

OPTIMASI PRODUKSI, KARAKTERISISASI, APLIKASI DAN PENGUJIAN BIODEGRADASI BIOPLASTIK YANG DIHASILKAN OLEH RALSTONIA EUTROPHA PADA SUBSTRAT HIDROLISAT MINYAK SAWIT

Khaswar Syamsu¹⁾

Ani Suryani²⁾, Anas M. Fauzi²⁾, Bagus W.D. Wicaksono²⁾

Sejalan dengan meningkatnya kepedulian akan kualitas lingkungan, maka perlu dicari bahan baku plastik alternatif yang kompatibel dan dapat didegradasi secara biologis. *Poly-β-Hydroxyalkanoates* (PHA) merupakan salah satu alternatif disamping beberapa tipe plastik yang dapat didegradasi secara biologis lainnya seperti *polylactate* (PLA) dan *polyvinylacetate* (PVA).

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah untuk menghasilkan poliester mikrobial sebagai bahan baku yang relatif ramah lingkungan untuk berbagai aplikasi. Target khususnya adalah (1) mendapatkan formulasi media dan kondisi optimum proses kultivasi *Ralstonia eutropha* pada media berbasis minyak sawit sebagai sumber karbon dan (2) mendapatkan informasi mengenai karakteristik dasar dan olahan poliester hasil kultivasi *Ralstonia eutropha* sebagai bahan baku produk-produk polimer yang dapat didegradasi secara biologis. Strain bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ralstonia eutropha* IAM 12368, yang diperoleh dari *IAM Culture Collection, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo*.

Sumber karbon sebagai substrat kultivasi adalah hidrolisat dan sabun minyak sawit. Hidrolisat minyak sawit dipersiapkan melalui proses hidrolisis secara enzimatis menggunakan lipase-OF dari *Candida cylindracea* produksi Meito Sangyo Japan. Hasil analisis menggunakan kromatografi gas menunjukkan bahwa hidrolisat tersebut mengandung asam kaprat (0.02%), asam laurat (0.17%), asam miristat (1.14%), asam palmitat (41.93%), asam palmitoleat (0.16%), asam stearat (4.01%), asam oleat (40.15%), asam linoleat (11.98%), asam linolenat (0.15%), dan asam arachidat (0.29%). Sedangkan sabun minyak sawit mengandung komponen laurat (0.15%), miristat (1.07%), palmitat (47.44%), stearat (5.20%), oleat (35.92%) dan linoleat (10.22%).

Kajian optimasi media kultivasi *Ralstonia eutropha* Tahap I yang didesain menggunakan rancangan kelompok berfaktor yang dimodifikasi dilakukan untuk menentukan : (a) Jenis substrat berbasis minyak sawit, (b) Konsentrasi karbon dan (c) Rasio C/N yang sesuai bagi pertumbuhan *Ralstonia eutropha* dan akumulasi biopolimer. Dua jenis substrat dicobakan yakni hidrolisat minyak sawit dan sabun minyak sawit. Tiga taraf konsentrasi yang diujikan adalah 10 g/L, 20 g/L dan 30 g/L. Empat taraf rasio C/N yang diujikan adalah 10:1; 50:1; 100:1; dan 200:1.

Bobot kering biomassa tertinggi (18.00 g/L) diperoleh menggunakan substrat hidrolisat minyak sawit dengan konsentrasi 30 g karbon/L dan rasio C/N sebesar 10:1. Pada substrat sabun minyak sawit, perlakuan konsentrat karbon 30 g/L memberikan produksi biopolimer tertinggi pada rasio C/N 100:1, sedangkan pada ketiga taraf rasio C/N lainnya memberikan respon yang relatif sama.

^{1)Ketua Peneliti (Staf Pengajar Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fateta-IPB); ^{2)Anggota Peneliti}}

Terdapat indikasi bahwa konsentrasi karbon yang relatif tinggi cenderung menghasilkan biopolimer yang relatif lebih tinggi, sedangkan pengaruh rasio C/N bergantung pada jenis substrat. Dapat disimpulkan bahwa konsentrasi karbon yang tinggi dan rasio C/N yang relatif rendah akan menghasilkan bobot biomassa yang relatif tinggi, namun akumulasi biopolimer yang tinggi akan dihasilkan pada konsentrasi karbon yang relatif tinggi dan rasio C/N yang bergantung pada jenis substrat.

Pengujian nilai tengah perlakuan menunjukkan bahwa : (a) pada substrat hidrolisat minyak sawit, perolehan biopolimer tertinggi (7.1553 g/L) dihasilkan pada konsentrasi 30 g karbon/L dan rasio C/N 10 : 1; (b) pada substrat sabun minyak sawit, perolehan biopolimer tertinggi (8.2200 g/L) dihasilkan pada konsentrasi 30 g karbon/L dan rasio C/N 100 : 1.

Perolehan biopolimer tertinggi pada substrat hidrolisat minyak sawit sejalan dengan perolehan biomassa tertinggi, yakni pada konsentrasi karbon sebesar 30 g/l dan rasio C/N 10:1. Namun demikian presentase biopolimer tertinggi dalam sel (rendemen) dihasilkan pada konsentrasi karbon 30 g/l dan rasio C/N 50:1 yaitu 74.29% dan terendah pada konsentrasi karbon 10 g/l dan rasio C/N 200:1 yaitu 2.86%. Hal ini menegaskan bahwa pembentukan biomassa dan biopolimer berlangsung dalam waktu yang berlainan.

Pertumbuhan sel atau biomassa optimal berlangsung pada kondisi nutrisi (karbon dan nitrogen) yang seimbang, sedangkan pembentukan biopolimer distimulasi oleh ketidakseimbangan nutrisi. Dengan demikian pola kultivasi yang relatif baik dalam produksi biopolimer adalah adanya stasioner yang cukup lama dengan fase eksponensial tidak harus lama. Produk bersifat intraseluler dan pembentukannya tidak berasosiasi dengan pertumbuhan sehingga diperlukan penggandaan sel yang banyak (fase eksponensial) sebelum terjadi akumulasi biopolimer (fase stasioner).

Optimasi Media Tahap II dirancang untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi karbon (hidrolisat minyak sawit), nitrogen, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , dan $MgSO_4$ terhadap produksi biopolimer dan mengoptimasi variabel-variabel tersebut untuk meningkatkan produktivitas. Pada penelitian ini digunakan rancangan Komposit *Fraktional Berfaktor* $2v^{5-1}$ ($2v^{5-1}$ fractional-fractional composite design) dengan I = 12345.

Pada optimasi media tahap II aplikasi metodologi permukaan respon memberikan hubungan empiris antara nilai-nilai bobot biomassa kering dan variabel-variabel uji melalui persamaan regresi :

$$Y = -27.264591 + 0.764761 x_1 + 4.965448 x_2 + 2.058518 x_3 + 4.707793 x_4 + 0.871529 x_5 - 0.014060 x_1*x_1 + 0.099990 x_2*x_1 - 1.114519 x_2*x_2 - 0.006533 x_3*x_1 + 0.046710 x_3*x_2 - 0.131153 x_3*x_3 - 0.033905 x_4*x_1 - 0.012307 x_4*x_2 - 0.024576 x_4*x_3 - 0.403932 x_4*x_4 + 0.012296 x_5*x_1 + 0.011672 x_5*x_2 - 0.021303 x_5*x_3 + 0.002607 x_5*x_4 - 0.051796 x_5*x_5$$

Kecuali parameter x_5 ($MgSO_4$), koefisien regresi linear keempat variable uji lainnya signifikan, sedangkan semua koefisien regresi kuadratnya sangat signifikan. Sementara itu hanya terdapat satu bentuk interaksi yang sangat signifikan, yakni antara x_1 (konsentrasi karbon) dan x_2 (konsentrasi nitrogen).

Hasil analisis kanonik menunjukkan bahwa nilai optimal variabel-variabel uji dalam unit-unit kode adalah $x_1 = 0.594300$; $x_2 = 0.427033$; $x_3 = 0.064566$; $x_4 = 0.015120$; dan $x_5 = 0.269462$, dengan bobot kering biomassa sebesar 20.347632

g/L. Tampak bahwa titik stasioner merupakan maksimum, hal ini tampak dari nilai *eigenvalue* yang semuanya bertanda negatif. Nilai asli variabel-variabel ini adalah konsentrasi karbon sebesar 41.885991 g/L; konsentrasi nitrogen sebesar 4.281098 g/L; K₂HPO₄ sebesar 3.857455 g/L, dan 12.694617 mL larutan MgSO₄ 0.1 M.

Sementara itu hubungan empiris antara nilai-nilai bobot PHA dan variabel-variabel uji dapat dinyatakan melalui persamaan regresi :

$$Y = -19.512048 + 0.503688 x_1 + 3.424910 x_2 + 0.433963 x_3 + 3.415835 x_4 + 0.712150 x_5 - 0.006420 x_1*x_1 + 0.048685 x_2*x_1 - 0.623717 x_2*x_2 + 0.010849 x_3*x_1 + 0.072726 x_3*x_2 - 0.026269 x_3*x_3 - 0.023835 x_4*x_1 - 0.191761 x_4*x_2 - 0.141154 x_4*x_3 - 0.184768 x_4*x_4 - 0.005236 x_5*x_1 - 0.061676 x_5*x_2 - 0.018831 x_5*x_3 + 0.002265 x_5*x_4 - 0.015674 x_5*x_5$$

Kecuali x₃ (K₂HPO₄) dan X₅ (MgSO₄), koefisien regresi linear ketiga variabel uji lainnya signifikan. Koefisien regresi kuadrat variabel x₁ (karbon), x₂ (nitrogen), dan x₄ (KH₂PO₄) signifikan. Sementara itu dua bentuk interaksi yang nyata adalah interaksi antara x₁ (konsentrasi karbon) dan x₂ (konsentrasi nitrogen) serta interaksi antara x₃ (konsentrasi K₂HPO₄) dan x₄ (konsentrasi (KH₂PO₄)).

Hasil analisis kanonik menunjukkan bahwa titik kritis variabel-variabel uji dalam unit-unit kode adalah x₁ = 0.254896; x₂ = -0.090266; x₃ = -0.920800; x₄ = 0.436621; dan x₅ = 0.160408, dengan bobot biopolimer sebesar 7.556173 g/L. Sifat titik stasioner adalah *saddle*, hal ini tampak dari nilai *eigenvalue* yang belum semuanya bertanda negatif atau positif.

Melalui simulasi multi tahap diperoleh nilai optimal biopolimer sebesar 15.4219 g/L pada konsentrasi karbon sebesar 50g/L; nitrogen sebesar 5.3684 – 5.5781 g/L; K₂HPO₄ sebesar 11.6 g/L; serta tanpa penambahan KH₂PO₄ pada MgSO₄. Namun demikian eksperimen konfirmasi menggunakan kombinasi perlakuan ini tidak memberikan hasil sesuai harapan. Nilai observasi berada jauh di bawah nilai prediksi. Nilai yang lebih mendekati justru didapatkan melalui optimasi produksi biomassa. Hal ini dapat dipahami mengingat bahwa PHA merupakan produk intraseluler yang terakumulasi pada fase stasioner sebagai respon atas keterbatasan satu atau beberapa nutrisi pembatas dalam ketersediaan karbon yang berlebih. Pembentukan PHA tidak berasosiasi dengan pertumbuhan. Hal ini berarti bahwa akumulasi PHA tertinggi akan diperoleh melalui pembatasan nutrisi induktif setelah tercapai produksi biomassa yang maksimum. Dengan demikian optimasi pembentukan PHA dapat dilakukan melalui strategi kultivasi dua tahap. Tahap pertama ditujukan untuk memaksimalkan pembentukan biomassa, sedangkan kultivasi tahap kedua ditujukan untuk memaksimalkan pembentukan PHA melalui pembatasan nutrisi induktif.

Optimasi kondisi proses kultivasi dirancang untuk mengevaluasi pengaruh pH, temperatur, laju agitasi dan laju aerasi terhadap produksi poliester dan mengoptimasi variabel-variabel proses tersebut untuk meningkatkan produktivitas. Pada penelitian ini digunakan rancangan komposit pusat faktorial penuh 2⁴ (2⁴ *full-factorial central composite design*) dengan metodologi permukaan respon. Pada optimasi kondisi proses kultivasi, aplikasi metodologi permukaan respon memberikan hubungan empiris antara nilai-nilai bobot biomassa kering dan variabel-variabel uji melalui persamaan regresi :

$$Y = 39.872974 + 10.952481 x_1 - 7.249536 x_2 - 0.108540 x_3 + 61.883458 x_4 - 0.825305 x_1*x_1 - 0.022752 x_2*x_1 + 0.170777 x_2*x_2 + 0.025827$$

$$x_3^2 x_1 - 0.001503 x_3^2 x_2 + 0.000171 x_3^2 x_3 - 0.423175 x_4^2 x_1 - 1.827790 x_4^2 x_2 - 0.059973 x_4^2 x_3 - 6.679083 x_4^2 x_4$$

Koefisien regresi linear parameter x_2 (temperatur) dan x_4 (aerasi) signifikan. Koefisien regresi kuadratik parameter x_1 signifikan, x_2 sangat signifikan, sedangkan kedua parameter lainnya tidak signifikan. Dua bentuk interaksi yang signifikan, yakni antara x_1 (pH) dan x_3 (laju agitasi) serta antara x_2 (temperature) dan x_4 (laju aerasi)

Hasil analisis kanonik menunjukkan nilai kritis variabel-variabel uji dalam unit-unit kode adalah $x_1 = -0.112595$; $x_2 = 0.134600$; $x_3 = -0.640165$; dan $x_4 = 0.422655$, dengan bobot kering biomassa pada titik stasioner sebesar 3.580106 g/L. Sifat titik stasioner adalah *saddle*, hal ini tampak dari nilai *eigenvalue* yang belum semuanya bertanda negatif atau positif. Melalui simulasi multi tahap diperoleh nilai optimal biopolimer sebesar 30.4295 g/L pada pH 9; temperatur 30 °C; laju agitasi sebesar 240 rpm; serta tanpa aerasi.

Hubungan empiris antara nilai bobot biopolimer dan variabel-variabel uji pada optimasi kondisi proses kultivasi dapat dinyatakan melalui persamaan regresi :

$$Y = 19.366892 + 3.810617 x_1 - 3.083020 x_2 + 0.101969 x_3 + 3.146400 x_4 - 0.143442 x_1^2 - 0.076740 x_2^2 + 0.080281 x_2^2 - 0.000080 x_3^2 x_1 - 0.003425 x_3^2 x_2 + 0.000060322 x_3^2 x_3 + 0.649200 x_4^2 x_1 - 0.157280 x_4^2 x_2 - 0.036317 x_4^2 x_3 + 0.399333 x_4^2 x_4$$

Koefisien regresi linear dan kuadratik parameter x_2 (temperatur) dan x_3 (laju agitasi) signifikan. Sementara itu dua bentuk interaksi yang nyata adalah interaksi antara x_2 (temperatur) dan x_3 (laju agitasi) serta interaksi antara x_3 (laju agitasi) dan x_4 (laju aerasi).

Hasil analisis kanonik menunjukkan bahwa titik kritis variabel-variabel uji dalam unit-unit kode adalah $x_1 = 0.416178$; $x_2 = 0.279001$; $x_3 = 0.069445$; dan $x_4 = 0.454636$, dengan bobot biopolimer pada titik stasioner sebesar 1.289041 g/L. Sifat titik stasioner adalah *saddle*, hal ini tampak dari nilai *eigenvalue* yang belum semuanya bertanda negatif. Melalui simulasi multi tahap diperoleh nilai optimal biopolimer sebesar 10.2011 g/L pada pH 7.9; temperatur 20 °C; laju agitasi sebesar 240 °C; serta tanpa aerasi.

Keluaran analisis DSC biopolimer hasil kultivasi *Ralstonia eutropha* pada media dengan konsentrasi karbon 30 g/L dengan rasio C/N 10:1 menunjukkan adanya dua puncak titik leleh. Puncak pertama memiliki titik leleh 70.98°C dengan panas pembentukan -46.7 J/g. Puncak kedua memiliki titik leleh 127.90°C dengan panas pembentukan -4,22 J/g. Panas pembentukan yang rendah menunjukkan tingkat kristalinitas yang rendah yang menunjukkan bahwa polimer mudah terdegradasi. Sementara itu biopolimer hasil kultivasi *Ralstonia eutropha* pada media hidrolisat minyak sawit dengan konsentrasi karbon 30 g/L, dengan rasio C/N 200:1 hanya memiliki satu puncak titik leleh yakni 73.49°C dengan panas pembentukan sebesar -91.15 J/g. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama dengan nisbah C/N yang berbeda didapatkan dua produk polimer yang berbeda.

Penggunaan sabun minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon bagi *R. eutropha* menghasilkan tipe biopolimer yang lebih bervariasi dibandingkan dengan hidrolisat minyak sawit. Pada konsentrasi karbon 30 g/l dan rasio C/N 50:1 terbentuk 4 tipe polimer semi kristalin, sedangkan pada konsentrasi karbon 30 g/l dan rasio C/N 100:1 terbentuk 5 tipe polimer. Pada perlakuan dengan konsentrasi karbon 30 g/l dan rasio C/N 50:1, dari 4 tipe polimer yang terbentuk, polimer

bertitik leleh 73°C relatif lebih banyak dibanding ketiga tipe polimer lainnya, selanjutnya berturut-turut adalah polimer bertitik leleh 126°C, 110°C dan 93°C. Pada perlakuan konsentrasi karbon 30 g/l dan rasio C/N 100:1, berturut-turut adalah polimer bertitik leleh : 117°C >> 76°C >> 85°C >> 131°C >> 96°C. Panas fusi yang terbentuk bersifat endoterm dan tergolong rendah. Rendahnya nilai panas fusi mengindikasikan kecilnya derajat kristalinitas yang berarti struktur amorf lebih dominan.

Sementara itu dari hasil kultivasi menggunakan hidrolisat sebagai sumber karbon dalam bioreaktor berskala kerja 40 L diperoleh dua tipe biopolimer. Masing-masing memiliki titik leleh sebesar 148.38°C dan 135.54°C dengan derajat kristalinitas sebesar 2.88%.

Hasil analisis thermal menunjukkan bahwa biopolimer hasil kultivasi *Ralstonia eutropha* pada substrat berbasis minyak sawit memiliki karakteristik yang relatif beragam. Titik leleh bervariasi dari 70.98°C hingga 148.38°C sehingga memungkinkan untuk diaplikasikan baik sebagai termoplastik maupun sebagai elastomer. Namun demikian struktur dominannya amorf, terlihat dari derajat kristalinitasnya yang relatif rendah. Berdasarkan karakteristik thermal, spektra FTIR, dan uji zona bening diduga bahwa biopolimer hasil kultivasi *R. eutropha* pada hidrolisat minyak sawit sebagai sumber karbon terdiri atas PHA berantai pendek (PHBV) dan PHA berantai menengah (bukan *polyhydroxyoctanoate*).

Hasil analisis kelarutan menunjukkan bahwa kloroform merupakan pelarut yang relatif sesuai bagi *polyhydroxyalkanoates* hasil kultivasi *Ralstonia eutropha* pada hidrolisat minyak sawit. Hal ini tampak dari nilai viskositas larutan (5.94 ± 0.27 cP), *swelling index* larutan (5.28 ± 2.82), dan *optical density* larutan (0.04 ± 0.01) yang relatif lebih baik dibandingkan dengan nilai viskositas, *swelling index*, dan *optical density* larutan PHA dalam aseton dan dichlorometana. Relatif tingginya indeks *swelling* larutan PHA dalam kloroform menunjukkan bahwa PHA lebih mudah menyerap kloroform dibandingkan kedua pelarut lainnya. Sedangkan rendahnya nilai absorbansi larutan PHA dalam kloroform menunjukkan bahwa partikel PHA telah berubah ukuran dan bentuk menjadi partikel-partikel yang lebih kecil dan menunjukkan kelarutan PHA yang tinggi pada pelarut kloroform. Lembaran bioplastik yang terbentuk dengan penambahan pemlastis dimetil ftalat (DMF) dan metode pencampuran mekanik didapatkan dengan penambahan konsentrasi DMF 10% dan 12.5%. Film yang terbentuk dengan penambahan pemlastis DMF 10% berwarna krem bersih, berpemukaan agak licin, dan relatif tipis. Sedangkan film yang terbentuk dengan penambahan pemlastis DMF 12.5% memiliki permukaan lebih mengkilat, licin, dan warna lebih gelap.

Penambahan pemlastis DMF mempengaruhi derajat kristalinitas PHA murni. Sampel dengan penambahan pemlastis DMF 0% (PHA), 5%, 10% dan 12.5% masing-masing memiliki derajat kristalinitas 2.88%, 3.67%, 0% (semuanya berbentuk amorf), dan 5.21%. Semakin tinggi nilai derajat kristalinitas, maka bioplastik yang terbentuk akan memiliki elastisitas yang semakin rendah dan titik leleh yang lebih tinggi.

Penambahan pemlastis DMF terhadap PHA mengakibatkan adanya ikatan hidrogen yang terbentuk antara salah satu gugus PHA dengan gugus DMF. Ikatan hidrogen yang terbentuk adalah antara gugus -OH pada PHA dengan gugus -C=O pada DMF. Peningkatan konsentrasi pemlastis DMF mengakibatkan semakin tidak dapat terdeteksinya gugus fungsi O-H seperti terdapat pada gugus fungsi PHA

murni. Hal tersebut menunjukkan terjadinya ikatan hidrogen antara PHA dengan DMF. Sampel dengan berbagai penambahan konsentrasi pemlastis DMF memiliki gugus fungsi C-H dan C=O dengan intensitas/komposisi yang berbeda. Semakin tinggi konsentrasi pemlastis DMF yang ditambahkan mengakibatkan reduksi intensitas gugus fungsi penyusunnya.

Kuat tarik tertinggi bioplastik PHA hasil kultivasi *Ralstonia eutropha* pada substrat hidrolisat minyak sawit dengan penambahan pemlastis DMF didapatkan pada konsentrasi DMF 12.5% yaitu sebesar 44.44 ± 7.9 kgf/cm² dengan densitas sebesar 1.001 ± 0.176 g/cm³. Sedangkan kuat tarik bioplastik PHA dengan penambahan konsentrasi pemlastis DMF 10% yaitu sebesar 7.94 ± 4.5 kgf/cm² dengan densitas sebesar 0.499 ± 0.016 g/cm³. Peningkatan konsentrasi pemlastis DMF mengakibatkan kuat tarik bioplastik yang terbentuk semakin tinggi.

Lembaran bioplastik dengan konsentrasi pemlastis dietil glikol (DEG) 10% memiliki warna yang lebih muda (krem) dibanding warna lembaran bioplastik dengan konsentrasi DEG 15%. Permukaan bioplastik dengan DEG 10% lebih halus dan tidak mengkilap, sedangkan permukaan bioplastik dengan DEG 15% licin dan mengkilap. Kedua bioplastik tersebut memiliki sifat mudah patah. Bioplastik dengan DEG 20% memiliki penampakan putih, halus dan tidak mudah patah.

Densitas bioplastik dengan penambahan DEG 10%, 15% dan 20% masing-masing adalah 0.234 g/cm³, 0.030 g/cm³ dan 0.0167 /cm³. Penambahan DEG menurunkan densitas bioplastik. Hal ini berhubungan dengan menurunnya derajat kristalinitas.

Bioplastik PHA memiliki derajat kristalinitas sebesar 2.88%, sedangkan bioplastik dengan DEG 10%, 15% dan 20% masing-masing memiliki derajat kristalinitas sebesar 3%, 0.55% dan 0.58%. Semua sampel bersifat semikristalin dengan bagian *amorph* lebih banyak dari pada bagian kristalinnnya.

Penambahan pemlastis DEG mengakibatkan pelemahan ikatan OH. Atom hidrogen yang terikat pada atom O sebagai gugus alkohol primer molekul pemlastis dietil glikol diduga berikatan dengan atom elektronegatif oksigen dari polimer PHA dengan jenis ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen yang terbentuk tidak terjadi pada atom O dari gugus C=O polimer PHA. Hal ini dapat disimpulkan dengan tidak berkurangnya intensitas transmisi gugus C=O setelah dilakukan penambahan pemlastis DEG.

Penambahan pemlastis DEG memperlemah ikatan pada gugus CH₂-OH yang terdapat pada polimer-polimer PHA akibat terbentuknya ikatan hidrogen sehingga presentase transmisi ikatan tersebut besar. Penambahan konsentrasi DEG sebesar 20% diduga menyebabkan terikatnya seluruh gugus OH dari polimer PHA dengan atom H dari pemlastis DEG melalui terbentuknya ikatan hidrogen. Semakin tinggi konsentrasi pemlastis DEG yang ditambahkan pada polimer PHA makin banyak ikatan hidrogen yang terjadi antara molekul-molekul pemlastis DEG dan polimer PHA.

Penambahan pemlastis tributil fosfat (TBF) 12.5% dapat membentuk lembaran plastik, sedangkan dengan penambahan 10% dan 15% tidak terbentuk plastik. Bioplastik PHA+TBF 12.5% yang terbentuk berwarna coklat jernih dengan keadaan permukaan yang licin dan berkilauan seperti kaca.

Bioplastik dengan penambahan TBF 10% memiliki derajat kristalinitas sebesar 2.76% dan bersifat semi kristalin. Derajat kristalinitas bioplastik dengan penambahan TBF 12.5% adalah 0% (seluruhnya amorf), sedangkan derajat kristalinitas bioplastik dengan penambahan tributyl fosfat 15% adalah 2.01%.

Nilai kuat tarik sampel bioplastik + TBF 12.5% sebesar 47.22 kgf/cm² dengan densitas sebesar 0.066 g/cm³. Rendahnya nilai densitas bioplastik ini karena struktur sampel berbentuk amorf. Bentuk dan struktur kristal memberikan pengaruh pada densitas suatu bahan.

Penambahan pemlastis dimetil ftalat dan dietil glikol berpengaruh negatif terhadap kecepatan biodegradasi *polyhydroxyalkanoates* pada medium tanah buatan. Laju biodegradasi bioplastik PHA+DMF dan bioplastik PHA+DEG lebih lambat daripada laju biodegradasi PHA tanpa pemlastis. Akumulasi produksi CO₂ hasil biodegradasi bioplastik PHA+DMF, bioplastik PHA+DEG dan PHA tanpa pemlastis hingga hari ke-60 pengujian berturut-turut sebesar 36.54 mg; 38.75 mg; dan 45.80 mg dengan laju produksi CO₂ berturut-turut sebesar 0.61 mg/hari; 0.65 mg/hari; dan 0.76 mg/hari. Namun demikian bioplastik PHA+DMF dan bioplastik PHA+DEG ini masih memiliki laju biodegradasi yang relatif lebih tinggi daripada laju biodegradasi selulosa yang digunakan sebagai pembanding.

Akumulasi produksi CO₂ hasil biodegradasi bioplastik PHA+DMF, bioplastik PHA+DEG, dan selulosa hingga akhir pengujian (hari ke-80) berturut-turut sebesar 38.03 mg; 45.43 mg; dan 37.30 mg dengan laju produksi CO₂ masing-masing sebesar 0.48 mg/hari; 0.57 mg/hari; dan 0.47 mg/hari. Pola biodegradasi selulosa (produksi CO₂) selama 80 hari pengujian mengikuti kurva kuadratik dengan persamaan $Y = -0.0079 (x)^2 + 1.0959 (x) - 2.0602$. Kurva produksi CO₂ PHA mengikuti persamaan logaritmik dengan $Y = 14,5918 \ln(x) - 14.472$, sedangkan kurva produksi CO₂ hasil biodegradasi bioplastik PHA+DMF mengikuti persamaan logaritmik dengan $Y = 11.529807 \ln(x) - 9.941069$.

Laju biodegradasi bioplastik PHA+DEG lebih tinggi daripada bioplastik PHA+DMF. Sifat pemlastis DEG yang lebih hidrolis dan tersedianya air yang lebih banyak setelah proses degradasi berlangsung, menyebabkan kecepatan degradasi bioplastik PHA+DEG menjadi lebih cepat daripada bioplastik PHA+DMF yang bersifat hidrofobik.

Pada medium cair buatan laju biodegradasi bioplastik PHA+DMF dan bioplastik PHA+DEG lebih lambat daripada laju biodegradasi selulosa dan PHA tanpa pemlastis. Laju produksi CO₂ hasil biodegradasi bioplastik PHA+DMF, bioplastik PHA+DEG, selulosa, dan PHA tanpa pemlastis hingga hari ke-60 pengujian masing-masing sebesar 0.5185 mg/hari; 0.6365 mg/hari; 0.7758 mg/hari; dan 0.6380 mg/hari. Laju biodegradasi bioplastik PHA+DEG pada medium cair buatan lebih tinggi daripada bioplastik PHA+DMF. Laju produksi CO₂ hasil biodegradasi bioplastik PHA+DEG dan bioplastik PHA+DMF hingga akhir pengujian (hari ke-100) masing-masing sebesar 0.7040 mg/hari dan 0.6578 mg/hari.