

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI MANOLITIKASAL BONGGOL POHON SAGU

### Isolation dan Characterization of Mannolitic Bacteria from Sago Farms

SRI WAHYUNI<sup>1</sup>, LIANTO<sup>2</sup>), DAN ANDI KHAERUNI<sup>3</sup>)

<sup>1</sup>Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Pertanian, Universitas Halu Oleo, Kendari

<sup>2</sup>Alumni Pendidikan Kimia, Jurusan Pendidikan MIPA, Universitas Halu Oleo, Kendari

<sup>3</sup>Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Halu Oleo, Kendari

#### ABSTRACT

Sago Processing in Southeast Sulawesi often generate waste in the form of pulp and tubers which contains lignin, cellulose, starch, minerals, and vitamins that can be used as a source of carbon and energy for growth of microorganisms, so it is likely to get microbes, including mannolitic bacteria that are useful for human life. The aim of this study was to isolate and characterize the biochemical properties of mannolitic bacteria originated from waste of sago hump in Konawe, Southeast Sulawesi Province. Isolation was done using serial dilution method and then spread over the surface of Nutrient agar medium and Mannan enrichment. Bacterial isolates showing high mannose activity were characterized mannose physiologically and biochemically. From this research, 6 mannolitic isolates originated from hump of sago waste samples from South Konawe were obtained. BLS.11-01 and BLS.11-02 mannolitic bacterial isolates had a strong mannolitic activity, with mannolitic index value of 2.3 and 2.0, respectively. Presumably, the two isolates were gram-positive bacteria, belonging to the same genus.

Key word: Mannolitic bacteria, mannanase, sago tubers

#### PENDAHULUAN

Perkembangan dalam bidang pertanian dan industri pertanian di Indonesia, seringkali menimbulkan peningkatan limbah yang berlisnoselulosa. Pemanfaatan limbah berlisnoselulosa dengan menggunakan jasa mikroba dapat menghasilkan berbagai senyawa turunan, antibiotik, enzim, dan oligosakarida yang berfungsi sebagai senyawa yang bermanfaat bagi kesehatan (Dewi, 2002).

Mannan yang banyak terdapat pada limbah pertanian merupakan sumber biomasa setelah selulosa dan xylan yang belum banyak dimanfaatkan. Selama ini pemanfaatan biomasa mannan, terutama dari limbah bungkil kelapa sawit dan kopra, lebih ditujukan untuk pakan ternak dengan tingkat efisiensi penyerapan yang relatif rendah

(Sumardi 2005; Hernentis *et al.* 2013; Wizna 2008). Kemajuan teknologi glikosains dan glikoteknologi memberikan manfaat tinggi dalam produksi berbagai oligosakarida yang diketahui fungsinya sebagai komponen pangan fungsional. Degradasi mannan dengan berbagai jenis enzim mananase dapat diperoleh manosa dan manno-oligosakarida yang berfungsi sebagai komponen pangan fungsional karena berfungsi sebagai prebiotik. Limbah biomasa perkebunan dan pertanian di Indonesia yang mengandung polisakarida mannan bisa dimanfaatkan untuk produksi manosa, manno-oligosakarida dan sakarida lainnya (Yopi *et al.* 2006).

Sagu merupakan salah satu makanan pokok di Sulawesi Tenggara. Pengolahan sagu, selain menghasilkan tepung sagu juga menghasilkan limbah berupa ampas, air bekas pencucian, dan bonggol. Bonggol sagu merupakan limbah yang potensial untuk pertumbuhan mikroorganisme karena mengandung lignin, selulosa, pati, mineral,

<sup>\*)</sup> Alamat korespondensi:  
Email : [akhaeruni@yahoo.com](mailto:akhaeruni@yahoo.com)

dan vitamin yang digunakan sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan mikroorganisme tersebut, sehingga sangat berpeluang untuk mendapatkan mikrob termasuk bakteri manolitik yang berguna bagi kehidupan manusia.

Bakteri manolitik adalah jenis bakteri yang memproduksi enzim  $\alpha$ -mannanase dan mampu memecah senyawa mannan. Enzim  $\alpha$ -mannanase merupakan enzim yang menghidrolisis mannan menjadi manosa dan manno-oligosakarida (Yopi *et al.* 2006; Sumardi *et al.* 2006; Wizna 2008). Enzim pemecah mannan banyak berperan dalam industri seperti pengolahan pangan, pakan ternak, deterjen, tekstil, dan kertas. Enzim ini dapat dihasilkan oleh mikroorganisme yang umumnya terdapat di tanah, kompos, atau rumen hewan (Hilge *et al.* 1998). Mikroba yang banyak ditemukan sebagai penghasil enzim  $\alpha$ -mannanase adalah kelompok bakteri, diantaranya *Bacillus subtilis* NM-39 (Mendoza *et al.* 1994), *Thermotoga neopalitana* 5068 (Duffaud *et al.* 1997), *Geobacillus stearothermophilus* L-07 (Sumardi *et al.* 2006); *Bacillus subtilis* WY34 (Jiang *et al.* 2006); *Paenibacillus* sp. D23 (Chandra *et al.* 2011), dan *Bacillus* sp. SM-1.4 (Hernentis *et al.* 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi sifat biokimia bakteri manolitikasal limbah bongkol sagu di Kabupaten Konawe Propinsi Sulawesi Tenggara.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi dan seleksi bakteri Mannolitik.

Limbah bongkol sagu sebagai sumber isolat diambil dari lokasi pengolahan sagu di Kabupaten Konawe, Propinsi Sulawesi Tenggara. Pengambilan sampel limbah bongkol sagu dilakukan pada bongkol yang telah membusuk dengan memasukkan dalam kantong plastik untuk diuji di laboratorium. Sebanyak 10% (b/v) limbah bongkol sagu disuspensikan dalam akuades steril dan dibuat seri pengenceran sampai pengenceran  $10^{-8}$ . Masing-masing suspensi sebanyak 0,1 mL pada pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ , dan  $10^{-8}$  diambil dan disebar di atas media NA dan diinkubasi pada suhu kamar selama dua hari. Setiap seri pengenceran dilakukan 3 kali penyebaran pada media yang berbeda. Koloni-

koloni yang tumbuh dipilih berdasarkan bentuk dan warna koloni yang berbeda untuk dikulturkan dalam media NA secara berulang-ulang hingga diperoleh kultur murni. Seleksi bakteri manase dilakukan dengan menumbuhkan isolat murni yang diperoleh pada medium pengkaya mannan (0,2% ekstrak khamir; 0,2% tripton; 0,02%  $MgSO_4$ ; 0,14%  $KH_2PO_4$ ; 0,1%  $(NH_4)SO_4$ ; dan 0,3% *locust bean gum*) pada suhu ruang selama 2 hari. Isolat yang tumbuh selanjutnya diwarnai dengan 0.1% *Congo red* selama 15 menit dan selanjutnya dicuci dengan 1 M NaCl. Bakteri yang menghasilkan mananasedicirikan dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloninya. Diameter zona bening yang dihasilkan diukur dan digunakan sebagai indikasi adanya aktivitas mananase dari bakteri manolitik (indeks manolitik) kemudian dimurnikan untuk pengujian lebih lanjut.

### Karakterisasi Morfologi dan Biokimia.

Karakterisasi morfologi isolat mengaju pada metode *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.* 1994), sedangkan karakterisasi biokimia dilakukan sebagai berikut:

**Pengujian Gram.** Reaksi Gram ditentukan berdasarkan metode pewarnaan Gram seperti yang dikemukakan oleh Lay (1994). Setelah dilakukan pewarnaan Gram, preparat diamati dengan mikroskop, untuk melihat bentuk sel dan reaksi Gram. Bakteri Gram positif tampak berwarna biru keunguan sedangkan Gram negatif berwarna merah muda.

**Uji pembentukan asam (karbohidrat sebagai Sumber karbon).** Pengujian ini dilakukan berdasarkan metode yang dikemukakan oleh Lay (1994). Senyawa karbohidrat 10% berupa glukosa, sukrosa, laktosa, maltosa, dan manitol, disterilisasi secara terpisah dari medium. Medium dalam tabung reaksi masing-masing ditambahkan senyawa karbohidrat 1%, sebagai indikator diberi brom timol biru (BTB). Satu ose biakan murni isolat bakteri secara terpisah diinokulasi ke dalam biakan kaldu karbohidrat, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 7 hari. Pemanfaatan karbohidrat sebagai sumber karbon ditandai dengan pembentukan asam yang ditunjukkan

dengan perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning.

**Uji sitrat.** Isolat bakteri uji diinokulasi pada media Simmon sitrat agar dengan inokulum yang tipis, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam. Jika terjadi perubahan warna dari hijau menjadi biru menunjukkan uji positif (Lay, 1994).

**Uji selulase.** Sebanyak 100 µL Suspensibakteri uji diinokulasikan dalam lubang yang dibuat di media LA yang mengandung CMC pada cawan Petri, kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar daerah inokulasi (Meryandini *et al.*, 2009).

**Uji hidrolisis pati.** Sebanyak 100 µL suspensi bakteri uji diinokulasi pada lubang di media NA yang mengandung pati, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar daerah inokulasi (Hastuti *et al.*, 2012).

**Uji respirasi aerob-anaerob.** Biakan diinokulasikan pada media padat yang mengandung brom timol biru dengan cara membagi media uji dalam 2 bagian pada

tabung reaksi, kemudian menginokulasikan biakan dengan cara menusukkan mikroba yang akan diuji pada 2 tabung yang berbeda, dimana salah satu tabung diisi/ditutupi dengan paraffin cair. Kemudian diinkubasi selama 3-4 hari pada suhu ruang. Perubahan warna dari biru menjadi kuning pada media menunjukkan bahwa isolat tersebut positif mampu hidup secara anaerob (Lay 1994).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

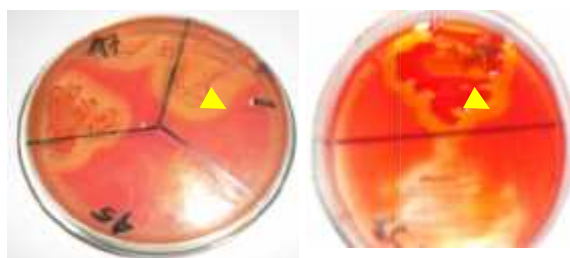
#### Isolasi dan Seleksi Bakteri Mannolitik.

Hasil isolasi bakteri dari limbah bonggol sagu yang telah membusuk di pengolahan sagu Kelurahan Punggaluku, Kecamatan Laiya, Kabupaten Konawe Selatan, diperoleh 12 isolat yang secara morfologi berbeda berdasarkan bentuk dan warna koloni. Dari 12 isolat tersebut, diperoleh 6 isolat yang menunjukkan aktivitas kitinolitik sebagaimana ditampilkan pada Tabel 1, yaitu ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri (Gambar 1). Berdasarkan nilai indeks mannolitik, terpilih dua isolat yang menunjukkan aktivitas mannolitik tertinggi yaitu isolat BLS.11-01 dan BLS.11-02.

Tabel 1. Isolat bakteri mannolitik dan indeks mannolitiknya

No	Kode isolat	Diameter koloni (cm)	Diameter zona bening (cm)	Indeks mannolitik
1	ALS11-01	7	14	1,0
2	ALS11-04	6	15	1,5
3	BLS11-01*	6	20	2,3
4	BLS11-02*	6	18	2,0
5	BLS11-05	8	11	0,4
6	BLS11-07	4	7	0,8

Keterangan: \*Isolat yang terpilih untuk pengujian selanjutnya



Gambar 1. Aktivitas mannolitik isolate BLS11-01 dan BLS11-02

#### Karakteristik Morfologi dan Biokimia.

Hasil pengamatan karakteristik morfologi terhadap isolat BLS.11-01 dan BLS.11-02, menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut memiliki ciri-ciri morfologi koloni yang sama pada warna koloni, bentuk sel, dan reaksi Gram, namun berbeda pada bentuk koloni, khususnya pada bentuk permukaan dan pinggiran koloni. Pengujian lebih lanjut berupa pengujian biokimia menunjukkan bahwa isolat BLS11-01 dan BLS11-02

memiliki karakteristik yang serupa, dan semua pengujian yang dilakukan bereaksi positif, sehingga diduga kuat kedua isolat tersebut berada dalam kelompok genus yang

sama. Ciri-ciri morfologi kedua isolat tersebut disajikan pada Tabel 2, sedangkan karakteristik morfologi disajikan pada Tabel 3.

Tabel 2. Karakteristik morfologi dan reaksi Gram isolat bakteri mannolitikisolat BLS11-01 dan BLS11-02

Karakteristik	Isolat terpilih	
	BLS11-01	BLS11-02
Warna koloni	putih	putih
Permukaan koloni	cembung	rata
Tepian koloni	berombak	utuh/rata
Bentuk sel	batang	batang
Sifat Gram	positif	positif

Tabel 3. Karakteristik biokimia isolat BLS.11-01 & isolat BLS.11-02

Jenis Uji	Isolat BLS.11-01	Isolat BLS.11-02
(1) Uji Fermentasi karbohidrat		
(a) Fermentasi glukosa	Positif	Positif
(b) Fermentasi laktosa	Positif	Positif
(c) Fermentasi sukrosa	Positif	Positif
(d) Fermentasi maltosa	Positif	Positif
(e) Fermentasi manitol	Positif	Positif
(2) Uji simon sitrat	Positif	Positif
(3) Uji katalase	Positif	Positif
(4) Uji hidrolisis pati	Positif	Positif
(5) Uji selulase	Positif	Positif
(6) Uji respirasi anaerob	Positif	Positif

### Pembahasan.

Hasil isolasi dengan menggunakan media TSA sebagai media umum untuk penumbuhan bakteri diperoleh 12 isolat yang memperlihatkan karakter morfologi yang berbeda terutama pada pengamatan bentuk dan warna koloni. Seleksi lebih lanjut dilakukan untuk memilih isolat mannolitik, oleh karena itu diperlukan media selektif yang dapat memperlihatkan adanya aktifitas mananase dari setiap isolat uji. Pada penelitian ini digunakan media yang mengandung sumber mannan yaitu *locus bean gum* sebagai substrat mananase, sehingga dapat menginduksi sel-sel bakteri untuk memproduksi dan mensekresikan enzim ekstraselluler -mananase (Yin *et al.* 2012).

Hasil seleksi memperlihatkan 6 isolat dari 12 isolat yang memiliki aktifitas kitinase dengan indeks mannolitik antara 0,4 sampai 2,3 yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloni bakteri, semakin tinggi nilai indeks mannolitik semakin tinggi aktifitas mananase bakteri tersebut. Hasil

penelitian ini menunjukkan bahwa isolat BLS11-01 dan BLS11-02 merupakan isolat yang tertinggi pertama dan kedua aktifitas mannolitiknya. Yin *et al.* (2012) mengemukakan bahwa mikroba penghasil enzim -mananase bila ditumbuhkan pada media padat yang mengandung mannan, maka substrat mannan yang disekeliling pertumbuhannya dihidrolisis dengan tidak terlihatnya pembentukan warna disekeliling koloni yang biasa disebut zona bening. Pembentukan zona bening dapat diperjelas dengan penambahan *congo red*.

Hasil karakterisasi morfologi terhadap isolat BLS11-01 dan BLS11-02, menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut memiliki karakteristik morfologi yang berbeda, khususnya pada permukaan dan tepian koloni, namun hasil pengujian reaksi Gram dan pengamatan mikroskopis menunjukkan persamaan karakteristik, yaitu sama-sama berGram positif dengan bentuk sel batang, sehingga terindikasi kemungkinan kedua isolat memiliki genus yang sama.

Selain uji morfologi juga telah dilakukan pengujian karakterisasi sifat biokimia terhadap kedua isolat bakteri manolitik tersebut. Uji biokimia merupakan salah satu uji untuk identifikasi bakteri, uji-uji tersebut digunakan untuk mengetahui aktivitas metabolisme mikroorganisme. Sifat metabolisme bakteri dalam uji biokimia diamati dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia dan kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi.

Hasil uji fermentasi karbohidrat menunjukkan bahwa ke-2 isolat bakteri yang diperoleh mampu melakukan fermentasi karbohidrat dengan substrat glukosa, sukrosa, laktosa, maltosa dan manitol. Kemampuan bakteri melakukan fermentasi tersebut ditandai dengan adanya produksi asam organik (asam asetat, asam laktat, asam formiat, dan asam suksinat). Produksi asam organik menyebabkan pH media fermentasi turun sehingga indikator *Bromthymol blue* yang terdapat pada media berubah dari biru menjadi kuning (Lay 1994).

Uji reaksi fisiologis pada fermentasi karbohidrat adalah glukosa, sukrosa, laktosa, dan manitol. Glukosa dapat langsung masuk dalam jalur fermentasi tahap pertama sedangkan sukrosa, laktosa, manitol dan maltosa akan dihidrolisis terlebih dahulu menjadi monosakarida penyusunnya, Laktosa dihidrolisis menjadi galaktosa dan glukosa. Sukrosa dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Manitol diubah menjadi manosa atau galaktosa. Sedangkan maltosa akan dihidrolisis menjadi dua molekul glukosa. Selain dapat memfermentasikan karbohidrat jenis glukosa, sukrosa, laktosa, maltosa dan manitol, kedua isolat bakteri juga dapat menghasilkan enzim selulase yang dapat menguraikan polisakarida jenis selulosa menjadi unit-unit glukosa. Hal ini ditunjukkan oleh hasil uji selulase dengan terbentuknya zona bening di sekitar daerah pertumbuhan bakteri

Kedua isolat bakteri memberikan hasil uji positif pada uji hidrolisis pati. Hal ini ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar daerah pertumbuhan bakteri setelah diberi beberapa tetes larutan lugol iodin. Hal ini memberikan informasi bahwa kedua isolat bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim -

amilase yang dapat menghidrolisis pati/amilum menjadi sakarida yang lebih sederhana lagi seperti maltosa dan glukosa. Pada hidrolisis pati, enzim yang berperan adalah -amilase yang bekerja memutuskan ikatan dengan konfigurasi pada pati. Hidrolisis pati oleh enzim -amilase terbagi dalam dua jalur, yaitu hidrolisis amilosa dan hidrolisis amilopektin

Menurut Suhartono (1989), hidrolisis amilosa oleh -amilase terjadi melalui dua tahap. Tahap pertama adalah penguraian amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Penguraian ini terjadi secara cepat yang diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahapan kedua berlangsung relatif lambat, dengan pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir.

Kemampuan isolat bakteri BLS.11-01 dan BLS.11-02 dalam menguraikan  $H_2O_2$  ditunjukkan oleh uji katalase yang memberikan hasil uji positif yang berarti bakteri mampu menghasilkan enzim katalase yang dapat digunakan pada reaksi penguraian hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi  $H_2O$  dan gas oksigen ( $O_2$ ). Uji sitrat dengan hasil positif yang ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Perubahan warna ini menunjukkan kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi (Lay 1994), sehingga asam hilang dari media biakan dan bila sitrat dapat digunakan oleh bakteri maka ammonium hidrogen fosfat turut teruraikan dan akan melepaskan ion ammonium ( $NH_4^+$ ) sehingga menyebabkan medium menjadi alkalis.

Kedua isolat bakteri BLS.11-01 dan BLS.11-02 menunjukkan hasil uji positif pada respirasi anaerob fakultatif. Hal ini dapat dilihat dengan adanya perubahan warna pada media uji dari biru menjadi kuning, dimana media yang digunakan bebas dari oksigen ( $O_2$ ). Perubahan warna ini menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut mampu melakukan fermentasi atau hidup tanpa adanya oksigen. Organisme anaerobik biasanya menggunakan jalur fermentasi asam laktat. Hasil karakterisasi sifat biokimia yang telah dihasilkan semakin menguatkan dugaan bahwa bakteri manolitik isolat BLS.11-01 dan BLS.11-02 merupakan kelompok bakteri

yang diduga kuat merupakan genus bakteri yang sama

### SIMPULAN

Diperoleh 6 isolat bakteri manolitik asal sampel limbah bonggol sagu dari Kabupaten Konawe Selatan. Isolat bakteri manolitik BLS.11-01 dan BLS.11-02, merupakan isolat yang memiliki aktifitas manolitik yang kuat dengan nilai indek manolitik 2,3 dan 2,0. Diduga kedua isolat tersebut merupakan kelompok bakteri berGram positif dari genus yang sama.

### DAFTAR PUSTAKA

- Chandra MRS, LeeYS, ParkIH, ZhouY., Kimand KK,ChoiYL. 2011. Isolation, purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -mannanase from *Paenibacillus* sp. DZ3. J. Korean Soc. Applied Biol. Chem., 54(3): 325-331.
- Dewi KH. 2002. Enzymatic Hydrolysis of Agriculture Wastes. Akta Agrosia 5(2) 67-71.
- Duffaud GD, McCutchen CM, Leduc P, Parker KN, Kelly RM. 1997. Purification and characterization of extremely thermostable  $\alpha$ -mannanase,  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -galaktosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neopalitana* 5068. Appl Environ Microbiol 63: 169-177.
- Harnentis, Marlida Y, Rizal Y, Mahata ME. 2013. Isolation, Characterization and Production of Mannanase from Thermophilic Bacteria to Increase the Feed Quality. Pakistan Journal of Nutrition 12 (4): 360-364.
- Hilge M, Gloor SM, Rypniewski W, Sauer O, Heightman TD, Zimmerermann W, Winterhalter K, Piontek K. 1998. High-resolution native and complex structures of thermostable mannanase from *Thermomonospora fusca*-substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5 Research article. Netherlands.
- Holt JG, NR Krieg PHA, Sneath JT, Staley ST, Williams 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: Ninth Edition* Williams & Wilkins USA.
- Jiang ZQ, Wei Y, Li D, Li L. Chai P, Kusakake I. 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. Carhyd. Poly., 66: 88-96.
- Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratotium*. Rajawali Pres Jakarta.
- Mendoza NS, Arai M, Kawaguchi T, Yoshida T, Joson LM. 1994. Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis*. Word J Microbiol Biotechnol 10:551-555.
- Meryandani A, Widosari W, Maranatha B, Sunarti TC, Rachmania N, Satria H. 2009. Isolation of Cellulolytic Bacteria and Characterization of the Enzyme. Makara Sains 13(1) 33-38.
- Suhartono. 1989 *Enzim dan Bioteknologi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sumardi. 2005. Optimasi produksi enzim  $\alpha$ -mannanase ekstraselluler dari *Geobacillus stearothermophilus* L-07. J. Sains Tek., 11(2):66-71.
- Sumardi, Antonius S, Suhartono MT, Tresnawati P. 2006. Purification and characterization of extracellular  $\beta$ -mannanase from a thermophilic bacterium, *Geobacillus stearothermophilus* L-07. J. Microbiol Indonesia, 57-62.
- Wizna, Abbas H, Rizal Y, Dharma A, Kompang IP. 2008. Improving the quality mixture as poultry feed through fermentation by *Bacillus Amylolyticus*. Pakistan Journal of Nutrition, 7(2): 249-254.
- Yin LJ, Tai HM, Jiang SH, 2012. Characterization of mannanase from a novel mannanase production bacteria. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 60(25): 6425-6431.
- Yopi, Purnawan A, Thontowi A, Hermansyah H, Wijanarko A. 2006. Preparasi Mannan dan Mananase Kasar dari bungkil Kelapa Sawit. Jurnal Teknologi 4: 312-319.