

PRODUKSI ASAM GALAT DARI KULIT BUAH LOKAL DI LOMBOK SECARA ENZIMATIS

GALLIC ACID PRODUCTION FROM RIND LOCAL FRUIT IN LOMBOK ENZYMATICALLY

Eka Junaidi* dan Yunita Arian Sani Anwar

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

* email: pubeka76@yahoo.com

DOI : 10.20961/alchemy.v13i2.5118

Received 20 February 2017, Accepted 20 May 2017, Published online 1 September 2017

ABSTRAK

Tanase merupakan enzim yang digunakan untuk menghasilkan asam galat. Asam galat adalah senyawa yang memiliki aktivitas biologi seperti antioksidan, antibakteri, dan antivirus. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan asam galat menggunakan limbah buah lokal di Pulau Lombok secara enzimatik. Terdapat 3 jenis limbah buah lokal yang digunakan yaitu kulit buah juwet (*Syzygium cumini*), kulit buah kepundung (*Baccaurea racemosa* Muell.Arg) dan kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*). Hasil penelitian menunjukkan enzim yang digunakan adalah tanase dengan aktivitas sebesar 57,827 U/mg. Asam galat tertinggi diperoleh pada konsentrasi enzim tanase sebesar 1 % (v/v) dan waktu reaksi sebesar 60 menit untuk kulit buah kepundung. Adapun kulit buah juwet dan kulit buah manggis menghasilkan asam galat tertinggi pada konsentrasi enzim tanase sebesar 1,2 % (v/v) dengan waktu reaksi yang sama.

Kata kunci: asam galat, juwet, kepundung, manggis, tanase.

ABSTRACT

Tannase is industrially important enzyme used in the production of gallic acid. Gallic acid possesses wide range of biological activities such as antioxidant, antibacterial, and antivirus. This work aims to produce gallic acid from local fruit rind in Lombok enzymatically. The tested rind local fruit were juwet (*Syzygium cumini*), kepundung (*Baccaurea racemosa* Muell.Arg) and mangosteen (*Garcinia mangostana*). The result showed that tannase activity of 57.827 U/mg. Gallic acid concentration has increased with increase in amount of tannase and reaction time. Optimal gallic acid concentration was obtained at 1 % (v/v) tannase and 60 minutes of reaction time for kepundung rind. However, juwet and mangosteen rind produced optimal gallic acid at 1.2 % (v/v) tannase with the same of reaction time.

Keywords: gallic acid, juwet, kepundung, mangosteen, tannase.

PENDAHULUAN

Setiap tahunnya kebutuhan bahan baku obat - obatan di Indonesia mengalami peningkatan. Pasar dalam negeri hingga saat ini belum dapat memenuhi kebutuhan tersebut sehingga 96 % kebutuhan bahan baku obat - obatan masih sangat bergantung pada impor (Kementerian Kesehatan, 2013). *Harian Kompas Health* (2014) mencatat bahan baku obat - obatan lebih banyak impor dari Cina dan India. Ketergantungan ini tentunya beresiko besar bagi ketahanan obat nasional.

Asam galat adalah salah satu bahan baku obat - obatan. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antivirus, analgesik dan antioksidan (Belur *and* Pallabhanvi, 2011; Bakheet *et al.*, 2014). Barcelo *et al.* (2014) menemukan asam galat memiliki aktivitas antibakteri *E.coli* disebabkan karena senyawa tersebut memiliki sifat pro-oksidatif dan genotoksik. Penelitian Nutan *et al.* (2013) menunjukkan asam galat dan asam ellagat memiliki aktivitas sebagai senyawa anti-HIV. Selain itu, asam galat juga dapat bersifat anti-karsinogenik dan terbukti dapat membunuh sel - sel kanker (Kawada *et al.*, 2001; Chia *et al.*, 2010). Selain sebagai bahan baku obat - obatan asam galat digunakan untuk tinta fotografi dan printing (Beniwal *et al.*, 2010).

Buah - buahan lokal di Pulau Lombok saat ini semakin kurang populer setelah munculnya buah - buahan impor. Hal ini menyebabkan buah - buahan tersebut hanya bersifat sebagai limbah yang mungkin dapat menyebabkan masalah lingkungan yang cukup serius di Pulau Lombok. Oleh karena itu perlu kiranya dipikirkan usaha untuk mengoptimalkan pemanfaatan buah tersebut.

Asam galat adalah senyawa fenol yang tetap ada pada buah-buahan (Vazirian *et al.*, 2011). Senyawa ini biasanya bersama dengan glukosa terikat membentuk tanin terhidrolisis. Selain itu, senyawa ini dapat juga bergabung dengan senyawa yang lain membentuk polifenol seperti (-)-epi-gallokatekin-3-galat (Tachibana *et al.*, 2004). Asam galat dapat dihasilkan dengan cara reaksi hidrolisis untuk memutuskan ikatan yang menghubungkan asam galat dengan senyawa lain . Selama ini, asam galat diproduksi melalui hidrolisis asam substrat kaya akan tanin sehingga membutuhkan biaya yang tinggi (Lokeswari *and* Kumar, 2013). Hanya saja untuk senyawa yang sangat kompleks, pemutusan tersebut tidak dapat menggunakan reagen kimia yang sederhana.

Salah satu teknologi yang dapat digunakan untuk memutuskan ikatan ester asam galat adalah secara enzimatis. Salah satu enzim yang spesifik untuk memutuskan ikatan ester menghasilkan asam galat adalah enzim tanase. Salah satu kendala terbatasnya

penggunaan enzim ini adalah harganya yang cukup mahal. Penelitian Anwar *and* Burhanuddin (2012) telah dapat menghasilkan enzim tanase dari *Aspergillus niger*. Hanya saja aplikasi enzim tanase untuk menghasilkan asam galat hingga saat ini belum diteliti.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah inkubator, *Shaker bath*, magnetik stirrer, *centrifuge* dingin (Beckman J2-21), *Water bath*, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 20), selofan (Sigma), autoklaf (American), pH meter, neraca analitik, dan *vortex*..

Bahan yang digunakan adalah limbah buah manggis, juwet dan kepundung yang diperoleh di Kota Mataram Nusa Tenggara Barat, tepung gandum, Tween 80 (Merck), NaNO₃, KCl, MgSO₄·3H₂O, FeSO₄·7H₂O, K₂HPO₄·3H₂O, asam tanat (Sigma), tepung gandum, gallotanin (Sigma), glukosa, NaOH, HCl, Na-sitrat, asam sitrat, etanol 95 % (Merck), Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck), H₃PO₄ 85 % (Merck), bovine serum albumin (Merck), (NH₄)₂SO₄ (Kanto), etil asetat (Merck), asam sulfat (Merck), asam galat standar (Sigma), rodanin (Sigma), metanol (Merck), KOH (Merck).

Produksi Enzim Tanase

Prosedur untuk produksi tanase mengacu pada metode Anwar *and* Burhanuddin (2012). Sebanyak 5 g tepung gandum dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 125 mL dan dibasahi dengan 10 mL 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. Media selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah itu, ke dalam media padat tersebut diinokulasikan 1 mL spora jamur *Aspergillus niger* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari.

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 buffer 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.

Produksi Asam Galat dari Ekstrak Buah Lokal

Limbah buah manggis, juwet dan kepundung disortir dan dikering anginkan. Sampel selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan metanol. Pelarut diuapkan dengan evaporator. Sebanyak 1 g ekstrak kering dipanaskan dengan 20 mL aquades selama 30 menit. Larutan diencerkan dengan aquades hingga volume larutan menjadi 50 mL dan disaring dengan menggunakan kertas Whatman no. 1. Ke dalam filtrat dimasukkan 0,15 M buffer sitrat hingga pH larutan sebesar 6. Ke dalam larutan dimasukkan enzim tanase sebesar 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 dan 1,2 % (v/v) dengan variasi waktu 15, 30, 45 dan 60 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan menggunakan etanol 95 %.

Isolasi Asam Galat (Belur *and* Pallabhanvi, 2011)

Campuran reaksi selanjutnya diekstraksi menggunakan etil asetat. Ke dalam corong pisah dimasukkan larutan dan etil asetat dengan perbandingan 1 : 1. Dikocok selama 10 menit hingga terbentuk dua fase larutan. Pelarut dapat dihilangkan menggunakan evaporator pada suhu 75 °C dan 100 rpm.

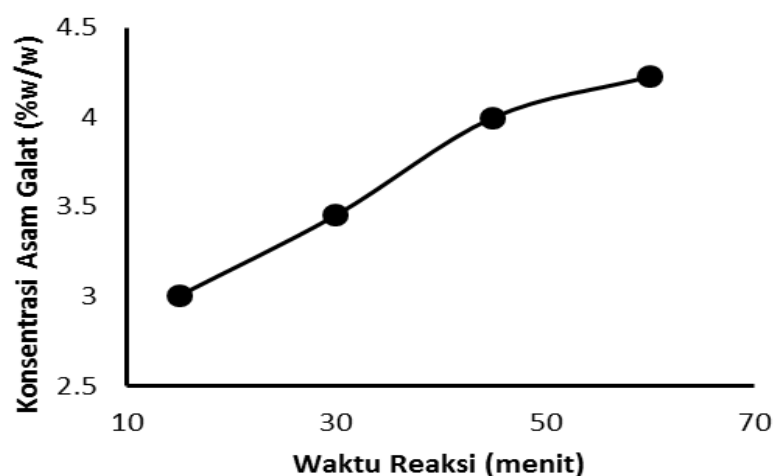
Penentuan Konsentrasi Asam Galat (Vazirian *et al.*, 2011)

Sebanyak 200 µL larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 600 µL asam sulfat (0,2 N). Ke dalam campuran dimasukkan 900 µL larutan rodanin (0,667 %). Setelah 9 menit, masukkan larutan KOH 0,5 N. Masukkan 12,9 mL aquades setelah 6 menit. Diamkan selama 25 menit. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 520 nm. Pada pembuatan blanko 900 µL rodanin diganti dengan 900 µL metanol. Larutan standar dibuat dengan 5 variasi konsentrasi asam galat (Sigma) yaitu 4 - 20 µg/5 mL.

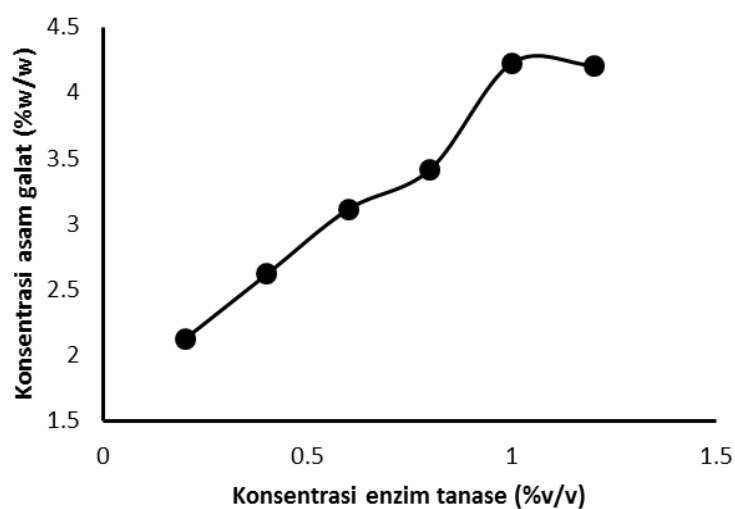
PEMBAHASAN

Produksi enzim tanase menggunakan metode Anwar *and* Burhanuddin (2012) yang dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat. Hasil akhir fraksinasi menggunakan ammonium sulfat diperoleh aktivitas tanase sebesar 17,69 U/mL pada suhu 30 °C dan jika diukur menggunakan suhu optimal 50 °C aktivitas tanase sebesar 30,897 U/mL. Kadar protein yang dihasilkan adalah sebesar 0,5343 mg/mL sehingga nilai aktivitas spesifik dari enzim adalah sebesar 57,827 U/mg. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Anwar *and* Burhanuddin (2012) sebagai penelitian pendahuluan.

Penambahan enzim tanase pada ekstrak kulit buah kepungdung menunjukkan konsentrasi asam galat yang dihasilkan berbeda - beda untuk masing-masing konsentrasi enzim tanase yang ditambahkan dan waktu reaksi yang digunakan. Semakin besar konsentrasi enzim tanase yang ditambahkan semakin besar asam galat yang dihasilkan (Gambar 1). Begitu pula waktu reaksi penambahan enzim tanase menunjukkan semakin lama waktu reaksi jumlah asam galat yang dihasilkan semakin besar (Gambar 2). Nilai tertinggi asam galat yang dihasilkan untuk kulit buah kepungdung adalah sebesar 4,227 % (w/w) pada konsentrasi penambahan enzim tanase sebesar 1 % dan waktu reaksi sebesar 60 menit. Penambahan enzim tanase sebesar 1,2 % dengan waktu reaksi yang sama tidak menunjukkan penambahan asam galat yang dihasilkan.



Gambar 1. Pengaruh waktu reaksi terhadap konsentrasi asam galat (% w/w) kulit buah kepungdung pada penambahan tanase sebesar 1 %.



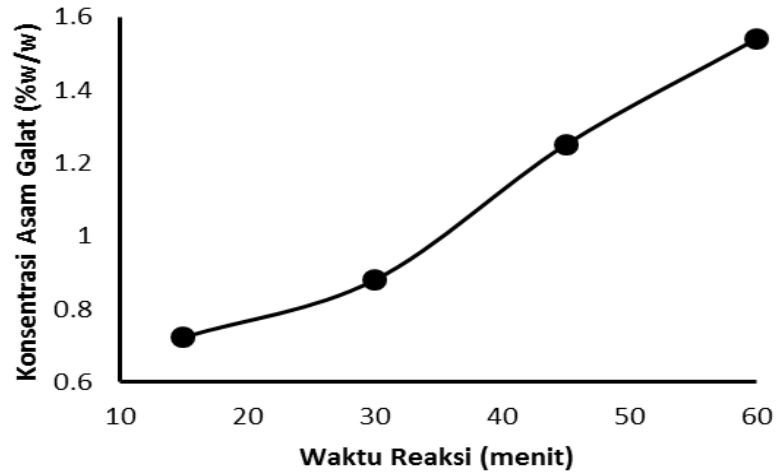
Gambar 2. Pengaruh penambahan enzim tanase terhadap konsentrasi asam galat (% w/w) kulit buah kepungdung.

Hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa asam galat yang dihasilkan dari kulit buah kepundung pada konsentrasi tanase sebesar 0,2 hingga 1 % berbeda secara nyata namun penambahan tanase 1 % dan 1,2 % tidak berbeda secara nyata. Waktu reaksi secara keseluruhan mempengaruhi produksi asam galat dari kulit buah kepundung. Hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan produksi asam galat berbeda secara nyata untuk waktu reaksi 15 hingga 45 menit namun tidak berbeda secara nyata untuk waktu reaksi 45 dan 60 menit.

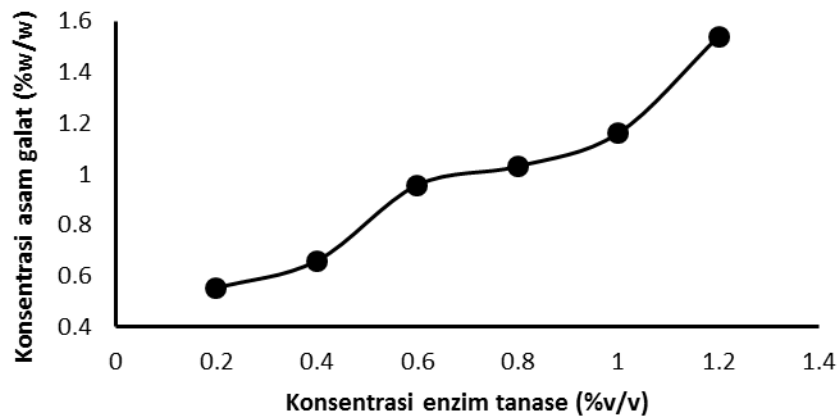
Penambahan konsentrasi enzim tanase sebesar 1,2 % tidak mempengaruhi produksi asam galat disebabkan oleh telah jenuhnya konsentrasi substrat tanase penghasil asam galat. Nelson *and* Cox (2008) menyatakan aktivitas tanase yang ditandai dengan produksi asam galat tidak dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi enzim dan substrat melainkan jumlah kompleks enzim-substrat yang dihasilkan. Jika jumlah enzim yang diberikan semakin besar namun substrat enzim sebagai penghasil asam galat telah habis dikonversi menjadi asam galat maka penambahan konsentrasi enzim tidak akan mempengaruhi produk. Begitu pula sebaliknya penambahan substrat tidak akan mempengaruhi penambahan produk jika enzim telah jenuh terhadap substrat. Hasil penelitian Prasad *et al.* (2011) menunjukkan bahwa penambahan substrat tidak mempengaruhi penambahan jumlah asam galat yang dihasilkan.

Seperti halnya kulit buah kepundung, penambahan enzim tanase pada ekstrak kulit buah manggis dan juwet menunjukkan konsentrasi asam galat yang dihasilkan berbeda - beda untuk masing-masing konsentrasi enzim tanase yang ditambahkan dan waktu reaksi yang digunakan. Nilai tertinggi asam galat yang dihasilkan untuk kulit buah juwet adalah sebesar 1,54 % (w/w) pada konsentrasi penambahan enzim tanase sebesar 1,2 % dan waktu reaksi sebesar 60 menit (Gambar 3 dan 4). Penambahan waktu reaksi tidak meningkatkan produksi asam galat karena enzim tanase dalam kondisi jenuh. Produksi asam galat tertinggi yang dihasilkan dari kulit buah manggis adalah sebesar 2,267 % (w/w) pada konsentrasi penambahan enzim tanase dan waktu reaksi yang sama dengan kulit buah juwet (Gambar 5 dan 6).

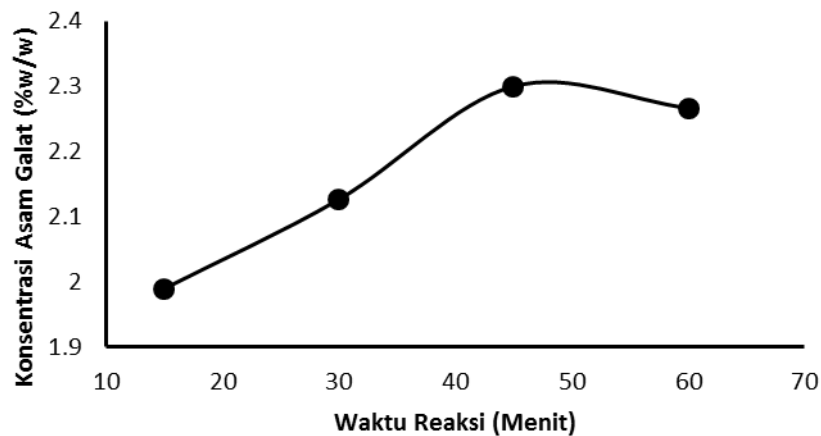
Berbeda dengan kulit buah kepundung, hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa asam galat yang dihasilkan dari kulit buah juwet dan kulit buah manggis berbeda secara nyata pada semua konsentrasi penambahan enzim. Produksi asam galat dari kulit buah juwet dan kulit buah manggis juga berbeda secara nyata untuk semua waktu reaksi berdasarkan hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$).



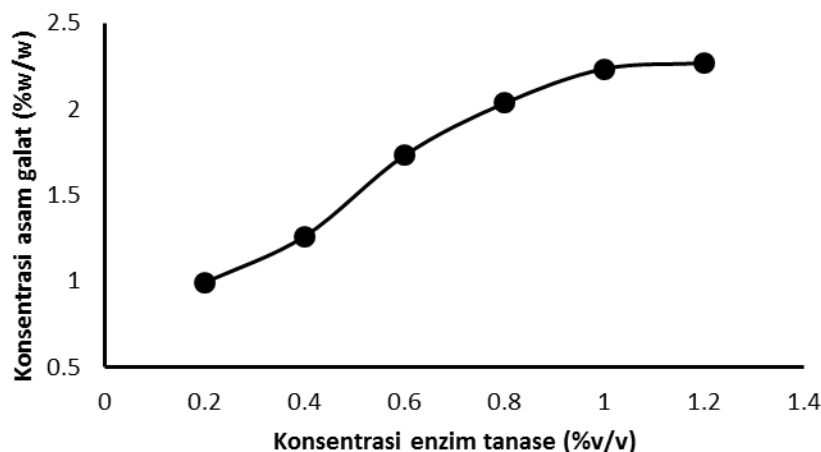
Gambar 3. Pengaruh waktu reaksi terhadap konsentrasi asam galat (% w/w) kulit buah juwet pada penambahan tanase sebesar 1,2 %.



Gambar 4. Pengaruh penambahan enzim tanase terhadap konsentrasi asam galat (% w/w) kulit buah juwet pada waktu reaksi 60 menit.



Gambar 5. Pengaruh waktu reaksi terhadap konsentrasi asam galat (% w/w) kulit buah manggis pada penambahan tanase sebesar 1,2 %.



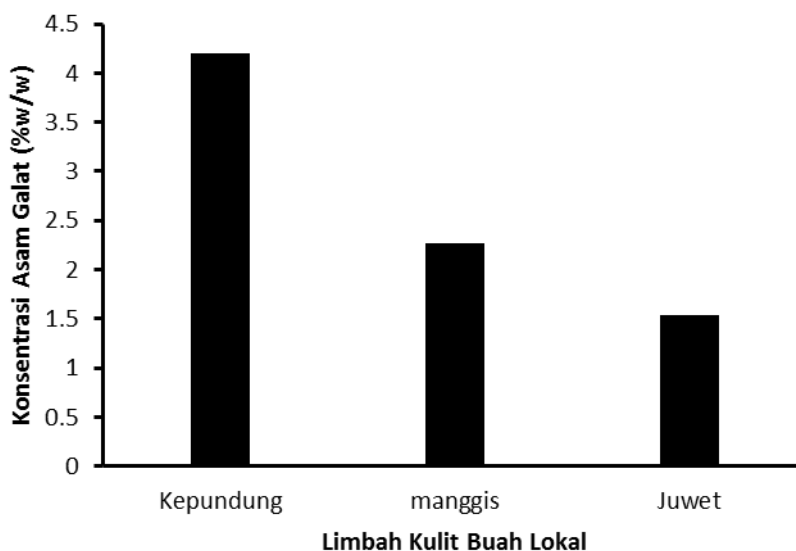
Gambar 6. Pengaruh penambahan enzim tanase terhadap konsentrasi asam galat (% w/w) kulit buah manggis pada waktu reaksi 60 menit.

Tanase merupakan enzim yang dapat mengkatalis reaksi hidrolisis tanin membentuk asam galat. Penelitian selama ini menggunakan media fermentasi untuk menghasilkan asam galat. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kulit buah kepundung memiliki potensi yang lebih besar dalam menghasilkan asam galat dibandingkan dengan kulit buah manggis dan kulit buah juwet. Beberapa penelitian telah mengkaji produksi asam galat menggunakan bahan alami dengan fermentasi oleh mikroba untuk menghasilkan asam galat. Beniwal *et al.* (2010) menggunakan *Enterobacter cloacae* MTCC 9125 dengan substrat sodium nitrat dan KH_2PO_4 sebagai sumber nitrogen dan sumber fosfat pada submerged fermentation. Asam galat maksimal yang dihasilkan sebesar 3,71 mg/mL. Buah Bahera dapat juga digunakan sebagai substrat oleh *Aspergillus heteromorphus* MTCC 5466 untuk menghasilkan asam galat. Jumlah maksimal asam galat yang dihasilkan sebesar 35 ± 2 mg/gds, dimana asam galat tersebut dapat digunakan untuk sintesis propil galat sehingga memiliki potensi sebagai antioksidan pada industri makanan (Prasad *et al.*, 2011). Lokeswari and Kumar (2013) telah memproduksi asam galat menggunakan limbah industri yang kaya akan tanin.

Di antara ketiga limbah kulit buah yang digunakan untuk produksi asam galat, kulit buah kepundung menunjukkan produksi asam galat yang lebih tinggi dibandingkan kulit buah manggis dan kulit buah juwet (Gambar 7). Hasil uji Duncan ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa asam galat yang dihasilkan dari ketiga limbah kulit buah berbeda secara nyata.

Perbedaan asam galat yang dihasilkan dari ketiga limbah kulit buah terkait dengan kandungan tanin dan senyawa fenol yang terdapat pada kulit buah. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa kandungan tanin pada kulit buah kepundung, manggis dan juwet adalah berturut-turut sebesar 0,233; 0,245 dan 0,172 g/100 g bahan. Total

senyawa fenol kulit buah kepundung, manggis dan juwet adalah sebesar 3,34; 1,38 dan 1,51 g/100 g bahan (Junaidi *and* Anwar, 2015). Kandungan tanin yang lebih tinggi pada kulit buah manggis dan kepundung menunjukkan produksi asam galat yang lebih tinggi. Produksi asam galat yang paling tinggi pada kulit buah kepundung meskipun kadar tanin yang lebih tinggi pada kulit buah manggis menunjukkan enzim tanase pada penelitian ini lebih spesifik menghidrolisis senyawa fenol dibandingkan tanin.



Gambar 7. Pengaruh jenis limbah kulit buah lokal terhadap produksi asam galat.

Tanase merupakan enzim memutuskan ikatan galoil pada tanin terhidrolisis untuk menghasilkan asam galat dan pliol, tetapi tidak dapat mengkatalis reaksi pemutusan heksahidroksifenil. Selain itu tanase juga memiliki kemampuan mengkatalis reaksi hidrolisis tanin terkondensasi untuk menghasilkan senyawa flavonoid (Seigler, 1998). Hasil penelitian Anwar *et al.* (2007) mengindikasikan bahwa tanase dari *Aspergillus niger* pada penelitian ini memiliki aktivitas yang lebih tinggi terhadap substrat yang mengandung ikatan depside dibandingkan ikatan ester. Ikatan depside lebih banyak terdapat pada senyawa polifenol. Hal ini kemungkinan dipengaruhi oleh komposisi media yang digunakan untuk menghasilkan tanase. Jika mikroba ditumbuhkan pada media yang mengandung substrat dengan ikatan ester, maka tanase yang dihasilkan akan memiliki aktivitas esterase yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas depsidase (Lokeswari *and* Raju, 2007). Sebaliknya jika substrat yang digunakan dalam media mengandung ikatan depside, maka tanase yang dihasilkan akan memiliki aktivitas depsidase yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas esterase. Pada penelitian ini, substrat yang terdapat dalam media

adalah asam tanat sehingga tanase yang diperoleh memiliki aktivitas depsidase yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas esterase.

Beberapa penelitian melaporkan produksi asam galat dari beberapa tumbuhan. Bhagat *et al.* (2015) melaporkan produksi asam galat dari tumbuhan *Terminalia chebula* yang kandungan tanin lebih banyak berupa gallotanin sebesar 40 %. Gallotanin sendiri termasuk tanin terhidrolisis sederhana yang terbentuk melalui ikatan ester antara glukosa dengan asam galat. Bentuk dasar dari senyawa ini disebut pentagalloyl glukosa (β -1,2,3,6-pentagalloyl-O-D-glukopiranos), memiliki lima ikatan ester yang terdiri dari gugus hidroksil alifatik pada inti glukosa (Hagerman, 2002). Asam galat juga telah dihasilkan dari tumbuhan *C. Alata* dan *A. Paniculata* dimana asam galat tertinggi dihasilkan melalui ekstraksi metanol sebesar $410 \pm 7,8$ mg/g crude ekstrak pada *A. paniculata* dan $351,2 \pm 5,6$ mg/g crude ekstrak *C. alata* (Phansawan and Pongsabangpho, 2014).

KESIMPULAN

Penggunaan enzim tanase dari media padat terbukti dapat menghasilkan asam galat dari limbah kulit buah lokal di Pulau Lombok. Konsentrasi enzim tanase sebesar 1 % (v/v) menunjukkan hasil asam galat yang lebih tinggi untuk kulit buah kepundung dan konsentrasi enzim tanase sebesar 1,2 % untuk kulit buah manggis dan juwet. Waktu reaksi sebesar 60 menit juga memberikan hasil tertinggi di dalam perolehan asam galat pada ketiga buah. Kulit buah kepundung menunjukkan produksi asam galat yang paling tinggi dibandingkan kulit buah manggis dan kulit buah juwet.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh dana penelitian Hibah Bersaing Kemenristek DIKTI.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, Y.A.S., and Burhanuddin, 2012. Pengaruh Komposisi Media terhadap Aktivitas dan Karakter Enzim Tanin Asil Hidrolase dari *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 10 (2), 87-92.
- Anwar, Y.A.S., Hasim, and Artika, I.M., 2007. The Production of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger*. *Mikrobiologi Indonesia* 1(2), 91–94.
- Bakheet, M.S., Soltan, S., Gadalla, A., Haredy, H.H., and Shakoor, M.A., 2014. Antioxidants (Vitamin E and Gallic Acid) as Valuable Protective Factors Against Myocardial Infarction. *Basic Research Journal of Medicine and Clinical Sciences* 11, 109–122.

- Barcelo, J.M., Guieb, M., Ventura, A., Nacino, A., Pinasen, H., Viernes, L., Yodong, T., Estrada, B.L., Valdez, D., and Binwag, T., 2014. Antibacterial, Prooxidative and Genotoxic Activities Of Gallic Acid And Its Copper And Iron Complexes Against *Escherichia coli*. *Asian Pacific Journal of Multidisciplinary Research* 2(6), 45–56.
- Bhagat, S., Dongre, P., Bhagat, S., and Dikpati, A., 2015. Extraction and Isolation Of Gallic Acid From Self-Generated Fermentation System of *Terminalia chebula*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7(4), 170–174.
- Belur, P.D., and Pallabhanvi, B., 2011. Investigation on Production Of Gallic Acid From *Terminalia chebula* extract using cell associated tannase of *Bacillus massiliensis*. *Bangkok: International conference of advances in biotechnology and pharmaceutical sciences (ICABPS)*.
- Beniwal, V, Chhokar, V., Singh, N., Sharma, J., 2010. Optimization of Process Parameters For The Production Of Tannase And Gallic Acid by *Enterobacter cloacae* MTCC 9125. *Journal of American Science* 6(8), 389–397.
- Chia, Y.C., Rajbanshi, R., Calhoun, C., and Chiu, R.H., 2010. Anti-neoplastic Effects Of Gallic Acid A Major Component Of *Toona sinensis* Leaf Extract on Oral Squamous Carcinoma Cell. *Molecules* 15, 8377-8389.
- Hagerman A.E., 2002. *Tannin Chemistry*. <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tanin.pdf>>. diakses pada 9 Juli 2010.
- Junaidi, E., and Anwar, Y.A.S., 2015. *Produksi Asam Galat dari Limbah Buah Lokal di Pulau Lombok*. Laporan penelitian tidak dipublikasi.
- Kementerian Kesehatan. 2013. *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kompas Health. 2014. *Bahan Baku Obat 95 persen masih diimport*. <<http://www.ikatanapotekerindonesia.net/pharmacy-news/34-pharmacy-news/1914-bahan-baku-obat-95-persen-masih-diimport.html>>, (diakses pada 22 April 2014).
- Kawada, M., Ohno, Y., Ri, Y., Ikoma, T., Yuugetu, H., Asai, T., Watanabe, M., Yasuda, N., Akao, S., Takemura, G., Minatoguchi, S., Gotoh, K., Fujiwara, H., and Fukuda, K., 2001. Antitumor Effect Of Gallic Acid On LL-2 Cancer Cells Transplanted In Mice. *Anticancer drugs*, 12, 847-852.
- Lokeswari, N., and Kumar, B.L., 2013. A Novel Biochemical Method For Production Of An Antibacterial Drug Trimethoprim From Industrial Wastes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(3), 651–653.
- Lokeswari, N., and Raju, K.J., 2007. Tannase Production by *Aspergillus Niger*. *E-Journal of Chemistry* 4(2), 192-198.
- Nelson D.L., and Cox M.M., 2008. *Lehninger: Principles of Biochemistry edition 5*. London: W.H. Freeman.
- Nutan, Modi, M., Goel, T., Das, T., Malik, S., Suri, S., Rawat, A.K., Srivastava, S.K., Tuli, R., Malhotra, S., Gupta, S.K., 2013. Ellagic Acid & Gallic Acid From *Lagerstroemia speciosa* L. Inhibit HIV-1 Infection Through Inhibition Of HIV-1 Protease & Reverse Transcriptase Activity. *Indian Journal of Medical Research* 137(3):540-8.

- Phansawan, B., and Pongsabangpho, S., 2014. Determination of Gallic Acid and Rutin in Extracts Cassia alata and Andrographis paniculata. *Science Asia* 40, 414–419.
- Prasad, D., Gupta, R.K., Venkataratnam, G.S., Kamini, N.R., and Gowthaman, M.K., 2011. Utilization Of Bahera Fruits For Production Of Tannase And Gallic Acid By Aspergillus Heteromorphus MTCC 5466 And Synthesis Of Propyl Gallate Thereof. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry Research* 6(3), 119–128.
- Seigler, D.S., 1998. *Plant Secondary Metabolism*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers.
- Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., and Yamada, K., 2004. A Receptor For Green Tea Polyphenol EGCG. *Nature structural and molecular biology* 11, 380-381.
- Vazirian, M., Khanavi, M., Amanzadeh, Y., and Hajimehdipoor, H., 2011. Quantification Of Gallic Acid In Fruits Of Three Medicinal Plants. *Iranian journal of pharmaceutical research* 10(2), 233-236.