

Pengaruh Komposisi Media terhadap Aktivitas dan Karakter Enzim Tanin Asil Hidrolase dari *Aspergillus niger*

(Effect of Media Composition on Activity and Character of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger*)

YUNITA ARIAN SANI ANWAR*, BURHANUDDIN

Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mataram
Jln. Majapahit 62, Mataram, Indonesia.

Diterima 28 November 2011, Disetujui 6 Juni 2012

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh komposisi media pada produksi enzim tanin asil hidrolase (tanase) dari *Aspergillus niger*. Faktor yang diuji meliputi perbandingan substrat padat dan media cair dan volume inoculum. Substrat padat dan media cair yang digunakan adalah tepung gandum dan medium Czapeck dengan variasi perbandingan 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 dan 1:5 (b/v). Sedangkan variasi volume inoculum yang digunakan adalah 1, 2 dan 3 mL. Enzim tanase selanjutnya difraksinasi dan dikarakterisasi. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas enzim tanase tertinggi diperoleh pada perbandingan tepung gandum dan medium Czapeck sebesar 1:2 (b/v) dan volume inoculum sebesar 1 mL. Hasil fraksinasi amonium sulfat menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada tingkat kejenuhan 70%. Karakter enzim tanase yang dihasilkan adalah suhu optimum sebesar 40°C dan pH optimum sebesar 6. Aktivitas tanase ditingkatkan oleh ion K⁺ dan Na⁺. Ion Zn²⁺, Cu⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ dan Mg²⁺ diketahui dapat menghambat aktivitas tanase.

Kata kunci: tanase, medium Czapeck, *Aspergillus niger*.

Abstract: This research aimed to investigate the effect of medium compositions in production of tannin acyl hydrolase (tannase) from *Aspergillus niger*. The parameter investigated were ratio of wheat flour and Czapeck medium, and volume of inoculum. Ratio of wheat flour and Czapeck medium were 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 and 1:5 (w/v) and volume of inoculum were 1, 2 and 3 mL. The tannase product was fractionated and characterized. The result showed that optimal tannase product was obtained at ratio of wheat flour and Czapeck medium 1:2 (w/v) with inoculum volume of 1 mL. The best specific activity of tannase was obtained at saturation level of 70%. Characterization results showed that optimum activity was at 40°C and pH 6. Tannase was increased by the presence of K⁺ and Na⁺. The presence of metal ions such as Zn²⁺, Cu⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ was known to inhibit the enzyme activity.

Keywords: tannase, Czapeck medium, *Aspergillus niger*.

PENDAHULUAN

ENZIM tanin asil hidrolase (tanase) merupakan enzim yang mengkatalis reaksi pemutusan ikatan ester pada tanin terhidrolisis membentuk asam galat dan glukosa. Enzim ini biasanya digunakan secara luas pada industri makanan maupun obat-obatan. Dalam industri makanan, tanase digunakan

pada produk teh instan, menjernihkan bir dan jus buah serta mengurangi efek antinutrisi tanin pada makanan ternak. Untuk industri obat-obatan, tanase berperan dalam produksi asam galat, yaitu senyawa yang digunakan untuk mensintesis propil galat dan trimetoprim secara kimia⁽¹⁾.

Beberapa mikroorganisme diketahui dapat memproduksi tanase. Namun, genus *Aspergillus* dan *Penicillium* dilaporkan memiliki kemampuan yang paling baik untuk memproduksi enzim tanase⁽²⁾. Penelitian Anwar *et al.*⁽³⁾ mampu menghasilkan

* Penulis korespondensi, Hp. 08175717685
e-mail: rian_blk@yahoo.com

enzim tanase dari *Aspergillus niger*.

Penelitian yang dilakukan oleh Anwar *et al.*⁽³⁾ telah menghasilkan enzim tanase pada media padat. Namun aktivitas enzim yang dihasilkan masih rendah. Salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya aktivitas enzim adalah komposisi media yang kurang tepat. Penelitian Shatta *et al.*⁽⁴⁾ menemukan bahwa komposisi media sangat berpengaruh terhadap produksi amilase. Selain itu, jumlah komposisi medium cair pada media padat dapat mempengaruhi produksi amilase⁽⁵⁾.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh komposisi media terhadap aktivitas tanase serta mengetahui karakter enzim yang dihasilkan.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan meliputi kapang *Aspergillus niger* yang diisolasi dari kulit buah kakao, *Potato Dextrose Agar* (Difco), Tween 80 (Merck), NaNO₃, KCl, MgSO₄·3H₂O, FeSO₄·7H₂O, K₂HPO₄·3H₂O, asam tanat (Sigma), tepung gandum, glukosa, NaOH, HCl, Na-sitrat, asam sitrat, etanol 95% (Merck), *Coomasie Brilliant Blue G 250* (Merck), H₃PO₄ 85% (Merck), *Bovine Serum Albumin* (Merck), (NH₄)₂SO₄ (Kanto), EDTA, Na₂CO₃, ZnSO₄·7H₂O, MgSO₄·3H₂O, CuSO₄·5H₂O, KCl, CaCl₂·2H₂O, MnSO₄·H₂O, Na₂SO₄.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator, *shaker bath*, *magnetic stirrer*, sentrifuga dingin (Beckman J2-21), penangas air, spektrofotometer, autoklaf, pH meter, neraca analitik, *vortex*, hemasitometer, *laminar air flow cabinet* dan peralatan gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium.

METODE. Pemeliharaan jamur. Jamur yang diambil dari kulit buah kakao ditumbuhkan dalam agar miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada suhu ruang 28°C selama 6 hari. Spora jamur disegarkan kembali pada media yang sama setelah tiga minggu.

Persiapan inokulum. Spora jamur pada agar miring PDA, dibuat suspensi spora dengan memasukkan 10 mL air suling steril yang mengandung 0,1% Tween 80. Spora jamur dilepaskan dengan jarum ose kemudian dikocok dengan *vortex* dan dihitung dengan menggunakan hemasitometer. Setiap mL suspensi spora yang digunakan sebagai inokulum mengandung ± 3.107 spora.

Produksi enzim tanase. Prosedur untuk produksi tanase mengacu pada metode Sanchez⁽⁶⁾ dan Anwar *et al.*⁽²⁾. Substrat padat yang digunakan adalah tepung gandum sedangkan media cairnya adalah medium Czapeck yang mengandung 3 g/L NaNO₃; 0,5 g/L KCl; 0,348 g/L MgSO₄·3H₂O; 0,01

g/L FeSO₄·7H₂O; 1,301 g/L K₂HPO₄·3H₂O pada pH 5,5. Perbandingan tepung gandum dan medium Czapeck divariasikan sebesar 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 dan 1:5 (b/v). Media selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, ke dalam media padat tersebut diinokulasikan spora jamur dengan variasi 1, 2 dan 3 mL. Media diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam.

Isolasi crude enzyme (enzim kasar). Isolasi enzim kasar dilakukan dengan cara mengekstrak media fermentasi dengan menambahkan 50 mL air suling steril yang mengandung 0,01% Tween 80 dan campuran dilarutkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Enzim kasar selanjutnya dipisahkan dari media melalui sentrifugasi. Supernatan disaring dengan kertas Whatman No. 1 dan dimasukkan ke dalam botol untuk analisis selanjutnya.

Pengujian aktivitas tanase. Aktivitas tanase diuji dengan spektrofotometer mengikuti metode Rajakumar dan Nandy⁽⁷⁾. Sebanyak 0,2 mL asam tanat 0,35% dalam 50 mM dapar sitrat pH 5 dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30°C. Selanjutnya 0,05 mL enzim ditambahkan ke dalam larutan tersebut dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu yang sama. Penghentian reaksi dilakukan dengan menambahkan 1 mL etanol 95% dan dikocok selama 1 menit. Campuran kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 310 nm.

Perlakuan blanko mengikuti prosedur yang sama dengan uji aktivitas enzim tetapi larutan enzim diganti dengan dapar sitrat. Sedangkan untuk kontrol enzim, 0,05 mL enzim diinaktifkan terlebih dahulu dengan menambahkan 1 mL etanol 95% kemudian ditambahkan asam tanat 0,35% sebanyak 0,2 mL. Perhitungan aktivitas enzim dengan menggunakan rumus berikut:

$$\Delta A_{310} = (A_{\text{tes}} - A_{\text{blanko}}) - (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}})$$

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menurunkan absorbansi per menit per mL enzim.

Fraksinasi enzim tanase dengan amonium sulfat dan dialisis. Pemurnian dilakukan dengan mengacu pada cara Pingoud *et al.*⁽⁸⁾ yaitu enzim kasar difraksinasi dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 30-80%. Perlakuan ini dilakukan pada kondisi suhu 4°C selama 3 jam. Pemisahan dilakukan dengan sentrifugasi 7700 g selama 20 menit pada suhu yang sama, kemudian endapan yang diperoleh disuspensikan dalam dapar sitrat 50 mM pH 5,0. Pemekatan enzim dilakukan dengan

cara dialisis pada suhu 4°C selama semalam dan daparnya dapat diganti beberapa kali sampai cairan di luar selofan tidak bereaksi dengan larutan Nessler. Enzim hasil fraksinasi diukur aktivitas dan kadar proteinnya. Pengukuran kadar protein mengikuti metode Bradford⁽⁹⁾.

Karakterisasi enzim tanase. Karakter enzim tanase yang diuji meliputi suhu optimum, pH optimum dan pengaruh ion logam.

Penentuan suhu optimum. Enzim tanase, substrat (asam tanat) dan dapar sitrat 0,05 M (pH 5) diinkubasi pada berbagai kisaran suhu 30-80°C, kemudian dilakukan pengujian aktivitas enzim sehingga diperoleh suhu optimum. Perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali.

Penentuan pH optimum. Enzim tanase, substrat (asam tanat) dan dapar diinkubasi pada kisaran pH 3-8. Larutan dapar yang digunakan berbeda-beda dimana untuk pH 3-6 menggunakan 0,05 M dapar sitrat dan dapar fosfat untuk rentangan pH 7-8. Setelah itu, aktivitas enzim diuji sehingga diperoleh pH optimum. Perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali.

Pengaruh ion logam. Untuk mengetahui pengaruh ion logam, maka campuran enzim, substrat dan daparnya ditambahkan berbagai jenis logam seperti Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} dan Mn^{2+} dengan konsentrasi 0,01 M dan 0,05 M kemudian diuji aktivitasnya. Perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

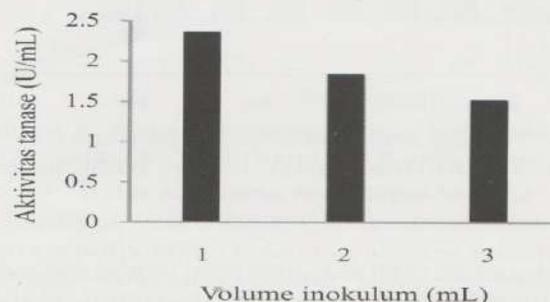
Hasil penelitian menunjukkan perbandingan tepung gandum dan medium Czapeck berpengaruh nyata terhadap aktivitas tanase dari *Aspergillus niger*. Aktivitas tertinggi diperoleh pada perbandingan tepung gandum dan medium Czapeck sebesar 1:2 (w/v) dengan nilai aktivitas sebesar 2,36 U/mL (Gambar 1). Hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa aktivitas tanase ini berbeda nyata dengan aktivitas tanase pada semua variasi perbandingan tepung gandum dan medium Czapeck yang digunakan.

Volume inokulum optimum yang diperoleh untuk produksi tanase adalah sebesar 1 mL seperti yang ditunjukkan Gambar 2. Hasil ini berbeda dengan penelitian Kar *et al.*⁽¹⁰⁾ yang menemukan bahwa volume inokulum optimum sebesar 12 mL untuk 5 gram substrat padat.

Penelitian Anto *et al.*⁽⁵⁾ menunjukkan bahwa komposisi media cair dan substrat padat dapat mempengaruhi produksi enzim. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Akcan dan Uyar⁽¹¹⁾ pada produksi protease dimana pada komposisi medium cair sebesar 40% dari substrat padat



Gambar 1. Pengaruh perbandingan tepung gandum dan medium Czapeck terhadap aktivitas tanase.



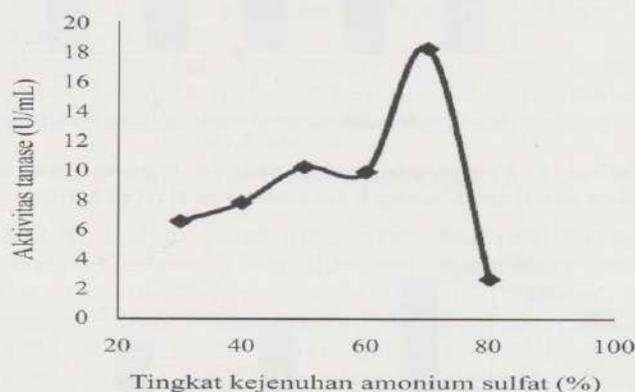
Gambar 2. Pengaruh volume inokulum ($\pm 3.10^7$ spora/mL) terhadap aktivitas tanase pada perbandingan tepung gandum dan medium Czapeck sebesar 1:2.

memberikan nilai aktivitas tanase tertinggi. Pada fermentasi media padat, jika medium cair terlalu tinggi maka tepung gandum sebagai substrat padat akan mengalami perubahan struktur sehingga menurunkan pemindahan oksigen. Hal ini berakibat pada rendahnya aktivitas enzim yang diperoleh. Sebaliknya jika jumlah medium cair terlalu rendah, kelarutan nutrisi pada substrat padat berkurang sehingga produksi enzim juga berkurang⁽¹²⁾.

Fraksinasi dengan amonium sulfat bertujuan untuk mendapatkan enzim tanase yang lebih murni. Berbagai tingkat kejenuhan digunakan untuk mengetahui jumlah amonium sulfat optimum yang dapat mengendapkan enzim dengan sempurna. Proses dialisis adalah tahap akhir fraksinasi yang bertujuan untuk menghilangkan sisa amonium sulfat.

Hasil fraksinasi amonium sulfat menunjukkan bahwa aktivitas tanase tertinggi diperoleh pada tingkat kejenuhan 70% yaitu sebesar 18,23 U/mL (Gambar 3). Kadar protein pada tingkat kejenuhan

60% menunjukkan hasil yang lebih tinggi yaitu 0,5324 mg/mL. Hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa aktivitas tanase pada tingkat kejenuhan 50% dan 60% tidak berbeda nyata sedangkan pada tingkat kejenuhan yang lain berbeda nyata. Uji Duncan ($\alpha = 5\%$) pada pengukuran kadar protein menunjukkan pada tingkat kejenuhan 40% dan 50% tidak berbeda secara nyata.



Gambar 3. Aktivitas enzim tanase pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat.

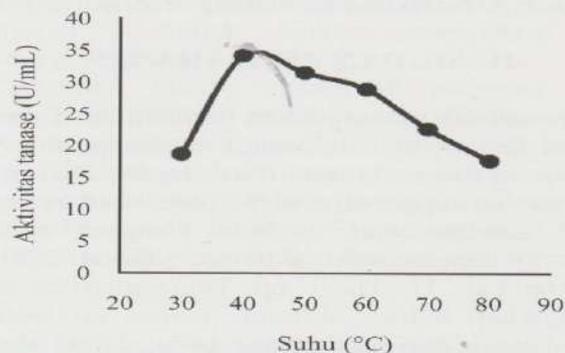
Berdasarkan nilai aktivitas total dan kadar protein yang dihasilkan, maka dapat diketahui aktivitas spesifik tanase dimana pada tingkat kejenuhan amonium sulfat 70% dihasilkan aktivitas spesifik sebesar 36,287 U/mg. Jika dibandingkan dengan enzim ekstrak kasar, aktivitas spesifik yang diperoleh setelah fraksinasi meningkat sebanyak 10 kali. Hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan aktivitas spesifik tanase pada semua tingkat kejenuhan berbeda nyata.

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan hasil yang berbeda-beda, dimana penelitian Sabu *et al.*⁽¹³⁾ menemukan aktivitas spesifik tanase tertinggi diperoleh pada tingkat kejenuhan 40-60%. Rajakumar dan Nandy⁽⁷⁾ menggunakan tingkat kejenuhan amonium sulfat hingga 100% pada proses pemurnian tanase. Perbedaan tingkat kejenuhan amonium sulfat berhubungan dengan jumlah asam amino hidrofilik yang terdapat pada protein enzim. Menurut Scopes⁽¹⁴⁾, protein enzim yang memiliki lebih banyak asam amino hidrofilik membutuhkan konsentrasi garam yang lebih tinggi untuk mengendapkannya. Penelitian Hatamoto *et al.*⁽¹⁵⁾ menemukan bahwa tanase mengandung lebih banyak asam amino hidrofilik.

Seperti yang telah diungkapkan pada paragraf sebelumnya, aktivitas tanase tertinggi diperoleh pada tingkat kejenuhan 70%. Setelah itu, terjadi

penurunan pada tingkat kejenuhan 80% baik ditinjau dari aktivitas total maupun kadar protein. Pada tingkat kejenuhan amonium sulfat di bawah nilai optimal, ion-ion garam akan melingkupi molekul-molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini sehingga protein melarut. Peristiwa ini disebut *salting in*. Pada tingkat kejenuhan amonium sulfat yang cukup, terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik mantel air dari protein. Interaksi hidrofobik di antara sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein sehingga protein akan terendapkan. Jika konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam larutan melebihi nilai optimal yang dibutuhkan untuk mengendapkan molekul protein, maka kelebihan ion garam dapat menarik molekul protein sehingga molekul protein tersebut terlarut kembali. Dengan demikian, jumlah protein yang terendapkan menjadi lebih sedikit⁽¹⁴⁾.

Karakterisasi enzim tanase meliputi suhu, pH dan pengaruh ion logam. Aktivitas enzim tanase mencapai nilai optimal pada suhu 40°C yaitu sebesar 34,167 U/mL (Gambar 4). Hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa aktivitas tanase berbeda nyata pada semua variasi suhu yang digunakan.



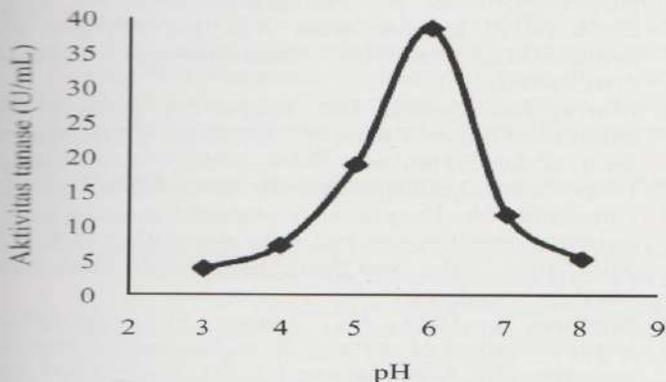
Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas tanase.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan hasil yang sama. Penelitian Sabu *et al.*⁽¹³⁾ menyimpulkan bahwa tanase yang diproduksi dari media padat memiliki suhu optimal 30-40°C, sedangkan penelitian Mahendrar *et al.*⁽¹⁶⁾ menemukan bahwa tanase memiliki suhu optimal 30-50°C. Berbeda halnya dengan penelitian yang dilakukan Ramirez-Coronel *et al.*⁽¹⁷⁾, dimana suhu optimal tanase yang diperoleh lebih tinggi yaitu sebesar 60-70°C. Hal ini kemungkinan disebabkan isolat kapang yang digunakan berbeda.

Pada penelitian Anwar *et al.*⁽³⁾, isolat kapang yang digunakan sama namun suhu optimal dihasilkan yaitu 50°C. Hal ini kemungkinan karena jenis media yang digunakan berbeda. Menurut Murray *et al.*⁽¹⁸⁾ sebagian besar enzim memiliki suhu optimal untuk menjalankan reaksi berada pada atau di atas suhu tempat enzim tersebut berada. Karena pada penelitian ini digunakan jumlah larutan Czapeck lebih banyak dibandingkan pada penelitian sebelumnya serta suhu sel mikroba lebih rendah maka suhu optimalnya menjadi lebih rendah.

Penurunan aktivitas tanase mulai terlihat pada suhu 50°C yaitu sebesar 31,449 U/mL dan terus mengalami penurunan hingga 17,611 U/mL pada suhu 80°C. Hal ini disebabkan terjadinya denaturasi protein yang dapat menghilangkan daya katalisis enzim. Jika suatu protein terdenaturasi, struktur tiga dimensi yang bersifat khusus dari rantai polipeptida terganggu. Dengan demikian struktur protein tersebut menjadi terbuka dan acak tanpa ada kerusakan pada struktur kerangka kovalennya, tetapi aktivitas biologisnya menjadi tidak berfungsi.

Aktivitas katalitik suatu enzim dapat dipengaruhi oleh perubahan pH dengan berbagai cara. Seperti halnya protein, enzim memiliki gugus yang dapat terionisasi dimana perubahan pH dapat menyebabkan perubahan gugus tersebut. Akibatnya, enzim dapat mengalami perubahan struktur atau konformasi sehingga kehilangan aktivitasnya⁽¹⁹⁾.

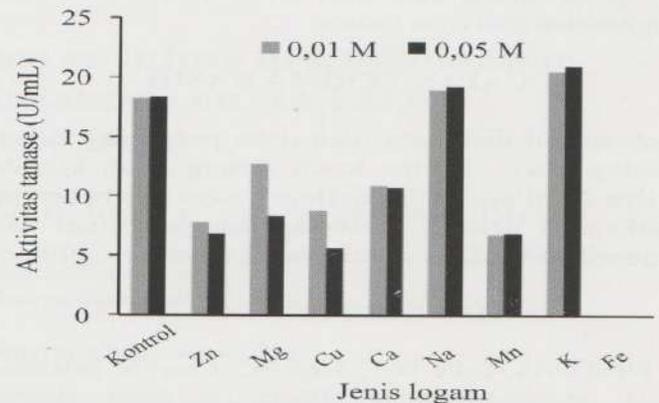


Gambar 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas tanase.

Pada Gambar 5 terlihat bahwa aktivitas tanase mencapai nilai maksimum sebesar 38,611 U/mL pada pH 6. Hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa aktivitas tanase pada pH 6 berbeda nyata dengan aktivitas tanase pada semua perlakuan pH yang digunakan. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan hasil yang sama seperti penelitian Sharma *et al.*⁽²⁰⁾ dan Sabu *et al.*⁽¹³⁾ yang menggunakan

Aspergillus niger pada produksi tanase.

Penambahan ion Na^+ dan K^+ pada konsentrasi 0,01 dan 0,05 M dapat meningkatkan aktivitas enzim tanase. Sedangkan penambahan ion Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} dan Mn^{2+} dapat menurunkan aktivitas tanase baik pada konsentrasi 0,01 dan 0,05 M (Gambar 6).



Gambar 6. Pengaruh penambahan ion logam (0,01M dan 0,05M) terhadap aktivitas tanase.

Menurut Suhartono⁽²¹⁾, penambahan garam dapat meningkatkan kekuatan ion dan mempertinggi konstanta dielektrik pelarut yang ada serta dapat mempengaruhi kestabilan molekul protein. Kestabilan molekul protein berkaitan dengan kestabilan ikatan-ikatan yang ada pada molekul enzim yakni ikatan hidrogen, ikatan Van der Waals, interaksi hidrofobik maupun gaya tarik menarik listrik antara muatan yang berbeda pada molekul-molekul penyusun. Molekul protein enzim yang stabil tentunya akan mempengaruhi pengikatan enzim dengan substrat baik pada sisi aktifnya maupun perubahan konformasi tiga dimensi enzim tersebut.

Ion logam memiliki fungsi yang beragam dalam reaksi katalisis. Ion logam dapat bertindak sebagai nukleofil dan mengaktifkan nukleofil dengan menyumbangkan elektronnya. Seperti halnya proton, ion logam dapat pula bertindak sebagai elektrofil dengan cara menerima elektron lewat ikatan σ atau π . Selain itu, ion logam dapat pula "menutupi" nukleofil sehingga mencegah reaksi samping yang mungkin terjadi⁽¹⁸⁾.

SIMPULAN

Nilai aktivitas tanase tertinggi diperoleh pada perbandingan substrat padat dan medium cair sebesar 1:2 (b/v) dengan volume inokulum sebesar

1 mL. Hasil fraksinasi amonium sulfat menunjukkan aktivitas spesifik tanase tertinggi diperoleh pada tingkat kejenuhan 70%. Karakter enzim tanase yang dihasilkan meliputi suhu optimum sebesar 40°C, pH optimum sebesar 6 dan diaktifkan oleh logam K⁺ dan Na⁺ pada konsentrasi 0,01 M dan 0,05 M. Penambahan ion Zn²⁺, Cu⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ dan Mg²⁺ pada konsentrasi 0,01 M dan 0,05 M dapat menghambat aktivitas tanase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh dana penelitian Hibah Bersaing Dikti. Terima kasih disampaikan kepada Ibu Dra. Muti'ah, M.Si dan Bapak Arya atas beberapa masukannya selama melaksanakan penelitian dan memberikan fasilitas selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Pinto GAS, Leite SGF, Terzi SC, Couri S. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. *Brazilian J Microbiol.* 2001. 32:24-6.
- Hamacher MS, Terzi SC, Couri S. 2001. Increase of tannase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. diambil dari <http://www.nrel.gov/biotechsypm25/does/abst3-68.doc>. diakses 8 Juli 2005.
- Anwar YAS, Hasim, Artika IM. The production of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger*. *Mikrobiologi Indonesia.* 2007. 1(2):91-4.
- Shatta AM, El Hamahmy AF, Ahmed FH, Ibrahim MMK, Acafa MAI. The influence of certain nutritional and environmental factors on the production of amylase enzyme by *Streptomyces aureofaciens* 77. *Journal of Islamic Acad of Science.* 1990. 3(2):134-8.
- Anto H, Trivedi U, Patel K. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation. *Food Technol Biotechnol.* 2006. 44(2): 241-5.
- Sanchez HH. Optimization of *Aspergillus niger* tannase production using Taguchi methods. http://ift.confex.com/ift/2003/tech_program/paper_19929.htm. diakses 8 Juli 2005.
- Rajakumar GS, Nandy SC. Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Appl and Environ Microbiol.* 1983. 46(2):525-7
- Pingoud A, Urbanke C, Hoggett J, Jeltsch A. *Biochemical methods: A concise guide for students and researchers.* Weinheim: Willey-VCH; 2002. 91-2.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72:248-54.
- Kar B, Banerjee R, Bhattarcharyya BC. Microbial production a gallic acid by modified solid state fermentation. *J Indust Microbiol biotechnol.* 1999. 23(3):173-7.
- Akcan N, Uyar F. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. *Eurasia J Biosci.* 2011. 5:64-72.
- Zadrazil F, Brunnert H. Investigations on physical parameters important for the SSF of straw by white rot fungi. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 1981. 11: 183-8.
- Sabu A, Kiran GS, Pandey A. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Food Technol Biotechnol.* 2005. 43(2):133-8.
- Scopes RK. *Protein purification principles and practice.* 2nd Ed. New York: Springer-Verlag; 1987. 56-8.
- Hatamoto O, Watarai T, Kikuchi K, Misusawa HS. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene.* 1996.175:215-21.
- Mahendrar B, Raman N, Kim DJ. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006.70(4):444-50.
- Ramirez-Coronel A, Viniestra-Gonzalez G, Augur C. A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity. *Microbiology.* 2003.149 (10):2941-6.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Biokimia Harper.* Ed ke-25. Hartono A, penerjemah; Bani AP dan Sikumbang TMN, editor. Terjemahan dari Harper's Biochemistry. Jakarta: EGC; 2003. 189-92.
- Copeland RA. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis.* 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.; Publication. 2000. 76-9.
- Sharma S, Bhat TK, Gupta MN. Bioaffinity immobilization of tannase from *Aspergillus niger* on concanavalin A-Sepharose CL-4B. *Biotechnol Appl Biochem.* 2002.35:165-9.
- Suhartono MT. *Enzim dan bioteknologi.* Bogor: PAU-IPB. 1989. 38-41.