

## METABOLISME VINILASETAT OLEH ISOLAT BAKTERI V2

### METABOLISM OF VINYLACETATE BY BACTERIAL ISOLATE V2

Bambang Sunarko

Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI  
Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16122. tel. (0251) 324006

#### ABSTRACT

Vinyl acetate is a toxic substance, but has a high commercial value. This work showed that vinyl acetate is subject to microbial degradation. It was hydrolyzed by bacterium V2 to ethanol, acetaldehyde and acetate at rate of 8.8 mM vinyl acetate/h. The bacterium V2 grew on 20 mM vinyl acetate with a doubling time ( $t_d$ ) at 2.1 h. The attained maximum cell biomass and yield coefficient (Y) were  $\pm 0,65$  g cell weight/liter medium and  $\pm 33$  g cell weight/mole substrate, respectively. The isolate V2 showing the highest vinylacetate-esterase activity, as it was grown on ethanol and the highest cell biomass attained, as it was grown on vinyl acetate. On acetaldehyde, however, isolate V2 exhibited the slowest growth rate, the lowest cell biomass, and the lowest vinylacetate-esterase activity.

Key words: Vinyl acetate, bacterial isolate V2, degradation, vinylacetate-esterase

#### ABSTRAK

Vinilasetat merupakan senyawa yang toksik, tetapi secara komersial mempunyai arti penting. Dalam penelitian ini diperlihatkan, bahwa vinilasetat dapat didegradasi oleh isolat bakteri V2 dengan menghasilkan produk berupa etanol, asetaldehida dan asam asetat dengan laju degradasi sebesar 8,8 mM vinilasetat/jam. Isolat V2 tumbuh pada 20 mM vinilasetat dengan waktu penggandaan ( $t_d$ ) sebesar 2,1 jam, serta perolehan biomassa dan koefisien hasil (Y) masing-masing sebesar  $\pm 0,65$  g/l dan  $\pm 33$  g/mol substrat. Aktivitas vinilasetat-esterase tertinggi diperoleh ketika sel ditumbuhkan pada etanol, sedangkan biomassa tertinggi diperoleh ketika sel ditumbuhkan pada vinilasetat. Laju pertumbuhan yang paling lambat, biomassa yang paling kecil, dan aktivitas enzim vinilasetat-esterase yang paling rendah diperlihatkan ketika isolat V2 ditumbuhkan pada asetaldehida.

Kata kunci: Vinilasetat, isolat bakteri V2, degradasi, vinilasetat-esterase

#### PENDAHULUAN

Vinilasetat, walaupun jarang dijumpai secara alami, banyak dihasilkan oleh berbagai proses produksi kimia. Vinilasetat, misalnya, merupakan bahan dasar polivinilasetat, polivinilalkohol, polivinilbutirat dan polimer lainnya. Vinilasetat dan derivatnya juga digunakan sebagai bahan baku plastik, cat, lem, serta bahan pemutih tekstil dan kertas.

Disamping nilai ekonomisnya yang tinggi, vinilasetat adalah senyawa yang toksik dan diklasifikasikan dalam kelompok senyawa yang diduga penyebab kanker. Semakin luasnya penggunaan vinilasetat dalam industri dan tingginya dampak negatif yang ditimbulkannya, maka upaya untuk menanggulangi pencemaran lingkungan oleh senyawa tersebut sangat diperlukan.

Vinilasetat adalah senyawa cair yang mudah menguap (*volatile*), sehingga pada prinsipnya penanggulangan senyawa tersebut dapat menggunakan teknik fisika maupun teknik kimia (Junghans & Dittrich, 1992). Namun, metode ini biayanya cukup mahal, sehingga diperlukan metode alternatif yang lebih murah.

Metode biologis, yang melibatkan jasad renik, untuk penanggulangan limbah merupakan metode alternatif yang akhir-akhir ini banyak menarik perhatian, karena dianggap sebagai metode yang secara ekologis dan ekonomis lebih dapat dipertanggungjawabkan. Tujuan penelitian ini adalah menguji kemampuan isolat V2 dalam mendegradasi vinilasetat. Diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai landasan untuk merancang sistem biologis pengolahan limbah yang mengandung vinilasetat.

## BAHAN DAN METODE

**Mikroorganisme.** Isolat bakteri V2 yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari koleksi biak Departemen Mikrobiologi, Universitas Bayreuth, Jerman.

**Medium tumbuh.** Komposisi medium pertumbuhan isolat bakteri V2 yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (9 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,0 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,002 g),  $\text{Fe(III)NH}_4$ -sitrat (0,0012 g) yang dilarutkan ke dalam 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest (Meyer & Schlegel, 1983) yang ditambah dengan hara tambahan (Pfennig, 1974). Sebagai sumber karbon dan energi ditambahkan 20 mM Vinilasetat. Sumber karbon dan energi lain yang dicobakan dalam penelitian ini adalah produk-produk degradasi vinilasetat, yaitu 10 mM asetaldehida, 20 mM etanol, atau 20 mM asam asetat.

**Fermentasi dan kondisi percobaan** Proses fermentasi dilakukan dalam fermentor merk Eiostat U (B. Braun AG, Melsungen, Jerman) berkapasitas 70 l, berlangsung pada suhu  $30^\circ\text{C}$  dengan kecepatan pengadukan 175 rpm dan pH 7,2. Aerasi diberikan secara tetap

dengan laju 0,1 l/min. Antibuih (polipropilen glikol 50 % v/v) ditambahkan secara manual bila diperlukan. Fermentor dan semua media disterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit. Anti buih dan botol-botol untuk pengambilan contoh disterilkan dengan cara yang sama. Vinilasetat, asetaldehida, etanol, dan asam asetat disterilkan dengan filtrasi.

**Persiapan inokulum.** Setelah disterilkan, fermentor diinokulasi dengan 2 l inokulan. Sebagai inokulan digunakan suspensi sel isolat V2 yang tumbuh pada fase eksponensial (diraih kurang lebih pada masa inkubasi 24 jam).

**Analisis.** Selama fermentasi berlangsung dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri yang mencakup pengukuran kerapatan optis, sel bobot kering, koefisien hasil, dan waktu penggandaan ( $t_d$ ). Selain itu, diukur pula konsentrasi vinilasetat, etanol, asam asetat, dan asetaldehida dan perubahan pH dalam medium pertumbuhan.

**Pengukuran pertumbuhan isolat V2.** Pertumbuhan isolat V2 selama proses fermentasi diukur dengan menggunakan satuan kerapatan optis (*optical density/OD*) pada panjang gelombang 436 nm. Pengukuran sel bobot kering dilakukan sesuai dengan metode yang diuraikan oleh Koch (1994). Sedangkan, koefisien hasil ( $Y$ ) dihitung berdasarkan persamaan:  $Y = \text{gram sel bobot kering/mol substrat terkonsumsi dan waktu penggandaan}$  ( $t_d$ ) dihitung berdasarkan persamaan:  $t_d = 0,6931/\mu$  (Gerhart & Drew, 1994)

**Pengukuran konsentrasi vinilasetat dan produk degradasinya.** Vinilasetat, etanol, asam asetat dan asetaldehida diukur dengan menggunakan kromatografi gas Packard Model 430 yang dilengkapi dengan *flame ionization detector*. Kolom yang digunakan berisi Porapak Q. Suhu oven adalah 200°C, suhu injektor dan detektor masing-masing 240°C. Sebagai gas pembawa digunakan  $N_2$  dan sebagai gas detektor digunakan  $H_2$ , yang masing-masing dipompakan dengan laju sebesar 11 ml/min. Untuk analisis, sampel sebesar 2  $\mu$ l diinjeksikan pada kolom kromatografi. Konsentrasi masing-masing senyawa dihitung berdasarkan kurva standar.

**Pengukuran aktivitas enzim vinilasetatesterase.** Aktivitas enzim vinilasetatesterase ditentukan dengan mengukur penurunan konsentrasi vinilasetat dan kenaikan konsentrasi etanol, asetaldehida dan asam asetat sebagai produk hidrolisis vinilasetat. Substrat yang digunakan adalah 10 mM vinilasetat yang dilarutkan dalam bufer 50 mM  $KH_2PO_4$ -NaOH, pH 7,2. Sebanyak 0,1 ml suspensi sel ditambahkan ke dalam 0,9 ml

larutan substrat pada tabung reaksi dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C. Dalam selang waktu 5 menit, sampel diambil sebanyak 0,1 ml dan kemudian dipusing dengan alat sentrifus pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatannya diinjeksikan pada kolom kromatografi gas. Satu unit aktivitas enzim (U) setara dengan 1  $\mu$ mol vinilasetat yang terhidrolisis dalam waktu satu menit per mg protein pada temperatur 30°C dan pH 7,2.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat V2 ternyata mampu tumbuh pada vinilasetat dan memanfaatkannya sebagai sumber karbon dan energi (Gambar 1). Seperti tampak pada gambar, konsentrasi vinilasetat dalam medium menurun, dengan laju rata-rata sebesar 8,8 mM Vinilasetat/jam, seiring dengan pertumbuhan isolat V2 tersebut. Pada Gambar 1 dan Tabel 1 diperlihatkan, bahwa pertumbuhan maksimum isolat V2 pada 20 mM Vinilasetat dicapai pada jam ke-20 dengan perolehan biomassa sebesar 658 mg sel bobot kering/l medium dan waktu penggandaan ( $t_d$ ) sebesar 2,1 jam. Selain itu, dapat pula ditentukan, bahwa koefisien hasil biomassa (Y) isolat V2 yang ditumbuhkan pada vinilasetat adalah sebesar  $\pm 33$  gram sel bobot kering per mol substrat, dengan aktivitas enzim vinilasetatesterase sebesar  $\pm 84$  nmol vinilasetat/min.mg sel bobot kering (Tabel 2).

Dapat pula diperlihatkan, bahwa etanol, asam asetat dan asetaldehida dijumpai dalam medium tumbuh dan tampaknya senyawa-senyawa tersebut merupakan produk-produk hidrolisis vinilasetat yang dikatalisir oleh isolat V2 (Gambar 1). Walaupun Vinilasetat dapat pula terurai secara spontan, tanpa isolat V2 (Gambar 2); namun laju hidrolisis yang ditunjukkan relatif kecil, yaitu hanya sebesar 0,15 mM Vinilasetat/jam. Disamping itu, produk hidrolisis vinilasetat secara spontan adalah asetaldehida dan asam asetat, tanpa terbentuk etanol.

Etanol, asam asetat dan asetaldehida yang terakumulasi dalam medium tumbuh dapat dikatakan relatif kecil, maksimum sebesar 1,5 mM (Gambar 1). Dan setelah 30 jam inkubasi, senyawa-senyawa tersebut tidak lagi ditemukan dalam medium. Tidak terakumulasinya produk-produk degradasi Vinilasetat ini merupakan indikasi bahwa senyawa-senyawa tersebut dimanfaatkan kembali oleh isolat V2 untuk memenuhi kebutuhan karbon dan energinya untuk pertumbuhannya.

Tabel 1. Pengaruh Media Tumbuh terhadap Waktu Penggandaan ( $t_d$ ), Biomassa dan koefisien Hasil (Y)

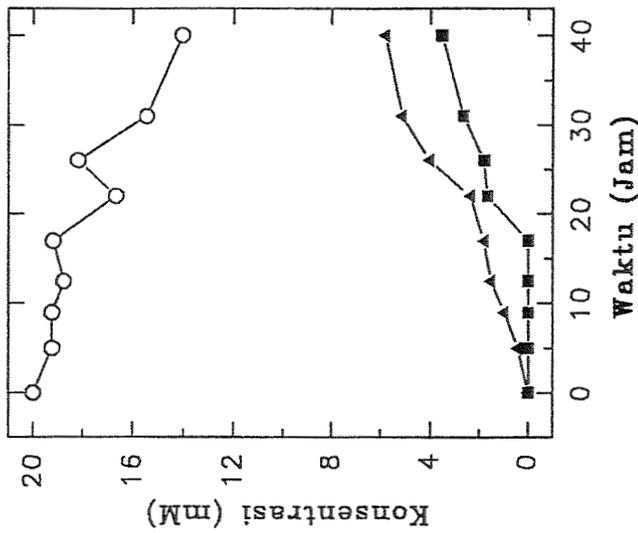
Substrat	Konsentrasi (mM)	$t_d$ (jam)	Biomassa (mg/l)	Y (g/mol)
Vinilasetat	20	2,1	658	32,9
Asetaldehida	10	4,8 & 1,2	220	22
Etanol	20	1,6	593	29,7
Asam asetat	20	0,8	322	16

Pengujian pertumbuhan isolat V2 pada 10 mM asetaldehida menunjukkan bahwa isolat V2 tumbuh dengan waktu penggandaan ( $t_d$ ) sebesar 1, 2 jam dan 4,8 jam, dan mencapai sel bobot kering sekitar 220 mg/l (Tabel 1 dan Gambar 3). Dari hasil perhitungan, koefisien hasil biomassa (Y) isolat V2 yang ditumbuhkan pada asetaldehida adalah sebesar 22 gram sel bobot kering per mol substrat. Nilai tersebut  $\pm 1,5$  kali lebih rendah bila dibandingkan dengan koefisien hasil yang dicapai oleh sel yang ditumbuhkan pada vinilasetat.

Selama pertumbuhan isolat V2 pada asetaldehida, keberadaan etanol juga terdeteksi dalam medium pertumbuhan. Namun, setelah keseluruhan asetaldehida termetabolisme, etanol yang terakumulasi dalam medium tersebut dimanfaatkan kembali oleh isolat V2 untuk pertumbuhannya. Setelah keseluruhan etanol termanfaatkan, terjadi perubahan fase pertumbuhan dari fase eksponensial ke fase stasioner (Gambar 3). Dapat pula ditentukan, bahwa aktivitas enzim vinilasetat esterase dari sel isolat V2 yang ditumbuhkan pada asetaldehida sebesar 56,3 nmol vinilasetat/min.mg sel bobot kering. Aktivitas enzim ini jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan aktivitas enzim isolat V2 yang ditumbuhkan pada Vinilasetat, etanol, atau pada asam asetat (Tabel 2).

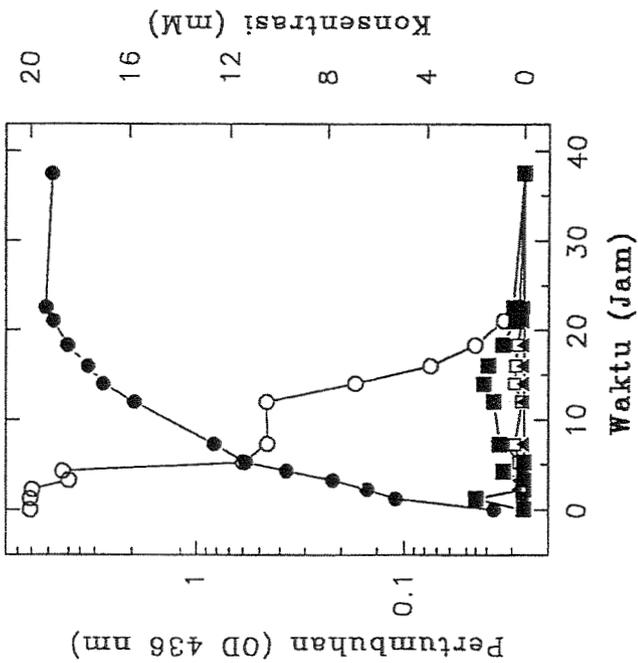
Tabel 2. Pengaruh Media Tumbuh terhadap Aktivitas Vinilasetat esterase dari Isolat V2

Substrat	Aktivitas Vinilasetat esterase	
	nmol VA.(min.mg) <sup>-1</sup>	(%)
Vinilasetat	84,3	100
Asetaldehida	56,3	67
Etanol	91,1	108
Asam asetat	74,4	88



Gambar 2 : Hidrolisis Vinilasetat secara spontan, tanpa isolat V2

- O : Vinilasetat
- : Asam Asetat
- ▲ : Asetaldehida

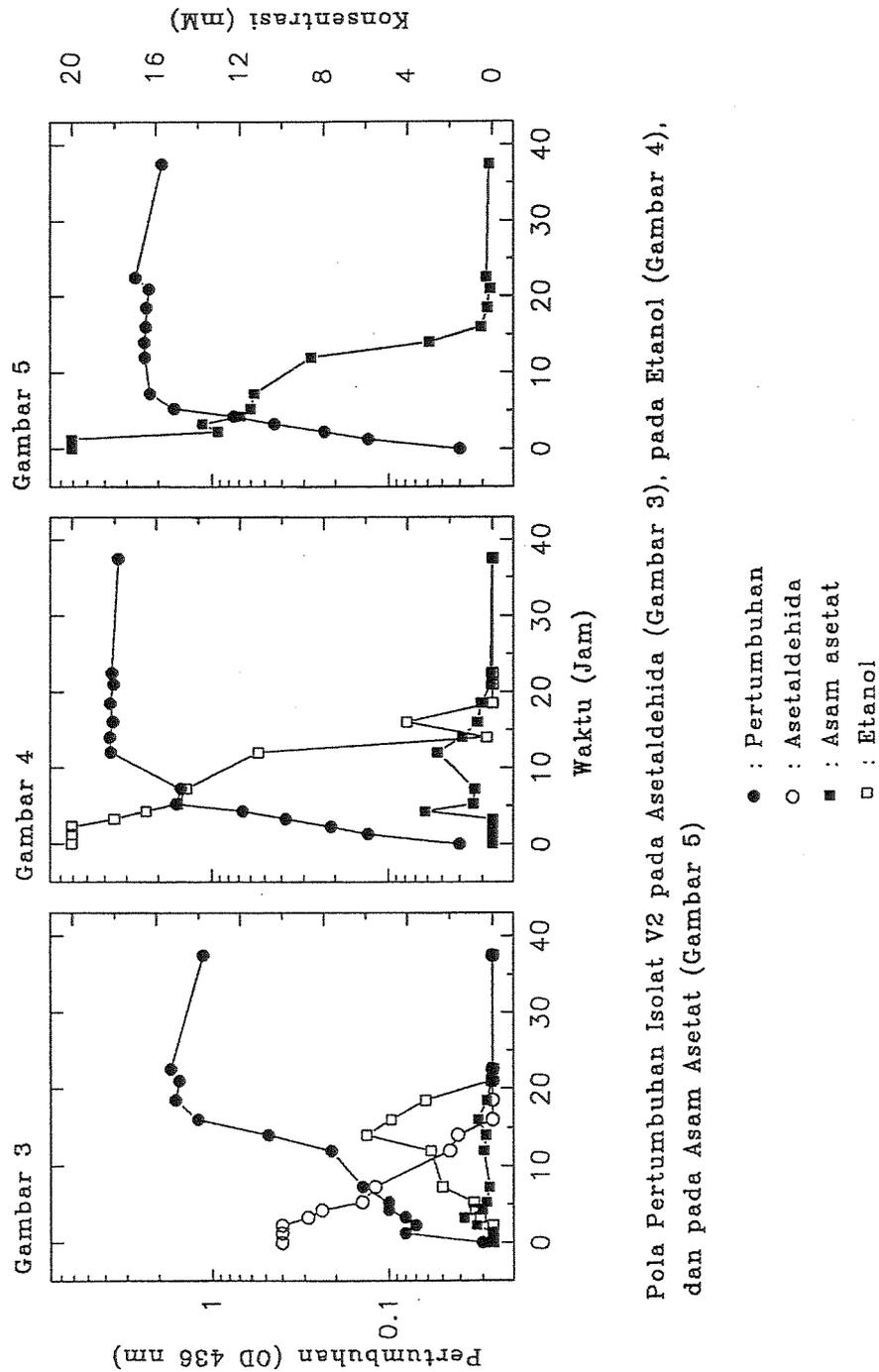


Gambar 1: Pola Pertumbuhan Isolat V2 pada Vinilasetat

- : Pertumbuhan
- O : Vinilasetat
- : Asam asetat
- : Etanol
- ▲ : Asetaldehida

Pada etanol, isolat V2 tumbuh dengan waktu penggandaan sebesar 1,6 h (Gambar 4 dan Tabel 1). Ini berarti, bahwa isolat V2 tumbuh pada etanol lebih cepat dibandingkan pada vinilasetat. Dan pertumbuhan isolat V2 pada 20 mM etanol mencapai biomassa sebesar 593 mg/l (Tabel 1) dengan koefisien hasil (Y) sebesar  $\pm 30$  gram sel bobot kering/mol substrat

yang dikonsumsi. Seperti terlihat pada Gambar 4, selama pertumbuhan isolat V2 pada etanol hanya dapat diamati sedikit asam asetat bebas (2,5 mM) dalam medium. Dapat ditunjukkan pula, bahwa aktivitas vinilasetaterase dari sel isolat V2 yang ditumbuhkan pada etanol sedikit lebih tinggi dari sel yang ditumbuhkan pada Vinilasetat (Tabel 2).



Pola Pertumbuhan Isolat V2 pada Asetaldehida (Gambar 3), pada Etanol (Gambar 4), dan pada Asam Asetat (Gambar 5)

Pada asam asetat, isolat V2 tumbuh dengan waktu penggandaan 0,8 h dengan biomassa sebesar 322 mg/l (Gambar 5 dan Tabel 1). Dengan demikian, laju pertumbuhan isolat tersebut pada asam asetat paling cepat dibandingkan dengan pada ketiga substrat lainnya, namun dengan koefisien hasil (Y) paling rendah. Disamping itu, dapat ditunjukkan pula, bahwa aktivitas vinilasetatesterase dari sel yang tumbuh pada asam asetat lebih rendah dibandingkan dengan sel yang ditumbuhkan pada vinilasetat dan etanol, tetapi lebih tinggi dari sel yang ditumbuhkan pada asetaldehida (Tabel 2).

### KESIMPULAN

Dalam penelitian ini dapat ditunjukkan, bahwa vinilasetat dapat didegradasi oleh isolat bakteri V2 dengan menghasilkan produk berupa etanol, asetaldehida dan asam asetat dengan laju degradasi sebesar 8,8 mM vinilasetat/jam. Isolat V2 tumbuh pada 20 mM vinilasetat dengan waktu penggandaan ( $t_d$ ) sebesar 2,1 jam, serta perolehan biomassa dan koefisien hasil (Y) masing-masing sebesar  $\pm 0,65$  g/l dan  $\pm 33$  g/mol substrat. Aktivitas vinilasetat-esterase tertinggi ditunjukkan oleh sel yang ditumbuhkan pada etanol, sedangkan perolehan biomassa tertinggi ditunjukkan oleh sel yang ditumbuhkan pada vinilasetat. Laju pertumbuhan yang paling lambat, perolehan biomassa yang paling rendah, dan aktivitas enzim vinilasetat-esterase yang paling rendah ditunjukkan oleh isolat V2 yang ditumbuhkan pada asetaldehida.

### PUSTAKA

- Gerhart, P. & S. W. Drew. 1994. Liquid Culture. *In*: Gerhart, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N. R. Krieg (eds.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM., Washington, D.C., 248-277
- Junghans, M. & B. Dittrich. 1992. Biofilter zur Reinigung kontaminierter Abluft als alternative zum Aktivkohlefilter. *Bioeng.* 4, 8-10
- Koch, A. L. 1994. Growth Measurement. *In*: Gerhart, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N. R. Krieg (eds.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM., Washington, D.C., 224-247.
- Meyer, O. & H. G. Schlegel. 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 277-310
- Pfennig, N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Arch. Mikrobiol.* 100, 197-206