

Karakterisasi PHA yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media limbah cair pabrik kelapa sawit

Characterization of PHA produced by Pseudomonas aeruginosa and Bacillus subtilis inoculated in palm oil mill effluent (POME) media

Irma KRESNAWATY^{*}), Agustin Sri MULYATNI, Deden Dewantara ERIS & Haryo Tejo PRAKOSO

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor 16128 Indonesia

Diterima tanggal 25 Agustus 2014/disetujui tanggal 3 November 2014

Abstract

The difficulties in processing of petroleum-based plastic waste had encouraged the development of biodegradable plastics polyhydroxyalkanoate (PHA). Researchers isolated the PHA-producing microorganisms from various sources to obtain new species with high PHA production capability. In addition, the high cost of PHA production might be overcome by using carbon-rich waste, such as palm oil mill effluent (POME). This research conducted characterization of produced PHA and optimization of PHA production in POME. In previous research, three potential isolates were obtained, which are one *Pseudomonas aeruginosa* isolate and two *Bacillus subtilis* isolates. Analysis of Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) showed the presence of PHA accumulation within the bacterial cell. The results of Spectra of Fourier Transform Infra Red Spectroscopy (FT-IR) revealed differences in C-C and C-H aliphatic regions of PHA produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. Optimum production of PHA was obtained using POME at concentration of 50-25% during 6 days of incubation time in an enriched media pretreatment.

[Keywords: Bioplastic, polyhydroxyalkanoate, waste treatment]

Abstrak

Sulitnya pengolahan limbah plastik berbasis minyak bumi mendorong pengembangan plastik biodegradable polihidroksialkanoat (PHA). Beberapa peneliti mengisolasi mikroorganisme penghasil PHA dari berbagai sumber karena diharapkan akan diperoleh spesies baru dengan kemampuan produksi PHA yang tinggi. Selain itu kendala tingginya biaya produksi PHA dapat diatasi dengan pemanfaatan limbah yang kaya akan karbon, seperti limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS). Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi PHA yang dihasilkan dan optimasi produksi PHA pada LCPKS. Pada penelitian sebelumnya telah diperoleh tiga isolat potensial, yaitu : satu isolat *Pseudomonas aeruginosa* dan dua isolat *Bacillus subtilis*. Analisis Scanning Electron Microscopy (SEM) dan Transmission Electron Microscopy (TEM) menunjukkan adanya akumulasi PHA di dalam sel bakteri. Dari hasil analisis FT-IR disimpulkan bahwa senyawa PHA yang dihasilkan *Pseudomonas aeruginosa* berbeda dengan *Bacillus subtilis* yang ditandai perbedaan pada spectra gugus C-C dan C-H alifatik. Produksi optimum PHA diperoleh pada konsentrasi

LCPKS 50-25%, waktu inkubasi enam hari dan optimisasi pertumbuhan pada media kaya di awal untuk meningkatkan populasi mikroba.

[Kata kunci : Bioplastic, polihidroksi alkanoat, penanganan limbah]

Pendahuluan

Saat ini, salah satu masalah terbesar negara berkembang seperti Indonesia adalah pengelolaan limbah plastik berbasis minyak bumi. Sulitnya pengolahan limbah plastik ini mendorong pengembangan plastik biodegradable polihidroksialkanoat (PHA). PHA merupakan senyawa biodegradable dan secara alami diakumulasi oleh beberapa bakteri seperti *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Cupriavidus* dan beberapa spesies bakteri fotosintetik dalam kondisi kekurangan nutrisi (Reddy *et al.*, 2003; Sangkharak & Prasertsan, 2007). PHA terdiri dari senyawa biopoliester dengan struktur yang sangat beragam. Beberapa peneliti mengisolasi mikroorganisme penghasil PHA dari berbagai sumber karena diharapkan akan memperoleh spesies baru dengan kemampuan produksi PHA yang tinggi (Singh & Parmar, 2011). Wu *et al.* (2000) memperoleh data bahwa PHA dapat disintesis oleh lebih dari 30% bakteri tanah lumpur aktif, bakteri dasar laut dan bakteri yang hidup di kondisi lingkungan ekstrim lainnya.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan penapisan beberapa isolat bakteri yang berasal dari tempat pembuangan sampah akhir (TPA) dan limbah cair kelapa sawit (LCPKS), dan diperoleh tiga isolat potensial, yaitu: satu isolat *Pseudomonas aeruginosa* dan dua isolat *Bacillus subtilis*. Identifikasi spesies mikroba potensial penghasil PHA merupakan hal yang penting karena setiap bakteri memiliki jalur biosintesis yang spesifik dan memerlukan kondisi optimum tertentu. Jika dibandingkan jalur sintesis PHA pada masing-masing spesies ini, pada *P. aeruginosa*, PHA disintesis dari asetil-CoA melalui sintesis asam lemak (Jalur II). (Valentin *et al.*, 2000). Selain itu juga diketahui bahwa *P. aeruginosa* tidak ber-

^{*}) Penulis Korespondensi: irma.kresnawaty@ yahoo.com

gantung kepada kondisi nutrisi terbatas untuk memproduksi PHA karena bakteri jenis ini memproduksi PHA selama proses pertumbuhan sel (Fernandez *et al.*, 2005).

Faktor pembatas yang kerap dijumpai dalam memproduksi PHA dari bakteri adalah ongkos produksi yang mahal, hampir lima kali lipat ongkos produksi plastik secara konvensional (Kim, 2000). Mahalnya ongkos produksi terkait erat dengan penggunaan sumber karbon. Untuk itu, sumber karbon alternatif dengan harga relatif murah mutlak diperlukan (Cramm, 2009). Salah satu sumber karbon alternatif yang tersedia banyak di Indonesia adalah limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS), mengingat Indonesia adalah produsen minyak sawit nomor satu di dunia (Lubis 2008). LCPKS merupakan limbah yang berasal dari proses ekstraksi minyak tandan buah segar pada pabrik kelapa sawit. Limbah ini mempunyai kadar BOD yang tinggi (sekitar 20.000 ppm) dan kadar nitrogen yang rendah (kurang dari 200 ppm dalam bentuk nitrogen amoniak dan kurang dari 500 ppm dalam bentuk total nitrogen). Dengan karakteristik tersebut, LCPKS merupakan substrat yang tepat untuk produksi PHA. Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi PHA yang dihasilkan oleh tiga isolat terseleksi dan melakukan optimasi produksi PHA pada limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS).

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah cair kelapa sawit (LCPKS), NaCl, nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), glukosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, asam sitrat, NaOCl, bufer fosfat, dietil eter, dan H_2SO_4 .

Pengamatan mikroskopis PHA yang dihasilkan oleh bakteri

Pengamatan dilakukan menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM) di Pusat Penelitian Zoologi LIPI, Cibinong dan *Transmission electron microscopy* (TEM) di Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Karakterisasi PHA menggunakan FT-IR

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui jenis PHA yang dihasilkan menggunakan Fourier Transform Infra Red (FT-IR) di Pusat Penelitian Karet, Bogor.

Optimasi produksi PHA menggunakan variasi konsentrasi media LCPKS, waktu inkubasi dan optimalisasi pertumbuhan

Isolat dipre-kulturkan terlebih dahulu pada 100 mL NB yang kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Inokulum bakteri yang telah dipersiapkan, diambil sebanyak 5 mL kemudian ditumbuhkan pada 250 mL variasi

konsentrasi LCPKS, yaitu 100; 50 dan 25% dan diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 72 jam pada suhu 30°C. Selain itu dilakukan variasi waktu inkubasi menjadi lima dan enam hari dengan konsentrasi 15 dan 25%.

Untuk mengoptimalkan produksi PHA, sel bakteri ditumbuhkan pada media kaya untuk mengoptimalkan pertumbuhan sel selama 3 hari, kemudian diinkubasi pada media LCPKS untuk menginduksi produksi PHA.

Kuantifikasi PHA

Kultur bakteri yang telah diinkubasi selama 72 jam, disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit, setelah itu supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk disuspensikan dengan 5 mL akuades. Suspensi sel diambil 1 mL untuk analisis kadar PHB dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 235 nm dan 1 mL suspensi sel diambil untuk mengukur berat kering massa sel.

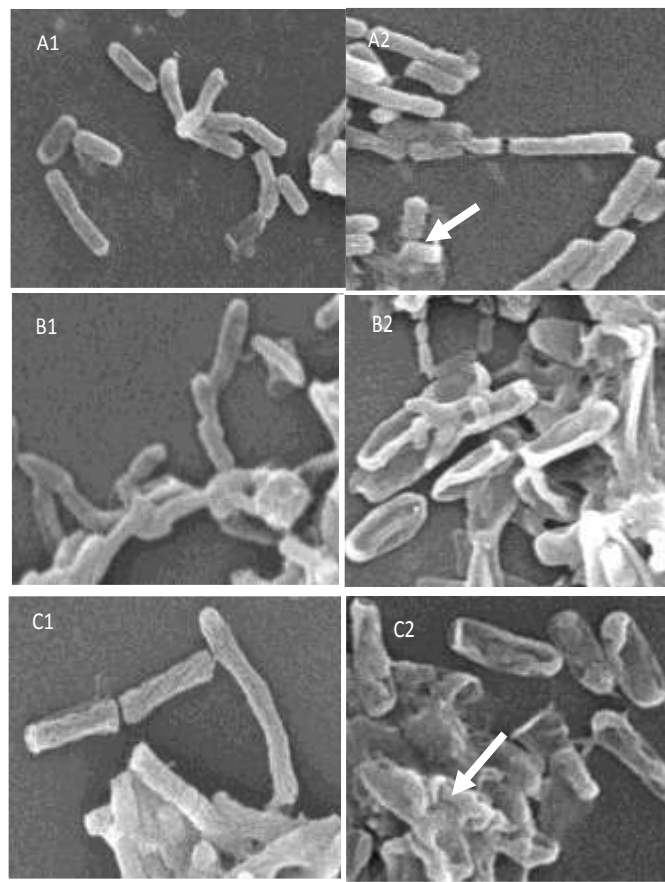
Aluminium foil dibuat seperti botol, lalu dikeringkan pada suhu 70°C selama 24 jam. Berat kering aluminium foil ditimbang hingga berat konstan, lalu ditambahkan 1 mL suspensi sel. Aluminium foil berisi 1 mL suspensi sel dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 70°C selama 24 jam, kemudian aluminium foil berisi suspensi sel yang telah dikeringkan ditimbang hingga berat konstan lalu berat kering massa sel dihitung.

Kemudian ke dalam suspensi sel ditambahkan 3 mL bufer fosfat pH 7,0 dan 1 mL NaOCl 5 %, dan diinkubasi pada suhu 25 °C dengan kecepatan 180 rpm selama 24 jam. Sisa pelet dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 4.000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian disentrifugasi kembali sebanyak tiga kali pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit dengan pelarut masing-masing, yaitu: 5 mL aquades, 3 mL aseton dan 3 mL eter. Supernatan dibuang dan pelet dicuci secara perlahan dengan 3 mL dietil eter dan didiamkan selama lima menit, kemudian eter dibuang. Setelah pelet kering ditambahkan 3 mL H_2SO_4 pekat, dan dipanaskan dalam *water bath* dengan suhu 100 °C selama 10 menit. Kadar PHA dideterminasi menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 235 nm dengan pelarut H_2SO_4 pekat.

Hasil dan Pembahasan

Pengamatan mikroskopis PHA yang dihasilkan oleh bakteri

Hasil *Scanning Electron Microscope* (SEM) (Gambar 1) menunjukkan bahwa isolat-isolat perlakuan yang ditumbuhkan pada media Ramsay (kaya C dan miskin N dan P) mengakumulasi PHA (ditandai dengan tanda panah), sementara pada kontrol tidak ditemukan adanya akumulasi PHA. Isolat *Pseudomonas aeruginosa* mengakumulasi PHA lebih banyak dibandingkan isolat *Bacillus subtilis*. Hal yang sama juga disimpulkan pada penelitian



Gambar 1. Hasil Scanning Electron Microscope (SEM) dengan perbesaran 5.000 kali untuk masing-masing perlakuan : A1) Kontrol *Bacillus subtilis* SO5, A2) Produksi PHA *Bacillus subtilis* SO5, B1) Kontrol *Pseudomonas aeruginosa* DO9, B2) Produksi PHA *Pseudomonas aeruginosa* DO9, C1) Kontrol *Bacillus subtilis* DO2, dan C2) Produksi PHA *Bacillus subtilis* DO2.

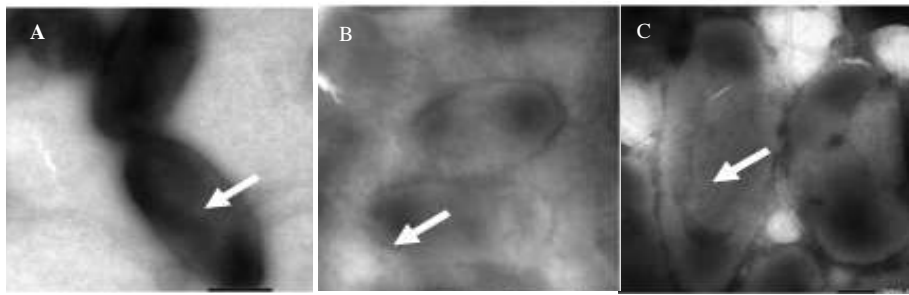
Figure 1. Scanning Electron Microscope (SEM) result with 5,000 times magnification respectively : A1) Control of *Bacillus subtilis* SO5, A2) *Bacillus subtilis* SO5 PHA production, B1) Control of *Pseudomonas aeruginosa* DO9, B2) *Pseudomonas aeruginosa* DO9 PHA production, C1) Control of *Bacillus subtilis* DO2, and C2) *Bacillus subtilis* DO2 PHA production.

Sangkharak & Prasertsan (2012) dimana isolat koleksi *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan PHA hampir dua kali lipat yang dihasilkan *Bacillus subtilis*. Pada hasil SEM terlihat bahwa PHA membentuk granul amorf bahkan kadang granul spherical yang terakumulasi di dalam sel dan mendorong sel untuk lebih membesar.

Selain SEM, dilakukan pengamatan *Transmission electron microscopy* (TEM) dengan tujuan mengamati ukuran PHA yang dihasilkan. Pengamatan TEM (Gambar 2) menghasilkan pengamatan yang kurang jelas dikarenakan populasi sel yang tinggi dan karena ditumbuhkan pada media LCPKS yang berwarna hitam. Selain itu, kemungkinan kondisi sel bakteri yang tidak lagi sempurna, bahkan diduga telah mengalami lisis. Komponen yang diduga PHA telah dieksresikan dari sel bakteri yang mengalami lisis (Gambar 3). Dari hasil TEM, isolat *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan akumulasi PHA yang lebih tinggi dibandingkan yang lain dengan ukuran PHA diasumsi mencapai 200-1000 nm.

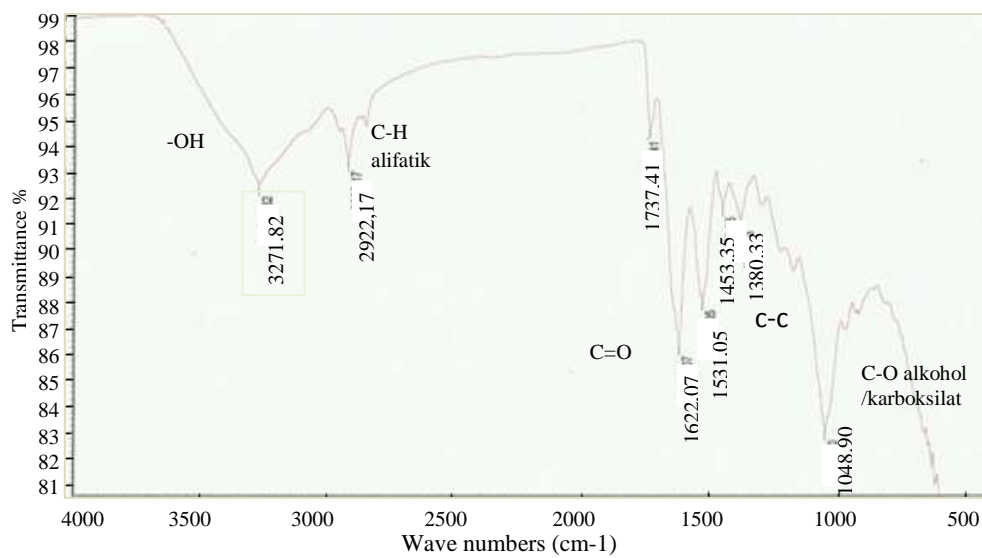
Karakterisasi PHA menggunakan FT-IR

Analisis FT-IR dari PHA yang dihasilkan menunjukkan masing-masing spesies ini memproduksi PHA yang berbeda. Hasil analisis FT-IR PHA *Bacillus subtilis* menunjukkan adanya pita gugus C-H (daerah 2922 nm) dan C-C (daerah 1380, 1453 dan 1531 nm) lebih dominan dibanding *Pseudomonas aeruginosa* (Gambar 3, 4 dan 5). Hasil penelitian Sangkharak & Prasertsan (2012) menunjukkan bahwa dengan sumber karbon LCPKS, *Bacillus subtilis* menghasilkan kadar polihidroksi valerat lebih tinggi dibandingkan *Pseudomonas* sp. Diasumsikan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* juga lebih banyak menghasilkan polihidroksi butirat dibanding polihidroksi valerat dan polihidroksi heksanoat. Hal ini mendukung hasil penelitian Thirumala *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa *Bacillus* sp. memiliki kemampuan yang besar dalam menghasilkan PHA jenis baru dengan rentang komposisi monomer yang besar karena kemampuannya untuk menggabungkan rantai



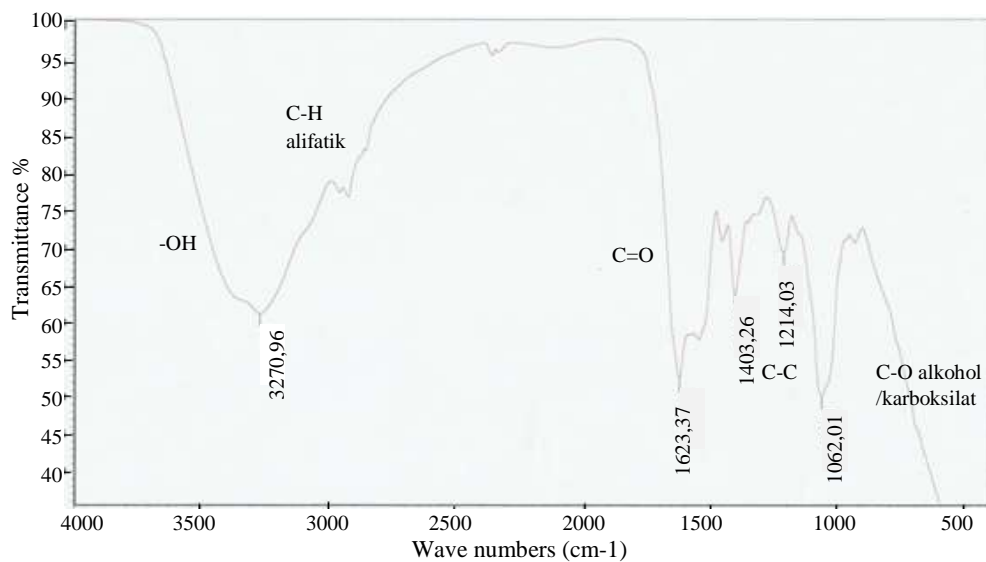
Gambar 2. Hasil *Transmission electron microscopy* (TEM) mikroba penghasil PHA. A). *Bacillus subtilis* D02, B). *Bacillus subtilis* SO5 dan C). *Pseudomonas aeruginosa* TH09.

Figure 2. *Transmission electron microscopy* (TEM) results of PHA producing bacterias. A). *Bacillus subtilis* D02, B). *Bacillus subtilis* SO5, and C). *Pseudomonas aeruginosa* TH09.



Gambar 3. Hasil analisis FT-IR PHA yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* DO2.

Figure 3. *FT-IR* analysis of PHA produced by *Bacillus subtilis* DO2.



Gambar 4. Hasil analisis FT-IR PHA yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* SO5

Figure 4. *FT-IR* analysis of PHA produced by *Bacillus subtilis* SO5.

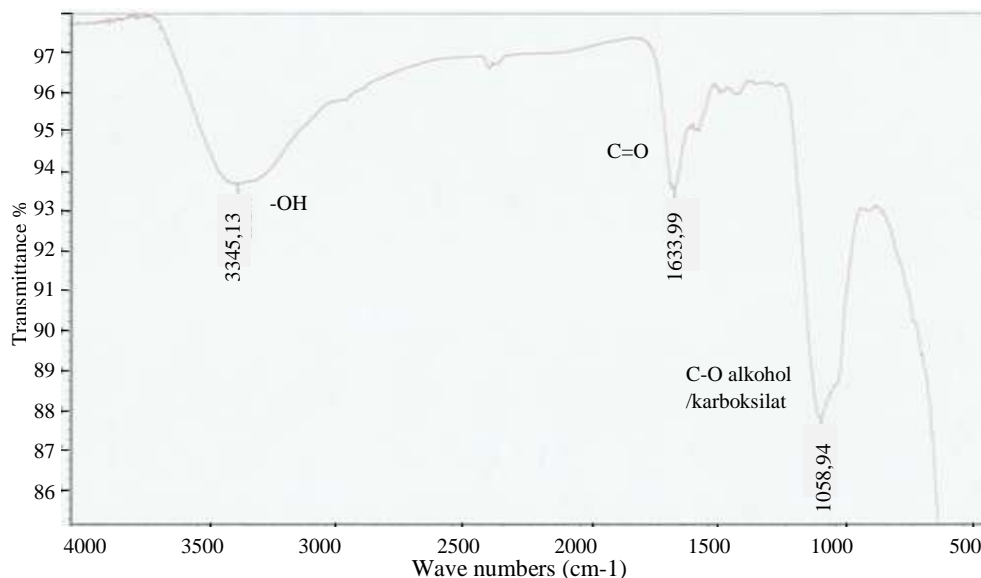
pendek (*short chain length /scl*) dan rantai menengah (*medium chain length /mcl*). Jika dibandingkan pada dua strain *Bacillus subtilis*, terlihat bahwa pita gugus O-H lebih dominan pada *Bacillus subtilis* SO5 (Gambar 3 dan 4). Hal ini dapat dikarenakan gugus O-H yang lebih banyak pada senyawa PHA strain *Bacillus subtilis* SO5, yang secara tidak langsung juga menunjukkan rantai polimer yang lebih panjang.

Optimasi produksi PHA menggunakan variasi konsentrasi media LCPKS, waktu inkubasi dan optimalisasi pertumbuhan

LCPKS mengandung banyak senyawa organik dan mineral an-organik. Limbah ini mengandung karbohidrat dan gula dalam jumlah tinggi, sedangkan nitrogen sangat rendah sehingga tepat sebagai media mikroba penghasil PHA. Hasil produksi PHA di LCPKS menunjukkan bahwa konsentrasi LCPKS 100 dan 50% menghasilkan PHA dalam jumlah yang relatif sama. Hasil tersebut berkesesuaian dengan penelitian Tamboli *et al* (2010) yang menumbuhkan *Sphingobacterium* sp di media molases dan pada konsentrasi tertentu, kadar PHA yang dihasilkan konstan walaupun konsentrasi molases ditambah sehingga diduga berkaitan dengan rasio jumlah substrat maksimal terhadap enzim. Penurunan kadar LCPKS menjadi 25% menurunkan produksi PHA sebesar 59-76% (Tabel 1). Jika dibandingkan produksi PHA pada LCPKS dengan media Ramsay, media LCPKS menyebabkan penurunan produksi PHA. Hal ini dapat disebabkan kandungan karbon yang umumnya berupa asam lemak pada LCPKS yang agak sulit untuk langsung digunakan bakteri untuk menghasilkan PHA. Karena itu diperlukan perlakuan anerobik dimana akan terjadi proses hidrolisis dan acidogenesis untuk menghasilkan asam lemak rantai pendek volatile (*volatile fatty acid/*

VFA), seperti asam asetat, asam butirat, asam valerat dan asam kaproat yang lebih mudah dikonversi menjadi PHA (Bengtsson *et al.*, 2009). Di samping itu, produksi PHA yang masih rendah ini dapat dikarenakan kandungan karbon LCPKS yang digunakan saat itu relative lebih rendah, yaitu 1,09% (sementara kadar nitrogen sama 0,075%) jika dibandingkan LCPKS normal mengandung karbon lebih dari 5% (Ahmad *et al.*, 2003). Penurunan kadar karbon ini dapat dikarenakan proses konversi okidatif dan fermentatif senyawa karbon oleh bakteri-bakteri indigenous menjadi CO₂ dan CH₄ yang lepas ke udara.

Selain karena faktor perlunya perlakuan awal limbah sebelum digunakan sebagai media produksi PHA, waktu inkubasi juga memegang peranan penting untuk optimasi produksi PHA. Dengan penambahan waktu inkubasi menjadi 5 hari, produksi PHA meningkat menjadi 1,0456% dan mencapai 1,5305% pada hari ke-6 (Tabel 2). Hal ini dapat dikarenakan mikroba tersebut memerlukan waktu adaptasi dengan media LCPKS yang memiliki karakteristik berbeda dengan media Ramsay yang sebelumnya digunakan. Di samping waktu inkubasi, dilakukan juga perlakuan optimasi pertumbuhan mikroba sebelum dikulturkan dalam media LCPKS. Seperti diketahui, proses produksi PHA melibatkan berbagai enzim yang umumnya terdiri dari unsur N, P dan S, sehingga defisiensi unsur ini pada awal pertumbuhan akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim-enzim tersebut. Sehingga optimalisasi pertumbuhan mikroba pada media kaya (*nutrient broth*) diharapkan akan memaksimalkan pertumbuhan mikroba dan produksi enzim-enzim yang terlibat dalam sintesis PHA, sehingga nantinya akan memaksimalkan juga produksi PHA pada saat dikulturkan pada media miskin nutrisi (kecuali karbon).



Gambar 5. Hasil analisis FT-IR PHA yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* DO9.
 Figure 5. FT-IR analysis of PHA produced by *Pseudomonas aeruginosa* DO9.

Tabel 1. Jumlah PHA yang dihasilkan pada variasi konsentrasi LCPKS.
 Table 1. PHA quantity that produced in variation concentration of POME.

No	Strain Bakteri <i>Bacteria strains</i>	Kadar PHA (% PHA / berat kering massa sel) <i>PHA quantity (% PHA/dry weight of cell mass)</i>		
		LCPKS (POME) 100%	LCPKS (POME) 50%	LCPKS (POME) 25%
1	<i>P. aeruginosa</i> DO9	0,3071	0,3913	0,1282
2	<i>Bacillus subtilis</i> DO2	0,3407	0,6128	0,1565
3	<i>Bacillus subtilis</i> SO5	0,3461	0,3076	0,1934

Tabel 2. Jumlah PHA yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* DO9 pada variasi konsentrasi LCPKS dan waktu inkubasi.
 Table 2. PHA quantity that produced by *Pseudomonas aeruginosa* DO9 in variation of concentration of POME and variation of incubation time.

No	Persentase LCPKS <i>POME percentage</i> (%)	Kadar PHA (% PHA/berat kering massa sel) <i>PHA quantity (% PHA/dry weight of cell mass)</i>	
		5 hari/days	6 hari/days
1	15	0,5115	1,0327
2	25	1,0456	1,5305

Tabel 3. Jumlah PHA yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* DO9 pada variasi konsentrasi LCPKS dengan perlakuan awal ditumbuhkan di media kaya (*nutrient broth*) selama tiga hari.

Table 3. PHA quantity that produced by *Pseudomonas aeruginosa* DO9 in variation concentration of POME with pre treatment which was incubated in rich nutrient (*nutrient broth*) for three days.

Persentase LCPKS <i>POME percentage</i> (%)	Kadar PHA (% PHA / berat kering massa sel) <i>PHA quantity (% PHA/dry weight of cell mass)</i>
20	0,764
30	0,767
40	0,775

Optimalisasi pertumbuhan terlebih dahulu (Tabel 3) menghasilkan produksi PHA yang lebih tinggi dibanding tanpa optimalisasi pertumbuhan (Tabel 1). Hal ini dikarenakan sel telah memiliki semua kebutuhan pokoknya (*building block cell*) untuk tumbuh dari media kaya (*nutrient broth*), dan menjadi dapat focus untuk menghasilkan PHA tanpa harus menyusun komponen sel yang penting lainnya. Jumlah produksi PHA yang tidak berbeda jauh dengan variasi konsentrasi LCPKS, dapat dikarenakan kerja enzim yang berperan dalam proses biosintesis PHA memiliki batas maksimal jumlah substrat. Sehingga seberapa banyakpun substrat yang ditambahkan, kadar PHA yang dihasilkan relatif sama. Untuk mendapatkan produksi PHA yang optimum masih perlu dilakukan lagi optimasi beberapa parameter di antaranya : pH, perlakuan awal fermentasi anaerobik, variasi kondisi LCPKS, aerasi dan optimalisasi ekstraksi PHA.

Kesimpulan dan Saran

Analisis SEM dan TEM menunjukkan adanya akumulasi PHA di dalam sel bakteri. Dari hasil analisis FT-IR disimpulkan bahwa senyawa PHA

yang dihasilkan *Pseudomonas aeruginosa* berbeda dengan *Bacillus subtilis* yang ditandai perbedaan pada spektra gugus C-C dan C-H alifatik. Produksi optimum PHA diperoleh pada konsentrasi 50-25%, waktu inkubasi 6 hari dan optimalisasi pertumbuhan pada media kaya di awal untuk meningkatkan populasi mikroba. Untuk mendapatkan data kondisi optimum produksi PHA, masih perlu dilakukan beberapa pengujian lagi, di antaranya variasi pH, fermentasi anaerobik, kondisi LCPKS, aerasi dan kecocokan bakteri yang digunakan, serta optimalisasi ekstraksi PHA.

Daftar Pustaka

- Ahmad AL, S Ismail & S Bhatia (2003). Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. *Desalination*, 157, 87-95.
- Bengtsson S (2009). The utilization of glycogen accumulating organisms for mixed culture production of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng* 104, 698-708.
- Cramm R (2009). Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16, 38-52.

- Fernandez D, E Rodríguez, M Bassas, M Viñas, AM Solanas, J Llorens, AM Marqués & A Manresa. (2005). Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochem Engin J* 26, 159–167.
- Kim BS (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb Technol* 27, 774-777.
- Lubis AU (2008). *Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.) di Indonesia*. Edisi 2. Medan, Pusat Penelitian Perkebunan Marihat. 348p.
- Reddy CSK., R Ghai, R Rasmi & VC Kalia (2003). Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresour Technol* 87, 137- 146.
- Sangkharak K & P Prasertsan (2007). Optimization of polyhydroxybutyrate production from wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *J Biotechnol* 132, 331- 340.
- Sangkharak K & P Prasertsan (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *J Gen Appl Microbiol* 58, 173-182.
- Tamboli DP, MB Kurade, TR Waghmode, SM Joshi, SP Govindwar & J Hazard Mater (2010). Exploring the ability of *Sphingo-bacterium* sp. ATM to degrade textile dye Direct Blue GLL, mixture of dyes and textile effluent and production of polyhydroxy-hexadecanoic acid using waste biomass generated after dye degradation. *J Harvard Matter* 182, 169-76.
- Thirumala M, SV Reddy & K Mahmood (2010). Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* spp. isolated from soil and activated sludge. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37, 271–278.
- Wu Q, SQ Sun, PHF Yu, AXZ Chen & GQ Chen (2000). Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates. *Acta Polym Sin* 6, 751–756
- Valentin HE, T A Mitsy, DA Mahadeo, M Tran & KJ Gruys (2000). Application of a propionyl coenzyme a synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environment Microbiol*, 253–258