

SKRIPSI

**OPTIMALISASI DAN ANALISIS JENIS *Polyhydroxyalkanoate* (PHA)
OLEH ISOLAT *Bacillus* sp. STRAIN CL33 DAN *Bacillus flexus* STRAIN
S5a ASAL LIMBAH PABRIK KELAPA SAWIT**



OLEH

MUTIA PUTRI JAMALUDDIN

H041181318

DEPARTEMEN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2022

**OPTIMALISASI DAN ANALISIS JENIS *Polyhydroxyalkanoate* (PHA)
OLEH ISOLAT *Bacillus* sp. STRAIN CL33 DAN *Bacillus flexus* STRAIN
S5a ASAL LIMBAH PABRIK KELAPA SAWIT**

SKRIPSI

*Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin*



**MUTIA PUTRI JAMALUDDIN
H041 18 1318**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2022

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**OPTIMALISASI DAN ANALISIS JENIS *Polyhydroxyalkanoate* (PHA)
OLEH ISOLAT *Bacillus* sp. STRAIN CL33 DAN *Bacillus flexus* STRAIN
S5a ASAL LIMBAH PABRIK KELAPA SAWIT**

Disusun dan diajukan oleh

MUTIA PUTRI JAMALUDDIN

H041 18 1318

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelcaian Program Sarjana Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 15 Agustus 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

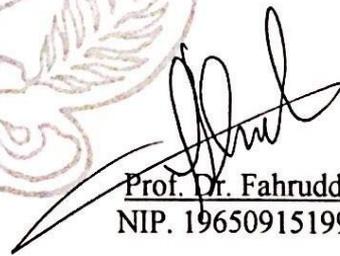
Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama



Dr. Nur Haedar, M.Si.
NIP. 196801291997022001



Prof. Dr. Fahrudin, M.Si.
NIP. 196509151991031002

Ketua Program Studi,



Dr. Nur Haedar, M.Si.
NIP. 196801291997022001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini;

Nama : Mutia Putri Jamaluddin

NIM : H041181318

Program Studi : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

**Optimalisasi Dan Analisis Jenis *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) Oleh Isolat
Bacillus sp. Strain CL33 Dan *Bacillus flexus* Strain S5a Asal Limbah Pabrik
Kelapa Sawit**

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Makassar, 15 Agustus 2022

Menyatakan



Mutia Putri Jamaluddin

KATA PENGANTAR

Segala puji peneliti panjatkan atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat rahmat dan karunia-Nya yang selalu diberikan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Optimalisasi dan Analisis Jenis *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) Oleh Isolat *Bacillus* sp. Strain CL33 Dan *Bacillus flexus* Strain S5a Asal Limbah Pabrik Kelapa Sawit”** yang merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan program pendidikan sarjana (S1) di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.

Tanpa bantuan, dukungan, dan doa dari berbagai pihak penulis tidak dapat menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya. Terima kasih tak terhingga kepada orang tua atas segala usaha yang dilakukan dalam merawat, membimbing, dan membesarkan penulis. Terima kasih kepada orang tua tercinta Bapak Jamaluddin dan Ibu Halilah yang senantiasa memberikan dukungan. Terima kasih juga kepada saudara penulis Nabila Ramadhani dan Muh. Riski yang selalu membantu dan menyemangati penulis.

Terima kasih sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si selaku pembimbing utama atas bimbingan, arahan, waktu, dan motivasi yang telah diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini dengan lancar. Terima kasih juga kepada Bapak Prof. Dr. Fahrudin, M.Si selaku pembimbing pertama yang telah memberikan saran, kritik, waktu, dan pikiran kepada penulis sehingga membantu penulis dalam penyusunan skripsi hingga selesai.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

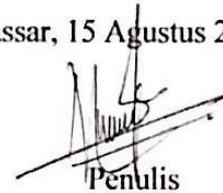
1. Prof. Dr. Jamaluddin Jompa, selaku Rektor Universitas Hasanuddin (Unhas) beserta Seluruh Staf.
2. Bapak Dr. Eng. Amiruddin, M.Sc selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
3. Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si selaku Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, terima kasih atas ilmu, motivasi, serta saran kepada penulis.
4. Tim penguji skripsi Ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si sekaligus pembimbing akademik penulis dan Ibu Andi Evi Erviani, S.Si., M.Sc. Terima kasih atas bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis.
5. Kepada seluruh Dosen Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada penulis. Kepada Staf dan Pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis dalam proses administrasi serta memberikan dukungan kepada penulis.
6. Fuad Gani, S.Si, Nenis Sardiani, S.Si, Heriadi, S.Si., M.Si, Nurul Qalbi, S.Si., M.Si, dan Donny Suherman, S.Si yang telah banyak memberi bantuan bagi penulis selama penelitian ini, berupa ilmu, bimbingan, kritik, dan saran serta motivasi yang sangat berharga bagi penulis.
7. Teman penelitian Nurul Aulyah Dhiensy dan Mujiza A. Salam yang telah menemani, mendukung, dan bekerja sama dalam menyelesaikan penelitian ini

8. Teman-temanku Ni Putu Shintia Reski, Zia Assya 'Aturrahma, dan Dian Islamiah yang selalu menghibur, membantu, dan memberikan semangat kepada penulis

9. Teman-teman Biologi Angkatan 2018, terima kasih atas banyaknya cerita suka duka selama ini bersama penulis

Pada akhirnya saya berterima kasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah berkontribusi hingga karya tulis ini terselesaikan dengan baik. Semoga tuhan membalas kebaikan yang lebih besar, Aamiin.

Makassar, 15 Agustus 2022



Penulis

ABSTRAK

Polyhydroxyalkanoate (PHA) merupakan polimer *biodegradable* yang dapat disintesis oleh mikroorganisme ketika kondisi pertumbuhan tidak optimal tetapi memiliki sumber karbon yang berlebih. Salah satu sumber karbon yang dapat digunakan untuk menghasilkan PHA adalah minyak sawit karena memiliki banyak kandungan asam lemak. Banyaknya konsentrasi karbon yang digunakan pada media pertumbuhan dapat mempengaruhi jumlah PHA yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan mengetahui konsentrasi sumber karbon optimum yang diperlukan bakteri dalam menghasilkan PHA serta mengetahui jenis PHA yang dihasilkan oleh bakteri. Konsentrasi minyak sawit yang digunakan 0,5%, 1%, dan 2% dengan waktu inkubasi 48 jam, 72 jam, dan 96 jam. Hasil dari penelitian ini diperoleh konsentrasi minyak sawit optimum bagi *Bacillus* sp. strain CL33 dan *Bacillus flexus* strain S5a dalam menghasilkan PHA sebesar 2%. *Bacillus* sp. strain CL33 menghasilkan PHA sebesar 92,23% dengan monomer *2-hydroxybutyrate ethyl ester* (-2HB) dan *2-hydroxy-3-phenylpropionate* (2H3PhP). *Bacillus flexus* strain S5a menghasilkan PHA sebesar 85,93% dengan monomer *Decamethyltetrasiloxane* (L4), *Dodecamethylpentasiloxane* (L5), *Hexamethylcyclotrisiloxane* (D3), *Octamethylcyclotetrasiloxane* (D4), dan *Dodecamethylcyclohexasiloxane* (D6).

Kata Kunci: *Polyhydroxyalkanoate*, Minyak Sawit, *Bacillus* sp. CL33, *Bacillus flexus* S5a

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a biodegradable polymer that can be synthesized by microorganisms when growth conditions are not optimal but have an excessive carbon source. One of the carbon sources that can be used to produce PHA is palm oil because it has a lot of fatty acid content. The amount of concentration of carbon sources used in the growth media can affect the amount of PHA produced. This study aims to determine the optimum concentration of carbon sources required by bacteria to produce PHA and to determine the type of PHA produced by bacteria. The concentrations of palm oil used were 0,5%, 1%, and 2% with incubation times of 48 hours, 72 hours, and 96 hours. The results of this study obtained the optimum concentration of palm oil for *Bacillus* sp. strains CL33 and *Bacillus flexus* strains S5a in producing a PHA of 2%. *Bacillus* sp. strains CL33 yielded PHA of 92,23% with 2-hydroxybutyrate ethyl ester (-2HB) and 2-hydroxy-3-phenylpropionate (2H3PhP) monomer. *Bacillus flexus* strains S5a produced PHA of 85,93% with Decamethyltetrasiloxane (L4), Dodecamethylpentasiloxane (L5), Hexamethylcyclotrisiloxane (D3), Octamethylcyclotetrasiloxane (D4), dan Dodecamethylcyclohexasiloxane (D6) monomer.

Keywords: *Polyhydroxyalkanoate*, Palm oil, *Bacillus* sp. CL33, *Bacillus flexus* S5a

DAFTAR ISI

SAMPUL	i
HALAMAN SAMPUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	iv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Tujuan Penelitian.....	3
I.3 Manfaat Penelitian.....	3
I.4 Waktu dan Tempat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II. 1 Tinjauan Umum Plastik.....	4
II.1.1 Plastik <i>Nondegradable</i>	5
II.1.2 Plastik <i>Biodegradable</i> (Bioplastik).....	5
II.2 <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	7
II.2.1 Karakteristik PHA.....	8
II.2.2 Bakteri Penghasil PHA.....	10
II.2.3 Mekanisme Pembentukan PHA.....	13
II.2.4 Aplikasi PHA Sebagai Bioplastik.....	14
II.3 Limbah Sawit Sebagai Sumber Karbon Bagi Bakteri Penghasil PHA	15
II.4 <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS).....	16
II.4.1 Karakterisasi PHA Menggunakan GC-MS.....	17
BAB III METODE PENELITIAN	19
III.1 Alat.....	19

III.2 Bahan.....	19
III.3 Metode Kerja.....	19
III.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	19
III.3.2 Pembuatan Medium.....	20
III.3.3 Peremajaan Isolat Bakteri Penghasil PHA.....	20
III.3.4 Uji Variasi Konsentrasi Sumber Karbon Dalam Menghasilkan PHA.....	21
III.3.5 Produksi PHA.....	22
III.3.6 Analisis Data.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
IV.1 Peremajaan Isolat Bakteri Penghasil PHA.....	25
IV.2 Uji Variasi Konsentrasi Sumber Karbon Dalam Menghasilkan PHA. 26	
IV.2.1 Perhitungan Pertumbuhan Total Bakteri Dengan Metode <i>Standard Plate Count</i> (SPC).....	27
IV.2.2 Berat Kering Sel.....	30
IV.2.3 Analisis PHA Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	33
IV.3 Produksi PHA.....	35
IV.3.1 Ekstraksi PHA.....	36
IV.3.2 Analisis Jenis PHA.....	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	42
V.1 Kesimpulan.....	42
V.2 Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA.....	43

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rantai samping alkil dan jenis <i>Polyhydroxyalkanoate</i> -nya.....	9
Tabel 2. Sifat fisik dari PHA.....	10
Tabel 3. Bakteri yang dapat menghasilkan PHA.....	11

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Umum <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	8
Gambar 2. Jalur Metabolisme Utama Biosintesis PHA.....	14
Gambar 3. Bagan Alir dari Aplikasi PHA Sebagai Bioplastik.....	15
Gambar 4. Peremajaan Isolat <i>Bacillus</i> sp. Strain CL33 dan Isolat <i>Bacillus Flexus</i> Strain S5a.....	25
Gambar 5. Grafik Hasil Perhitungan Total Bakteri <i>Bacillus</i> sp. Strain CL33.....	27
Gambar 6. Grafik Hasil Perhitungan Total Bakteri <i>Bacillus flexus</i> Strain S5a...	28
Gambar 7. Histogram Perbandingan Berat Kering Sel (g/mL) <i>Bacillus</i> sp. Strain CL33 pada Tiap Interval Konsentrasi Minyak Sawit dan Waktu Inkubasi.....	30
Gambar 8. Histogram Perbandingan Berat Kering Sel (g/mL) <i>Bacillus flexus</i> Strain S5a pada Tiap Interval Konsentrasi Minyak Sawit dan Waktu Inkubasi.....	31
Gambar 9. Histogram Perbandingan Nilai Absorbansi Asam Krotonat <i>Bacillus</i> sp. Strain CL33 pada Tiap Interval Konsentrasi Minyak Sawit dan Waktu Inkubasi.....	33
Gambar 10. Histogram Perbandingan Nilai Absorbansi Asam Krotonat <i>Bacillus Bacillus flexus</i> Strain S5a pada Tiap Interval Konsentrasi Minyak Sawit dan Waktu Inkubasi.....	34
Gambar 11. Histogram Nilai konsentrasi PHA pada Waktu Inkubasi 96 jam dengan Konsentrasi Minyak Sawit 2%.....	36
Gambar 12. Hasil Analisis GC-MS PHA <i>Bacillus</i> sp. Strain CL33.....	37
Gambar 13. Hasil Analisis GC-MS PHA <i>Bacillus flexus</i> Strain S5a.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Penelitian.....	52
Lampiran 2. Skema Kerja Peremajaan Isolat Bakteri Penghasil <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	53
Lampiran 3. Skema Kerja Uji Variasi Konsentrasi Sumber Karbon Dalam Menghasilkan <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	54
Lampiran 4. Skema Kerja Perhitungan Total Bakteri Menggunakan Metode Standard Plate Count (SPC).....	55
Lampiran 5. Skema Kerja Analisis Berat Kering Sel.....	56
Lampiran 6. Skema Kerja Analisis <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA) Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis.....	57
Lampiran 7. Skema Kerja Ekstraksi <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	58
Lampiran 8. Skema Kerja Analisis Jenis <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	59
Lampiran 9. Pertumbuhan Total Bakteri pada Konsentrasi Minyak 0,5%, 1%, dan 2% dengan Metode <i>Standard Plate Count</i> (SPC).....	60
Lampiran 10. Perbandingan Berat Kering Sel pada Konsentrasi Minyak 0,5%, 1%, dan 2%.....	61
Lampiran 11. Perbandingan Nilai Absorbansi (<i>Optical Density</i>) pada Konsentrasi Minyak 0,5%, 1%, dan 2%.....	62
Lampiran 12. Hasil Perhitungan Ekstraksi <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	63
Lampiran 13. Hasil Perhitungan Konsentrasi <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	63
Lampiran 14. Uji Variasi Konsentrasi Sumber Karbon dalam Menghasilkan <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	64
Lampiran 15. Ekstraksi <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	70
Lampiran 16. Analisis Jenis <i>Polyhydroxyalkanoate</i> (PHA).....	72
Lampiran 17. Foto Prosedur Penelitian.....	76

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Plastik adalah salah satu produk yang paling banyak digunakan dan telah menjadi bagian tak terpisahkan dari manusia. Secara kumulatif, produksi plastik secara global mengalami peningkatan dari sekitar 2 juta ton pada 1950 menjadi 8,3 miliar ton pada 2015 dan akan terus meningkat seiring bertambahnya populasi manusia. Namun dari hasil produksi tersebut, 6,3 miliar ton (76%) berakhir sebagai limbah yang bersifat sulit terdegradasi dan menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan, ekosistem, dan kesehatan manusia. Kelemahan dari plastik yang berbasis minyak bumi atau *nondegradable* ini kemudian menjadi dasar pengembangan plastik *biodegradable* (bioplastik) (Boey *et al.*, 2021; Darus *et al.*, 2020; Mazhandu *et al.*, 2020).

Penelitian dan pengembangan bioplastik telah banyak dilakukan untuk dapat menggantikan plastik berbasis minyak bumi karena bersifat ramah lingkungan dan dapat diproduksi dari bahan-bahan alam seperti kentang, kulit kentang, jagung, tebu, gandum, beras, dan kulit pisang serta dari mikroorganisme. Bioplastik juga bersifat *biodegradable* karena dapat terdegradasi sepenuhnya di alam menjadi karbon dioksida, air, dan senyawa organik (Shah *et al.*, 2021; Simo-Cabrera *et al.*, 2021). Salah satu jenis bioplastik yang paling banyak digunakan yaitu *polyhydroxyalkanoate* (PHA) karena memiliki sifat material yang mirip dengan plastik konvensional (Godbole, 2016; Jeremic *et al.*, 2020).

Polyhydroxyalkanoate (PHA) adalah polimer biodegradable yang disintesis dan diakumulasikan oleh mikroba (Obulisamy and Mehariya, 2021; Riaz *et al.*, 2021). PHA diproduksi oleh bakteri di bawah kondisi pertumbuhan yang tidak optimal seperti kekurangan nitrogen, magnesium, atau oksigen tetapi memiliki sumber karbon yang berlebih (Dobrogojski *et al.*, 2018; Irwandi *et al.*, 2018; Samui and Kanai, 2019). Sekitar 140 jenis PHA yang berbeda telah diidentifikasi dari kurang lebih 90 genus bakteri. Salah satu genus yang terkenal dapat mengakumulasi PHA adalah *Bacillus* dengan contoh jenis bakterinya yaitu *Bacillus megaterium*, *Bacillus sp.*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, dan *Bacillus firmus* (Bhat and Nambisan, 2014). Suherman (2021) memperoleh dua isolat bakteri yang mampu menghasilkan PHA yang berasal dari limbah pabrik kelapa sawit. Kedua isolat bakteri tersebut yaitu *Bacillus sp.* strain CL33 dan *Bacillus flexus* strain S5a.

Polyhydroxyalkanoate (PHA) yang dihasilkan oleh bakteri dapat ditingkatkan hasil dan produktivitasnya melalui optimalisasi fermentasi. Ada beberapa faktor yang berpengaruh terhadap optimalisasi PHA meliputi suhu, pH, rasio karbon terhadap nitrogen dalam media, konsentrasi substrat, konsentrasi *trace element*, kekuatan ion, intensitas pengadukan, dan kandungan oksigen terlarut. Namun, rasio nitrogen, fosfor, dan karbon serta jenis sumber karbon adalah faktor yang paling umum digunakan sebagai parameter optimalisasi PHA (Zain *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2018).

Rasio karbon yang digunakan dapat mempengaruhi jumlah PHA yang dihasilkan oleh bakteri. Semakin tinggi konsentrasi sumber karbon maka semakin besar jumlah biomassa sel yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan sumber karbon

digunakan bakteri dalam penyerapan fosfor dan peningkatan penyerapan fosfor akan meningkatkan kandungan PHA dalam biomassa sel bakteri (Irwandi *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018). Sangkharak dan Prasertsan (2013) memperoleh kandungan PHA optimum sebesar 19,55 g/L dari *Bacillus licheniformis* M2-12 mutan menggunakan konsentrasi limbah sawit sebagai sumber karbon sebesar 3%.

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi karbon optimum dalam menghasilkan PHA serta menganalisis jenis PHA yang dihasilkan terhadap isolat bakteri *Bacillus* sp. strain CL33 dan *Bacillus flexus* strain S5a asal limbah pabrik kelapa sawit.

I.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui konsentrasi sumber karbon optimum yang diperlukan oleh bakteri *Bacillus* sp. strain CL33 dan *Bacillus flexus* strain S5a dalam menghasilkan *Polyhydroxyalkanoate* (PHA)
2. Mengetahui jenis *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. strain CL33 dan *Bacillus flexus* strain S5a dengan metode GC-MS

I.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat menjadi sumber informasi ilmiah mengenai jenis *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus* sp. strain CL33 dan *Bacillus flexus* strain S5a.

I.4 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2022-Juni 2022 di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tinjauan Umum Plastik

Plastik merupakan salah satu bahan yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Karakteristik plastik yang ringan, tahan air, dan murah menjadi alasan utama dari banyaknya penggunaan plastik. Perkembangan plastik dimulai pada tahun 1869 saat ditemukannya plastik pertama yang berasal dari polimer alam, yaitu seluloid oleh seorang investor Amerika John W. Hyatt dan terbentuk pada tahun 1872. Plastik pertama terdiri dari selulosa, nitrat, kapur barus, dan alkohol. Kemudian pada tahun 1909, plastik berkembang menjadi industri modern setelah diproduksi bakelite, yaitu plastik dengan komponen sintesis pertama oleh American Chemist L.H Baakeland. Plastik adalah senyawa polimer yang unsurnya tersusun atas sebagian besar karbon dan hidrogen serta mengandung beberapa zat aditif untuk meningkatkan sifat plastik. Komponen utama dari plastik terdiri atas 58% bahan pelentur, 3% bahan penstabil panas, 8% FR, 9% bahan pengering, 12% pewarna, dan 7% lainnya (Elfidiah *et al.*, 2020; Hassanpour and Unnisa, 2017; Yani *et al.*, 2019).

Industri plastik saat ini terus berkembang dan telah menghasilkan lebih dari 300 jenis plastik, dimana sekitar 60 jenis diantaranya adalah yang paling banyak digunakan meliputi *polyethylene* (PE), *polypropylene* (PP), *polyvinylchloride* (PVC), *polystyrene* (PS), *polyurethane* (PU), dan resin fenolik (Chen *et al.*, 2021). Perkembangan industri plastik juga menyebabkan peningkatan angka produksi plastik secara global yang masing-masing mencapai

230 dan 299 MT pada tahun 2009 dan 2013. Angka ini menunjukkan kenaikan sebesar 3,9% dari tahun 2012. Penggunaan plastik pada umumnya digunakan untuk peralatan rumah tangga, pengemasan, mainan, dan lain-lain (Hassanpour and Unnisa, 2017).

Berdasarkan bahan bakunya, plastik dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu plastik dari bahan yang tidak dapat diperbaharui dan dapat diperbaharui. Sedangkan berdasarkan kemudahannya terdegradasi oleh alam, plastik dibedakan menjadi dua yaitu plastik yang sulit terdegradasi (*non degradable*) dan plastik yang mudah terdegradasi (*biodegradable*) atau bioplastik (Kasmiati *et al.*, 2017)

II.1.1 Plastik *Nondegradable*

Plastik nondegradable adalah polimer organik buatan, diperoleh dari gas alam atau minyak bumi (Suman *et al.*, 2020). Plastik berbasis minyak bumi dihasilkan dari sumber daya yang tidak terbarukan dan tahan terhadap biodegradasi di lingkungan sehingga dapat bertahan selama bertahun-tahun di alam dan akan terakumulasi semakin banyak hingga membentuk timbunan sampah. Sifat plastik *nondegradable* yang sulit terurai menjadi salah satu penyebab krisis limbah padat modern dan berpotensi mengancam kelangsungan makhluk hidup ke depannya (Haedar, 2014; Nurhayati *et al.*, 2017; Tanikkul *et al.*, 2020).

II.1.2 Plastik *Biodegradable* (Bioplastik)

Plastik *biodegradable* merupakan plastik yang dapat diuraikan oleh mikroorganisme secara alami menjadi senyawa yang bersifat ramah lingkungan dan terbuat dari bahan baku yang dapat diperbaharui (*renewable resources*) dan berkelanjutan (Hasibuan, 2020). Bioplastik adalah plastik yang dapat didegradasi

oleh mikroorganisme dari senyawa yang berasal dari tumbuhan seperti pati, selulosa, dan lignin. Plastik *biodegradable* memiliki kualitas fungsional yang sama seperti plastik konvensional, tetapi dapat terurai oleh aksi mikroorganisme dan menghasilkan air (H₂O), karbon dioksida (CO₂), dan metana (CH₄). Dengan kata lain, mereka dapat kembali ke alam setelah digunakan karena dapat terurai di lingkungan, sehingga disebut juga sebagai plastik ramah lingkungan. Bioplastik dapat terdegradasi 10 sampai 20 kali lebih cepat dibanding plastik konvensional (Wahyuningtiyas and Suryanto, 2017).

Beberapa negara telah melakukan berbagai riset untuk mengembangkan bioplastik, diantaranya adalah Kanada, Italia, Amerika Serikat, dan China. Hal ini dikarenakan kapasitas produksi global bioplastik diprediksi akan tumbuh dari sekitar 2,11 juta ton pada tahun 2018 menjadi sekitar 2,62 juta ton pada tahun 2023. Asosiasi bioplastik Eropa bahkan memperkirakan bahwa produksi plastik *biodegradable* global akan meningkat tiga kali lipat selama lima tahun ke depan (Gosh and Jones, 2021; Ogawa, 2020).

Polimer Biodegradable diklasifikasikan ke dalam dua kelompok dan empat keluarga yang berbeda. Kelompok utama adalah *agro-polymer* yang diperoleh dari bahan-bahan pertanian, seperti polisakarida, protein, dan lemak. Kelompok kedua adalah biopoliester (*biodegradable polyester*) seperti *Poly Lactic Acid* (PLA), *Polyhydroxyalkanoate* (PHA), aromatik, dan alifatik kopoliester. Biopoliester dibagi lagi berdasarkan sumbernya. Kelompok *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) didapatkan dari aktivitas mikroorganisme yang diperoleh dengan cara ekstraksi. Contoh kelompok *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) yaitu (*polyhydroxybutyrate*) (PHB) dan *polyhydroxybutyrate co-hydroxy valerate*

(PHBV). Kelompok lainnya adalah biopoliester yang diperoleh dari aplikasi bioteknologi, yaitu dengan sintesis secara konvensional monomer-monomer yang diperoleh secara biologis yang dikenal dengan sebutan kelompok polilaktida. Contoh dari polilaktida adalah *Poly Lactic Acid* (PLA). Kelompok terakhir diperoleh dari produk-produk petrokimia yang disintesis secara konvensional dari monomer-monomer sintesis. Kelompok ini terdiri dari *poly capro lactones* (PCL), *polyester amides*, *aliphatic co-polyesters*, dan *aromatic co-polyesters* (Averous, 2008).

II.2 Polyhydroxyalkanoate (PHA)

Minat terhadap bahan-bahan terbarukan, ramah lingkungan, dan berbasis bio yang tinggi menunjukkan bahwa bioplastik akan menjadi komponen penting dalam industri plastik di masa depan (Szacherska *et al.*, 2021). Produksi bioplastik diperkirakan akan terus meningkat di masa depan, dengan tingkat pertumbuhan 10-20% dan diperkirakan meningkat dengan rata-rata 12,6% pada 2020 (Kumar and Thakur, 2017). Salah satu jenis bioplastik yang banyak digunakan adalah *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) yang memiliki sifat *biodegradable*, fleksibel, dan termoplastik (Hasibuan, 2020). Menurut Szacherska *et al.* (2021), produksi PHA dari produsen komersial di seluruh dunia telah mencapai 2,05 juta ton pada tahun 2017 dan diperkirakan nilai pasar global PHA akan tumbuh dari USD 57 juta pada tahun 2019 menjadi USD 98 juta pada tahun 2024.

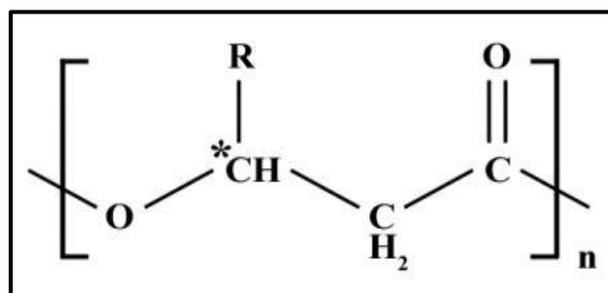
Polyhydroxyalkanoate (PHA) pertama kali ditemukan oleh Lemogine pada tahun 1926 (Tan *et al.*, 2014). PHA merupakan jenis bioplastik yang dihasilkan oleh bakteri sebagai produk intraseluler yang diakumulasi di dalam sel bakteri,

bersifat hidrofobik (resisten terhadap uap air) dan permeabilitas oksigennya rendah, tidak beracun, tetapi juga *biodegradable* serta dapat dihasilkan dari sumber daya terbarukan (Permatasari *et al.*, 2021). PHA adalah kelompok poliester alami yang produksinya umumnya dipicu oleh pembatasan nutrisi, seperti nitrogen dan fosfor, dengan karbon yang berlebih. PHA dapat terdegradasi sepenuhnya menjadi C_2O dan H_2O di alam (Devi *et al.*, 2015; Vu *et al.*, 2021).

Sekitar 150 subunit PHA yang berbeda telah berhasil diidentifikasi (Chanasit *et al.*, 2016) dan yang paling umum diantaranya adalah *polyhydroxybutyrate* (PHB) dan *poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)* (PHBV). Polimer ini memiliki karakteristik fisikokimia yang serupa dengan plastik *nondegradable* seperti polipropilen (PP) dan *low-density polyethylene* (LDPE) (Kourmentza and Kornaros, 2016).

II.2.1 Karakteristik PHA

PHA di kategorikan menjadi tiga kelompok berdasarkan panjang rantai karbon monomernya, yaitu PHA rantai pendek atau *short chain length* (scl-PHA), PHA rantai menengah atau *medium chain length* (mcl-PHA), dan PHA rantai panjang atau *long chain length* (lcl-PHA). Scl-PHA memiliki 2-5 atom karbon, mcl-PHA memiliki 6-14 atom karbon, dan lcl-PHA memiliki lebih dari 15 atom karbon. Struktur rantai karbon monomer ini akan menentukan sifat fisik dan kualitas dari PHA (Huang *et al.*, 2018)



Gambar 1. Struktur umum *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) (Akinmulewo and Nwinyi, 2019)

Tabel 1. Rantai samping alkil dan jenis *Polyhydroxyalkanoate*-nya

Alkyl side chain or 'R'	PHA polyester
-CH ₃	<i>Poly(3-hydroxybutanoate)</i> or PHB
-CH ₂ -CH ₃	<i>Poly(3-hydroxyvalerate)</i> or PHV
-(CH ₂) ₂ -CH ₃	<i>Poly(3-hydroxyhexanoate)</i> or PHHx
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	<i>Poly(3-hydroxyoctanoate)</i> or PHO
-(CH ₂) ₆ -CH ₃	<i>Poly(3-hydroxydecanoate)</i> or PHO

Sumber: Muneer *et al.* (2020)

PHA memiliki sifat fisik berupa tidak larut dalam air karena bersifat hidrofobik, termoplastik yang tidak beracun di alam, dan larut dalam pelarut organik. Sifat PHA bervariasi berdasarkan panjang rantainya dan gugus monomer dalam polimernya serta bergantung pada keberadaan homopolimer, heteropolimer atau struktur bercabang. Sebagian besar scl-PHA bersifat rapuh dan tidak ideal untuk pembuatan plastik, sedangkan mcl-PHA ideal untuk membuat bahan plastik dan kualitasnya dapat bervariasi tergantung pada sumber karbon yang diberikan kepada mikroorganisme. Sedangkan lcl-PHA adalah polimer elastis dan lebih cocok dalam pembuatan bahan karet. Variabilitas dalam sifat PHA sangat tergantung pada sumber karbon yang disediakan untuk mikroorganisme, metode ekstraksi, dan waktu pertumbuhan. Sifat kristalisasi tergantung pada suhu transisi gelas PHA yaitu sekitar 2°C. Titik lebur PHA berkisar antara 150°C hingga di atas 180°C yang terdegradasi menjadi asam krotonat dan oligomer lainnya sehingga bersifat non-volatil. Kekuatan tarik PHA yaitu antara 10 hingga 50 MPa (Murab *et al.*, 2021).

Tabel 2. Sifat fisik dari PHA

No	Properties of PHA	
1	<i>Glass transition temperature (T_g)</i>	2°C
2	<i>Crystalline degree (X_{cr})</i>	40-60%
3	<i>Elongation of break (ε)</i>	1-15%
4	<i>Melting temperature (T_m)</i>	160-175°C
5	<i>Young Modulus (E)</i>	1-2 GPa
6	<i>Tensile strength (σ)</i>	15.40 MPa
7	<i>Water Vapour Transition Rate (WVTR)</i>	2.36 g.mm/m ² .day
8	<i>Oxygen Transition Rate (OTR)</i>	55.2cc.mm/m ² .day
9	<i>Degradation temperature</i>	180°C
10	<i>Resistance to UV light</i>	Good

Sumber: Murab *et al.* (2021)

II.2.2 Bakteri Penghasil PHA

Sekitar 300 strain bakteri bakteri yang berbeda telah diidentifikasi dapat mengakumulasi PHA. Bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif, gram negatif, archea, *halophilic*, *halotolerant*, dan bakteri bintil akar (Rhizobia) (Tufail *et al.*, 2017). Beberapa jenis bakteri yang telah diidentifikasi dapat menghasilkan PHA, yaitu *Methylobacterium* sp., *Cupriavidus necator*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Azotobacter beijerinckii*, *Rhizobium* sp., *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter macrocytogene*, *Pseudomonas oleovorans*, dan *Protomonas extorquens*. Beberapa strain baru *Stenotrophomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Staphylococcus* sp., dan

Haloarchaea juga telah diidentifikasi dapat meningkatkan potensi produksi *Polyhydroxyalkanoate* (PHA) (Javaid *et al.*, 2020).

Tabel 3. Bakteri yang dapat menghasilkan PHA

Microorganisms	Carbon substrate and concentration (g/L)	PHA type and yields (%)
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14945	Glucose, 5 g/L Acetic acid, 5 g/L Butyric acid, 5g/L Caproic acid, 1,8-2 g/L a mixture of synthetic VFAs a mixture of VFAs from AD, 7 g/L	PHB 10% PHB 9% PHB 11,2% PHB 9,2% PHB 10% PHB 8,6%
<i>Bacillus cereus</i>	Glucose, 5 g/L	PHB 13,7%
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Glucose, 5 g/L	PHB 11,3%
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Glucose, 5 g/L	PHB & PHV, 38%
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 90	Propionic acid, 1,5 g/L	PHBV 33,7%
<i>Ralstonia eutropha</i>	Acetic acid, 5 g/L Butyric acid, 5 g/L	PHB 29,3% PHB 31,9%
<i>Cupriavidus necator</i>	Acetic acid, 15 g/L Butyric acid, 25 g/L	PHB 34% PHB 19%

Sumber: Vu *et al.* (2021)

Pada umumnya, PHA lebih banyak dihasilkan menggunakan bakteri gram negatif dibanding gram positif (Akinmulewo and Nwinyi, 2019). Diantara gram positif, *Bacillus* sp. diidentifikasi sebagai salah satu bakteri pertama yang mampu memproduksi PHA. Secara genetik dan biokimia, *Bacillus* sp. memiliki beberapa keuntungan seperti waktu generasi yang singkat, inang yang menarik untuk ekspresi gen, pertumbuhan yang mudah hingga kepadatan sel yang sangat tinggi, kemampuan untuk mentolerir suhu tinggi dan tekanan osmotik tinggi, serta mampu mensintesis berbagai jenis poliester yang terdiri dari berbagai jenis monomer tergantung pada kondisi fermentasi dan sumber karbon. *Bacillus* sp. adalah salah satu produsen PHA paling serbaguna dengan potensi biodegradasi yang besar (Damle and Vaidya, 2016). Selain itu, *Bacillus* sp. tidak memiliki

endotoksin lipopolisakarida (LPS) yang membuat tidak di perlukannya tahap pemurnian dalam produksi PHA sehingga dapat mengurangi biaya produksi (Cardozo *et al.*, 2020). *Bacillus* sp. juga memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim hidrolitik yang membantu hidrolisis substrat bernilai rendah yang lebih kompleks (Vu *et al.*, 2021)

Umumnya bakteri yang termasuk dalam genus *Bacillus* menghasilkan *Polyhydroxyalkanoate* rantai pendek seperti PHB (Pillai *et al.*, 2017). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. dapat menghasilkan PHA menggunakan media dengan sumber karbon umum seperti arabinosa, glukosa, gliserol, laktosa, dan sukrosa. Selain itu, pemberian VFA termasuk asam asetat, asam propionat, asam butirat, asam oktanoat pada tingkat tertentu juga dapat menghasilkan PHA (Vu *et al.*, 2021).

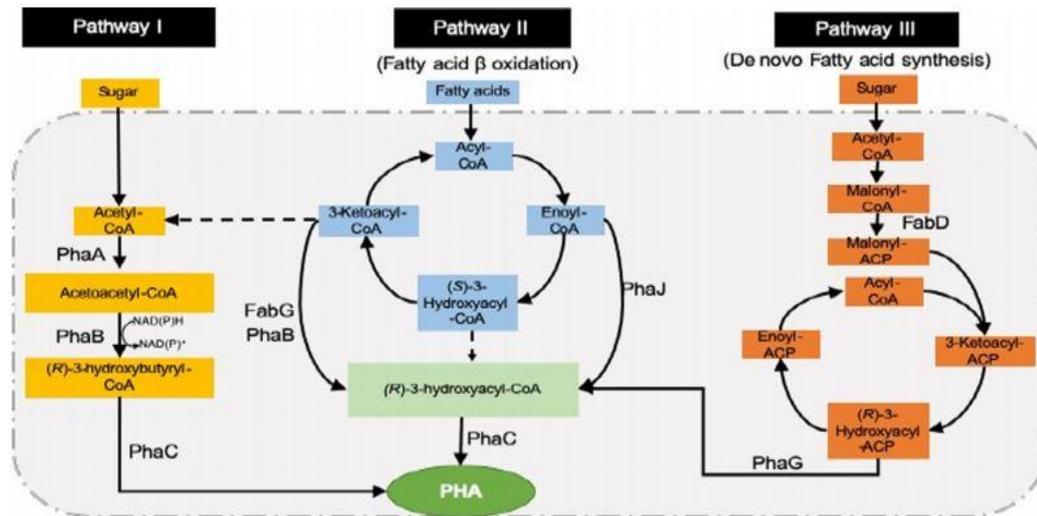
Salah satu jenis bakteri dari genus *Bacillus* yang telah diidentifikasi dapat menghasilkan PHA adalah *Bacillus flexus*. Berdasarkan Penelitian Khattab *et al.* (2021), *Bacillus flexus* dapat menghasilkan PHA dengan kadar PHA mencapai 20,96%. *Bacillus flexus* memiliki kemampuan untuk menghasilkan berbagai enzim hidrolitik-protease, amilase, dan lipase yang menunjukkan potensi untuk mengubah substrat kompleks menjadi metabolit sederhana sehingga dapat diserap untuk memproduksi PHB. Substrat kompleks ini dapat berupa sumber karbon alternatif seperti limbah pertanian dan sisa makanan yang kaya akan pati dan protein serta asam lemak dari triasilgliserol pertanian meliputi minyak nabati, lemak hewani, dan produk turunannya seperti minyak daur ulang. *Bacillus flexus* juga resisten terhadap antibiotik yaitu Cephalothin dan Ampisilin serta memiliki toleransi terhadap logam berat hingga 50 µg/mL kromium, 200 g/mL merkuri, 100 g/mL timbal dan 100 g/mL seng (Damle and Vaidya, 2016).

II.2.3 Mekanisme Pembentukan PHA

Ada tiga jalur utama dalam biosintesis PHA oleh bakteri. Jalur pertama merupakan jalur yang paling umum, pertama kali ditemukan pada *Cupriavidus necator*, dimana kondensasi dua molekul asetil-CoA yang diturunkan untuk metabolisme gula digunakan untuk menghasilkan monomer PHA rantai pendek. Pada jalur kedua, jalur oksidasi asam lemak menghasilkan substrat yang dapat dipolimerisasi menjadi PHA rantai menengah oleh *Pseudomonas oleovorans* dari berbagai alkana, alkena, dan alkanoat. Jalur ketiga monomer PHA dihasilkan dari gula sederhana seperti glukosa, sukrosa, dan fruktosa melalui asam lemak de novo (Tan *et al.*, 2019).

PHA disintesis melalui reaksi tiga enzim yang terdiri dari phaC sintase (PhaC), acetocetyl CoA 3-ketotiolase (PhaA), dan acetoacetyl CoA reductase (PhaB). Diantara ketiga enzim tersebut, PhaC sintase adalah enzim yang paling penting, karena bertanggung jawab untuk polimerisasi PHA. Berdasarkan sifat kinetik dan mekanisme katalitiknya, PhaC sintase diklasifikasikan menjadi empat kelas. Pengelompokan PhaC sintase ke dalam setiap kelas tergantung pada struktur PhaC itu sendiri atau dalam hubungannya dengan subunit lain dan spesifitas substrat. Kelas I, III, dan IV menghasilkan polimer panjang rantai pendek tergantung pada 3-hydroxypropionat (3HP), 3-hydroxy atau 4-hydroxy butyrate (3HB, 4HB), 3-hydroxyvalerate (3HV), dan 3-hydroxyhexanoate (3HH). Sedangkan kelas II menghasilkan polimer dengan panjang rantai sedang tergantung pada 3-hydroxyhexanoate (3HH), 3-hydroxyheptanoat (3HHp), 3-hydroxyoktanoat (3H2O), 3-hydroxydekanoat (3HD), 3-hydroxyundecanoat (3HUD), 3-hydroxydedocanoat (3HDD) (C6 hingga C12), dan ketersediaan yang

sesuai substrat tioester CoA, yang berasal dari tiga jalur metabolisme (Pradani *et al.*, 2020).



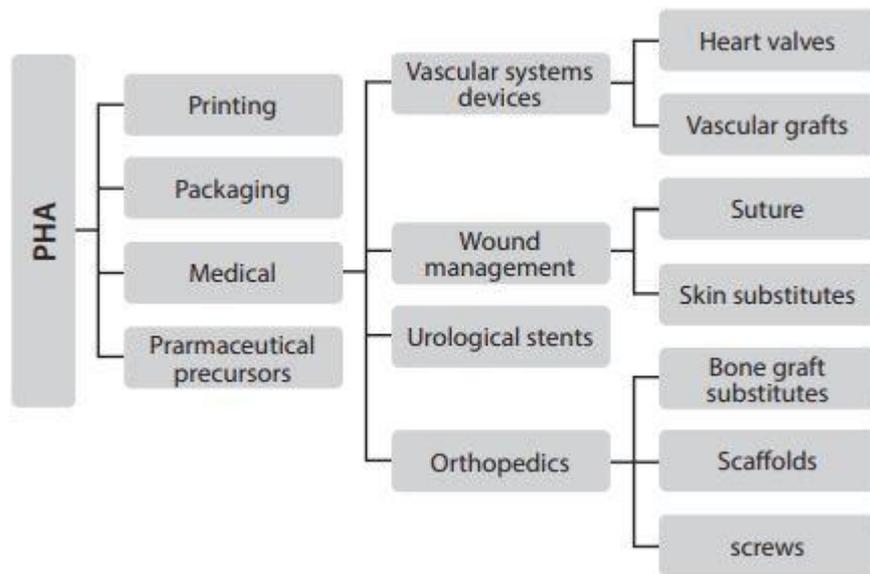
Gambar 2. Jalur metabolisme utama biosintesis PHA (Khatami *et al.*, 2021)

II.2.4 Aplikasi PHA sebagai Bioplastik

Pemanfaatan PHA telah diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti kimia, pertanian, perikanan, medis, dan farmasi. Dalam bidang kimia, PHA dimanfaatkan dalam pembuatan wadah kosmetik dan bahan baku cat lateks. Di bidang pertanian, digunakan sebagai pembawa untuk pelepasan herbisida atau insektisida jangka panjang. PHA juga meningkatkan omset di bidang pertanian karena menggunakan bahan limbah pertanian dalam produksi PHA. Di bidang perikanan, PHA digunakan sebagai penghasil serat ultra strong untuk alat penangkap ikan (Hendrawan *et al.*, 2020; Mozejko-Ciesielska and Kiewisz, 2016; Shah and Kumar, 2020). Di bidang medis, pemanfaatan PHA diantaranya digunakan dalam pembuatan produk kardiovaskular, sebagai tamban perikardial, perbesaran arteri, perbaikan defek septum atrium, cangkok pembuluh darah, dan pembuatan katup jantung. Sedangkan dalam bidang farmasi, digunakan sebagai pengantaran obat, pembuatan implan dan tablet, serta pemenuhan nutrisi manusia

dan hewan (Williams and Martin, 2014). PHA memiliki monomer utama berupa *R-3-hydroxybutyric* yang merupakan konstituen alami sehingga aman digunakan dalam bidang medis (Pakalapati *et al.*, 2018).

PHA juga banyak digunakan dalam pembuatan wadah makanan karena polimer ini bersifat lembam dan tidak beracun. Penggunaan PHA sebagai bahan kemasan makanan dapat mencegah kerusakan oksidatif produk karena bahan tersebut memiliki sifat penghalang yang baik. Kualitas bahan makanan yang dikemas menggunakan PHA relatif sama dengan yang dikemas menggunakan HDPE. Selain itu, karena memiliki sifat anti mikroba PHA digunakan untuk pembuatan film perekat dan perlengkapan bayi terkait kebersihan, termasuk popok (Keskin *et al.*, 2017; Shah and Kumar, 2020).



Gambar 3. Bagan alir dari aplikasi PHA sebagai bioplastik (Shah and Kumar, 2020).

II.3 Limbah Sawit Sebagai Sumber Karbon Bagi Bakteri Penghasil PHA

Industri minyak kelapa sawit merupakan industri yang menghasilkan minyak nabati yang paling banyak dikonsumsi di dunia. Selain itu, industri ini

juga menghasilkan sejumlah besar biomassa yang berpotensi digunakan untuk berbagai produk. Namun, seperti industri pada umumnya, industri kelapa sawit menghasilkan limbah yang memiliki nilai *chemical oxygen demand* (COD) dan *biological oxygen demand* (BOD) yang tinggi sehingga tidak dapat langsung ke lingkungan. Industri minyak sawit juga menghasilkan limbah lain seperti tandan kosong sawit, serat mesokarp, dan cangkang (Mumtaz *et al.*, 2010).

Limbah yang dihasilkan oleh industri kelapa sawit ini dapat digunakan sebagai sumber bahan organik mudah terdegradasi yang dapat dikonversi menjadi produk bernilai tambah seperti PHA. Fraksi minyak sawit seperti minyak inti sawit mentah atau *crude palm kernel oil* (CPKO) atau produk samping seperti *palm kernel acid oil* (PKAO) dan *palm acid oil* (PAO) serta minyak goreng bekas merupakan bahan baku yang secara kontinu dapat digunakan untuk produksi PHA (Mumtaz *et al.*, 2010; Sudesh *et al.*, 2011).

Penggunaan minyak sawit dapat menghasilkan PHA lebih tinggi karena kandungan karbon per gram minyak lebih tinggi dibandingkan gula. Limbah cair minyak sawit mengandung asam-asam lemak dan limbah padat minyak sawit mengandung selulosa yang dapat digunakan sebagai sumber gula pereduksi. Selain itu, pemanfaatan limbah minyak sawit sebagai sumber karbon bagi PHA dapat mengatasi kendala tingginya biaya produksi PHA (Hasibuan, 2020; Kresnawaty *et al.*, 2014).

II.4 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Kromatografi gas (GC) merupakan jenis kromatografi yang digunakan dalam kimia organik untuk pemisahan dan analisis. Kromatografi gas dapat digunakan untuk menguji kemurnian dari bahan tertentu. Selain itu, kromatografi

gas dapat digunakan untuk memisahkan berbagai komponen dari campuran. Sedangkan spektroskopi massa (*mass spectrometry*) berupa spektrum massa yang diperoleh dengan mengubah senyawa suatu sampel menjadi ion-ion yang bergerak cepat yang dipisahkan berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan. Spektroskopi massa mampu menghasilkan berkas ion dari suatu zat uji, memilah ion tersebut menjadi spektrum yang sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan dan merekam kelimpahan relatif tiap jenis ion yang ada. Kombinasi antara kromatografi gas dan spektrometri massa menghasilkan metode yang sangat bagus yang dikenal dengan GC-MS (Wahyudiono *et al.*, 2018).

GC-MS adalah teknik analisis kimia yang merupakan penggabungan dari pemisahan fisik menggunakan kromatografi gas dan deteksi massa molekul dengan spektrometri massa. Teknik ini memiliki spesifitas dan sensitivitas pengukuran yang sangat tinggi dibandingkan dengan teknik kimia analisis lainnya. GC-MS biasanya digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dari suatu sampel. Salah satu contoh penggunaan GC-MS yaitu memisahkan komponen senyawa-senyawa dari *polyhydroxyalkanoate* (Chadijah *et al.*, 2019)

II.4.1 Karakterisasi PHA Menggunakan GC-MS

Polyhydroxyalkanoat (PHA) memiliki sekitar 150 komponen monomer PHA yang berbeda berdasarkan panjang rantai karbon dan struktur perlekatannya. Variasi struktur dan komposisi kimia menyebabkan PHA memiliki karakteristik yang berbeda satu sama lain sehingga sebelum pengaplikasiannya diperlukan karakterisasi PHA terlebih dahulu (Vigneswari *et al.*, 2021). Karakterisasi PHA bertujuan untuk menentukan komposisi kimia dari senyawa PHA untuk mengevaluasi potensinya untuk penggunaan industri (Pagliano *et al.*, 2020).

Saat ini telah banyak metode yang digunakan dalam analisis PHA, salah satunya yaitu kromatografi gas-spektrometri massa atau *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS). GC-MS merupakan metode analisis yang paling banyak digunakan karena dapat menghasilkan informasi kualitatif dan kuantitatif tentang PHA. Selain itu, kromatografi gas (GC) yang digabungkan dengan spektrometer massa (GC-MS) memungkinkan PHA dapat diidentifikasi melalui perbandingan pola spektrum massa terhadap perpustakaan referensi standar NIST (*National Institute of Standards and Technology*) Gaithersburg, Maryland, USA (Tan *et al.*, 2014).

Analisis GC-MS dilakukan dengan membaca spektra yang terdapat pada kedua metode yang digabung tersebut (Wahyudiono *et al.*, 2018). Kuantifikasi GC-MS untuk senyawa hidrokarbon seperti PHA biasanya dilakukan melalui penghitungan faktor respon (RF) untuk setiap standar analitik PHA sedangkan identifikasi PHA dilakukan dengan membandingkan waktu retensi (RT) dari PHA diduga terhadap RT analisis standar. Nomor karbon (berat molekul) dari seri hidrokarbon homolog dan RF, serta antara jumlah karbon dan waktu retensi juga diketahui memiliki korelasi yang dapat membantu untuk memperkirakan RF dan RT dari homolog hidrokarbon lain yang standar analitisnya tidak tersedia (Tan *et al.*, 2014).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas kimia, gelas ukur, ose bulat, ose lurus, bunsen, tabung cuvet, pipet tetes, sendok tanduk, rak tabung, spoit, timbangan analitik (OHAUS), *laminar air flow*, inkubator (Heraeus), *shaker* (HEALTH), hot plate, otoklaf (American), oven (Heraeus), sentrifuse (Hettich), neraca analitik (OHAUS), dan spektrofotometer UV-Vis (Thermo).

III.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Bacillus* sp. strain CL33 dan *Bacillus flexus* strain S5a, medium Nutrient Agar (NA), media minimal Ramsay ((NH₄)₂SO₄, Na₂HPO₄.7H₂O, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, ferrous ammonium citrate, CaCl₂.2H₂O, trace element), media Plate Count Agar (PCA), glukosa, minyak sawit, sodium hypochlorite, aseton p.a, dietil eter p.a, cloroform p.a, H₂SO₄ p.a pekat, kertas saring, spiritus, akuades, kapas, alkohol, kain kasa, clingwarp, label, dan aluminium foil.

III.3 Metode Kerja

III.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Peralatan yang terbuat dari bahan kaca atau gelas di sterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Sedangkan peralatan lainnya yang tidak tahan panas beserta media pertumbuhan disterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.