

Metabolisme Benzonitril oleh *Flavobacterium* sp. NUB 1

Nunik Sulistinah^{✉1)}, Bambang Sunarko²⁾ & Ahmad Thontowi²⁾

¹⁾ Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor

²⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong

ABSTRACT

Metabolism of Benzonitriles by *Flavobacterium* sp. NUB 1. *Flavobacterium* sp. NUB 1 was isolated from industrial waste of PT. Petrokimia Gresik. The bacterium was able to utilize benzonitrile and acetonitrile and propionitril as the sole source of carbon and nitrogen. Growth on benzonitrile gave higher growth rate and biomass yield than growth on acetonitrile and propionitrile. When *Flavobacterium* sp. NUB1 grew on benzonitril 15 mM, the doubling time is 9 hours 54 minutes and the specific growth rate (μ) was $0,07 \text{ h}^{-1}$. Whole cell of *Flavobacterium* sp. NUB 1 could hydrolyzed aromatic and aliphatic nitriles. The bacteria isolate has ability in metabolism of acetonitrile greater than benzonitrile. Activity of nitrile hydratase and amidase are more dominant than nitrilase in metabolism of benzonitrile.

Key words: Biodegradation, benzonitril, *Flavobacterium* sp. NUB 1, nitrile-hydratase, amidase, nitrilase

PENDAHULUAN

Benzonitril ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}$) merupakan senyawa nitril aromatik paling sederhana dan sangat toksik. Senyawa ini banyak digunakan sebagai pelarut kuat untuk beberapa senyawa organik, anorganik dan beberapa polimer (Pollak *et al.*, 1991), sintesis benzoguanamina, serta dalam pemisahan naftalena dan alkilnaftalena dari senyawa aromatik dengan destilasi azeotrop (Nawaz *et al.*, 1992).

Benzonitril juga merupakan salah satu bahan aktif herbisida yang banyak digunakan di bidang pertanian, seperti misalnya bromoksinil, dichlobenil, ioksinil dan buktril. Penggunaan herbisida secara luas dapat menyebabkan pencemaran lingkungan dan berdampak negatif bagi kesehatan. Biotransformasi senyawa nitril

dengan menggunakan mikroba merupakan cara terbaik untuk menghilangkan toksisitasnya (Kobayashi & Shimizu, 1994; Nagasawa *et al.*, 1987). Selain untuk mengatasi masalah lingkungan (O'Grady & Pembroke, 1994; Chapatwala *et al.*, 1995) mikroba pendegradasi nitril dan enzimnya dapat digunakan dalam sintesis berbagai senyawa kimia (Langdahl *et al.* 1996; Bianchi *et al.*, 1991; Kakeya *et al.*, 1991; Layh *et al.*, 1992). Dilaporkan hanya sedikit mikroba yang mampu mendegradasi benzonitril, diantaranya *Fusarium solani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodococcus rhodochrous*, dan *Arthrobacter* sp. Mikrob tersebut mampu memanfaatkan benzonitril sebagai satu-satunya sumber karbon, nitrogen, dan energi (Asano *et al.*, 1982; Nawaz *et al.*, 1992).

✉ Jl. Ir. H. Juanda No. 18 Bogor 16002

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi *Flavobacterium* sp. NUB 1 yang merupakan isolat bakteri lokal dalam memetabolisme senyawa nitril, khususnya benzonitril. Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi landasan untuk mengembangkan sistem detoksifikasi limbah yang mengandung benzonitril.

BAHAN DAN METODE

Bahan kimia

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Asetonitril (Merck), Propionitril (Aldrich), Benzonitril (Junsei Chemical), Asetamida (Sigma), Propionamida (Sigma), dan Benzamida (Sigma).

Mikroorganisme dan kondisi pertumbuhan

Flavobacterium sp. NUB 1 diisolasi dari limbah cair industri PT. Petrokimia Gresik. Isolat bakteri tersebut dikoleksi dalam agar miring (*slant agar*) dan diinokulasikan ke dalam media *subculture*. *Subculture* tersebut dipersiapkan untuk pengujian lebih lanjut. Isolat bakteri tersebut juga ditumbuhkan pada media mineral yang mengandung senyawa nitril atau amida dengan konsentrasi tertentu sebagai sumber karbon dan nitrogen.

Medium tumbuh untuk produksi biomassa *Flavobacterium* sp. NUB 1

Media yang digunakan untuk menumbuhkan *Flavobacterium* sp. NUB 1 adalah media mineral (Meyer & Schlegel, 1983) dan ditambahkan 1 ml mikroelemen (Pfennig, 1974). Sebagai sumber energi, karbon dan nitrogen digunakan benzonitril.

Penentuan pola pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB 1 pada benzonitril

Flavobacterium sp. NUB 1 ditumbuhkan dalam fermentor (3 liter) yang berisi 2 liter media mineral dan mengandung 15 mM benzonitril. Selang waktu tertentu kultur diambil untuk diamati pertumbuhannya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 436 nm.

Penentuan biomassa *Flavobacterium* sp. NUB 1

Biomassa *Flavobacterium* sp. NUB 1 diperoleh dengan menumbuhkan isolat bakteri tersebut dalam fermentor (3 liter) yang berisi 2 liter media mineral yang mengandung 15 mM benzonitril sebagai sumber karbon dan nitrogen. Kultur dipanen pada inkubasi 48 jam dan selanjutnya dipusingkan selama 60 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Sel yang diperoleh dicuci dengan bufer fosfat sebanyak 2 kali dan selanjutnya disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -20°C untuk dianalisis.

Penentuan aktivitas enzim pendegradasi benzonitril dari sel utuh (*whole cell*) *Flavobacterium* sp. NUB 1

Untuk menentukan aktivitas tertinggi enzim pendegradasi benzonitril dari sel utuh, maka dilakukan penambahan biomassa sel (bobot kering) ke dalam 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ pH 7,2 yang mengandung 100 mM benzonitril dan/atau 190mM asetonitril. Reaksi dilakukan selama 60 menit dengan pengadukan dalam erlenmeyer (50 ml) tertutup pada suhu ruang (28°C). Selanjutnya sampel diambil untuk penentuan aktivitas nitrilase dan/atau nitril hidratase. Penghentian aktivitas enzim dilakukan dengan menambahkan 0,25 ml 4N HCL pada setiap 1 ml sampel. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Penentuan

aktivitas enzim pendegradasi nitril dari supernatan yang diperoleh dilakukan dengan mengukur produksi amonium menurut metode Nessler. Sedangkan aktivitas enzim amidase ditentukan dengan cara yang sama yaitu dengan menggantikan senyawa nitril dengan senyawa amida sebagai substrat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemampuan *Flavobacterium* sp. NUB 1 dalam memanfaatkan senyawa nitril

Tabel 1. Pertumbuhan *Flavobacterium* sp NUB 1 pada berbagai konsentrasi benzonitril

Konsentrasi Benzonitril (mM)	Biomassa (g/l)	Rendemen (%)
0	0,0	0,0
5	1,3	56,52
10	1,9	82,61
15	2,3	100,0
20	2,1	91,30
25	2,2	95,65
30	1,3	56,52

Disamping itu *Flavobacterium* sp. NUB 1 juga mampu menggunakan senyawa nitril alifatik (asetonitril dan propionitril) sebagai satu-satunya sumber karbon dan nitrogen (Tabel 2). Namun pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB1 pada benzonitril relatif lebih baik dibandingkan pada asetonitril dan propionitril. Perolehan biomassa tertinggi ditunjukkan oleh *Flavobacterium* sp. NUB1 yang ditumbuhkan pada gabungan dari asetonitril dan benzonitril. Hasil yang sama dilaporkan oleh Cramp *et al.* (1997), bahwa pertumbuhan terbaik *Bacillus pallidis* Dac 521 adalah pada media yang mengandung campuran asetonitril dan benzonitril.

Demikian juga pengujian kemampuan tumbuh *Flavobacterium* sp.

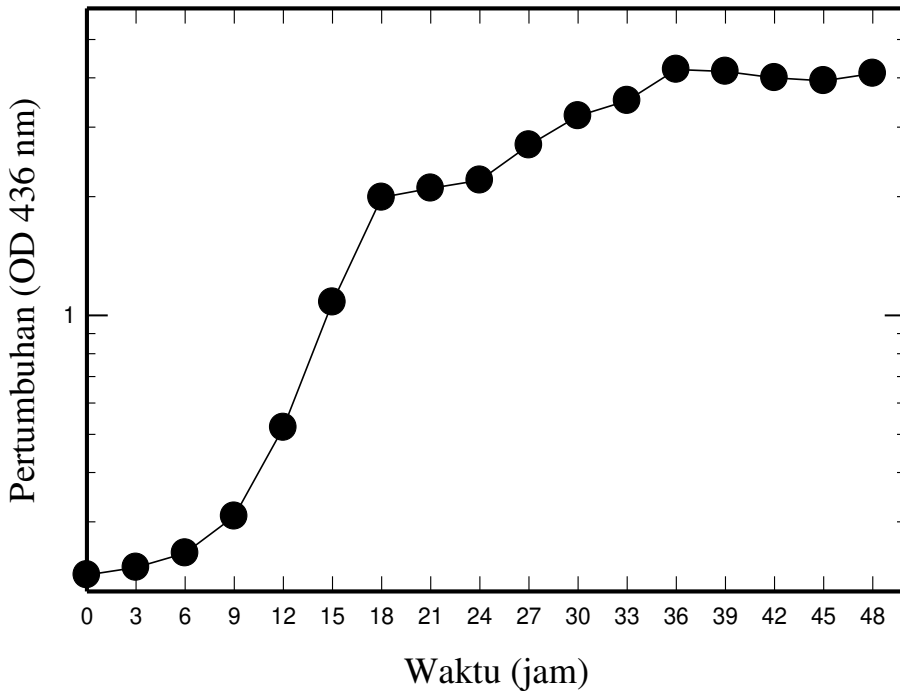
dan amida sebagai substrat untuk pertumbuhan

Hasil pengujian pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB 1 pada berbagai konsentrasi benzonitril menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu tumbuh pada benzonitril hingga konsentrasi 25 dan 30 mM, namun pertumbuhan tertinggi dicapai bila bakteri tersebut ditumbuhkan pada media mineral yang mengandung 15 mM benzonitril dengan perolehan biomassa sebesar 2,3 g sel bobot kering/l. (Tabel 1).

NUB 1 pada berbagai senyawa amida menunjukkan, bahwa isolat bakteri tersebut mampu tumbuh pada keseluruhan senyawa amida yang diuji (Tabel 2). Pertumbuhan tertinggi isolat tersebut ditunjukkan pada medium yang mengandung benzamida.

Pola pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB 1.

Gambar 1 memperlihatkan pola pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB 1 pada 15 mM benzonitril selama 48 jam. Isolat bakteri tersebut tumbuh dengan melewati fase lag sekitar 9 jam. Baru pada jam ke-12 memasuki fase logaritma, dan setelah 36 jam kemudian pertumbuhan isolat tersebut



Gambar 1. Pola pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB 1 pada 15 mM benzonitril

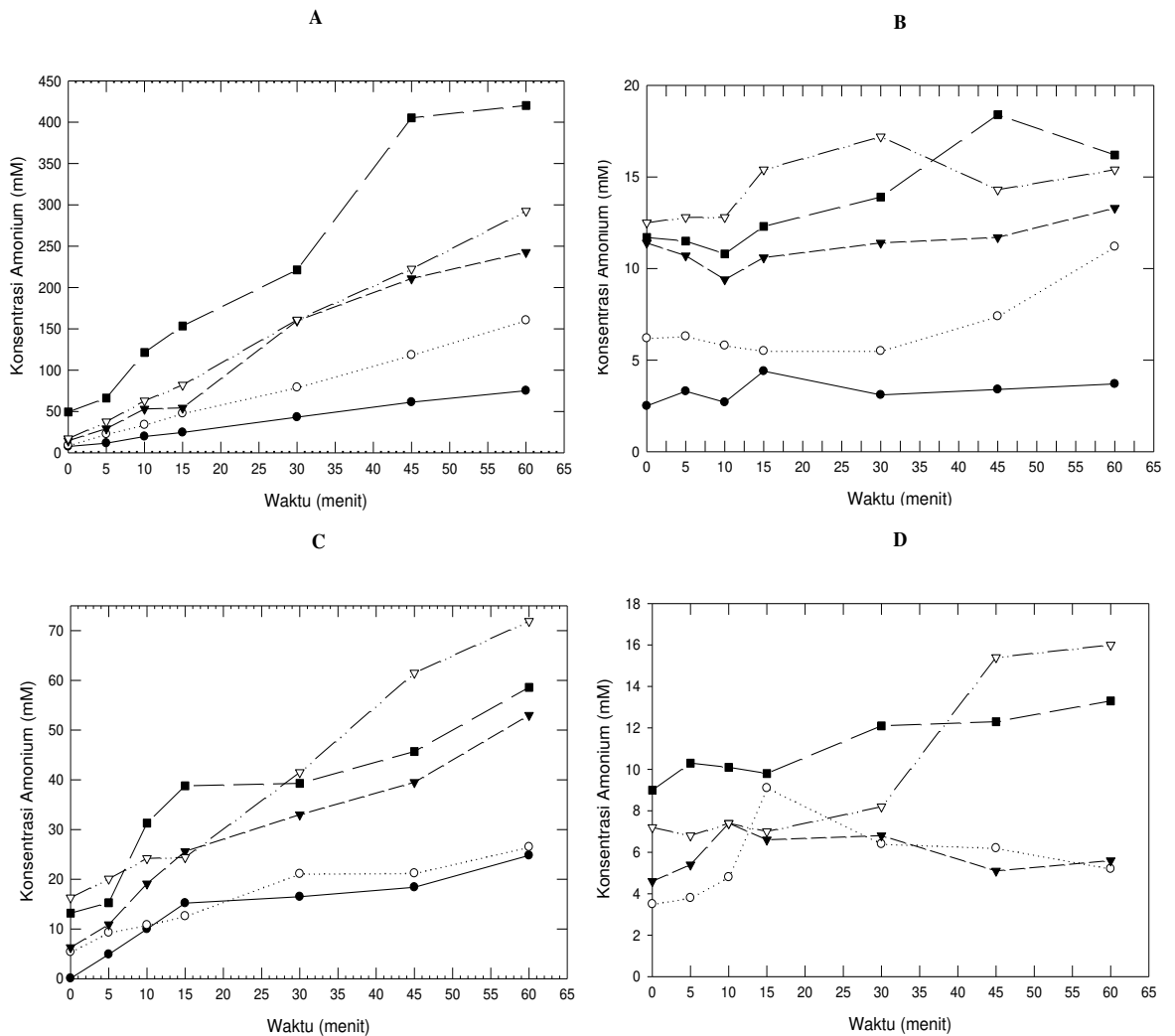
Tabel 2. Pertumbuhan *Flavobacterium* sp NUB 1 pada berbagai nitril dan amida

Substrat	Perolehan biomassa (g/l)	Rendemen (%)
Nitril		
Asetonitril 1% (v/v)	2,4	28,2
Propionitril 1% (v/v)	2,2	25,9
Benzonitril (15 mM)	2,6	30,6
Asetonitril 1% + Benzonitril (15 mM)	4,1	48,2
Propionitril 1% + Benzonitril (15 mM)	3,9	45,9
Amida		
Asetamida (50 mM)	1,8	21,2
Propionamida (50 mM)	3,3	38,8
Benzamida (50 mM)	8,5	100,0
Asetamida (50 mM) +Benzamida (50 mM)	2,1	24,7
Propionamida (50 mM) + Benzamida (50 mM)	1,9	22,4

memasuki fase stasioner. Berdasarkan pertumbuhan tersebut dapat ditentukan waktu penggandaan *Flavobacterium* sp.

NUB1 sebesar 9 jam 54 menit dan laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar $0,07 \text{ h}^{-1}$.

Metabolisme Benzonitril oleh

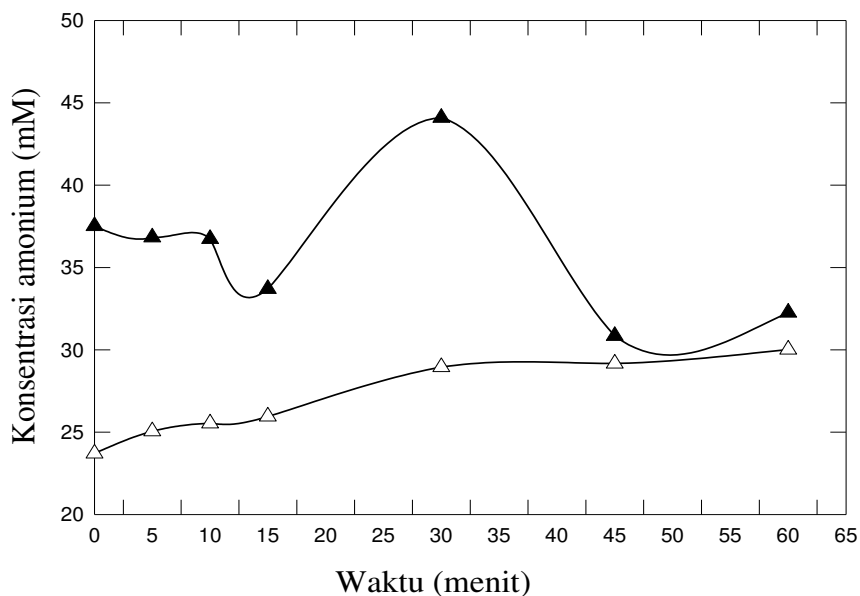


Gambar 2. Aktivitas enzim nitrilase dan/atau nitril hidratase dari sel utuh (*whole cell*) *Flavobacterium* sp. NUB 1 berdasarkan analisis amonium. (A) 1% sel, (B) 2% sel, (C) 3% sel, dan (D) 4% sel. (●): ditumbuhkan asetonitril (AsCN), diuji AsCN, (○): ditumbuhkan AsCN, diuji benzonitril (Benzo-CN), (▼): ditumbuhkan Benzo-CN, diuji AsCN, (▽): ditumbuhkan Benzo-CN, diuji Benzo-CN, (■): ditumbuhkan AsCN, diuji bzn

Aktivitas enzim nitrilase dan/atau nitril hidratase dari sel utuh (*whole cell*) *Flavobacterium* sp. NUB 1.

Aktivitas enzim nitrilase dan/atau nitril hidratase ditentukan secara tidak langsung berdasarkan pembentukan

ammonium. Sel *Flavobacterium* sp. NUB 1 yang ditumbuhkan pada asetonitril mempunyai aktivitas enzim tertinggi terhadap asetonitril (*aset-nitril hidratase*). Aktivitas enzim terendah dihasilkan oleh sel *Flavobacterium* sp. NUB 1 yang



Gambar 3. Aktivitas enzim benzamidase *Flavobacterium* sp. NUB 1 yang ditumbuhkan pada (●) asetonitril, dan (○) benzonitril

ditumbuhkan pada benzonitril dan diuji aktivitasnya terhadap benzonitril (benzonitrilase) (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan bahwa kemungkinan enzim yang terlibat dalam degradasi senyawa nitril oleh sel *Flavobacterium* sp. NUB 1 adalah nitril-hidratase, amidase, dan bukan enzim nitrilase.

Hal ini berbeda dengan laporrn Bandyopadhyay *et al.* (1986) bahwa *Arthrobacter* sp. J-1 mampu tumbuh pada asetonitril dan benzonitril serta dapat memproduksi dua macam enzim, yaitu benzonitrilase A dan B. Pada umumnya senyawa nitril aromatis heterosiklis didegradasi melalui satu tahap reaksi oleh enzim nitrilase (Kobayashi, 1991; Faber & Waldman, 1995).

Aktivitas benzamidase *Flavobacterium* sp. NUB 1

Aktivitas enzim benzamidase ditentukan berdasarkan konsentrasi ammonium yang terbentuk sebagai hasil

degradasi benzamida oleh enzim benzamidase. Aktivitas tertinggi enzim benzamidase diperoleh pada *Flavobacterium* sp. NUB 1 yang ditumbuhkan pada asetonitril, yaitu setelah 30 menit inkubasi dengan perolehan ammonium sebesar 44,09 mM (Gambar 3).

KESIMPULAN

Flavobacterium sp. NUB 1 mampu menggunakan senyawa nitril alifatik (asetonitril dan propionitril) maupun senyawa nitril aromatik (benzonitril) sebagai satu-satunya sumber karbon dan nitrogen. Namun pertumbuhan *Flavobacterium* sp. NUB1 tertinggi pada 15 mM benzonitril. Selain itu, *Flavobacterium* sp. NUB 1 juga mampu tumbuh pada berbagai senyawa amida (asetamida, benzamida dan propioamida) dengan pertumbuhan tertinggi pada benzamida.

Sel *Flavobacterium* sp. NUB 1

yang ditumbuhkan pada asetonitril mempunyai aktivitas enzim tertinggi terhadap asetonitril (*aset-nitril hidratase*) Sedangkan, aktivitas enzim terendah ditunjukkan oleh sel *Flavobacterium* sp. NUB 1 yang ditumbuhkan pada benzonitril dan diuji aktivitasnya terhadap benzonitril (benzonitrilase)

DAFTAR PUSTAKA

- Asano, X., K. Fujishiro, Y. Tanni & H. Yamada. 1982. Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter* sp. J-1: Purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 46(5) : 1165-1174.
- Bandiopathyay, A.K., T. Nagasawa, Y. Asano, K. Fujishiro, Y. Tani, and H. Yamada. 1986. Purification and characterization of benzonitrilase from *Agrobacter* sp. strain J-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 302-306.
- Bianchi, D., A. Bosetti, P. Cesti, G. Franzosi & S. Spezia. 1991. Stereoselective microbial hydrolysis of 2-arylpropionitriles. *Biotechnol. Lett.* 13, 241-244.
- Chapatwala, K.D., G.R.V. Babu, E.R. Armstead, E.M. White & JH. Wolfram. 1995. A kinetic study on the bioremediation of sodium cyanide and acetonitril by free and immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 717-726.
- Cramp, R., M. Gilmour & D.A. Cowan. 1997. Novel thermophilic bacteria producing nitrile degrading enzymes. *Microbiology*, 143 : 2313-2320.
- Faber, K. & H. Waldman. 1995. Enzymes Catalyst in Organic Synthesis. Vol. 1. VCH. Weinheim.
- Takeya, H., Sakai, N., Sugai, T. & H. Ohta. 1991. Microbial hydrolysis as apotent method for the preparation of optically active nitriles, amides and carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* 32, 1343-1346.
- Kobayashi, M. & S. Shimizu. 1994. Versatile nitrilases: Nitrile hydrolyzing enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* 120 : 217-224
- Kobayashi, M. 1991. Studies on Enzymes Involved in Nitril Metabolism in *Rhodococcus rhodochrous*. *Ph.D thesis*.
- Langdahl, B.R., P. Bisp, & K. Ingvorsen. 1996. Utilization of acetonitril and other aliphatic nitriles by a *Candida famata* strain. *FEMS Microbio. Lett.* 144:7-71.
- Layh, N., A. Stolz, S. Forster, F. Effenberger, & H. Knackmuss. 1992. Enantioselective hydrolysis of O-acetylmandelonitrile to O-acetylmandelic acid by bacterial nitrilases. *Arch. Microbiol.* 158: 405-411.
- Meyer, O. & H.G. Schlegel. 1983. Biology of Aerobic Carbon Monoxide Oxidizing Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 227-310.
- Nagasawa, T., H. Hanaba, K. Ryuno, K. Takeuchi, & H. Yamada. 1987. Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Eur. J. Biochem.* 162: 1305-1312.
- Nawaz, M., T.M. Heinze, & C.E. Cerniglia. 1992. Metabolism of benzonitrile and butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 27-31.
- O'Grady, D. & J.T. Pembroke. 1994. Isolation of Novel *Agrobacterium* spp. capable of degrading a range of nitrile compounds. *Biotechnol. Lett.* 16 (1) : 47-50.

Sulistinah et al.

Pfennig, N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp.n., a new species of the Rhodospirillaceae. *Arch. Microbiol.* 100 : 197-206.

Pollak, P., G. Romender, & F. Hageorm, 1991. Nitriles. Dalam: Elvers, B., S.

Hawkins, & G. Schulz (eds.). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 5th ed. Vol. A17. VCH, Weinheim : 363-376.