

LAPORAN PENELITIAN  
HIBAH BERSAING XVII PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2008



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

PENGEMBANGAN BAKTERI PEKTINOLITIK SEBAGAI  
PROBIOTIK ANTAGONISME PENEKAN PERTUMBUHAN  
*Microcystis aeruginosa*

Oleh :

Ir. Endang Dewi Masithah, MP.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,  
Departemen Pendidikan Nasional sesuai dengan Surat Perjanjian  
Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Nomor :  
319/SP2H/PP/DP2M/III/2008 Tanggal 5 Maret 2008

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2008

LAPORAN PENELITIAN  
HIBAH BERSAING XVII PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2008

KKC  
KK  
LP.233/10  
Mas  
P



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

PENGEMBANGAN BAKTERI PEKTINOLITIK SEBAGAI  
PROBIOTIK ANTAGONISME PENEKAN PERTUMBUHAN  
*Microcystis aeruginosa*

Oleh :

Ir. Endang Dewi Masithah, MP.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,  
Departemen Pendidikan Nasional sesuai dengan Surat Perjanjian  
Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Nomor :  
319/SP2H/PP/DP2M/III/2008 Tanggal 5 Maret 2008

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2008



**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1. Judul Penelitian : Pengembangan Bakteri Pektinolitik sebagai Probiotik Antagonisme Penekan Pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*
2. Ketua Peneliti :
- a. Nama Lengkap : Ir. Endang Dewi Masithah, MP.  
 b. Jenis Kelamin : Perempuan  
 c. Pangkat/Gol/NIP : Lektor / IIIIC / 132 158 476  
 d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar  
 e. Fakultas/Puslit/Jurusan: Kedokteran Hewan / Budidaya Perairan  
 f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga  
 g. Bidang Ilmu : Planktonologi

3. Tim Peneliti :

No.	Nama lengkap dengan Gelar	Bidang Keahlian	Instansi
1.	Prof. Dr. H. Sarmanu, MS., Drh.	Biostatistika	Fak. Kedokteran Hewan Unair
2.	Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSi., Dra.	Biokimia Molekuler	Jur. Kimia, Fak. Sains dan Teknologi Unair
3.	Dr. Ni'matuzahroh, Dra.	Mikrobiologi Perairan	Jur. Biologi, Fak. Sains dan Teknologi Unair


4. Jangka Waktu Penelitian : 7 (tujuh) bulan (tahun ke-2)  
 5. Biaya yang disetujui : Tahun pertama : Rp. 35.000.000,-  
 Tahun kedua : Rp. 35.000.000,-

Surabaya, Desember 2008


Mengetahui  
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
 Universitas Airlangga,

  
Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh.  
 NIP. 130 687 305

Kepala Peneliti,

  
Ir. Endang Dewi Masithah, MP.  
 NIP. 132 158 476

Mengetahui,  
 Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
 Universitas Airlangga  
 Ketua,

  
Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh.  
 NIP. 131 837 004

## RINGKASAN

JUDUL PENELITIAN	: Pengembangan Bakteri Pektinolitik sebagai Probiotik Antagonisme Penekan Pertumbuhan <i>Microcystis aeruginosa</i>
KETUA PENELITI	: Ir. Endang Dewi Masithah, MP.
ANGGOTA PENELITI	: Prof. Dr. H. Samanu, MS., Drh. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSi., Dra. Dr. Ni'matuzahroh, Dra.
TAHUN	: Desember 2008, 69 halaman

*Blooming Microcystis aeruginosa* sering membawa dampak merugikan, baik bagi ekosistem perairan maupun ekosistem terestrial yang memanfaatkan air tersebut. Racun *microcystin* yang dihasilkan bersifat hepatotoksin dan menyebabkan kanker hati bahkan kematian pada ternak dan manusia yang mengkonsumsi air minum dari waduk yang mengalami *blooming M. aeruginosa*. Produksi udang menurun hingga 50% seiring dominansi *M. aeruginosa* di perairan tambak. *Off flavor* atau penyimpangan rasa pada komoditi perikanan apabila lingkungan budidaya mengalami *blooming M. aeruginosa*. Keragaman zooplankton menjadi rendah dan nilai nutrisi zooplankton sebagai pakan alami ikan menjadi menurun. Nilai kualitas air bagi akuakultur menurun karena kandungan oksigen terlarut rendah.

Kontrol populasi *M. aeruginosa* telah banyak dilakukan dengan berbagai metode, baik fisis, kimia maupun biologis. Pengembangan pengendali hayati dewasa ini semakin banyak dilakukan karena dinilai lebih alamiah dan aman. Penelitian penggunaan bakteri antagonis sebagai pengendali populasi *M. aeruginosa* telah dilakukan di luar negeri. Informasi pengembangan bakteri antagonis untuk mengendalikan *M. aeruginosa* di Indonesia belum banyak diketahui.

Pada penelitian ini akan dicari bakteri sebagai kandidat pengendali *Microcystis aeruginosa* dari tambak. Pemilihan bakteri berdasar sifat pektinolitik sehingga diharapkan dapat mendegradasi dinding sel *M. Aeruginosa* yang sebagian besar terdiri dari pektin.

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu Penelitian tahap pertama : Isolasi dan seleksi bakteri pektinolitik, isolasi *Microcystis aeruginosa*, uji efek algisidal bakteri pektinolitik terpilih terhadap *M. Aeruginosa*. Penelitian tahap kedua : karakterisasi enzim ektinase dari isolat terpilih serta uji efek algisidal ekstrak kasar ezim pektinase dari bakteri pektinolitik terpilih terhadap *M. Aeruginosa*.

Hasil penelitian tahap pertama diperoleh satu solat bakteri pektinolitik potensial. Berdasar hasil identifikasi morfologis dan fisiologis serta identifikasi molekuler, bakteri tersebut adalah *Burkholderia pseudomallei* P26. Bakteri tersebut mampu hidup bersama *M. aeruginosa*, tidak bersifat patogen terhadap larva bandeng sampai kepadatan  $10^{10}$  CFU/ml serta memiliki sifat : bentuk batang pendek, dinding sel gram negatif dan motil. Selain itu isolat P26 menghasilkan enzim katalase, pektinase, omitin dekarboksilase, arginin dihidrolase, citrase, dapat melakukan fermentasi terhadap gula-gula (glukosa, xilosa, mannitol, sorbitol, ramnosa, sukrosa, arabinosa, raffinosa) serta dapat menggunakan malonat sebagai sumber karbon. Isolat P26 tidak menghasilkan  $H_2S$ , indol, acetoin (reaksi Voges-Proskauer), tidak menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase yang mendegradasi ONPG (o-nitrophenil- $\beta$ -d-galactopiranosida), tidak menghasilkan enzim urease, lisin dekarboksilase, triptopan deaminase serta tidak mampu melakukan fermentasi terhadap beberapa gula (laktose, inositol, adonitol dan salisin).

Hasil penelitian tahap kedua menunjukkan bahwa terdapat tiga jenis enzim pektinase utama yang terdapat pada *B. pseudomallei* P26, yaitu pektat liase (PEL).

pektin liase (PL) dan poligalakturonase (PGA). Pektat liase bekerja optimum pada pH 10, suhu 35 °C dan waktu inkubasi 90 menit. Pektin liase bekerja optimum pada pH 7, suhu 40 °C dan waktu inkubasi 60 menit. Sedangkan poligalakturonase bekerja optimum pada pH 9, suhu 45 °C dan waktu inkubasi 45 menit. Pengendapan pektat liase terjadi secara optimum pada konsentrasi kejenuhan ammonium sulfat 60%, pektin liase pada 65% dan poligalakturonase pada 70%. Uji efek algisidal ekstrak kasar enzim pektinase dari bakteri terpilih mampu menekan pertumbuhan *M. aeruginosa*. Pengamatan menggunakan elektron mikroskop menunjukkan model penyerangan bakteri *B. pseudomallei* P26 adalah dengan menempel pada *Microcystis aeruginosa* dan menghasilkan enzim pektinase. Jenis enzim pektinase yang dominan bekerja adalah pektin liase. Akibat serangan bakteri, materi dinding sel *M. aeruginosa* rusak, lisis dan akhirnya mati. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *B. pseudomallei* P26 dapat dikembangkan sebagai agen bikontrol terhadap *blooming M. aeruginosa*.

## SUMMARY

As has been well-known, the blooming of *Microcystis aeruginosa* results in off flavour of fish and shrimp, haemocytic enteritis disease and intoxication in fish, cattle and humans; shrimp production decrease until 50%; zooplankton diversity became lower and the decrease of zooplankton nutrition quality as natural feed. Water stagnation and organic matter were the major factor that cause *Microcystis aeruginosa* blooming. Biocontrol agents have been developed today to overcome various problems in aquaculture, including *Microcystis aeruginosa* bloom. The use of biocontrol became more utilized because appraised more naturally and save.

Apart from that, the use of bacteria as environmental probiotic have several weakness because some factors that influences their capacity. The complain of fish farmer is not obtained probiotic specification that promoted. Besides of that, some research about probiotic development obtainead constraint about bacterial survival in the fish pond (personal correspondence). So, it is important to hunt the active compound that have specification agains *Microcystis aeruginosa* to limite some factors that influence to their capability. The compound active specification was determined among others by the special characteristic of target organism that different compare with others, that one is cell wall component.

As defense material agains some environment factors, some plankton produce the structural carbohydrate as cell wall component. The pectinolytic as specific characteristic mechanism agains *Microcystis aeruginosa* was desired have a high specification, considering some phytoplankton have the different major cell wall component. *Microcystis* was produce extracelular carbohydrate with pectin as major component.

Based on these, it is important to study the capability of pectinase enzyme that extracted from local bacteria to developed as controll agent that have high specification agains *Microcystis aeruginosa*. This development based on capability of pectinolytic bacteria to produce pectinase enzyme that desired to degrade pectin, the major component *Microcystis aeruginosa* cell wall. Enzyme that extracted from bacteria constitute alternative to overcome the problem that caused of *Microcystis aeruginosa* bloom. The use of enzyme to overcome the environmental problem have several special quality among others highly specificity and not accumulative residue because their characteristic as protein that can degraded. It is desired to give the new methode in bacterial use to aquaculture activity.

Pectinase enzyme that extracted from *Pseudomonas pseudomallei* bacteria, have a specific target to pectin, the major component of *Microcystis aeruginosa* cell wall. Previously, researches was used live *Pseudomonas pseudomallei* bacteria as probiotic, and obtain that at the concentration of  $10^6$  CFU/ml, the bacteria are able to reduce *Microcystis aeruginosa* density from  $10^6$  cells/ml to  $10^4$  cells/ml. Furthermore in this study researches was tried out to use crude pectinase that extracted from *Pseudomonas pseudomallei* as active compound to decrease *Microcystis aeruginosa* population.

The result of the study obtained that pectinase extract from *Pseudomonas pseudomallei* is potential to develop as material to overcome problem of *Microcystis aeruginosa* bloom. Pectinase was extracted in hour 12 after culture, precipitated at 60% saturated of ammonium sulphate and diluted in pH 7 of buffer.

Observation using electron microscope (SEM) indicated that cell wall of *Microcystis aeruginosa* was damaged, lysis and finally destroyed after attack of crude pectinase. This indicated that pectinase that extracted from *Pseudomonas pseudomallei* can be developed as control agent against *Microcystis aeruginosa* bloom.

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kehadiran Allah SWT sehingga laporan penelitian dengan judul Pengembangan Bakteri Pektinolitik sebagai Probiotik Antagonisme Penekan Pertumbuhan *Microcystis Aeruginosa* dapat diselesaikan dengan baik.

Penelitian ini dapat terlaksana atas pembiayaan dari dana Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional. Oleh karena itu pada kesempatan ini, disampaikan terimakasih kepada :

1. Menteri Pendidikan c.q. Dirjen Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional.
2. Tim Panitia Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing
3. Rektor Universitas Airlangga Surabaya
4. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya
5. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

Kami menyadari bahwa penulisan laporan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang sifatnya menyempumakan, sangat kami harapkan. Semoga tulisan ini bermanfaat.

Surabaya, Desember 2008

Tim Penulis

# DAFTAR ISI



Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	
RINGKASAN.....	i
SUMMARY.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Lokasi Penelitian.....	4
1.4 Hasil yang Diharapkan.....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 <i>Microcystis aeruginosa</i> dan Dinding Selnya.....	6
2.2 Dampak <i>Blooming Microcystis aeruginosa</i> .....	7
2.3 Biodegradasi Pektin.....	9
2.4 Kontrol Populasi <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	10
2.5 Pengembangan Probiotik Antagonisme untuk Menekan Pertumbuhan <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	11
<b>BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....</b>	<b>13</b>
3.1 Tujuan Penelitian.....	13
3.1.1 Tujuan Jangka Pendek.....	13
3.1.2 Tujuan Jangka Panjang.....	13
3.2 Manfaat Penelitian.....	13
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>16</b>
4.1 Sampel Penelitian.....	16
4.2 Rancangan Penelitian.....	16
4.3 Hipotesis Penelitian.....	16
4.4 Bahan Penelitian.....	17
4.5 Peralatan Pengumpulan Data Penelitian.....	17
4.6 Prosedur Penelitian.....	17
4.6.1 pH optimum.....	17
4.6.2 Suhu optimum.....	18
4.6.3 Waktu inkubasi optimum.....	18
4.6.4 Konsentrasi ammonium sulfat optimum untuk pengendapan.....	18
4.6.5 Efek algisidal ekstrak kasar enzim pektinase dari bakteri <i>Burkholderia pseudomallei</i> P26 terhadap <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	19
4.6.6 Pengamatan dengan Mikroskop Elektron.....	20
4.9 Analisis Data.....	20
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>21</b>
5.1 pH Optimum.....	21
5.2 Suhu Optimum.....	24



5.3	Waktu Inkubasi Optimum.....	26
5.4	Pengendapan Ammonium Sulfat .....	28
5.5	Efek Algisidal Ekstrak Kasar Enzim Pektinase dari Bakteri <i>Burkholderia pseudomallei</i> P26 terhadap <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	30
	5.5.1 Pemberian enzim pektinase pH 7.....	32
	5.5.2 Pemberian enzim pektinase pH 9.....	34
	5.5.3 Analisis stataistik data pemberian enzim pH 7.....	36
	5.5.4 Pengamatan <i>Microcystis aeruginosa</i> dengan Mikroskop Elektron (SEM).....	44
	5.5.5 Prospek <i>Burkholderia pseudomallei</i> P26 sebagai Bahan Pengendali Pertumbuhan <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	48
<b>BAB 6</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>50</b>
6.1	Kesimpulan.....	50
6.2	Saran.....	51
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>52</b>
	<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>57</b>

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 5.1	Grafik Aktivitas Enzim Pektinase pada Berbagai Kondisi pH	22
Gambar 5.2	Grafik Aktivitas Enzim Pektinase pada Berbagai Suhu Inkubasi .....	24
Gambar 5.3	Grafik Aktivitas Enzim Pektinase pada Berbagai Waktu Inkubasi.....	27
Gambar 5.4	Grafik Aktivitas Enzim Pektinase pada Berbagai Konsentrasi Pengendapan Ammonium Sulfat.....	29
Gambar 5.5	Grafik Kepadatan <i>Microcystis aeruginosa</i> (A), Aktivitas Enzim PEL (B), PL (C) dan PGA (D) Tiap Pengamatan Pada Perlakuan Pemberian Enzim terhadap <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	32
Gambar 5.6	Perbedaan Kekeruhan Kultur <i>Microcystis aeruginosa</i> Setelah Pemberian Enzim Pektinase.....	38
Gambar 5.7	Simulasi Proses Kolonisasi dan Pengendapan Sel <i>Microcystis aeruginosa</i> Akibat Enzim Pektinase (Lourens and Pellerin, 2007).....	42
Gambar 5.8	Hasil Pengamatan <i>Microcystis aeruginosa</i> Menggunakan Mikroskop Elektron (SEM).....	46

## DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 5.1 Aktivitas Enzim Pektinase Bakteri <i>Burkholderia pseudomallei</i> P26 pada Berbagai pH .....	21
Tabel 5.2 Aktivitas Enzim Pektinase Bakteri <i>Burkholderia pseudomallei</i> P26 pada Berbagai Suhu .....	24
Tabel 5.3 Aktivitas Enzim Pektinase Bakteri <i>Burkholderia pseudomallei</i> P26 pada Berbagai Waktu Inkubasi .....	26
Tabel 5.4 Aktivitas Enzim Pektinase Bakteri <i>Burkholderia pseudomallei</i> P26 pada Berbagai Konsentrasi Pengendapan Ammonium Sulfat.....	28
Tabel 5.5 Hasil Analisis Univariat Pemberian Enzim Pectinase pH 7 dengan Konsentrasi Berbeda terhadap Laju Penurunan Kepadatan Plankton, Aktivitas Enzim PEL, PL dan PGA .....	37
Tabel 5.6 Hasil Pengukuran pH Berbagai Kondisi Kultur <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	39

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Data Laju Penurunan Kepadatan <i>Microcystis</i> , Aktivitas Enzim PEL, PL dan PGA pada Perlakuan Enzim pH 7..... 57
Lampiran 2	Analisis Univariat Pengaruh Konsentrasi Enzim Pektinase pH 7 terhadap Laju Penurunan Kepadatan <i>Microcystis aeruginosa</i> ..... 58
Lampiran 3	Analisis Univariat Pengaruh Konsentrasi Enzim Pektinase pH 7 terhadap Aktivitas Enzim PEL..... 61
Lampiran 4	Analisis Univariat Pengaruh Konsentrasi Enzim Pektinase pH 7 terhadap Aktivitas Enzim PL..... 64
Lampiran 5	Analisis Univariat Pengaruh Konsentrasi Enzim Pektinase pH 7 terhadap Aktivitas Enzim PGA..... 67

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

*Microcystis aeruginosa* merupakan alga berbahaya bila berada dalam keadaan *blooming* di perairan. Racun microcystin yang dihasilkan menyebabkan penyakit *haemocytic enteristis* atau penyakit kotoran putih pada ikan dan udang (Yukasano, 2000), sehingga produksi menurun hingga 50 persen. Di daerah Lamongan dan Gresik kelimpahan *Microcystis aeruginosa* berhubungan erat dengan cita rasa lumpur pada ikan bandeng (Trisyani, 1997 dan Masithah dkk, 2004). Cita rasa lumpur juga terjadi pada jenis ikan lain dan udang di berbagai daerah di Indonesia (Haryono, 2001). Selain itu, sebagai pakan alami, plankton ini kurang berkualitas karena sulit dicerna (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

Beberapa upaya untuk mengontrol pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* dapat dilakukan dengan manajemen kualitas air, kontrol secara kimiawi maupun biologis. Kontrol pada tambak layah dengan pengaturan kondisi lingkungan, cukup sulit dilakukan karena faktor topografi yang menyebabkan sulitnya ganti air dan pembuangan bahan organik. Kontrol secara kimiawi beresiko akumulatif dan toksin terhadap organisme yang dipelihara, sehingga kontrol secara biologis lebih banyak dikembangkan untuk menciptakan sistem akuakultur organik yang ramah lingkungan.

Ekstrak umbi tike telah diteliti sebagai bahan kontrol biologis terhadap *Microcystis aeruginosa* di Indonesia (Andriyani, 1995). Ekstrak kulit jeruk dan kulit pisang digunakan untuk tujuan yang sama di China (Chen *et al.*, 2004), sedangkan dekomposisi jerami dan sampah daun-daunan digunakan di beberapa negara lain (Welch *et al.* (1990); Barret *et al.* (1996); Ridge and Pillinger (1996); Gibson *et al.* (1990); Ridge *et al.* (1995); Oberholster, *et al.*, (2000); Harding and Piaxton (2001) dan Ball *et al.* (2001)). Penggunaan ekstrak umbi tike dan dekomposisi jerami mempunyai



keterbatasan karena jumlah ketersediaan bahan serta kemudahan penerapan dikaitkan dengan luasnya tambak.

Mikroorganisme yang bersifat antagonisme dewasa ini dikembangkan untuk agen biokontrol dalam rekayasa budidaya ikan. Istilah probiotik dalam dalam akuakultur adalah mikroba hidup yang bermanfaat bagi inang dengan berbagai cara asosiasi dengan inang atau meningkatkan / memperbaiki kualitas air (Verschuere et al., 2000). Penggunaan probiotik sebagai alternatif pengendalian *Microcystis aeruginosa*., seperti *Cytophaga* (Yamamoto et al., 1993), *Myxococcus fulvus* (Burnham et al., 1994) dan *Alcaligenes denitrificans* (Manage et al., 2000) telah dilakukan di luar negeri.

Informasi pengembangan probiotik untuk mengatasi masalah *Microcystis aeruginosa* di Indonesia belum diketahui, selain produk komersial impor. Padahal bakteri sebagai pengendali hayati bersifat sangat spesifik (Isnansetyo, 2005). Hal ini didukung beberapa penelitian yang membuktikan bahwa, penggunaan bakteri isolat lokal untuk suatu tujuan, memberikan hasil lebih efektif dibanding produk komersial yang umumnya berasal dari luar negeri (Nganro, dkk., 1997; Sutanto dan Suprpto, 2004; Susanto, dkk., 2005.).

Berdasarkan permasalahan tersebut, perlu dilakukan isolasi, identifikasi dan karakterisasi berbagai bakteri asal tambak lokal, sebagai kandidat probiotik antagonisme untuk menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* yang mempunyai efektivitas tinggi. Pengembangan probiotik ini berdasarkan sifat bakteri yang memproduksi poly 1,4- $\alpha$ -D galacturonidase yang mampu mendegradasi pektin, suatu polisakarida komponen utama penyusun dinding sel *Microcystis aeruginosa*. Diharapkan *Microcystis aeruginosa* tidak dapat berkembang biak lebih lanjut dan tidak mempunyai kesempatan untuk membentuk spora. Dengan penggunaan probiotik yang berasal dari tambak lokal, diharapkan permasalahan keterbatasan jumlah bahan dan ketidaksesuaian lingkungan tidak lagi menjadi kendala dalam upaya mengatasi kelimpahan *Microcystis aeruginosa*.

Penelitian ini merupakan rangkaian penelitian untuk pengembangan bakteri pektinolitik sebagai probiotik antagonisme untuk menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*. Tujuan utama penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri pektinolitik yang potensial sebagai bahan pengembangan probiotik antagonisme serta mengetahui mekanismenya dalam mendegradasi dinding sel *Microcystis aeruginosa*, sehingga dapat menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*. Penelitian pendahuluan telah dilaksanakan yaitu isolasi dan identifikasi bakteri pektinolitik asal tambak daerah Jawa Timur, sampai tahap genus, yaitu *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Vibrio* dan *Micrococcus*. Penelitian terdiri dari 2 tahap, tahap pertama telah dikerjakan pada tahun pertama (2007) meliputi : Isolasi *Microcystis aeruginosa* dari tambak sesuai daerah isolasi bakteri pektinolitik; Uji aktivitas pektinase beberapa bakteri pektinolitik yang diperoleh untuk mendapatkan kandidat bakteri berkemampuan pektinolitik tinggi (bakteri terpilih); Identifikasi bakteri pektinolitik terpilih sampai tahap spesies, menggunakan Microbact Package dan analisis gen 16Sr-RNA; Uji patogenitas bakteri pektinolitik terpilih terhadap ikan bandeng untuk mengetahui dosis aman bagi ikan serta Efek algisidal bakteri pektinolitik terpilih terhadap *Microcystis aeruginosa*. Hasil penelitian tahap pertama diperoleh bakteri terpilih adalah *Burkholderia pseudomallei* P26; bakteri tersebut tidak bersifat patogen terhadap larva ikan bandeng sampai kepadatan  $10^{10}$  CFU/ml; konsentrasi bakteri optimum untuk menekan *Microcystis aeruginosa* adalah  $10^6$  CFU/ml; diberikan pada saat *Microcystis aeruginosa* berada pada fase eksponensial. Penelitian tahap kedua dikerjakan pada tahun kedua (2008), meliputi : Ekstraksi enzim pektinase dari bakteri terpilih melalui pengendapan ammonium sulfat; Karakterisasi enzim pektinase hasil ekstraksi untuk mengetahui kondisi optimum; Mengetahui efek algisidal enzim pektinase terhadap *Microcystis aeruginosa* serta Mengetahui pola penyerangan bakteri terhadap *Microcystis aeruginosa* melalui elektron mikroskop (SEM).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan permasalahan yang diajukan pada penelitian ini adalah :

- 1) Bagaimana karakter enzim pektinase (suhu, pH, waktu inkubasi optimum dan konsentrasi ammonium sulfat optimum untuk pengendapan enzim pektinase dari bakteri pektinolitik terpilih (*Burkholderia pseudomallei* P26) agar diperoleh aktivitas enzim maksimum ?
- 2) Bagaimana efek algisidal enzim pektinase terhadap *Microcystis aeruginosa* ?
- 3) Bagaimana pola penyerangan bakteri terpilih terhadap *Microcystis aeruginosa* ?

## 1.3 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di :

- 1) Laboratorium Budidaya Perairan, FKH Unair untuk uji efek algisidal enzim pektinase terhadap *Microcystis aeruginosa*.
- 2) Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA Unair untuk ekstraksi enzim pektinase dan karakterisasi enzim pektinase.
- 3) UFT Elektron Mikroskop, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga.

## 1.4 Hasil yang Diharapkan

Hasil yang ditargetkan dari tahap penelitian ini adalah :

- 1) Mengetahui karakter enzim pektinase (suhu, pH, waktu inkubasi optimum dan konsentrasi ammonium sulfat optimum untuk pengendapan enzim pektinase dari bakteri pektinolitik terpilih (*Burkholderia pseudomallei* P26) agar diperoleh aktivitas enzim maksimum ?
- 2) Mengetahui efek algisidal enzim pektinase terhadap *Microcystis aeruginosa* ?
- 3) Mengetahui pola penyerangan bakteri terpilih terhadap *Microcystis aeruginosa* ?

Sedangkan hasil akhir yang diharapkan dari rangkaian penelitian ini adalah :  
Mendapatkan isolat bakteri pektinolitik sebagai bahan probiotik antagonisme untuk menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* pada tambak dan aman untuk ikan yang dipelihara.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Microcystis aeruginosa* dan Dinding Selnya

*Microcystis aeruginosa* merupakan salah satu plankton spesies alga hijau biru (Cyanophyta), terdiri dari agregat sel bulat, membentuk koloni kecil sampai besar. Tiap sel berdiameter antara 2 – 3 sampai 10  $\mu\text{m}$ , mempunyai vakuola gas sehingga koloni dapat terapung (Paerl, 1998). Untuk merespon faktor lingkungan, plankton ini membentuk dinding sel yang tersusun atas eksopolisakarida dengan komposisi seperti pektin, lebih dari 83 % asam galakturonat (Hoiczuk and Hansel, 2000).

Pektin adalah heteropolisakarida kompleks terdiri dari dua bagian, yaitu bagian halus dan bagian berbulu (de Vries *et al.*, 1999). Bagian halus, merupakan rantai (tulang punggung) terdiri dari residu  $\alpha$ -1,4-asam galakturonat yang dapat mengalami asetilasi atau metilasi. Pada bagian berbulu, residu asam galakturonat pada rantai (tulang punggung), diselingi dengan residu  $\alpha$ -1,2 rhamnosa, juga rantai panjang arabinan dan galaktan (dapat dipotong pada O4). Rantai arabinan terdiri dari rantai utama yaitu residu  $\alpha$ -1,5-arabinofuranosidase yang dapat disubstitusi dengan  $\alpha$ -1,3-arabinofuranosida dan dengan residu feruloil yang dipotong pada O2 terminal dari residu arabinosa. Rantai samping galaktan berisi rantai utama yaitu residu  $\beta$ -1,4-galactopyranosida yang dapat disubstitusi dengan residu feruloil pada O6. Kurang lebih 20-30% residu feruloil pada pektin *sugar beet* dipotong menjadi rantai sisi arabinan, sedangkan residu feruloil yang lain dipotong menjadi rantai sisi galaktan (Guillon and Thibault, 1989). Daerah berambut juga berisi ikatan ester golongan asetil menjadi residu asam galakturonat dari rantai utama ( Scols and Voragen, 1994).



## 2.2 Dampak *Blooming Microcystis aeruginosa*

Cita rasa lumpur pada ikan merupakan masalah serius pada beberapa negara yang membudidayakan ikan. Menurut Lovell and Sackey (1973) *catfish* di USA mempunyai cita rasa lumpur yang disebabkan alga hijau biru. Kamalakkannan (2004) menyatakan penyebab cita rasa lumpur di India adalah *Actinomyces*. Cita rasa lumpur di Indonesia, sering didapatkan pada budidaya ikan bandeng di lokasi tambak Gresik dan Lamongan (Trisyani, 1997 dan Masithah dkk., 2004). Korelasi antara kelimpahan *Microcystis aeruginosa* dengan citarasa lumpur ikan bandeng di Gresik mengikuti persamaan sebagai berikut :  $\text{Citarasa} = 33.585 + 43.616 (1 - e^{-0.015 \text{ kelimpahan}})$ . Dari persamaan tersebut diduga dengan semakin melimpahnya alga *Microcystis aeruginosa*, makin meningkat pula cita rasa lumpur daging ikan bandeng di tambak Gresik (Trisyani, 1997).

Avault (1996) menyatakan bahwa penyebab cita rasa lumpur pada ikan adalah senyawa yang dihasilkan alga hijau biru. Menurut Lelana (1993), penyebab cita rasa lumpur pada ikan adalah senyawa metabolit alga hijau biru yaitu geosmin. Geosmin memiliki nama kimia trans-1, 10-dimetil-trans-9-dekalol (Sarawad, 2004). Beberapa peneliti terdahulu seperti Lowell (1999), Tabachek and Yorkowski (1996), Person (1999) serta Edwards (2005) menyatakan bahwa geosmin diproduksi oleh alga hijau biru pada kolam budidaya ikan dan pada lingkungan payau. Famili alga hijau biru yang umum terdapat pada kolam tambak di daerah tropis dan subtropik adalah spesies *Anabaena*, *Aphanizomenon* dan *Microcystis* yang dicirikan dengan warna perairan hijau pekat (James and Ottey, 1996).

Hasil penelitian Lovell and Sackey (1973) membuktikan bahwa geosmin merupakan metabolit ekstraseluler yang dihasilkan alga ke perairan, kemudian diserap oleh ikan. Smith (1993) menambahkan bahwa penyerapan geosmin dapat terjadi melalui insang, saluran pencernaan dan kulit. Front and Hoyck (1994) mendapatkan bahwa

bagian tubuh yang paling cepat menyerap geosmin adalah insang (6 menit), selanjutnya kulit (1,5 jam), usus kecil (4 jam), dan perut (7 jam). Hal ini menunjukkan bahwa insang adalah bagian tubuh utama untuk menyerap senyawa geosmin.

Selain menyebabkan cita rasa lumpur, plankton ini juga menyebabkan rendahnya populasi jenis plankton lain, walaupun ada jumlahnya tidak banyak. *Microcystis aeruginosa* kurang disukai oleh ikan karena sulit dicerna (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995). Oberholster, *et al.* (2004) di Afrika, Czerwiec (2005) di Amerika dan Jianzong (2002) di China, mendapatkan bahwa *Microcystis aeruginosa* menghasilkan racun yang bernama *microcystins*. Di Indonesia, *Microcystis* menghasilkan racun yang menyebabkan penyakit *haemocytic enteritis* atau penyakit kotoran putih pada ikan dan udang (Yukasano, 2000). Racun Cyanobacteria berpengaruh terhadap pola makan, pertumbuhan, tingkah laku dan kelangsungan hidup mikro dan mesozooplankton. Fulton and Paerl's (1987) mengatakan bahwa *Microcystis aeruginosa* pada konsentrasi  $10^4$  sel/ml menyebabkan toksik dan berpengaruh pada populasi golongan *Rotifer* yaitu *Karatella mixta* dan *Bosmina longirostris*. Beberapa studi tentang efek inhibisi *Microcystis aeruginosa* seperti Penazola *et al* (1990) menunjukkan bahwa metabolit ekstraseluler yang dihasilkan bersifat toksik terhadap beberapa *Rotifer*, *Copepoda* dan *Cladocera*. De Mott *et al* (1991) mendapatkan bahwa *Copepoda* lebih sensitif terhadap *microcystin* dibanding *Cladocera*. Ahlgren *et al* (1990) menambahkan bahwa nilai nutrisi beberapa zooplankton menjadi rendah bila tumbuh pada perairan dengan *blooming Microcystis aeruginosa* karena komposisi beberapa asam lemak berkurang.

Menurut Trisyani (1997) daerah Lamongan dan Gresik sangat cocok untuk pertumbuhan *Myrocystis aeruginosa*. Salinitas di tambak Lamongan dan Gresik tergolong rendah karena lokasi tambak jauh dari laut, sehingga sumber air tambak mengandalkan air tawar dan hujan. Pasang laut yang mampu mengairi tambak hanya pasang tertinggi yang terjadi sebulan dua kali. Kondisi salinitas yang rendah akan

mendukung perkembangan alga Cyanophyceae (*Blue Green algae*), sehingga *Microcystis aeruginosa* akan mendominasi. Dominansi *Microcystis* sp. diperairan juga dipacu oleh kadar Nitrogen dan Phospor yang tinggi akibat bahan organik tidak terbuang dari tambak karena sulitnya pergantian air.

### 2.3 Biodegradasi Pektin

Perbedaan struktur antara rantai utama dari bagian berbulu dan bagian halus pektin, mempunyai implikasi enzim yang berperan dalam degradasi bagian tersebut. Bagian halus dapat dihidrolisa dengan pektin liase (EC 4.2.2.10), pektat liase (EC 4.2.2.2) dan poligalakturonase (EC 3.2.1.15 dan EC 3.2.1.67). Pada *Aspergillus*, gen yang mengkode enzim ini telah diidentifikasi (Harmsen *et al.*, 1990; Bussink *et al.*, 1992a; Parenicova *et al.*, 1998). Enzim yang termasuk dalam degradasi bagian berbulu adalah rhamnogalakturonan hidrolase dan rhamnogalakturonan liase yang sudah teridentifikasi pada *Aspergilli* dan diketahui mempunyai spesififikasi tinggi dalam hidrolisis bagian berambut dari pektin (Mutter *et al.*, 1994a, 1994b dan 1996; Suykerbuyk *et al.*, 1995). Semua enzim tersebut, bekerja secara sinergi dalam mendegradasi pektin (de Vries 1999).

Istilah kimia enzim pektinase adalah poly (1,4- $\alpha$ -D galakturonida) glicanohidrolase, poli (1,4- $\alpha$ -D-galakturonida) liase, dan pektin pektilhidrolase. Sedangkan beberapa nama lain enzim ini adalah fosforilase, pektat liase, pektin liase, pektinesterase dan poligalakturonase ([www.genome.jp](http://www.genome.jp), 2005).

Beberapa mikroba berupa bakteri dan jamur, mempunyai kemampuan untuk mengeluarkan enzim yang dapat menghancurkan pektin menjadi asam galakturonat, suatu senyawa karbohidat yang larut dalam air (Doran, 2002). Kemampuan untuk memecah pektin merupakan sifat banyak bakteri dan digolongkan sebagai bakteri pektinolitik. Beberapa macam bakteri yang dikelompokkan sebagai pektinolitik yaitu

*Ralstonia solanacearum* (Tans – Kersten *et al.*, 1998; Gonzales and Allen, 2003), *Erwinia chrysanthemi* (Tardy *et al.*, 1997), *Pseudomonas cellulose*, *Rhizobium*, *Amicolata* sp. (Gonzales and Allen, 2003), *Bacillus subtilis* (Gonzales and Allen, 2003; [www. textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net), 2005), *Azospirillum irokenense* (Bekri *et al.*, 1999).

#### 2.4 Kontrol Populasi *Microcystis* sp.

Beberapa upaya telah dicoba untuk mengatasi *blooming Microcystis aeruginosa* antara lain memanipulasi level nutrisi sehingga pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* bisa digantikan oleh alga lain (Schoeder, 1998). Boyd (1997) menyarankan mengganti air untuk melarutkan buangan organik. Verhoeven and Eloff (1989) memberikan kuprisulfat atau *algacidae* dalam bentuk kristal / terlarut untuk mengontrol pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*, namun senyawa ini bersifat racun terhadap ikan dan mengurangi kandungan karbondioksida. Penggunaan klorin juga akan berbahaya bagi lingkungan, karena sisa klorin akan terbuang ke perairan. Hoeger and Coworkers (2002) memberikan ozon untuk mengatasi toksin *Microcystis aeruginosa*.

Kontrol secara biologis terhadap *blooming Microcystis aeruginosa* sudah banyak dilakukan di beberapa negara. Di China, Chen, *et al.* (2004) menggunakan ekstrak kulit jeruk dan kulit pisang yang mengandung fenol dan tannin untuk mengatasi pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*. Di Indonesia, Andriyani (1995) menggunakan ekstrak umbi tike untuk menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*.

Upaya lain untuk menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* adalah menggunakan mikroorganisme, seperti penggunaan bakteri *Myxococcus* (Burnham *et al.*, 1991, 1994), *Lysobacter* (Daft and Stewart, 1971, Mitsutani *et al.*, 1987), *Flexibacter* (Gromov *et al.*, 1972), *Myxobacter* (Shilo, 1970, Yamamoto and Suzuki, 1990), *Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp (Yamamoto *et al.*, 1993),

*Cytophaga* (Stewart and Brown, 1969, Yamamoto et al., 1993), *Alcaligenes denitrificans* (Manage et al., 2000).

## **2.5 Pengembangan Probiotik Antagonisme untuk Menekan Pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* (Studi Pendahuluan)**

Pengertian probiotik yang dikemukakan oleh Irianto (2003) adalah suplementasi sel mikroba utuh pakan atau lingkungan hidup yang menguntungkan inang atau hewan yang dipelihara. Tujuan pemberian probiotik pada lingkungan perairan adalah untuk memperbaiki dan mempertahankan mutu lingkungan tambak (menguraikan bahan organik, menurunkan atau menghilangkan senyawa – senyawa beracun) secara alami melalui kerja bakteri pengurai (Sutanto dan Suprpto, 2004). Pemanfaatan bakteri antagonis sebagai probiotik atau agen biokontrol semakin penting dari segi ekosistem akuakultur, mengurangi bahkan menghilangkan penggunaan antibiotik dan bahan kimia, sehingga tercipta sistem budidaya yang ramah lingkungan dan mempersiapkan suatu sistem akuakultur organik (Isnansetyo, 2005).

Verschuere et al. (2000) mengemukakan bahwa mekanisme bakteri antagonis yang dapat digunakan sebagai biokontrol adalah menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan, terjadi kompetisi pemanfaatan senyawa tertentu atau pemanfaatan energi, kompetisi tempat menempel, mempertinggi tanggap kebal inang, meningkatkan kualitas air dan adanya interaksi dengan fitoplankton dan zooplankton.

Hasil penelitian pendahuluan mendapatkan 4 genus bakteri pektinolitik asal tambak Lamongan dan Gresik, yang akan dikembangkan sebagai bahan probiotik antagonisme guna menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*. Bakteri tersebut adalah *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* dan *Micrococcus*. Dasar pengembangan bakteri sebagai probiotik antagonisme adalah kemampuannya menghasilkan enzim pektinase yang mampu mendegradasi pektin sebagai komponen



utama penyusun dinding sel *Microcystis aeruginosa*. Dinding sel merupakan salah satu sistem pertahanan bagi plankton ini untuk menghadapi berbagai dampak faktor lingkungan.

## BAB 3

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 Tujuan Penelitian

##### 3.1.1 Tujuan Jangka Pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai adalah :

- 1) Mengetahui karakter enzim pektinase (suhu, pH, waktu inkubasi optimum dan konsentrasi ammonium sulfat optimum untuk pengendapan enzim pektinase dari bakteri pektinolitik terpilih (*Burkholderia pseudomallei* P26) agar diperoleh aktivitas enzim maksimum ?
- 2) Mengetahui efek algisidal enzim pektinase terhadap *Microcystis aeruginosa* ?
- 3) Mengetahui pola penyerangan bakteri terpilih terhadap *Microcystis aeruginosa* ?

##### 3.1.2 Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai adalah :

- 1) Mendapatkan bakteri pektinolitik sebagai bahan pengembangan probiotik untuk menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*
- 2) Memperoleh metode kontrol terhadap populasi *Microcystis aeruginosa* secara biologis di tambak yang berwawasan lingkungan sehingga aman bagi kegiatan akuakultur berkelanjutan.
- 3) Mengatasi berbagai dampak blooming *Microcystis aeruginosa* terhadap produk dan lingkungan perikanan.

#### 3.2 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

- 1) Memberikan pertimbangan untuk penggunaan probiotik asal lokal guna menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*
- 2) Memberikan wawasan keilmuan terutama terhadap lingkungan budidaya perikanan

## BAB 4

### MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian yang terdiri dari 2 tahap, yaitu :

#### Tahap I (Tahun I)

- 1) Isolasi plankton *Microcystis aeruginosa* dari tambak bandeng di daerah Lamongan dan Gresik sehingga diperoleh isolat murni.
- 2) Mengamati pola pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*.
- 3) Uji aktivitas enzim pektinase semua isolat bakteri pektinolitik. Hasil uji aktivitas ini digunakan sebagai dasar pemilihan satu isolat bakteri yang akan digunakan sebagai bahan probiotik.
- 4) Uji efek algisidal bakteri terpilih terhadap *Microcystis aeruginosa* secara in vitro.
- 5) Uji patogenitas bakteri terpilih terhadap ikan bandeng untuk mengetahui dosis aman bagi ikan.
- 6) Identifikasi bakteri terpilih sampai tahap spesies :
  - o Identifikasi menggunakan *Microbact Package* (fisiologis)
  - o Identifikasi secara molekuler (sekuensing gen 16S-rRNA).

#### Tahap II (Tahun II)

- 1) Karakterisasi enzim pektinase hasil ekstraksi

Tahap ini terdiri dari karakterisasi terhadap masing-masing jenis enzim pektinase dari isolat bakteri pektinolitik terpilih yang meliputi pH, suhu, waktu inkubasi dan pengendapan ammonium sulfat optimum. Hasil penelitian tahap ini digunakan sebagai acuan produksi enzim.

- 2) Uji efek algisidal ekstrak enzim pektinase terhadap *Microcystis aeruginosa*
- 3) Mengetahui pola penyerangan bakteri terhadap *Microcystis aeruginosa* melalui pengamatan mikroskop elektron (SEM).

Selanjutnya, yang disampaikan pada laporan ini adalah materi penelitian tahap II

#### 4.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim pektinase yang diekstrak dari isolat terpilih (hasil penelitian tahap I) yaitu *Burkholderia pseudomallei* serta isolat bakteri tersebut.

#### 4.2 Rancangan Penelitian

Ekstraksi dan karakterisasi enzim pektinase serta pengamatan mode penyerangan bakteri terhadap *Microcystis aeruginosa* (pengamatan elektron mikroskop) dilakukan dengan metode deskriptif dengan teknik pengumpulan data secara observasi langsung yaitu mengadakan pengamatan langsung terhadap gejala-gejala subyek yang diselidiki dalam situasi yang sebenarnya (Silalahi, 2003). Uji efek algisidal ekstrak enzim pektinase terhadap *Microcystis aeruginosa* menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

#### 4.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan adalah :

- 1) Konsentrasi enzim berpengaruh terhadap persentase penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa*



#### 4.4 Bahan Penelitian

Bahan untuk ekstraksi dan karakterisasi enzim pektinase adalah buffer Tris/HCl (10 mM); CaCl<sub>2</sub> (1mM, pH 7,5); ammonium sulfat; substrat PGA (*Polygalacturonic Acid* \_ SIGMA); substrat pektin (60% termetilasi - SIGMA); EDTA; HCl 0,2 ml; 50 mM glycine serta enzim pektinase hasil ekstraksi dari bakteri pektinolitik.

Bahan untuk uji efek algisidal enzim pektinase adalah ekstrak enzim yang telah diendapkan dengan ammonium sulfat, kultur *Microcystis aeruginosa*, nutrien agar serta bahan-bahan untuk uji aktivitas enzim pektinase.

#### 4.5 Peralatan Penelitian

Peralatan untuk ekstraksi dan karakterisasi enzim adalah : *centrifuge*, *ice bath*, spektrofotometer UV-Vis, Erlenmeyer, beaker glass, *water bath set*, *magnetic stirrer*, tabung volumetri, refrigerator, timbangan analitik mikro inkubator, pemanas, refrigerator. Peralatan untuk uji efek algisidal adalah botol sampel, lampu neon untuk penerangan, pipet, mikroskop, counter chamber serta peralatan untuk uji aktivitas enzim.

#### 4.6 Prosedur Pengumpulan Data Penelitian

##### 4.6.1 pH optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim PEL, PL dan PGA dengan variasi pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11 dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 30 °C.

Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara variasi pH terhadap aktivitas masing-masing enzim. Aktivitas maksimum menunjukkan nilai pH optimum.

#### **4.6.2 Suhu optimum**

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim PEL, PL dan PGA dengan variasi suhu inkubasi 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 dan 55 °C. Buffer yang digunakan sesuai pH optimum masing-masing enzim dan diinkubasi selama 60 menit.

Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara variasi suhu inkubasi terhadap aktivitas masing-masing enzim. Aktivitas maksimum menunjukkan suhu inkubasi optimum.

#### **4.6.3 Waktu inkubasi optimum**

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim PEL, PL dan PGA dengan variasi waktu inkubasi 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 dan 135 menit. Buffer dan suhu yang digunakan sesuai pH dan suhu optimum masing-masing enzim.

Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara variasi waktu inkubasi terhadap aktivitas masing-masing enzim. Aktivitas maksimum menunjukkan waktu inkubasi optimum.

#### **4.6.4 Konsentrasi ammonium sulfat optimum untuk pengendapan**

Bakteri dikultur pada media pektin dan dipanen pada waktu produksi maksimum. Ekstrak kasar enzim dipanen dengan cara sentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit.

Sejumlah ammonium sulfat ditimbang untuk memperoleh variasi kejenuhan 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 dan 80 persen. Tabel

kejenuhan ammonium sulfat yang digunakan berdasarkan Aulani'am (2004). Masing-masing dimasukan ke dalam 1 ml ekstrak kasar enzim sedikit demi sedikit sambil dikocok pelan. Selanjutnya diinkubasi semalam dalam keadaan dingin. Setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Fraksi endapan dan supernatan yang diperoleh dipisahkan. Selanjutnya ditambahkan buffer sesuai pH optimum masing-masing enzim sampai volume semula.

Aktivitas enzim pektinase masing-masing diukur. Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara variasi kejenuhan ammonium sulfat terhadap aktivitas masing-masing enzim. Aktivitas maksimum menunjukkan kejenuhan ammonium sulfat optimum.

#### **4.6.5 Efek algisidal ekstrak kasar enzim pektinase dari bakteri terpilih (*Burkholderia pseudomallei* P26) terhadap *Microcystis aeruginosa***

Pada penelitian ini dilakukan inokulasi ekstrak enzim pektinase yang telah dipisahkan dengan pengendapan ammonium sulfat ke dalam kultur murni *Microcystis aeruginosa*. Waktu pemberian ditentukan berdasarkan hasil penelitian tahap I yang memberikan hasil paling baik (penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa* paling tinggi) yaitu hari ke-8 dari kultur *Microcystis aeruginosa*.

Enzim yang diberikan dilarutkan dalam buffer dengan pH sesuai pH optimum masing-masing enzim. Konsentrasi yang diberikan bervariasi sesuai hasil aktivitas enzim pada penelitian tahap I. Kultur murni *Microcystis aeruginosa* sebanyak 50 ml disiapkan dalam botol bening volume 100 ml. Jumlah botol yang disiapkan bergantung jumlah perlakuan dengan 5 ulangan, masing-masing diisi kultur *Microcystis aeruginosa* dengan kepadatan awal sama. Kultur diinkubasi

dengan intensitas pencahayaan 4000 - 5000 lux dan fotoperiode gelap : terang = 12 : 12.

Variabel yang diamati meliputi kepadatan *Microcystis aeruginosa*, aktivitas enzim PEL, aktivitas enzim PL dan aktivitas enzim PGA. Metode penghitungan *Microcystis aeruginosa* dan pengukuran aktivitas enzim sama seperti pada penelitian tahap pertama. Sebelum pengamatan dengan spektrofotometer, dilakukan pemisahan *Microcystis aeruginosa* dan bakteri dengan medium kultur melalui sentrifugasi.

#### **4.6.7 Pengamatan dengan Mikroskop Elektron**

Sampel hasil perlakuan uji efek algisidal bakteri *Burkholderia pseudomallei* terhadap *Microcystis aeruginosa* dan uji efek algisidal enzim pektinase terhadap *Microcystis aeruginosa* diamati menggunakan mikroskop elektron (SEM) sesuai prosedur persiapan yang ditetapkan.

#### **4.7 Analisis Data**

Data yang diperoleh dari karakterisasi enzim dan pengamatan mikroskop elektron dianalisis secara deskriptif. Data hasil uji efek algisidal enzim terhadap *Microcystis aeruginosa* dianalisis dengan analisis varian (ANOVA) menggunakan perangkat lunak SPSS 13. Hasil pengujian hipotesis bermakna bila diperoleh harga  $p < 0,05$

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi enzim diperlukan untuk mengetahui kondisi optimum meliputi pH, suhu, waktu inkubasi dan konsentrasi pengendapan ammonium sulfat untuk tujuan produksi enzim pektinase. Produksi enzim pektinase pada penelitian ini diperlukan pada uji efek algisidal bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 yaitu untuk membuktikan bahwa degradasi dinding sel dilakukan oleh enzim yang dihasilkan bakteri setelah kontak dengan *Microcystis aeruginosa*.

#### 5.1 pH Optimum

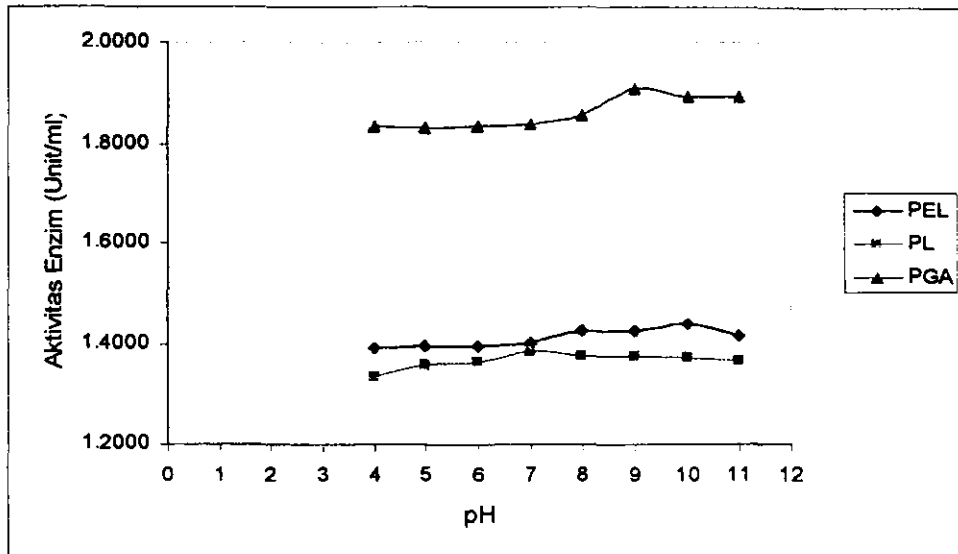
Data aktivitas tiap enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada kondisi pH berbeda disajikan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Aktivitas Enzim Pektinase Bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada Berbagai pH

pH	Aktivitas Enzim (Unit/ml)		
	PEL	PL	PGA
4	1,3902	1,3349	1,8355
5	1,3957	1,3594	1,8323
6	1,3949	1,3636	1,8355
<b>7</b>	1,4014	<b>1,3836</b>	1,8396
8	1,4260	1,3762	1,8567
9	1,4256	1,3751	<b>1,9099</b>
<b>10</b>	<b>1,4371</b>	1,3699	1,8914
11	1,4163	1,3643	1,8909

Keterangan : huruf tercetak tebal menunjukkan nilai aktivitas paling tinggi

Grafik aktivitas tiap enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada berbagai kondisi pH disajikan pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Grafik Aktivitas Enzim Pektinase Bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada Berbagai Kondisi pH

Berdasar tabel 5.1 dan gambar 5.1 diketahui bahwa pH optimum untuk PEL adalah 10, untuk PL adalah 7 dan untuk PGA adalah 9.

Sebagai suatu protein, enzim tidak berbeda dengan protein lainnya, antara lain struktur 3 dimensi molekul enzim dipengaruhi derajat keasaman dari larutan tempat enzim bekerja. Pada beberapa rentang pH yang berbeda, sebanyak itu pula struktur 3 dimensi suatu enzim mungkin berbeda. Dari sedemikian banyak struktur 3 dimensi yang mungkin terjadi, hanya beberapa bahkan mungkin hanya satu saja yang memberi peluang bagi enzim untuk bekerja sebagaimana mestinya. Pada struktur inilah enzim bekerja optimum (Sadikin, 2002). Enzim merupakan protein yang tersusun atas asam amino-asam amino. Masing - masing asam amino memiliki satu gugus  $-NH_2$  dan  $-COOH$ . Pada pH yang lebih rendah dari pH optimum, terdapat konsentrasi  $H^+$  berlebih, sehingga gugus diatas menjadi  $-NH_3^+$  dan  $-COOH$ , atau dikatakan dalam bentuk terprotonasi. Pada pH yang lebih tinggi dari pH optimum, gugus tersebut menjadi  $-NH_2$  dan  $COO^-$ . Interaksi diantara muatan positif dan negatif tersebut sangat berperan dalam menentukan struktur enzim (<http://www.enzymes.co.uk/>, 2005).

Aktivitas enzim PEL seperti terlihat pada kurva Gambar 5.1, menunjukkan adanya 2 puncak walaupun tidak tampak jelas. Dari pH 7 ke pH 8 terjadi peningkatan aktivitas yaitu dari 1,4014 Unit/ml menjadi 1,4260 Unit/ml. Peningkatan pH menjadi 9 berakibat menurunkan aktivitas menjadi 1,4256 Unit/ml. Pada pH 10 aktivitas meningkat lagi sebesar 1,4371 Unit/ml, namun selanjutnya menurun pada pH 11 yaitu sebesar 1,4163 Unit/ml. Adanya 2 puncak seperti ini dimungkinkan karena adanya molekul enzim dalam bentuk beberapa molekul protein yang berbeda (isozim). Tiap molekul isozim bekerja pada pH yang sedikit berbeda (Sadikin, 2002).

Nilai pH optimum ketiga enzim pektinase dari bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 berbeda, untuk PEL adalah pH 10, untuk PL adalah pH 7 dan untuk PGA adalah pH 9. Nilai pH optimum enzim pektinase tiap organisme berbeda. Chen *et al* (1998) mendapatkan pH optimum PL dari *Pythium splendens* adalah 8. Sementara *Curvularia inaequalis* memiliki pH optimum untuk aktivitas PL adalah 5 (Afifi *et al.*, 2002). *Bacillus* sp memiliki pH optimum untuk PEL adalah 11,5; untuk PL adalah 8; sedangkan untuk PGA adalah 10. *Bacillus subtilis* memiliki pH optimum untuk PGA adalah 8 (BRENDA, 2006)

Kisaran pH aktivitas kompleks enzim pektinase dari bakteri ini cukup luas yaitu antara 4 sampai 11 masih terdapat aktivitas, walaupun pH optimum tiap jenis pektinase (PEL, PL dan PGA) berbeda. Kisaran pH yang luas pada kompleks enzim ini sesuai dengan sifat bakteri perairan yang umumnya memiliki toleransi luas terhadap pH (Wiadnya, 1994). Perbedaan pH optimum tiap jenis pektinase penyusun suatu kompleks enzim memiliki keuntungan karena dengan demikian secara keseluruhan enzim dapat bekerja optimum pada kisaran pH lebih luas dengan syarat substrat sesuai.

## 5.2 Suhu Optimum

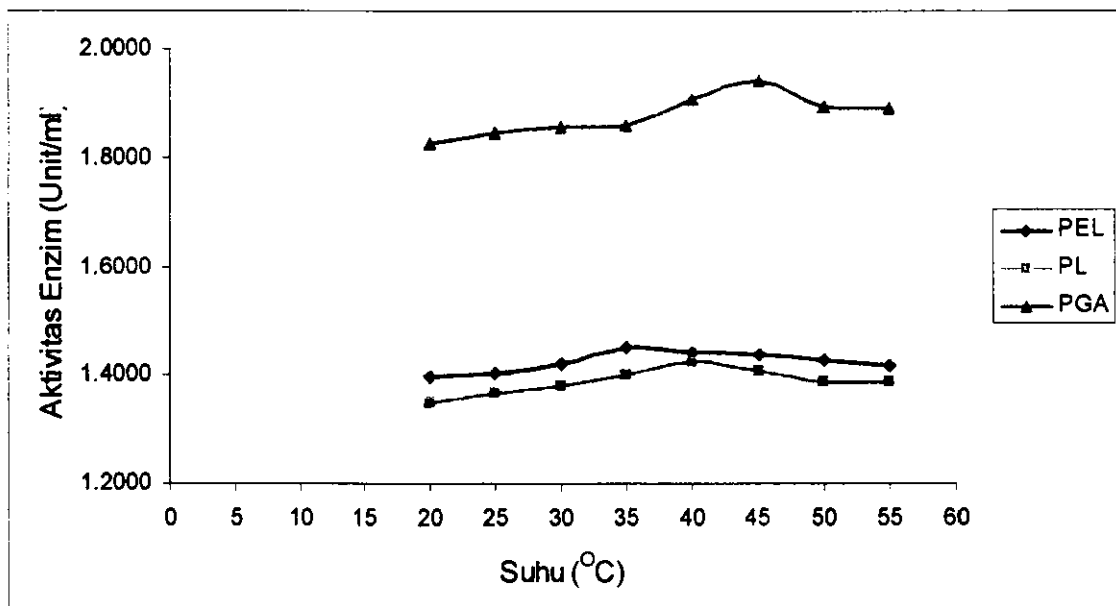
Data aktivitas tiap enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada suhu berbeda disajikan pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Aktivitas Enzim Pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada Berbagai Suhu

Suhu (°C)	Aktivitas Enzim (Unit/ml)		
	PEL	PL	PGA
20	1,3951	1,3499	1,8286
25	1,4036	1,3660	1,8480
30	1,4198	1,3805	1,8580
<b>35</b>	<b>1,4496</b>	1,3980	1,8606
40	1,4388	<b>1,4236</b>	1,9086
<b>45</b>	1,4354	1,4068	<b>1,9419</b>
50	1,4262	1,3869	1,8957
55	1,4171	1,3855	1,8914

Keterangan : huruf tercetak tebal menunjukkan nilai aktivitas paling tinggi

Grafik aktivitas tiap enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada berbagai suhu inkubasi disajikan pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Grafik Aktivitas Enzim Pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada Berbagai Suhu Inkubasi

Berdasar tabel 5.2 dan gambar 5.2 diketahui bahwa suhu inkubasi optimum untuk PEL adalah 35°C, untuk PL adalah 40°C dan untuk PGA adalah 45°C.



Reaksi yang dikatalisis oleh enzim juga dipengaruhi oleh suhu. Sampai batas tertentu, apabila suhu meningkat maka laju reaksi enzimatik juga meningkat hingga tercapai suhu optimum yaitu suhu dimana terjadi laju reaksi maksimum. Selanjutnya aktivitas akan menurun karena enzim mengalami denaturasi. Pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimum, gerak termodinamik berkurang sehingga tumbukan antara molekul enzim dan substrat berkurang, akibatnya laju reaksi enzimatik berkurang. Bila kontak antara molekul enzim dan substrat berkurang, maka pembentukan kompleks enzim-substrat juga berkurang. Padahal kompleks enzim-substrat diperlukan untuk pembentukan produk. Peningkatan suhu di atas suhu optimum menyebabkan laju reaksi menurun, disebabkan walaupun gerak termodinamik meningkat namun molekul protein mengalami denaturasi sehingga bangun tiga dimensi berubah secara bertahap (Sadikin, 2002). Kerusakan struktur enzim disebabkan ikatan yang menjaga struktur enzim putus sehingga molekul enzim akan terbuka. Terbukanya molekul enzim akan mengakibatkan kerusakan sisi aktif sehingga enzim menjadi inaktif yang pada akhirnya menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Akibatnya pembentukan kompleks enzim substrat semakin berkurang dan produk juga berkurang.

Suhu inkubasi optimum tiap jenis enzim pektinase dari bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 berbeda, yaitu 35°C untuk PEL, 40 °C untuk PL dan 45 °C untuk PGA. Berdasarkan suhu tersebut, maka *Burkholderia pseudomallei* P26 tergolong dalam mesofilik, yaitu mikroba yang tumbuh optimum pada suhu antara 20 – 45 °C (Prescott et al., 1987). Suhu optimum ketiga enzim tersebut tergolong tinggi bila dibanding dengan kisaran suhu perairan umumnya, yaitu 25 - 35°C. Hal ini sangat menguntungkan untuk tujuan degradasi *Microcystis aeruginosa* karena plankton ini tergolong alga termofilik yang hidup optimal pada suhu perairan tinggi, yaitu 35 – 40°C (Paeri, 1998).

Pada organisme termofilik, seperti *Thermotoga* sp, suhu optimum aktivitas enzim mencapai 105 °C. Nilai suhu optimum aktivitas pektinase pada tiap organisme berbeda.

*Curvularia inaequalis* memiliki suhu optimum untuk aktivitas PL adalah 45°C (Afifi et al., 2002), sedangkan *Pseudomonas marginalis* adalah 30 °C dan *Aspergillus japonicus* adalah 55 °C. *Erwinia chrysanthemi* memiliki suhu optimum untuk aktivitas PEL adalah 35 °C, sedangkan *Thermoanaerobacter italicus* adalah 80. *Aspergillus niger* memiliki aktivitas PGA optimum pada suhu 40 dan *Clostridium thermosulfurogenes* 75 °C (BRENDA, 2006)

### 5.3 Waktu Inkubasi Optimum

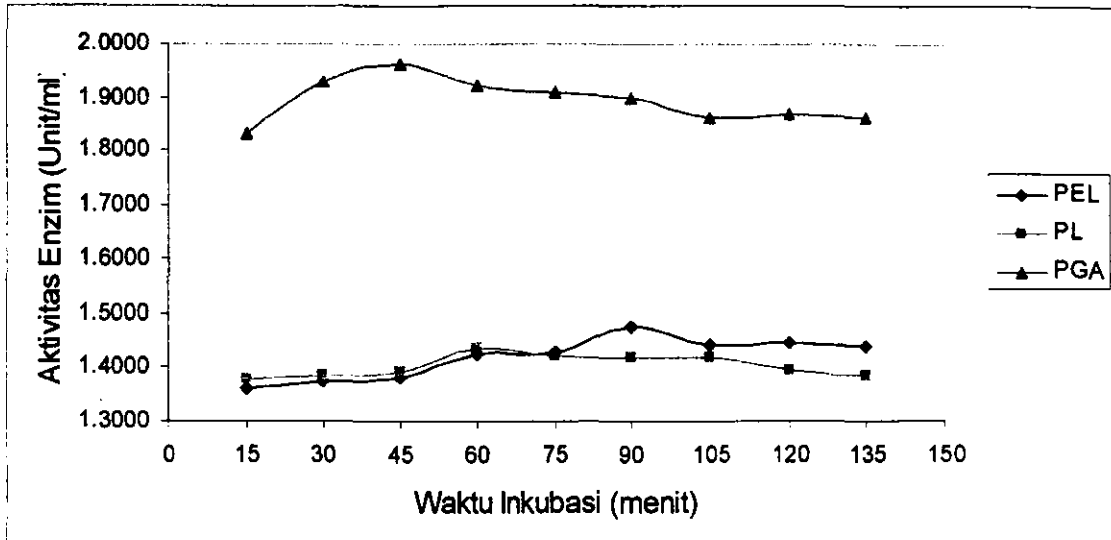
Data aktivitas tiap enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada waktu inkubasi berbeda disajikan pada Tabel 5.3 dan Gambar 5.3. Berdasar tabel dan gambar tersebut, diketahui bahwa waktu inkubasi optimum untuk PEL adalah 45 menit, untuk PL adalah 60 menit dan untuk PGA adalah 90 menit.

Tabel 5.3 Aktivitas Enzim Pektinase Bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada Berbagai Waktu Inkubasi

Waktu Inkubasi (menit)	Aktivitas Enzim (Unit/ml)		
	PEL	PL	PGA
15	1,3592	1,3794	1,8323
30	1,3735	1,3838	1,9305
<b>45</b>	<b>1,3814</b>	1,3913	<b>1,9639</b>
<b>60</b>	1,4267	<b>1,4336</b>	1,9219
75	1,4294	1,4208	1,9101
<b>90</b>	<b>1,4754</b>	1,4173	1,8972
105	1,4427	1,4176	1,8627
120	1,4470	1,3931	1,8675
135	1,4375	1,3860	1,8605

Keterangan : huruf tercetak tebal menunjukkan nilai aktivitas paling tinggi

Grafik aktivitas tiap enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada berbagai waktu inkubasi disajikan pada gambar 5.3.



Gambar 5.3 Grafik Aktivitas Enzim Pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada Berbagai Waktu Inkubasi

Waktu inkubasi diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat. Waktu inkubasi yang pendek, menyebabkan kesempatan enzim untuk bereaksi dengan substrak berkurang, sehingga produk yang dihasilkan sedikit. Waktu inkubasi yang lebih panjang (hingga mencapai optimal), akan memberi kesempatan enzim untuk bereaksi dengan substrat sehingga produk yang dihasilkan akan meningkat. Sedangkan bila waktu inkubasi ditingkatkan lagi, belum tentu diikuti peningkatan produk, bahkan bisa jadi cenderung menurun akibat degradasi produk oleh enzim lain (jika enzim dalam bentuk ekstrak kasar yang masih bercampur dengan enzim lain) atau kerusakan enzim akibat panas berlebih.

Seperti halnya pH dan suhu, waktu inkubasi tiap jenis enzim pektinase dari bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 juga berbeda. Waktu inkubasi optimum untuk PEL adalah 45 menit, untuk PL adalah 60 menit dan untuk PGA adalah 90 menit. Afifi *et al.* (2002) memperoleh waktu inkubasi optimum aktivitas pektinase pada *Curvularia inaequalis* adalah 50 menit

#### 5.4 Pengendapan Ammonium Sulfat

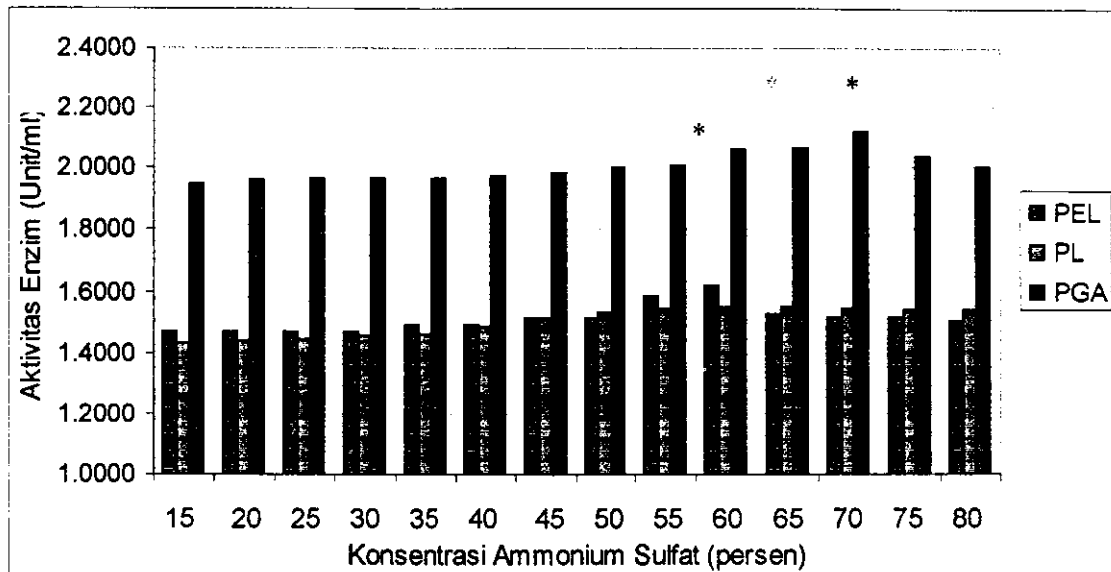
Data aktivitas tiap enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada konsentrasi pengendapan ammonium sulfat berbeda disajikan pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Aktivitas Enzim Pektinase Bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada Berbagai Konsentrasi Pengendapan Ammonium Sulfat

Konsentrasi Ammonium Sulfat (%)	Aktivitas Enzim (Unit/ml)		
	PEL	PL	PGA
15	1,4686	1,4326	1,9509
20	1,4669	1,4371	1,9587
25	1,4674	1,4456	1,9642
30	1,4675	1,4563	1,9666
35	1,4910	1,4611	1,9682
40	1,4926	1,4861	1,9712
45	1,5139	1,5160	1,9831
50	1,5151	1,5304	2,0016
55	1,5885	1,5454	2,0082
<b>60</b>	<b>1,6237</b>	1,5489	2,0621
<b>65</b>	1,5261	<b>1,5487</b>	2,0673
<b>70</b>	1,5138	1,5447	<b>2,1208</b>
75	1,5133	1,5414	2,0389
80	1,5035	1,5362	2,0037

Keterangan : huruf tercetak tebal menunjukkan nilai aktivitas paling tinggi

Grafik aktivitas tiap enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada berbagai konsentrasi pengendapan ammonium sulfat disajikan pada gambar 5.4. Berdasar tabel 5.4 dan gambar 5.4 diketahui bahwa konsentrasi ammonium sulfat untuk pengendapan PEL adalah 60 persen, untuk PL adalah 65 persen dan untuk PGA adalah 70 persen. Untuk tujuan produksi enzim yang digunakan pada penelitian tahap III, digunakan pengendapan ammonium sulfat 60 persen.



Gambar 5.4 Grafik Aktivitas Enzim Pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada Berbagai Konsentrasi Pengendapan Ammonium Sulfat

Keterangan : \* : Aktivitas optimum PEL  
 \* : Aktivitas optimum PL  
 \* : Aktivitas optimum PGA

Pengendapan ammonium sulfat sering disebut sebagai metode "salting out". Protein umumnya larut dalam air karena memiliki gugus hidrofilik. Kelarutan ini merupakan fungsi kekuatan ionik dan pH larutan. Bila kekuatan ionik dinaikkan dengan penambahan garam, maka protein akan mengendap. Pada konsentrasi garam yang tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik mantel air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik dimana sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein.

Mengetahui persentase ammonium sulfat untuk pengendapan enzim sangat penting terutama untuk tujuan isolasi dan produksi enzim, agar diperoleh enzim yang lebih pekat. Hasil pengendapan ammonium sulfat terhadap pektinase dari bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 diketahui bahwa tiap jenis enzim pektinase mengendap optimum pada konsentrasi berbeda. Enzim PEL mengendap optimum pada konsentrasi ammonium sulfat 60 persen, enzim PL pada 65 persen dan enzim PGA pada 70 persen.

Setelah pengendapan dengan ammonium sulfat, aktivitas enzim mengalami peningkatan dibanding ekstrak kasar. PEL meningkat dari 1,3644 Unit/ml menjadi 1,6237 Unit/ml setelah diendapkan dengan konsentrasi ammonium sulfat 60 persen. PL meningkat dari 1,3631 Unit/ml menjadi 1,5487 Unit/ml setelah diendapkan dengan ammonium sulfat 65 persen, sedangkan PGA meningkat dari 1,3903 Unit/ml menjadi 1,5705 Unit/ml dengan pengendapan ammonium sulfat 70 persen. Affi *et al.* (2002) mendapatkan aktivitas PL *Curvularia inaequalis* meningkat dari 0,84 Unit/mg menjadi 5,39 Unit/mg setelah mengalami pengendapan dengan ammonium sulfat 70 persen.

Pada penelitian ini, untuk tujuan produksi enzim, ekstrak kasar enzim diendapkan pada ammonium sulfat 60 persen.

### **5.5 Efek Algisidal Ekstrak Kasar Enzim Pektinase dari Bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 terhadap *Microcystis aeruginosa***

Perlakuan pemberian ekstrak kasar enzim pektinase bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 terhadap *Microcystis aeruginosa* ditujukan untuk membuktikan bahwa degradasi dinding sel *Microcystis aeruginosa* terjadi sebagai akibat kerja enzim pektinase.

Pada tahap ini dilakukan pemberian enzim pektinase pada kultur *Microcystis aeruginosa*. Pemberian enzim dilakukan pada hari ke-8 dari pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* (berdasar hasil tahap sebelumnya). Enzim yang diberikan berupa ekstrak kasar yang telah diendapkan dengan ammonium sulfat pada konsentrasi 60%. Selanjutnya enzim dilarutkan pada buffer pH 7 dan pH 9 (berdasar penelitian tahap karakterisasi enzim). Pada tiap pH enzim, ekstrak kasar enzim yang diberikan terdiri dari 6 konsentrasi, yaitu

0,2 ml dalam 50 ml kultur : setara dengan konsentrasi PL 0,00625 Unit/ml

0,4 ml dalam 50 ml kultur : setara dengan konsentrasi PL 0,01251 Unit/ml

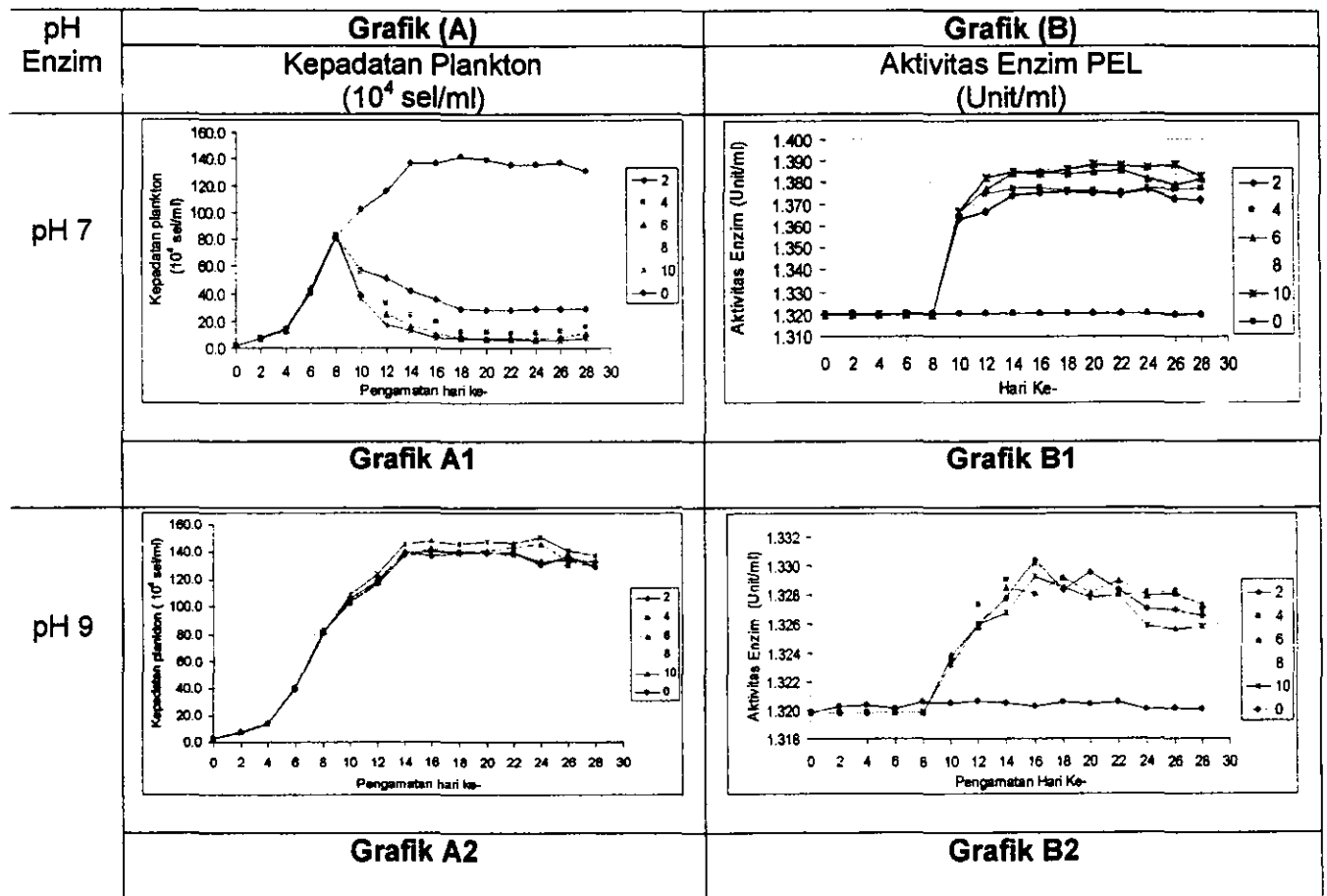
0,6 ml dalam 50 ml kultur : setara dengan konsentrasi PL 0,01877 Unit/ml

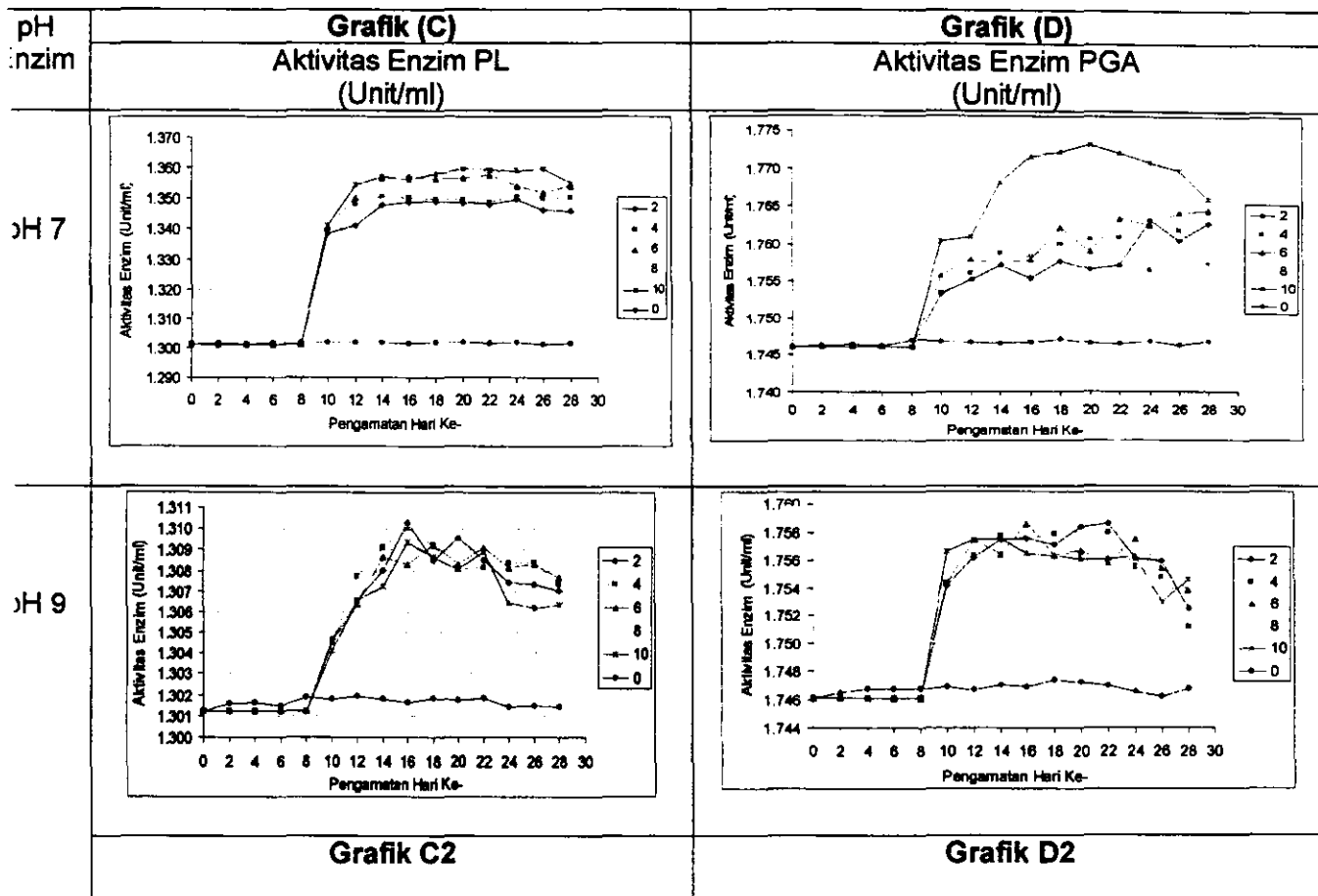
0,8 ml dalam 50 ml kultur : setara dengan konsentrasi PL 0,02502 Unit/ml

1,0 ml dalam 50 ml kultur : setara dengan konsentrasi PL 0,03128 Unit/ml

Kontrol : tanpa pemberian enzim

Pengamatan dilakukan terhadap kepadatan plankton (sel/ml), aktivitas enzim PEL, PL dan PGA (Unit/ml). Pengamatan dilakukan tiap 2 hari sampai hari ke-28. Hasil yang diperoleh disajikan pada gambar 5.5.





Gambar 5.5 Grafik Kepadatan *Microcystis aeruginosa* (A), Aktivitas Enzim PEL (B), PL (C) dan PGA (D) Tiap Pengamatan Pada Perlakuan Pemberian Enzim terhadap *Microcystis aeruginosa*

Keterangan :

- 2 = Pemberian enzim dengan konsentrasi PL 0,00625 Unit/ml (0.2 ml)
- 4 = Pemberian enzim dengan konsentrasi PL 0,01251 Unit/ml (0.4 ml)
- 6 = Pemberian enzim dengan konsentrasi PL 0,01877 Unit/ml (0.6 ml)
- 8 = Pemberian enzim dengan konsentrasi PL 0,02502 Unit/ml (0.8 ml)
- 10 = Pemberian enzim dengan konsentrasi PL 0,03128 Unit/ml (1,0 ml)
- K = Tanpa pemberian enzim (Kontrol)

### 5.5.1 Pemberian enzim pektinase pH 7

Kepadatan *Microcystis aeruginosa* (Grafik A1) mengalami penurunan setelah pemberian enzim pH 7. Konsentrasi perlakuan 0,00625 Unit/ml (0,2 ml) memiliki kemampuan menurunkan kepadatan plankton paling rendah, disusul perlakuan 0,01251 Unit/ml (0,4 ml). Perlakuan 0,01877 Unit/ml (0,6 ml); 0,02502 Unit/ml (0,8 ml) dan



0,03128 Unit/ml (1,0 ml) memberikan hasil penurunan kepadatan plankton relatif sama. Pada perlakuan enzim 0,00625 Unit/ml (0,2 ml), kepadatan *Microcystis aeruginosa* menurun dan mulai meningkat kembali pada pengamatan hari ke-22. Pada perlakuan 0,01251 Unit/ml (0,4 ml), penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa* terjadi lebih tinggi dibanding perlakuan enzim 0,00625 Unit/ml (0,2 ml) dan kepadatan *Microcystis aeruginosa* mulai meningkat kembali pada pengamatan hari ke-24. Perlakuan enzim 0,01877 Unit/ml (0,6 ml); 0,02502 Unit/ml (0,8 ml) dan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) secara kuantitatif menghasilkan penurunan kepadatan plankton relatif sama namun memiliki perbedaan pada lamanya penurunan bertahan. Pada perlakuan 0,01877 Unit/ml (0,6 ml), kepadatan *Microcystis aeruginosa* mulai meningkat kembali pada pengamatan hari ke-26, sedangkan perlakuan 0,02502 Unit/ml (0,8 ml) dan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) pada pengamatan hari ke-28.

Aktivitas enzim PEL dan PL pada pemberian enzim pH 7 (Grafik B1 dan C1) tiap perlakuan konsentrasi enzim, mempunyai pola yang sama. Pada pengamatan hari ke-10 sampai ke-18, aktivitas enzim cenderung meningkat dengan semakin menurunnya kepadatan *Microcystis aeruginosa* (Grafik A1). Pada pengamatan hari selanjutnya, aktivitas enzim mengalami peningkatan dan penurunan secara bergantian. Pada akhir pengamatan, aktivitas enzim cenderung mengalami penurunan. Pada perlakuan Kontrol, aktivitas enzim memiliki nilai jauh lebih rendah dibanding semua perlakuan.

Aktivitas enzim PGA pada pemberian enzim pH 7 (Grafik D1) secara keseluruhan membutuhkan waktu lebih lama untuk mencapai nilai maksimum dibanding pada aktivitas enzim PEL dan PL. Aktivitas enzim PEL dan PL mencapai maksimum pada pengamatan hari ke-14, sedangkan enzim PGA mencapai aktivitas maksimum pada waktu yang bervariasi antara hari ke-18 sampai hari ke-24. Pada perlakuan 0,00625 Unit/ml (0,2 ml), aktivitas enzim mengalami peningkatan terus dan mencapai puncak pada pengamatan hari ke 24, selanjutnya mengalami penurunan. Pada

perlakuan 0,01251 Unit/ml (0,4 ml), aktivitas mengalami peningkatan terus sampai pengamatan hari ke-22, selanjutnya mengalami penurunan dan peningkatan dengan pola tidak teratur. Pada perlakuan 0,01877 Unit/ml (0,6 ml), aktivitas enzim mengalami peningkatan sampai hari ke-18, selanjutnya mengalami peningkatan dan penurunan dengan pola yang tidak teratur. Pada perlakuan enzim 0,02502 Unit/ml (0,8 ml), aktivitas enzim meningkat terus sampai pengamatan hari ke-24, selanjutnya mengalami penurunan. Pada pengamatan hari ke-16, nilai aktivitas enzim lebih tinggi dibanding ketiga perlakuan yang lebih rendah (0,00625 Unit/ml (0,2 ml) – 0,01877 Unit/ml (0,6 ml)). Pada perlakuan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml), aktivitas enzim tiap pengamatan cenderung lebih tinggi dibanding perlakuan yang lebih rendah (0,00625 Unit/ml (0,2 ml) – 0,02502 Unit/ml (0,8 ml)). Aktivitas enzim cenderung meningkat sampai pengamatan hari ke-20, selanjutnya mengalami penurunan.

### **5.5.2 Pemberian enzim pektinase pH 9**

Kepadatan *Microcystis aeruginosa* pada pemberian enzim pH 9 (Grafik A2) mengalami kenaikan seperti pada Kontrol. Bahkan pada beberapa pengamatan relatif lebih tinggi dibanding Kontrol. Pada akhir pengamatan (hari ke-28) kepadatan *Microcystis aeruginosa* pada semua perlakuan dan Kontrol mulai menurun.

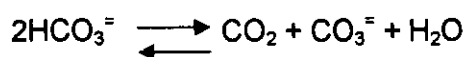
Aktivitas enzim PEL dan PL pada pemberian enzim pH 9 (Grafik B2 dan C2) mengalami peningkatan sampai pengamatan hari ke-14 dan 16. Pada pengamatan selanjutnya aktivitas enzim mengalami peningkatan dan penurunan secara bergantian dan cenderung menurun pada akhir pengamatan. Aktivitas enzim PEL dan PL pada pemberian enzim pH 9 (Grafik B2 dan C2) memiliki nilai lebih rendah dibanding pemberian enzim pH 7 (Grafik B1 dan C1). Hal ini terjadi pada tiap pengamatan.

Aktivitas enzim PGA pada pemberian enzim pH 9 (Grafik D2) cenderung memiliki pola sama pada tiap perlakuan, yaitu mengalami peningkatan sampai hari ke-12,

selanjutnya mengalami kenaikan dan penurunan secara bergantian dan mengalami penurunan pada akhir pengamatan. Secara keseluruhan, nilai aktivitas enzim PGA pada pemberian enzim pH 9 adalah lebih rendah dibanding pemberian enzim pH 7.

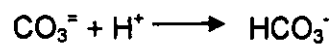
Pemberian enzim pektinase pH 9 tidak menghasilkan penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa*, tapi pada pemberian konsentrasi tinggi justru meningkatkan kepadatan *Microcystis aeruginosa*. Aktivitas enzim PEL, PL maupun PGA masih terdeteksi walau dalam konsentrasi rendah, jauh dibawah aktivitas enzim pektinase pH 7. Hal ini diduga disebabkan enzim tidak dapat bekerja optimal pada kondisi pH 9, sehingga *Microcystis aeruginosa* tidak terdegradasi dan pertumbuhannya semakin meningkat. Apalagi didukung pH medium menjadi 7,5 (lihat tabel 5.6) setelah pemberian enzim pH 9, dimana *Microcystis aeruginosa* menyukai lingkungan basa untuk pertumbuhannya.

Seperti pada kultur murni *Microcystis aeruginosa*, nilai pH kultur *Microcystis aeruginosa* yang diberi perlakuan enzim 9 meningkat dari 7,5 menjadi 8,5 pada akhir pengamatan. Mekanisme meningkatnya pH pada pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* dapat dijelaskan sebagai berikut : Nilai pH dalam kultur plankton berkaitan dengan konsentrasi CO<sub>2</sub> dalam medium yang dipengaruhi oleh proses fotosintesis dan respirasi. Fotosintesis memerlukan CO<sub>2</sub>, banyaknya CO<sub>2</sub> yang diperlukan bergantung pada besarnya populasi plankton dan pencahayaan. Intensitas fotosintesis yang tinggi menyebabkan CO<sub>2</sub> pada media rendah bahkan habis. Pada kondisi demikian terjadi konversi cadangan CO<sub>2</sub>, yaitu 2 ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> berdisosiasi menjadi 1 molekul CO<sub>2</sub> dan 1 molekul CO<sub>3</sub><sup>=</sup> :



Ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> merupakan komponen alkalinitas dalam perairan. Semakin banyak CO<sub>2</sub> yang diperlukan, maka semakin tinggi pula konsentrasi CO<sub>3</sub><sup>=</sup> yang dihasilkan. Hidrolisis CO<sub>3</sub><sup>=</sup>

hanya menggantikan 1 ion  $\text{HCO}_3^-$  untuk setiap pasang ion  $\text{HCO}_3^-$  yang hilang dalam mempertahankan keseimbangan pada saat  $\text{CO}_2$  habis :



Oleh karena itu hidrolisis  $\text{CO}_3^{2-}$  hanya menggantikan secara parsial dari  $\text{HCO}_3^-$  yang dikeluarkan pada saat  $\text{CO}_2$  habis dan sebagai akibatnya pH akan meningkat karena konsentrasi  $\text{CO}_3^{2-}$  meningkat (Wiadnya, 1994).

### 5.5.3 Analisis statistik data pemberian enzim pH 7

Berdasar hasil yang tergambar pada Grafik 5.5 diketahui bahwa pemberian enzim pH 7 dapat menghasilkan penurunan kepadatan *Microcrocystis aeruginosa*, sedangkan pada pH 9 tidak terjadi. Dengan demikian, data pada pemberian enzim pH 7, selanjutnya dianalisis statistik. Untuk proses analisis statistik, kepadatan *Microcrocystis aeruginosa* dinyatakan dalam laju penurunan kepadatan (sel/hari) antara hari ke-8 sampai hari ke-20, sedangkan untuk data aktivitas enzim adalah hari ke-20. Data laju penurunan kepadatan *Microcrocystis aeruginosa*, aktivitas enzim PEL, PL dan PGA setelah perlakuan pemberian enzim pH 7 yang dianalisis statistik disajikan pada Lampiran 1. Analisis univariat konsentrasi enzim pH 7 terhadap laju penurunan kepadatan *Microcrocystis aeruginosa* aktivitas enzim PEL, PL dan PGA disajikan pada Lampiran 2, 3, 4 dan 5.

Hasil uji F menunjukkan perlakuan konsentrasi enzim memberikan pengaruh berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap laju penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa*, aktivitas enzim PEL, PL dan PGA. Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, dilakukan Uji Tukey (HSD). Berdasar Uji Tukey, diketahui bahwa perlakuan konsentrasi enzim 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) memberikan hasil laju penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa* paling tinggi, disusul 0,01877 Unit/ml (0,6 ml) dan 0,02502 Unit/ml (0,8 ml) (ketiganya tidak berbeda), kemudian 0,01251 Unit/ml (0,4 ml) dan 0,00625 Unit/ml (0,2

ml). Perlakuan Kontrol tidak terjadi penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa*. Terhadap aktivitas enzim PEL dan PL, perlakuan konsentrasi 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) memberikan aktivitas enzim paling tinggi, disusul 0,02502 Unit/ml (0,8 ml); 0,01877 Unit/ml (0,6 ml) (ketiganya tidak berbeda); 0,01251 Unit/ml (0,4 ml) dan 0,00625 Unit/ml (0,2 ml) (keduanya tidak berbeda) dan Kontrol. Terhadap aktivitas enzim PGA, perlakuan konsentrasi 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) memberikan hasil paling tinggi, disusul 0,02502 Unit/ml (0,8 ml) dan 0,01251 Unit/ml (0,4 ml), (keduanya tidak berbeda), kemudian 0,01877 Unit/ml (0,6 ml) dan 0,00625 Unit/ml (0,2 ml) (antara 0,4; 0,6 dan 0,2 ml tidak berbeda) dan terakhir Kontrol.

Tabel 5.5 Hasil Analisis Uniuariat Pemberian Enzim Pektinase pH 7 dengan Konsentrasi Berbeda terhadap Laju Penurunan Kepadatan Plankton, Aktivitas Enzim PEL, PL dan PGA

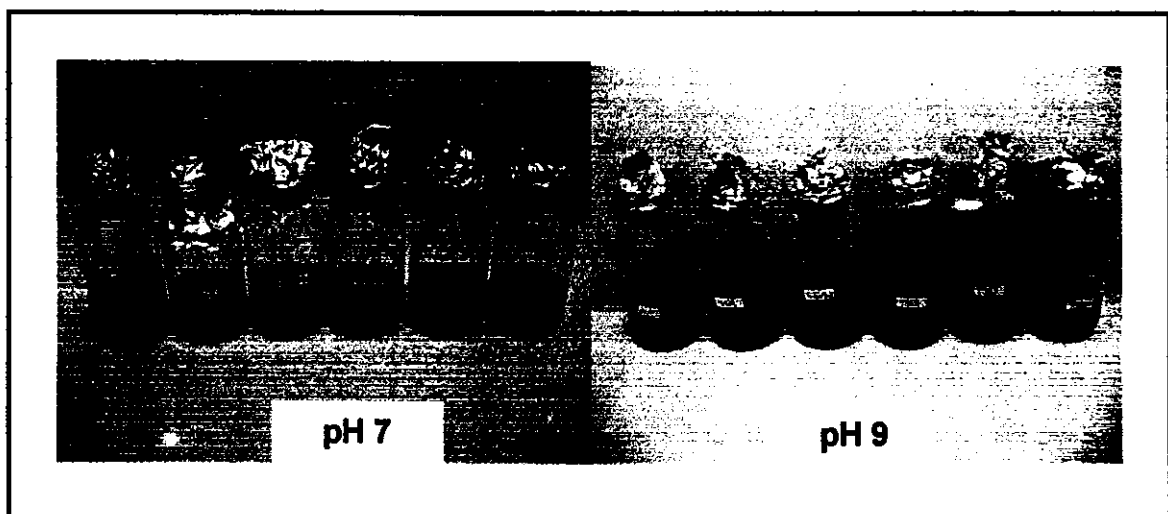
Konsentrasi Enzim Unit/ml	Laju Penurunan Kepadatan <i>M. aeruginosa</i> (sel/hari) ± SD	Aktivitas Enzim PEL (Unit/ml) ± SD	Aktivitas Enzim PL (Unit/ml) ± SD	Aktivitas Enzim PGA (Unit/ml) ± SD
K	-4,82 <sup>a</sup> ± 0,27	1,320 <sup>a</sup> ± 0,001	1,302 <sup>a</sup> ± 0,001	1,747 <sup>a</sup> ± 0,000
0,00625 (0,2 ml)	4,50 <sup>b</sup> ± 0,36	1,376 <sup>b</sup> ± 0,002	1,349 <sup>b</sup> ± 0,002	1,757 <sup>b</sup> ± 0,002
0,01251 (0,4 ml)	5,61 <sup>c</sup> ± 0,24	1,377 <sup>b</sup> ± 0,003	1,350 <sup>b</sup> ± 0,002	1,761 <sup>bc</sup> ± 0,003
0,01877 (0,6 ml)	6,27 <sup>d</sup> ± 0,28	1,385 <sup>c</sup> ± 0,004	1,357 <sup>c</sup> ± 0,004	1,759 <sup>b</sup> ± 0,002
0,02502 (0,8 ml)	6,26 <sup>d</sup> ± 0,30	1,387 <sup>c</sup> ± 0,002	1,358 <sup>c</sup> ± 0,002	1,766 <sup>c</sup> ± 0,003
0,03128 (1,0 ml)	6,32 <sup>d</sup> ± 0,48	1,388 <sup>c</sup> ± 0,003	1,360 <sup>c</sup> ± 0,003	1,773 <sup>d</sup> ± 0,002

Keterangan : nilai rata-rata yang dikuti superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan adanya korelasi positif antara laju penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa* dengan aktivitas enzim PEL ( $r = 0,989$ ), dengan aktivitas enzim PL ( $r = 0,989$ ) dan dengan aktivitas enzim PGA ( $r = 0,761$ ).

Seperti halnya pada perlakuan pemberian bakteri pada hari ke-8, pemberian enzim pH 7 menyebabkan kekeruhan kultur *Microcystis aeruginosa* berkurang akibat plankton mati. Gambar kultur *Microcystis aeruginosa* dalam botol setelah mendapat perlakuan enzim pH 7 disajikan pada Gambar 5.6. Pada gambar tersebut tampak perbedaan kekeruhan kultur *Microcystis aeruginosa* setelah perlakuan pemberian enzim. Pada pemberian enzim pH 7, kultur menjadi bening dengan semakin meningkatnya konsentrasi enzim yang diberikan. Pada pemberian enzim pH 9 terjadi sebaliknya, kultur semakin keruh dengan semakin meningkatnya konsentrasi enzim yang diberikan.

Pengukuran pH dilakukan terhadap berbagai kondisi kultur *Microcystis aeruginosa* guna mengetahui adanya kerja enzim pektinase (selain melalui pengukuran produk / aktivitas enzim). Hasil pengukuran pH berbagai kondisi kultur *Microcystis aeruginosa* disajikan pada tabel 5.6.



Gambar 5.6 Perbedaan Kekeruhan Kultur *Microcystis aeruginosa* Setelah Pemberian Enzim Pektinase. pH 7 dari kiri ke kanan : K; 1,0 ml; 0,8 ml; 0,6 ml; 0,4 ml dan 0,2 ml. Terjadi perubahan kekeruhan setelah perlakuan, akibat *Microcystis aeruginosa* mengendap. pH 9 dari kiri ke kanan : 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; 1,0 ml dan K. Tidak terjadi perubahan kekeruhan setelah perlakuan.

Tabel 5.6 Hasil Pengukuran pH Berbagai Kondisi Kultur *Microcystis aeruginosa*

	Nilai pH				
	Awal kultur	Hari ke-8		Hari ke-9	Akhir kultur (hari ke-30)
		Sebelum perlakuan	Setelah perlakuan		
Medium Gorham	7	7	7	7	7
<i>Microcystis aeruginosa</i>	7	7	7	7	8
<i>Microcystis aeruginosa</i> + enzim pH 7	7	7	7	7	6,5
<i>Microcystis aeruginosa</i> + enzim pektinase pH 9	7	7	7,5	7,5	8,5

Pemberian enzim pH-7 dapat menurunkan kepadatan *Microcystis aeruginosa* secara drastis. Berdasar hasil statistik (Tabel 5.5) diketahui bahwa perlakuan 0,00625 Unit/ml (0,2 ml) menghasilkan laju penurunan paling rendah. Selanjutnya sampai perlakuan konsentrasi 0,01877 Unit/ml (0,6 ml), laju penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa* juga semakin meningkat dengan semakin meningkatnya konsentrasi enzim. Hal ini menunjukkan ketiganya masih berada pada pola bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat, maka aktivitas enzim juga semakin meningkat (Sadikin, 2003). Sedangkan pada perlakuan 0,01877 Unit/ml (0,6 ml); 0,02502 Unit/ml (0,8 ml) dan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml), penambahan konsentrasi enzim tidak berpengaruh ( $p < 0,05$ ) terhadap laju penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa*. Hal ini berarti penambahan konsentrasi enzim, sudah tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Hal ini didukung hasil uji Tukey terhadap aktivitas enzim PEL dan PL yang mendapatkan bahwa perlakuan 0,01877 Unit/ml (0,6 ml); 0,02502 Unit/ml (0,8 ml) dan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) tidak berbeda, yang berarti tidak terjadi peningkatan aktivitas degradasi walaupun konsentrasi enzim ditingkatkan.

Perbedaan konsentrasi enzim menghasilkan perbedaan lamanya *Microcystis aeruginosa* meningkat lagi setelah terjadi penurunan. Pada perlakuan 0,00625 Unit/ml (0,2 ml), *Microcystis aeruginosa* mulai meningkat pada pengamatan hari ke 22, selanjutnya pada perlakuan 0,01251 Unit/ml (0,4 ml) dan 0,01877 Unit/ml (0,6 ml) berturut-turut terjadi pada hari ke-24 dan 26, sedangkan pada perlakuan 0,02502 Unit/ml (0,8 ml) dan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) pada hari ke-28. Perbedaan waktu *recovery* bagi *Microcystis aeruginosa* diduga berhubungan dengan tingkat kerusakan yang terjadi pada populasi *Microcystis aeruginosa*. Semakin tinggi konsentrasi enzim yang diberikan, semakin banyak sel *Microcystis aeruginosa* yang mengalami lisis, dan mati (terbukti dari perbedaan kultur *Microcystis aeruginosa* semakin bening (Gambar 5.16)). Dengan kata lain, semakin sedikit sel plankton yang hidup dan sehat. Semakin sedikit jumlah sel yang hidup, maka dibutuhkan waktu lebih lama untuk berkembangbiak hingga menghasilkan perbedaan jumlah sel yang signifikan, yang dapat terukur dengan metode sampling untuk dihitung pada *haemocytometer*. Hal ini sesuai dengan rumus laju peningkatan populasi yaitu :  $N_t = N_0 \cdot e^{rt}$  dimana  $N_t$  adalah jumlah individu pada saat  $t$ ,  $N_0$  adalah jumlah individu saat  $t=0$ ,  $e$  adalah logaritma natural (2,71828),  $r$  adalah laju pertumbuhan populasi dan  $t$  adalah waktu yang diperlukan untuk menggandakan populasi (Soegianto, 1994). Berdasar rumus tersebut diketahui bahwa semakin rendah jumlah anggota populasi, maka diperlukan waktu lebih banyak untuk menggandakan populasi.

Pada analisis statistik terhadap enzim PGA menunjukkan bahwa perlakuan 0,00625 Unit/ml (0,2 ml); 0,01251 Unit/ml (0,4 ml) dan 0,01877 Unit/ml (0,6 ml) tidak berbeda, sedangkan perlakuan 0,01251 Unit/ml (0,4 ml) tidak berbeda dengan perlakuan 0,02502 Unit/ml (0,8 ml). Hal ini diduga karena waktu inkubasi optimum PGA yang pendek, yang menunjukkan reaksi berjalan lebih cepat. Sedangkan pada media kultur masih dimungkinkan adanya peran enzim lain (karena enzim yang diberikan

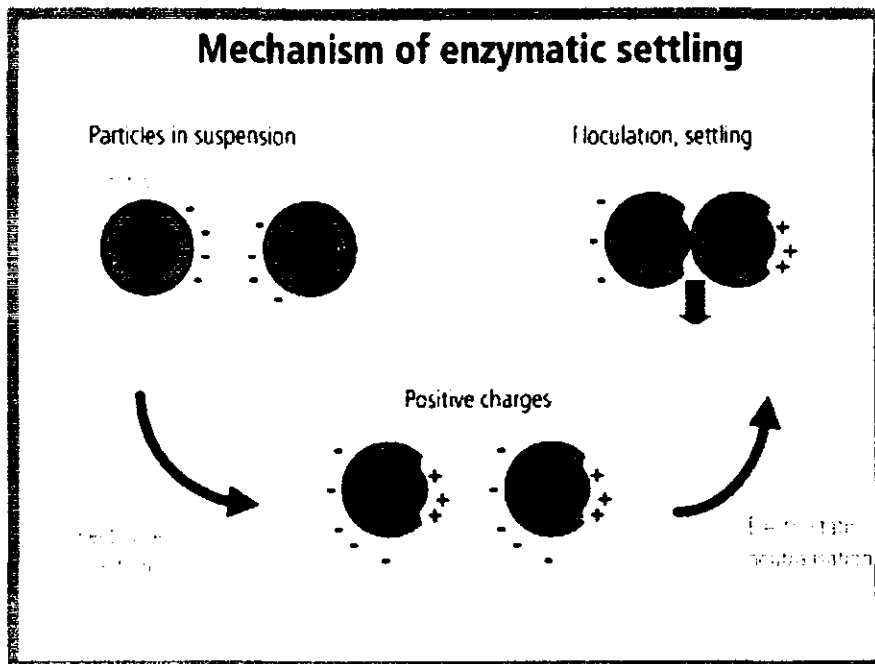


masih berupa ekstrak kasar), yang merubah asam galakturonat menjadi bentuk lebih sederhana dan diserap *Microcystis aeruginosa*. Akibatnya, terjadi dinamika naik turun yang menyolok dan tidak berpola. Pola yang jelas terlihat adalah perlakuan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) berbeda dengan perlakuan yang lain (Grafik D1). Hal ini diduga, perlakuan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) menghasilkan asam galakturonat lebih banyak, sehingga pengurangan asam galakturonat akibat digunakan oleh *Microcystis aeruginosa* tidak berpengaruh terhadap dinamika asam galakturonat yang ada pada medium kultur. Apalagi pada perlakuan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml), penurunan *Microcystis aeruginosa* paling tinggi, yang berarti kepadatan *Microcystis aeruginosa* paling rendah, sehingga jumlah asam galakturonat yang digunakan oleh *Microcystis aeruginosa* lebih sedikit. Hal ini juga terlihat dari kekeruhan media kultur, pada perlakuan 0,03128 Unit/ml (1,0 ml) tampak paling bening karena *Microcystis aeruginosa* lisis, menggumpal dan mengendap.

Sel *Microcystis aeruginosa* yang mengalami lisis berwarna putih karena materi di dalamnya, termasuk pigmen keluar dan rusak. Pigmen terdapat dalam tilakoid yang terletak sejajar dengan membran sitoplasma. Pigmen terdiri dari klorofil a, karotenoid, fikosianin dan fikoeitrin (Anonimus, 2005). Penelitian tentang bahan aktif yang menyebabkan kerusakan dinding sel juga dilakukan beberapa peneliti lain. Arzul *et al.* (1999) mendapatkan ekskresi substansi alelopati yang dihasilkan suatu plankton dapat menyebabkan plankton lain mengalami haemolisis. Graneli and Turner (2006) menambahkan, sel yang mengalami lisis dapat diakibatkan oleh kerusakan membran sitoplasma.

Perbedaan lain yang terjadi dalam kultur *Microcystis aeruginosa* adalah semakin tinggi konsentrasi enzim pektinase pH 7, semakin besar ukuran koloni *Microcystis aeruginosa* yang terbentuk. Hal ini diduga berhubungan dengan dampak pemutusan ikatan antar molekul penyusun dinding sel yang menimbulkan perubahan muatan ionik

dan menyebabkan gaya tarik menarik antar muatan, sehingga terbentuk koloni. Keadaan ini dapat dijelaskan berdasarkan gambar 5.7.



Gambar 5.7. Simulasi Proses Kolonisasi dan Pengendapan Sel *Microcystis aeruginosa* Akibat Enzim Pektinase (Lourens and Pellerin, 2007)

Seperti halnya struktur dinding sel tanaman, selain terdapat pektin, terdapat pula protein struktural yang menyusun dinding sel *Microcystis aeruginosa*. Ketika pektinase bekerja mendegradasi pektin sehingga merusak ikatan antar molekul dan merusak dinding sel, protein struktural juga ikut rusak. Putusnya ikatan antar molekul asam amino menyebabkan adanya muatan positif dan negatif diantara sel *Microcystis aeruginosa*. Ketika terjadi ikatan elektrostatik antara ikatan positif dan negatif antar sel *Microcystis aeruginosa*, maka sel-sel *Microcystis aeruginosa* akan bersatu dan mengendap. Semakin banyak sel *Microcystis aeruginosa* yang terdegradasi, semakin banyak sel yang memiliki muatan positif dan negatif, semakin banyak pula sel yang menempel dalam satu koloni.

Proses pembentukan koloni juga merupakan salah satu mekanisme pertahanan diri ketika plankton mengalami tekanan lingkungan (Graneli and Turner, 2006). Sedikit kerusakan akibat pemutusan pada ikatan pektin yang menimbulkan perbedaan muatan, bila segera direspon dengan ikatan elektrostatik untuk menggumpal, dapat menghindarkan bagian yang telah terputus dari pemutusan lanjutan akibat aksi pektinase berikutnya. Bila daya perbaikan sel cepat, maka kerusakan dapat diperbaiki dan *Microcystis aeruginosa* dapat tetap hidup. Namun bila pektinase menyerang terus-menerus hingga daya perbaikan tidak mampu mengatasi pemutusan / kerusakan yang terus-menerus, maka sel akan mengalami lisis dan *Microcystis aeruginosa* akan mati.

Adanya aktivitas enzim pektinase dapat dideteksi melalui produk degradasi yang terukur dengan Spektrofotometer<sup>1</sup> serta perubahan pH medium kultur<sup>2</sup>. Produk yang terukur melalui Spektrofotometer<sup>1</sup> adalah asam digalakturonat ( $\lambda$  550 nm) dan asam galakturonat ( $\lambda$  515 nm) sebagai hasil degradasi pektinase. Sedangkan perubahan pH medium kultur<sup>2</sup> menunjukkan peran produk sebagai hasil kerja enzim yang berpengaruh terhadap pH medium. Produk pemutusan pektin adalah asam digalakturonat dan asam galakturonat yang merupakan asam lemah. Dengan adanya produk tersebut, maka pH berubah menjadi asam. Pada Tabel 5.6 dapat diketahui bahwa nilai pH medium Gorham yang digunakan pada penelitian ini adalah 7, baik pada awal (setelah medium dibuat) maupun setelah inkubasi 30 hari (bersamaan dengan inkubasi kultur *Microcystis aeruginosa*). Nilai pH medium dengan kultur murni *Microcystis aeruginosa* pada awal kultur adalah 7 dan meningkat menjadi 8 setelah pemeliharaan *Microcystis aeruginosa* selama 30 hari. Hal ini menunjukkan adanya kegiatan penggunaan cadangan CO<sub>2</sub> yang dilakukan *Microcystis aeruginosa* sehingga menghasilkan CO<sub>3</sub><sup>-</sup> yang bersifat basa. Banyaknya ion CO<sub>3</sub><sup>-</sup> di perairan dapat mengubah pH medium menjadi basa (pembahasan tentang hal ini dapat dilihat pada poin 5.5.2 tentang pemberian enzim pH 9). Kondisi ini juga terjadi pada kultur *Microcystis aeruginosa* dengan perlakuan enzim

pH 9 yang menunjukkan perubahan pH dari 7,5 (pada awal kultur, setelah pemberian enzim) menjadi 8,5 pada akhir kultur. Hal ini menunjukkan bahwa pada pH basa enzim tidak bekerja optimum, sementara *Microcystis aeruginosa* menyukai pH tinggi. Dengan demikian *Microcystis aeruginosa* dapat tumbuh dengan baik. Sementara pada kultur *Microcystis aeruginosa* yang diberi enzim pH 7, tidak menunjukkan perubahan pH, namun pada pengamatan selanjutnya cenderung menjadi asam (6,5) sebagai akibat adanya molekul asam digalakturonat dan asam galakturonat pada medium.

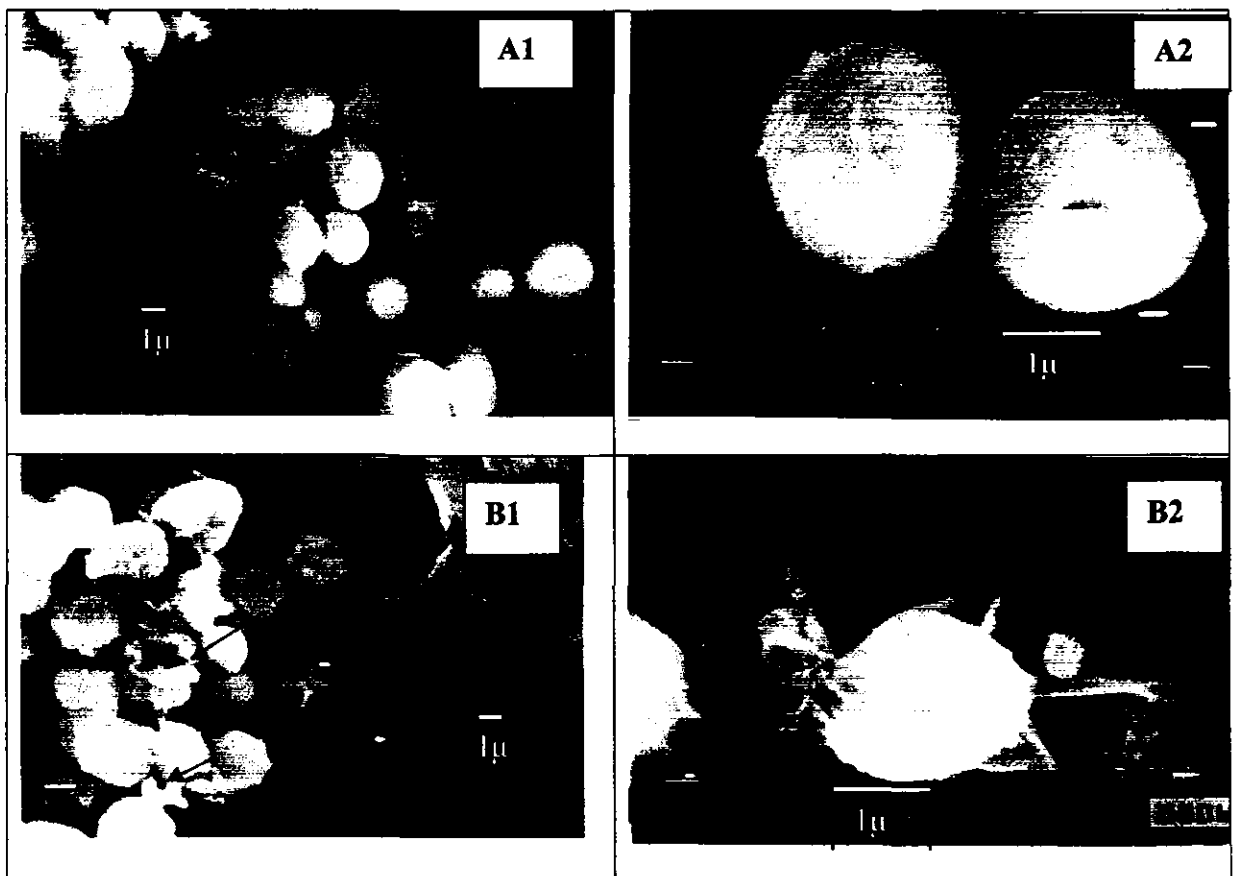
Keadaan yang terjadi pada alinea diatas sesuai dengan pembahasan tentang produk degradasi enzim pektinase yang menyebutkan bahwa pektin metilesterase bekerja dengan melepaskan gugus metanol dari rantai pektin, meninggalkan gugus karboksil yang asam. Selanjutnya, enzim pektat liase bekerja dengan memutus ikatan  $\alpha$ -1,4-D-galacturonan menghasilkan monomer asam galakturonat (yang bersifat asam). Sehingga cara untuk melihat adanya kerja enzim pektinase antara lain adalah pH menjadi lebih asam sebagai tanda terjadinya reaksi, karena dihasilkan produk bersifat asam ([http://www.enzymes.co.uk/answer\\_pectinase.htm](http://www.enzymes.co.uk/answer_pectinase.htm), 2005). Selain itu, hasil uji korelasi Pearson menunjukkan adanya korelasi positif antara laju penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa* dengan aktivitas enzim PEL, PL maupun PGA. Hal ini menunjukkan bahwa dengan semakin meningkatnya laju penurunan kepadatan plankton sebagai akibat penambahan enzim pektinase dari bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26, maka semakin meningkat pula produk hasil degradasi oleh aktivitas enzim tersebut

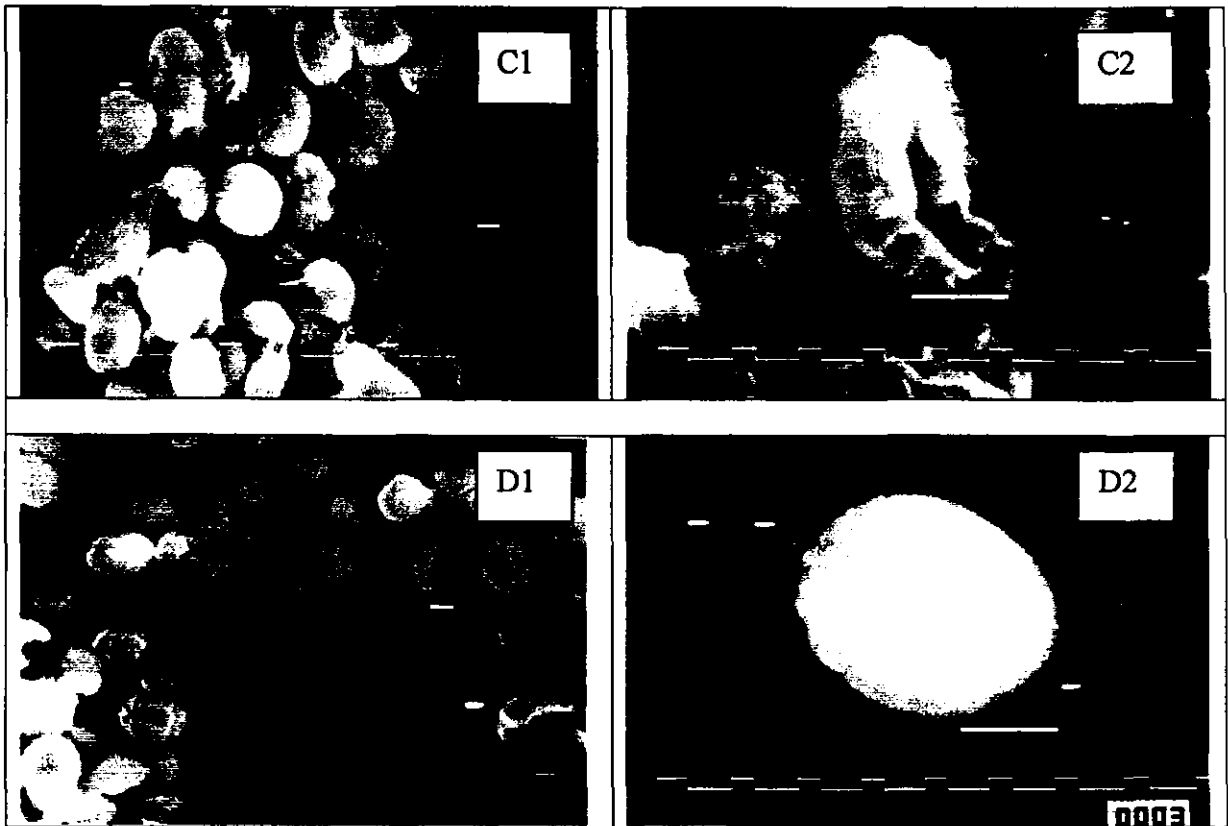
#### **5.5.4 Pengamatan *Microcystis aeruginosa* dengan Mikroskop Elektron (SEM)**

Pengamatan menggunakan mikroskop elektron ditujukan untuk mengetahui kerusakan yang terjadi pada dinding sel *Microcystis aeruginosa* akibat perlakuan pemberian bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 dan enzim pektinase. Hasil

pengamatan dengan mikroskop elektron terhadap *Microcystis aeruginosa* setelah perlakuan dengan bakteri maupun enzim pektinase disajikan pada Gambar 5.7.

Pada gambar A, terlihat koloni *Microcystis aeruginosa* dengan bentuk sel normal dan kompak. Kerusakan dinding sel terjadi pada beberapa sel yang mengalami lisis alami. Pada gambar B (*Microcystis* dengan perlakuan bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26) terlihat jumlah sel *Microcystis aeruginosa* yang mengalami kerusakan dinding sel lebih banyak dan hampir merata pada koloni. Gambar B2, tingkat kerusakan yang lebih berat, pengelupasan lebih banyak. Tampak pula bakteri menempel pada dinding sel *Microcystis aeruginosa* yang menunjukkan pola penyerangan bakteri.





Gambar 5.7 Hasil Pengamatan *Microcystis aeruginosa* Menggunakan Mikroskop Elektron (SEM). A1 dan A2 : Tanpa perlakuan. Sel normal dan kompak. B1 dan B2 : setelah perlakuan dengan bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26. Terjadi pengelupasan pada dinding sel, kolonisasi lebih besar. Panah menunjukkan bakteri *Bacillus pseudomallei*. C1 dan C2 : setelah perlakuan enzim pektinase pH 7. Kerusakan lebih parah, sel *Microcystis aeruginosa* terbelah, kolonisasi lebih besar dan dinding sel mengelupas. D1 dan D2 : setelah perlakuan enzim pektinase pH 9. Sel normal dan kompak. Skala bar menunjukkan 1  $\mu\text{m}$ .

Gambar C (*Microcystis* dengan perlakuan enzim pH 7) kondisi sel *Microcystis aeruginosa* menyerupai gambar B, kerusakan terjadi pada sebagian besar sel anggota koloni. Gambar C2, tingkat kerusakan yang lebih berat menyebabkan sel *Microcystis aeruginosa* pecah. Gambar D (*Microcystis* dengan perlakuan enzim pH 9) memperlihatkan keadaan sel mirip dengan gambar A (tanpa perlakuan), bentuk sel lebih kompak, tingkat kerusakan dinding sel lebih ringan.

Selain menyebabkan kerusakan pada dinding sel, pemberian bakteri dan enzim pH 7 menyebabkan pembentukan koloni lebih besar. Tampak pada gambar A1 dan D1,

individu *Microcystis aeruginosa* lebih soliter, sedangkan pada gambar B1 dan C1 lebih menggerombol.

Pengamatan *Microcystis aeruginosa* menggunakan mikroskop elektron (Gambar 5.7) menunjukkan hasil yang positif bahwa pemberian bakteri pektinolitik maupun enzim pektinase dapat menyebabkan kerusakan pada dinding sel. Enzim pektinase memutus ikatan-ikatan pada materi dinding sel sehingga struktur dinding sel mengalami kerusakan sehingga robek dan tampak mengelupas. Selain terjadi kerusakan dinding sel, juga terjadi kolonisasi yang lebih besar pada *Microcystis aeruginosa* yang mendapat perlakuan bakteri serta enzim pH 7. Pembahasan tentang hal ini dapat dilihat pada poin 5.5.3.

Pada Gambar 5.7B terlihat bakteri menempel pada dinding *Microcystis aeruginosa*. Hal ini menunjukkan bahwa model penyerangan bakteri adalah melalui penempelan pada dinding *Microcystis aeruginosa*, selanjutnya menghasilkan enzim pektinase yang bekerja pada dinding sel *Microcystis aeruginosa*. Berdasar perbandingan hasil pemberian enzim pektinase pH 7 dan pH 9, maka diduga enzim yang dominan bekerja adalah Pektin Liase (PL), yang memutus ikatan alfa-1,4-D-galakturonan metil ester dari pektin sebagai komponen mayoritas dinding sel *Microcystis aeruginosa*. Hal ini terbukti dari adanya aktivitas enzim yang terukur, yang menunjukkan adanya molekul asam digalakturonat pada medium sebagai hasil degradasi pektin. Beberapa peneliti mendapatkan bahwa bakteri mampu bekerja di lingkungan perairan sesuai mekanisme masing-masing. Burnham, *et al.* (1994) mendapatkan bahwa bakteri *Myxococcus xanthus* dapat menekan pertumbuhan Cyanobacteria *Phormidium luridum* melalui kontak langsung. Manage, *et al.* (2000) mendapatkan bahwa filtrat kultur bakteri yang diinoklasikan pada *Microcystis aeruginosa* tidak dapat menekan pertumbuhan *Microcystis aeruginosa*. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan zat penghambat pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* paling efektif bekerja pada permukaan membran

*Alcaligenes denitrificans*, sehingga bakteri dapat membunuh *Microcystis aeruginosa* melalui kontak langsung. Chen, et al. (2004), mendapatkan bahwa metabolit ekstraseluler bakteri dilepaskan ke perairan dan akan terkumpul pada permukaan dinding sel *Microcystis aeruginosa* hingga bila sudah mencapai konsentrasi tertentu, baru dapat bekerja menyerang *Microcystis aeruginosa*.

#### **5.5.5 Prospek *Burkholderia pseudomallei* P26 sebagai Bahan Pengendali Pertumbuhan *Microcystis aeruginosa***

Berdasar hasil penelitian di atas, diketahui bahwa bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 memiliki prospek untuk dikembangkan sebagai bahan pengendali pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* dalam kegiatan akuakultur dengan pertimbangan bahwa bakteri tersebut tidak bersifat patogen (pada penelitian ini terhadap nener bandeng) serta memiliki spesifisitas antagonis terhadap *Microcystis aeruginosa* yaitu menghasilkan enzim pektinase yang mendegradasi pektin, komponen utama dinding sel *Microcystis aeruginosa*. Pemanfaatan bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 masih memerlukan serangkaian penelitian terutama spesifitasnya apabila diperlakukan pada perairan dengan berbagai jenis plankton, kemampuan beradaptasi hidup di lapang serta upaya untuk mempertahankan kepadatan yang cukup di lapang.

Bakteri golongan *Burkholderia* saat ini dipertimbangkan sebagai agen biokontrol yang potensial karena ketahanannya terhadap antibiotik dan dapat menekan patogen pada manusia dan hewan ternak. Selama ini, bakteri yang banyak dimanfaatkan untuk probiotik di bidang perikanan antara lain adalah genus *Bacillus* dan *Pseudomonas*, namun lebih ditujukan untuk proses denitrifikasi. Beberapa produk probiotik komersial yang beredar di dunia perikanan merupakan konsorsium bakteri dengan salah satu anggota adalah genus *Bacillus*.



Selain pemanfaatan dalam keadaan hidup yaitu sebagai kandidat probiotik, *Burkholderia pseudomallei* P26 juga memiliki prospek untuk dikembangkan sebagai sumber enzim pektinase guna berbagai tujuan. Tentunya hal ini masih memerlukan berbagai penelitian, antara lain pemurnian enzim. Data karakterisasi enzim pada penelitian tahap kedua, dapat dimanfaatkan sebagai dasar apabila akan mengembangkan penelitian selanjutnya tentang ekstraksi dan pemurnian enzim. Enzim pektinase dapat dimanfaatkan dalam industri makanan yaitu proses pembuatan jus buah. Penggunaan enzim pektinase dapat meningkatkan kecepatan filtrasi hingga 50% (Wakabayashi *et al*, 2003). Pada industri kopi, enzim pektinase mempermudah pembuangan lapisan *mucilaginous* dari biji kopi (Kiran, 2007). Enzim pektinase diberikan sebagai perlakuan awal pada pengelolaan limbah industri makanan, sebelum dilakukan dekomposisi dengan lumpur aktif (Serrat *et al*, 2002). Pada industri tekstil bermanfaat pada proses *bleaching* menggantikan soda kaustik sehingga lebih aman untuk lingkungan (Fachin *et al*, 2004).

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Berdasar analisis hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Karakter enzim pektinase dari bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 adalah sebagai berikut :
  - pektat liase bekerja optimum pada pH 10, suhu optimum 35°C, waktu inkubasi 90 menit dan mengendap optimum pada konsentrasi ammonium sulfat 60 persen.
  - pektin liase bekerja optimum pada pH 7, suhu optimum 40°C, waktu inkubasi 60 menit dan mengendap optimum pada konsentrasi ammonium sulfat 65 persen.
  - poligalakturonase bekerja optimum pada pH 9, suhu optimum 45°C, waktu inkubasi 45 menit dan mengendap optimum pada konsentrasi ammonium sulfat 70 persen.
2. Ekstrak enzim pektinase dari bakteri pektinolitik *Burkholderia pseudomallei* P26 mampu meningkatkan laju penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa*. Konsentrasi optimum yang dapat menghasilkan laju penurunan kepadatan *Microcystis aeruginosa* adalah 0,01877 Unit/ml.
3. Pola penyerangan bakteri pektinolitik *Burkholderia pseudomallei* P26 terhadap *Microcystis aeruginosa* adalah dengan cara menempel pada dinding sel *Microcystis aeruginosa* kemudian menghasilkan enzim pektinase yang bekerja mendegradasi dinding sel *Microcystis aeruginosa*. Enzim yang berperan optimal dalam hal ini adalah pektin liase, memutus pada ikatan 1,4-alfa-D-galakturonan metil ester dari pektin sebagai komponen mayoritas dinding sel sehingga sel *Microcystis aeruginosa* mengalami lisis.

## 6.2 Saran

1. Bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 dapat dikembangkan sebagai kandidat probiotik guna mengatasi *blooming Microcystis aeruginosa* yang memiliki spesifitas terhadap *Microcystis aeruginosa*.
2. Sesuai kondisi terbaru di lapang bahwa *blooming Microcystis aeruginosa* mulai menyerang tambak air asin, maka perlu dilakukan penelitian kemampuan hidup bakteri *Burkholderia pseudomallei* P26 pada salinitas tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Affi, A.F., E.M. Fawzi and M.A. Foaad. 2002. Purification and Characterization of a Pectin Lyase Produced by *Curvularia inaequalis* NRRL 13884 on Orange Peels Waste, Sollid State Culture. *Ann. Microbiol.*, 52:287-297.
- Ahlgren, G., L. Lundstedt, M. Brett and Forsberg. 1990. Lipid Composition and Food Quality of Some Freshwater Phytoplankton for Cladoceran Zooplankters. *Journal of plankton research* 12:809-818.
- Andriyani, N., 1995. Daya Hambat Ekstrak Tike (*Eleocharis dulcis*) Hensel Terhadap Pertumbuhan Populasi Alga Biru Hiaju *Microcystis aeruginosa* Kuetz dan Alga Hijau *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Aster Theses JBPTITBBI. Departemen Biologi. ITB.
- Anonymous, 2005. Media Recipes. <http://www.micro.utexas.edu/research/uicex/old/medrec.htm>
- Avault, J.W. 1996. Off Flavor of Chanel catfish Soem fundamentals Reveiued. *Aquaculture* 22 : 6.
- Ball, A.S. Williams M., Vincent D. and Robinson, J., 2000. Algal Growth Control by Barley Straw Extract. *Bioresour. Technol.* 77:177-181
- Bekri, M, A., J. Desair., V. Keijers., P. Proost., M. S. Leeuwen., J. Vanderleyden and A. Broek. 1999. *Azospirillum irakense* Produces a Novel Type of Pectate Lyase. *Journal of Bacteriology* 181(8) : 2440 – 2447.
- Boyd, CE., 1979. Water Quality in Warmwater Fish Ponds. Alabama Agricultural Experiment Station. Auburn University, Auburn. Alabama. USA.
- Brenda, 2006. Enzyme Class. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>
- Bumham J.C., Collart, S.A. and Daft M.J. 1994. Myxococcal Predation of The Cyanobacterium *Phormidium luridum* in Aqueous Environments. *Arch. Microbiol.* 137:220-225.
- Chen, J. Z. Liu, G. Ren, P. Li and Y. Jiang. 2004. Control of *Microcystis aeruginosa* TH01109 with Batangas Mandarin Skin and Dwarf Banana Peel. *Water S.A.* Vol. 30. No. 2 April 2004.279-282.
- Daft M.J. and Stewart W.D.P. 1971. Bacterial Pathogens of Freshwater Blue Green Algae. *New Phytol.* 70:819-829.
- DeMott, W.R., Q.Z. Zhang and W.W. Carmichael. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and oceanography* 36:1346-1357.

- De Vries, R.P. 1999. Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Doctoral thesis. Wageningen University.
- Doran, J. 2002. Final Report For Screening of *Aspergillus niger* Strains for Enzyme Production in Sugar Beet Pulp Fermentations to Produce Fuel Ethanol. Central Michigan University. 5 p.
- Edwards, V.A. 2005. Managing Cyanobacteria. <http://www.alken-murray.com/Cyanobacteria.htm>
- Front, J. and V.Horiyck. 1994. Sites of Uptake of Geosmin, a Cause of Early-Flavor in Rainbow Trout (*Salmon gairdnei*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 41:1224-1226
- Gibson, J., Gonzales, E.T., and C. Allen. 1990. Molecular Plant Microbe Interaction. 16 (6) : 536 – 544.
- Gonzales, E.T. And C. Allen. 2003. Molecular Plant Microbe Interaction 16(6) : 526-544
- Graneli, E. and J.T. Turner. 2006. Ecology of Harmful Algae. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Netherlands
- Guillon, F., and J.F. Thibault. 1989. Enzymic hydrolysis of the "hairy" fragments of sugarbeet pectins. Carbohydr. Res. 190:97-108.
- Gromov B.V., Ivanov O.G., Mamkaeva K.A. and Avilov I.V. 1972. A Flexibacter that Lyses Blue Green Algae. Mikrobiologia 41:1074-1079.
- Haryono, S. S. 2001. Off-Flavor. Majalah Mitra Bahari Edisi tahun VI, Nomor 3 / 2001.
- Hoeger S.J., Dietrich D.R. and Hitzfeld B.C. 2002. Effect of Ozonation on The Removal of Cyanobacterial Toxins During Drinking Water Treatment. Environ. Health Perspect. 110: 1127-1132
- Hoiczky, E. dan A. Hansel. 2000. Cyanobacterial Cell Walls : News From an Unusual Prokaryotic Envelope. J. Bacteriol, 182 (5) : 1191 – 1199.
- [http://www.enzymes.co.uk/answer14\\_pectinase.htm](http://www.enzymes.co.uk/answer14_pectinase.htm). 2006.
- Irianto, A. 2003. Probiotik Akuakultur. Gadjah Mada University Press. 125 hal.
- Isnansetyo, A. 2005. Bakteri Antagonis sebagai Probiotik untuk Pengendalian Hayati pada Aquaculture. Jurnal Perikanan VII (1): Februari 2005.
- Isnansetyo dan Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton. Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut. Penerbit Kanisusu. Yogyakarta.

- James, D. and D.Otley.1996. Biological Principles of Pond Culture Fish. Oregon State University. Corvallis. Oregon.
- Kamalakkannan, K. 2004. Smell of Earth. Sci Tech. The Hindu. Online Edition of India's National Newspaper. Thursday, Sep 16. 2004
- Lelana, I.Y.B. 1993. Geosmine and Flafor in Chanel catfish. Doctoral Disertation. Auburn University. Auburn. Alabama. USA.
- Lourens, K and P. Pellerin. 2007. Enzymes in Wynemaking. Wynboer, A Technician Guide for Wine Producers. Montpellier, France.
- Lowell, R.T.1999. Flavor problem in Fish Culture *in* T.V.R. pillay and W.M. A. Dill. Advances in Aquaculture. Fishing News Books Ltd. Farnham. Surrey. England.p.186-190.
- Manage, P., Z.E. Kawabata and S. Nakano. 2000. Algacidal Effect of The Bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. Aquat Microb Ecol. 22:111-117
- Masithah, E.D., Laksmi S. dan Juni T. 2004. Hubungan Kelimpahan *Microcystis aeruginosa* dengan Cita Rasa Lumpur Ikan Bandeng di Tambak Kabupaten Lamongan. Laporan Penelitian. Program Studi budidaya Perairan. Fakultas kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mitsutani A., Uchida A. and Ishida Y. 1987. Occurrence of Blue Green Algae and Algal lytic Bacteria in Lake Biwa. Bull Jpn Soc. Mikrob. Ecol 2:21-28.
- Nganro, N.R., I Nyoman P.A., Pingkan, A dan Dea I.A. 1997. Pengembangan Paket produk Bakteri Penghambat Pertumbuhan Bakteri Patogen *Vibrio* pada Budidaya Tambak Udang. Departemen Biologi. Institut Teknologi Bandung.
- Oberholster P.J., Botha and Grobbelaar. 2004. *Microcystis aeruginosa* : Source of Toxic Microcystins in Drinking Water. African Journal of Biotechnology 3(3); 159-168
- Paerl, H, W. 1988. Growth And Reproductive Strategies Of Fresh Water Phytoplankton. Cambridge University Press. pp.261 – 315.
- Penazola, R., M. Rojas, I. Vila and F. Zambrano. 1990. Toxicity of soluble peptide from *Microcystis* sp. to zooplankton and fish. Freshwater Biology 24:233.
- Person, P.E. 1999. The Source of Muddy-Odor in Bream (*Abramis brama*) from the Porvoo Sea area. Journal of The Fisheries Research Board of Canada. 36:883-890.
- Ridge I. And Pillinger J.M and J.Walters.1995. Alleviating The Problems of Excessive Algal Growth. In: D.M. Harper and A.J.D. ferguson (eds). The Ecological Basis for River management. John Wiley Chichester.211-218.

- Sadikin, M. 2002. Biokimia Enzim. Penerbit Widya Medika. Jakarta.
- Sarawad, I.M. 2004. Smell of Earth. Sci Tech. The Hindu. Online Edition of India's National Newspaper. Thursday, Sep 16. 2004.
- Shilo, M. 1970. Lysis of Blue Green Algae by Myxobacter. J.Bact 104:453-461.
- Smith, L. 1993. Introduction to Fish Physiology. T.F.H. Publications. Neptune. New Jersey. USA.
- Soegianto, A. 1994. Ekologi Kuantitatif. Metode Analisis Populasi dan Komunitas. Penerbit Usaha Nasional. Surabaya.
- Stewart WDP and Brown RM. 1969. Ecological Studies on Algallysizing Bacteria in Fresh Waters. Freshw Biol 5:577-596.
- Sutanto, I. dan Suprpto. 2004. Peranan Probiotik Dalam Budidaya Udang Intensif. Makalah Seminar The National Symposium on Development and Scientific and Tecnology Innovation in Aquaculture, Semarang, 27 – 29 Januari 2004. 22 hal.
- Susanto, B., I. Setyadi, D. Syahidah, M. Marzuqi dan I. Rusdi. 2005. Penggunaan bakteri Probiotik sebagai Kontrol Biologi dalam Produksi Massal Benih Rajungan. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. 11 : 1
- Tabachek, J.L. and R.M. Yorkowski. 1996. Isolation and Identification of Blue Green Algae Producing Muddy-Odor Metabolites Geosmin and 2-methyl Isoborneol in Saline Lakes in Manitoba. Journal of Fisheries Research Board of Canada. 33:25-35.
- Tan – Kersten, J., Y. Guan and C. Allen. 1998. *Ralstonia solanacearum* Pectin Methyl Esterase Is Required for Growth on Methylated Pectin but Not for Bacterial Wilt Virulence. Applied and Environmental Microbiology, 64(12) : 4918 – 4923.
- Tardy, F., W. Nasser., J.R. Baudouy and N. H. C. Pattat. 1997. Comparative Analysis of the Five Major *Erwinia chrysanthemi* Pectat Lyases : Enzyme Characteristics and Potential Inhibitors. Journal of Bacteriology 179 (8) : 2503 – 2511.
- Trisyani, N. 1997. Hubungan Antara Kualitas Air Tambak Dan Pertumbuhan Alga Cyanophyceaea Terhadap Citarasa Lumpur Ikan Bandeng ( *Chanos chanos* Forskal). Tesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang. 92 hal.
- Verhoeven R.L. and Eloff, J.N. (1979). Effect of Lethal Concentration of Copper on The Ultrastructure and Growth of Microcystis. Proc. Electron. Microsc. Soc. S. Afr. 9:161-162

Verschuere, L., G. Rombaut., P. Sorgeios and W. Verstraete. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 655 – 671.  
<http://mmb.asm.org/cgi/content/full/64/4/655/T1>

Wiadnya, D.G.R. 1994. Analisis Laboratorium Kualitas Air. Fakultas Pascasajana, Jurusan Pengelolaan Tanah dan Air. Universitas Brawijaya. Malang.

[www.genome.jp](http://www.genome.jp). 2005. Database Enzyme Search Term : Pectin.  
[http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bfind\\_sub?mode=bfind&max\\_hit=1000&dbkey=enzyme&keywords=pectin](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind_sub?mode=bfind&max_hit=1000&dbkey=enzyme&keywords=pectin). 4 hal

[www.textbookofbacteriology.net](http://textbookofbacteriology.net). 2005. The Genus *Bacillus*.  
<http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>. 15p.

Yamamoto Y. and Suzuki K. 1990. Distribution and Algal-lysing Activity of Fruiting Myxobacteria in Lake Suwa. *J. Phycol* 26:457-492.

Yamamoto Y., Nuzuma S., Kuroda N., Sakamoto M. 1993. Occurrence of Heterothrophic Bacteria causing Lysis of Cyanobacteria in Euthrophic Lake. *J. Phycol* 41:215-220.

Yukasano, D. 2002. Teknik Mengontrol Mikroba Dalam Budidaya Udang Intensif. *Majalah Mitra Bahari Edisi VII (3)* : 140 – 147.



**Lampiran 1. Data Laju Penurunan Kepadatan *Microcystis*, Aktivitas Enzim PEL, PL dan PGA pada Perlakuan Enzim pH 7**

Perlakuan (Dosis enzim)	Ulangan	Laju penurunan plankton (sel/hari)	Aktivitas enzim PEL (Unit/ml)	Aktivitas enzim PL (Unit/ml)	Aktivitas enzim PGA (Unit/ml)
Kontrol	1	-4,41	1,320	1,302	1,747
	2	-4,92	1,320	1,301	1,746
	3	-5,15	1,320	1,302	1,747
	4	-4,88	1,320	1,301	1,746
	5	-4,73	1,322	1,303	1,747
0,2 ml	1	4,49	1,372	1,346	1,760
	2	3,99	1,377	1,350	1,757
	3	4,33	1,377	1,350	1,758
	4	4,83	1,375	1,348	1,755
	5	4,87	1,377	1,350	1,753
0,4 ml	1	5,57	1,372	1,346	1,758
	2	5,61	1,376	1,349	1,767
	3	5,68	1,380	1,352	1,761
	4	5,26	1,378	1,351	1,762
	5	5,92	1,378	1,351	1,756
0,6 ml	1	6,45	1,385	1,357	1,763
	2	6,63	1,389	1,360	1,760
	3	5,98	1,387	1,359	1,755
	4	6,01	1,378	1,351	1,757
	5	6,27	1,386	1,358	1,760
0,8 ml	1	5,97	1,386	1,357	1,769
	2	6,06	1,389	1,360	1,771
	3	6,43	1,386	1,358	1,761
	4	6,69	1,384	1,356	1,762
	5	6,16	1,389	1,361	1,765
1,0 ml	1	6,70	1,390	1,361	1,775
	2	6,83	1,391	1,362	1,773
	3	6,40	1,390	1,361	1,769
	4	5,92	1,386	1,358	1,775
	5	5,73	1,384	1,356	1,773

**Lampiran 2. Analisis Univariat Pengaruh Konsentrasi Enzim Pektinase pH 7 terhadap Laju Penurunan Kepadatan *Microcystis aeruginosa***

**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
Dosis	1 Kontrol	5
Enzim (Unit/ml)	2 dosis 0,2 ml	5
	3 dosis 0,4 ml	5
	4 dosis 0,6 ml	5
	5 dosis 0,8 ml	5
	6 dosis 1,0 ml	5

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Laju Penurunan (sel/hari)

Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean	Std. Deviation	N
Kontrol	-4.8180	.27326	5
dosis 0,2 ml	4.5020	.36568	5
dosis 0,4 ml	5.6080	.23721	5
dosis 0,6 ml	6.2680	.28004	5
dosis 0,8 ml	6.2620	.29491	5
dosis 1,0 ml	6.3160	.47930	5
Total	4.0230	4.08411	30

**Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>**

Dependent Variable: Laju Penurunan (sel/hari)

F	df1	df2	Sig.
1.275	5	24	.307

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Dosis

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Laju Penurunan (sel/hari)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	481.080 <sup>a</sup>	5	96.216	874.982	.000
Intercept	485.536	1	485.536	4415.434	.000
Dosis	481.080	5	96.216	874.982	.000
Error	2.639	24	.110		
Total	969.255	30			
Corrected Total	483.719	29			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .993)

## Estimated Marginal Means

### 1. Grand Mean

Dependent Variable: Laju Penurunan (sel/hari)

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
4.023	.061	3.898	4.148

### 2. Dosis Enzim (Unit/ml)

Dependent Variable: Laju Penurunan (sel/hari)

Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	-4.818	.148	-5.124	-4.512
dosis 0,2 ml	4.502	.148	4.196	4.808
dosis 0,4 ml	5.608	.148	5.302	5.914
dosis 0,6 ml	6.268	.148	5.962	6.574
dosis 0,8 ml	6.262	.148	5.956	6.568
dosis 1,0 ml	6.316	.148	6.010	6.622

## Post Hoc Tests

### Dosis Enzim (Unit/ml)

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Laju Penurunan (sel/hari)

Tukey HSD

(I) Dosis Enzim (Unit/ml)	(J) Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	dosis 0,2 ml	-9.3200*	.20973	.000	-9.9685	-8.6715
	dosis 0,4 ml	-10.4280*	.20973	.000	-11.0745	-9.7775
	dosis 0,6 ml	-11.0860*	.20973	.000	-11.7345	-10.4375
	dosis 0,8 ml	-11.0800*	.20973	.000	-11.7285	-10.4315
	dosis 1,0 ml	-11.1340*	.20973	.000	-11.7825	-10.4855
dosis 0,2 ml	Kontrol	9.3200*	.20973	.000	8.6715	9.9685
	dosis 0,4 ml	-1.1080*	.20973	.000	-1.7545	-.4575
	dosis 0,6 ml	-1.7860*	.20973	.000	-2.4145	-1.1175
	dosis 0,8 ml	-1.7800*	.20973	.000	-2.4085	-1.1115
	dosis 1,0 ml	-1.8140*	.20973	.000	-2.4625	-1.1655
dosis 0,4 ml	Kontrol	10.4280*	.20973	.000	9.7775	11.0745
	dosis 0,2 ml	1.1080*	.20973	.000	.4575	1.7545
	dosis 0,6 ml	-.8800*	.20973	.044	-1.3085	-.0115
	dosis 0,8 ml	-.6540*	.20973	.047	-1.3025	-.0055
	dosis 1,0 ml	-.7080*	.20973	.027	-1.3565	-.0595
dosis 0,6 ml	Kontrol	11.0860*	.20973	.000	10.4375	11.7345
	dosis 0,2 ml	1.7860*	.20973	.000	1.1175	2.4145
	dosis 0,4 ml	.6600*	.20973	.044	.0115	1.3085
	dosis 0,8 ml	.0060	.20973	1.000	-.6425	.6545
	dosis 1,0 ml	-.0480	.20973	1.000	-.6965	.6005
dosis 0,8 ml	Kontrol	11.0800*	.20973	.000	10.4315	11.7285
	dosis 0,2 ml	1.7600*	.20973	.000	1.1115	2.4085
	dosis 0,4 ml	.6540*	.20973	.047	.0055	1.3025
	dosis 0,6 ml	-.0060	.20973	1.000	-.6545	.6425
	dosis 1,0 ml	-.0540	.20973	1.000	-.7025	.5945
dosis 1,0 ml	Kontrol	11.1340*	.20973	.000	10.4855	11.7825
	dosis 0,2 ml	1.8140*	.20973	.000	1.1655	2.4625
	dosis 0,4 ml	.7080*	.20973	.027	.0595	1.3565
	dosis 0,6 ml	.0480	.20973	1.000	-.6905	.6965
	dosis 0,8 ml	-.0540	.20973	1.000	-.6945	.7025

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

### Laju Penurunan (sel/hari)

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Dosis Enzim (Unit/ml)	N	Subset			
		1	2	3	4
Kontrol	5	-4.8180			
dosis 0,2 ml	5		4.5020		
dosis 0,4 ml	5			5.6080	
dosis 0,8 ml	5				6.2620
dosis 0,6 ml	5				6.2680
dosis 1,0 ml	5				6.3160
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .110.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

b. Alpha = .05.

**Lampiran 3. Analisis Univariat Pengaruh Konsentrasi Enzim Pektinase pH 7 terhadap Aktivitas Enzim PEL**

**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
Dosis Enzim (Unit/ml)	Kontrol	5
	dosis 0,2 ml	5
	dosis 0,4 ml	5
	dosis 0,6 ml	5
	dosis 0,8 ml	5
	dosis 1,0 ml	5

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: PEL (Unit/ml)

Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean	Std. Deviation	N
Kontrol	1.32040	.000894	5
dosis 0,2 ml	1.37560	.002191	5
dosis 0,4 ml	1.37680	.003033	5
dosis 0,6 ml	1.38500	.004183	5
dosis 0,8 ml	1.38680	.002168	5
dosis 1,0 ml	1.38820	.003033	5
Total	1.37213	.024161	30

**Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>**

Dependent Variable: PEL (Unit/ml)

F	df1	df2	Sig.
1.285	5	24	.303

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Dosis

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PEL (Unit/ml)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.017 <sup>a</sup>	5	.003	434.926	.000
Intercept	56.482	1	56.482	7335389	.000
Dosis	.017	5	.003	434.926	.000
Error	.000	24	7.70E-006		
Total	56.499	30			
Corrected Total	.017	29			

a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .987)

## Estimated Marginal Means

### 1. Grand Mean

Dependent Variable: PEL (Unit/ml)

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
1.372	.001	1.371	1.373

### 2. Dosis Enzim (Unit/ml)

Dependent Variable: PEL (Unit/ml)

Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	1.320	.001	1.318	1.323
dosis 0,2 ml	1.376	.001	1.373	1.378
dosis 0,4 ml	1.377	.001	1.374	1.379
dosis 0,6 ml	1.385	.001	1.382	1.388
dosis 0,8 ml	1.387	.001	1.384	1.389
dosis 1,0 ml	1.388	.001	1.386	1.391

## Post Hoc Tests

### Dosis Enzim (Unit/ml)

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PEL (Unit/ml)

Tukey HSD

(I) Dosis Enzim (Unit/ml)	(J) Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	dosis 0,2 ml	-.05520*	.001755	.000	-.06063	-.04977
	dosis 0,4 ml	-.05640*	.001755	.000	-.06183	-.05097
	dosis 0,6 ml	-.06460*	.001755	.000	-.07003	-.05917
	dosis 0,8 ml	-.06640*	.001755	.000	-.07183	-.06097
	dosis 1,0 ml	-.06780*	.001755	.000	-.07323	-.06237
dosis 0,2 ml	Kontrol	.05520*	.001755	.000	.04977	.06063
	dosis 0,4 ml	-.00120	.001755	.982	-.00663	.00423
	dosis 0,6 ml	-.00940*	.001755	.000	-.01483	-.00397
	dosis 0,8 ml	-.01120*	.001755	.000	-.01663	-.00577
	dosis 1,0 ml	-.01260*	.001755	.000	-.01803	-.00717
dosis 0,4 ml	Kontrol	.05640*	.001755	.000	.05097	.06183
	dosis 0,2 ml	.00120	.001755	.982	-.00423	.00663
	dosis 0,6 ml	-.00820*	.001755	.001	-.01363	-.00277
	dosis 0,8 ml	-.01000*	.001755	.000	-.01543	-.00457
	dosis 1,0 ml	-.01140*	.001755	.000	-.01683	-.00597
dosis 0,6 ml	Kontrol	.06460*	.001755	.000	.05917	.07003
	dosis 0,2 ml	.00940*	.001755	.000	.00397	.01483
	dosis 0,4 ml	.00820*	.001755	.001	.00277	.01363
	dosis 0,8 ml	-.00180	.001755	.905	-.00723	.00363
	dosis 1,0 ml	-.00320	.001755	.470	-.00863	.00223
dosis 0,8 ml	Kontrol	.06640*	.001755	.000	.06097	.07183
	dosis 0,2 ml	.01120*	.001755	.000	.00577	.01663
	dosis 0,4 ml	.01000*	.001755	.000	.00457	.01543
	dosis 0,6 ml	.00180	.001755	.905	-.00363	.00723
	dosis 1,0 ml	-.00140	.001755	.965	-.00683	.00403
dosis 1,0 ml	Kontrol	.06780*	.001755	.000	.06237	.07323
	dosis 0,2 ml	.01260*	.001755	.000	.00717	.01803
	dosis 0,4 ml	.01140*	.001755	.000	.00597	.01683
	dosis 0,6 ml	.00320	.001755	.470	-.00223	.00683
	dosis 0,8 ml	.00140	.001755	.965	-.00403	.00683

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

### PEL (Unit/ml)

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Dosis Enzim (Unit/ml)	N	Subset		
		1	2	3
Kontrol	5	1.32040		
dosis 0,2 ml	5		1.37560	
dosis 0,4 ml	5		1.37680	
dosis 0,6 ml	5			1.38500
dosis 0,8 ml	5			1.38680
dosis 1,0 ml	5			1.38820
Sig.		1.000	.982	.470

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 7.70E-006.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

b. Alpha = .05.

## Correlations

### Correlations

		Laju Penurunan (sel/hari)	PEL (Unit/ml)
Laju Penurunan (sel/hari)	Pearson Correlation	1	.989**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	30	30
PEL (Unit/ml)	Pearson Correlation	.989**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	30	30

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Lampiran 4. Analisis Univariat Pengaruh Konsentrasi Enzim Pektinase pH 7 terhadap Aktivitas Enzim PL**

**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
Dosis	1	Kontrol	5
Enzim (Unit/ml)	2	dosis 0,2 ml	5
	3	dosis 0,4 ml	5
	4	dosis 0,6 ml	5
	5	dosis 0,8 ml	5
	6	dosis 1,0 ml	5

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: PL (Unit/ml)

Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean	Std. Deviation	N
Kontrol	1.30180	.000837	5
dosis 0,2 ml	1.34880	.001789	5
dosis 0,4 ml	1.34980	.002387	5
dosis 0,6 ml	1.35700	.003536	5
dosis 0,8 ml	1.35840	.002074	5
dosis 1,0 ml	1.35960	.002510	5
Total	1.34590	.020602	30

**Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>**

Dependent Variable: PL (Unit/ml)

F	df1	df2	Sig.
1.198	5	24	.340

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Dosis

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PL (Unit/ml)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.012 <sup>a</sup>	5	.002	446.895	.000
Intercept	54.343	1	54.343	9971267	.000
Dosis	.012	5	.002	446.895	.000
Error	.000	24	5.45E-006		
Total	54.356	30			
Corrected Total	.012	29			

a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .987)



## Estimated Marginal Means

### 1. Grand Mean

Dependent Variable: PL (Unit/ml)

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
1.346	.000	1.345	1.347

### 2. Dosis Enzim (Unit/ml)

Dependent Variable: PL (Unit/ml)

Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	1.302	.001	1.300	1.304
dosis 0,2 ml	1.349	.001	1.347	1.351
dosis 0,4 ml	1.350	.001	1.348	1.352
dosis 0,6 ml	1.357	.001	1.355	1.359
dosis 0,8 ml	1.358	.001	1.356	1.361
dosis 1,0 ml	1.360	.001	1.357	1.362

## Post Hoc Tests

### Dosis Enzim (Unit/ml)

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PL (Unit/ml)

Tukey HSD

(I) Dosis Enzim (Unit/ml)	(J) Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	dosis 0,2 ml	-.04700*	.001476	.000	-.05157	-.04243
	dosis 0,4 ml	-.04800*	.001476	.000	-.05257	-.04343
	dosis 0,8 ml	-.05520*	.001476	.000	-.05977	-.05063
	dosis 0,8 ml	-.05880*	.001476	.000	-.06117	-.05203
	dosis 1,0 ml	-.05780*	.001476	.000	-.06237	-.05323
dosis 0,2 ml	Kontrol	.04700*	.001476	.000	.04243	.05157
	dosis 0,4 ml	-.00100	.001476	.983	-.00557	.00357
	dosis 0,6 ml	-.00820*	.001476	.000	-.01277	-.00363
	dosis 0,8 ml	-.00980*	.001476	.000	-.01417	-.00503
	dosis 1,0 ml	-.01080*	.001476	.000	-.01537	-.00623
dosis 0,4 ml	Kontrol	.04800*	.001476	.000	.04343	.05257
	dosis 0,2 ml	.00100	.001476	.983	-.00357	.00557
	dosis 0,6 ml	-.00720*	.001476	.001	-.01177	-.00283
	dosis 0,8 ml	-.00880*	.001476	.000	-.01317	-.00403
	dosis 1,0 ml	-.00980*	.001476	.000	-.01437	-.00523
dosis 0,6 ml	Kontrol	.05520*	.001476	.000	.05063	.05977
	dosis 0,2 ml	.00820*	.001476	.000	.00363	.01277
	dosis 0,4 ml	.00720*	.001476	.001	.00263	.01177
	dosis 0,8 ml	-.00140	.001476	.930	-.00597	.00317
	dosis 1,0 ml	-.00260	.001476	.508	-.00717	.00197
dosis 0,8 ml	Kontrol	.05880*	.001476	.000	.05203	.06117
	dosis 0,2 ml	.00980*	.001476	.000	.00503	.01417
	dosis 0,4 ml	.00880*	.001476	.000	.00403	.01317
	dosis 0,6 ml	.00140	.001476	.930	-.00317	.00597
	dosis 1,0 ml	-.00120	.001476	.962	-.00577	.00337
dosis 1,0 ml	Kontrol	.05780*	.001476	.000	.05323	.06237
	dosis 0,2 ml	.01080*	.001476	.000	.00623	.01537
	dosis 0,4 ml	.00980*	.001476	.000	.00523	.01437
	dosis 0,6 ml	.00260	.001476	.508	-.00197	.00717
	dosis 0,8 ml	.00120	.001476	.962	-.00337	.00577

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

PL (Unit/ml)

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Dosis Enzim (Unit/ml)	N	Subset		
		1	2	3
Kontrol	5	1.30180		
dosis 0,2 ml	5		1.34880	
dosis 0,4 ml	5		1.34980	
dosis 0,6 ml	5			1.35700
dosis 0,8 ml	5			1.35840
dosis 1,0 ml	5			1.35960
Sig.		1.000	.983	.508

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.45E-006.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

b. Alpha = .05.

## Correlations

### Correlations

		Laju Penurunan (sel/hari)	PL (Unit/ml)
Laju Penurunan (sel/hari)	Pearson Correlation	1	.989**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	30	30
PL (Unit/ml)	Pearson Correlation	.989**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	30	30

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Lampiran 5. Analisis Univariat Pengaruh Konsentrasi Enzim Pektinase pH 7 terhadap Aktivitas Enzim PGA**

**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N	
Dosis	1	Kontrol	5
Enzim (Unit/ml)	2	dosis 0,2 ml	5
	3	dosis 0,4 ml	5
	4	dosis 0,6 ml	5
	5	dosis 0,8 ml	5
	6	dosis 1,0 ml	5

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: PGA (Unit/ml)

Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean	Std. Deviation	N
Kontrol	1.74660	.000548	5
dosis 0,2 ml	1.75660	.002702	5
dosis 0,4 ml	1.76080	.004207	5
dosis 0,6 ml	1.75900	.003082	5
dosis 0,8 ml	1.76560	.004336	5
dosis 1,0 ml	1.77300	.002449	5
Total	1.76027	.008714	30

**Levene's Test of Equality of Error Variances**

Dependent Variable: PGA (Unit/ml)

F	df1	df2	Sig.
2.121	5	24	.098

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Dosis

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PGA (Unit/ml)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.002 <sup>a</sup>	5	.000	39.533	.000
Intercept	92.956	1	92.956	9358003	.000
Dosis	.002	5	.000	39.533	.000
Error	.000	24	9.93E-006		
Total	92.958	30			
Corrected Total	.002	29			

a. R Squared = .892 (Adjusted R Squared = .869)

## Estimated Marginal Means

### 1. Grand Mean

Dependent Variable: PGA (Unit/ml)

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
1.760	.001	1.759	1.761

### 2. Dosis Enzim (Unit/ml)

Dependent Variable: PGA (Unit/ml)

Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	1.747	.001	1.744	1.750
dosis 0,2 ml	1.757	.001	1.754	1.760
dosis 0,4 ml	1.761	.001	1.758	1.764
dosis 0,6 ml	1.759	.001	1.756	1.762
dosis 0,8 ml	1.766	.001	1.763	1.769
dosis 1,0 ml	1.773	.001	1.770	1.776

## Post Hoc Tests

### Dosis Enzim (Unit/ml)

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PGA (Unit/ml)

Tukey HSD

(I) Dosis Enzim (Unit/ml)	(J) Dosis Enzim (Unit/ml)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	dosis 0,2 ml	-.01000*	.001993	.001	-.01616	-.00384
	dosis 0,4 ml	-.01420*	.001993	.000	-.02036	-.00804
	dosis 0,6 ml	-.01240*	.001993	.000	-.01856	-.00624
	dosis 0,8 ml	-.01900*	.001993	.000	-.02516	-.01284
	dosis 1,0 ml	-.02640*	.001993	.000	-.03256	-.02024
dosis 0,2 ml	Kontrol	.01000*	.001993	.001	.00384	.01616
	dosis 0,4 ml	-.00420	.001993	.317	-.01036	.00196
	dosis 0,6 ml	-.00240	.001993	.831	-.00856	.00376
	dosis 0,8 ml	-.00900*	.001993	.002	-.01516	-.00284
	dosis 1,0 ml	-.01640*	.001993	.000	-.02256	-.01024
dosis 0,4 ml	Kontrol	.01420*	.001993	.000	.00804	.02036
	dosis 0,2 ml	.00420	.001993	.317	-.00196	.01036
	dosis 0,6 ml	.00180	.001993	.942	-.00436	.00796
	dosis 0,8 ml	-.00480	.001993	.193	-.01096	.00136
	dosis 1,0 ml	-.01220*	.001993	.000	-.01836	-.00604
dosis 0,6 ml	Kontrol	.01240*	.001993	.000	.00624	.01856
	dosis 0,2 ml	.00240	.001993	.831	-.00376	.00856
	dosis 0,4 ml	-.00180	.001993	.942	-.00796	.00436
	dosis 0,8 ml	-.00960*	.001993	.031	-.01276	-.00044
	dosis 1,0 ml	-.01400*	.001993	.000	-.02016	-.00784
dosis 0,8 ml	Kontrol	.01900*	.001993	.000	.01284	.02516
	dosis 0,2 ml	.00900*	.001993	.002	.00284	.01516
	dosis 0,4 ml	.00480	.001993	.193	-.00136	.01096
	dosis 0,6 ml	.00660*	.001993	.031	.00044	.01276
	dosis 1,0 ml	-.00740*	.001993	.012	-.01356	-.00124
dosis 1,0 ml	Kontrol	.02640*	.001993	.000	.02024	.03256
	dosis 0,2 ml	.01640*	.001993	.000	.01024	.02256
	dosis 0,4 ml	.01220*	.001993	.000	.00604	.01836
	dosis 0,6 ml	.01400*	.001993	.000	.00784	.02016
	dosis 0,8 ml	.00740*	.001993	.012	.00124	.01356

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

### PGA (Unit/ml)

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Dosis Enzim (Unit/ml)	N	Subset			
		1	2	3	4
Kontrol	5	1.74660			
dosis 0,2 ml	5		1.75660		
dosis 0,6 ml	5		1.75900		
dosis 0,4 ml	5		1.76080	1.76080	
dosis 0,8 ml	5			1.76560	
dosis 1,0 ml	5				1.77300
Sig.		1.000	.317	.193	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 9.93E-006.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

b. Alpha = .05.

## Correlations

### Correlations

		Laju Penurunan (sel/hari)	PGA (Unit/ml)
Laju Penurunan (sel/hari)	Pearson Correlation	1	.761**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	30	30
PGA (Unit/ml)	Pearson Correlation	.761**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	30	30

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

