

## Biodegradasi Senyawa Epiklorohidrin oleh Bakteri Isolat G3

### *Biodegradation of Epichlorohydrin Compound by Bacterial Isolate G3*

ANAS MIFTAH FAUZI\*, AMIN PRIYO UTOMO, NITARIANI ELFRIDA & MAYA NILASARI

*Center for Development of Safe Agroindustrial Processes, Gedung Fateta Institut Pertanian Bogor,  
Kampus IPB Darmaga, Bogor 16002*

Biodegradation of epichlorohydrin (ECH) by strain G3 (temporarily identified as *Pseudomonas aeruginosa*) was investigated both in suspended cultures and biofilm reactors. Experiment was performed to study biodegradation profile of the target pollutant in the presence of other organic pollutants, i.e. mixture of benzene, toluene, xylene, and heavy metal, i.e. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. The results indicated that the chemicals reduced the specific growth rates of G3 isolate in the suspended cultures with ECH added as the sole carbon source. These chemicals also slightly reduced dechlorination rate of ECH in the effluent of biofilm reactor. This study also showed that the magnitude of 2 mg/l ECH degradation decreased with the lower retention time. 67.6% of degradation was occurred during 1.33 min retention time.

Key words: epichlorohydrin, biofilm reactor, biodegradation

Senyawa halogen organik merupakan salah satu kelompok besar polutan yang mencemari lingkungan akibat penggunaan senyawa tersebut secara luas sebagai herbisida, insektisida, pelarut, dan sebagai zat antara dalam sintesis senyawa kimia. Salah satu senyawa halogen organik terpenting yang termasuk dalam kelompok tersebut ialah klorin alifatik. Senyawa klorin alifatik yang dijadikan sebagai model pada penelitian ini ialah epiklorohidrin.

Senyawa 3-propilen oksida atau 1-klor-2, 3-epoksi-propana atau epiklorohidrin (ECH) ialah senyawa yang sangat reaktif yang banyak digunakan di industri kimia dan farmasi seperti *adrenergic β-blocker*, L-karnitin, *platelet activating factor* (PAF), vitamin, bahan kimia pertanian, dan cairan kristal fero elektrik (Kasai *et al.* 1992). Senyawa ECH juga digunakan sebagai pelarut dan prekursor untuk sintesis senyawa yang bersifat optik aktif yang banyak digunakan di bidang farmasi (Suzuki *et al.* 1992).

Produksi dan penggunaan ECH menyebabkan tersebarnya senyawa ini ke dalam lingkungan perairan. Senyawa ini merupakan bahan kimia berbahaya karena diduga bersifat karsinogen. Selain itu, Haratake *et al.* (1993) melaporkan bahwa ECH juga menginduksi nekrosis.

Aplikasi bioteknologi untuk mengatasi masalah pencemaran lingkungan dapat dilakukan menggunakan mikroba yang mampu mendetoksifikasi senyawa kimia beracun. Salah satu jenis reaktor yang di dalamnya terdapat mikroba yang melekat pada bahan isian yang dimasukkan ke dalam reaktor ialah reaktor biofilm. Reaktor biofilm mempunyai keuntungan, yaitu relatif stabil terhadap keberadaan bahan

kimia beracun yang berkonsentrasi rendah dan mampu mengimobilisasi senyawa tersebut dengan cara adsorpsi untuk proses biodegradasi dan detoksifikasi (Bouwer & Mc Carty 1982).

Sejumlah bahan pencemar di lingkungan terdiri atas senyawa-senyawa kimia yang sangat kompleks. Senyawa pencemar yang satu dengan yang lain mungkin bersifat sinergis atau saling menghambat. Klecka & Maier (1988) melaporkan bahwa adanya penambahan fenol, 2,4,5-triklorofenol akan menghambat laju degradasi pentaklorofenol. Burbach & Perry (1993) juga melaporkan bahwa penambahan toluena dapat meningkatkan degradasi siren, tetapi laju degradasi dari toluena lebih rendah ketika ditambahkan siren.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pertumbuhan bakteri galur G3 dalam media yang berisi ECH pada berbagai konsentrasi sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi dengan atau tanpa pengaruh adanya senyawa polutan lain seperti benzena, toluena, dan xilena (BTX) atau logam berat seperti Pb. Mikroba yang digunakan pada penelitian ini ialah bakteri galur G3. Galur G3 diisolasi dari reaktor biofilm untuk mendegradasi senyawa 1,3-dikloropropanol (1,3-DCP) yang kultur awalnya berasal dari campuran bakteri galur A1 dan G1 (Fauzi *et al.* 1996). Setelah diidentifikasi, galur A1 diperkirakan ialah *Agrobacterium* sp., sedangkan galur G1 diperkirakan sementara sebagai *Pseudomonas mesophilus*.

#### BAHAN DAN METODE

**Bakteri.** Bakteri galur G3 diisolasi oleh Fauzi *et al.* (1996) dari reaktor biofilm yang dioperasikan untuk proses degradasi senyawa 1,3-DCP. Hasil identifikasi sementara

\* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-628253,  
Fax. +62-251-627830, E-mail: cdsapipb@indo.net.id

menunjukkan bahwa bakteri ini ialah *Pseudomonas aeruginosa*.

**Media Mineral.** Media mineral yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas dua jenis, yaitu media mineral A dan B. Media mineral A yang berkonsentrasi substrat rendah mengandung (per liter air suling) 0.5 g  $K_2HPO_4$ , 0.25 g  $KH_2PO_4$ , 0.25 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.05 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , dan 5 ml *trace element*. Media mineral B yang berkonsentrasi substrat tinggi dengan molaritas bufer fosfat 20 kali dari media A mengandung (per liter air suling) 12.5 g  $K_2HPO_4$ , 3.8 g  $KH_2PO_4$ , 1.0 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , dan 10 ml *trace element*. Komposisi *trace element* yang digunakan yaitu (per liter air suling) 12 g  $Na_2EDTA$ , 2.0 g  $NaOH$ , 1.0 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.4 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.4 g  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.5 ml  $H_2SO_4$ , 10 g  $Na_2SO_4$ , 0.1 g  $Na_2MoO_4$ , dan 2.0 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ . Senyawa ECH atau halogen lain yang telah disterilkan dengan filter (Millipore, diameter 0.2  $\mu$ ) ditambahkan ke dalam larutan media sebagai sumber karbon atau energi.

**Reaktor Biofilm.** Reaktor biofilm yang digunakan ialah reaktor tipe unggun diam, terdiri dari kolom gelas tubular dengan bahan isian berupa batu vulkanik.

**Partikel Bahan Isian (PBI).** Arang aktif, batu vulkanik, dan pasir sebagai PBI pada reaktor biofilm diseleksi untuk mendapatkan jenis partikel yang efektif menahan mikroba sebagai biofilm dan harganya murah.

**Penyiapan Inokulum dan Pengolahan ECH dengan Reaktor Biofilm.** Inokulum disiapkan dengan cara menumbuhkan mikroba galur G3 pada media yang mengandung 1.0 g/l 3-kloro-1,2-propanediol (CPD) pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruangan sampai fase eksponensial selama dua hari.

**Waktu Tinggal.** Waktu tinggal air limbah dalam reaktor sangat berpengaruh terhadap efisiensi pengolahan. Waktu tinggal dengan mengatur laju umpan yang masuk reaktor, dimulai dengan laju umpan pelan kemudian dinaikkan secara bertahap.

**Pengaruh BTX dan  $Pb(NO_3)_2$ .** Untuk melihat pengaruh polutan lain seperti BTX dan logam berat Pb maka ke dalam larutan ECH ditambahkan senyawa BTX dan  $Pb(NO_3)_2$  masing-masing sebanyak 1 mg/l dan 2 mg/l.

**Metode Analisis.** Konsentrasi sel diukur berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 600 nm ( $OD_{600}$ ). Kadar klorida yang merupakan produk degradasi ECH ditentukan dengan metode *modified florence and farrar* (MFF) menurut Fauzi *et al.* (1996) sedangkan konsentrasi ion Pb diukur menggunakan *atomic absorption spectrophotometer* (AAS) (AAnalyst 100, Perkin Elmer)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

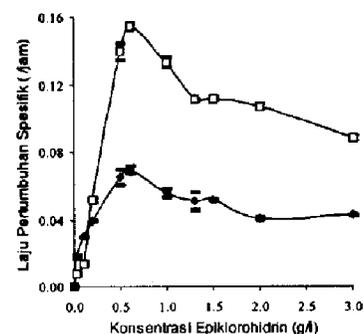
**Kinetika Pertumbuhan Galur G3 dan Pengaruh Senyawa  $Pb(NO_3)_2$ .** Kinetika pertumbuhan mikroba galur G3 diamati pada media dengan ECH sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi pada berbagai konsentrasi (Gambar 1). Hasil ini dibandingkan dengan kultur yang

mengandung senyawa lain yaitu  $Pb(NO_3)_2$ . Senyawa  $Pb(NO_3)_2$  telah menghambat laju pertumbuhan mikroba galur G3. Penambahan 200 mg/l  $Pb(NO_3)_2$  pada media menghambat laju pertumbuhan bakteri pada konsentrasi ECH diatas 200 mg/l. Karena proses perombakan senyawa ECH dipengaruhi oleh jumlah sel aktif maka laju proses biodegradasi ECH juga menurun. Senyawa ECH merupakan satu-satunya sumber karbon sehingga penghambatan pertumbuhan sel oleh adanya senyawa toksik seperti  $Pb(NO_3)_2$  diduga disebabkan karena terjadinya penurunan kemampuan enzim yang berfungsi untuk merombak ECH.

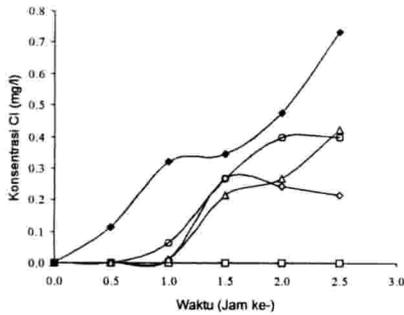
**Pengaruh Konsentrasi Sel Galur G3.** Hasil penelitian menggunakan konsentrasi sel galur G3 yang berbeda ( $1.2 \times 10^7$  cfu/ml sampai  $6.0 \times 10^7$  cfu/ml) menunjukkan bahwa laju degradasi atau deklorinasi dari 2 mg/l ECH akan semakin meningkat dengan semakin bertambahnya jumlah sel seperti yang ditunjukkan Gambar 2 dan Gambar 3. Peningkatan jumlah sel mikroba berarti akan meningkatkan konsentrasi enzim yang berperan dalam proses degradasi ECH. Hasil ini menunjukkan perlunya dikembangkan suatu sistem bioreaktor yang mampu mempertahankan konsentrasi sel aktif yang tinggi dalam proses perombakan senyawa ECH. Salah satu sistem yang mungkin diterapkan ialah reaktor biofilm. Untuk mempertahankan konsentrasi mikroba agar selalu tinggi di dalam reaktor maka pada penelitian ini digunakan reaktor biofilm.

**Biodegradasi ECH dalam Reaktor Biofilm.** Evaluasi terhadap arang aktif, batu vulkanik, dan pasir sebagai PBI didasarkan pada laju konsumsi substrat ECH oleh mikroba pada masing-masing partikel tersebut. Karakteristik ketiga partikel ada pada Tabel 1. Laju konsumsi substrat menunjukkan perubahan jumlah substrat per satuan waktu sehingga laju konsumsi substrat secara tidak langsung menggambarkan laju degradasi substrat tersebut.

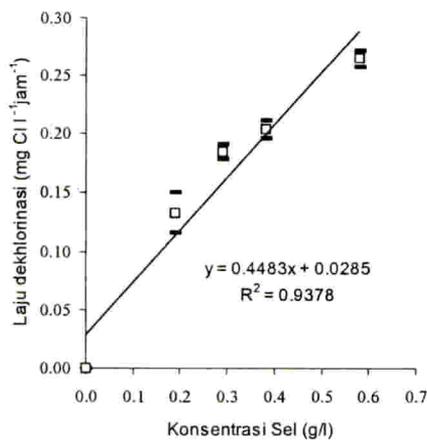
Hasil penelitian menunjukkan bahwa di antara ketiga jenis PBI yang digunakan, laju konsumsi substrat tertinggi terjadi pada media batu vulkanik yaitu 2.3 mg/l jam, sementara arang aktif dan pasir masing-masing ialah 1.4 mg/l.jam dan 1.1 mg/l.jam (data tidak disajikan), sehingga untuk selanjutnya batu vulkanik dipakai sebagai PBI pada reaktor film.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi epiklorohidrin dan penambahan  $Pb(NO_3)_2$  terhadap laju pertumbuhan spesifik. Simbol: □ epiklorohidrin, • epiklorohidrin + 200 mg/l  $Pb(NO_3)_2$ .



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi inokulum galur G3 terhadap deklorinasi epiklorohidrin pada konsentrasi 2 mg/l. Simbol: □ 0 cfu/ml; ◊  $1.2 \times 10^7$  cfu/ml, Δ  $1.8 \times 10^7$  cfu/ml, ○  $2.4 \times 10^7$  cfu/ml, •  $6.0 \times 10^7$  cfu/ml.



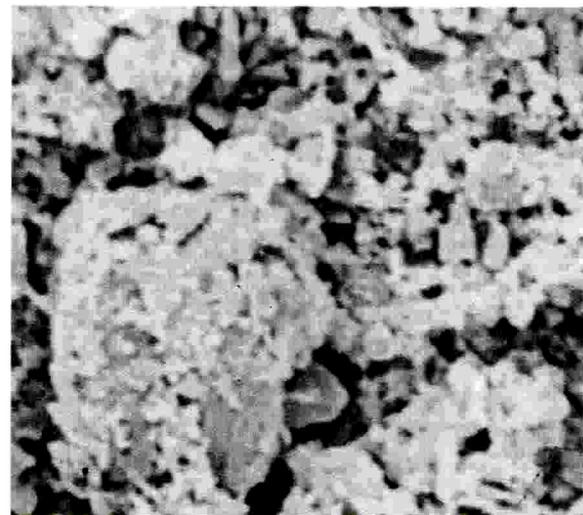
Gambar 3. Grafik hubungan antara laju deklorinasi epiklorohidrin dengan konsentrasi inokulum galur G3.

Berdasarkan penampakan morfologi yang dilakukan dengan *scanning electron microscope*, dapat dilihat bahwa batu vulkanik dan arang aktif mempunyai bentuk yang tidak teratur sehingga memungkinkan terdapat banyak rongga di dalamnya (Gambar 4). Rongga-rongga tersebut menyediakan tempat bagi mikroba untuk melekat dan membentuk koloni sehingga biomassa mikroba tersebut dapat membentuk biofilm yang kompak (Jewell 1990).

**Pengaruh Waktu Tenggat.** Untuk melihat pengaruh waktu tenggat terhadap degradasi senyawa ECH, pengujian dilakukan pada media A yang berisi 2 mg/l ECH. Penelitian dilakukan pada laju alir 6, 12, 20, dan 30 ml/menit atau waktu tenggat 2.65, 1.33, 0.80, dan 0.53 menit. Hasil

Tabel 1. Karakteristik arang aktif, batu vulkanik, dan pasir sebagai partikel bahan isian pada reaktor biofilm.

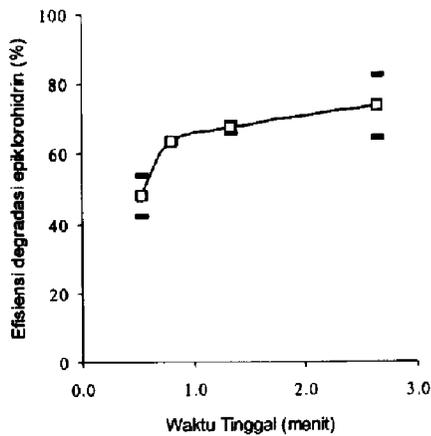
Karakteristik	Arang Aktif	Batu Vulkanik	Pasir
Diameter partikel (mm)	1.50 -2.00	1.50 - 2.00	0.50
Berat per reaktor (g)	24.35	47.77	53.99
Volume bed (ml)	35.00	35.00	35.00
Porositas	0.47	0.45	0.43
Densitas (g/ml)	0.57	1.15	1.34
Densitas (g/ml)	16.6	15.90	14.9



Gambar 4. Penampakan morfologi arang aktif dengan pembesaran 2 000x (atas) dan batu vulkanik dengan pembesaran 1 500x (bawah) yang digunakan sebagai partikel bahan isian.

penelitian menunjukkan bahwa reaktor biofilm pada waktu tinggal 2.65 menit dapat mendegradasi ECH sampai 73.6%. Perhitungan ini didasarkan pada asumsi bahwa persentase degradasi ECH sebanding dengan persentase deklorinasi ECH. Hal ini menunjukkan bahwa biofilm dari galur G3 memiliki kondisi yang aktif untuk mendegradasi ECH pada konsentrasi rendah. Persentase degradasi ECH semakin menurun dengan semakin rendahnya waktu tinggal. Persentase degradasi ECH pada waktu tinggal 1.33, 0.80, dan 0.53 menit masing-masing ialah 67.6%, 63.8%, dan 48.1%. Grafik penurunan persentase degradasi ECH pada berbagai laju alir dapat dilihat pada Gambar 5.

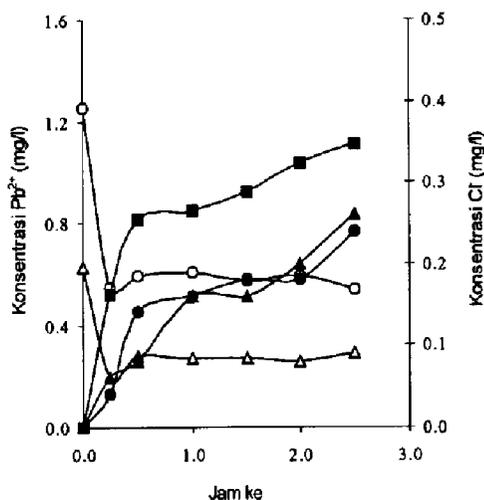
Fenomena penurunan persentase deklorinasi ECH pada laju alir yang tinggi dapat dijelaskan bahwa laju alir yang tinggi atau waktu tinggal yang singkat akan menyebabkan peningkatan *shear stress* sehingga terjadi peningkatan *detachment* (pelepasan sel mikroba dari BSP) yang menyebabkan rendahnya jumlah mikroba (Olivera 1992).



Gambar 5. Pengaruh waktu tinggal terhadap efisiensi degradasi epiklorohidrin.

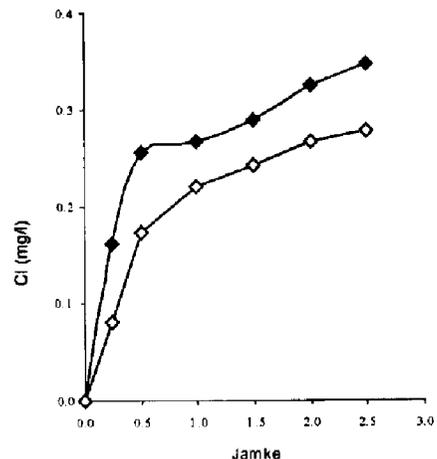
**Pengaruh  $Pb(NO_3)_2$  dan BTX terhadap Degradasi ECH.** Penelitian ini untuk mengamati pengaruh  $Pb^{2+}$  maupun BTX terhadap proses degradasi ECH pada reaktor biofilm. Hasil penelitian pada reaktor biofilm (Gambar 6) menunjukkan bahwa konsentrasi Cl bebas dalam efluen setelah 2.5 jam proses lebih rendah dibandingkan dengan proses yang sama tanpa adanya  $Pb^{2+}$ . Pada percobaan ini peningkatan penambahan  $Pb(NO_3)_2$  dari 1 mg/l menjadi 2 mg/l tidak berpengaruh nyata.

Penurunan hasil pengukuran Cl dalam efluen belum tentu menggambarkan terjadinya penghambatan degradasi ECH. Hal ini dibuktikan dengan adanya penurunan kadar Pb dalam larutan. Secara kimiawi ion Pb akan bereaksi dengan ion Cl membentuk endapan  $PbCl_2$ .



Gambar 6. Profil deklorinasi 1 mg/l epiklorohidrin dengan adanya ion Pb pada berbagai konsentrasi. Simbol terbuka menunjukkan konsentrasi ion Pb di larutan dan simbol tertutup menunjukkan konsentrasi klor. Simbol:  $\blacktriangle$   $Pb(NO_3)_2$  1 mg/l,  $\bullet$   $Pb(NO_3)_2$  2 mg/l,  $\blacksquare$  tanpa  $Pb(NO_3)_2$ .

Laju deklorinasi mengalami sedikit penurunan dengan adanya penambahan 2 mg/l BTX (Gambar 7). Hasil penelitian dalam kultur tersuspensi (data tidak ditampilkan) menunjukkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* galur G3 tidak dapat menggunakan BTX sebagai sumber energi. Mikrob ini tumbuh dengan baik pada media yang mengandung BTX dan ECH sebagai sumber karbon.



Gambar 7. Profil deklorinasi ECH pada konsentrasi 1 mg/l yang dicampur dengan benzena toluena xilena. Simbol:  $\bullet$  ECH 1 mg/l,  $\circ$  ECH 1 mg/l + BTX 2 mg/l.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bouwer, E.J. & P.L. Mc. Carty. 1982. Removal of trace chlorinated organic compounds by activated carbon and fixed film bacteria. *Environ. Sci. Tech.* 16:836-843.
- Burback, B.L. & J.J. Perry. 1993. Biodegradation and biotransformation of groundwater pollutant mixtures by *Mycobacterium vaccae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1025-1029.
- Fauzi, A.M., D.J. Hardman & A.T. Bull. 1996. Biodehalogenation of low concentrations of 1,3-dichloropropanol by mono and mixed cultures of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:660-666.
- Haratake, J., A. Furuta, T. Iwasa, C. Wakasugi & K. Imasu. 1993. Submassive hepatic necrosis induced by dichloropropanol. *Liver* 13:123-129.
- Jewell, W.J. 1990. Fundamentals and advances in expanded bed reactor for wastewater treatment, hlm. 223-252. Di dalam: R.D. Tyagi (ed.), *Wastewater Treatment by Immobilized Cells*. London: CRC.
- Kasai, N., K. Tsujimura, K. Unoura & T. Suzuki. 1992. Preparation of (S)-2,3-dichloro-1-propanol by *Pseudomonas* sp. and its use in the synthesis of R-epichlorohydrin. *J. Indus. Microbiol.* 9:97-101.
- Klecka, G.M. & W.J. Maier. 1988. Kinetics on microbial growth on mixtures of pentachlorophenol and chlorinated aromatic compounds. *Biotech. Bioeng.* 31:328-335.
- Olivera, D.R. 1992. Physico-chemical aspect of adhesion, hlm. 45-48. Di dalam: L.F. Melo (ed.), *Biofilm - Science and Technology*. London: Kluwer Academic.
- Suzuki, T., N. Kasai, R. Yamamoto & N. Minamura. 1992. Isolation of a bacterium assimilating @-3-chloro-1,2-propanediol and production of (S)-3-chloro-1,2-propanediol using microbial resolution. *J. Ferment. Bioeng.* 73:443-448