

PRODUKSI ENZIM TANASE DARI *Aspergillus niger* SEBAGAI PENURUN KADAR TANIN PADA TEH

Yunita Arian Sani Anwar¹

Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas
Mataram Jl. Majapahit 62 Mataram, Indonesia
Telepon (0370) 623873 Fax. 634918

Abstrak

Enzim tanase merupakan enzim yang berperan sebagai katalis pada reaksi hidrolisis tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan enzim tanase sebagai penurun kadar tanin pada teh. Enzim tanase dihasilkan oleh *Aspergillus niger* yang diisolasi dari kulit buah kakao melalui fermentasi fase padat dengan menguji tepung gandum, tepung beras, tepung terigu dan tepung tapioka sebagai bahan media padat. Konsentrasi asam tanat divariasasi 0%; 3%; 5% dan 7%. Jenis teh yang digunakan adalah teh hijau, teh oolong dan teh herbal dengan konsentrasi enzim tanase sebesar 0%; 0,5%; 1%; 1,5%; dan 2%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim tanase yang dihasilkan pada media padat tepung gandum dengan konsentrasi induker 5% menunjukkan aktivitas yang paling tinggi dibandingkan semua perlakuan. Enzim tanase mampu menurunkan kandungan tanin hingga 100% pada teh oolong sedangkan teh hijau menunjukkan penurunan kadar tanin terendah yaitu sebesar 67%.

Kata Kunci : Enzim Tanase, Tanin, Teh

Abstract

Tannase is a hydrolytic enzyme that acts on tannins. This research to know the potential of tannase to reduce tannins of tea. Tannase production was carried out using solid state fermentation. The solid medium tested were wheat flour, rice flour, tapioca flour and potato flour with a concentration of tannic acid as inducer at 0; 3; 5 and 7% (wt/vol). Tannase was applied to oolong tea, green tea and herbal tea with a concentration of tannase at 0%; 0.5%; 1%; 1.5% and 2% (vol/vol). The best production solid medium was wheat flour with tannic acid concentration of 5% (wt/vol). Tannase was able to reduce tannin until 100% in oolong tea and 67% on green tea.

Key words: tannase, tannin, tea

¹ Penulis Korespondensi
Email rian_bik@yahoo.com

PENDAHULUAN

Tanin adalah senyawa polifenol dengan bobot molekul tinggi antara 500 sampai 20.000 Dalton dan memiliki kemampuan membentuk kompleks dengan protein dan polisakarida (Hagerman, 2002). Keberadaan tanin dalam tanaman berfungsi untuk pertahanan diri dan mencegah degradasi nutrisi yang berlebihan di dalam tanah (Leinmuller dkk, 1991).

Kandungan tanin pada buah ataupun bagian tumbuhan lainnya menimbulkan masalah pada saat pengolahan. Pada buah, kandungan tanin dapat menimbulkan rasa sepat sehingga hasil olahan buah dengan kandungan tanin yang tinggi, kurang diminati oleh para konsumen (Saragih & Haryadi, 2003). Tanin dapat menurunkan aktivitas enzim pepsin dan kimotripsin sehingga mengganggu pencernaan hewan ternak yang berakibat pada menurunnya berat badan ternak (Oh & Hoff, 1986). Pada teh, kandungan tanin menyebabkan cream teh tidak dapat larut dalam air dingin (Sanderson & Coggon, 1977).

Tanase merupakan enzim yang digunakan secara luas untuk mengurangi kandungan tanin. Enzim ini telah digunakan pada industri makanan dan obat-obatan. Dalam industri obat-obatan, tanase berperan dalam produksi asam galat. Industri makanan menggunakan enzim tanase pada produk teh instan, menjernihkan beer dan jus buah serta mengurangi efek antinutrisi pada pakan ternak (Banerjee *et al.*, 2001).

Tanase merupakan enzim ekstraselular yang dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme seperti bakteri, yeast dan jamur. Namun, jamur dari genus *Aspergillus* dan *Penicillium* diketahui sebagai penghasil tanase terbaik (Battestin & Macedo, 2007). Hasil penelitian sebelumnya telah dapat menghasilkan tanase dari *Aspergillus niger* pada fermentasi fase padat dengan aktivitas sebesar 1,401 U/mL (Anwar dkk, 2007). Namun, aplikasi enzim tanase yang dihasilkan tersebut pada suatu bahan belum dilakukan hingga saat ini.

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan enzim tanase dan mengetahui kemampuan enzim tanase sebagai penurun kadar tanin pada teh.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang diperlukan meliputi kapang *Aspergillus niger* yang diisolasi dari kulit buah kakao, Tween 80 (Merck), NaNO₃, KCl, MgSO₄·3H₂O, FeSO₄·7H₂O, K₂HPO₄·3H₂O, asam tanat (Sigma), tepung gandum, tepung terigu, tepung tapioka, tepung beras, teh hijau, teh oolong, teh herbal, indigokarmin, KMnO₄, gelatin, (NH₄)₂SO₄, aquades. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pipet volumetrik, mikropipet, inkubator, Shaker bath, magnetik stirer, Sentrifuge dingin (Beckman J2-21), Water bath, spektrofotometer, autoklaf, pH meter, neraca analitik, vortex, corong Buncher, vakum, laminar, Erlenmeyer, jarum ose, kertas Whatman no.1 (Advantec) dan peralatan gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium.

Produksi Enzim Tanase

Spora *Aspergillus niger* yang ditumbuhkan pada agar miring PDA dibuat suspensi spora dalam larutan aquades steril yang mengandung 0,1% Tween 80 sampai mencapai konsentrasi spora 3.10^7 spora/mL.

Tanase diproduksi dengan fermentasi fase padat dengan mengacu pada metode Sanchez (2003) dan Anwar dan Burhanuddin (2012). Untuk mendapatkan enzim tanase dengan aktivitas optimal digunakan variasi media padat yaitu menggunakan tepung gandum, tepung beras, tepung tapioca, dan tepung terigu masing-masing sebanyak 5 gram. Media tersebut dibasahi dengan 10 mL larutan garam. Komposisi larutan garam meliputi NH₄NO₃ 0,5%; NaCl 0,1%; MgSO₄·7H₂O 0,1% dan asam tanat dengan variasi konsentrasi 0%; 3%; 5% dan 7% pada pH 5,5. Campuran selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 20 menit. Setelah dingin, substrat padat tersebut diinokulasikan dengan 1 mL spora *Aspergillus niger* dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam.

Ekstraksi Enzim Kasar

Isolasi enzim kasar dilakukan dengan cara mengekstrak media fermentasi dengan menambahkan 50 ml aquades steril yang mengandung 0,01 % Tween 80. Campuran tersebut dilarutkan dengan menggunakan magnetik stirrer. Enzim kasar (*crude enzyme*) selanjutnya dipisahkan dari media melalui sentrifugasi. Supernatan disaring dengan kertas Whatman no. 1 dan dimasukkan ke dalam botol.

Enzim kasar difraksinasi dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 70%. 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 bufer sitrat 50 mM pH 5,0. Pemekatan enzim dilakukan dengan cara dialisis pada suhu 4 °C selama semalam dan bufernya dapat diganti beberapa kali sampai cairan diluar selofan tidak bereaksi dengan larutan Nessler.

Aktivitas enzim tanase ditentukan melalui metode Rajakumar dan Nandy (1983). Aktivitas enzim ditunjukkan dalam international unit (IU). Satu unit didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk membentuk 1 μmol asam galat per menit pada kondisi reaksi standar. Sedangkan kadar protein total ditentukan dengan metode Bradford (1976).

Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan rancangan acak lengkap 2 faktor dimana faktor A adalah jenis-jenis teh dan faktor B adalah kadar enzim tanase. Jenis-jenis teh yang digunakan adalah teh hijau, teh hitam dan teh herbal. Konsentrasi tanase yang digunakan 0%; 0,5%; 1%; 1,5%; dan 2% (v/v). Masing-masing sampel dikondisikan pada suhu 50°C dan diukur penurunan kadar taninnya dengan metode Lowenthal-Procter. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

Penentuan Kadar Senyawa Tanin (Harborne, 2006)

Sebanyak 10 mL larutan teh ditambah 25 mL larutan indigokarmin dan 750 mL aquades, kemudian dititrasi dengan larutan KMnO_4 0,1 N sampai warna kuning emas, misalkan diperlukan A mL.

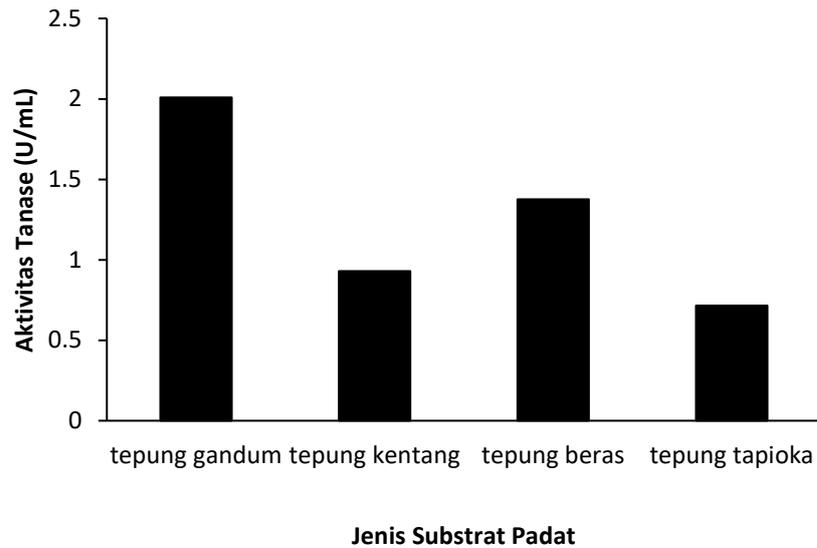
Sebanyak 100 mL larutan teh ditambah berturut-turut 50 mL gelatin. Sebanyak 100 mL larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 100 gram bubuk kaolin, lalu dikocok kuat-kuat beberapa menit dan disaring. Sebanyak 25 mL filtrat ini dicampur dengan larutan indigokarmin sebanyak 25 mL dan 750 mL aquades. Selanjutnya dititrasi dengan larutan KMnO_4 0,1 N misal dibutuhkan B mL.

Perhitungan kadar tanin adalah

$$\frac{(50A-50B) \times N/0,1 \times 0,00416}{5} \times 100\%$$

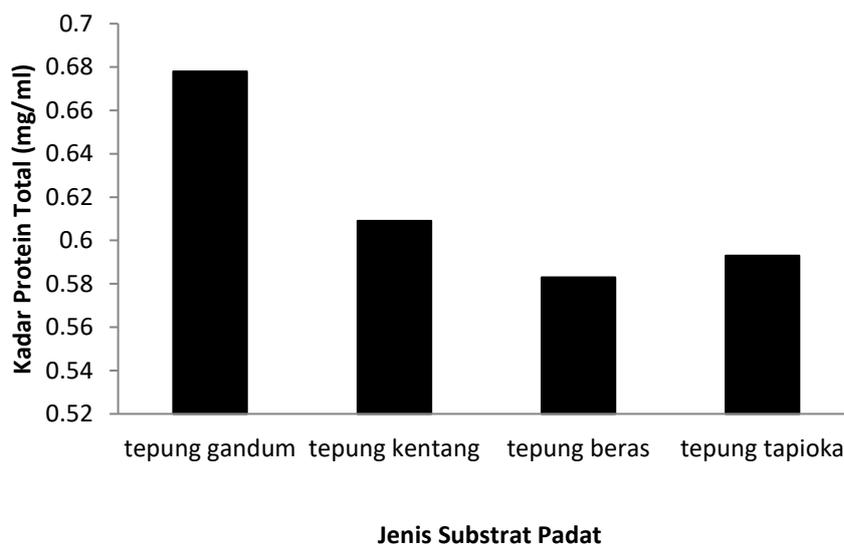
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji penggunaan media padat terbaik menunjukkan bahwa penggunaan tepung gandum memberikan hasil yang paling baik dibandingkan dengan tepung beras, tepung tapioka dan tepung kentang. Ini dapat dilihat dari aktivitas enzim tanase yang lebih tinggi pada penggunaan tepung gandum sebagai bahan pembuat media padat yaitu sebesar 2,01 U/mL (Gambar 1). Uji beda sidik ragam menunjukkan bahwa penggunaan jenis tepung secara nyata mempengaruhi aktivitas enzim tanase yang dihasilkan.



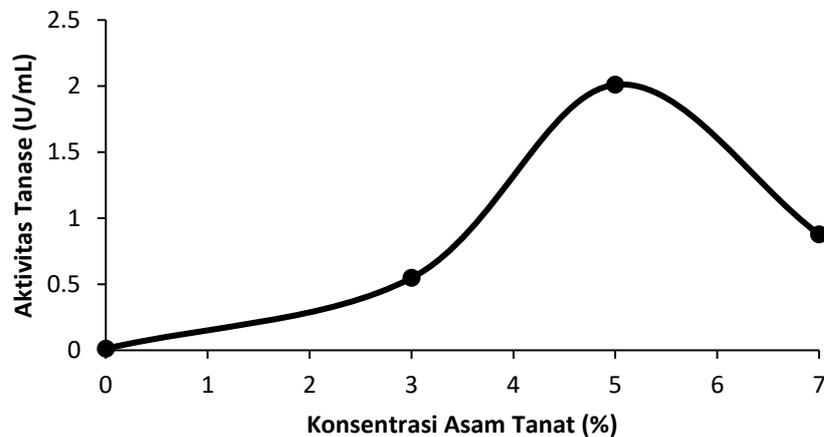
Gambar 1. Aktivitas tanase pada beberapa bahan padat dengan konsentrasi asam tanat sebesar 5% (b/v)

Kandungan protein yang terdapat pada substrat padat tepung gandum menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan jenis tepung yang lain (Gambar 2). Kadar protein tertinggi yang dihasilkan yaitu sebesar 0,678 mg/ml sedangkan kadar protein terendah adalah pada substrat padat tepung beras yaitu sebesar 0,583 mg/ml.



Gambar 2. Kadar protein total pada beberapa bahan padat dengan konsentrasi asam tanat sebesar 5% (b/v)

Konsentrasi asam tanat sebagai induser berpengaruh secara nyata terhadap aktivitas enzim tanase yang dihasilkan. Aktivitas enzim tanase tertinggi diperoleh pada konsentrasi asam tanat sebesar 5% (b/v) untuk semua jenis tepung.



Gambar 3. Aktivitas tanase pada substrat padat tepung gandum dengan beberapa konsentrasi

Penggunaan beberapa jenis tepung berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim tanase yang dihasilkan oleh *A. niger*. Hal ini sangat terkait dengan kandungan nutrisi yang terdapat pada keempat jenis tepung. Tepung gandum diketahui memiliki kandungan nutrisi yang lebih baik dibandingkan tepung kentang, tepung beras dan tepung tapioka. Selain itu, kandungan logam Ca yang lebih tinggi pada tepung tapioka dan tepung kentang kemungkinan dapat mempengaruhi aktivitas tanase yang dihasilkan. Menurut Poedjiadi (1994) kandungan logam Ca pada tepung kentang dan tepung tapioka adalah masing-masing sebesar 20 mg dan 84 mg per 100 gram bahan. Penelitian Rajakumar dan Nandy (1983) menunjukkan adanya efek penghambatan kerja enzim tanase sebesar 33% pada penambahan logam Ca. Penelitian Anwar dan Burhanuddin (2012) melaporkan bahwa logam Ca dapat menurunkan aktivitas tanase.

Penggunaan asam tanat sebesar 5% memberikan hasil yang lebih baik untuk semua jenis tepung. Hal ini sesuai dengan penelitian Anwar dkk (2007) yang menemukan konsentrasi asam tanat sebesar 5% pada media cair dan media padat memberikan aktivitas tanase tertinggi. Namun,

aktivitas tanase mengalami penurunan untuk semua jenis tepung pada penambahan induser sebesar 7%. Jumlah asam tanat yang berlebih dalam media diduga dapat bertindak sebagai repressor yang menghambat disintesisnya mRNA sehingga pembentukan enzim juga terhambat. Seperti yang diungkapkan oleh Gumbira-Said (1987), jumlah substrat yang berlebih dapat bertindak sebagai represor yang akan terikat pada gen operator sehingga mencegah disintesisnya mRNA oleh gen-gen struktural. Selain itu, apabila jumlah substrat ditingkatkan di atas nilai optimal untuk produksi tanase, akan meningkatkan jumlah panas yang dihasilkan dan mengurangi proses aerasi sehingga menurunkan produksi enzim (Banerjee dkk, 2005).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan tanase sebesar 1,5% (v/v) mampu menurunkan kadar tanin pada teh oolong sebesar 100% sedangkan teh hijau dan teh herbal dengan kadar tanase yang sama hanya mengalami penurunan sebesar 50% dan 70% (Tabel 1). Untuk teh hijau dan teh oolong penurunan kadar tanase optimal terlihat pada penggunaan enzim tanase sebesar 2%.

Tabel 1. Penurunan kandungan tannin pada beberapa jenis teh setelah penambahan enzim tanase

Jenis Teh	Penurunan kadar tanin (%)				
	0%	0,5%	1%	1,5%	2%
Teh hijau	0,01	10	22	50	67
Teh oolong	0,05	43	71	100	100
Teh herbal	0,02	35	58	67	85

Analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penambahan enzim tanase mampu menurunkan kadar tanin pada teh secara nyata ($P < 0,01$). Uji beda Duncan menunjukkan penurunan kadar tannin pada ketiga jenis teh yang tidak diberikan enzim tanase tidak berbeda nyata. Sedangkan pada penggunaan tanase sebesar 0,5%-2% menunjukkan penurunan tannin yang nyata pada ketiga jenis teh.

Pada perlakuan dengan enzim tanase sebesar 0%, penurunan kadar tanin tetap terjadi pada ketiga jenis teh walaupun dengan persentase yang rendah. Hal ini disebabkan suhu perlakuan yang

digunakan sebesar 50°C sesuai dengan suhu optimum aktivitas tanase (Anwar dkk, 2009). Kemungkinan pada suhu tersebut beberapa tanin dapat terurai terutama tanin terhidrolisis. Hagerman (2002) mengungkapkan pada suhu tersebut beberapa tanin terhidrolisis lebih mudah terurai dibandingkan tanin terkondensasi.

Penurunan kadar tanin pada ketiga jenis teh menunjukkan hasil yang berbeda pada penggunaan tanase sebesar 0,5%-2%. Ini disebabkan kandungan tanin pada ketiga jenis teh berbeda-beda. Diketahui bahwa teh hijau memiliki kandungan epigallocatekin yang lebih tinggi dibandingkan dengan teh oolong dan teh herbal yaitu sebesar 30-40% (Rohdiana, 2001).

Tanase memiliki dua aktivitas tanase terpisah yaitu aktivitas esterase dan depsidase. Aktivitas esterase adalah kemampuan menghidrolisis galoil ester pada glukosa atau alkil sedangkan aktivitas depsidase adalah kemampuan menghidrolisis ikatan antara dua residu galoil (Haslam & Stangroom, 1966).

Aktivitas tanase dipengaruhi oleh media pertumbuhan kapang *A. niger*. Menurut Haslam dan Stangroom (1966) jika *A. niger* ditempatkan pada media yang mengandung tannin dengan kandungan ester yang lebih tinggi dibandingkan ikatan depside, aktivitas esterase akan lebih dominan dibandingkan aktivitas depsidase.

Pada penelitian ini digunakan asam tanat sebagai induser dimana asam tanat mengandung ikatan depside. Enzim tanase yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki aktivitas depsidase yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas esterase. Ini dapat terlihat dari penurunan kadar tanin pada teh hijau yang lebih rendah dibandingkan teh herbal dan teh oolong. Epigallocatekin yang lebih banyak terkandung pada teh hijau lebih banyak mengandung ikatan ester dibandingkan ikatan depside sehingga penurunan kadar tanin pada teh ini lebih rendah dibandingkan teh herbal dan teh oolong.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa produksi enzim tanase dengan menggunakan tepung gandum sebagai substrat padat dan konsentrasi asam tanat sebesar 5% memberikan nilai aktivitas tanase tertinggi. Enzim tanase yang dihasilkan mampu menurunkan kadar tanin pada teh hijau, teh herbal dan teh oolong dimana penurunan kadar tanin terendah terdapat pada teh hijau. Sedangkan teh oolong mengalami penurunan kadar tanin tertinggi oleh enzim tanase.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar Y.A.S dan Burhanuddin, (2012), Pengaruh Komposisi Media terhadap Aktivitas dan Karakter Enzim Tanin Asil Hidrolase dari *Aspergillus niger*, *JiFI*, 10(2), pp. 87-92.
- Anwar Y.A.S, Hasim, Artika I.M, (2007), The Production of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger*, *Mikrobiologi Indonesia*,1(2), pp. 91-94.
- Anwar Y.A.S, Artika I.M, Danuri H, (2009), Fractionation and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger*, *Hayati*,16(3), pp. 95-99.
- Banerjee D, Mondal K.C, Pati B.R, 2001, Production and Characterization of Extracellular and Intracellular Tannase from Newly Isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9, *J Basic Microbiol*, 41 (6), pp. 313-318.
- Banerjee D, Mukherjee G, Patra K.C, 2005, Microbial Transformation of Tannin Rich Substrate to Gallic Acid through Co Culture Method, *Bioresource Technol*, 96, pp. 949-953.
- Battestin V, Macedo G.A, 2007, Effects of Temperature, pH and Additives on the Activity of Tannase Produced by *Paecilomyces variotii*, *Electro J biotechnol*, 10: pp. 191-199.
- Bradford M.M, (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding, *Anal Biochem*, 72, pp. 248-254.
- Gumbira-Said E, 1987, *Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi*, PT Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta, pp. 24-38.
- Hagerman A.E, (2002), Tannin Chemistry, <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tanin.pdf> [9 Juli 2012].
- Harborne J.B, 2006, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, ITB Press, Bandung, pp. 16-19.

Haslam E, Stangroom J.E, 1966, The esterase and depsidase activities of tannase, *J Biochem*, 99, pp. 28-31.

Leinmüller E, Steingass H, Menke K.H, 1991, Tannins in Ruminant Feedstuffs, *Animal Research and Development*, 33, pp. 9-62.

Oh H.I, Hoff J.E, 1986, Effects of Condensed Grape Tannins on the in Vitro Activity of Digestive Proteases and Activation of Their Zymogens, *J Food Sci*, 51 (3), pp. 577-583.

Poedjiadi, A, 1994, Dasar-Dasar Biokimia, UI Press, Jakarta, pp. 443.

Rajakumar G.S, Nandy S.C, 1983, Isolation, Purification, and Some Properties of *Penicillium chrysogenum* Tannase, *Appl and Environ Microbiol*, 46 (2), pp. 525-527.

Rohdiana D, 2001, Radical Scavengers Activity of Tea Polyphenol. *Majalah Farmasi Indonesia*, 12(1), pp. 53-58.

Sanderson G.W, Coggon P, 1977, Use of Enzymes in the Manufacture of Black Tea and Instant Tea, Di dalam: Ory R.L, Angelo A.J, editor. *Enzymes in Food and Beverage Processing*. Americal Chemical Society, Washington DC, pp. 12-23.

Saragih Y.P, Haryadi Y, 2003, *Mete: Budidaya Jambu Mete, Pengupasan Gelondong*, Penebar Swadaya, Jakarta, pp. 5-10.