

# HIDROLISIS BEBERAPA JENIS XILAN DENGAN ENZIM XILANOLITIK TERMOFILIK REKOMBINAN

Ni Nyoman Tri Puspaningsih\*, Hery Suwito, Sri Sumarsih, Ali Rohman, dan One Asmarani

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga

\*contact person: nyomantri@yahoo.com

## ABSTRACT

The aims of this research were to know the ability of recombinant xylanolytic enzyme from recombinant *E. coli* DH5 $\alpha$  (pTP510) to hydrolyze several commercial xylan and analysis the reduction sugar product. Recombinant xylanolytic enzyme (exo-xylanase,  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase) could hydrolyzed several commercial xylan (oat-spelt xylan, birchwood, wheat, rye, and arabinan) with xylanolytic activities are: oat-spelt xylan (1.73 U/mL), birchwood (0.92 U/mL), wheat (6.52 U/mL), rye (4.94 U/mL), and arabinan (3.40 U/mL). Xylanolytic enzyme assay use specific substrate p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside (pNP-X) shown xylosidase activity 15.869 U/mL. Hydrolysis product was analyzed by HPLC. The results showed that xylose, arabinose, and xylo-oligosaccharide were produced from birchwood, wheat, rye, and arabinan hydrolysis, although xylose and arabinose were produced from hydrolysis of oat-spelt xylan.

**Key words:** commercial xylan, pNP-X, pTP510, xylanolytic enzyme

## PENGANTAR

Limbah pertanian di Indonesia seperti batang/jerami padi, bonggol jagung, daun-daun kering dan ranting-ranting tanaman yang cukup melimpah belum dimanfaatkan secara optimal, dan sebagian besar dimusnahkan dengan pembakaran. Sementara itu, pembakaran limbah pertanian meningkatkan kadar CO<sub>2</sub> di udara yang berdampak terjadinya pemanasan global. Kandungan hemiselulosa yang cukup tinggi ( $\pm$  30%) dalam limbah pertanian dapat dimanfaatkan menjadi monomer xilosa yang berpotensi untuk bahan baku industri.

Di alam, hemiselulosa memiliki bermacam-macam komposisi karbohidrat sehingga kemampuan optimal enzim untuk menghidrolisisnya juga berbeda. Oleh karena itu, enzim yang digunakan perlu diuji untuk diketahui kemampuannya dalam menghidrolisis hemiselulosa. Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis substrat hemiselulosa kaya xilan disebut kompleks enzim xilanase (xilanolitik). Hidrolisis sempurna xilan memerlukan aktivitas sinergis kelompok enzim hemiselulosa (hidrolitik), di antaranya adalah enzim *endo- $\beta$ -xilanase*, *exo-xilanase*,  *$\beta$ -xilosidase*,  *$\alpha$ -L-arabinofuranosidase*.

Gen penyandi enzim xilanolitik termofilik telah berhasil diklonkan dan diekspresikan ke dalam sel inang *E. coli* DH5 $\alpha$  (pTP510). pTP510 merupakan plasmid rekombinan yang mengandung gen penyandi enzim xilanolitik termofilik *exo-xilanase*,  *$\beta$ -xilosidase*,  *$\alpha$ -L-arabinofuranosidase* (Puspaningsih, 2004).

Berdasarkan latar belakang di atas maka selanjutnya dilakukan penelitian mengenai kerja sinergis ketiga

enzim xilanolitik tersebut dari *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dalam menghidrolisis beberapa jenis substrat xilan komersial.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan

Bahan penelitian ini adalah *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510).

### Cara Kerja

#### Produksi enzim xilanolitik

Media inokulum merupakan media cair LB. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan biakan bakteri pTP510 dari *E. coli* DH5 $\alpha$  ke dalam 20 ml media inokulum yang sebelumnya ditambahkan 20  $\mu$ l ampisilin (100 mg/ml). Biakan diinokulasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm selama  $\pm$ 18 jam. Satu persen biakan inokulum dimasukkan ke dalam 20 ml media produksi yang sebelumnya ditambahkan 20  $\mu$ l ampisilin (100 mg/ml). Biakan diinkubasi dengan kondisi seperti di atas. Sel dipanen setelah  $\pm$ 18 jam pertumbuhan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet dilarutkan dalam buffer fosfat sitrat (PC) pH 7 dan dipecah dengan ultrasonikator dengan frekuensi 20 Hz selama 2 menit diulang 2 kali. Enzim xilanolitik didapat dari supernatan hasil sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit.

### Uji aktivitas enzim xilanolitik

#### Uji aktivitas enzim xilanolitik menggunakan substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida

Sebanyak 100  $\mu$ l enzim xilanolitik ditambah 900  $\mu$ l substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida diinkubasi pada suhu 70 °C selama 60 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan. Pengamatan jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan diamati dengan spektrofotometri pada  $\lambda$  405 nm. Blangko yang digunakan 100  $\mu$ l akuades dan 900  $\mu$ l substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilosida diperlakukan sama dengan kondisi di atas.

Standar *p*-nitrofenol digunakan pada kisaran 0,1–0,5 mM *p*-nitrofenol/ml dari stok *p*-nitrofenol 10 mM/ml dalam pelarut buffer PC pH 7.

#### Uji aktivitas enzim xilanolitik menggunakan substrat beberapa jenis xilan

Aktivitas enzim xilanolitik ditentukan dengan mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat *oat spelt xylan* (Fluka), *birchwood* (Sigma), *wheat* (Megazyme), *rye* (Megazyme), dan *arabinan* (Megazyme). Masing-masing 100  $\mu$ l substrat tersebut ditambah 100  $\mu$ l enzim diinkubasi pada suhu 70 °C selama 60 menit. Hasil inkubasi ditambah dengan 600  $\mu$ l pereaksi DNS dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit, kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada  $\lambda$  550 nm. Kontrol yang digunakan 100  $\mu$ l enzim dan 600  $\mu$ l pereaksi DNS diperlakukan sama dengan kondisi di atas (Miller, 1959).

Standar xilosa dibuat pada kisaran 0,1–1 mg xilosa/ml dari stok xilosa 10 mg/ml. Blangko digunakan dengan mengganti xilosa dengan akuades.

#### Analisis produk hidrolisis

Sampel substrat xilan ditambah dengan enzim xilanolitik, dihidrolisis pada suhu 70 °C selama 24 jam. Hasil hidrolisis digunakan sebagai sampel untuk analisis HPLC. Analisis HPLC menggunakan kolom karbohidrat (Mikrobondapak), detektor indeks bias, pelarut metanol 80% dalam air, kecepatan alir 1 ml/menit, konsentrasi senyawa standar 0,05%, volume injeksi 20  $\mu$ l pada suhu kamar.

## HASIL

**Tabel 1.** Aktivitas xilanolitik beberapa jenis xilan

Jenis xilan	Aktivitas (U/ml)
<i>Oat-spelt xylan</i>	1,73
<i>Birchwood</i>	0,92
<i>Wheat</i>	6,52
<i>Rye</i>	4,94
<i>Arabinan</i>	3,40

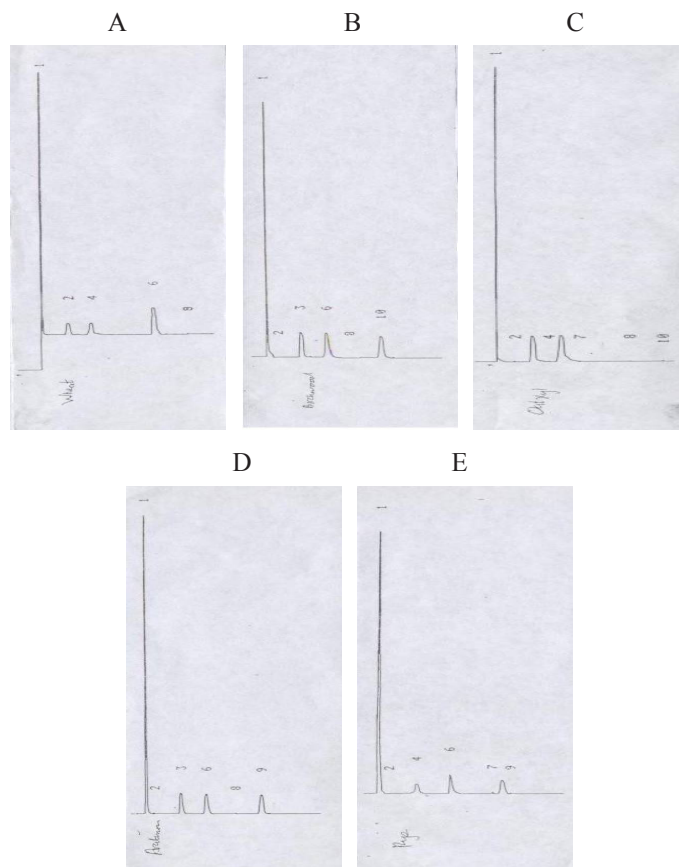
**Tabel 2.** Hasil analisis HPLC

Jenis xilan	Hasil analisis (%)		
	xilosa	arabinosa	xilo-oligosakarida
<i>Oat-spelt xylan</i>	21,73	26,67	-
<i>Birchwood</i>	20,60	22,26	18,60
<i>Wheat</i>	17,62	19,95	42,46
<i>Rye</i>	8,89	13,02	10,05
<i>Arabinan</i>	13,55	15,10	13,99

## PEMBAHASAN

Media produksi bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) merupakan media cair LB ampisilin. *E. coli* DH5 $\alpha$  (pTP510) mampu memproduksi enzim xilanolitik secara konstitutif. Hal ini sangat menguntungkan dari sisi produksi enzim rekombinan tersebut. Selain itu, keuntungan lain produksi enzim xilanolitik termofilik rekombinan adalah produksi dilakukan pada suhu pertumbuhan sel inang *E. coli* DH5 $\alpha$  pada 37 °C, selanjutnya enzim xilanolitik rekombinan akan tetap mampu menunjukkan aktivitas optimumnya pada 70 °C. Sedangkan bila diproduksi dari isolat asalnya *Bacillus hermoleovorans* IT-08, maka isolat tersebut hanya dapat tumbuh pada suhu 60 °C, akibatnya enzim xilanolitik juga harus diproduksi pada suhu pertumbuhan isolat asalnya (Puspaningsih, 2004).

Enzim xilanolitik diuji aktivitas xilanolitiknya, dengan mereaksikan enzim xilosidase yang diekspresikan oleh *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) dengan substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan. Pengamatan jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan diamati dengan spektrofotometri pada  $\lambda$  405 nm. 1 unit aktivitas enzim xilosidase didenifisikan sebagai jumlah enzim



**Gambar 1.** Kromatogram HPLC dari : A. oat spelt xylan (3) xilosa RT 1,40 dan (6) arabinosa RT 2,02; B. birchwood (3) xilosa RT 1,39, (6) arabinosa RT 2,08, (10) xilo-oligosakarida RT 3,45; C. wheat (2) xilosa RT 1,35, (4) arabinosa RT 1,93 (6) xilo-oligosakarida RT 3,48; d. rye (4) xilosa RT 1,33, (6) arabinosa RT 2,18, (8) xilo-oligosakarida RT 3,50; E. arabinan (3) xilosa RT 1,36, (6) arabinosa RT 2,04, (9) xilo-oligosakarida RT 3,47

yang menghasilkan 1  $\mu$ mol *p*-nitrofenol dalam waktu 1 menit pada kondisi percobaan. Hasil penentuan aktivitas xilosidase sebesar 15,869 U/ml (Saha, 2003b).

Enzim xilanolitik diuji dengan beberapa substrat xilan dengan pereaksi DNS. Banyaknya gula pereduksi diukur menggunakan metode DNS secara spektrofotometri pada  $\lambda$  550 nm (Miller, 1959). 1 unit aktivitas xilanolitik menunjukkan  $\mu$  mol xilosa yang dihasilkan per menit untuk setiap ml enzim. Aktivitas xilanolitik terhadap beberapa xilan terlihat pada Tabel 1. Dari data tersebut terlihat bahwa enzim xilanolitik rekombinan dapat menghidrolisis beberapa jenis substrat xilan komersial.

Perbedaan aktivitas xilanolitik beberapa jenis xilan komersial di atas disebabkan kemampuan menghidrolisis enzim xilanolitik rekombinan yang berbeda terhadap masing-masing jenis xilan. Aktivitas tertinggi enzim xilanolitik rekombinan terlihat pada *wheat*, data ini juga

didukung oleh data HPLC (Tabel 2 dan Gambar 1.C) yang menunjukkan bahwa *wheat* terhidrolisis menjadi 17,62% xilosa, 19,95% arabinosa, dan 42,46% xilo-oligosakarida

Produk hidrolisis enzim xilanolitik rekombinan terhadap beberapa substrat xilan menunjukkan bahwa enzim tersebut dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa, arabinosa, dan xilo-oligosakarida (Tabel 2).

Enzim xilanolitik rekombinan dapat menghidrolisis *oat-spelt xylan* menjadi xilosa dan arabinosa, ini didukung data HPLC pada Gambar 1.A dengan RT 1,40 untuk xilosa (RT xilosa standar 1,37) dan 2,02 untuk arabinosa (RT arabinosa standar 2,00).

Komposisi *birchwood* adalah xilosa 89,3%, arabinosa 1%, glukosa 1,4%, dan asam anhidrouonat 8,3% (Saha, 2003a), sedangkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *birchwood* terhidrolisis menjadi xilosa 20,60% (RT 1,39), arabinosa 22,26% (RT 2,08), dan xilo-oligosakarida 18,60%

(RT 3,45) oleh enzim xilanolitik rekombinan (Gambar 1B). Hasil hidrolisis menunjukkan bahwa enzim yang diekspresikan oleh *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) mempunyai aktivitas xilanolitik lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian sebelumnya oleh Saha (2003a).

*Wheat* terhidrolisis menjadi xilosa (RT 1,35), arabinosa (RT 1,93), dan xilo-oligosakarida (RT 3,48) oleh enzim xilanolitik rekombinan (Gambar 1C). Komposisi *wheat* menurut Saha (2003a) terdiri dari 65,8% xilosa, 33,5% arabinosa, 0,3% glukosa, dan 0,1% manosa. Komposisi *wheat* (Megazyme) yaitu arabinosa 37%, xilosa 61%, gula lainnya 2%. Hasil hidrolisis *wheat* dengan enzim xilanolitik rekombinan adalah 17,62% xilosa, 19,95% arabinosa, 42,46% xilo-oligosakarida. Hal ini menunjukkan bahwa *wheat* menghasilkan produk xilo-oligosakarida tertinggi dibandingkan sampel xilan yang lain.

Enzim xilanolitik rekombinan terutama menghidrolisis *rye* menjadi arabinosa. Hasil hidrolisis *rye* oleh enzim xilanolitik rekombinan adalah 8,89% xilosa (RT 1,33), 13,02% arabinosa (RT 2,18), dan 10,05% xilo-oligosakarida (RT 3,50) ditunjukkan pada Gambar 1D, sedangkan komposisi *rye* (Megazyme) yaitu arabinosa 49%, xilosa 48%, dan gula lainnya 3%.

Komposisi *arabinan* (Megazyme) mengandung arabinosa, galaktosa, rhamnosa, dan asam galakturonat dengan perbandingan 88:3:2:7. *Arabinan* terhidrolisis oleh enzim xilanolitik rekombinan menjadi 13,55% xilosa (RT 1,36), 15,10% arabinosa (RT 2,04), dan 13,99% xilo-oligosakarida (RT 3,47) seperti yang terlihat pada Gambar 1E. Sesuai dengan komposisi *arabinan*, hidrolisis dengan enzim xilanolitik rekombinan menunjukkan bahwa produk utamanya adalah arabinosa.

Hidrolisis enzimatis terhadap substrat xilan komersial menunjukkan bahwa *wheat* mampu terhidrolisis 80% menjadi produk monomer dan oligomernya, sedangkan yang lain kurang dari 80% (Tabel 2). Hasil ini sesuai dengan data aktivitas enzim yang tinggi pada *wheat* (Tabel 1).

Hidrolisis substrat xilan dilakukan oleh sifat sinergi ketiga enzim xilanolitik yang gennya telah terklonkan ke dalam pTP510. Mekanisme hidrolisis diawali oleh enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase yang menghidrolisis rantai cabang xilan menghasilkan L-arabinosa dan xilobiosa. Pemutusan rantai cabang akan mempermudah hidrolisis xilan oleh enzim exo-xilanase dan  $\beta$ -xilosidase. Enzim exo-xilanase menghidrolisis rantai utama xilan menjadi xilo-oligosakarida yang merupakan substrat bagi enzim  $\beta$ -xilosidase untuk menghasilkan xilosa. Produk utama dari ketiga enzim tersebut adalah xilosa, arabinosa, dan xilotetrosa tersubstitusi yang bercampur dengan sedikit

xilotriosa tersubstitusi (Tuncer dan Ball, 2003; Puspaningsih, 2004).

Hasil analisis produk hidrolisis di atas menunjukkan bahwa enzim xilanolitik rekombinan sangat berpotensi menjadi enzim yang dapat menghasilkan xilosa, yang bermanfaat sebagai bahan baku di berbagai industri, seperti produksi bioetanol, xilitol, 2,3-butanadiol (Horitsu *et al.*, 1992), bahan bakar cair (Fall *et al.*, 1984), dan pelarut organik (Yu dan Saddler, 1985).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa enzim xilanolitik dari *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinan (pTP510) mampu menghidrolisis beberapa jenis xilan komersial dengan aktivitas xilanolitik untuk *oat-spelt xylan* (1,73 U/ml), *birchwood* (0,92 U/ml), *wheat* (6,52 U/ml), *rye* (4,94 U/ml), dan *arabinan* (3,40 U/ml). Produk hidrolisis utama dari degradasi xilan komersial oleh enzim xilanolitik rekombinan adalah xilosa, arabinosa, dan xilo-oligosakarida.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Menristek melalui Riset Unggulan Terpadu (RUT) XII 2005–2006. Untuk itu kami menyampaikan terima kasih.

## KEPUSTAKAAN

- Fall RP, Phelps P, Spindler D, 1984. Bioconversion of xylan to triglyceride by oil-rich yeasts, *Appl Environ Microbiol* 47: 1130–1134.
- Horitsu H, Yahashi Y, Takamizawa K, Kawai K, Suzuki T, Watanabe N, 1992. Production of Xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate, *Biotechnol Bioeng* 40: 1085–1091.
- Miller LG, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal chem* 31: 426–428.
- Puspaningsih NNT, 2004. Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08, Desertasi S3-IPB, Bogor.
- Saha BC, 2003a, Hemicellulose Bioconversion, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30: 279–291.
- Saha BC 2003b, Purification and Properties of An Extracellular  $\beta$ -xylosidase from A Newly Isolated *Fusarium proliferatum*, *Bioresources Technol* 90: 33–38.
- Tuncer M, Balls AS, 2003. Co-operative actions and degradation analysis of purified xylan degrading enzymes from *Thermomonospora fusca* BD25 on oat spelt xylan, *J. Appl Microbiol* 94: 1030–1035.
- Yu EKC, Saddler JN, 1985. Biomass conversion to butanediol by simultaneous saccharification and fermentation, *Trends Biotechnol* 3: 100–104.

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**

## PETUNJUK PENULISAN MAKALAH

---

Berkala menerima sumbangan karya ilmiah dalam bentuk makalah lengkap dan komunikasi ringkas. Makalah lengkap adalah suatu karya tentang laporan hasil penelitian yang belum pernah dipublikasikan, jumlah halaman dibatasi sebanyak-banyaknya 30 halaman naskah termasuk tabel dan gambar. Bila naskah yang dikirim terdiri dari 10 halaman atau kurang maka akan dimasukkan dalam kelompok komunikasi ringkas. Bila lebih dari 30 halaman akan dikenai biaya tambahan.

### A. PENYERAHAN MAKALAH

Makalah dapat diserahkan langsung atau dikirimkan melalui pos atau usaha ekspedisi lain yang dianggap aman kepada redaksi. Naskah yang diserahkan tiga bendel lengkap (termasuk gambar dan tabel). Pada surat pengantar naskah hendaknya juga diterangkan bidang keilmuan isi makalah, hal ini diperlukan untuk memudahkan pemilihan editor.

### B. PERSYARATAN

Naskah ditulis dalam bahasa Indonesia baku dan bahasa Inggris. Semua naskah akan diedit oleh tim editor yang ditunjuk oleh redaksi. Penggunaan data atau gambar yang pernah dipublikasikan merupakan tanggung jawab penulis, dan bukti tersebut harus dikirimkan bersama naskah (cukup foto copynya).

Cara penulisan nama ilmiah harus memperhatikan kaidah atau peraturan yang berlaku. Istilah dan nama yang berasal dari bahasa selain yang digunakan dalam naskah harus dalam bentuk *italic* atau digaris bawah (underline).

### C. BENTUK NASKAH

Naskah harus diketik dua spasi pada satu sisi (tidak bolak-balik), kertas berukuran A4 putih dengan margin (dari semua tepi) 2,5 cm. Judul ditulis di tengah halaman. Setiap halaman harus diberi nomor. Penggunaan catatan kaki (*footnote*) dalam naskah harus dihindari.

### D. ORGANISASI NASKAH

#### Judul

Judul harus ringkas dan jelas. Diusahakan tidak lebih dari 20 kata. Di bawah judul harus tertulis nama penulis (atau para penulis), alamat pos penulis untuk korespondensi. Bila para penulis memiliki alamat yang berbeda, maka harus diberi tanda (misal dengan bintang 1 atau 2) dan masing-masing tanda diberi nama instansi atau universitasnya.

#### Abstrak (*Abstract*)

Berisi informasi ringkas alasan dan tujuan percobaan atau penelitian, bahan dan cara kerja serta pernyataan hasilnya, ditulis dalam bahasa Inggris (400 kata). Kata kunci (*key word*) ditulis setelah abstrak berjarak tiga spasi dari bagian akhir abstrak.

#### Pengantar (*Introduction*)

Berisi penjelasan kepada pembaca tentang latar belakang percobaan atau penelitian ini, dan informasi yang cukup jelas mengapa dikerjakan (atau diulangi bila dulu pernah dilakukan hal yang serupa). Studi pustaka dari publikasi terdahulu harus diusahakan jangan terlalu panjang.

### Bahan dan cara kerja (*Materials and Methods*)

Berisi informasi yang lengkap kepada pembaca bila ingin melakukan hal yang serupa. Bahan dijelaskan asalnya, kuantitas, kualitas serta galur atau varietasnya (bila ada), cara kerja dan analisa data harus ditulis secara jelas dan ringkas, modifikasi dan cara kerja yang pernah dipublikasikan cukup menyebutkan sumbernya dan menjelaskan bagian yang dimodifikasi. Bila menggunakan uji statistik, cukup ditulis metodenya (RCBD atau Faktorial), variabelnya dari referensinya.

### Hasil (*Results*)

Berisi hasil penelitian atau percobaan yang dikemukakan dalam bentuk tabel atau gambar dengan keterangan dan tanpa pembahasan. Hasil uji statistik dapat ditulis dalam bentuk tabel untuk menunjukkan hasil yang *significance* dan tidak bila dianggap perlu dicantumkan juga nilai uji statistiknya (nilai F test, atau chi square atau lainnya).

### Pembahasan (*Discussion*)

**Pembahasan bukanlah penulisan ulang dari hasil.** Pembahasan harus berisi pernyataan ringkas dan penting dari penemuan sebagai hasil penelitian atau percobaan, suatu pembahasan tentang validitas hasil pengamatan, pembahasan tentang hubungannya dengan hasil penelitian yang pernah dipublikasikan dan pembahasan tentang hasil nyata dan karya tersebut yang mengarah pada pengambilan kesimpulan.

### Kepustakaan (*References*)

Pengutipan pustaka dalam naskah hanya ditulis penulis dan tahunnya saja, misal:

Hasil yang sama pernah dilaporkan oleh Salamun dkk. (1991) dan Darmanto (1992).

Fenomena yang sama juga terdapat paa Crustacea lain (Fidhiani, 1990a, 1990b, Ikeda, 1992).

Daftar pustaka ditulis menurut abjad dengan nama keluarga didahulukan dan ditulis lengkap sedang nama diri ditulis singkat (ditulis huruf pertamanya saja), bila nama keluarga tidak diketahui maka kata terakhir dari nama tersebut dianggap nama keluarga, contoh:

Bagnara JT, and Fernandez PJ, 1993. Hormonal Influences on the development of Amphibian Pigmentation patterns. *Zoological Science* 10: 733–748. **Keterangan:** 10 nomor volume Journal, 733–748 nomor halaman. Judul majalah ditulis *italic* atau garis bawah.

Brown TA, 1993. Genetics a Molecular Approach, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London, 270, 302–303.

**Keterangan:** 270, 302–303 adalah nomor halaman tempat pernyataan dikutip.

Templeton AR, 1989. The Meaning of Species and Speciation; A Genetic Perspective dalam Otte D, dan Endler, JA. (Ed.) *Speciation and its Conseuences*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 1–27. **Keterangan:** 1–27 adalah halaman makalah yang dikutip dalam buku. Judul buku ditulis *Italic* atau garis bawah.

Bila penulis lebih dari dua orang maka kata penghubung "dan" hanya dipakai di antara dua penulis terakhir.