

PENCIRIAN MANANASE *Streptomyces costaricanus* 45I-3

Anja Meryandini^{1)*}, Dwi Ambarawati¹⁾, Nisa Rachmania¹⁾

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF *Streptomyces costaricanus* 45I-3 MANNANASE

Major component of hemicelluloses are mannans (softwoods) and xylans (hardwoods). Hemicelluloses are used by microbes as a carbon sources. Mannanase and xylanase are enzyme complex that are able to degrade hemicelluloses. Mannanase activity from *Streptomyces costaricanus* 45I-3 was tested in locust bean gum 0.5% and coconut meal 0.5% medium and was detected by dinitrosalicylic acid method. Protein concentration was measured using Bradford method. Mannanase and xylanase activity were also detected using birchwood xylan and oat spelt xylan medium. The optimum temperature and pH of *Streptomyces* mannanase strain 45I-3 was 40 °C and 6,0, respectively. The addition 1mM of Mg²⁺ and Zn²⁺ at final concentration increased the mannanase activity for about 30% and 80%, while 1mM Mn²⁺, Ca²⁺ and Co²⁺ decreased its activity for about 67%, 100%, and 60%, respectively. The addition of 1mM ethylene diamine tetraacetic acid tend to decreased the enzyme activity to 30%. The medium which contain birchwood xylan dan oat spelt xylan could induce mannanase activity, but in a lower degree then that of xylanase.

Keywords: mananase, streptomyces, xilanase

ABSTRAK

Hemiselulosa terutama terdiri atas manan (*softwoods*) dan xilan (*hardwoods*). Hemiselulosa dapat digunakan oleh mikroba sebagai sumber karbon. Mananase dan xilanase adalah enzim kompleks yang dapat mendegradasi hemiselulosa. Aktivitas mananase *Streptomyces* sp. galur 45I-3 diuji pada media locust bean gum 0,5% dan bungkil kelapa 0,5% dengan metode asam dinitrosalisilat (DNS). Kadar protein diukur dengan kolorimeter menggunakan *coomasie blue*. Aktivitas mananase dan xilanase juga diuji menggunakan media birchwood xylan dan oat spelt xylan. Mananase *Streptomyces* sp. galur 45I-3 mempunyai suhu optimum 40 °C dan pH optimum 6,0. Penambahan 1mM kation Mg²⁺ dan Zn²⁺ masing-masing meningkatkan aktivitas mananase sebesar 29,2% dan 80,2%, sedangkan Mn²⁺, Ca²⁺ dan Co²⁺ masing-masing menurunkan aktivitasnya sebesar 67%, 100%, dan 59,7%. Penambahan senyawa pengkelat logam etilen diamina tetraasetat (EDTA) dengan konsentrasi akhir 1 mM hanya sedikit menurunkan aktivitasnya. Media yang mengandung birchwood xylan dan oat spelt xylan menginduksi pembentukan mananase namun dengan aktivitas yang lebih rendah dari xilanase.

Kata kunci: mananase, Streptomyces, xilanase

PENDAHULUAN

Hemiselulosa merupakan polisakarida linier atau ber-

cabang yang banyak ditemukan sebagai heteroglikan pada tumbuhan tingkat tinggi. Dua jenis hemiselulosa yang penting dalam industri ialah hetero-1,4-D-manan dan hetero-1,4-D-xilan (Hilge *et al.* 1998). Manan adalah komponen hemiselulosa pada *soft woods* atau kayu lunak yang terdapat pada gimnospermae (Marga *et al.* 1996) yang merupakan polimer dari manosa sedangkan galaktomanan adalah polimer manosa yang diselingi galaktosa (Lehninger 1982). Kandungan manan dan galaktomanan yang tinggi pada bungkil kelapa sebagai pakan ternak berprotein menghambat pencernaan protein. Pemanfaatan bungkil kelapa sebagai pakan ternak secara optimal dapat dibantu dengan adanya enzim mananase yang dapat menguraikan manan dan galaktomanan sehingga protein mudah dicerna oleh ternak. Mananase mengkatalisis hidrolisis ikatan β -1,4-manosa pada β -1,4-manan, glukomanan, dan galaktomanan. Di samping itu mananase dapat pula digunakan untuk mengurangi viskositas pada proses ekstraksi minyak sayur dari biji legum dan ekstrak kopi pada pembuatan kopi instan (Kansoh, Nagieb 2004). Pada industri pulp dan kertas, mananase dapat dikombinasikan dengan xilanase sebagai agen *prebleaching* untuk pulp *softwood* guna mengurangi penggunaan bahan kimia klorin (Marga *et al.* 1996).

Kemampuan mendegradasi hemiselulosa dapat dilakukan oleh mikroorganisme yang ada di tanah, kompos, dan rumen hewan (Hilge *et al.* 1998). Untuk dapat mendegradasi senyawa manan dengan sempurna, mikroorganisme harus menghasilkan sedikitnya 3 enzim, yaitu β -mananase, β -manosidase, dan α -galaktosidase (Duffaud *et al.* 1997). Aktinomiset merupakan kelompok bakteri berfilamen yang dapat membentuk miselia, bersifat gram positif, dan sebagian besar membentuk spora (Madigan *et al.* 2003). Aktinomiset penghasil enzim

1) Departemen Biologi, FMIPA-IPB, Gedung Fapet Lt 5 Wing 1, Kampus IPB Darmaga 16680

* Penulis Korespondensi: ameryandini@yahoo.com

ekstraseluler banyak ditemukan di tanah (Balows 1981). Meryandini *et al.* (2007) melaporkan bahwa *Streptomyces costaricus* 451-3 asal Kalimantan mempunyai aktivitas mananolitik dan xilanolitik.

Penelitian ini bertujuan mengetahui kondisi optimum mananase (pH, suhu), kation yang berperan, dan substrat yang dapat menginduksi pembentukan mananase dari *S. costaricus* 451-3.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Isolat *S. costaricus* 451-3. Bahan yang digunakan ialah *locust bean gum*, xilan *oatspelt*, xilan *birchwood* (Sigma USA), bungkil kelapa, dan reagen dinitrosalisilat (DNS), reagen bradford (Sigma USA). Alat-alat yang digunakan adalah penangas air, spektrofotometer (Spectronic 21), penangas bergoyang (Precision), sentrifus (Jouan), dan autoklaf.

Metode

Peremajaan Isolat

Isolat ditumbuhkan pada media agar-agar *basal salt medium* (BSM) yang mengandung *locust bean gum* (*locust bean gum* 0,5%; KNO₃ 0,2%; K₂HPO₄ 0,1%; MgSO₄ 7H₂O 0,05%; NaCl 0,05%; FeSO₄ 0,001%; CaCO₃ 0,3%; agar-agar 1,5%) dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang.

Produksi Enzim Mananase

Dengan menggunakan penyedot plastik steril berdiameter 0,5cm. koloni isolat dari media agar-agar BSM dengan *locust bean gum* diinokulasikan ke dalam 100mL media cair BSM yang mengandung *locust bean gum* atau bungkil kelapa dengan konsentrasi 0,5% dalam erlenmeyer 500mL. Suspensi diinkubasi dalam penangas bergoyang pada suhu ruang. Setiap hari selama 5–7 hari, 6mL kultur bakteri diambil untuk pengujian aktivitas enzim dan kadar protein. Ekstrak kasar enzim dipisahkan dari massa sel dengan sentrifugasi pada kecepatan 4.500g selama 10 menit. Aktivitas tertinggi ditentukan sebagai waktu panen enzim untuk pencirian mananase.

Penetapan Aktivitas Mananase dan Pengukuran Kadar protein

Aktivitas mananase dilakukan dengan menguji ekstrak kasar enzim dengan metode asam dinitrosalisilat (DNS) berdasarkan Purwadaria *et al.* (1994). Gula pereduksi yang dihasilkan diukur absorbansnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540nm. Satu nkat aktivitas mananase adalah banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 nanomol manosa dalam satu detik. Kadar

protein diukur mengikuti metode Bradford (1976).

Pencirian Mananase

Untuk mengetahui kondisi optimum aktivitas mananase, ekstrak kasar enzim diujikan pada berbagai suhu (30–90°C) dengan selang 10°C dan pada berbagai pH (3,0–9,0) dengan selang 0,5 unit. Bufer yang digunakan ialah sitrat fosfat 0,2 M (pH 3,0–5,5), fosfat 0,2 M (6,0–8,0), tris HCl 0,2 M (8,5–9,0). Pengaruh penambahan kation dilakukan dengan menambahkan beberapa jenis kation (Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, dan Zn²⁺) yang berasal dari garam MgCl₂, CaCl₂, CoCl₂, MnCl₂ dan ZnCl₂ serta senyawa pengkelat logam EDTA dengan konsentrasi akhir 1mM.

Uji Substrat

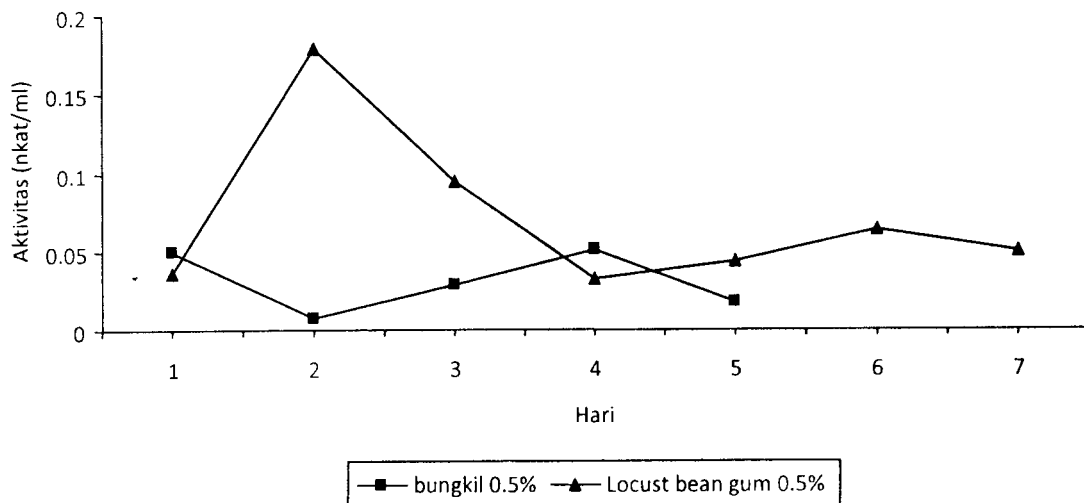
Uji substrat dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media yang mengandung substrat manan dan xilan kemudian dari masing-masing media diukur aktivitas mananase dan xilanase pada pH dan suhu optimum keduanya. Aktivitas xilanase diukur dengan metode DNS berdasarkan Miller (1959). Substrat yang digunakan ialah *locust bean gum*, xilan *oatspelt* dan xilan *birchwood*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Mananase dan Kurva Aktivitas Mananase Isolat 451-3

S. costaricus 451-3 yang telah ditumbuhkan pada media yang mengandung *locust bean gum* 0,5% atau bungkil kelapa 0,5% diuji aktivitasnya. Aktivitas mananase di media *locust bean gum* 0,5% menunjukkan aktivitas mananase tertinggi pada hari ke-2, yaitu 0.179nkat.ml⁻¹, kadar protein sebesar 0,168mg.ml⁻¹, dan aktivitas spesifik 1,065nkat.mg⁻¹. Pada hari pertama inkubasi di media bungkil kelapa sudah terdeteksi adanya aktivitas mananase, kemudian mengalami penurunan pada hari ke-2, dan naik kembali pada hari ke-3 hingga diperoleh aktivitas tertinggi pada hari ke-4 sebesar 0,051nkat.ml⁻¹, kadar protein sebesar 0,139mg.ml⁻¹, dan aktivitas spesifik 0,367nkat.mg⁻¹ (Gambar 1).

Aktivitas tertinggi mananase *S. costaricus* 451-3 dalam media *locust bean gum* 0,5% didapat pada saat biakan berumur 2 hari. Setelah berumur 2 hari aktivitas mananase *Streptomyces* sp. galur 451-3 menurun. Penurunan aktivitas ini karena adanya represi katabolit. Kadar monosakarida seperti manosa dan galaktosa sebagai hasil dari hidrolisis dapat menekan sintesis enzim yang digunakan untuk menguraikan polisakarida (galaktomanan). Setelah hari keempat aktivitas mananase mulai meningkat lagi karena monosakarida yang digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan mulai berkurang sehingga bakteri mulai memproduksi enzim kembali untuk menguraikan polisakarida.



Gambar 1 Aktivitas Mananase *S. costaricus* 45I-3 pada Berbagai pH yang Diukur pada Suhu 37°C

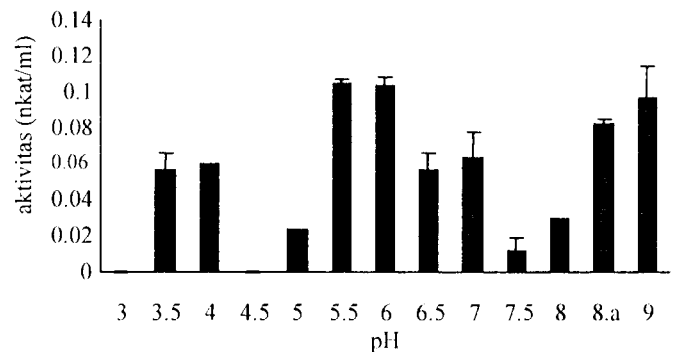
Pengukuran aktivitas mananase *S. costaricus* 45I-3 menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi pada media *locust bean gum* 0,5% dibandingkan pada media bungkil kelapa 0,5%. *Locust bean gum* lebih dapat menginduksi pembentukan mananase *S. costaricus* 45I-3 daripada bungkil kelapa karena kandungan galaktomanan pada *locust bean gum* lebih tinggi dibandingkan di bungkil kelapa yaitu sebesar 88% sedangkan dibungkil kelapa hanya 61%. Sumardi (2004) melaporkan bahwa *G. stearothermophilus* L-07 menunjukkan aktivitas mananase pada media yang mengandung *locust bean gum*, kolang kaling, dan umbi suweg tetapi tidak pada media yang mengandung bungkil kelapa. Hal ini diduga karena kandungan logam pada bungkil kelapa yang cukup tinggi sehingga bersifat racun terhadap *G. stearothermophilus*. Kandungan logam tinggi pada bungkil kelapa ini antara lain Ca, Co, Mn, Mg, Zn, dan Cu. Berbeda dengan hasil penelitian Meryandini (2008) yang melaporkan bahwa isolat RA05 yang berasal dari tempat pembuangan limbah kopra Kabupaten Pasaman, Sumatera Barat, menunjukkan aktivitas mananase yang lebih tinggi pada media bungkil kelapa dibandingkan dengan *locust bean gum*.

Karakterisasi Mananase Isolat 45I-3

Mananase *S. costaricus* 45I-3 menunjukkan aktivitas yang tinggi pada pH 5,5, 6,0, dan 9,0 dengan aktivitas mananase sebesar 0,105nkat.ml⁻¹, 0,103nkat.ml⁻¹, dan 0,096nkat.ml⁻¹ (Gambar 2).

Setelah dilakukan pengujian lebih lanjut mananase *S. costaricus* 45I-3 aktivitasnya tetap tinggi pada pH 6,0 sehingga pH tersebut dipakai sebagai pH optimum. Adanya 3 pH yang menunjukkan aktivitas yang tinggi karena enzim yang diukur masih berupa ekstrak kasar sehingga masih dalam bentuk protein campuran. Aktivitas yang tinggi pada

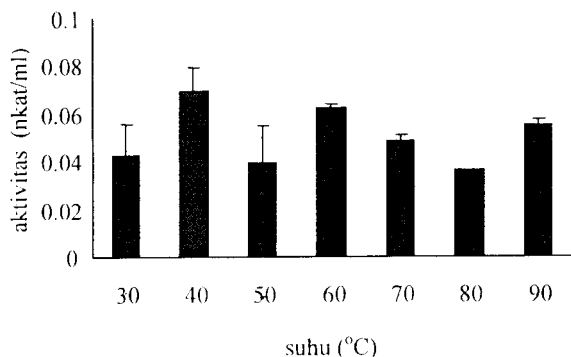
3 pH juga diduga karena *S. costaricus* 45I-3 menghasilkan 3 enzim dari kompleks mananase. Tetapi untuk lebih menyakinkan harus dilakukan pemurnian enzim dan uji substrat spesifik untuk kompleks enzim mananase. Menurut Denniston *et al.* (2001) perubahan pH dapat menyebabkan perubahan derajat ionisasi gugus ionik dari asam amino pada rantai protein. Peningkatan aktivitas enzim disebabkan oleh ionisasi gugus ionik pada sisi aktif yang menyebabkan



Gambar 2 Aktivitas Mananase *S. costaricus* 45I-3 pada Berbagai pH yang Diukur pada Suhu 37°C

konformasi sisi aktif lebih efektif dalam mengikat dan mengubah substrat menjadi produk. Mananase dari *S. galbus* NR (Kansoh, Nagieb 2004), *Vibrio* sp. galur MA-138 (Tamaru *et al.* 1995) dan *Clostridium tertium* KT-5A (Kataoka, Tokiwa 1998) mempunyai pH optimum 6,5 (Kansoh, Nagieb 2004).

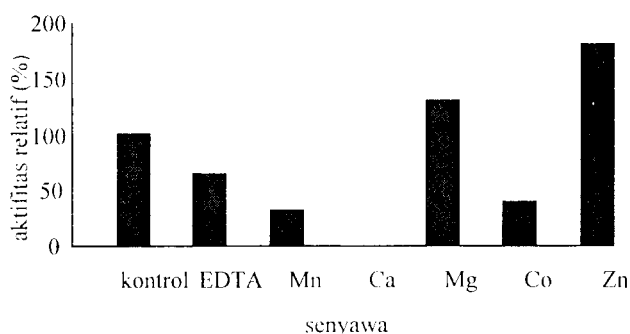
Suhu optimum mananase *S. costaricus* 45I-3 ialah 40°C dengan aktivitas sebesar 0,070nkat.ml⁻¹ (Gambar 3). Mananase *S. costaricus* 45I-3 juga mempunyai aktivitas yang tinggi pada suhu 60°C dan 90°C dengan aktivitas sebesar 0,062nkat.ml⁻¹ dan 0,055nkat.ml⁻¹. Setelah me-



Gambar 3 Aktivitas Mananase *S. costaricus* 451-3 pada Berbagai Suhu yang Diukur pada pH 6,0.

lewat suhu optimum aktivitas enzim menurun karena kemungkinan kerusakan enzim akibat denaturasi semakin besar. Tamaru *et al.* (1995) melaporkan bahwa mananase dari *Vibrio* sp. galur MA-138 mempunyai suhu optimum 40°C. Mananase *S. galbus* NR juga mempunyai suhu optimum 40°C (Kansoh, Nagieb 2004).

Penambahan kation Mg^{2+} dan Zn^{2+} dengan konsentrasi akhir 1mM akan meningkatkan aktivitas mananase sebesar 29,2% dan 80,2%, sedangkan penambahan kation Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} menurunkan aktivitasnya sebesar 67%, 100% dan 59,7%. Penambahan EDTA juga menurunkan aktivitas mananase sebesar 35,9% (Gambar 4). Penambahan kation menunjukkan pengaruh yang berbeda-beda terhadap aktivitas mananase *S. costaricus* 451-3. Menurut Kansoh; Nagieb (2004) kation Mg^{2+} dapat meningkatkan aktivitas mananase dari *S. galbus* NR. Penambahan kation Mn^{2+} ,



Gambar 4 Pengaruh Penambahan Berbagai Kation dengan Konsentrasi Akhir 1mM terhadap Aktivitas Relatif Mananase *S. costaricus* 451-3 pada pH 6,0 dan Suhu 40°C.

Ca^{2+} , Co^{2+} (1 mM) ternyata dapat menghambat aktivitas mananase *S. costaricus* 451-3. Kation Mn^{2+} juga menurunkan aktivitas mananase dari *Vibrio* sp. galur MA-138 (Tamaru *et al.* 1995) dan *C. tertium* KT-5A (Kataoka,

Tokiwa 1998). Penambahan EDTA menurunkan aktivitas mananase sebesar 35,9% karena senyawa EDTA mengkelat kation yang ada pada enzim yang dibutuhkan untuk aktivitasnya. Menurut Whitaker (1994) kation dapat berperan penting sebagai komponen pada sisi aktif enzim, kofaktor, atau komponen yang dapat menjaga konformasi sisi aktif enzim.

Uji Substrat

Media *locust bean gum* 0,5% dengan kondisi optimum mananase, yaitu pH 6,0 dan suhu 40°C, dapat menginduksi pembentukan mananase dan xilanase. Aktivitas mananase lebih tinggi daripada xilanase, yaitu sebesar 0,090nkat.mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 0,533nkat.mg⁻¹. Aktivitas xilanase di media *locust bean gum* 0,5% pada kondisi optimum mananase ialah 0,057nkat.mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 0,340nkat.mg⁻¹.

Media *birchwood xylan* dapat menginduksi mananase dan xilanase. Aktivitas mananase dan xilanase di media *birchwood xylan* (pH 6,0 dan suhu 40°C) ialah 0,805nkat.mL⁻¹ dan 7,567nkat.mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 3,979nkat.mg⁻¹ dan 37,421nkat.mg⁻¹. Aktivitas mananase dan xilanase pada kondisi optimum xilanase (pH 5,0 dan suhu 50°C) ialah 0,257nkat.mL⁻¹ dan 9,072nkat.mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 1,271nkat.mg⁻¹ dan 44,869nkat.mg⁻¹. Media *oatspelt xylan* juga dapat menginduksi pembentukan mananase dan xilanase. Aktivitas mananase dan xilanase (kondisi optimum mananase) pada media ini ialah 0,257nkat.mL⁻¹ dan 2,592nkat.mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 1,014nkat.mg⁻¹ dan 11,012nkat.mg⁻¹. Pada kondisi optimum xilanase, aktivitas mananase dan xilanase ialah 0,552nkat.mL⁻¹ dan 8,138nkat.mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 2,219nkat.mg⁻¹ dan 34,574nkat.mg⁻¹ seperti yang terlihat pada Tabel 1.

Uji substrat yang dilakukan menggunakan media *locust bean gum* menunjukkan adanya aktivitas mananase dan xilanase. Kemampuan mikroorganisme untuk memproduksi enzim pada suatu substrat bergantung jenis mikroorganisme dan substratnya. Media *locust bean gum* lebih dapat menginduksi pembentukan mananase daripada xilanase. *Locust bean gum* merupakan substrat yang mengandung galaktomanan yang berasal dari tanaman *Ceratonia siliqua*. Media ini dapat menginduksi pembentukan kompleks mananase yang dapat menghidrolisis rantai tulang punggung galaktomanan maupun rantai sampingnya

Locust bean gum terdiri atas komponen galakto-D-manoglukan 88%, pentan 4%, protein 6%, selulosa 1% dan mineral 1% (Whistler *et al.* 1973 dalam Sumardi 2004). Kansoh, Nagieb (2004) melaporkan bahwa media yang mengandung substrat galaktomanan dapat lebih menginduksi pembentukan mananase daripada xilanase dari *S. galbus* NR. Media *birchwood xylan* dan *oatspelt xylan* dapat menginduksi pembentukan mananase. Aktivitas mananase yang diukur lebih rendah dibandingkan xilanase karena substrat xilan lebih dapat menginduksi pembentukan xilanase daripada mananase. Meryandini *et al.* (2007)

Tabel 1 Aktivitas Mananase dan Xilanase *S. costaricus* 45I-3 pada Beberapa Media Produksi

Media	Aktivitas enzim (nkat.ml ⁻¹)		Kadar protein (mg.ml ⁻¹)
	pH 6 suhu 40°C	pH 5 suhu 50°C	
<i>Locust bean gum</i>			
mananase	0,090		0,168
xilanase	0,057		
<i>Birchwood xylan</i>			
mananase	0,805	0,257	0,202
Xilanase	7,567	9,073	
<i>Oatspelt xylan</i>			
mananase	0,257	0,522	0,235
xilanase	2,592	8,139	

melaporkan bahwa xilanase *S. costaricus* 45I-3 mempunyai aktivitas yang tinggi pada pH 5–6,5 dan suhu 40–60°C. Hal ini menunjukkan bahwa kisaran pH untuk kerja mananase lebih sempit daripada xilanase karena dari hasil uji substrat, xilanase tetap mempunyai aktivitas yang tinggi pada kondisi optimum mananase. Nagieb, Kansoh (2004) melaporkan adanya aktivitas mananase pada media yang mengandung substrat xilan pada *S. galbus* NR dengan aktivitas yang lebih rendah daripada xilanase.

Menurut Kansoh, Nagieb (2004), mananase dapat diproduksi pada beberapa sumber karbon. Nilai aktivitas tertinggi dicapai ketika galaktomanan dipakai sebagai sumber karbon sedangkan untuk xilanase mencapai aktivitas tertinggi menggunakan sumber karbon xilan. Adanya kesamaan rantai samping pada substrat manan dan xilan diduga dapat menginduksi pembentukan kompleks enzim mananase ataupun xilanase. Manan dan xilan mempunyai kesamaan berupa rantai samping galaktosa dan asetil yang dapat dipotong oleh kompleks enzim mananase atau xilanase.

KESIMPULAN

Aktivitas mananase *S. costaricus* 45I-3 pada media *locust bean gum* 0,5% tertinggi dicapai pada hari kedua dengan aktivitas 0,179nkat.ml⁻¹, sedangkan pada media bungkil kelapa 0,5% tinggi pada hari ke-4 yaitu 0,051 nkat.ml⁻¹. Hasil pencirian mananase menunjukkan bahwa enzim ini memiliki suhu optimum 40°C, pH optimum 6,0 dan penambahan kation Mg²⁺ dan Zn²⁺ (konsentrasi akhir 1 mM) akan meningkatkan aktivitas sebesar 29,2% dan 80,2%. Media yang mengandung substrat *birchwood xylan* dan *oatspelt xylan* dapat menginduksi pembentukan mananase dengan aktivitas yang lebih rendah daripada xilanase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Yulin Lestari atas penyediaan isolatnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Balows A. 1981. *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application*. Vol 1 Ed ke-2. New York: Springer-Verlag, Inc.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the a Principle of Protein Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Denniston KJ, Topping JJ, Caret RL. 2001. *General, Organic, and Biochemistry*. Ed ke-3. New York: McGraw Hill, Inc.
- Duffaud GD. *et al.* 1997. Purification and Characterisation of Extremely Thermostable B-Mananase, B-Manosidase and A-Galaktosidase from Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga neopolitana* 5068. *Appl Environ Microbiol* 63:169–177.
- Hilge M. *et al.* 1998. High-Resolution Native and Complex Structure of Thermostable B-Mananase from *Thermomonospora Fusca*-Substrat Specificity in Glycosyl Hydrolase Family 5. *Structure* 6:1433–1444.
- Kansoh AL, Nagieb ZA. 2004. Xylanase and Mananase Enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in Biobleaching of Softwood Kraf Pulp. *Antonie van Leeuwenhoek* 85:103–114.

- Kataoka N, Tokiwa Y. 1998. Isolation and Characterization of an Active Mananase Producing Anaerobic Bacterium *Clostridium tertium* KT5A from lotus soil. *Appl Microbiol* 84: 357–367.
- Lehninger AL. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Thenawijaya M, penerjemah; Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: *Principles of Biochemistry*.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Ed ke-10. New Jersey: Prentice Hall International, Inc.
- Marga F. *et al.* 1996. Improved Production of Mananase by *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol* : 4656–4658.
- Meryandini A, Hendarwin T, Agung PP, Akhdiya A. 2007. Characterization of *Streptomyces* spp. 451–3 Xylanase. *BIOTROPIA* Vol. 14 :32–42.
- Meryandini A, Anggreandari R, Rachmania N. 2008. Isolasi Bakteri Mananolitik dan Karakterisasi Mananasenya. *Biota* vol. 13:28–35.
- Miller G L. 1959. Use Dinitrosalicylic Acid Reagen for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31: 426–428.
- Purwadaria T, haryati T, Darma J. 1994. Isolasi dan Seleksi Kapang Mesofilik Penghasil Mananase. *Ilmu dan Peternakan* 7:26–29.
- Sumardi. 2004. Isolasi, Karakterisasi dan Produksi β -Mananase Ekstraseluler dari *Geobacillus stearothermophilus* L-07 [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor, Fakultas Pasca Sarjana.
- Tamaru Y. *et al.* 1995. Purification and Characterization of an Extracellular β -1,4-mananase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain MA-138. *Appl Environ Microbiol*: 4454–4458.
- Whitaker JR. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Science*. Ed ke-2. Food Science and Technology. New York: Marcel Dekker, Inc.