

**PENGARUH BERBAGAI INDUKTOR TERHADAP LAJU DEGRADASI  
ASETONITRIL OLEH *Corynebacterium* UBT 9**

**EFFECT OF VARIOUS INDUCTORS ON ACETONITRILE DEGRADATION  
RATE BY *Corynebacterium* UBT 9**

Bambang Sunarko

Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi, LIPI

**ABSTRACT**

Various nitrile substances were selected to find out the best inductor for biosynthesis of enzyme nitrile hydratase of *Corynebacterium* UBT 9. This work showed that *Corynebacterium* UBT 9 could grow on eight of examined sixteen nitrile substances, as inductors. The bacterial colony attained the highest cell biomass, as it grew on acetonitrile, allyl cyanide, butyronitrile, and propionitrile. However, the highest nitrile-hydratase activity was shown by *Corynebacterium* UBT grown on 2-pentenitrile. The acetonitrile degradation rate by 2-pentenitrile induced cells was five times higher than those by acetonitrile induced cells. The needed cell biomass for the total 10 (5 (v/v) acetonitrile degradation by 2-pentenitrile induced cells was 25 % smaller than those by acetonitrile induced cells.

Keywords: nitriles, nitrile-hydratase, inductor, degradation

**ABSTRAK**

Dalam penelitian ini diperlihatkan, bahwa *Corynebacterium* UBT 9 mampu tumbuh pada delapan dari enambelas senyawa nitril yang diuji sebagai inductor. Biomassa tertinggi diperoleh bila *Corynebacterium* UBT 9 ditumbuhkan pada asetonitril, allilsianida, butironitril, dan propionitril. Namun aktivitas enzim nitril-hidratase tertinggi diperoleh apabila sel ditumbuhkan pada 2-pentenitril. Dapat diperlihatkan pula, bahwa laju degradasi asetonitril oleh sel yang diinduksi 2-pentenitril berlangsung sekitar lima kali lebih cepat dibandingkan dengan laju degradasi oleh sel yang diinduksi asetonitril. Selain itu, untuk mendegradasi 10 (v/v) asetonitril secara total dengan menggunakan sel yang diinduksi oleh 2-pentenitril diperlukan biomassa yang lebih kecil, yaitu hanya 25 % dari biomassa yang diinduksi oleh asetonitril.

Kata kunci: senyawa nitril, nitril-hidratase, inductor, degradasi

**PENDAHULUAN**

Asetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) adalah senyawa toksik, tetapi secara komersial mempunyai arti penting. Senyawa tersebut banyak diproduksi dan dimanfaatkan oleh industri kimia dan farmasi, terutama sebagai pelarut dan pengestrak. Asetonitril juga digunakan dalam industri plastik,

fotografi, pewarna tekstil, pewangi dan dalam produksi senyawa-senyawa organik yang mengandung nitrogen seperti amida, amina, mono- dan dinitril. Disamping itu, asetonitril juga merupakan produk samping dari berbagai proses produksi, misalnya produksi bensol kasar dari *ter* batubara, dan produksi akrilonitril dari propilen.

Toksisitas asetonitril terutama disebabkan oleh produk urainya, asam sianida (HCN) yang sulit terurai dan sangat berbahaya bagi manusia. Asetonitril juga mudah terserap kulit, sehingga dapat mengakibatkan gangguan pada kulit dan selaput pelindung lainnya (Hagedorn & Gelbke, 1979). Untuk mengantisipasi masalah pencemaran lingkungan akibat peningkatan produksi dan penggunaan asetonitril dalam industri, maka perlu dikembangkan suatu sistem biologis yang dapat menghidrolisis senyawa tersebut menjadi senyawa-senyawa *non*-toksik.

*Corynebacterium* UBT 9 dilaporkan mampu tumbuh pada asetonitril dan memanfaatkannya sebagai sumber energi, karbon dan nitrogen untuk tumbuhnya (Sunarko, 1995). Telah diketahui, bahwa *nitril-hidratase* (E.C. 4.3.2.84) dan *amidase* (E.C. 3.5.1.4) adalah enzim yang terlibat dalam hidrolisis asetonitril menjadi asam asetat dan amonia pada berbagai jasad renik (Nagasawa *et al.*, 1987; Wyatt & Linton, 1988, Sander, 1991; Sunarko, 1995). Namun, aktivitas kedua enzim tersebut pada *Corynebacterium* UBT 9 terbukti masih relatif rendah (Sunarko & Meyer, 1989; Sunarko, 1995; Sunarko, 1996). Oleh karena itu, untuk dapat memanfaatkan jasad renik tersebut sebagai biokatalisator yang efektif untuk mendetoksifikasi air buangan yang mengandung asetonitril diperlukan upaya untuk meningkatkan aktivitas kedua enzim tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh berbagai induktor (berbagai senyawa nitril) terhadap aktivitas enzim nitril hidratase dari *Corynebacterium* UBT 9 dan terhadap proses degradasi asetonitril oleh isolat yang ditumbuhkan pada induktor terbaik.

## BAHAN DAN METODE

**Mikroorganisme.** *Corynebacterium* UBT 9 diperoleh dari koleksi biak Lehrstuhl fuer Mikrobiologie, Universitaet Bayreuth, Jerman.

**Medium tumbuh *Corynebacterium* UBT 9.** Komposisi medium mineral untuk menumbuhkan *Corynebacterium* UBT 9 adalah sebagai berikut :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,4475 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g), ekstrak khamir (0,01 g), yang dilarutkan dalam  $\text{H}_2\text{O}$  dest.(1000 ml) (Meyer & Schlegel 1983) dan

ditambah dengan 1 ml mikroelemen. Sedangkan, komposisi mikroelemen tersebut adalah sebagai berikut:  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,1 g),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (0,03 g),  $H_3BO_3$  (0,3 g),  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,2 g),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,015 g),  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,02 g),  $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$  (0,9 g),  $Na_2SeO_3$  (0,02 g) dalam  $H_2O$  dest. (1000 ml) (Pfennig 1974). Sebagai sumber energi, karbon, dan nitrogen digunakan asetonitril dan senyawa-senyawa nitril lainnya dengan konsentrasi 10 mM.

**Produksi biomassa *Corynebacterium* UBT 9.** Biomassa *Corynebacterium* UBT 9 diproduksi dengan cara menumbuhkan isolat tersebut pada asetonitril dan senyawa-senyawa nitril lainnya sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen dalam fermentor (3 l) yang berisi 2 l medium tumbuh dengan aerasi dan pengadukan dengan kecepatan 100 rpm. Aerasi diberikan secara tetap dengan laju 0,1 l/min. Antibuih (polipropilen glikol 50 % v/v) ditambahkan secara manual bila diperlukan. Sebagai inokulan digunakan *Corynebacterium* UBT 9 yang tumbuh pada fase eksponensial. Sel dipanen pada akhir fase eksponensial dengan sentrifus (6.000 rpm) selama 1 jam. Sebelum digunakan untuk analisis, sel-sel tersebut disimpan pada suhu  $-4^\circ C$ .

**Pengukuran pertumbuhan *Corynebacterium* UBT 9.** Pertumbuhan *Corynebacterium* UBT 9 selama proses fermentasi ditentukan dengan menggunakan satuan kerapatan optis (*optical density*/OD) pada panjang gelombang 436 nm.

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

**Pengukuran aktivitas enzim nitril-hidratase sel *Corynebacterium* UBT 9.** Aktivitas enzim nitril-hidratase ditentukan dengan mengukur penurunan konsentrasi asetonitril dan kenaikan konsentrasi asetamida, asam asetat dan ammonium sebagai produk hidrolisis asetonitril. Substrat yang digunakan dalam pengujian aktivitas ini adalah 100 mM asetonitril yang dilarutkan dalam 50 mM  $KH_2PO_4$ -NaOH, pH 7,2. Suspensi sel (0,1 ml) ditambahkan ke dalam substrat (0,9 ml) pada tabung reaksi dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu  $30^\circ C$ . Dalam selang waktu 5 menit, 0,1 ml sampel diambil, kemudian dipusing dengan sentrifus (kecepatan 5000 rpm) selama 10 menit. Supernatannya diinjeksikan pada kolom kromatografi gas. Satu unit aktivitas enzim (U)

Tabel 1. Pengaruh berbagai senyawa nitril terhadap pertumbuhan dan aktivitas nitril-hidratase sel *Corynebacterium* UBT 9

Substrat	Biomassa sel		Aktivitas Nitril-Hidratase	
	(g/l) <sup>a)</sup>	%	( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) <sup>b)</sup>	%
Asetonitril	0,40	100	0,92	21
Akronitril	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
Adiponitril	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
Allilsianida	0,40	100	0,10	2
Allil-isothiosianat	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
Benzonitril	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
Benzilsianida	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
Butironitril	0,34	85	0,75	17
Iso-butironitril	0,04	9	0,52	12
Krotonitril	0,14	35	3,30	75
Etil-isothiosianat	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
Lauronitril	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
2-Pentenitril	0,17	43	4,40	100
Pimelonitril	0,20	50	0,26	6
Propionitril	0,39	98	0,72	16
Suberonitril	0,20	50	0,10	2
m-tolunitril	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
Valeronitril	0,39	98	1,41	32

a) g sel bobot kering per liter medium tumbuh

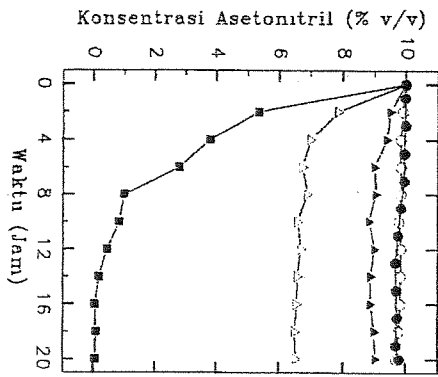
b)  $\mu\text{mol}$  asetonitril per min. per mg sel bobot kering

c) tidak tumbuh

Selain itu Gambar 1A dan 2A juga memperlihatkan, bahwa waktu yang diperlukan untuk mendegradasi asetonitril secara total dengan menggunakan sel yang diinduksi dengan 2-pentenitril lebih cepat dibandingkan dengan menggunakan asetonitril. Dengan menggunakan sel yang diinduksi dengan 2-pentenitril, keseluruhan asetonitril (10 % v/v) sudah terdegradasi hanya dalam waktu 8 - 10 jam masa inkubasi, sedangkan dengan menggunakan sel yang diinduksi dengan asetonitril diperlukan waktu antara 16-20 jam. Dengan demikian, penggunaan sel yang diinduksi dengan 2-pentenitril dapat menghemat waktu proses degradasi sekitar 8 - 10 jam.

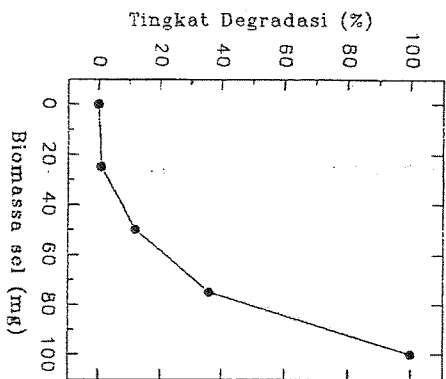
Seperti juga diperlihatkan pada Gambar 1A dan 2 A, secara keseluruhan, laju degradasi asetonitril tertinggi terjadi pada dua jam pertama masa inkubasi, dan setelah itu laju degradasinya menurun secara drastis. Nampaknya, stabilitas enzim sel yang diinduksi oleh 2-pentenitril tidak lebih baik daripada sel yang diinduksi dengan asetonitril. Berdasarkan

perhitungan, laju degradasi asetonitril tertinggi dengan sel yang diinduksi dengan asetonitril terjadi dengan penambahan 100 mg sel bobot kering, yaitu sebesar 0,047 mmol asetonitril/mg.jam (Gambar 1C). Sedangkan dengan sel yang diinduksi dengan pentenitril, laju degradasi asetonitril tertinggi terjadi dengan penambahan 15 mg -20 mg sel biomassa, yaitu  $\pm 0,35$  mmol asetonitril/mg.jam (Gambar 2C). Dengan demikian, penggunaan sel-sel yang diinduksi dengan pentenitril dapat meningkatkan laju degradasi asetonitril sekitar 7,5 kali dibandingkan dengan penggunaan sel yang diinduksi dengan asetonitril.

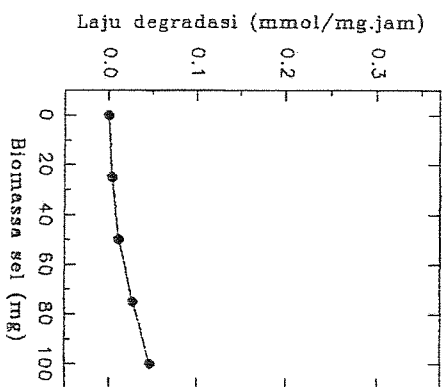


Gambar 1A: Pola degradasi asetonitril oleh sel *Corynebacterium* UBR 9 yang diinduksi dengan asetonitril

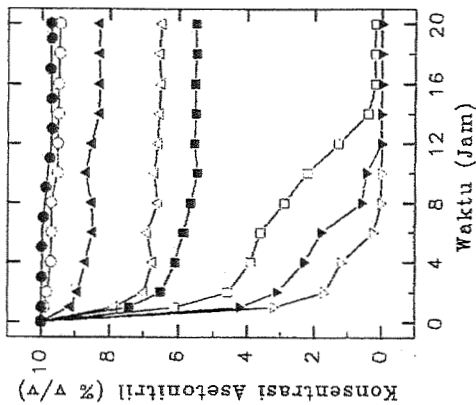
- : kontrol
- : 25 mg biomassa sel
- ▲ : 50 mg biomassa sel
- △ : 75 mg biomassa sel
- : 100 mg biomassa sel



Gambar 1B: Korelasi antara biomassa sel dengan tingkat degradasi asetonitril oleh *Corynebacterium* UBR 9

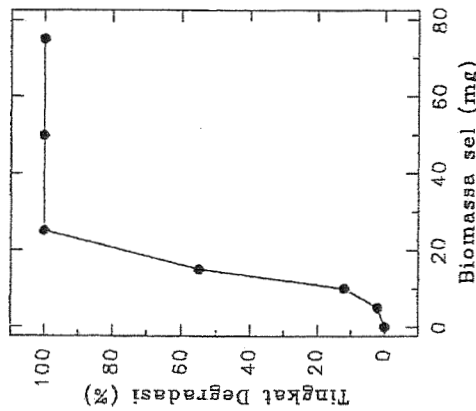


Gambar 1C: Korelasi antara biomassa sel dengan laju degradasi asetonitril oleh *Corynebacterium*

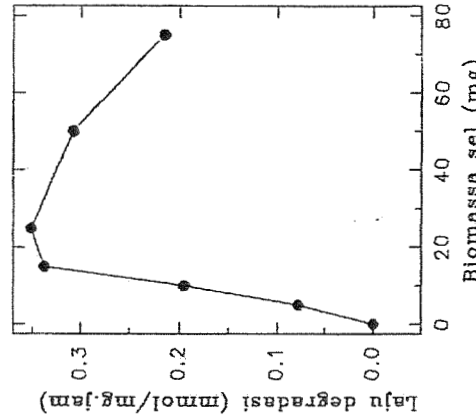


Gambar 2A: Pola degradasi asetonitril oleh sel *Corynebacterium* UBT 9 yang diinduksi dengan penten-nitril

- : kontrol
- : 5 mg biomassa sel
- ▲ : 10 mg biomassa sel
- △ : 15 mg biomassa sel
- : 20 mg biomassa sel
- : 25 mg biomassa sel
- ▼ : 50 mg biomassa sel
- ▽ : 75 mg biomassa sel



Gambar 2B: Korelasi antara biomassa sel dengan tingkat degradasi asetonitril oleh *Corynebacterium* UBT 9



Gambar 2C: Korelasi antara biomassa sel dengan laju degradasi asetonitril oleh *Corynebacterium* UBT 9

## KESIMPULAN

Dalam penelitian ini dapat diperlihatkan, bahwa *Corynebacterium* UBT 9 mampu tumbuh pada delapan dari enambelas senyawa nitril yang diuji. Perolehan biomassa tertinggi diperlihatkan, bila *Corynebacterium* UBT 9 ditumbuhkan pada asetonitril, allilsianida, butironitril, dan

propionitril. Namun aktivitas enzim nitril-hidratase tertinggi diperoleh dari sel yang ditumbuhkan pada 2-pentenitril sebagai induktor. Dapat diperlihatkan pula, bahwa laju degradasi asetoneitril oleh sel yang diinduksi 2-pentenitril berlangsung sekitar lima kali lebih cepat dibandingkan dengan laju degradasi oleh sel yang diinduksi asetoneitril. Selain itu, untuk mendegradasi 10 (v/v) asetoneitril secara total dengan menggunakan sel yang diinduksi dengan 2-pentenitril diperlukan biomassa lebih kecil, yaitu hanya 25 % dari biomassa sel yang diinduksi oleh asetoneitril, dan proses degradasinya berlangsung dua kali lebih cepat.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Hagedorn, F & H. P. Gelbke. 1979. Aliphatische Nitrile. Dalam: Bartolomé, E., E. Biekert, H. Hellmann, H. Ley, W. M. Weigert, E. Weise (Eds.), Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, Band 17, 323- 338
- Meyer, O. & H. G. Schlegel. 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. Ann. Rev. Microbiol., 37, 277-310
- Nagasawa, T., H. Nanaba, K. Ryuno, K. Takeuchi, H. Yamada. 1987. Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. Eur. J. Biochem., 162, 1305-1312
- Pfennig, N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. Arch. Mikrobiol., 100, 197-206
- Sander, A. 1991. Charakterisierung Taxonomisch Diverser Nitril-Abbauender Bakterien und Untersuchung der Am Nitrilabbau Beteiligten Enzyme. Doktorarbeit, Universität Bayreuth, Jerman.
- Sunarko, B. & O. Meyer. 1989. A Microbial System for the Detoxification of Acetonitrile in HPLC-Waste. p. 859-862. In: Behren, D. and A. J. Driesel (Eds.) Dechema Biotechnology Conf., 3. Verlag Chemie, Weinheim.
- Sunarko, B. 1995. Mikrobieller Abbau von Acetonitril und Vinylacetat, und Charakterisierung von Vinylacetatesterase. p. 174. Doktorarbeit. Universitaet Bayreuth.
- Sunarko, B. 1996. Kemampuan Berbagai Islat Bakteri Dalam Mendegradasi Asetoneitril. *J. Mikrobiol. Tropika*, 1: 13-19.
- Wyatt, J. M., E. A. Linton. 1988. The industrial potensial of microbial nitrile biochemistry. Dalam: Mehnert, J., L. Brimer (eds.), Cyanide Compounds in Biology, John Wiley & Sons, Chichester, 32-42