

PRODUKSI SENYAWA BIOPLASTIK P(3HB) DARI MINYAK KELAPA SAWIT DALAM BIOREAKTOR KAPASITAS 100 LITER DAN PEMANFAATANNYA SEBAGAI KEMASAN RAMAH LINGKUNGAN

Akmal Djamaan * dan Anthoni Agustien **

* *Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Andalas*

** *Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas*

ABSTRACT

This research was initiated to study the ability of *Erwinia* sp. USMI-20 to produce a bioplastic compound of P(3HB) from palm oil as a single carbon sources by fermentation process. Fermentation was conducted in a 100L bioreactor at pH 7, aeration 40 % v/v, agitation 200 rpm for 48 hours. The polymer granules accumulated in the cells of *Erwinia* sp. USMI-20 upon cultivation were extracted and purified and characterized by using gas chromatography (GC), ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR). The thermal properties including melting temperature (T_m) and glass transition temperature (T_g) for the polymer were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC). The molecular weight was determined by gel permeation chromatography (GPC).

Our results showed that by using palm oil as the sole carbon source, *Erwinia* sp. USMI-20 was able to produce P(3HB) with a maximum polymer content of 45.8 % of the dry cell weight with an optimum fermentation time of 48 hours. The T_m and T_g of polymer were of 175 °C and 15 °C respectively. The weight-average molecular weight (M_w) of the P(3HB) produced was 700.000-800.000 Da whereas the number-average (M_n) was 250.000-300.000 Da with a polydispersity index (M_w/M_n) of 2.3-2.8.

PENDAHULUAN

Sejak beberapa dekade yang lalu, plastik sintesis telah digunakan secara meluas karena sifatnya yang sangat kenyal, tidak telap air dan tahan terhadap penguraian. Seiring dengan itu industri permintaan yang semakin bertambah telah menyebabkan penghasilannya melebihi 100 juta ton setiap tahun. Akibat dari penggunaan plastik sintesis yang tidak terkontrol ini ini menyebabkan masalah pencemaran lingkungan yang serius, karena plastik ini tidak dapat diuraikan secara semulajadi (Page, 1995).

Di Amerika Serikat dan Jepang dilaporkan bahwa lebih dari 30 persen sampah, merupakan sampah plastik. Selain itu beratus ribu ton sampah plastik telah dibuang ke lautan setiap tahun dan menyebabkan lebih dari satu juta hewan laut, mati setiap tahunnya akibat terjerat atau terhalang oleh sisa-sisa plastik yang tenggelam di dalam air laut ataupun yang terapung di permukaan air laut (Doi, 1990).

Selain daripada masalah pencemaran lingkungan dan kerosakan ekosistem yang telah dikemukakan di atas, bahan mentah pembuatan plastik yaitu petroleum merupakan sumber alam yang semakin ketandusan. Diketahui bahawa, petroleum merupakan sumber daya alam yang tak dapat diperbaharui (*non-renewable*) sehingga tidak mungkin digunakan secara terus-menerus dalam masa yang panjang.

Untuk mencari jalan keluar dari permasalahan tersebut di atas, berbagai kajian dan usaha telah dilakukan untuk menghasilkan plastik yang dapat terurai

dan berasal dari bahan alam yang dapat diperbaharui. Salah satu cara yang mendapat perhatian akhir-akhir ini ialah biosintesis secara fermentasi dengan menggunakan mikroorganisma penyimpan poli(3-hidroksialkanoat), P(3HA).

Telah diketahui bahawa mikroorganisma tertentu dapat menyimpan P(3HA) di dalam selnya yang berguna sebagai cadangan bahan makanan dan energi pada keadaan pertumbuhan yang kurang menguntungkan misalnya: kekurangan nitrogen, fosfat, oksigen dan magnesium (Lee *et al.*, 1999). Biopolimer yang dihasilkan oleh mikroorganisma tersebut dapat diekstrak keluar dari dalam selnya dan diproses lebih lanjut sesuai dengan keperluan yang diinginkan, terutamanya sebagai pengganti penggunaan plastik yang berasaskan petrokimia.

Senyawa plastik mudah terurai (bioplastik) dilaporkan pertama kali oleh Lemoigne pada tahun 1925, seorang ahli mikrobiologi dari Institut Pasteur di Paris. Dia mengisolasi polimer P(3HB) tersebut dari bakteria *Bacillus megaterium* (Kunioka, *et al.*, 1989). Dalam banyak bakteria, senyawa bioplastik berperan sebagai sumber karbon dari tenaga dalam keadaan kekurangan nutrien. Dilaporkan bahwa *Azospirillum brasiliense* mempunyai peluang hidup yang lebih lama karena mempunyai kandungan P(3HB) yang lebih tinggi pada keadaan lingkungan yang lebih jelek (Doi, 1990b).

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil minyak kelapa sawit terbesar di dunia. Selama ini Indonesia hanya mampu mengeksport minyak kelapa sawit mentah (*crude palm oil*) ke berbagai negara di dunia tanpa

pengolahan lebih lanjut sehingga harganya relatif murah. Dengan adanya kajian ini, minyak kelapa sawit dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar pada produksi senyawa bioplastik poli(3-hidroksibutirat) yang harganya di pasaran dunia saat ini relatif tinggi yaitu US \$ 16/kg (Fukui dan Doi, 1998). Di Malaysia dan Jepang penelitian ke arah ini telah dimulai sejak awal tahun 1990-an dan di Korea ternyata telah dapat memasarkan produknya dengan harga yang dapat bersaing dengan plastik sintetis (Steinbuchel and Fuchtenbusch, 1998; Rehm and Steinbuchel, 1999; Fukui dan Doi, 1998).

Kajian ini merupakan terobosan baru dalam upaya diversifikasi pemanfaatan minyak kelapa sawit Indonesia, sehingga pada gilirannya akan meningkatkan nilai tambah minyak kelapa sawit. Di samping itu, penggunaan plastik yang ramah lingkungan (biodegradable polymer) sebagai bahan kemasan/pembungkus akan mengurangi kerusakan lingkungan yang sudah sangat parah akibat penggunaan plastik sintetis selama ini.

Pada percobaan akan diproduksi senyawa bioplastik poli(3-hidroksibutirat), dari bahan dasar minyak kelapa sawit secara fermentasi menggunakan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 dalam bioreaktor kapasitas 100 liter. Selanjutnya biopolimer yang terkandung di dalam biomasa bakteri hasil fermentasi, dikeringkan dan akan diekstraksi keluar sel, dimurnikan dan dikarakterisasi sifat-sifat fisika, kimia dan berat molekulnya.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan kimia dan pelarut yang digunakan dalam kajian ini adalah kualiti pro-analisis meliputi: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, natrium hidroksida, asam hidroklorida, biotin, pantotenat, tiamin HCl, nikotinamida, piridoksin HCl, asam sulfurik, asam kaproik metil ester, natrium nitroprusid, natrium sulfat anhidrous, klorox, , penampakan fosfat pH 7.2, etanol, osmium tetraoksida, urinal asetat, plumbum asetat, aseton, kloroform, deuterated kloroform, metanol, medium *nutrient agar* (NA) dan *nutrient broth* (NB), agar teknikal dan minyak kelapa sawit bertapis.

Bakteri

Bakteri penghasil biopolimer yang digunakan dalam kajian ini ialah *Erwinia* sp. USMI-20 yang diperoleh dari kultur murni yang simpan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Andalas Padang.

Medium pemeliharaan mikroorganisma

Medium pemeliharaan *Erwinia* sp. USMI-20 yaitu medium NA dengan komposisi bahan-bahannya untuk 1 liter medium, sebagai berikut: ekstrak daging 5 g, pepton 5 g, glukosa 10 g dan agar teknikal 15 g. Selanjutnya pH medium diselaraskan menjadi 6 dengan penambahan asam hidroklorida 0.1 N atau natrium hidroksida 0.1 N.

Medium pengkulturan *Erwinia* sp. USMI-20

Medium pengkulturan *Erwinia* sp. USMI-20 iaitu medium mineral spesifik dengan komposisi untuk 1 liter medium ialah sebagai berikut: KH_2PO_4 3.7 g/l, K_2HPO_4 5.8 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/l, larutan unsur surih 10 ml/l dan larutan vitamin 2.5 ml/l (Majid *et al.* 1994).

Komposisi larutan unsur surih ialah sebagai berikut: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.78 g/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.98 g/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.81 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.67 g/l, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 g/l dan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g/l. Larutan unsur surih disediakan secara terpisah dengan melarutkan jumlah bahan-bahan kandungannya dalam asam hidroklorida 1.0 N sebelum dicampurkan ke dalam medium. Kemudian pH medium diselaraskan menjadi 7 dengan penambahan natrium hidroksida 0.1 N. Manakala larutan vitamin dengan komposisi sebagai berikut: biotin 0.012 g/l, pantotenat 2.4 g/l, tiamin HCl 2.0 g/l, nikotinamida 4.8 g/l dan piridoksin HCl 20.0 g/l. Larutan vitamin dilarutkan dalam air suling dan ditambahkan secara aseptik ke dalam medium yang telah disterilkan.

Penyediaan inokulum *Erwinia* sp. USMI-20

Koloni *Erwinia* sp. USMI-20 yang telah ditumbuhkan di dalam medium NA dipindahkan ke dalam 10 ml medium NB yang telah disterilkan. Kultur benih ini diaramkan pada suhu 30 °C di atas penggoncang orbital (B Braun Certomat R&H) selama 24 jam. Sebanyak 3 ml dari kultur benih tersebut dipindahkan ke dalam 100 ml medium mineral yang mengandungi minyak kelapa sawit dengan konsentrasi 4.6 g/l. Selanjutnya inokulum ini diaramkan lagi selama 24 jam (30 °C, 200 rpm, hingga diperoleh konsentrasi inokulum 25% T (trasmitan)

pada λ 580 nm menggunakan spektrofotometer uv-cahaya tampak (Pharmacia Biotech. Novaspee II).

Produksi bioplastik P(3HB) dalam bioreaktor

Bakteri *Erwinia* sp USMI-20 ditumbuhkan di atas medium NA dalam cawan Petri dan agar miring. Inkubasi dalam inkubator suhu 37°C selama 24-48 jam kemudian disimpan di dalam lemari pendingin sebagai stok bakteri penghasil. Inokulum *Erwinia* sp. USMI-20 dibuat dengan sumber karbon minyak kelapa sawit dalam fermentor 10 Liter dan dimasukkan ke dalam bioreaktor 100L secara aseptik menggunakan pompa vakum .

Dalam fermentor 10L, fermentasi dilakukan pada pH 7.0, suhu 30 °C, agitasi 200 rpm, aerasi 25 % v/v. Setiap selang waktu 4 jam sampai, sampai 18 jam dan selang waktu 6 jam setelah 18 jam sampai 66 jam sampel diambil sebanyak 100 ml. Untuk setiap sampel yang diambil dilakukan analisis berupa: berat sel kering, kandungan polimer, konsentrasi polimer, kandungan minyak kelapa sawit tertinggal dan nitrogen tertinggal di dalam medium.

Dibuat grafik profil hubungan antara masa inkubasi terhadap biomasa, kandungan polimer, konsentrasi polimer, konsumsi minyak kelapa sawit dan nitrogen yang tertinggal di dalam medium. Minyak kelapa sawit tertinggal di dalam medium ditentukan dengan kaedah kromatografi gas, sedang nitrogen tertinggal dengan spektroskopi visibel setelah pewarnaan dengan Barthelot reagen (Djamaan *et al*, 1998a; Lee dan Yoo, 1994).

Isolasi dan pemurnian P(3HB) yang dihasilkan.

P(3HB) yang terdapat di dalam sel *Erwinia* sp. USMI-20 setelah pengeringan, diekstrak keluar menggunakan kloroform di dalam alat soklet. Larutan kloroformnya di ambil dan selanjutnya P(3HB) yang terlarut di dalamnya diendapkan dengan penambahan metanol sambil diaduk perlahan-lahan. Resin P(3HB) yang telah mengendap tersebut disaring dengan bantuan pompa vakum dan dikeringkan pada suhu kamar (Djamaan, 2004)

Karakterisasi polimer P(3HB) yang dihasilkan

Karakterisasi terhadap senyawa P(3HB) yang telah diekstraksi di atas dilakukan dengan teknik kromatografi gasnya dibandingkan dengan P(3HB) standar dan analisis spektrum resonansi magnetik inti (NMR) yaitu: ^{13}C dan ^1H NMR untuk konfirmasi struktur kimia P(3HB) yang dihasilkan dengan metode yang dikemukakan oleh Doi *et al.* (1986a: 1986b).

Penentuan sifat termal P(3HB) yang dihasilkan ditentukan dengan kaedah *Differential Scanning Calorimetry* untuk suhu lebur (*melting temperature*) (T_m) dan suhu peralihan kaca (*glass transition temperature*) (T_g) (Doi, 1990). Berat molekul ditentukan dengan alat kromatografi permeasi gel (GPC) dengan pelarut kloroform dan gas pembawa helium. Ditentukan purata berat berat molekul (M_w), purata-nomor berat molekul (M_n) serta indeks polidispersitinya (M_w/M_n) untuk setiap polimer yang dihasilkan. Sebagai standar digunakan polistirena dengan berbagai macam berat molekul yang telah diketahui, seperti yang dikemukakan oleh Barham *et al.* (1984), Majid (1988), Djamaan *et al.* (2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil fermentasi P(3HB) di dalam biorektor diperlihatkan oleh data pada Tabel 1, Gambar 1-3. Secara umum terlihat bahwa berat kering sel tertinggi dicapai setelah fermentasi berlangsung selama 42 jam, sedangkan kandungan polimer tertinggi pada jam ke 48. Kandungan P(3HB) tertinggi yang dicapai yaitu sebesar 45,86 % b/b.

Ini berarti hampir separoh dari berat sel bakteri tersebut berasal dari granul P(3HB) yang diakumulasinya di dalam sel. Ini menunjukkan bahwa bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 sangat potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai mikroba industri biopolimer. Sebagai contoh *Ralsonia eutropha* yang dikembangkan oleh Biopol (USA) secara komersial dewasa ini, dapat mengumpulkan polimer di dalam selnya sehingga 85% b/b (doi, 1990).

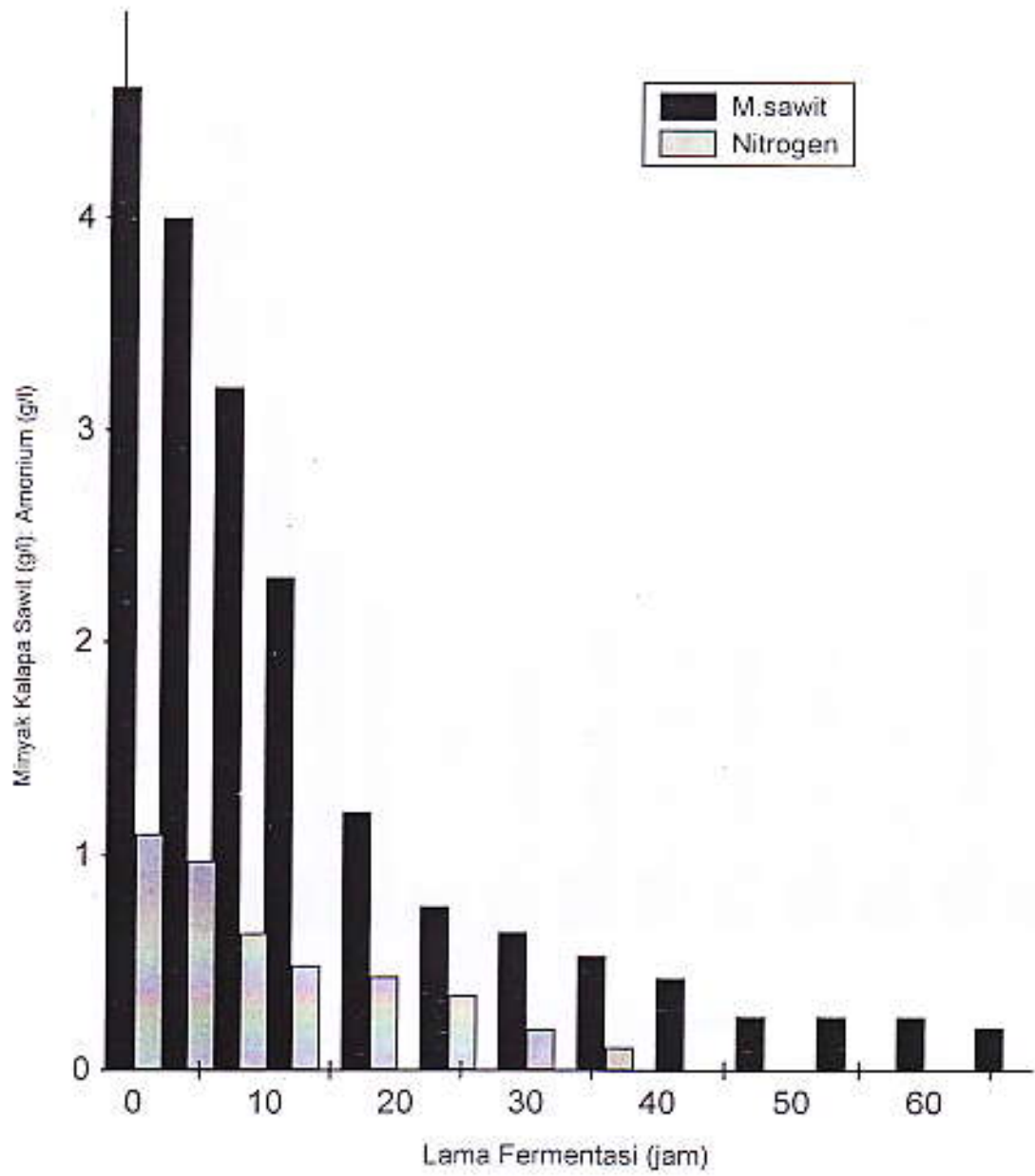
Profil penggunaan minyak kelapa sawit dan amonium selama fermentasi berlangsung ditunjukkan pada Gambar 1. Terlihat bahwa minyak kelapa sawit sebagai satu-satunya sumber karbon dalam medium, dikonsumsi dalam jumlah yang sangat cepat pada 30 jam pertama fermentasi. Pada waktu itu bakteri juga berkembang dengan sangat pesat (fase eksponensial), yang ditunjukkan dengan kenaikan berat kering sel (Tabel 1) dan penurunan konsentrasi amonium (Gambar 1). Setelah jam ke 30 tersebut, sumber amonium menipis dan bakteri mulai mengakumulasi P(3HB) di dalam selnya hingga mencapai puncaknya pada jam ke 48 (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan teori penghasilan P(3HB) yang dikemukakan oleh Lee *et al.* (1999).

Tabel 1 Data fermentasi produksi P(3HB) oleh *Erwinia* sp. USMI-20 dari minyak kelapa sawit dengan konsentrasi 4.5 g/l di dalam fermentor selama 66 jam fermentasi^a

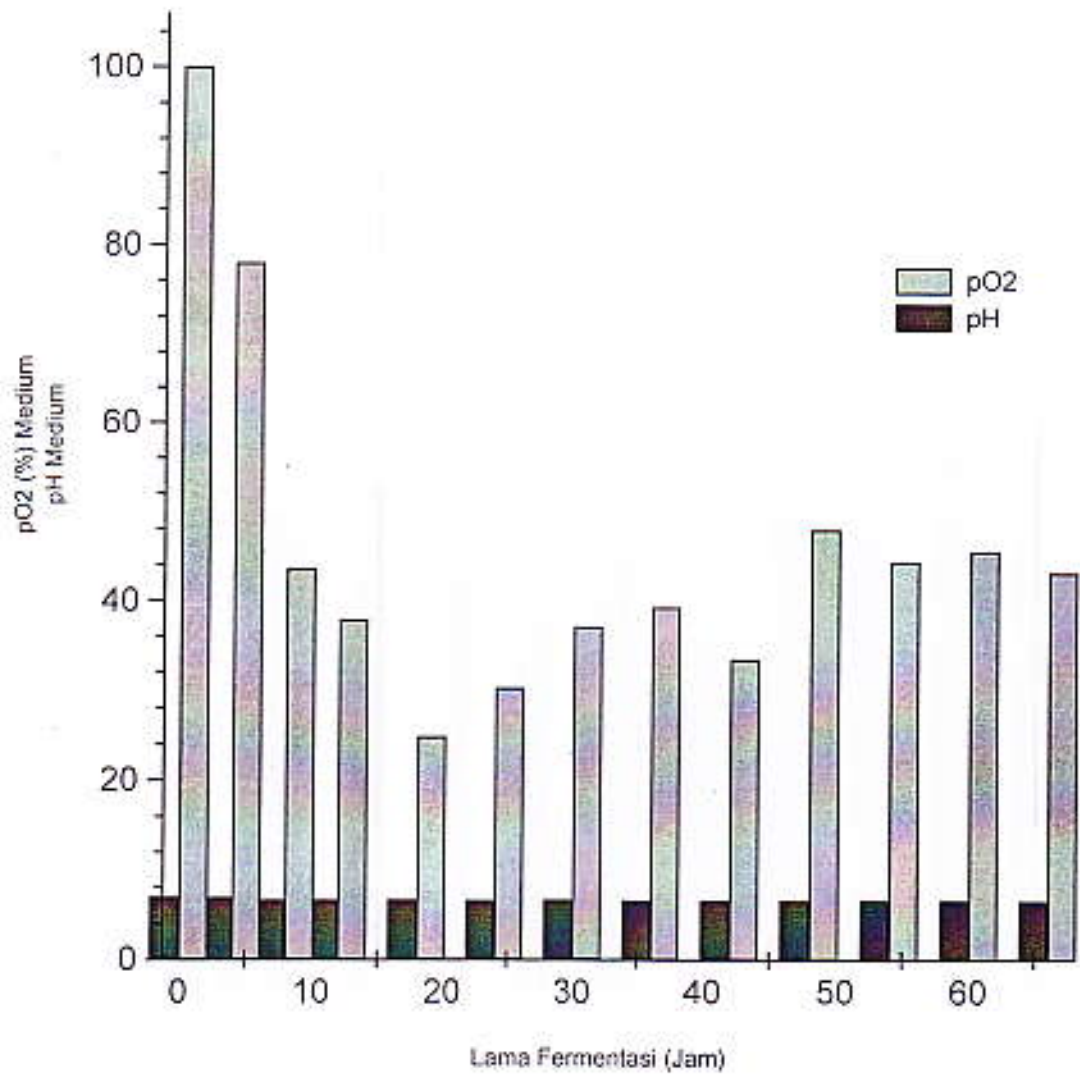
Masa (jam)	Berat kering sel (g/l)	Minyak kelapa sawit (g/l)	Kandungan P(3HB) (% b/b)	Biomasa residu (g/l)
0	0.162	4.62	0.00	0.162
4	0.354	4.00	3.69	0.341
8	1.283	3.20	4.43	1.226
12	1.468	2.30	23.77	1.119
18	2.687	1.20	24.66	2.024
24	3.139	0.76	28.90	2.232
30	3.455	0.64	35.43	2.231
36	3.827	0.53	37.54	2.390
42	3.843	0.43	38.25	2.374
48	3.571	0.25	45.86	1.933
54	3.343	0.25	37.72	2.082
60	2.990	0.25	33.36	1.993
66	2.807	0.20	28.90	1.996

^a Masa inkubasi 66 jam, 30°C, pH 7.0 dan guncangan 200 rpm

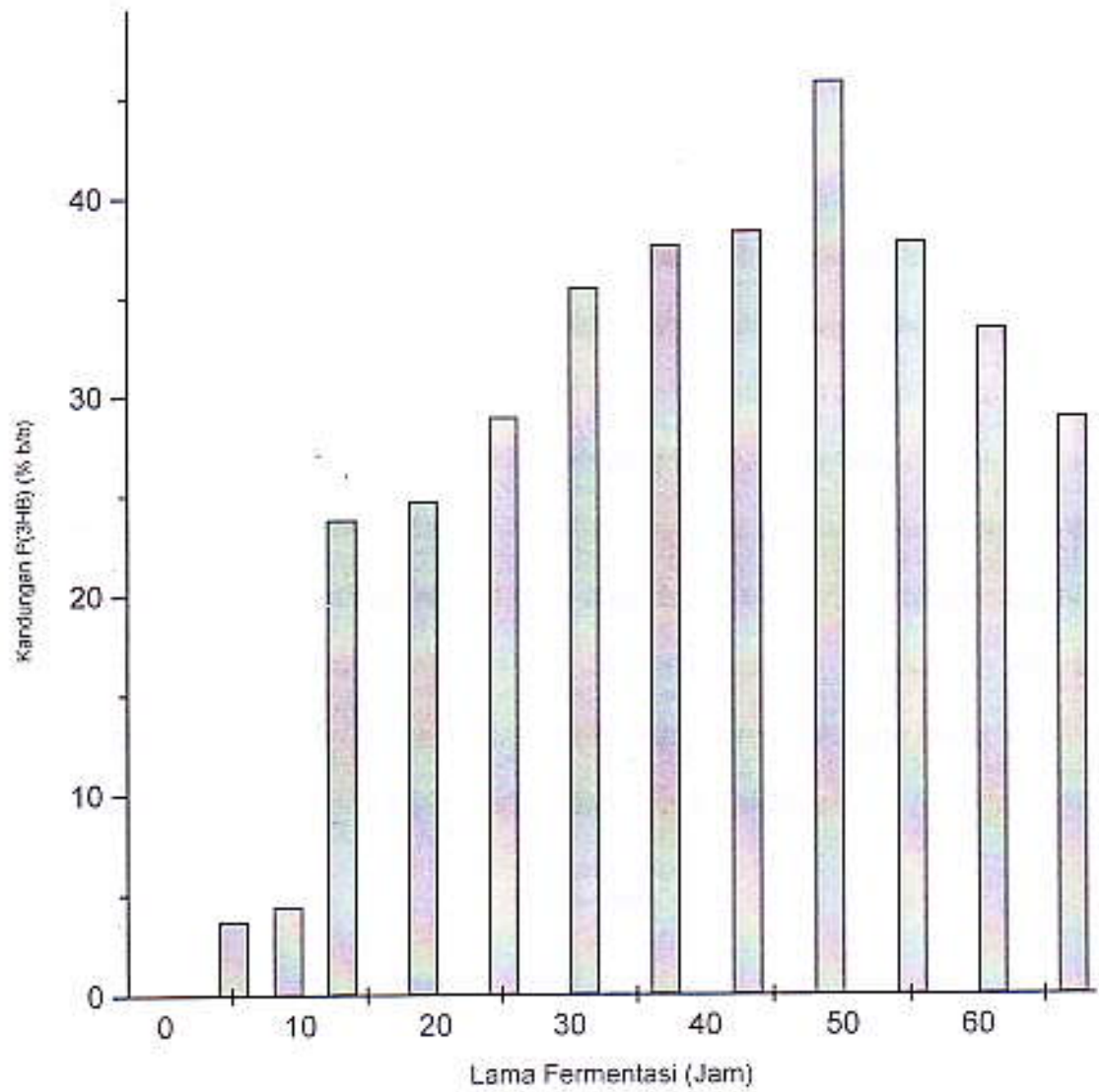
^b Kandungan P(3HB) dihitung dari berat kering sel.



Gambar 1. Profil penggunaan minyak kelapa sawit dan amonium selama fermentasi P(3HB) menggunakan *Erwinia* sp. USMI-20



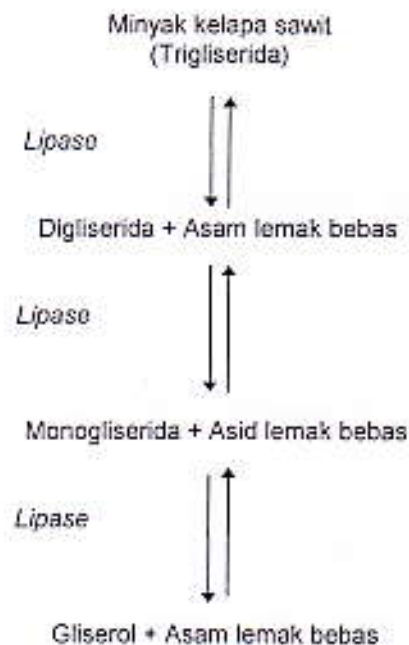
Gambar 2. Profil ketersediaan oksigen dan kondisi pH medium selama fermentasi P(3HB) dari minyak kelapa sawit menggunakan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20



Gambar 3. Profil pengaruh lama fermentasi terhadap kandungan P(3HB) yang dihasilkan oleh *Erwinia* sp. USMI-20 dari minyak kelapa sawit.

Sementara itu, ketersediaan oksigen (pO_2) dan pH medium secara umum relatif baik selama fermentasi, yaitu pO_2 berkisar 40% v/v dan pH berkisar 7.

Melewati jam ke 48 fermentasi terlihat bahwa terjadi penurunan berat kering sel (Tabel 1). Penurunan berat kering sel ini, diduga karena pada waktu itu kemungkinan sebahagian sel bakteri di dalam kultur telah mati seiring dengan habisnya sumber nutrisi di dalam medium. Hal ini juga ditandai dengan timbulnya buih pada permukaan cairan kultur yang berasal sel atau dari protein sel yang telah mati. Buih yang dihasilkan semasa fermentasi akan dapat menekan pertumbuhan sel (Stanbury *et al.*, 1995). Di samping itu, buih juga dapat dihasilkan apabila enzim lipase ekstra-sel dibebaskan dengan jumlah yang banyak untuk menghidrolisis minyak kelapa sawit menjadi gliserol dan asam lemak seperti ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi enzim lipase ekstra-sel terhadap minyak kelapa sawit (trigliserida) dalam medium fermentasi (Macrae, 1983).

Sampel polimer yang telah diekstrak dan dimurnikan dari sel *Erwinia* sp. USMI-20, dikarakterisasi menggunakan kromatografi gas dan spektroskopi magnetik inti. Hasilnya menunjukkan bahwa polimer yang dihasilkan adalah benar P(3HB). Penentuan titik lebur (T_m) dan suhu peralihan kaca (T_g) serta dari P(3HB) yang dihasilkan oleh *Erwinia* sp. USMI-20 diketahui T_m sebesar 170 °C, dan T_g 13 °C (Tabel 2).

Bila dibandingkan dengan P(3HB) yang dihasilkan oleh bakteri komersial *R. eutropha*, P(3HB) yang dihasilkan oleh *Erwinia* sp. USMI-20 mempunyai titik lebur (T_m) dan suhu peralihan kaca yang hampir sama dengan nilai yang dilaporkan. Dalam kajian ini diperoleh P(3HB) yang mempunyai T_m 175 °C dan T_g 13 °C, sedangkan P(3HB) yang dihasilkan oleh *R. eutropha* mempunyai T_m di antara 175 hingga 180 °C dan T_g di antara 4 hingga 15 °C (Poirier *et al.*, 1995). Ini menunjukkan bahwa kualitas dari P(3HB) yang dihasilkan oleh *Erwinia* sp. USMI-20 sama dengan yang dihasilkan oleh *R. eutropha* komersial.

Pada Tabel 3 ditunjukkan hasil penentuan berat molekul P(3HB) yang dihasilkan yaitu dengan M_w berkisar antara 750.000 – 800.000 Da, M_n berkisar antara 250.000 – 300.000 Da serta M_w/M_n 2,3-2,8. Dari data tersebut juga diketahui bahwa berat molekul P(3HB) tertinggi juga dicapai pada jam ke 48 fermentasi. Menurut Cowd (1982), secara umum dengan bertambah besarnya berat molekul suatu polimer, maka sifat yang lebih kenyal akan diperoleh. Ini sangat menguntungkan dan disukai oleh industri polimer kerana mudah membentuknya menjadi berbagai produk plastik yang diinginkan.

Tabel 2 Suhu lebur dan suhu peralihan kaca P(3HB) yang dihasilkan oleh *Erwinia* sp. USMI-20 dari minyak kelapa sawit berbanding P(3HB) yang dihasilkan oleh *R. eutropha*.

P(3HB)	Takat lebur (T_m) ($^{\circ}\text{C}$)	Suhu peralihan kaca (T_g) ($^{\circ}\text{C}$)
P(3HB) <i>Erwinia</i> sp. USMI-20 ^a	170	13
P(3HB) <i>R. eutropha</i> . ^b	175-180	4-15

^a Analisis dilakukan ke atas hasil fermentasi P(3HB) pada bahagian 3.2.2.

^b Data daripada Doi (1990) dan Poirier *et al.* (1995)

Tabel 3 Hasil penentuan M_w , M_n dan M_w/M_n P(3HB) yang dihasilkan oleh *Erwinia* sp. USMI-20 dari sumber karbon minyak kelapa sawit^a

Lama Fermentasi (jam)	M_w (Da)	M_n (Da)	M_w/M_n
36	800,000	300,000	2.3
48	800,000	300,000	2.3
60	700,000	250,000	2.8

^a Analisis dilakukan dengan metode Kromatografi Permiasi Gel

^b Kandungan polimer dihitung dari berat kering sel.

Secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa polimer P(3HB) yang dihasilkan oleh bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 mempunyai kualitas yang hampir sama dengan P(3HB) yang telah dipasarkan secara komersial dewasa ini. Hasil penelitian ini juga memberi peluang pengembangan P(3HB) secara besar-besaran dari bahan dasar minyak kelapa sawit di masa depan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut :

- P(3HB) dapat dihasilkan secara fermentasi dari bahan dasar minyak kelapa sawit menggunakan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 dalam bioreaktor kapasitas 100L dengan berat kering sel tertinggi 3,8 g/L dan kandungan polimer 45,8 % b/b.
- Polimer yang dihasilkan mempunyai suhu lebur 170 °C dan suhu peralihan kaca 13 °C dengan berat molekul antara 700.000-800.000 Da.

Disarankan untuk melanjutkan penelitian ini ke tahap aplikasi penggunaan polimer P(3HB) dalam kehidupan sehari-hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, H., Doi, Y., H (1996). Solid-state structure and enzymatic degradabilities for melt-crystallized film of copolymers of (*R*)-3-hydroxybutyric acid with hydroxyalkanoic acids. *Macromolecules* 31: 1791-1797.
- Barham, P. J. (1990). Physical properties of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in: *Novel Biodegradable Microbial Polymers* (Ed. Dawes, E. A). Kluwer Academic Publ., Boston, 81-96.
- Cowd, M. A. (1982). *Polymer Chemistry*, John Murray Publ. Ltd, London.
- Djamaan A. (2004). The Production and characterization of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) from various carbon sources by *Erwinia* sp. USMI-20, *Ph.D Thesis*, Universiti Sains Malaysia, Penang. 1-60.
- Djamaan A., M.N. Azizan and M.I.A. Majid (2003). Biodegradation of microbial polyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under the tropical climate environment, *Int. J. Polym. Degrad. Stab.* 80: 513-518.
- Djamaan A, M.I.A. Majid, and M.N. Azizan (1998a), Biosynthesis of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from palm oil and n-propanol or propionic acid as a second carbon source by *Erwinia* sp.USMI-20, *Program and Abstracts of The International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates*, 9-11 September 1998, Tokyo, JAPAN
- Djamaan A., M.I.A. Majid, A. Agustien, L.L. Few, M.S. Razip, M.N. Nazalan and M.N. Azizan (1999a). Utilization of valeric acid as a second carbon source on production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 4(1): 1-11.
- Djamaan A. dan Agustien, A. (1999). Penghasilan bioplastik poli(3-hidroksibutirat) dan kopolimernya oleh bakteri *Erwinia* sp. USMI-20, *Laporan Penelitian Dosen Muda (BBI), Ditjen Dikti*, Tahun anggaran 1999/2000.
- Djamaan A. dan Agustien, A. (2000). Landasan ilmiah penghasilan bioplastik poli(3-hidroksibutirat) dari minyak kelapa sawit oleh bakteri *Erwinia* sp. USMI-20, *Laporan Penelitian Program Penelitian Dasar Ditjen Dikti*, Tahun anggaran 1999/2000.
- Doi, Y. Kunioka, M., Nakamura, Y. dan Soga, K. (1986a). ^1H and ^{13}C NMR analysis of poly(β -hydroxybutyrate) isolated from *Bacillus megaterium*. *Microb. Polyester.* 19: 1274-1276.
- Doi, Y. Kunioka, M., Nakamura, Y. dan Soga, K. (1986b). Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and a copolymer of (β -hydroxybutyrate) and (β -hydroxyvalerate) from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Microb. Polyester*, 19: 2860-2864.

- Doi, Y (1990a), Poly (3-hydroxyalkanoates), Metabolism, In: *Microbial Polyester*, Chapter 4, UCH Publ. Inc., New York, 63-86.
- Doi, Y (1990b), Microorganism and Poly (3-hydroxyalkanoates), In: *Microbial Polyester*, Chapter 3, UCH Publ. Inc., New York, 33-60.
- Doi, Y. (1990c), Biodegradation of Microbial Polyester, In: *Microbial Polyester*, Chapter 8, UCH Publ. Inc., New York, 135-151.
- Dawes, E.A and Senior, P.J. (1973). The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Microorganism, *Adv. Microb. Physiol*, 10, 135-267.
- Fukui, T. and Doi, Y. (1998). Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oil by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 333-336.
- Haywood, et. al (1988a), Characterization of Two 3-ketothioloses in The Polyhydroxyalkanoate synthesizing Organism *Alcaligenes eutrophus*, *FEMS Microbiol Lett*, 52, 41-46.
- Haywood, et al. (1988b), The Role of NADH and NADPH Linked Acetoacetyl-coA Reductases The Polyhydroxyalkanoate Synthesizing Organism *Alcaligenes eutrophus*, *FEMS Microbiol Lett*, 52, 250-264.
- Koyama, N. and Doi, Y. (1997). Miscibility of binary blends of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and poly[(S)-lactic acid]. *Polymer*, 38: 1589-1593.
- Kunioka, M., Kawaguchi, Y. and Doi, Y. (1989). Production of biodegradable copolyesters 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 569-573.
- Lee, Y. W. and Yoo, Y. J. (1994). High cell density culture of *Alcaligenes eutrophus* and PHB production by optimization of medium compositions. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Lett.* 14: 811-816.
- Lindsay, K.F (1992), Truly Degradable Resin are Now Truly Commercial, *Mod. Plast.* 69, 62-64.
- Macrae, R. M. and Wilkinson, J. F. (1958). Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspension of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.* 19: 210-222.
- Majid, M. I. A. (1988). The degradation of PHB and P(3HB/HV) copolymers and their uses in drug delivery, *Ph.D. Thesis, The University of Bath*, United Kingdom, 1-250.
- Majid, MIA, Hori, K., Akiyama, M. and Doi, Y. (1994), Production of Poly (hydroxybutyrate) from Plants Oil by *Alcaligenes* sp, In: *Biodegradable Plastics and Polymers* (Doi, Y and Fukuda, (Eds.), Elsevier Science BV, 417-424.

Page, W.J. (1995), Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Natural Biodegradable Plastics with A Great Future, *Can. J. Microbiol.* 41 (Supp.1), 4-13.

Rehm, B. H. A. and Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 25: 3-19.

Schlegel, H.G., Gottchalk, G. and Von Bartha, R. (1961), Formation and Utilization of Poly-β-hydroxybutyric Acid by Knallgas Bacteria, *Nature*, 191, 463-465.

Swift, G. (1992). Biodegradation of polymer in the environments: Complexities and significance of definitions and measurements. *FEMS Microbiol. Rev.* 103(2): 337-345.

Swift, G. (1994). Expectation for biodegradation testing methods, in: *Biodegradable Plastics and Polymers* (Eds. Doi, Y. and Fukuda, K.), Elsevier Science, B.V, Amsterdam, 228-249.

Slatter, S. G., Voige, W.H. and Derris, D. E. (1988), Cloning and Expression in *E. coli* of *Alcaligenes eutrophus* H-16 Poly-β-hydroxybutyrate Biosynthetic Pathway, *Bacteriol* 170, 4431-4436.

Steinbüchel, A. and Fuchtenbush, B. (1998). Bacterial and other biological system for polyester production. *Tibtech.* 16: 419-427.

Stanbury, P. F., Whitaker, A. and Hall, S. J. (1995). Principles of fermentation technology, 2nd ed., Pergamon Ltd, Elsevier Science, United Kingdom.

Steinbüchel, A. and Schlegel, H. G. (1989). Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus* which are impaired in the accumulation of poly(β-hydroxybutyric acid), (PHB) under conditions permitting synthesis of PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 168-175.

Timm, A., Byrom, D. and Steinbüchel, A. (1990). Formation of blends of various poly(β-hydroxyalkanoic acid) by a recombinant strain *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 296-301.

van der Walle, G. A. M., Buisman, G. J. H., Weusthuis, R. A. and Eggink, K. (1999). Development of environmentally friendly coating and paints using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder. *Int. J. Biol. Macromol.* 25: 123-128.

Yamane, T (1993), Yield of Poly-D-β-hydroxybutyrate from Various Carbon Sources, A Theoretical Study, *Biotechnol. Bioeng.* 165-170.

Zhang, L., Deng, X., Zhao, S. and Huang, Z. (1997). Biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and starch acetate. *Polym. Int.* 44: 104-110.