

PERTUMBUHAN BEBERAPAI SOLAT MIKROBA DARI BERBAGAI LIMBAH INDUSTRI PADA BENZAMIDA

[Growth of Microbial isolates from Various Industrial Effluents on Benzamide]

Nunik Sulistinah dan Bambang Sunarko

Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi - LIPI

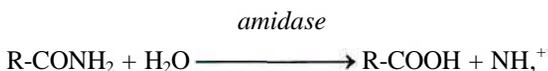
ABSTRACT

Twenty five microbes could be isolated from industrial effluents. Seven isolates of those examined microbes were able to grow on benzamide as sources of carbon, energy, and nitrogen.. The highest growth on benzamide was shown by bacterial isolate D1. Besides on benzamide, isolate D1 could grow on acetamide, acrylamide, benzamide, nicotinamide and propionamide, respectively.. On carboxylic acids, however isolate D1 could grow only on acetic acid, propionic acid, and benzoic acid as carbon and energy sources. When isolate D1 grew on 40 mM benzamide, the doubling time (t_d) was 6 h 40 minutes, the specific growth rate (μ) was 0,046 h⁻¹ the attained maximum cell biomass was 4.96 g cell dry weight/liter medium, and the yield coefficient (Y) was 124 g cell dry weight/mole benzamide.

Kata kunci/keywords: benzamide, industrial effluents, microbial isolates, growth, bacterial isolate D1, carboxylic acids.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan senyawa-senyawa amida alifatik oleh beberapa mikroba sebagai sumber karbon dan/atau nitrogen sudah banyak dilaporkan (Clarke, 1970; Friederich & Mitrenga, 1981; Ramirez *et al.*, 1998). Demikian juga, laporanyang rinci mengenai biokimia, regulasi dan genetika dari pemanfaatan senyawa amida tersebut, misalnya pada *Pseudomonas aeruginosa* (Clarke, 1970, 1972; Clarke & Ornston 1975). Secara umum hidrolisis senyawa amida alifatik dalam berbagai mikroba berlangsung melalui reaksi berikut (Nagasawa *et al.*, 1987; Wyatt & Linton, 1988; Sunarko, 1995):



Walaupun saat ini telah banyak laporan tentang mikroba pendegradasi senyawa amida alifatik, namun hanya sedikit mikroba yang diketahui mampu memetabolisme senyawa-senyawa amida aromatik (Collins & Knowles, 1983; Vaughan *et al.*, 1988; Beard *et al.*, 1993; Effenberg & Bohme, 1994). *Nocardia rhodochrous* LL100-21, misalnya, dilaporkan mampu tumbuh

pada nikotinamida, namun dapat memanfaatkannya hanya sebagai sumber nitrogen saja (Vaughan *et al.*, 1988). Selain itu, *Comamonas acidovorans* KPO-2771-4 dilaporkan mampu tumbuh dan mampu mendegradasi 2-arilpropionamida menjadi asam 2-arilpropionat (Beard *et al.* (1993) dan Effenberger & Bohme (1994).

Benzamida adalah senyawa amida aromatik yang paling sederhana, karena hanya mengandung satu cincin dalam strukturnya. Dengan demikian, biodegradasi benzamida dinilai sangat penting, karena dapat digunakan sebagai model untuk mempelajari pola degradasi senyawa amida aromatik yang lebih kompleks. Selain itu, asam benzoat, yang secara teoritis merupakan salah satu produk degradasi benzamida (Collins & Knowles (1983) mempunyai nilai ekonomi yang penting, misalnya sebagai bahan pengawet makanan, pelarut senyawa-senyawa alkaloida, untuk memproduksi senyawa-senyawa benzoat dan benzoil, dsb.

Sampai saat ini masih sangat sedikit penelitian yang menyangkut hidrolisis benzamida secara mikrobiologis. Tampaknya hanya Collins &

Knowles (1983) yang telah melaporkan, bahwa benzamida dapat dihidrolisis oleh *Nocardia rhodochrous* LL100-21 dengan melibatkan enzim benzamidase. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan tumbuh berbagai isolat bakteri yang diisolasi dari berbagai limbah industri. Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh paling tidak satu isolat yang dapat digunakan sebagai landasan untuk penelitian lebih lanjut yaitu untuk mengkarakterisasi pola degradasi benzamida dan senyawa amida aromatik lainnya serta enzim yang terlibat didalamnya.

BAHANDAN METODE

Pengambilan sampel. Sampel, berupa limbah cair dan lumpur (*sludge*), diperoleh dari berbagai tempat pembuangan limbah industri tekstil, penyamakan kulit, cat dsb. (Tabel 1). Sebelum digunakan sampel tersebut disimpan dalam botol plastik pada suhu 4 °C.

Bahan kimia. Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk dari Aldrich (propionamida), Sigma (benzamida), Merck (asetamida, akrilamida, nikotinamida).

Media tumbuh mikroba. Komposisi media mineral yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba pendegradasi benzamida adalah sebagai berikut : Na_2HPO_4 (0,357g), KH_2PO_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), *yeast extract* (0,01 g), mikroelemen (1,0 ml) dan aquadest sampai dengan 1000 ml (Meyer & Schlegel, 1983). Sedangkan komposisi mikroelemen (Pfenning, 1974) 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), H_3BO_3 (0,3 g), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g), $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g), $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,9 g), Na_2SeO_3 (0,02 g) dalam aquadest 1000 ml. Sebagai sumber energi, karbon dan energi digunakan benzamida. Untuk pemurnian dan peremajaan isolat bakteri digunakan *nutrient agar* dengan komposisi *beef extract* (3 g), *pepton* (5 g), *bacto*

agar (Difco) (20 g) yang dilarutkan dalam 1000 ml aquadest (Gerhardt *et al.*, 1994)

Isolasi mikroba pendegradasi benzamida. Isolasi mikroba pendegradasi benzamida dilakukan dengan metode pengkayaan kultur dalam 100 ml labu Erlenmeyer dengan menggunakan 50 ml medium mineral yang mengandung 20 mM benzamida sebagai sumber energi, karbon dan nitrogen dan 1 ml sampel limbah. Kultur diinkubasi selama 7-14 hari di atas mesin pengocok (*shaker*) dengan kecepatan 115 rpm pada suhu ruang 28° C. Dari kultur pengkayaan tersebut diambil $\pm 0,25$ ml sampel secara aseptis dan ditumbuhkan pada media padat *nutrient agar* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1-2 hari. Isolat yang tumbuh kemudian dimurnikan dan ditumbuhkan pada media agar miring untuk pengujian selanjutnya.

Seleksi mikroba dari berbagai limbah industri. Isolat-isolat bakteri yang diisolasi dari berbagai limbah industri ditumbuhkan pada Erlenmeyer (100 ml) yang berisi 50 ml mineral media (pH 7,2) yang mengandung (1) 20 mM benzamida sebagai sumber energi, karbon dan nitrogen, (2) 20 mM benzamida & 10 mM glukosa untuk pengujian penggunaan benzamida sebagai sumber nitrogen, (3) 20 mM benzamida & 10 mM NH_4NO_3 untuk pengujian penggunaan benzamida sebagai sumber energi dan karbon. Kultur bakteri tersebut diinkubasi selama 7 hari di atas mesin pengocok pada suhu ruang. Pertumbuhan ditentukan dengan mengukur kerapatan optis (OD) kultur bakteri tersebut dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 436 nm. Sedangkan, penentuan sel bobot kering dilakukan dengan metode yang diuraikan oleh Koch (1994).

Pengujian pertumbuhan isolat DI pada berbagai senyawa amida, asam-asam karboksilat. Pengujian kemampuan tumbuh isolat terpilih (isolat DI) pada berbagai senyawa amida dan asam-asam karboksilat dilakukan dengan konsentrasi 20 mM. Komposisi media dan metode

yang digunakan sama dengan yang diuraikan di atas.

Pengujian pengaruh konsentrasi benzamida terhadap pertumbuhan isolat D1. Pengujian pengaruh konsentrasi benzamida terhadap pertumbuhan isolat D1 dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media mineral yang mengandung benzamida sebagai sumber karbon, nitrogen dan energi pada konsentrasi 0-50 mM. Selanjutnya kultur diinkubasi selama 3 hari diatas mesin pengocok pada temperatur ruang. Pertumbuhan isolat ditentukan dengan mengukur kerapatan optis dari kultur pada panjang gelombang 436 nm dan dengan mengukur sel bobot kering dengan metode yang diuraikan oleh Koch (1994).

Penentuan pola **pertumbuhan** isolat D1 **pada benzamida**. Isolat D1 ditumbuhkan pada 40 mM benzamida pada Erlenmeyer (1000 ml) yang berisi 500 ml media mineral dan diinkubasi di atas mesin pengocok. Setiap 4 jam kultur diambil untuk penentuan pola pertumbuhan. Pertumbuhan isolat D1 diukur dengan menggunakan satuan kerapatan optis pada panjang gelombang 436 nm, dan sel bobot kering ditentukan dengan metode yang diuraikan oleh Koch (1994). Koefisien hasil (Y) dihitung berdasarkan persamaan: $Y = \text{gram sel bobot kering/mol substrat terkonsumsi dan waktu penggandaan (td)}$ dihitung berdasarkan persamaan: $t_a = 0,6931/n$ (Gerhart & Drew, 1994).

HASIL

Dari berbagai sampel limbah industri dapat diisolasi 25 isolat bakteri (Tabel 1) dan tujuh isolat diantaranya telah diuji kemampuan tumbuhnya pada benzamida (Tabel 2). Dari hasil pengujian tersebut dapat ditunjukkan, bahwa keseluruhan isolat mampu tumbuh pada benzamida sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen. Pertumbuhan tertinggi pada benzamida ditunjukkan oleh isolat D1.

Pengujian berbagai senyawa amida sebagai substrat terhadap kemampuan tumbuh isolat D1 ditunjukkan pada Tabel 3. Dari tabel

tersebut terlihat, bahwa isolat D1 juga mampu tumbuh pada keseluruhan senyawa amida yang diuji dan mampu memanfaatkannya sebagai sumber karbon, energi dan nitrogen. Pertumbuhan tertinggi ditunjukkan oleh isolat D1 yang ditumbuhkan pada benzamida.

Pengujian kemampuan tumbuh isolat D1 pada berbagai asam karboksilat menunjukkan, bahwa isolat D1 ternyata hanya mampu tumbuh pada asam asetat, asam benzoat dan asam propionat sebagai sumber energi dan karbon, tetapi tidak mampu tumbuh pada asam akrilat dan asam nikotinat (Tabel 4).

Pertumbuhan isolat bakteri D1 pada berbagai konsentrasi benzamida memperlihatkan, bahwa pertumbuhan tertinggi isolat bakteri tersebut ditunjukkan pada medium yang mengandung 40 mM benzamida, dengan perolehan biomassa sebesar 4,00 g sel bobot kering/liter (Gambar 1 dan Tabel 5).

PEMBAHASAN

Secara umum dapat diperlihatkan, bahwa ketujuh isolat dapat tumbuh pada benzamida, namun pertumbuhan paling baik ditunjukkan bila benzamida tersebut digunakan hanya sebagai sumber nitrogen saja. Dari ketujuh isolat tersebut pertumbuhan terbaik pada benzamida diperlihatkan oleh isolat bakteri D1. Bila benzamida digunakan sebagai satu-satunya sumber karbon, energi, dan nitrogen perolehan biomassa adalah sebesar 2,54 g sel bobot kering/liter. Bila benzamida digunakan sebagai sumber karbon dan energi perolehan biomassa adalah sebesar 2,05 g sel bobot kering/liter. Dan bila benzamida sebagai sumber nitrogen saja perolehan biomassa sebesar 2,86 g/liter. Sedangkan, pertumbuhan isolat D1 pada berbagai konsentrasi benzamida memperlihatkan, bahwa pertumbuhan tertinggi isolat tersebut ditunjukkan pada medium yang mengandung 40 mM benzamida, dengan perolehan biomassa sebesar 4,00 g sel bobot kering/liter (Gambar 1 dan Tabel 5).

Pengujian berbagai senyawa amida sebagai substrat terhadap kemampuan tumbuh isolat D1 menunjukkan, bahwa isolat D1 juga mampu tumbuh pada senyawa amida yang diuji (akrilamida, asetamida, benzamida, nikotinamida dan propionamida). Namun, secara umum, pertumbuhan terbaik dicapai apabila senyawa amida digunakan hanya sebagai sumber nitrogen saja. Walaupun begitu, tampaknya isolat D1 mempunyai preferensi yang lebih tinggi terhadap benzamida dibandingkan senyawa-senyawa amida lainnya, karena pertumbuhan tertinggi isolat D1 ditunjukkan bila ditumbuhkan pada benzamida, baik sebagai satu-satunya sumber karbon, energi, dan nitrogen 3,01 g sel bobot kering/liter, sebagai sumber karbon dan energi 1,33 g sel bobot kering/liter, maupun sebagai sumber nitrogen saja 2,72 g sel bobot kering/liter (Tabel 3).

Telah banyak dilaporkan, bahwa enzim amidase berperan dalam hidrolisis senyawa-senyawa amida dengan menghasilkan asam-asam karboksilat dan amonium (Nagasawa *et al.*, 1987; Wyatt & Linton, 1988, Sunarko, 1995). Pengujian kemampuan tumbuh isolat bakteri D1 pada berbagai asam karboksilat menunjukkan, bahwa isolat D1 ternyata hanya mampu tumbuh pada asam asetat, asam benzoat dan asam propionat sebagai sumber energi dan karbon, tetapi tidak mampu tumbuh pada asam akrilat dan asam nikotinat (Tabel 4). Walaupun begitu, perolehan biomassa isolat D1 pada ketiga asam karboksilat tersebut relatif sangat kecil, yaitu masing-masing hanya sebesar 0,06 g sel bobot kering/liter pada asam asetat, sebesar 0,08 g sel bobot kering/liter pada asam benzoat, dan sebesar 0,06 g sel bobot kering/liter pada asam propionat (Tabel 4).

Pola pertumbuhan isolat D1 pada benzamida sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen ditampilkan pada Gambar 2. Seperti ditunjukkan pada gambar, pertumbuhan isolat D1 pada 40 mM benzamida tidak memerlukan fase lag dan langsung memasuki fase logaritma dengan pertumbuhan maksimum dicapai pada jam ke-96, dengan perolehan biomassa sebesar (4,96 g sel bobot kering/liter) dan koefisien hasil sel (Y) sebesar 124 g sel bobot kering/mol benzamida. Dari pola pertumbuhan tersebut dapat pula ditentukan perkiraan waktu penggandaan (t_d), yaitu sekitar 6 jam 40 menit, dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar 0,046 h^{-1} .

KESIMPULAN

Dari berbagai sampel limbah industri dapat diisolasi 25 isolat bakteri dan tujuh isolat diantaranya mampu tumbuh pada benzamida sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen. Pertumbuhan tertinggi diperlihatkan oleh isolat D1. Isolat D1 juga mampu tumbuh pada asetamida, akrilamida, benzamida, nikotinamida dan propionamida. Namun pada asam-asam karboksilat, isolat D1 ternyata hanya mampu tumbuh pada asam asetat, asam benzoat dan asam propionat sebagai sumber energi dan karbon. Pertumbuhan tertinggi isolat D1 ditunjukkan pada medium yang mengandung 40 mM benzamida. Isolat D1 tumbuh pada 40 mM benzamida dengan waktu penggandaan (t_d) sekitar 6 jam 40 menit dan laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar 0,046 h^{-1} . Perolehan biomassa maksimum dapat ditentukan sebesar 4,96 g sel bobot kering/liter dengan koefisien hasil (Y) sebesar 124 g sel bobot kering/mol benzamida.

Tabel 1. Isolat mikroba yang dapat diisolasi dari berbagai limbah industri

No.	Jenis Limbah	Isolat yang diperoleh
1.	Tangki Anaerob Batik Keris/Danliris - Solo	3
2.	Tangki Aerob Batik Keris/Danliris - Solo	2
3.	Lumpur Aktif Batik Keris/Danliris - Solo	3
4.	Lumpur Bakteri PT. Danliris - Solo	2
5.	Limbah penyamakan kulit Gede Bage -Bandung	2
6.	Limbah industri logam-Bandung	1
7.	Limbah cat ICII	-
8.	Limbah cat ICI II	1
9.	Limbah cat III	-
10.	Limbah awal PT. Kusumahadi Santosa-Solo	2
11.	Bak pemeliharaan bakteri PT. Kusumahadi Santosa -Solo	3
12.	Biological sludge PT. Kusuma Santosa-Solo	2
13.	Tanah & pupuk (proses aerob) Batik Keris/ Danliris - Solo	2
14.	Tanah yang terkontaminasi limbah tapioka - Bogor	2
Jumlah keseluruhan isolat yang diperoleh		25

Tabel 2. Pertumbuhan berbagai isolat pada benzamida sebagai sumber karbon, energi, dan/atau nitrogen

Isolat	Perolehan biomassa (g/l) ¹⁾		
	dari isolat yang ditumbuhkan pada benzamida sebagai sumber		
	Karbon, Energi dan Nitrogen	Karbon dan Energi	Nitrogen
A1	1,46	+	0,03
A2	1,61	0,04	2,54
A3	0,01	0,07	0
D1	2,54	2,05	2,86
D2	1,66	1,98	1,66
K1	1,49	0,14	1,28
K2	1,07	0,01	1,05

¹⁾ : gram sel bobot kering/liter medium tumbuh

Tabel 3. Pertumbuhan isolat bakteri D1 pada berbagai senyawa amida sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan/atau nitrogen

Senyawa Amida	Perolehan biomassa (g/l) ¹⁾		
	Dari isolat D1 pada senyawa amida sebagai sumber		
	Karbon, energi, dan nitrogen	Karbon dan energi	Nitrogen
Asetamida	0,55	0,42	1,42
Akrlamida	0,01	0,01	2,12
Benzamida	3,01	1,33	2,72
Nikotinamida	0,93	0,20	1,96
Propionamida	1,16	1,14	2,21

¹⁾ : gram sel bobot kering/liter medium tumbuh

Tabel 4. Pertumbuhan isolat bakteri D1 pada berbagai asam karboksilat sebagai sumber karbon dan energi

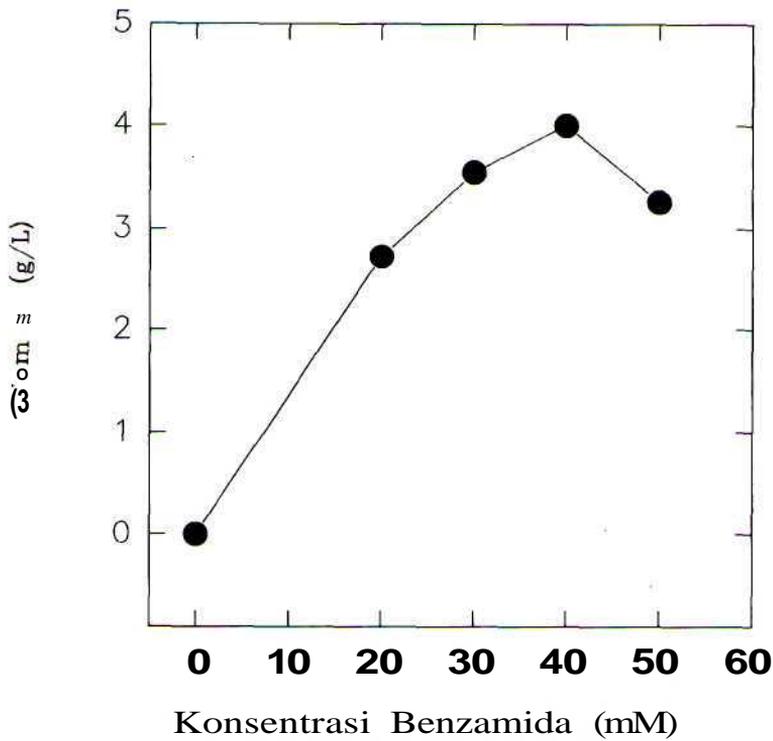
Asam-asam karboksilat (20 niM)	Perolehan biomassa (g/l) ^{ij}
Asam Akrilat	-
Asam Asetat	0,06
Asam Benzoat	0,08
Asam Nikotinat	-
Asam Propionat	0,06

^{ij}: gram sel bobot kering/liter medium tumbuh

Tabel 5. Pengaruh konsentrasi benzamida terhadap perolehan biomassa isolat bakteri D1.

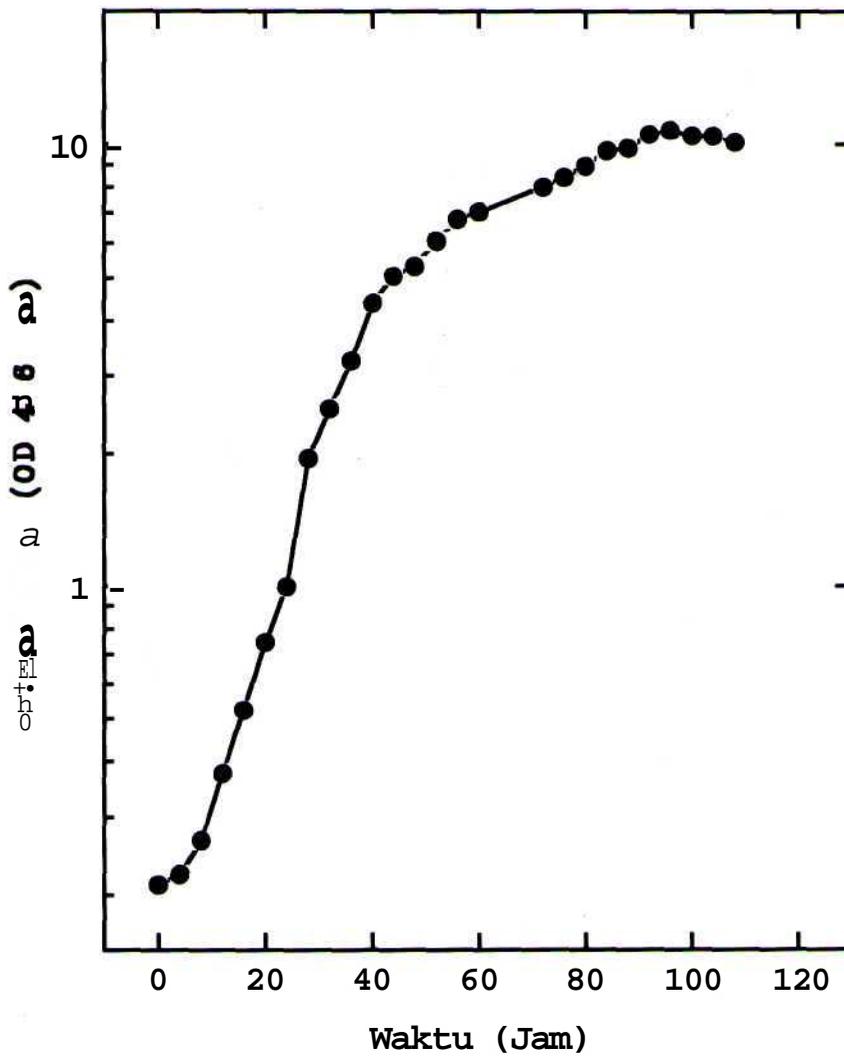
Benzamida (mM)	Biomassa (g/l) ^{ij}	Prosentual (%)
0	0	0
20	2,72	67,91
30	3,55	88,69
40	4,00	100
50	3,26	81,48

^{ij}: ram sel bobot kenng/hter medium tumbuh



• = inkubasi 3 hari

Gambar 1. Pengaruh berbagai konsentrasi Bezamida terhadap pertumbuhan isolat D1.



Gambar 2. Pola pertumbuhan isolat D1 pada 40 mM Benzamida sebagai sumber karbon, energi dan nitrogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Beard T, Cohen MA, Parrat JS, Tuner NJ, Crosby J & Moilliot. J. 1993.** Stereoselective Hydrolysis of Nitriles and Amides Under Mild Conditions Using a Whole Cell Catalyst. *Tetrahedron: Asymmetry*, 4, 1085-1104.
- Clarke PH & Ornston N. 1975.** Metabolic Pathways and Regulation II. Dalam: Clarke, P. H and M. H. Richmond (Eds.). *Genetics and Biochemistry of Pseudomonas*, 263-340. John Willey, London.
- Clarke PH. 1970.** The Aliphatic Amidases of *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv. In Microb. Physiol.*, 4, 179-222
- Clarke PH. 1972.** Biochemical and Immunological Comparison of Aliphatic Amidases Produced by *Pseudomonas* species. *J. Gen. Microbiol.* **71**, 241-257.
- Collin PA & Knowles C J. 1983.** The Utilization of Nitriles and Amides by *Nocardia rhodochrous*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 711-718.
- Effenberger F & Bohme J. 1994.** Enzyme-Catalyzed Enantioselective Hydrolysis of Racemic Naproxen Nitrile. *Bioorg. Med.Chem.* 7, 715-721.
- Friedrich GC & Mitrenga G. 1981.** Utilization of Aliphatic Amides and Formation of Two Different Amidases by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Gen. Microbiol.* **125**, 367-374.
- Gerhardt P & Drew SW. 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
- Koch AL. 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 & Schlegel HG. 1983.** Biology of Aerobic Carbon Monoxide Oxidizing Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 277-310.
- Nagasawa T, Nanaba H, Ryuno K, Takeuchi K, Yamada H. 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. Microbiol.* **100**, 197-206..
- Ramirez F, Monroy O, Favela E, Guyot JP & Cruz F.. 1998.** Acetamide Degradation by A Continuous-fed Batch Culture of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **70-72**, 215-223.
- Sunarko B. 1995.** Mikrobieller Abau von Acetonitril und Vinylacetat und Charakterisierung von Vinylacetatesterase. Dissertation. Universität Bayreuth, Bayreuth, 135-165.
- Vaughan PA, Cheetham PSJ & Knowles CJ. 1988.** The Utilization of Pyridine Carbonitriles and Carboxamides by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1099-1107.
- Wyatt JM & Linton EA. 1988.** The Industrial Potential of Microbial Nitrile Biochemistry. Dalam: Mehnert J, Brimer L. (Eds.), *Cyanide Compounds in Biology*. John Wiley & Sons, Chichester, 32-42.