

KEMAMPUAN *Flavobacterium* sp NUB1 DALAM MENGGUNAKAN ALIFATIK NITRIL UNTUK PERTUMBUHANNYA

Nunik Sulistinah

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Cibinong Science Center, Jl Raya Jakarta-Bogor km 46 Cibinong
E-mail: listin_ar@yahoo.com

Abstract

A bacteria isolate capable utilizing 1% (v/v) acetonitrile and butyronitrile as the sole source of carbon and nitrogen was isolated from industrial effluents of PT Petrokimia-Gresik and identified as Flavobacterium sp NUB1. The bacterial isolate was able to grow in both acetonitrile and butyronitrile at concentration up to 4% (v/v). The highest growth was reached at 1% concentration of acetonitrile and butyronitrile, but the bacteria isolate was not able to grow on acrylonitrile. The specific growth rate (μ) of the isolate was 0,029 h⁻¹. The major objective of this study was to explore the abilities of the isolate to utilize some aliphatic nitriles and then further evaluate the metabolite product of the nitrile degradation.

Key words: aliphatic nitrile, biodegradation, *Flavobacterium* sp. NUB1

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Senyawa nitril merupakan senyawa organik yang mengandung CN pada struktur molekulnya ($-C=N$). Senyawa ini tersebar luas di lingkungan. Di alam, sebagian besar nitril berada dalam bentuk sianoglikosida yang dihasilkan/ diproduksi oleh tanaman (Miller & Conn, 1980)¹. Selain itu, sebagian besar tanaman juga menghasilkan senyawa nitril yang lain, seperti sianolipid, risinin, phenilasetonitril dsb. Sedangkan industri-industri kimia menggunakan nitril secara ekstensif untuk memproduksi macam-macam polimer. Nitril juga banyak diproduksi secara industri sebagai bahan intermediet

dan bangunan. Sebagian besar senyawa nitril merupakan senyawa hidropobik yang toksik dan beberapa diantaranya sulit untuk didegradasi (Sorokin *et al.*, 2007)². Atas dasar itu, penggunaan senyawa nitril secara ekstensif dapat menimbulkan masalah-masalah lingkungan (Rezende *et al.*, 1999). Oleh karena itu, peran enzim pendegradasi nitril sangat penting untuk mendetoksifikasi atau paling tidak meminimasi keberadaan senyawa tersebut di lingkungan.

Secara umum, ada 2 enzim yang berperan dalam biokonversi senyawa nitril menjadi asam karboksilat. Metaloenzim nitril hidratase menghidrolisis sebagian besar nitril alifatik, arilalifatik dan aromatik menjadi

amida (R-CONH₂) yang selanjutnya dapat dikonversi menjadi asam-asam karboksilat dan ammonium oleh enzim amidase. Dilaporkan organisme-organisme yang memproduksi nitril hidratase pada umumnya juga memproduksi amidase (Kobayashi & Shimizu, 1998; Sorokin *et al.*, 2007)³). Enzim pendegradasi yang lain adalah nitrilase yang mengkatalisis senyawa nitril (RCN) secara langsung menjadi asam karboksilat dan ammonium tanpa menghasilkan amida sebagai produk. Enzim nitrilase pada umumnya menghidrolisis sebagian besar senyawa nitril aromatik.

Pemanfaatan mikroba yang mampu memproduksi enzim-enzim tersebut sangat mendapat perhatian oleh karena enzim-enzim yang dihasilkan sangat potensial sebagai biokatalis dan juga dapat digunakan untuk sintesis senyawa-senyawa organik secara enansioselektif, serta sebagai agent bioremediasi lingkungan (Blakey *et al.*, 1995; Banerjee *et al.*, 2002; Håkansson *et al.*, 2005; Kohyama *et al.*, 2006; Manolov *et al.*, 2005). Beberapa strain bakteri dan jamur dilaporkan sebagai penghasil enzim pendegradasi/ penghidrolisis nitril, seperti misalnya Genus *Rhodococcus* yang termasuk dalam kelompok *Actinobacteria* dilaporkan memproduksi enzim nitril hidratase dan nitrilase (Kobayashi & Shimizu, 1998).⁴

Sejauh ini diketahui bahwa mikroba pendegradasi nitril adalah dari kelompok neutrofilik, mikroba tersebut tumbuh optimal pada pH netral. Sementara dilaporkan oleh Sorokin *et al.*, 2007 bahwa *Natrocella acetinitrilica* yang diisolasi dari "soda lake sediment" mampu tumbuh dan memanfaatkan asetonitril dan propionitril sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen dibawah kondisi "haloalkaline". Enzim penghidrolisis nitril pada kondisi alkaline yang sangat tinggi mungkin mempunyai kelebihan, terutama ketika senyawa sianida terlibat dalam proses reaksi degradasi tersebut, seperti misalnya pada reaksi Strecker: hidrolisis α -aminonitrile secara enansioselektif menjadi α -aminoamides and α -amino acids (Duthaler, 1994).⁵

1.2. Tujuan

Tujuan utama dari eksperimen ini adalah untuk mengeksplor kemampuan *Flavobacterium* NUB1 dalam menggunakan beberapa senyawa alifatik nitril sebagai substrat pertumbuhannya yang selanjutnya mengevaluasi reaksi transformasi dengan mengukur salah satu produk metabolitnya yaitu ammonium.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Mikroba

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Flavobacterium* sp NUB1 dan *Flavobacterium* sp ASP yang masing-masing diisolasi dari limbah PT Petrokimia Gresik dan limbah kilang minyak Sungai Gerong Plaju- Palembang.

2.2. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk dari Merck (Acetonitril dan Butironitril), Akrilonitril (Aldrich).

2.3. Komposisi media kultivasi

Media yang digunakan untuk menumbuhkan *Flavobacterium* sp NUB1 adalah media mineral dengan komposisi sebagai berikut: Na₂HPO₄ 0,357g, KH₂PO₄ 0,1g, MgSO₄.7H₂O 0,1g, CaCl₂.2H₂O 0,01g, FeSO₄.7H₂O 0,001g, yeast extract 0,01g, Mikroelemen 1,0 ml, Aquadest ditambahkan sampai volume 1000 ml (Meyer & Schlegel, 1983; Pfennig, 1974). Komposisi mikroelemen adalah sebagai berikut: ZnSO₄.7H₂O, MnCl₂.4H₂O, H₃BO₃, CoCl₂.6H₂O, CuCl₂.2H₂O, NiCl₂.6H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O, Na₂SeO₃ Sebagai sumber karbon dan nitrogen digunakan asetonitril dan butironitril masing-masing dengan konsentrasi 1% (v/v).

2.4. Penentuan pertumbuhan *Flavobacterium sp.*

Pertumbuhan *Flavobacterium sp.* selama proses fermentasi ditentukan dengan menggunakan satuan kerapatan optis (OD) pada panjang gelombang 436 nm. Laju pertumbuhan spesifik (μ) isolate ditentukan berdasarkan persamaan berikut: $\mu = 2,303 \log 2 \times 1/td$ (Marison, 1988).

2.5. Pengujian *Flavobacterium sp* NUB1 pada asetonitril, butironitril, dan akrilonitril sebagai sumber energi, karbon, dan/atau nitrogen

Penggunaan asetonitril dan butironitril sebagai satu-satunya energi, karbon, dan nitrogen diuji dengan menumbuhkan isolat bakteri uji pada asetonitril, butironitril dan akrilonitril. Penggunaan senyawa nitril alifatik sebagai sumber energi dan karbon diuji dengan menumbuhkan isolat bakteri tersebut pada asetonitril, butironitril, akrilonitril dan NH_4Cl . Sedangkan penggunaan asetonitril, butironitril, dan akrilonitril sebagai sumber nitrogen saja diuji dengan menumbuhkan isolat bakteri pada asetonitril, butironitril, akrilonitril dan glukosa. Kultur diinkubasi di atas mesin pengocok (*shaker*) pada suhu kamar selama waktu tertentu. Pertumbuhan kultur diamati pada jam ke 0, 48, dan 96.

2.6. Pengujian pengaruh berbagai konsentrasi asetonitril dan butironitril terhadap pertumbuhan *Flavobacterium sp* NUB1

Isolat yang mampu memanfaatkan senyawa alifatik nitril (asetonitril dan butironitril) sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen ditumbuhkan pada kedua senyawa nitril tersebut dengan kisaran konsentrasi 0%-4% dan diinkubasi selama ± 7 hari

2.7. Penentuan Pola pertumbuhan *Flavobacterium sp*

Pertumbuhan *Flavobacterium sp* NUB1 dilakukan dalam Erlenmeyer (1000 ml) berisi 500 ml media pertumbuhan yang mengandung asetonitril 1% (v/v). Kultur diinkubasi di atas mesin pengocok (*shaker*) pada suhu kamar (± 28 oC) selama 72 jam. Setiap 3 jam, sample diambil untuk penentuan pertumbuhan, perubahan pH, dan konsentrasi amonium (NH_4^+) yang terbentuk.

2.8. Produksi biomassa sel

Biomassa sel diproduksi dalam 1000 ml erlenmeyer berisi 500 ml media pertumbuhan yang mengandung asetonitril 1%. Kultur diinkubasi pada suhu kamar dan sel dipanen pada waktu produksi sel optimum (± 72 jam). Sel dipanen dengan cara mensentrifuse kultur dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4oC. Pelet yang diperoleh dicuci dengan 50 mM buffer fosfat (KH_2PO_4) pH 7,2 sebanyak 2 kali. Pelet yang diperoleh digunakan untuk penentuan karakterisasi enzim dalam sel utuh (*whole cells*).

2.9. Penentuan aktivitas enzim

Campuran reaksi yang telah mengandung 1,5% sel b/v, asetonitril 1% (untuk NH-ase) atau asetamide (untuk amidase) dalam 50 mM (KH_2PO_4) pH 7,2 diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar (30°C). Pengambilan sampel sebanyak 1000 μl dilakukan pada menit ke 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, dan 180. Aktivitas enzim dihentikan dengan penambahan 0,25 ml HCl 4 N. Sampel kemudian disentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 15000 rpm. Kadar ammonium (NH_4^+) dalam supernatan ditentukan dengan metode Nessler.

2.10. Penentuan konsentrasi ammonium sebagai salah satu produk hidrolisis

Konsentrasi ammonium ditentukan secara kolorimetris dengan menggunakan metode Nessler. Supernatan sampel (100 μ l) ditambahkan ke dalam 990 μ l 0,1N NaOH. Ke dalam larutan tersebut kemudian ditambahkan 200 μ l pereaksi Nessler, dihomogenkan dan diinkubasi selama 20 menit. Larutan tersebut selanjutnya diukur pada panjang gelombang 400 nm. Konsentrasi ammonium dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standar.

2.11. Pereaksi Nessler

5,0 g KI (Kalium Iodid) dilarutkan dalam aquabidest (air bebas ammonia) dan kemudian ditambahkan larutan HgCl₂ (2,0 g HgCl₂ dalam 35 ml aquabidest) sampai membentuk endapan yang berwarna orange. Selanjutnya larutan ditambahkan larutan 5N NaOH sebanyak 20 ml (Gerhardt & Drew, 1994).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

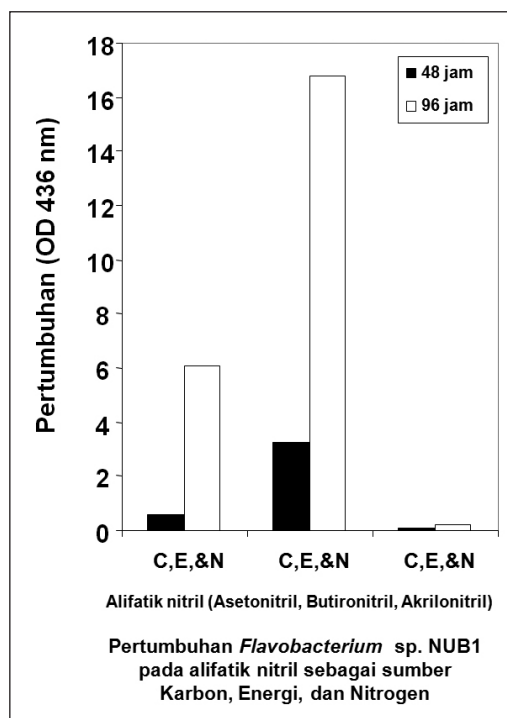
3.1. Pertumbuhan *Flavobacterium* sp NUB1 pada alifatik nitril

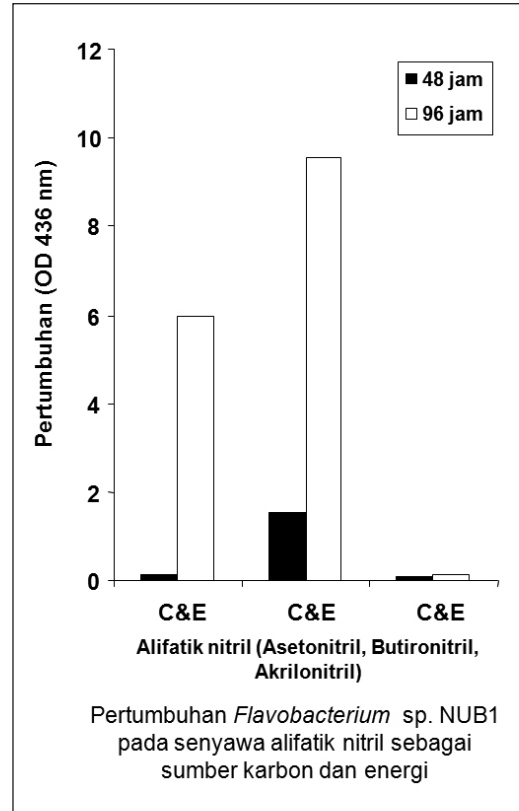
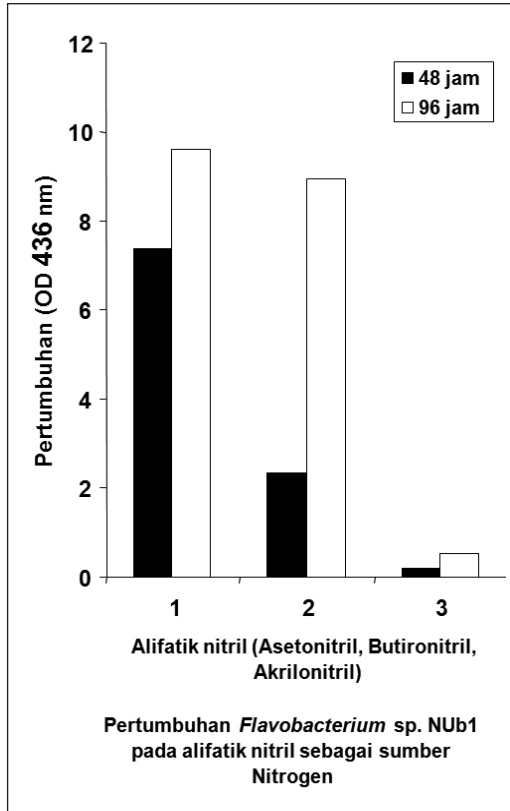
Hasil pengujian menunjukkan, bahwa *Flavobacterium* sp NUB1 mampu tumbuh dan menggunakan kedua senyawa nitril alifatik (asetonitril dan butironitril) sebagai satu-satunya sumber karbon, energi, dan nitrogen untuk pertumbuhannya. Namun isolat bakteri tersebut tidak mampu menggunakan akrilonitril dengan baik sebagai sumber karbon, energi, dan nitrogen (Gambar 1 A, B & C). Ketidakmampuan *Flavobacterium* sp NUB1 tumbuh pada akrilonitril disebabkan toksisitas akrilonitril lebih tinggi dibandingkan senyawa asetonitril dan butironitril. Dilaporkan, bahwa isolasi mikroba pendegradasi akrilonitril sangat sulit dilakukan karena akrilonitril tergolong

sangat toksik sehingga mikroba sulit tumbuh (Yamada & Kobayashi, 1996). Disamping itu struktur akrilonitril mempunyai ikatan ganda dua atom C nomor satu dan atom C nomor dua (nitrilalifatik tidak jenuh) sehingga mikroba sulit mendegradasi senyawa ini (Purnomo,2000).

Penggunaan glukosa sebagai sumber karbon dan penggunaan amonium khlorida sebagai sumber nitrogen juga ditampilkan pada Gambar 1A, B, dan C. Nampak bahwa penggunaan glukosa sebagai sumber karbon dan penggunaan NH₄Cl sebagai sumber karbon tidak meningkatkan pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB1 pada akrilonitril. Hal ini membuktikan bahwa isolat bakteri tersebut hanya mampu menggunakan asetonitril/ butironitril sebagai satu-satunya sumber karbon, energi, dan/atau nitrogen.

Beberapa alasan yang menguatkan bahwa *Flavobacterium* sp NUB1 dapat tumbuh pada butironitril/alifatik nitril adalah induksi enzim nitril hidratase dan amidase oleh senyawa nitril pada mikroba. Umumnya induksi terjadi pada saat diberi senyawa





Gambar 1 : A, B dan C. Pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB1 pada alifatik nitril (asetonitril 1%, butironitril 1%, akrilonitril 0,01%).

alifatik dengan berat molekul rendah, seperti asetonitril, butironitril, sedangkan enzim nitrilase cenderung menggunakan penginduksi senyawa nitril aromatik (Yamada, 1996; Kobayashi, 1994). Sifat enzim nitril hidratase dan amidase bekerja secara luas (Layh *et al.*, 1995), sehingga dapat dimungkinkan diperoleh enzim nitril hidratase dan amidase yang merupakan enzim pendegradasi nitril.

Pengujian pengaruh konsentrasi asetonitril dan butironitril terhadap pertumbuhan *Flavobacterium* sp NUB1 ditampilkan pada Gambar 3 A&B . Pada Gambar tersebut terlihat bahwa *Flavobacterium* sp NUB1 mamputumbuh pada asetonitril dan butironitril hingga konsentrasi

4% (v/v) dengan pertumbuhan maksimal masing-masing pada 1% (v/v). Peningkatan konsentrasi butironitril menghambat pertumbuhan *Flavobacterium* sp NUB1, sedangkan pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB1 pada kisaran konsentrasi asetonitril 1-4% relatif lebih baik dibandingkan pertumbuhannya pada butironitril. Dengan demikian asetonitril merupakan substrat yang baik untuk pertumbuhan isolat bakteri tersebut.

3.2. Pola Pertumbuhan *Flavobacterium* sp NUB1 pada Asetonitril dan Butironitril

Pola pertumbuhan *Flavobacterium* sp NUB1 ditentukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri tersebut pada media mineral yang mengandung 1% (v/v) senyawa alifatik nitril (asetonitril/ butironitril) sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen

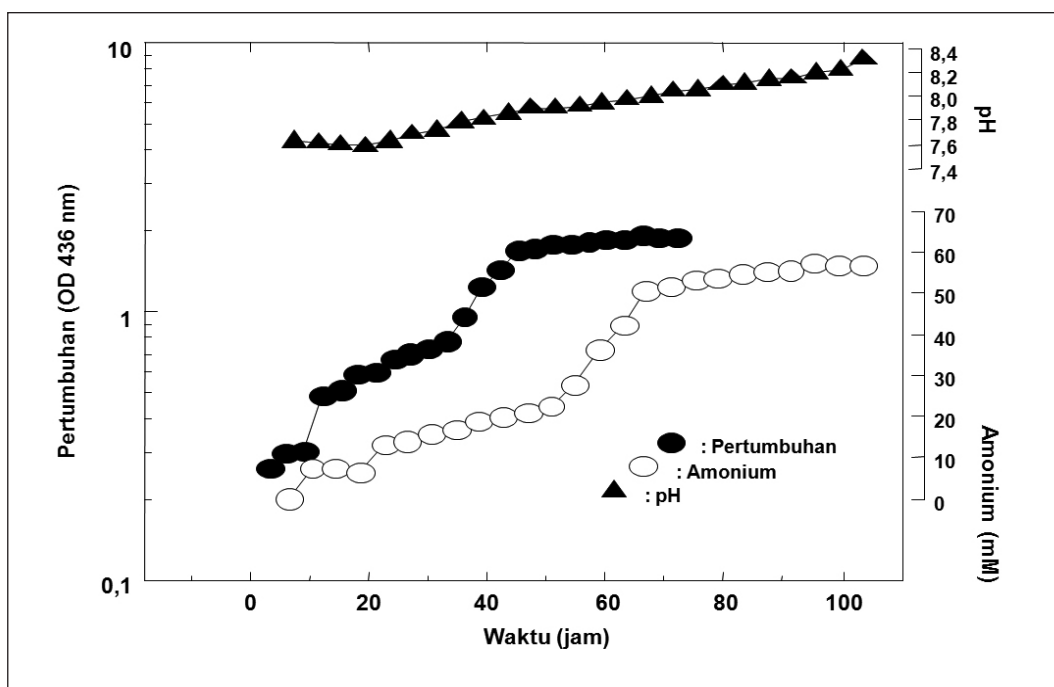
untuk pertumbuhannya. Pola pertumbuhan *Flavobacterium* sp NUB1 ditunjukkan pada Gambar 4. Pada gambar tersebut memperlihatkan, bahwa pertumbuhan *Flavobacterium* sp.

NUB1 baik pada asetonitril maupun butironitril diawali dengan fase lagi yang relatif cukup panjang yaitu selama \pm 9-10 jam. Pertumbuhan bakteri pada fase ini masih lambat karena bakteri masih beradaptasi dengan lingkungan mediana. Terbentuknya amonium yang dihasilkan merupakan indikasi, bahwa senyawa nitril yang diuji telah mengalami penguraian menjadi amida dan asam karboksilat (Digeronimo & Antoine, 1976). Dilaporkan, bahwa metabolisme senyawa alifatik nitril oleh mikroba melalui dua tahap reaksi yang berbeda dan melibatkan dua enzim yang berbeda pula. Tahap reaksi pertama melibatkan enzim nitril hidratase (NH-ase) mengubah nitril menjadi amida dan reaksi selanjutnya amida yang terbentuk akan diubah menjadi asam karboksilat

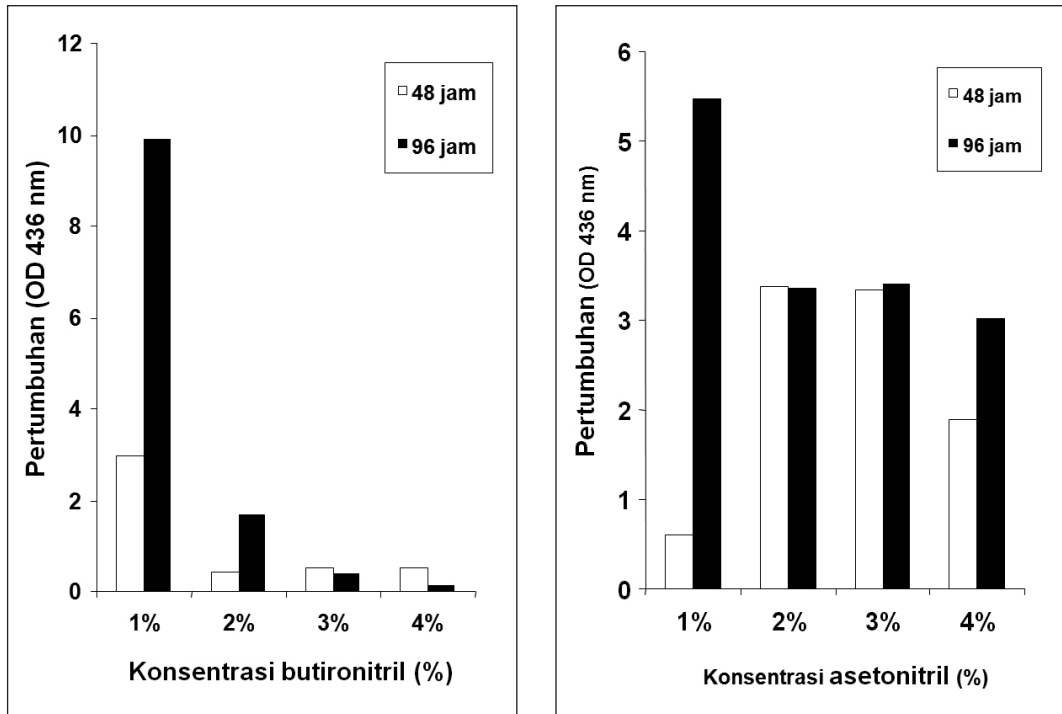
dan amonia oleh enzim amidase. Fase eksponensial dicapai dalam jangka waktu yang relatif lama yaitu sekitar 56 jam. Pada fase eksponensial terjadi pertumbuhan yang sangat cepat. Populasi meningkat drastis dan mengikuti persamaan eksponensial dan terjadi peningkatan pH. pH mengalami kenaikan oleh karena mikroba belum memanfaatkan seluruh amonium yang terbentuk untuk metabolismenya.

3.3. Degradasi alifatik nitril dengan menggunakan *resting cell* *Flavobacterium* sp. NUB1

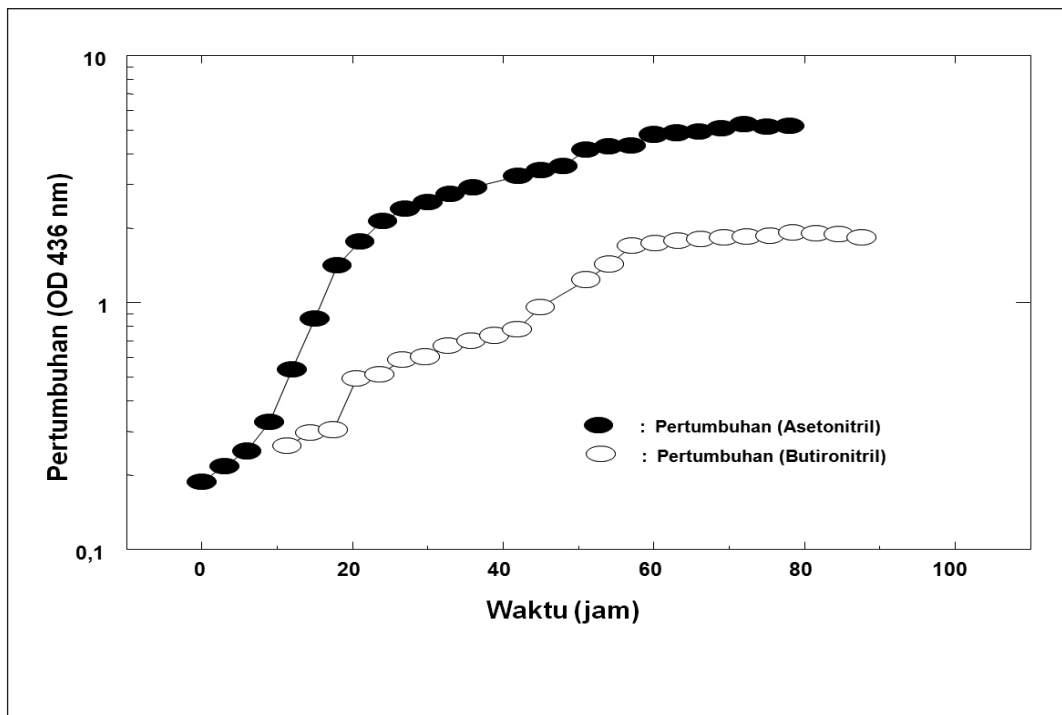
Kemampuan *Flavobacterium* sp. NUB1 dalam mensintesis enzim pendegradasi alifatik nitril dapat diketahui secara tidak langsung dengan cara mengukur kadar amonium (Nawaz *et al.*, 1992). Amonium yang terbentuk pada degradasi alifatik nitril dengan *resting cell* *Flavobacterium* sp. NUB1 ditampilkan pada Gambar 5. Gambar tersebut menunjukkan, bahwa konsentrasi



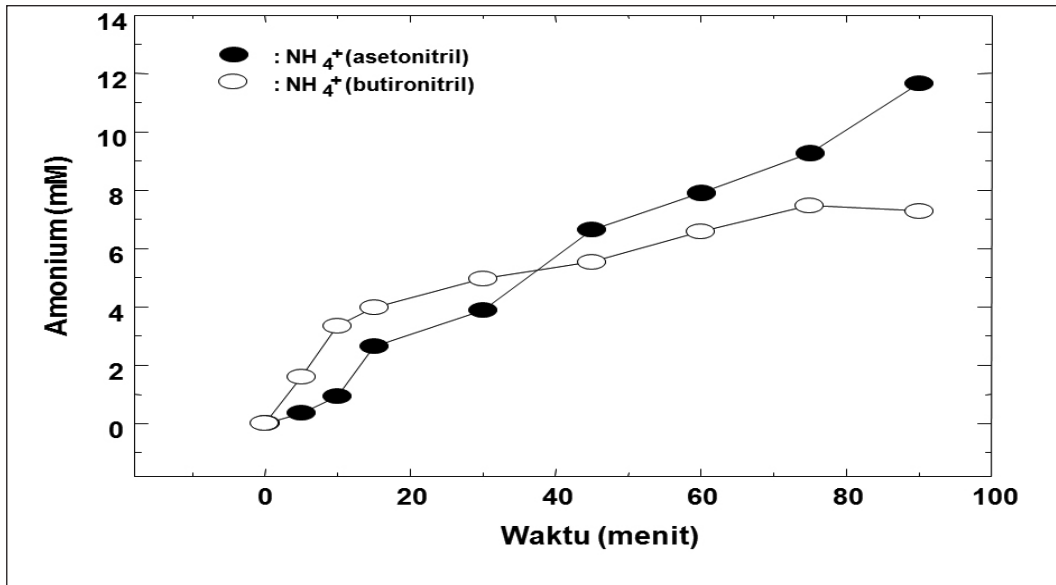
Gambar 2 : Pertumbuhan, perubahan pH, dan amonium selama proses fermentasi *Flavobacterium* sp. NUB1 pada Butironitril 1%



Gambar 3 : A dan B. Pengaruh konsentrasi Asetonitril (A) dan Butironitril (B) terhadap pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB1.



Gambar 4 : Pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB1. pada Asetonitril (1%) dan Butironitril (1%)



Gambar 5 : Pembentukan amonium pada degradasi Asetonitril dan Butironitril dengan menggunakan resting cell flavobacterium sp. NUB1

amonium meningkat dengan meningkatnya waktu inkubasi.

Konsentrasi amonium yang terukur selama 90 menit inkubasi adalah sebesar 11,65 mM untuk asetonitril dan 7,285 mM untuk butironitril. Amonium yang terbentuk mengindikasikan bahwa *Flavobacterium* sp NUB1 mampu mensintesis enzim pendegradasi nitril.

4. KESIMPULAN

Dari hasil eksperimen ini dapat disimpulkan, bahwa *Flavobacterium* sp NUB1 yang di isolasi dari PT Petrokimia -Gresik mampu memanfaatkan asetonitril dan butironitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen untuk substrat pertumbuhannya.

Isolat tersebut juga mampu tumbuh pada kedua senyawa nitril tersebut sampai dengan 4% (v/v) dengan pertumbuhan optimal pada konsentrasi 1%. Laju pertumbuhan spesifik (μ) 0,029 h⁻¹. Degradasi alifatik nitril oleh *Flavobacterium* sp. NUB1 menghasilkan produk berupa amonia. Dibandingkan akrilonitril dan butironitril, asetonitril merupakan sumber

energi, karbon, dan nitrogen yang terbaik untuk *Flavobacterium* sp. NUB1.

DAFTAR PUSTAKA

1. Banerjee, A., R. Sharma, and U. C. Banerjee, 2002. The nitriledegrading enzymes: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**:33-44.
2. Blakey, A. J., J. Colby, E. Williams, and C. O'Reilly, 1995. Regioand stereospecific nitrile hydrolysis by the nitrile hydratase from *Rhodococcus* AJ270. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**:57-62
3. DiGeronimo, M.J. and A.D. Antoine, 1976. Metabolism of Acetonitrile and Propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *Appl. Environ. Microbiol.* **31** (6) : 900-906.
4. Duthaler, R. O. 1994. Recent developments in the stereoselective synthesis of amino acids. *Tetrahedron* **50**:1539-1650.

5. **Gerhardt, P. & S.W. Drew**, 1994. Liquid Culture. In : Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. & Krieg, N.R. (eds). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM., Washington, DC., 248-277
6. **Håkansson, K., U. Welander, and B. Mattiasson**, 2005. Degradation of acetonitrile through a sequence of microbial reactors. *Water Res.* **39**:648-654.
7. **Kobayashi, M., and S. Shimizu**, 1998. Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation and application to biotechnology. *Nat. Biotechnol.* **16**:733-736.
8. **Kohyama, I., A. Yoshimura, D. Aoshima, T. Yoshida, H. Kawamoto, and T. Nagasawa**, 2006. Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**:600-606.
9. **Miller, J.M. and E.E. Conn**, 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Physiologia Plantarum* **65**, 1199-1202
10. **Meyer, O & H.G. Schlegel**, 1983. Biology of Aerobic Carbon Monoxide Oxidizing Bacteria. *Annual Review Microbiology* **37**, 277-310
11. **Miller, J.M. and E.E. Conn**, 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Physiologia Plantarum* **65**, 1199-1202
12. **Marison, I.W.** 1988. Growth Kinetics. Dalam: AH Scragg (Ed). *Biotechnology for Engineers*. Ellis Horwood
13. **Manolov, T., K. Håkansson, and G. Benoit**, 2005. Continuous acetonitrile degradation in a packed-bed bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**:567-574. [PubMed].
14. **Nawaz, M.S., T.M. Hienze, and C.E. Cerniglia**, 1992. Metabolism of Benzoinitrile and Butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (1):27-31.
15. **Pfennig, N.** 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp.n., A new species of the Rhodospirillaceae. *Arch. Microbiology* **100**, 197-206.
16. **Purnomo**. 2000. Biokonversi akrilonitril menjadi akrilamida dan asam akrilat oleh sel *Corynebacterium* D5 (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
17. **Sorokin, D.Y., P van Sander, P.T. Tatjana, and M. Gerard**, 2007. Microbial Isobutyronitrile Utilization under Haloalkaline Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **23** (17) : 5574-5579.
18. **Sorokin, D. Y., S. van Pelt, T. P. Tourova, S. Takaichi, and G. Muyzer**, 2007. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov. *Microbiology* **153**:1157-1164.
19. **Yamada H. and M. Kobayashi**, 1996. Nitrile Hydratase and its application to industrial production of Acrylamide. *Bioschi. Biotech. Biochem.* **60** : 1391-1400.