Jurnal Sains dan Edukasi Sains
Vol.6, No.2, Agustus 2023: 117-123
https://doi.org/10.24246/juses.v6i2p117-123

Optimasi Tegangan Akselerasi pada *Scanning Electron Microscope – Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy* (SEM-EDX) untuk Pengamatan Morfologi Sampel Biologi

Halimahtus Sahdiah[1,3,*], Robi Kurniawan[1,2,3]

[1]Laboratorium Mineral dan Material Maju, FMIPA, Universitas Negeri Malang
[2]Departemen Fisika, Universitas Negeri Malang
[3]Pusat Unggulan Iptek Perguruan Tinggi (PUI-PT), *Centre of Advance Materials and Renewable Energy* (CAMRY)

*email korespondensi: halimahtus.sahdiah@um.ac.id

Received: 6 Juli 2023; ***Revised***: 31 Juli 2023; ***Accepted***: 31 Agustus 2023; ***Published***: 2 September 2023

ABSTRAK

Scanning Electron Microscope – Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDX) merupakan metode yang yang digunakan untuk pengamatan morfologi permukaan dan unsur kandungan berbagai jenis sampel padat dengan prinsip tembakan elektron. Keunggulan pengamatan perbesaran tinggi dan kemampuan deteksi unsur kandungan mulai dari unsur organik hingga anorganik menyebabkan penggunaannya sangat luas termasuk dalam pengamatan sampel biologi. Di Laboratorium Mineral dan Material Maju FMIPA telah banyak mendapat permintaan pengamatan sampel biologi menggunakan SEM-EDX. Akan tetapi, dalam penerapan pengondisian sampel biologi seringkali mendapati kendala hasil yang kurang maksimal. Pada sampel biologi tentu saja tidak hanya pengondisian sampel yang harus diperhatikan, melainkan juga faktor-faktor penting lainnya yaitu pengondisian peralatannya seperti tegangan akselerasi yang digunakan. Untuk didapatkan hasil yang maksimal, tegangan akselerasi sangatlah penting, faktor ini menentukan besarnya energi dan kedalaman tembakan elektron yang mengenai sampel. Dengan kondisi sampel yang kurang stabil namun diinginkan hasil morfologi yang maksimal serta unsur kandungan lengkap maka perlu dilakukan pengamatan dan penentuan optimalisasi tegangan akselerasi pada SEM EDX untuk pengamatan sampel biologi. Pada tulisan ini dilakukan pembahasan penentuan optimalisasi tegangan akselerasi pada pengamatan sampel biologi menggunakan tegangan akselerasi 5 kV hingga 30 kV. Hasil analisa SEM sampel biologi menunjukkan fenomena charging pada tegangan lebih dari 15 kV dan hasil analisa EDX menunjukkan pada tegangan kurang dari 15 kV beberapa kandungan unsur tidak terbaca.

Kata-kata kunci: morfologi; optimasi; sampel biologi; SEM-EDX; tegangan akselerasi

PENDAHULUAN

SEM (*Scanning Electron Microscope*) – EDX (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*) merupakan metode yang secara luas digunakan untuk pengamatan morfologi permukaan, struktur, dan pemetaan kandungan berbagai jenis sampel mulai dari bahan alam, organik, anorganik, polimer, logam hingga sampel biologi (Pretorius, 2010). Metode pengamatan ini menggunakan berkas elektron pancaran energi tinggi untuk memindai objek sehingga menghasilkan citra dan komposisi sampel. Berkas elektron yang digunakan sebagai sumber memiliki panjang gelombang puluhan ribu kali lebih pendek dari panjang gelombang cahaya tampak sehingga citra yang dihasilkan metode ini memiliki resolusi dan detail gambar yang lebih baik daripada mikroskop optik (Masta, 2020). Prinsip tersebut membuat metode ini memiliki keunggulan lebih dan sangat digemari jika dibandingkan mikroskop optik. Metode ini dapat menghasilkan citra gambar tiga dimensi dengan perbesaran dan resolusi yang jauh lebih tinggi (Yañez & Barbosa, 2003).

Untuk dapat dihasilkan citra gambar yang baik maka hal yang penting harus dilakukan diantaranya pengondisian sampel sehingga sampel bersifat konduktif dan dapat mengalirkan elektron (Ichinokawa et al., 1974). Dalam penelitian sebelumnya, telah dipaparkan mengenai metode pengondisian sampel biologi, disamping menggunakan *coating* Au-Pd juga sebagai alternatif digunakan pelapisan cairan ionik (Hanif et al., n.d.). Namun, selain pengondisian sampel juga terdapat pengondisian instrumen yang juga menjadi parameter yang sangat penting, salah satunya adalah penentuan tegangan akselerasi (Tang et al., 2017).

Tegangan akselerasi adalah beda potensial pemercepat elektron yang diterapkan pada fillament mulai dari 0,2 kV hingga 30 kV. Tegangan akselerasi akan berpengaruh pada kedalaman penetrasi elektron ke dalam sampel (Masta, 2020). Penentuan tegangan akselerasi ini dapat memberikan dampak yang signifikan terhadap kualitas gambar pada umumnya resolusi, kecerahan, dan kontras gambar. Selain itu, kedalaman penetrasi elektron dapat berpengaruh dalam penentuan unsur kandungan sampel yang diamati (Masta, 2020). Namun kedalaman penetrasi elektron ke dalam sampel disertai energi yg cukup besar ini terkadang menyebabkan *defect*/kerusakan terhadap permukaan sampel khususnya sampel biologi. Hal tersebut dikarenakan sampel biologi memiliki banyak kandungan cairan, berikatan lemah, dan terdapat banyak rongga (Adhika et al., 2018). Penelitian sebelumnya telah melakukan pengamatan terhadap sampel trombosit darah manusia namun tidak didapatkan perbedaan yang signifikan dikarenakan variasi tegangan akselerasi yang sedikit dan hanya dalam lingkup tegangan rendah (Pretorius, 2010). Dalam penelitian tersebut juga hanya membahas tentang morfologi saja tetapi tidak membahas korelasi tegangan akselerasi dengan membacaan kandungan unsur pada sampel. Untuk itu, perlu dilakukan kajian lebih mendalam terkait pengondisian alat pada pengamatan sampel biologi baik secara morfologi juga pembacaan kandungan unsur sampel agar didapatkan resolusi terbaik dan kandungan lengkap dengan pengondisian tegangan akselerasi yang optimum pada *Scanning Electron Mcroscope – Energy Dispersive X-Ray spectroscopy* (SEM-EDX) untuk pengamatan morfologi sampel biologi.

EKSPERIMEN

Alat dan Bahan

Sampel biologi diperoleh dari bagian tanaman yang lunak yaitu kepala putik bunga dan jamur patogen yang menginfeksi tanaman. Bahan kimia yang digunakan berderajat PA (*Pro Analysis)* dan teknis meliputi Etanol dan PDA (*Potato dextrose agar)* dari Merck, Alkohol, NaOCl, dan akuades dari Onemed. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *incubator autoclave*, timbangan analitik, *hot plate,* mikropipet, pinset, kaca preparat, dan peralatan gelas.

Instrumen

Instrumen utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah SEM (*Scanning Electron Microscopy*) – EDX (*Energy Dispersive X-Ray*) Merk FEI Inspect S50 – EDAX Ametex Element dengan parameter WD (*Working Distance*) 6-10 mm, spot 3,5-4,5. Instrumen penunjang yang digunakan yaitu Mini Sputer Coater Merk Emitech SC762.

Prosedur Kerja

Penyiapan Sampel

Penyiapan sampel dilakukan untuk beberapa jenis sampel uji, yaitu sampel bagian lunak tanaman kepala putik bunga, jamur patogen, dan sampel logam sebagai pembanding. Pada sampel bagian tanaman dilakukan pemotongan spesimen putik bunga dengan pisau bedah steril dan dilakukan proses dehidrasi (Hanif et al., n.d.). Pada sampel jamur dilakukan isolasi jamur patogen dari buah yang menunjukkan gejala penyakit yang diperoleh dilapangan. Dengan melakukan pemotongan daerah buah yang terinfeksi dan selanjutnya direndam dalam NaOCl 1% , alkohol 70%, dan akuades steril masing- masing selama 1 menit lalu dikeringanginkan dan ditanam pada media PDA secara aseptik (Indratmi, 2009). Selanjutnya, dilakukan proses inkubasi pada isolat selama 5-7 hari.

Preparasi Sampel Pengujian SEM-EDX

Preparasi sampel untuk sampel jamur dilakukan dengan menyiapkan hasil biakan berupa irisan tipis dengan lebar 5 x 5 mm pada *cover glass* steril dalam cawan steril. Kemudian dilakukan pengeringan bertingkat menggunakan konsentrasi larutan etanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, dan 96% dengan cara disemprotkan kurang lebih dengan jarak 30 cm dan jarak waktu 5 menit pada setiap semprotan (Hastuti & Rahmawati, 2016).

Setelah sampel jamur dan sampel bagian tanaman terdehidrasi selanjutnya spesimen sampel diletakkan pada pemegang spesimen (*holder sample*) berbahan dasar aluminium berbentuk silinder

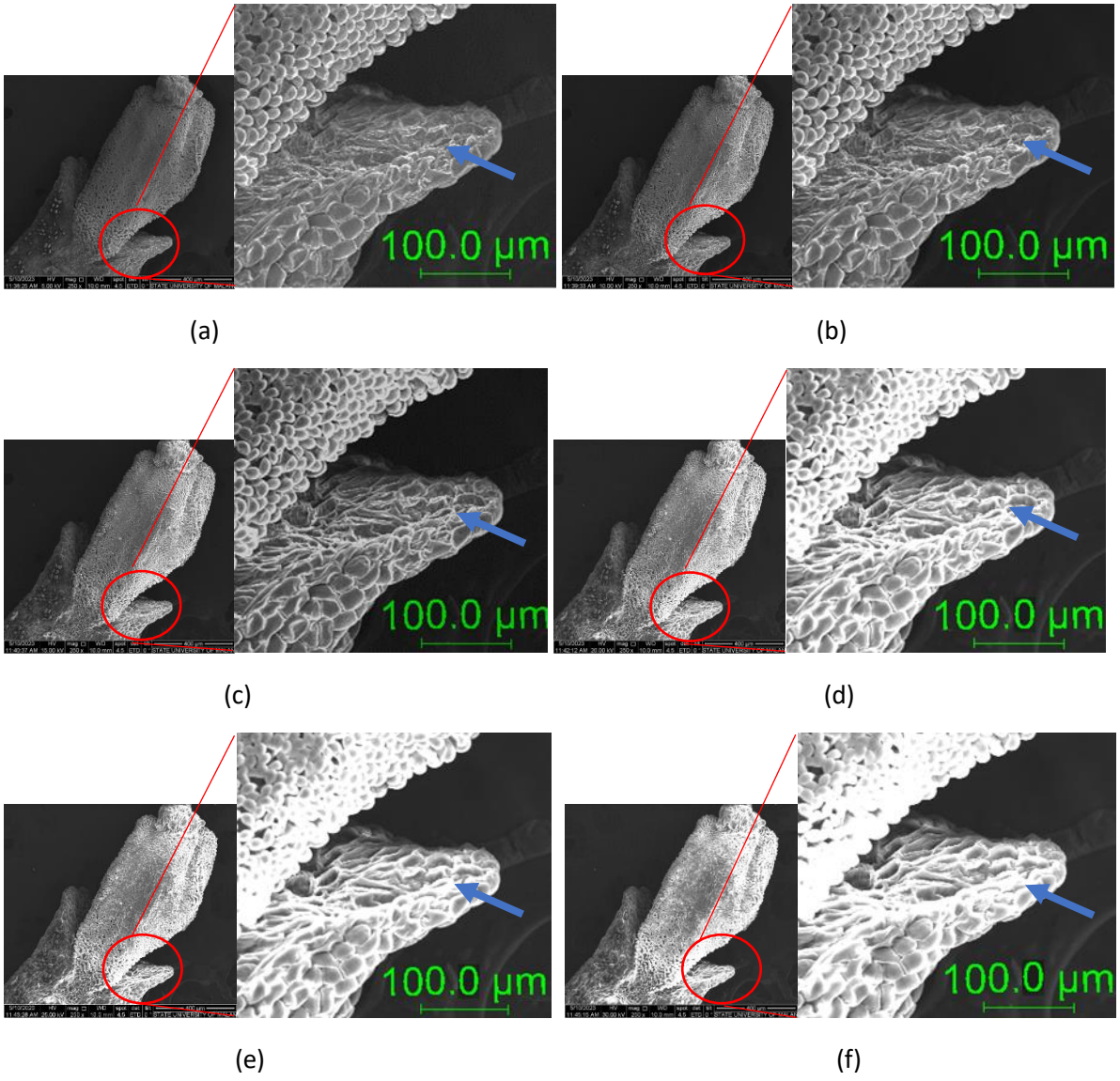
berukuran diameter 1 cm dengan perekat konduktif *tape* berbahan karbon. Selanjutnya sampel dilapisi dengan logam mulia Au dan Pd menggunakan *sputter coater* selama 90 detik dengan arus 18 mA (Setyaningsih et al., 2017). Proses pelapisan ini bertujuan untuk membuat lapisan konduktif setipis mungkin pada permukaan sampel, proses ini sangatlah penting mengingat sampel biologi memiliki tingkat konduktivitas yang sangat lemah. Lapisan konduktif ini dapat merangsang generasi elektron sekunder sehingga dapat ditangkap oleh detektor (Stokroos et al., 1998).

Analisa Sampel

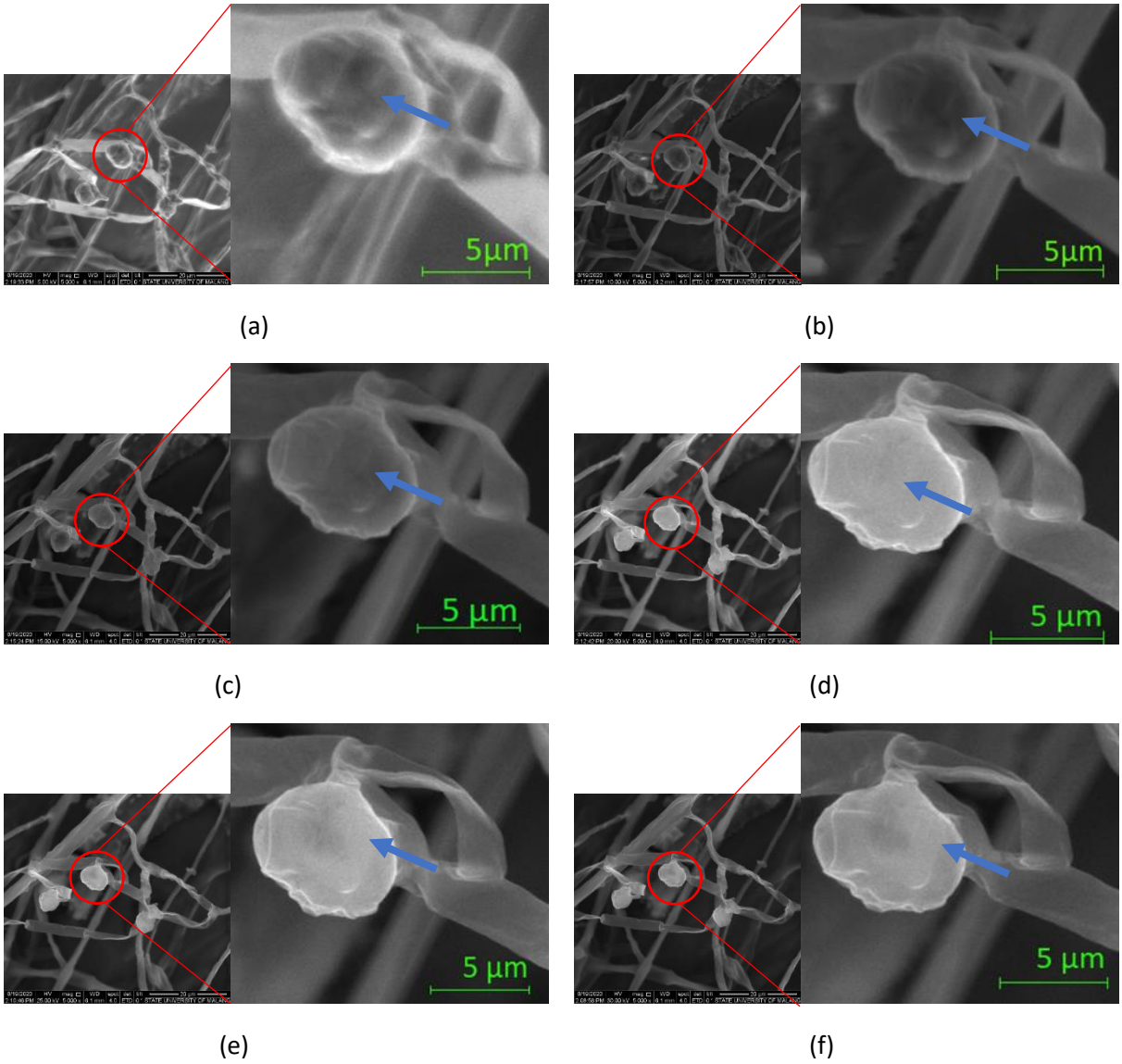
Analisa sampel dilakukan menggunakan instrument SEM-EDX dengan parameter WD (*Working Distance*) 6-10 mm, spot 3,5 – 4,5 . Penggunaan tangangan akselerasi dipilih mulai dari tegangan 5 kV hingga 30 kV menggunakan variasi tegangan 5 kV. Pada tegangan 5 kV akan didapatkan hamburan berkas elektron pada daerah dekat permukaan dan pada 30 kV didapatkan intensitas maksimum dengan tembakan terdalam (Joy, 1985). Hal ini dilakukan dengan tujuan melihat hingga batas mana struktur sampel biologi masih dapat diamati dan tidak mengalami kerusakan, selain itu juga dapat dilakukan pengamatan kandungan sampel.

HASIL DAN DISKUSI

Hasil SEM sampel biologi bagian tanaman kepala putik bunga diperoleh morfologi dengan perbesaran 250 kali dengan variasi tegangan akselerasi dapat dilihat pada **Gambar 1** dan hasil SEM sampel jamur dengan perbesaran 5000 kali ditampilkan pada **Gambar 2**.



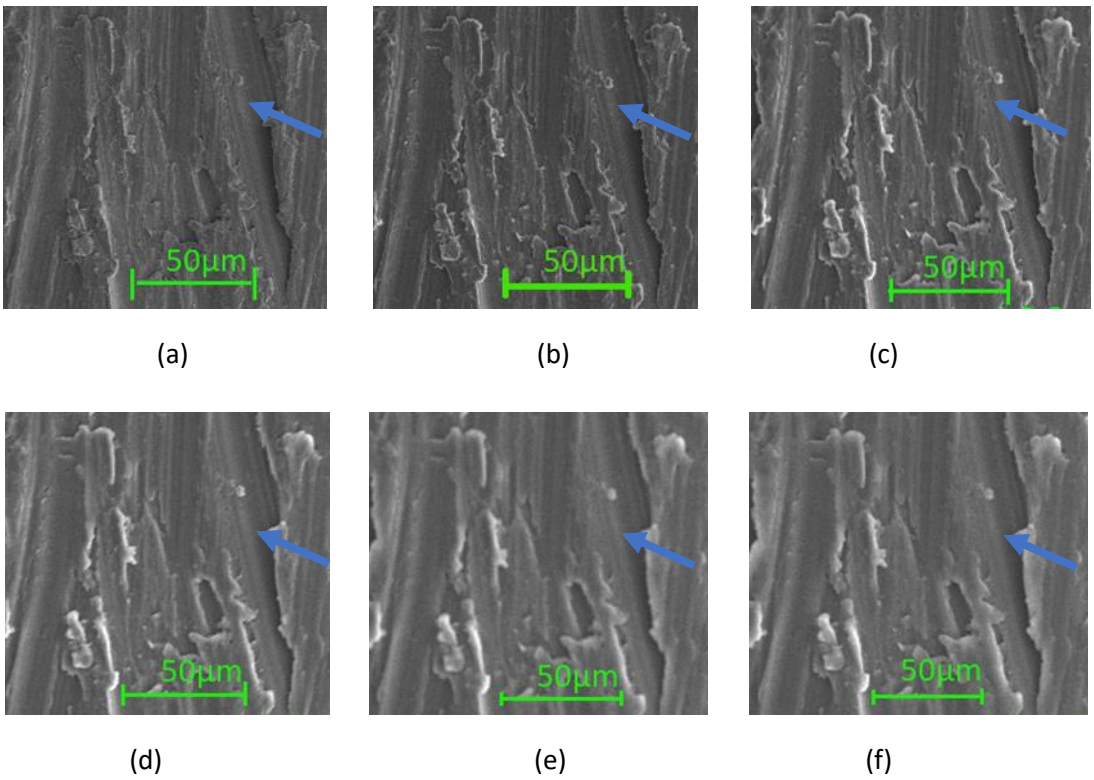
Gambar 1. Hasil SEM sampel biologi bagian tanaman kepala putik bunga pada perbesaran 250 kali dengan tegangan akselerasi: (a) 5 kV; (b) 10 kV; (c) 15 kV; (d) 20 kV; (e) 25 kV; dan (f) 30 kV



Gambar 2. Hasil SEM sampel jamur patogen pada perbesaran 5000 kali dengan tegangan akselerasi: (a) 5 kV; (b) 10 kV; (c) 15 kV; (d); 20 kV; (e) 25 kV; dan (f) 30 kV

Variasi tegangan akselerasi mengakibatkan perbedaan kualitas kontras dan kecerahan pada hasil morfologi sampel biologi bagian tanaman kepala putik bunga dan jamur patogen, hal ini berdasarkan pengamatan pada **Gambar 1** dan **Gambar 2**. Secara kualitatif morfologi yang dihasilkan untuk **Gambar 1** dengan tegangan 5 kV telah memiliki kualitas yang baik namun terdapat beberapa tekstur permukaan tangkai kepala putik yang halus atau bertekstur tipis, pada tegangan 10 kV menunjukkan peningkatan kualitas kontras gambar dan beberapa tekstur tangkai kepala putik mulai terlihat, hal ini juga ditunjukkan pada tegangan 15 kV yaitu tangkai kepala putih terlihat lebih bertekstur. Namun, pada tegangan 20 kV, 25 kV, dan 30 kV menunjukkan peningkatan kontras dan kecerahan yang sangat signifikan sehingga menyebabkan penurunan kualitas gambar. Untuk pengamatan **Gambar 2** penerapan tegangan 5 kV pada jamur patogen didapatkan kualitas hasil yang paling buruk, sementara pada tegangan 10 kV dan 15 kV kualitas hasil membaik dan guratan – guratan tekstur pada bagian jamur menjadi terlihat. Pada penerapan tegangan yang lebih tinggi yaitu 20 kV hasil morfologi menunjukkan peningkatan kecerahan namun terdapat struktur guratan yang hilang sehingga permukaannya terlihat halus. Kemudian pada tegangan 25 kV dan 30 kV tidak menunjukkan hasil yang berbeda signifikan hanya terdapat penambahan tingkat kecerahan dan guratan tekstur bagian jamur semakin hilang dan semakin halus juga kerusakan mulai terlihat yaitu permukaan mulai melepuh.

Sebagai pembanding dilakukan pengamatan hasil SEM pada sampel non biologi potongan logam Aluminium pada berbesaran 500 kali dengan variasi tegangan akselerasi dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Hasil SEM sampel non biologi potongan logam aluminium pada perbesaran 500 kali dengan tegangan akselerasi: (a) 5 kV; (b) 10 kV; (c) 15 kV; (d) 20 kV; (e) 25 kV; dan (f) 30 kV

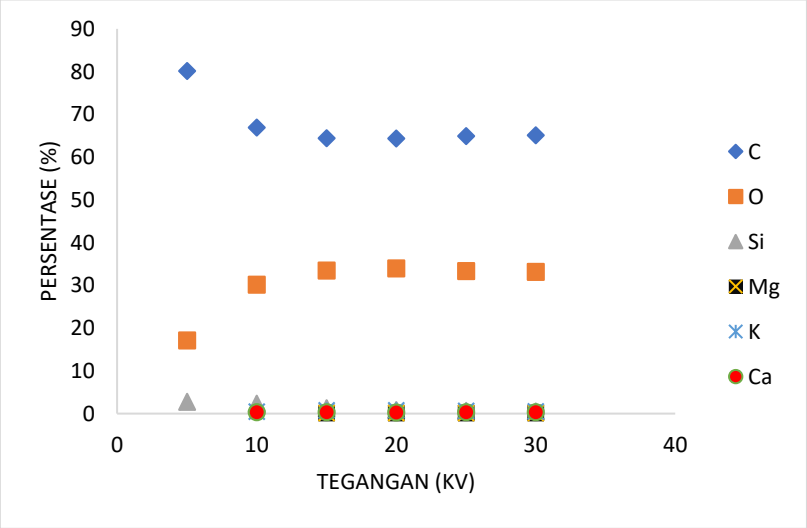
Variasi tegangan akselerasi pada sampel non biologi potongan logam aluminium pada tegangan 5 kV seluruh guratan permukaan logam dapat terlihat dengan tampilan samar atau tipis. Pada tegangan 10 kV tampilan struktur logam mulai terlihat jelas dan pada tegangan 15 kV tampilan struktur mengalami kenaikan kontras sehingga lebih terlihat rongga – rongga pada permukaan logam. Sementara pada tegangan 20 kV, 25 kV, dan 30 kV menunjukkan hal sebaliknya yaitu semakin menurunnya kualitas gambar dikarenakan struktur pada permukaan logam semakin terlihat halus seiring bertambahnya tegangan.

Karakterisasi EDX digunakan untuk mengetahui kandungan partikel penyusun utama sampel biologi bagian tanaman kepala putik bunga meliputi beberapa unsur yaitu (C) Carbon, (O) Oksigen, Si (Silica), (Mg) Magnesium, (K) Kalium, dan (Ca) Calsium. Informasi selengkapnya ditampilkan dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Persentase C , O , Si , Mg , K , dan Ca pada sampel biologi bagian tanaman kepala putik bunga

Tegangan (kV)	Persentase (%)					
	C	O	Si	Mg	K	Ca
5	80,1	17,1	2,7	-	-	-
10	66,9	30,1	2,3	-	0,4	0,3
15	64,4	33,4	1,2	0,1	0,7	0,3
20	64,3	33,9	0,8	0,1	0,7	0,2
25	64,9	33,3	0,6	0,1	0,6	0,3
30	65,1	33,1	0,5	0,1	0,5	0,3

Perubahan tegangan terhadap kandungan partikel penyusun sampel komposisi ditampilkan pada **Gambar 4**. Berdasarkan **Gambar 4** dapat dilihat bahwa pada tegangan 5 kV hanya terbaca 3 partikel penyusun, sementara pada tegangan 10 kV hingga 30 kV mampu terbaca 6 partikel penyusun. Hal ini disebabkan karena pada tegangan akselerasi 5 kV memiliki energi yang terlalu rendah sehingga tidak dapat mengidentifikasi partikel penyusun yang energinya lebih besar seperti K dan Ca. Dapat dilihat juga bahwa pembacaan dengan menggunakan tegangan 5 kV dan 10 kV mendapatkan hasil persentase yang berbeda signifikan dengan data lainnya, sementara pada tegangan 15 kV hingga 30 kV persentase yang didapatkan berada pada rentang yang sama. Perbedaan tegangan akselerasi selanjutnya dianalisa menggunakan data intensitas EDX dapat dilihat pada **Tabel 2**.

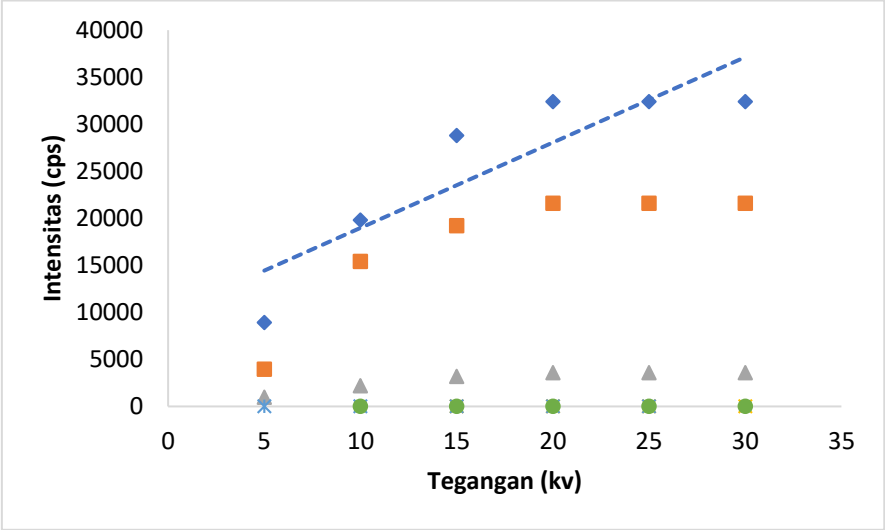


Gambar 4. Grafik hubungan tegangan akselerasi terhadap persentase partikel C, O, Si, Mg, K, dan Ca

Tabel 2. Intensitas pembacaan C , O , Si , Mg , K , dan Ca pada sampel biologi bagian tanaman kepala putik bunga

Tegangan (kV)	Intensitas (cps)					
	C	O	Si	Mg	K	Ca
5	8,91K	3,96K	0,99K	-	-	-
10	19,8K	15,4K	2,2K	-	0,0K	0,0K
15	28,8K	19,2K	3,2K	0,0K	0,0K	0,0K
20	32,4K	21,6K	3,6K	0,0K	0,0K	0,0K
25	32,4K	21,6K	3,6K	0,0K	0,0K	0,0K
30	32,4K	21,6K	3,6K	0,0K	0,0K	0,0K

Bertambahnya tegangan akselerasi menyebabkan intensitas pembacaan partikel kandungan juga bertambah, grafik perubahan intensitas pembacaan kandungan dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 5. Grafik hubungan tegangan akselerasi terhadap intensitas pembacaan kandungan

Berdasarkan **Gambar 5** terlihat bahwa pada tegangan 5 kV memiliki intensitas pembacaan paling rendah, kemudian dengan penambahan menjadi 10 kV terjadi peningkatan intensitas pembacaan, sementara pada 15 kV hingga 30 kV tidak terjadi peningkatan intensitas yang terlalu signifikan atau masih dalam rentang yang sama. Berdasarkan grafik tersebut menunjukkan bahwa intensitas pembacaan partikel kandungan semakin meningkat dengan bertambahnya tegangan akselerasi. Hal ini disebabkan semakin tinggi tegangan sumber penembak maka energi yang dihasilkan juga semakin tinggi dan dapat melakukan pembacaan kandungan dengan intensitas tinggi.

KESIMPULAN

Sampel biologi bagian tanaman kepala putik bunga dan sampel jamur menghasilkan morfologi yang memiliki kualitas resolusi, kecerahan, dan kontras yang optimal pada tegangan akselerasi 15 kV. Penggunaan

tegangan akselerasi dibawah 15 kV memiliki kualitas yang kurang baik karena beberapa struktur tidak terlihat. Di sisi lain, penambahan tegangan diatas 15 kV menyebabkan kenaikan kecerahan dan kontras yang signifikan serta mengalami penurunan penampakan struktur guratan sehingga menyebabkan menurunnya kualitas gambar. Analisa EDX menunjukkan hasil yang selaras, yaitu penerapan tegangan dibawah 15 kV menyebabkan kurangnya akurasi pembacaan dikarenakan beberapa partikel kandungan tidak terbaca dan intensitas pembacaan sangat rendah, namun penambahan tegangan diatas 15 kV tidak memberikan perubahan hasil yang berbeda signifikan. Hasil EDX pada sampel biologi bagian tanaman pada tegangan akselerasi 15 kV menunjukkan pembacaan partikel kandungan Karbon 64,4 %; Oksigen 33,4%; Silika 1,2 %; Magnesium 0,1 %; Kalium 0,7 %; dan Kalsium 0,3 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Negeri Malang yang telah mendanai kegiatan penelitian ini melalui dana internal UM Tahun Anggaran 2023 dengan nomor kontrak 5.4.906/UN32.20.1/LT/2023.

DAFTAR PUSTAKA

Adhika, D. R., Anindya, A. L., Tanuwijaya, V. V., & Rachmawati, H. (2018). Teknik pengamatan sampel biologi dan non-konduktif menggunakan scanning electron microscopy. *Prosiding Seminar Nasional Instrumentasi, Kontrol Dan Otomasi*, 53-58-53–58.

Hanif, Q. A., Hertiningtyas, C., & Saraswati, T. E. (n.d.). Mikroskop Elektron untuk Observasi Spesimen Biologi (Electron Microscope for Biological Specimen Observation). *Welcome Speech from Committee and Head of Chemistry*, 1.

Hastuti, U. S., & Rahmawati, I. (2016). The antagonism mechanism of Trichoderma spp. Towards Fusarium solani mold. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, *5*(3), 178.

Ichinokawa, T., Iiyama, M., Onoguchi, A., & Kobayashi, T. (1974). Charging effect of specimen in scanning electron microscopy. *Japanese Journal of Applied Physics*, *13*(8), 1272.

Indratmi, D. (2009). Penggunaan Debaryomyces sp. Dan Schizosaccharomyces sp. Dengan adjuvant untuk pengendalian penyakit antraknosa pada Mangga. *Jurnal Gamma*, *5*(1).

Joy, D. C. (1985). Resolution in low voltage scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy*, *140*(3), 283–292.

Masta, N. (2020). *Buku Materi Pembelajaran Scanning Electron Microscopy*.

Pretorius, E. (2010). Influence of acceleration voltage on scanning electron microscopy of human blood platelets. *Microscopy Research and Technique*, *73*(3), 225–228.

Setyaningsih, N. E., Muttaqin, R., & Mar'ah, I. (2017). Optimalisasi Waktu Coating pada Bahan Komposit Alam untuk Karakterisasi Morfologi dengan Scanning Electron Microscopy (SEM)–Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX). *Physics Communication*, *1*(2), 36–40.

Stokroos, Kalicharan, Der Want, V., & Jongebloed. (1998). A comparative study of thin coatings of Au/Pd, Pt and Cr produced by magnetron sputtering for FE-SEM. *Journal of Microscopy*, *189*(1), 79–89.

Tang, D., Ferreira, M. E., & Pistorius, P. C. (2017). Automated inclusion microanalysis in steel by computer-based scanning electron microscopy: Accelerating voltage, backscattered electron image quality, and analysis time. *Microscopy and Microanalysis*, *23*(6), 1082–1090.

Yañez, M. J., & Barbosa, S. E. (2003). Changes in particle area measurements due to SEM accelerating voltage and magnification. *Microscopy Research and Technique*, *61*(5), 463–468.