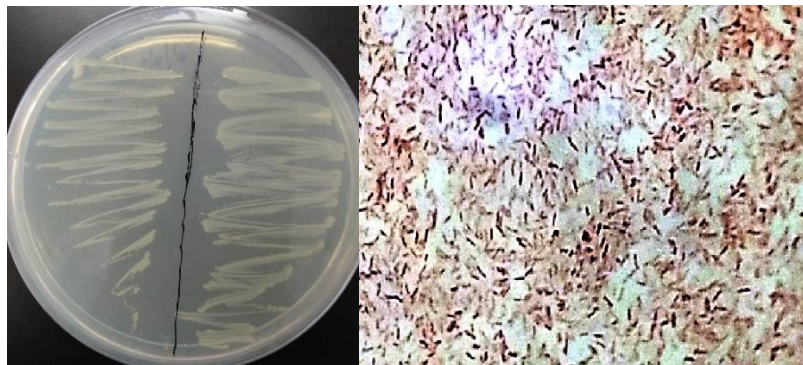
**Tabel 1** Nilai arus puncak oksidasi dan reduksi tiap isolat

Isolat	Arus oksidasi blanko	Arus oksidasi sampel	Total selisih arus oksidasi	Arus reduksi blanko	Arus reduksi sampel	Total selisih arus reduksi
1	30.6 $\mu\text{A}$	50.2 $\mu\text{A}$	19.6 $\mu\text{A}$	-110.3 $\mu\text{A}$	-	-
2	30.6 $\mu\text{A}$	150.7 $\mu\text{A}$	120.1 $\mu\text{A}$	-110.3 $\mu\text{A}$	-490.8 $\mu\text{A}$	-300.5 $\mu\text{A}$
3	30.6 $\mu\text{A}$	80.9 $\mu\text{A}$	50.3 $\mu\text{A}$	-110.3 $\mu\text{A}$	-290.5 $\mu\text{A}$	-180.2 $\mu\text{A}$
4	30.6 $\mu\text{A}$	70.4 $\mu\text{A}$	39.8 $\mu\text{A}$	-110.3 $\mu\text{A}$	-	-



**Gambar 2.** Voltamogram siklik empat isolat bakteri murni sampel minyak bumi

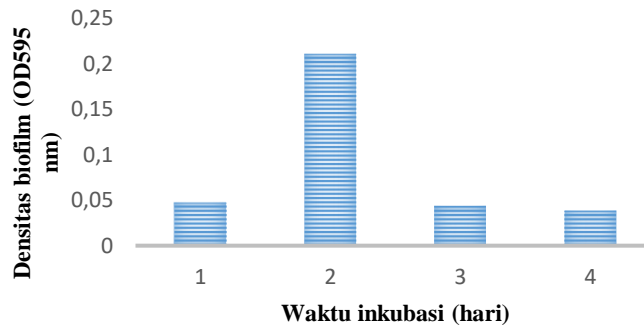
Gambar 2 menunjukkan bahwa isolat bakteri kedua dan ketiga memberikan nilai puncak arus oksidasi dan reduksi. Adanya puncak oksidasi menunjukkan terjadinya reaksi oksidasi pada benzena oleh bakteri penghasil enzim oksigenase. Sementara adanya puncak reduksi menunjukkan terjadinya reaksi reduksi akibat enzim dehidrogenase. Hasil seleksi menunjukkan bahwa isolat kedua merupakan isolat terpilih yang memberikan aktivitas bakteri tinggi dalam mendeteksi benzena. Isolat dua memiliki nilai puncak oksidasi 120,1  $\mu\text{A}$ . Isolat ini membuktikan bakteri tersebut tumbuh menggunakan benzena sebagai sumber karbon dan memberikan daya tahan bakteri yang cukup lama dibandingkan ketiga isolat yang lain. Selanjutnya mengkarakterisasi bakteri isolat terpilih secara makroskopik dan mikroskopik melalui metode pewarnaan Gram.



**Gambar 3.** Koloni pada media agar (kiri) dan pewarnaan Gram bakteri (kanan)

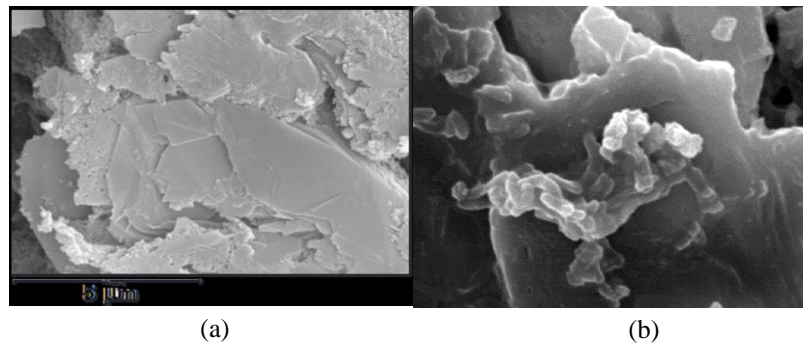
Gambar 3 sebelah kiri menunjukkan purifikasi isolat kedua pada media *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA). Bentuk koloni yang besar, halus, permukaan rata dan berwarna kuning kehijauan. Karakterisasi bakteri melalui pewarnaan Gram mengacu pada *Bergey's Manual Determinative Bacteriology seven edition* (Gambar 3 kanan). Bakteri memiliki sifat sel yang memanjang, berbentuk batang pendek, gram negatif, aerobik, dan tumbuh dengan baik dan cepat di permukaan media pada suhu 37 °C yang menyerupai famili *Pseudomonadanceae* genus *Pseudomonas* spesies *Pseudomonas* sp (Breed RS, Murray EGD, Smith NR. 1975). *Pseudomonas* mampu mengoksidasi hidrokarbon secara aerob. Hal ini menunjukkan bakteri hasil seleksi mampu mengoksidasi senyawa benzena.

### Aktivitas Biofilm *Pseudomonas* sp.



**Gambar 4** Grafik pembentukan dan pertumbuhan biofilm *Pseudomonas* sp melalui metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* (OD<sub>595</sub> nm)

Gambar 4 menunjukkan hasil uji pembentukan dan pertumbuhan biofilm yang digunakan untuk mengetahui berapa waktu yang dibutuhkan bakteri *Pseudomonas* sp untuk membentuk biofilm. Hasil rata-rata pembacaan kerapatan sel pembentuk biofilm melalui metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* sebesar 0.211 dalam waktu 2 hari. Meskipun dengan OD yang tidak begitu besar, *Pseudomonas* sp tetap berpotensi membentuk biofilm. Oleh karena itu, biofilm *Pseudomonas* sp dibentuk di atas permukaan SPCE untuk mendeteksi benzena. Pencirian Biofilm dilakukan untuk melihat biofilm yang dibentuk oleh *Pseudomonas* sp dan bentuk dari bakteri *Pseudomonas* sp pada permukaan SPCE menggunakan *Scanning Microscope Electron* (SEM)



**Gambar 5.** Morfologi permukaan elektrode kerja pada SPCE (Dropsens 2016) (a); Morfologi permukaan SPCE biofilm *Pseudomonas* sp. pada perbesaran 7.500 kali (b)

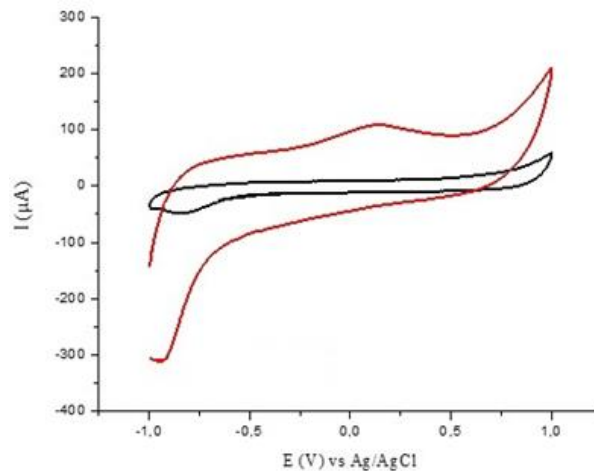
Berdasarkan hasil SEM pada gambar 5, morfologi *Pseudomonas* sp pada SPCE berbentuk batang dan bergerombol atau berkoloni. Hal ini sesuai dengan hasil SEM oleh penelitian Donlan 2002 terhadap biofilm *Pseudomonas* sp yaitu berbentuk batang. *Pseudomonas* sp. yang diimobilisasi pada permukaan SPCE akan mengendap dan bergerombol mengikuti gaya gravitasi kemudian membentuk biofilm (Donlan dkk., 2002). Biofilm berupa matriks polimer ekstraseluler yang tersusun dari polisakarida, protein, asam nukleat, dan lipid. Biofilm tersebut akan melindungi sel dari kondisi lingkungan yang ekstrem, sehingga sel masih tetap hidup dalam waktu yang lama meskipun tanpa nutrisi. Bakteri yang telah membentuk biofilm akan lebih tahan terhadap zat antimikroba

dibandingkan bakteri planktoni /k atau yang tidak membentuk biofilm (Pantanella F dkk., 2013).

### Konstruksi pengukuran biosensor benzena berbasis biofilm

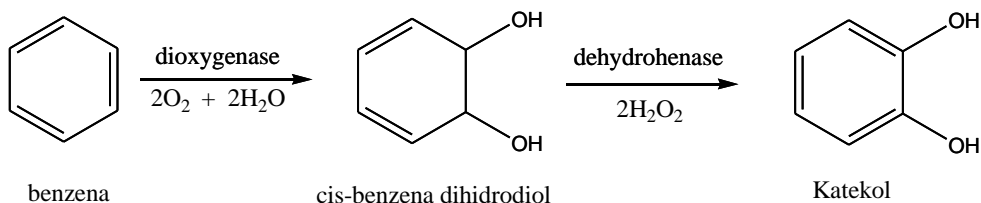
Sel *Pseudomonas* sp. dalam buffer fosfat diimobilisasi ke atas permukaan elektrode kerja sebanyak 100  $\mu$ L, lalu didiamkan selama 2 hari pada suhu ruang dan terlindung dari cahaya matahari di tempat yang kering. Matriks elektrode karbon memberikan sistem adsorpsi fisik pada proses imobilisasinya. Hal ini karena karbon memiliki diameter dan luas permukaan yang cukup besar sehingga memudahkan bakteri untuk teradsorpsi pada permukaan dan bertahan hidup membentuk biofilm. Penggunaan biosensor benzena di lingkungan secara komersial umumnya dilakukan pada suhu ruang. Penyimpanan pada suhu ruang 27-30  $^{\circ}$ C membuat SPCE akan bekerja optimum pada suhu tersebut. Pengukuran dilakukan dengan larutan benzena 3 mM dalam buffer fosfat pH 76.8 50 mM sebagai analit atau substrat, sedangkan buffer fosfat digunakan sebagai blanko. Jendela potensial diatur pada -1 V sampai +1 V. Kecepatan payar digunakan yang paling tinggi yaitu 100 mV/s

Pendeteksian benzena sebagai penentuan aktivitas biofilm dilakukan dengan mengukur arus oksidasi yang dihasilkan dari reaksi antara substrat dengan enzim secara voltametri siklik. Substrat yang digunakan ialah larutan simulasi benzena 3 mM dan enzim yang digunakan ialah benzena dioksigenase yang terekskresikan oleh *Pseudomonas* sp. pada permukaan SPCE.



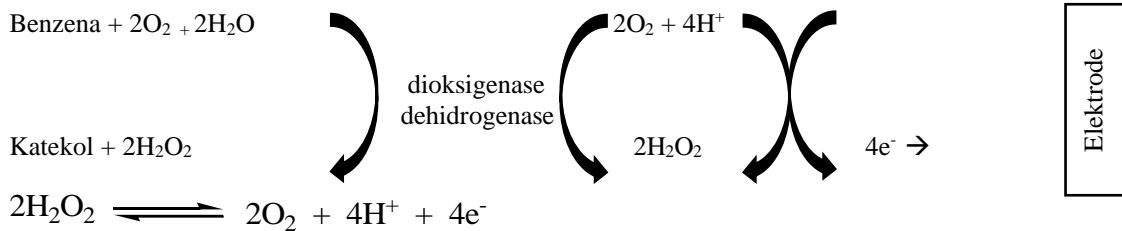
**Gambar 6 .** Voltammogram siklik benzena 3 mM dalam buffer fosfat pH 6.8 50 mMyang diukur dengan SPCE biofilm pada jendela potensial -1 V sampai +1V dengan kecepatan payar 100 mV/s ( — buffer fosfat 50 mM pH 6.8; — Benzena 3 mM dalam buffer fosfat 50 mM pH 6.8)

Pada gambar 6 menunjukkan puncak arus oksidasi benzena 3 mM dalam buffer fosfat 50 mM pH 6.8 dengan SPCE biofilm ialah sebesar 108.7  $\mu$ A dengan waktu respon 11.40 detik. Lanyon (2006) telah membuat biosensor benzena dengan mengimobilisasi 50  $\mu$ l kultur bakteri OD 0.7 ke permukaan SPE, hasil menunjukkan arus pengukuran benzena



paling tinggi 25  $\mu\text{A}$ . Hasil tersebut jauh lebih rendah dibandingkan penelitian ini. Keberhasilan penggunaan bakteri *Pseudomonas* dalam upaya pendeteksian cemaran benzena membutuhkan pemahaman tentang mekanisme interaksi antara bakteri dengan senyawa benzena sebagai berikut (Gambar 7 dan Gambar 8).

Gambar 7. Reaksi oksidasi dan reduksi benzena



Gambar 8 Mekanisme oksidasi benzena melalui sel bakteri *Pseudomonas* sp.

Katalisis dilakukan dengan cara membuka cincin benzena yang dibantu dengan keberadaan oksigen sebagai oksidator untuk menghasilkan katekol dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Gambar 8). Reaksi redoks yang dapat balik antara oksigen dengan hidrogen peroksida ini akan menghasilkan elektron. Transfer elektron tersebut menyebabkan timbulnya arus yang kemudian dikirim oleh elektrode menuju transduser dalam bentuk sinyal. Sinyal ini oleh transduser akan diubah menjadi gelombang elektromagnetik yang dapat dibaca dan terekam oleh *recorder* sebagai puncak arus oksidasi benzena.

## SIMPULAN

Bakteri *Pseudomonas* sp. hasil isolasi minyak bumi menunjukkan bakteri terbaik sebagai molekul pengenal senyawa benzena. Hasil menunjukkan puncak arus oksidasi benzena 3 mM dalam buffer fosfat 50 mM pH 6.8 dengan SPCE yang terimobilisasi biofilm sebesar 108.7  $\mu\text{A}$  dengan waktu respon 11.40 detik. Ini membuktikan bahwa imobilisasi sel *Pseudomonas* sp. berbasis biofilm pada SPCE berpotensi sebagai bioreseptor yang dapat digunakan dalam mendeteksi benzena di lingkungan secara praktis, murah, dan mampu dikembangkan menjadi prototipe.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanti D, Dyah I, Sugita P, Novik N, Hefni E, Ali AG, & Yehezkiel SK. (2020). Highly Sensitive Phenol Biosensor Utilizing Selected Bacillus Biofilm Through an Electrochemical Method. *Makara Journal of Science* 24(1). doi: 10.7454/mss.v24i1.11726.
- Breed RS, Murray EGD, & Smith NR. (1975). *Bergey's manual of determinative bacteriology seven edition*. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- Davey ME & George AO. (2000). Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4):847–67. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000.
- Dawson JJC, Iroegbu CO, Maciel H, & Paton GI. (2007). Application of Luminescent Biosensors for Monitoring the Degradation and Toxicity of BTEX Compounds in Soils. *Journal of Applied Microbiology* 0(0):071008041820009-??? doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03552.x.



- Donlan RM & J. William C. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15(2):167–93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
- Febryanti A, Mulijani S, Iswantini D, & Nurhidayat N. (2018). Antioxidant Biosensor Based on *Deinococcus Radiodurans* Biofilm Immobilized on Screen-Printed Carbon Electrode (SPCE) Surface. *Vandana Publicatons* 5(4):1-7.
- Gu X, Trybilo M, Ramsay S, Jensen M, Fulton R, Rosser S, & Gilbert D. (2010). Engineering a Novel Self-Powering Electrochemical Biosensor. *Systems and Synthetic Biology* 4(3):203–14. doi: 10.1007/s11693-010-9063-2.
- Iswantini D, Nurhidayat N, & Sarah. (2017). Enhancing Activity and Stability of Uricase from *Lactobacillus Plantarum* by Zeolite Immobilization. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 58:012009. doi: 10.1088/1755-1315/58/1/012009.
- Iswantini D, Ghozali AA, Kusmana C, & Nurhidayat N. (2021). Evaluation of Bacterial Biofilm as Biosensor for Detecting Phenol, Catechol, and 1,2-Dihydroxynaphthalene. *HAYATI Journal of Biosciences* 28(4):262–70. doi: 10.4308/hjb.28.4.262-270.
- Iswantini D, Nurhidayat N, & Trivadila. (2011). Glucose Biosensor Using Selected Indonesian Bacteria. *Microbiology Indonesia* 5(1):9–14. doi: 10.5454/mi.5.1.2.
- Kivirand K, Kagan M, & Rinke T. (2013). Calibrating Biosensors in Flow-Through Set-Ups: Studies with Glucose Optrodes. in *State of the Art in Biosensors - General Aspects*, edited by T. Rinke. InTech.
- Lanyon, Yvonne H., Ibtisam ET, & Marco M. (2006). An Amperometric Bacterial Biosensor Based on Gold Screen-Printed Electrodes for the Detection of Benzene. *Analytical Letters* 39(8):1669–81. doi: 10.1080/00032710600713784.
- Digabel YL, Beggah S, & Meer JR. (2015). Measurements of Hydrocarbon Pollutants in Aqueous Samples Using Bacterial Bioreporter Assays. Pp. 247–57 in *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, Springer Protocols Handbooks*, edited by T. J. McGenity, K. N. Timmis, and B. Nogales. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Merritt JH, Daniel EK, & George AO. (2011). Growing and Analyzing Static Biofilms. *Current Protocols in Microbiology* 22(1). doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s22.
- Moreau J & Rinnert E. (2015). Fast Identification and Quantification of BTEX Coupling by Raman Spectrometry and Chemometrics. *The Analyst* 140(10):3535–42. doi: 10.1039/C5AN00035A.
- Moretto, Ligia M, & Kurt K. (2014). Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors: *Fundamentals*. New York, NY: Springer New York.

- Obayori OS & Salam LB. (2010). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Role of Plasmids. *Sci. Res. Essays* 14.
- Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, & Berlutti F. (2013). Analytical Techniques to Study Microbial Biofilm on Abiotic Surfaces: Pros and Cons of the Main Techniques Currently in Use. 12.
- Vinci G, Antonelli ML, & Preti R. (2013). Rapid Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Rainwater by Liquid-Liquid Microextraction and LC with Core-Shell Particles Column and Fluorescence Detection: Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science* 36(3):461–68. doi: 10.1002/jssc.201200854.
- Xu Z, Mulchandani A, & Chen W. (2003). Detection of Benzene, Toluene, Ethyl Benzene, and Xylenes (BTEX) Using Toluene Dioxygenase-Peroxidase Coupling Reactions. *Biotechnology Progress* 19(6):1812–15. doi: 10.1021/bp0341794.
- Zhang Q, Ding J, Kou L, & Qin W. 2013. A Potentiometric Flow Biosensor Based on Ammonia-Oxidizing Bacteria for the Detection of Toxicity in Water. *Sensors* 13(6):6936–45. doi: 10.3390/s130606936.