

STANDAR FILTER UNTUK KALIBRASI *MICRO PLATE READER*

Boedi Soesatyo dan Mego Pinandito

Abstract

Micro plate reader is an instrument that is used in plant virus or bacteria analysis based on optical density. Testing laboratories that use this instrument as analytical instrument should consider that this instrument must be well calibrated. The calibration of this instrument can be carry out by the accredited calibration laboratory, but in fact, now the calibration of micro plate reader still could not be realized. As a metrology research laboratory, regarding to the main scope of activities and research on the field of radiometry photometry, it would be possible to carry out a research on filter standard measurement in order to support the calibration of micro plate reader based on optical density. The filter standard used in this research is the Neutral Density Filter (NDF) that its the transmission factor on wavelength of 405 nm had been measured by using monochromator, and photomultiplier (PMT) as a sensor with electric current output ,so that the optical density can be determined. As the result of this research, it shows that in the calibration of micro plate reader, there was a correction of positive (+) 0.047 OD with the measurement uncertainty of ± 0.013 OD.

Keywords: filter standard, calibration, micro plate reader

1. PENDAHULUAN

Microplate reader adalah alat untuk menganalisa virus atau bakteri tanaman berdasarkan densitas optik dimana antara referensi, buffer dan bahan yang diuji ditempatkan pada plate.

Laboratorium uji yang menggunakan microplate reader untuk alat ukur harus terkalibrasi, karena itu merupakan persyaratan disamping juga dalam pengajuan akreditasi. Kalibrasi alat ukur dapat dilakukan pada laboratorium kalibrasi yang terakreditasi^[1], tapi pada kenyataannya untuk kalibrasi microplate reader belum dapat dilakukan. Sebagai laboratorium metrologi bidang radio fotometri dan sesuai dengan ruang lingkup kegiatannya dimungkinkan untuk melakukan penelitian sistem pengukuran standar filter untuk kalibrasi microplate reader berdasarkan densitas optik.

Lampu halogen sebagai sumber cahaya tipe A rencananya akan digunakan sebagai sumber cahaya pada monokromator dan photomultiplier sebagai sensor pada sistem pengukurannya. Standar filter yang digunakan adalah Neutral Density Filter yang mempunyai attenuasi dari daerah tampak sampai dekat dengan infra merah.

Neutral Density Filter (NDF) diukur transmisinya pada panjang gelombang 405 nm menggunakan monokromator dan photomultiplier (PMT) dengan keluaran arus sebagai sensor serta lampu halogen sebagai sumber.

Dari hasil transmisi Neutral Density Filter pada panjang gelombang 405 nm dapat ditentukan densitas optiknya, kemudian

dilakukan percobaan kalibrasi terhadap alat microplate reader yang hasilnya merupakan Optical Density (Densitas Optik). Dari hasil kalibrasi microplate reader ada koreksi sebesar 0.047 OD.

2. TEORI DASAR

Monokromator adalah elemen optik pemisah panjang gelombang yang berupa kisi (*grating*). Kisi terdiri dari sejumlah besar alur-alur yang sejajar yang berada di atas permukaan mengkilap, sehingga memantulkan semua sinar yang datang.

Cahaya yang jatuh ke permukaan kisi akan didifraksikan oleh setiap alur pada daerah sudut tertentu dan ke arah tertentu, akan terjadi interferensi konstruktif pada setiap pantulan yang dinyatakan dengan rumus kisi^[2,3]:

$$b (\sin i + \sin r) = m \lambda \quad (1)$$

dimana:

b = jarak antara alur

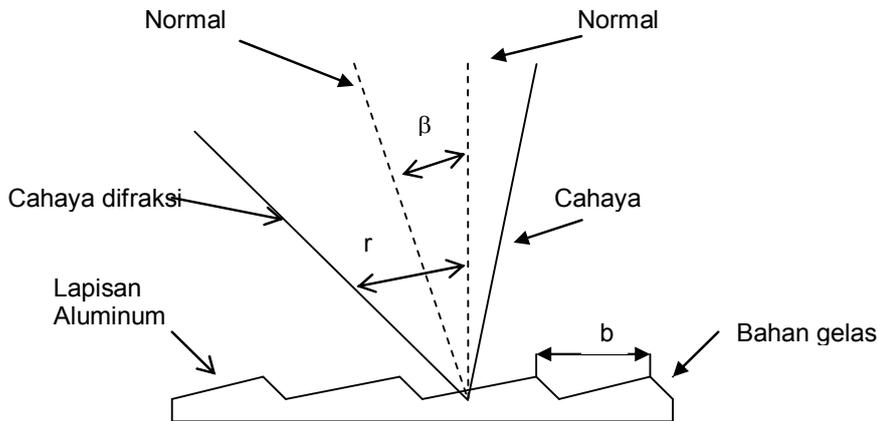
i = sudut cahaya jatuh

r = sudut difraksi

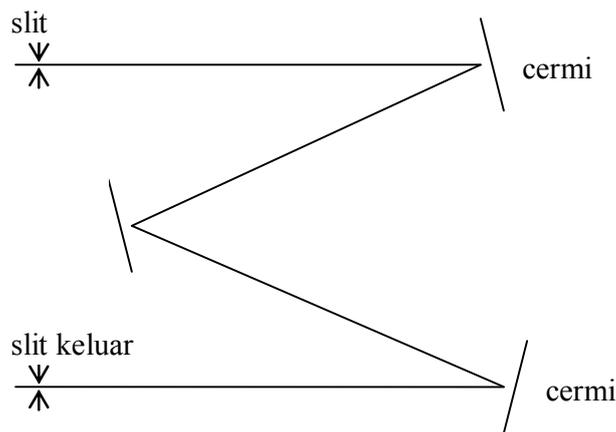
m = orde dari kisi yang terjadi (0, 1, 2.....n)

λ = panjang gelombang

Makin banyak alur persatuan panjang (millimeter) makin besar sudut difraksinya. Konstruksi sistem monokromator ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1 Potongan Melintang dari Kisi/Grating Difraksi



Gambar 2 Konstruksi Czerny – Turner

Untuk mendapatkan panjang gelombang yang diinginkan maka posisi kisi diputar pada sumbunya. Karena spektrum yang terjadi mempunyai $\Delta \lambda$ yang sama, maka skala dari panjang gelombang akan linier. Kegunaan dari slit masuk adalah untuk mempersempit berkas cahaya sehingga setelah terjadi dispersi, dapat dicegah terjadinya tumpah tindih (*overlapping*) dari citra monokromatis. Sedangkan kegunaan $\lambda = 405 \text{ nm}$

Densitas Optik dari filter ditentukan dengan persamaan ^[3,4,5].

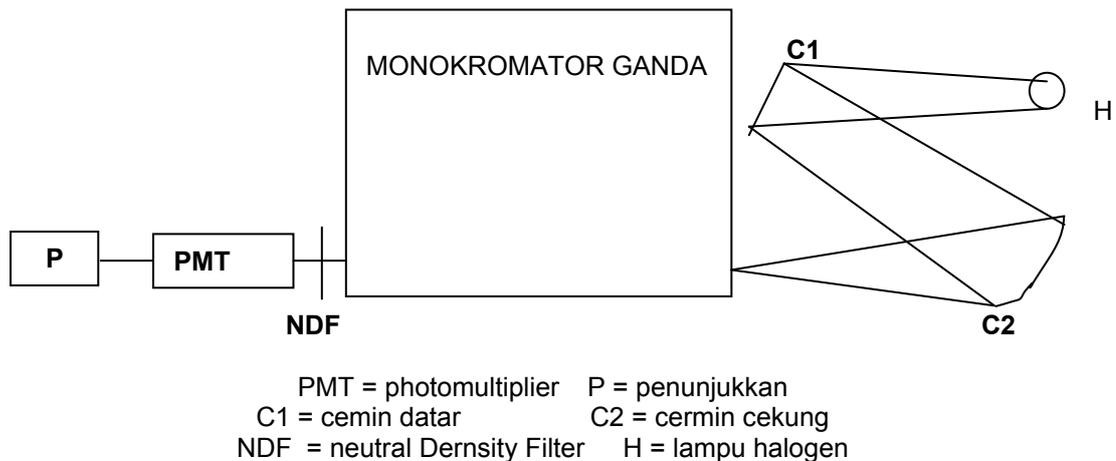
$$\text{Densitas Optik} = \log (1/T_\lambda) \quad (3)$$

dari slit keluar adalah untuk mengisolasi satu daerah panjang gelombang.

Transmisi dari filter pada panjang gelombang tertentu ditentukan dengan persamaan ^[3,4,5].

Transmisi dari filter

$$T_\lambda = \frac{\text{Keluaran PMT dgn filter pada } \lambda}{\text{Keluaran PMT tan pa filter pada } \lambda} \quad (2)$$



Gambar 3 Susunan pengukuran densitas optik standar filter dengan monokromator

3. PERCOBAAN DAN HASIL

Sistem pengukuran densitas optik standar filter untuk keperluan kalibrasi microplate reader dengan susunan seperti pada Gambar 3.

Monokromator diset pada panjang gelombang 405 nm, lampu halogen sebagai sumber cahaya tipe A (2856 K) dinyalakan pada arus tertentu. Keluaran monokromator pada panjang gelombang 405 nm tanpa filter diukur dengan photomultiplier (PMT) yang berupa arus

hasilnya diset sama dengan $0.0100 \times 10^{-5} \text{A}$ menggunakan attenuator, kemudian Neutral Density Filter (NDF) 1 = F1 ditempatkan sesuai dengan susunan Gambar 3 maka keluaran monokromator pada panjang gelombang 405 nm dengan filter diukur dengan photomultiplier (PMT) yang berupa arus (nilai transmisi filter) ditunjukkan langsung. Kemudian dengan cara yang sama dilakukan terhadap NDF 2 = F2 dan NDF 3 = F3 dan jika dibuat tabel seperti pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil Keluaran Rata-Rata Arus Photomultiplier

λ (nm)	PMT Tanpa Filter ($\times 10^{-5} \text{A}$)	Keluaran PMT dengan filter ($\times 10^{-5} \text{A}$)		
		F1	F2	F3
405	Blank 0.100	0.070	0.0476	0.708

4. PEMBAHASAN

Dilihat dari hasil keluaran arus photomultiplier pada Tabel 1 nilai transmisi dan densitas dari filter ditentukan dengan menggunakan persamaan (1) dan (2). Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Kemudian standar filter tersebut digunakan untuk kalibrasi microplate reader pada panjang gelombang 405 nm^[5], filter ditempatkan pada plate yang kosong, dengan mengikuti perintah pada alat sampai pada perintah ukur maka filter dan plate akan di scan dan hasilnya seperti pada Tabel 3.

Tabel 2 Transmisi dan Densitas Optik dari Standar Filter

(nm)	PMT Tanpa Filter x 10 ⁻⁵ A	Keluaran PMT dengan Filter x 10 ⁻⁵ A			Transmisi			Densitas Optik		
		F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
405	Blank 0.100	0.070	0.0476	0.708	0.070	0.0476	0.708	1.155	0.322	0.150

Tabel 3 Data Hasil Kalibrasi Microplate Reader dengan Standar Filter F1,F2,F3

Filter 1 = 1.155 OD

I	II	III	IV	V	Rata-Rata	
1.22	1.218	1.215	1.212	1.208	1.2146	
1.213	1.21	1.209	1.205	1.2	1.2074	
1.205	1.203	1.2	1.196	1.193	1.1994	
1.197	1.195	1.192	1.189	1.184	1.1914	
1.189	1.187	1.184	1.18	1.177	1.1834	
					1.19924	
					stdev	0.012399
					u2	0.005545

Filter 2 = 0.322 OD

I	II	III	IV	V	Rata-Rata	
0.376	0.374	0.37	0.366	0.364	0.370	
0.378	0.372	0.37	0.366	0.362	0.370	
0.376	0.372	0.369	0.366	0.362	0.369	
0.375	0.371	0.368	0.365	0.362	0.368	
0.375	0.371	0.369	0.364	0.362	0.368	
					0.369	
					stdev	0.001
					u2	0.000363

Filter 3 = 0.150 OD

I	II	III	IV	V	Rata-Rata	
0.2	0.2	0.201	0.2	0.2	0.2002	
0.201	0.199	0.199	0.199	0.199	0.1994	
0.199	0.199	0.198	0.198	0.199	0.1986	
0.198	0.198	0.198	0.199	0.198	0.1982	
0.197	0.198	0.199	0.198	0.198	0.198	
0.199	0.1988	0.199	0.1988	0.1988	0.19888	
					0.19888	
					stdev	0.000816
					u2	0.000365

Dilihat dari hasil kalibrasi Tabel 3 bahwa dari penunjukkan alat setiap angka I sampai dengan angka V itu mempunyai 5 (lima) data, maka setiap filter dari F1 (filter 1) sampai dengan F3

(filter3) mempunyai data sebanyak 25 data dengan penunjukkan densitas optik adalah 3 angka dibelakang koma. Untuk perhitungan ketidakpastian pengukuran dari kalibrasi microplate reader diperlukan data ketidakpastian

pengukuran dari standar filter yang digunakan dan spesifikasi dari alat yaitu sebagai berikut:
Ketidakpastian pengukuran standar filter u_s : ± 0.005 OD

Spesifikasi dari alat yang dikalibrasi, mempunyai ketelitian u_1 : ± 0.010 OD
Perhitungan ketidakpastian pengukuran:

Tabel 4 Perhitungan Ketidakpastian Pengukuran

Artefact:	Microplate Reader
Method:	Optical Density
Ref.Stan:	Neutral Density Filter
Uncert.Eq.:	OD = Ods + correction

Filter 1

Uncert source/ Komponen	Unit/ Satuan	Distribusi	Symbol	Expanded Uncert/ U	Cov. Factor/ Pembagi	Deg.of freedom/ ν_i	Std. Uncert/ ui	Sens. Coeff/ ci	ci.ui
Accuracy Repeatability of measurement OD Filter	OD	Rect	u1	0.01	1.732051	~	0.0057735		
	A	Normal	u2	0.0055449	2.236068	4	0.00247974		
	OD	Normal	us	0.005	2	30	0.00628351 0.0025	1 1	0.006284 0.0025
Com.uncert,uc									0.006763
Eff.Deg.of freedom,neff									1.42E+27
Cov.Fac.for 95% CL									1.96
Expanded uncert.,U95									0.0123355

Filter 2

Uncert source/ Komponen	Unit/ Satuan	Distribusi	Symbol	Expanded Uncert/ U	Cov. Factor/ Pembagi	Deg.of freedom/ ν_i	Std. Uncert/ ui	Sens. Coeff/ ci	ci.ui
Accuracy Repeatability of measurement OD Filter	OD	Rect	u1	0.01	1.732051	~	0.0057735		
	A	Normal	u2	0.0003633	2.236068	4	0.00016248		
	OD	Normal	Us	0.005	2	30	0.00577579 0.0025	1 1	0.0057758 0.0025
Com.uncert,uc									0.0062936
Eff.Deg.of freedom,neff									4.09E+27
Cov.Fac.for 95% CL									1.96
Expanded uncert.,U95									0.0123355

Filter 3

Uncert source/ Komponen	Unit/ Satuan	Distribusi	Symbol	Expanded Uncert/ U	Cov. Factor/ Pembagi	Deg.of freedom/ ν_i	Std. Uncert/ ui	Sens. Coeff/ ci	ci.ui
Accuracy Repeatability of measurement OD Filter	OD	Rect	u1	0.01	1.732051		0.0057735		
	A	Normal	u2	0.0008158	2.236068	4	0.00036486		
	OD	Normal	us	0.005	2	30	0.00578502 0.0025	1 1	0.005785 0.0025
Com.uncert,uc									0.006302
Eff.Deg.of freedom,neff									4.01E+27
Cov.Fac.for 95% CL									1.96
Expanded uncert.,U95									0.0123355

Ketidakpastian pengukuran dari standar filter :	F1	0.013255
	F2	0.012336
	F3	0.012352
	Rata-Rata	0.012647

Tabel 5 Hasil Kalibrasi Microplate Reader pada $\lambda=405$ nm Menggunakan Standar Filter F1, F2 dan F3

No Filter	Standar (OD)	Penunjukkan Alat (OD)	Koreksi (OD)
F1	1.155	1.199	0.044
F2	0.322	0.369	0.047
F3	0.150	0.199	0.049
		Rata-Rata	0.047

Ketidakpastian pengukuran dari kalibrasi microplate reader menggunakan standar filter F1, F2 dan F3 adalah sebesar: ± 0.013 OD, dengan koreksi sebesar $+ 0.047$ OD. Microplate reader yang dikalibrasi tersebut di atas adalah microplate reader yang digunakan menganalisa virus atau bakteri tanaman berdasarkan densitas optik. Microplate reader tersebut bekerja pada panjang gelombang 405 nm, dimana antara referensi, buffer dan bahan yang diuji ditempatkan pada plate, kemudian dianalisa reader didapat OD (*Optical Density* = densitas optik) pada setiap plate yang diberi bahan. Dengan metoda elisa^[6] densitas optik tersebut dihitung dan hasilnya tanaman tersebut ada virus atau tidak. Dilihat dari keluaran/penunjukan alat adalah OD (*Optical Density*) maka sistem pengukurannya adalah transmisi, bahwa plate akan mengurangi sumber cahaya yang melewati, jadi dalam melakukan kalibrasi plate harus disertakan, sedangkan bahan diganti dengan filter dan merupakan satu kesatuan.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Kalibrasi microplate reader pada panjang gelombang 405 nm dapat dilakukan menggunakan standar filter F1, F2 dan F3 dengan koreksi sebesar $+ 0.047$ OD, ketidakpastian pengukuran ± 0.013 .

Perlu dilakukan penelitian selanjutnya untuk kalibrasi microplate reader pada panjang gelombang di atas 405 nm.

2. IES *Lihgting Hand Book*, Illuminating Engineering Society. New York 1978.
3. Manual Microplate Reader
4. *Metrologi: Sebuah Pengantar*, Puslit KIM-LIPI, 2005.
5. Prosiding Pertemuan Ilmiah XIX HFI Jateng & DIY, Yogyakarta 24 April 1999.
6. Sunartoto Gunadi, Boedi Soesatyo, Sugiono, *Sistem Kalibrasi Densitometer Menggunakan Sumber Cahaya Tipe A*.
7. Willard, Merrit, Dean, *Instrumental Methods of Analysis*, D Van Nostrand Company 1974.

BIODATA

Boedi Soesatyo, saat ini bekerja di Pusat Penelitian Kalibrasi Instrumentasi dan Metrologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Penulis menamatkan Pasca Sarjana Bidang Opto-elektroteknika dan Aplikasi Laser Universitas Indonesia pada tahun 1992. Sejak tahun 2003 penulis menjabat sebagai Peneliti Utama bidang Teknik Interdisiplin di Laboratorium Metrologi Radiometri Fotometri.

Mego Pinandito, saat ini bekerja di Pusat Penelitian Kalibrasi Instrumentasi dan Metrologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Penulis menamatkan pendidikan S1 dan S2 bidang Elektronika Ehime University tahun 1992 dan 1994 dan S3 dari Shinshu University, Jepang tahun 2001. Saat ini penulis menjabat sebagai Peneliti bidang Instrumentasi Optik di Laboratorium Metrologi Radiometri Fotometri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ewing, G.W, *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Mc Graw-Hill 4th, Edition, 1975.