

## ISOLASI, SELEKSI, DAN KARAKTERISASI MIKROBA PENDEGRADASI ASETONITRIL DARILIMBAH INDUSTRI

[Isolation, Selection, and Characterization of Acetonitrile Degrading Microbes  
from Industrial Wastes]

Bambang Sunarko<sup>1</sup>, Adityarini<sup>2</sup>, Usman Sumo F Tambunan<sup>3</sup> dan Nunik Sulistinah<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI, <sup>2</sup> Program Studi Biologi, Program Pasca Sarjana, Universitas Indonesia, <sup>3</sup> Jurusan Biokimia, FMIPA, Universitas Indonesia

### ABSTRACT

A number of microbes which could grow on acetonitrile were isolated and selected from industrial effluents and were studied to characterise the isolate which has the best degrading capability. Cultures were grown on mineral medium with microelements and acetonitrile was added as sole source of energy, carbon, and nitrogen. Isolate D5, identified as *Corynebacterium* sp., was able to grow on high concentration acetonitrile (up to 5 % v/v) and exhibited the highest specific growth rate ( $\mu$ ). When *Corynebacterium* D5 grew on 2 % (v/v) acetonitrile, the doubling time was 6 hours 40 minutes, the specific growth rate ( $\mu$ ) was 0.1 h<sup>-1</sup> and the acetonitrile decreasing rate was 3.99 mM/h. Increasing of acetonitrile concentration would extend the doubling time, decline the maximum growth and specific growth rate ( $\mu$ ), and biomass production of *Corynebacterium* D5. The products of acetonitrile degradation by *Corynebacterium* D5 were acetamide, acetic acid, and ammonia. The maximum growth of *Corynebacterium* D5 showed when /3-aminopropionitrile was used as a substrate.

Kata kunci/Key word: Isolasi/ isolation, seleksi/ selection, karakterisasi/ characterization.asetonitril/ acetonitrile, limbah industri/ industrial effluent, *Corynebacterium* sp.

### PENDAHULUAN

Asetonitril (CH<sub>3</sub>CN) adalah senyawa turunan asam karboksilat yang tergolong toksik (Pollak *et al.*, 1991). Senyawa ini banyak digunakan pada industri farmasi, karena merupakan pelarut yang sangat baik dan mempunyai titik didih yang rendah (Smiley, 1981). 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 dengan berat molekul tinggi, nitril berhalogen, keton, isosianat, dan heterosiklik, seperti piridin dan imidazolin.

Perhatian pada mikroba pendegradasi asetonitril meningkat, karena berpotensi untuk dimanfaatkan dalam penanggulangan limbah nitril (O'Grady dan Pembroke, 1994) maupun dalam sintesis berbagai senyawa kimia (Langdahl *et al.*, 1996). Misalnya *Brevibacterium* R312 dan *Rhodococcus* sp. N-774 telah digunakan untuk

memproduksi asam karboksilat dan amida (Yamada dan Kobayashi, 1996) dan *Pseudomonas putida* untuk detoksifikasi limbah yang mengandung senyawa nitril (Chapatwala *et al.*, 1995).

Sampai saat ini sejumlah mikroba pendegradasi asetonitril telah ditemukan, beberapa di antaranya adalah *Nocardia rhodochrous* LL100-21 (DiGeronimo dan Antoine, 1976), *Agrobacterium* spp. (O'Grady dan Pembroke, 1994), *Pseudomonas marginalis* (Babu *et al.*, 1995), *P. putida* (Chapatwala *et al.*, 1995), *Rhodococcus erythropolis* BL1 (Langdahl *et al.*, 1996), dan *Candida famata* (Linardi *et al.*, 1996).

Meskipun peluang untuk mendapatkan berbagai jenis mikroba pendegradasi asetonitril di Indonesia sangat besar, namun penelitian ke arah tersebut belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menyeleksi mikroba pendegradasi asetonitril dari limbah industri serta mengkarakterisasi dan menentukan pola degradasi asetonitril oleh isolat terpilih.

## BAHAN DAN METODE

**Pengambilan sampel.** Limbah cair dan padat diambil dari berbagai tempat pembuangan limbah industri yang diduga mengandung senyawa-senyawa nitril. Sebelum digunakan, sampel-sampel tersebut disimpan dalam botol-botol plastik pada suhu 4 °C.

**Bahan-bahan kimia.** Asetonitril dan bahan-bahan kimia lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk dari Merck, kecuali ekstrak khamir, ekstrak daging, pepton, dan agar (Difco), laktonitril, butironitril, propionitril, dan akrilonitril (Aldrich), 3-Sianopiridin dan P-aminopropionitril (Sigma).

**Medium tumbuh mikroba.** Komposisi medium mineral untuk menumbuhkan mikroba pendegradasi asetonitril 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 dan Schlegel, 1983) dan ditambah dengan 1 mL elemen mikro. Sedangkan komposisi elemen mikro tersebut adalah sebagai berikut:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,03 g),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,3 g),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,015 g),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,02 g),  $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,9 g),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0,02 g) dalam  $\text{H}_2\text{O}$  dest. (1000 mL) (Pfennig, 1974). Sebagai sumber energi, karbon, dan nitrogen digunakan asetonitril.

Medium padat yang digunakan untuk isolasi dan perbanyak mikroba adalah nutrient agar, dengan komposisi sebagai berikut: 3 g ekstrak daging, 5 g pepton, 15 g agar, dan  $\text{H}_2\text{O}$ -dest. ditambahkan hingga 1000 mL (Smibert dan Krieg, 1994).

**Isolasi mikroba pendegradasi asetonitril.** Isolasi mikroba pendegradasi asetonitril dari sampel limbah dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 mL sampel ke dalam 50 mL 1 % (v/v) asetonitril

dalam labu Erlenmeyer (100 mL). Kultur diinkubasi di atas mesin pengocok (*shaker*) dengan kecepatan 115 rpm pada suhu ruang ( $\pm 28$  °C) selama 14 hari. Dari kultur tersebut kemudian diambil 1 mL sampel dan diinokulasikan pada nutrient agar, dan diinkubasi pada suhu ruang setama 3 - 5 hari. Setiap koloni yang tumbuh diambil dan diinokulasikan kembali pada nutrient agar. Isolat yang tumbuh cepat ( $\leq 24$  jam) dimurnikan, diperbanyak, dan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

### ***Pertumbuhan isolat mikroba pendegradasi asetonitril.***

Isolat mikroba pendegradasi asetonitril hasil seleksi ditumbuhkan pada labu Erlenmeyer (250 mL) yang berisi 150 mL medium mineral ditambah elemen mikro dengan asetonitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen. Kultur diinkubasi di atas mesin pengocok dengan kecepatan 115 rpm pada suhu ruang selama 7 hari, dan pertumbuhan isolat tersebut ditentukan menggunakan satuan kerapatan optis (*optical density* = OD) pada panjang gelombang 436 nm.

### ***Pengujian pertumbuhan berbagai isolat pada asetonitril sebagai sumber energi, karbon atau nitrogen.***

Penggunaan asetonitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen diuji dengan menumbuhkan setiap isolat pada asetonitril. Penggunaan asetonitril sebagai sumber energi dan karbon diuji dengan menumbuhkan setiap isolat pada asetonitril dan  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Sedangkan penggunaan asetonitril sebagai sumber nitrogen saja diuji dengan menumbuhkan setiap isolat pada asetonitril dan glukosa. Kultur diinkubasi selama 7 hari.

### ***Pengujian pengaruh berbagai konsentrasi asetonitril terhadap pertumbuhan mikroba pendegradasi asetonitril.***

Isolat yang mampu menggunakan asetonitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan

nitrogen ditumbuhkan pada asetonitril dengan kisaran konsentrasi 0% -5% (v/v) dan diinkubasi selama 7 hari. Laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) isolat pada kisaran konsentrasi 1% - 5% (v/v) ditentukan berdasarkan persamaan berikut:  $n = 2.303 \log 2 \times l/t(j)$  (Marison, 1988), sedangkan perolehan biomassa setelah inkubasi 40 jam dihitung berdasarkan kurva standar.

***Penentuan pola pertumbuhan Corynebacterium DS pada 2 % (v/v) asetonitril dan pembentukan produk degradasinya.***

*Corynebacterium* D5 ditumbuhkan pada 2 % (v/v) asetonitril dalam fermentor (3 L) yang berisi 2 L medium mineral dengan aerasi dan pengadukan (100 rpm) pada suhu 30 °C. Setiap selang waktu 4 jam sampel diambil untuk penentuan pola pertumbuhan, penggunaan asetonitril, pembentukan produk degradasi, dan perubahan pH selama pertumbuhan.

Aktivitas mikroba dalam sampel (4 mL) dihentikan dengan menambahkan 1 mL 4N HCl. Sampel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit dan supernatannya digunakan untuk analisis.

***Penentuan konsentrasi asetonitril dan produk degradasinya.***

Konsentrasi asetonitril, asetamida, dan asam asetat dalam sampel diukur dengan menggunakan kromatografi gas (Shimadzu GC 14-B) yang dilengkapi dengan flame ionization detector (FID) dan kolom yang berisi Porapak Q. Suhu oven, injektor, dan detektor masing-masing adalah 225°C, 240°C, dan 240°C. Sebagai gas pembawa adalah N<sub>2</sub> dan sebagai gas detektor adalah H<sub>2</sub>. Selanjutnya, supernatan sampel (1 $\mu$ L) diinjeksikan ke dalam kolom tersebut. Konsentrasi asetonitril, asetamida dan asam asetat dihitung berdasarkan larutan standar.

Konsentrasi amonium ditentukan secara kolorimetris dengan menggunakan metode Nessler. Supernatan sampel (0,1 mL) ditambahkan ke dalam

9,9 mL 0,1 N NaOH. Kemudian ke dalam larutan tersebut ditambahkan 0,2 mL pereaksi Nessler, dihomogenkan, dan diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya larutan tersebut diukur pada panjang gelombang 400 nm. Konsentrasi amonium dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standar.

***Penentuan pengaruh berbagai senyawa nitril terhadap pertumbuhan Corynebacterium D5.***

*Corynebacterium* D5 ditumbuhkan pada 50 mM berbagai senyawa nitril (3-sianopiridin, (3-aminopropionitril, asetonitril, butironitril, laktionitril, propionitril, akrilonitril) sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen. Setiap kultur diinkubasi di atas mesin pengocok dengan kecepatan 115 rpm pada suhu ruang selama 7 hari. Pada akhir pertumbuhannya kerapatan optis masing-masing kultur diukur.

**HASIL**

***Pertumbuhan isolat mikroba dari berbagai limbah industri pada asetonitril.***

Dari 13 sampel limbah yang berasal dari 6 industri kimia diperoleh 29 isolat mikroba yang dapat tumbuh pada asetonitril (Tabel 1), 10 isolat di antaranya (C2, D4, D5, E2, F3, G3, 12, L2, L3, dan M1) dapat tumbuh dalam waktu 24 jam.

Pengujian ulang pertumbuhan kesepuluh isolat tersebut pada asetonitril menunjukkan bahwa hanya 3 isolat (C2, D5, dan L3) yang mampu menggunakan asetonitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen (Tabel 2). Isolat D4 mampu tumbuh pada asetonitril, bila digunakan sebagai sumber energi dan karbon atau sebagai sumber nitrogen untuk tumbuhnya. Isolat G3 dan L2 hanya mampu tumbuh, bila asetonitril digunakan sebagai sumber nitrogen saja, sedangkan isolat E2, F3, 12, dan M1 tidak mampu menggunakan asetonitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen untuk tumbuhnya, sebagai sumber energi dan karbon,

Tabel 1. Isolat mikroba yang diperoleh dari berbagai limbah industri dengan asetonitril sebagai induktor

Sumber Limbah	Isolat yang diperoleh	Jumlah Isolat
Bayer Agrochemical Industries	-	-
Bayer Agrochemical Industries	-	-
DIC Astra Chemicals	C1.C2	2
DIC Astra Chemicals	D1.D2, D3,D4, D5	5
DIC Astra Chemicals	E1.E2	2
Master Steel	F1.F2.F3	3
Master Steel	G1.G2, G3,G4	4
ICI	H1,H2	2
Kebayoran Wama Prima	11,12,13	3
Kebayoran Warna Prima	-	-
Jakarta Kyoei Steel Works	K1,K2, K3	3
Jakarta Kyoei Steel Works	L1,L2, L3,L4	4
DIC Astra Chemicals	MI	1

Tabel 2. Pertumbuhan berbagai isolat pada asetonitril sebagai sumber energi, karbon, dan nitrogen

Isolat	Asetonitril sebagai Sumber		
	energi, karbon, dan nitrogen	Energi dan karbon	nitrogen
C2	+	+	+
D4	-	+	+
D5	+	+	+
E2	-	-	-
F3	-	-	-
G3	-	-	+
12	-	-	-
L2	-	-	+
L3	+	+	+
MI	-	-	-

+ : tumbuh ; - : tidak tumbuh.

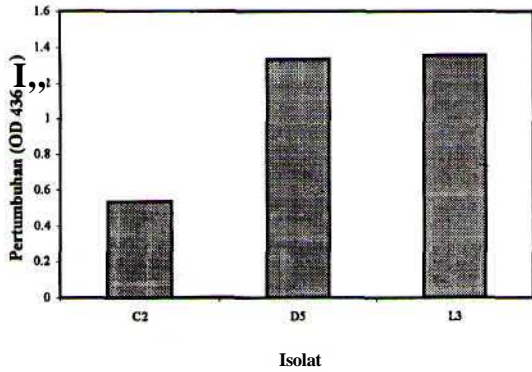
Tabel 3. Pertumbuhan *Corynebacterium* D5 pada berbagai senyawa nitril

Substrat *	Pertumbuhan <sup>b</sup>
3-Sianopiridin	-
P-Aminopropionitril	+
Asetonitril	+
Butironitril	+
Laktonitril	-
Propionitril	+
Akronitril	-

Keterangan : \*. Konsentrasi substrat yang digunakan adalah 50 mM

<sup>b</sup>. Pertumbuhan diamati setelah inkubasi 7 hari; + : tumbuh; - : tidak tumbuh

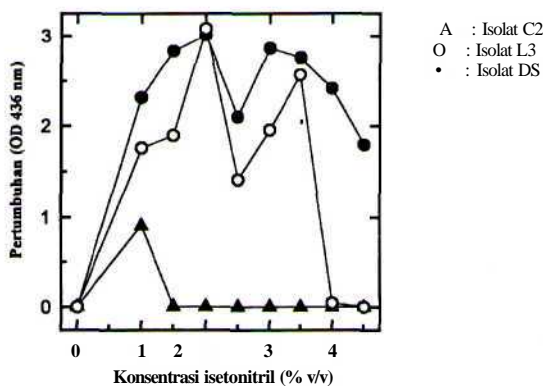
maupun sebagai sumber nitrogen saja. Perbandingan pertumbuhan isolat C2, D5, dan L3 pada asetonitril ditampilkan pada Gambar 1 yang menunjukkan, bahwa pertumbuhan isolat L3 lebih baik dibandingkan dengan isolat D5 dan C2.



Gambar 1. Pertumbuhan isolat C2, D5 dan L3 pada 1% asetonitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon dan nitrogen.

**Pertumbuhan isolat C2, D5, dan L3 pada berbagai konsentrasi asetonitril.**

Dari Gambar 2 dapat ditunjukkan bahwa isolat C2 mampu tumbuh pada asetonitril hanya hingga 1 % (v/v), isolat L3 hingga 3,5 % (v/v) dengan pertumbuhan maksimal pada 2 % (v/v), dan isolat D5 hingga 5 % (v/v) dengan pertumbuhan maksimal juga pada 2 % (v/v) asetonitril.

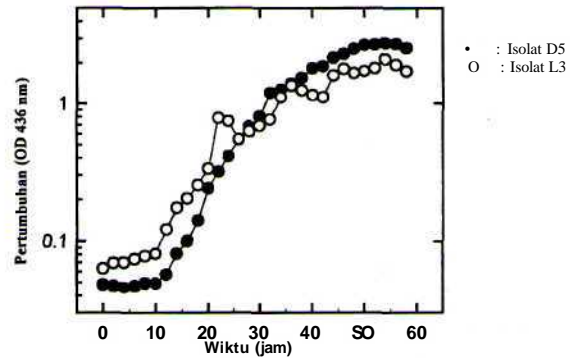


Gambar 2. Pertumbuhan isolat C2, D5 dan L3 pada berbagai konsentrasi asetonitril

**Pola pertumbuhan isolat D5 dan L3 pada 1% (v/v) asetonitril.**

Gambar 3 memperlihatkan pola pertumbuhan isolat

D5 dan L3 pada 1 % (v/v) asetonitril selama 60 jam. Isolat D5 tumbuh dengan melewati fase lag (12 jam) dan fase eksponensial (20 jam), sedangkan isolat L3 tumbuh juga dengan melewati fase lag (10 jam) dan fase eksponensial (12 jam)



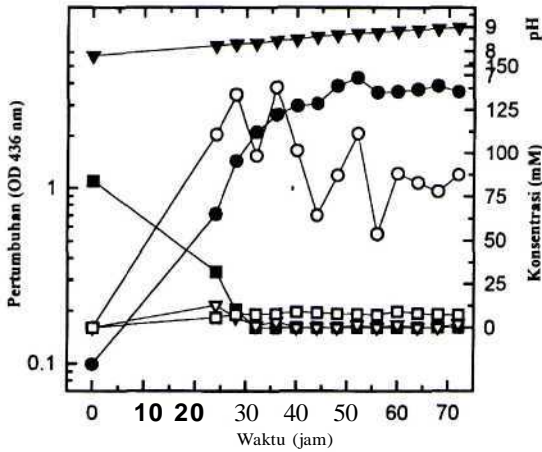
Gambar 3. Pola pertumbuhan D5 dan L3 pada 1% (v/v) asetonitril.

**Pola pertumbuhan Corynebacterium D5 pada 2% (v/v) asetonitril dan pembentukan produk degradasinya.**

Tampak pada Gambar 4 bahwa pada 2 % (v/v) asetonitril *Corynebacterium* D5 tumbuh secara eksponensial tanpa melalui fase lag. Setelah masa pertumbuhan 50 jam pertumbuhan mencapai maksimal dan kemudian memasuki fase stasioner. Selama pertumbuhan, diamati adanya penurunan konsentrasi asetonitril, pembentukan asetamida, asam asetat, dan amonium, serta perubahan pH medium tumbuh. Konsentrasi asetonitril menurun dengan laju rata-rata 3,99 mM/jam, dan setelah 32 jam pertumbuhan tidak lagi terdeteksi adanya asetonitril. Sedangkan asetamida, asam asetat, dan amonium, mulai terdeteksi di dalam medium tumbuh setelah 24 jam pertumbuhan. Konsentrasi asam asetat tampak berfluktuasi selama pertumbuhan *Corynebacterium* D5, dengan konsentrasi terendah sekitar 53 mM (setelah 56 jam pertumbuhan) dan konsentrasi tertinggi sekitar 137 mM (setelah 36 jam pertumbuhan). Jika dibandingkan dengan konsentrasi asam asetat, konsentrasi asetamida dan amonium relatif rendah



dengan konsentrasi maksimal hanya di bawah 15 mM, yang dicapai setelah masa pertumbuhan 24 jam, dan setelah itu konsentrasi kedua produk degradasi tersebut konstan



Gambar 4. Pola pertumbuhan *Corynebacterium* D5 pada 2% (v/v) asetonitril dan pembentukan produk degradasi.

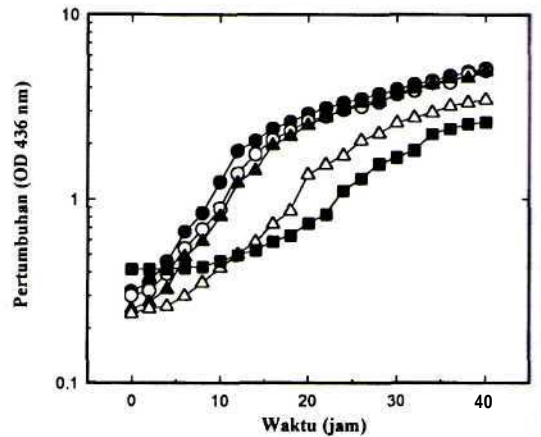
**Pengaruh konsentrasi asetonitril terhadap pertumbuhan *Corynebacterium* D5.**

Pada Gambar 5 tampak bahwa peningkatan konsentrasi asetonitril menurunkan tingkat pertumbuhan maksimal dan memperpanjang fase lag. Pengaruh peningkatan konsentrasi ini terlihat nyata terutama pada konsentrasi di atas 3 % (v/v). Meningkatnya konsentrasi asetonitril juga menyebabkan perolehan bio massa *Corynebacterium* D5 menurun (Gambar 6). Pada konsentrasi 1% (v/v) 3% (v/v) asetonitril, perbedaan biomassa yang dihasilkan tidak terlalu besar, tetapi pada konsentrasi asetonitril di atas 3 % (v/v) penurunan biomassa tampak nyata.

**Pengaruh berbagai senyawa nitril terhadap pertumbuhan *Corynebacterium* D5.**

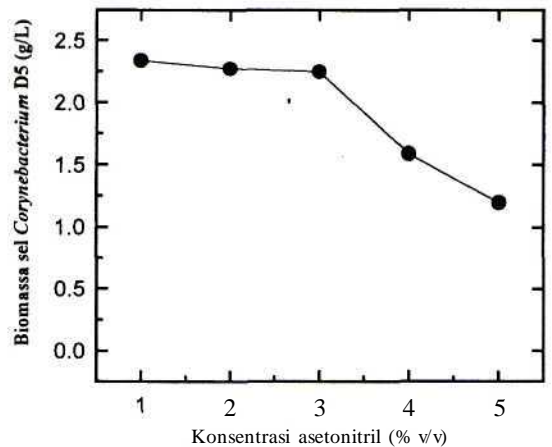
Pertumbuhan *Corynebacterium* D5 pada berbagai senyawa nitril sebagai satu satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen ditunjukkan pada Tabel 3. Dari Tabel tersebut tampak bahwa *Corynebacterium* D5 mampu tumbuh pada P

aminopropionitril, butironitril, asetonitril, dan propionitril. Sedang kan 3 sianopiridin, akrilonitril dan laktonitril tidak dapat digunakan sebagai satu satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen untuk tumbuhnya. Pertumbuhan maksimal tertinggi *Corynebacterium* D5 dicapai dengan menggunakan aminopropionitril sebagai substrat, yang diikuti berturut turut oleh butironitril, asetonitril dan propionitril (Gambar 7).

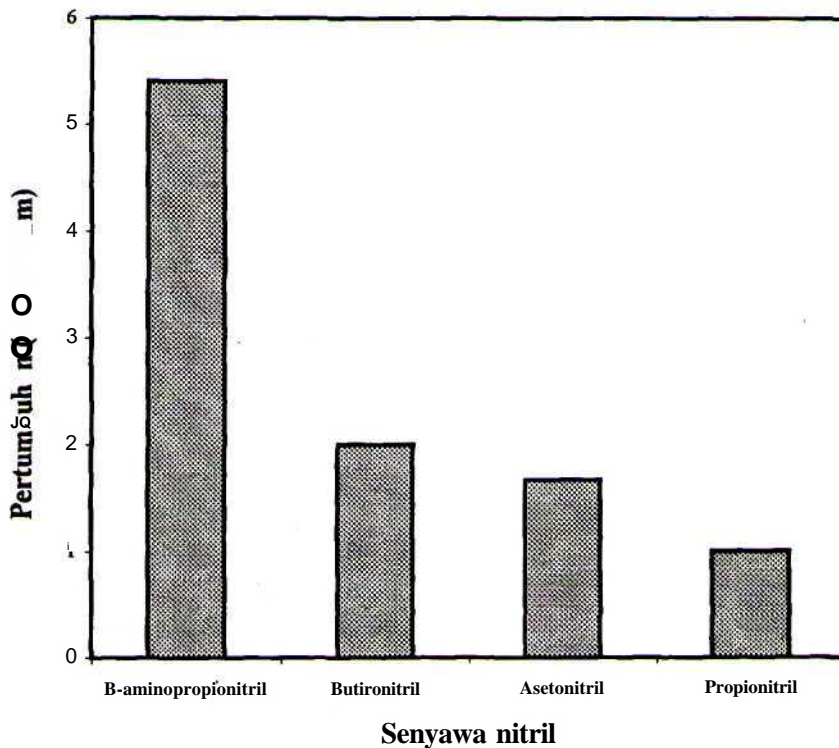


Gambar 5. Pola pertumbuhan *Corynebacterium* D5 pada berbagai konsentrasi asetonitril.

- : 2% (v/v) asetonitril      ▲ : 3% (v/v) asetonitril
- : 1% (v/v) asetonitril     △ : 4% (v/v) asetonitril
- : 5% (v/v) asetonitril



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi asetonitril terhadap perolehan biomassa *Corynebacterium*



Gambar 7. Pertumbuhan *Corynebacterium* D5 pada berbagai senyawa nitril dengan konsentrasi 50 mM.

## PEMBAHASAN

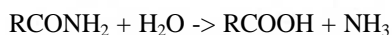
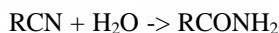
Dari ketiga isolat yang mampu menggunakan asetonitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon dan nitrogen (Tabel 1 dan 2), isolat D5 dan isolat L3 menunjukkan pertumbuhan yang baik (Gambar 1). Namun, toleransi tertinggi terhadap konsentrasi asetonitril ditunjukkan oleh isolat D5 (5 % v/v asetonitril), yang diikuti oleh Isolat L3 (3,5 % v/v), kemudian C2 (1 % v/v). *Pseudomonas marginalis* dilaporkan mampu tumbuh pada asetonitril hingga 2 % (v/v) (Babu *et al*, 1995), dan *Rhodococcus erythropolis* A10 hingga 3 % (v/v) asetonitril (Acharya dan Desai 1997). Dengan demikian, dibandingkan dengan kedua bakteri pendegradasi asetonitril tersebut, isolat D5 dan L3 mempunyai toleransi yang cukup tinggi terhadap asetonitril. Namun strain *Candida famata* (Linardi *et al*, 1996) dan *Rhodococcus erythropolis* BL1 (Langdahl *et al*,

1996) dilaporkan juga toleran terhadap asetonitril hingga konsentrasi 5 % (v/v).

Meskipun isolat D5 mempunyai fase lag yang lebih panjang, tetapi pertumbuhan secara keseluruhan lebih baik dibandingkan dengan isolat L3, karena memiliki fase pertumbuhan eksponensial yang lebih lama, waktu penggandaan yang lebih singkat, laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) yang lebih cepat serta pertumbuhan maksimal yang lebih tinggi. Isolat D5 mempunyai fase eksponensial sebesar 20 jam, waktu penggandaan isolat D5 4 jam 38 menit, dan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) sebesar  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Sedangkan isolat L3 mempunyai fase eksponensial sebesar 12 jam, waktu penggandaan selama 5 jam dan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) sebesar  $0,14 \text{ h}^{-1}$ .

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat D5 termasuk dalam marga *Corynebacterium* (Supartono, 1997), dan selanjutnya isolat D5

disebut sebagai *Corynebacterium* D5. Pada 2 % (v/v) asetonitril *Corynebacterium* D5 tumbuh dengan waktu penggandaan 6 jam 40 menit dan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ )  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . Selama pertumbuhannya, diamati adanya penurunan konsentrasi asetonitril, pembentukan asetamida, asam asetat, dan amonium, serta perubahan pH medium tumbuh. Hal ini mengindikasikan bahwa pola degradasi asetonitril oleh *Corynebacterium* D5 mungkin melalui dua tahap reaksi yang melibatkan enzim nitril hidratase dan amidase (Asano *et al.*, 1980). Pada reaksi tahap pertama, asetonitril dihidrolisis oleh nitril hidratase menjadi asetamida, dan pada reaksi tahap kedua asetamida dihidrolisis oleh amidase menjadi asam asetat dan amonia:



Pola degradasi asetonitril melalui dua tahap ini ditunjukkan juga oleh *Nocardia rhodochrous* LL100-21 (DiGeronimo dan Antoine 1976), *Agrobacterium* spp. (O'Grady dan Pembroke 1994), *Pseudomonas marginalis* (Babu *et al.*, 1995), *P. putida* (Chapatwala *et al.*, 1995), dan *Bacillus pallidus* Dac521 (Cramp *et al.*, 1997).

Dalam pertumbuhannya pada berbagai konsentrasi asetonitril tampak bahwa peningkatan konsentrasi asetonitril menurunkan tingkat pertumbuhan maksimal dan memperpanjang fase lag (Gambar 5). Pengaruh peningkatan konsentrasi ini terlihat nyata terutama pada konsentrasi di atas 3 % (v/v). Peningkatan konsentrasi asetonitril juga dapat memperpanjang waktu penggandaan. Berdasarkan perhitungan, waktu penggandaan *Corynebacterium* D5 pada 1 % (v/v) asetonitril, pada 2 % (v/v) dan 3 % (v/v), pada 4 % (v/v), dan pada 5 % (v/v) masing-masing sebesar 4 jam, 4 jam 30 menit, 7 jam 45 menit, dan 8 jam. Di samping itu, peningkatan konsentrasi asetonitril menurunkan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) *Corynebacterium* D5. Laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ )

*Corynebacterium* D5 pada 1 % (v/v) asetonitril, pada 2 % (v/v) dan 3 % (v/v), serta pada 4 % (v/v) dan 5 % (v/v) masing-masing adalah  $0,17 \text{ h}^{-1}$ ;  $0,15 \text{ h}^{-1}$ ; dan  $0,09 \text{ h}^{-1}$ . Perolehan biomassa *Corynebacterium* D5 juga menurun dengan meningkatnya konsentrasi asetonitril (Gambar 6). Pada konsentrasi 1 % (v/v) - 3 % (v/v) asetonitril, perbedaan biomassa yang dihasilkan tidak terlalu besar, tetapi pada konsentrasi asetonitril di atas 3 % (v/v) penurunan biomassa tampak nyata.

Disamping dapat tumbuh pada asetonitril, *Corynebacterium* D5 juga mampu tumbuh pada [3-aminopropionitril, butironitril, asetonitril, dan propionitril (Tabel 3). Namun, 3-sianopiridin, akrilonitril, dan laktonitril tidak dapat digunakan sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen untuk tumbuhnya. Vaughan *et al.*, (1988) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa 3-sianopiridin bersifat bakteriostatik terhadap *Nocardia rhodochrous* LL 100-21. Sedangkan Yamada dan Kobayashi (1996) menjelaskan bahwa isolasi mikroba pendegradasi akrilonitril sangat sulit dilakukan karena senyawa ini tergolong senyawa nitril yang paling toksik sehingga mikroba sukar tumbuh. Dengan demikian, penjelasan tersebut mungkin dapat menerangkan sifat *Corynebacterium* D5 yang tidak dapat tumbuh pada 3-sianopiridin dan akrilonitril. Laktonitril juga bersifat sangat toksik, namun pengaruhnya terhadap pertumbuhan mikroba hingga kini belum banyak diteliti.

## KESIMPULAN

Dari 13 sampel limbah industri yang diuji dalam penelitian ini, diperoleh 29 isolat mikroba yang mampu tumbuh pada asetonitril. Di antara isolat-isolat tersebut, *Corynebacterium* D5 dapat menggunakan asetonitril sebagai satu-satunya sumber energi, karbon, dan nitrogen, dan mampu tumbuh pada asetonitril sampai dengan 5 % (v/v). Pada 2 % (v/v) asetonitril *Corynebacterium* D5



tumbuh dengan waktu penggandaan 6 jam 40 menit, laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ )  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , laju penurunan konsentrasi asetonitril sebesar 3,99 mM/jam, menghasilkan produk berupa asetamida, asam asetat, dan amonia. Kenaikan konsentrasi asetonitril mengakibatkan penurunan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ), peningkatan waktu penggandaan, serta penurunan perolehan biomassa *Corynebacterium* D5. Dibandingkan dengan asetonitril, butironitril, dan propionitril, p-aminopropionitril merupakan sumber energi, karbon, dan nitrogen yang terbaik untuk *Corynebacterium* D5.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Acharya A and Desai AJ. 1997.** Studies on Utilization of Acetonitrile by *Rhodococcus erythropolis* A10. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13,175-178.
- Asano Y, Tani Y and Yamada H. 1980.** A New Enzyme "Nitrile Hydratase" which Degrades Acetonitrile in Combination with Amidase. *Agric. Biol. Chem.* 44 (9), 2251-2252.
- Babu GRV, Wolfram JH, Marian JM and Chapatwala K D. 1995.** *Pseudomonas Marginalis*: Its Degradative Capability on Organic Nitriles and Amides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 739-745.
- Chapatwala KD, Babu GRV, Armstead ER, White EM and Wolfram JH. 1995.** A Kinetic Study on the Bioremediation of Sodium Cyanide and Acetonitrile by Free and Immobilized Cells of *Pseudomonas putida*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52, 717-726.
- Cramp R, Gilmour M and Cowan DA. 1997.** Novel Thermophilic Bacteria Producing Nitrile-Degrading Enzymes. *Microbiology* 143, 2313-2320.
- DiGeronimo MJ and Antoine AD. 1976.** Metabolism of Acetonitrile and Propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (6), 900-906.
- Langdahl BR, Bisp P and Ingvorsen K. 1996.** Nitrile Hydrolysis by *Rhodococcus Erythropolis* BL1, an Acetonitrile-Tolerant Strain Isolated from a Marine Sediment. *Microbiology* 142, 145-154.
- Linardi VR, Dias JCT and Rosa CA. 1996.** Utilization of Acetonitrile and Other Aliphatic Nitriles by a *Candida Famata* Strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 144,1-1.
- Marison IW. 1988.** Growth Kinetics. Dalam: AH Scragg (Ed.). *Biotechnology for Engineers.* Ellis Horwood.
- Meyer O and Schlegel HG. 1983.** Biology of Aerobic Carbon Monoxide Oxidizing Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 277-310.
- O'Grady D and Pembroke JT. 1994.** Isolation of A Novel *Agrobacterium* spp. Capable of Degrading a Range of Nitrile Compounds. *Biotechnol. Lett.* 16(1), 47-50.
- Pfennig N. 1974.** *Rhodopseudomonas globiformis* sp.n. a New Species of the Rhodospirillaceae. *Arch. Microbiol.* 100, 197-206.
- Pollak P, Romeder G and Hagedorn F. 1991.** Nitriles. Dalam: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 5<sup>th</sup> ed. A17, 363-376. B Elvers, S Hawkins and G Schulz (Editor). VCH, Weinheim.
- Smibert RM and Krieg NR. 1994.** Phenotypic Characterization. Dalam: *Methods for General and Molecular Bacteriology.* P Gerhardt, RGE Murray, WA Wood and NR Krieg (Editor). American Society for Microbiology, Washington, DC: 645.
- Smiley RA. 1981.** Nitriles. Dalam: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* 15, 888-909. John Wiley dan Sons, New York.
- Supartono. 1997.** Laporan Hasil Identifikasi Isolat-Isolat Bakteri dari Berbagai Limbah Industri. Balai Penelitian Veteriner, Bogor (laporan secara personal).
- Vaughan PA, Cheetham PSJ and Knowles CJ. 1988.** The Utilization of Pyridine Carbonitriles and Carboxamides by *Nocardia rhodochrous* LL 100-21. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1099-1107.
- Yamada H and Kobayashi M. 1996.** Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(9), 1391-1400.