

Skrining dan Identifikasi Molekuler Gen Penyandi 16S rRNA Bakteri Penghasil Enzim Tanase dari Hutan Lawu Utara

Screening and Molecular Identification of 16S rRNA Encoding Genes of Tanase Enzyme Producing Bacteria from North Lawu Forest

Muh. Nahrowi B

Sekolah Menengah Atas Negeri 2 Ngawi, Jl. Ahmad Yani Klitik, Ngawi, Jawa Timur, Tromol Pos 7
Email: muhnahrowi70@gmail.com

Abstrak

Tanin merupakan senyawa fenolik bersifat rekalsitran dan toksik bagi sebagian besar mikroorganisme. Degradasi tanin oleh tanase fungi telah banyak dilaporkan, namun laporan yang berkaitan dengan kemampuan bakteri untuk mendegradasi tanin masih sedikit. Dalam aplikasinya, tanase banyak digunakan sebagai biokatalisator dalam berbagai industri. Sebagian besar biomassa di dasar hutan Lawu Utara berupa tumpukan daun pinus dengan kandungan tanin cukup tinggi, diduga memiliki potensi cukup melimpah populasi bakteri penghasil tanase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah di hutan Lawu Utara terdapat bakteri penghasil tanase aktivitas tinggi dan berapa besar tingkat aktivitas tanase serta bagaimana hubungan filogenetiknya. Uji kualitatif dengan mengukur indek degradasi asam tanat. Uji kuantitatif digunakan spektrofotometer UV-Vis, λ 310 nm. Identifikasi takson berdasarkan sekuen gen penyandi 16S rRNA. Terdapat 6 isolat memiliki tanase aktivitas tinggi. Aktivitas tertinggi 44,72 U/ml terdapat pada isolat B03 teridentifikasi memiliki similaritas sebesar 98% dengan genus *Pseudomonas*.

Kata kunci: Gen penyandi 16S rRNA, Hutan Lawu Utara, tanase

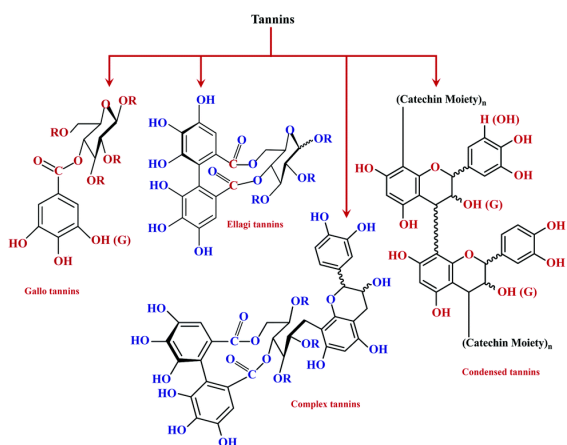
Abstract

*Tannins are phenolic compounds that are recalcitrant and toxic to most microorganisms. Degradation of tannins by tannase fungi has been widely reported, but reports relating to the ability of bacteria to degrade tannins are still few. In its application, tannase is widely used as a biocatalyst in various industries. Most of the biomass at the bottom of the North Lawu forest is in the form of piles of pine needles with a fairly high tannin content, thought to have the potential for quite an abundant population of tannase-producing bacteria. This study aims to determine whether there are high-activity tannase-producing bacteria in the North Lawu Forest forest, what is the level of tannase activity, and how is the phylogenetic relationship—qualitative test by measuring the tannic acid degradation index. The quantitative test used a UV-Vis spectrophotometer, λ 310 nm—identification of the taxon based on the 16S rRNA encoding gene sequence. Six isolates had high tannase activity. The highest activity of 44.72 U/ml was found in isolate B03, which was identified as a bacterium that has a similarity of 98% to the genus *Pseudomonas*.*

Keywords: : 16S rRNA coding gene, North Lawu Forest, tannase

Pendahuluan

Tanin merupakan metabolit sekunder yang tergolong kedalam senyawa fenolik dengan berat molekul berkisar antara 500 – 3000 Dalton (Biswas et al., 2022; Farha et al., 2020). Senyawa ini banyak terdapat pada angiospermae, gymnospermae dan pteridophyte, banyak ditemukan di bagian tumbuhan seperti, daun, akar, kulit batang dan buah (Lekshmi et al., 2021a). Tanin diklasifikasikan menjadi tanin terhidrolisis dan terkondensasi. Gambar 1 menunjukkan klasifikasi dasar tanin. Tanin terhidrolisis menghasilkan campuran asam galat, asam ellagat, dan asam digalat, senyawa tersebut terdiri dari ikatan ester yang terbentuk dari asam benzoat dan gula. Selain itu, tanin juga memiliki nukleofilisitas lebih rendah dengan kandungan senyawa fenolat yang lebih rendah. Polimerisasi tanin terkondensasi menghasilkan phlobaphene yang tidak larut dalam air (Dhawale et al., 2022a).



Gambar 1. Jenis Tanin (Tanin Terhidrolisis dan Terkondensasi) dan Struktur Kimianya (Dhawale et al., 2022b)

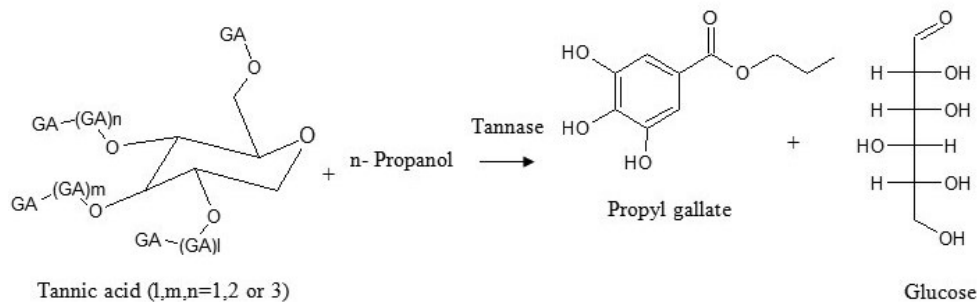
Bar-Ya'akov et al. (2019) melaporkan, ekstrak *Punica granatum* L dan *Quercus* suber mengandung tanin yang dapat dihidrolisis. Sedangkan tanin terkondensasi terdiri oligomer atau polimer flavan-3-ol yang digabungkan dengan ikatan C-C, yang biasanya dibentuk oleh ikatan C-4 dari katekin ke C-8 berikutnya, meskipun terkadang C-4 ke C-6 (Khanbabaee & Van Ree, 2001) senyawa ini banyak ditemukan di beberapa kulit kayu termasuk *Pinus merkusii* (Sianto et al., 2022). Kehadiran gugus hidroksil bebas, tanin memiliki potensi untuk dilakukan modifikasi secara kimiawi sehingga menjadi bahan yang lebih fungsional

(Dhawale et al., 2022c). Sebagian besar reaksi biokatalitik dan biotransformasi telah secara signifikan memanfaatkan berbagai enzim untuk membuat produk yang berharga bagi kesejahteraan manusia (Alcántara et al., 2022) Enzim mikroba memiliki nilai ekonomi sangat tinggi di beberapa tahun terakhir karena kegunaannya yang luas dalam kebanyakan aplikasi industri. Enzim mikroba merupakan bagian utama dari enzim industri karena enzim mikroba memiliki karakteristik aktivitas lebih baik dibandingkan dengan yang diperoleh dari sumber lain (Thapa et al., 2019)

Tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) atau tanase adalah kelompok enzim esterase yang bekerja secara spesifik mengkatalisis hidrolisis tanin menjadi asam galat, glukosa dan galoil ester (saeed et al., 2021). Tanase memiliki aplikasi luas dalam berbagai bidang industri, seperti industri pembuatan asam galat, pirogallol, pemrosesan makanan dan minuman, pengelolaan limbah penyamakan kulit dan air limbah (Biswas et al., 2022). Indonesia yang kaya akan biodiversitas memiliki potensi besar untuk produksi berbagai biokatalis dari eksplorasi mikroba terutama enzim tanase. Tanase merupakan salah satu molekul penting dalam industri dan terapeutik yang permintaannya lebih dari 10.000 ton per tahun, enzim ini juga dapat digunakan secara efektif untuk menurunkan kandungan tanin dalam limbah beracun penyamakan kulit sehingga memberikan peluang untuk meminimalkan biaya operasional. Selama tiga dekade terakhir tannase dari sumber mikroba telah diusulkan untuk degradasi tanin alami. Ketersediaan berbagai residu agroindustri membuka jalan untuk pemanfaatan produksi tannase secara maksimal (Lekshmi et al., 2021b). Tanase juga dapat digunakan sebagai probe analitik untuk menentukan struktur ester asam galat, untuk mendeteksi sel kanker, pengurai limbah cair industri penggilingan zaitun dan kulit yang mengandung tanin (Belmares et al., 2004; Mohapatra et al., 2009; Noguchi et al., 2007). Biaya produksi tannase dapat dikurangi melalui eksplorasi penggunaan mikroorganisme yang berpotensi aktif menghasilkan enzim tersebut (Aharwar & Parihar, 2018). Beberapa mikroba yang dilaporkan menghasilkan enzim tanase antar lain; *Bacillus Gottheilii* M2S2, *Lachnospiracea* bacterium, *Aspergillus niger* (Borah et al., 2023; Guan et al., 2023; Omeroglu et al., 2023). Asam tanat adalah polifenol alami yang mengandung

glukosa dan asam galat, senyawa ini merupakan standar yang paling umum digunakan untuk uji

kuantisasi tannin (Makkar & Becker, 1993).



Gambar 2. Jalur Hidrolisis Asam tanat oleh Enzim Tanase (Natarajan K. et al., 2008)

Metode Penelitian

Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan kualitatif diskriptif.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan tanggal 12 Januari – 13 Juni 2022 di laboratorium Biologi SMAN 2 Ngawi dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain; sampel tanah yang diambil dari lantai hutan dari kawasan lereng Lawu bagian Utara, medium nutrisi agar (NA agar), asam tanat 0,25%, akuades, buffer sitrat 0,05M (pH 5,5), ddH₂O, forward primer 63f, reverse primer 1387r.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: cool box, botol sampel, kertas label, pensil, digital camera, tabung reaksi, cawan petri, gelas beker, erlenmeyer, neraca analitik, hot plate, shaker, laminar air flow, autoclave, lampu bunsen, batang pengaduk, gelas ukur, jarum ose, batang L, magnetic stirrer, kapas, aluminium foil, pipet, freezer, tip, tabung eppendorf, biophotometer, alat polimerase chain reaction (PCR), seperangkat alat elektroforesis, ultraviolet transiluminator (gel doc). Spektrofotometri UV-Vis.

Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari tiga lokasi yaitu; a). Lantai hutan di bawah campuran pohon kopi dan pinus, b). Lantai hutan di bawah pohon pinus saja, dan c). Lantai hutan di bawah

campuran pohon cengkeh dan kopi. Sampel tanah diambil dari bawah serasah yang sudah mulai lapuk kurang lebih 50 gram.

Skrining bakteri penghasil enzim tanase

Skrining dilakukan dengan memodifikasi protokol (Kumar et al., 2010) cara 1 gram sampel tanah diencerkan ke dalam 9 ml akuades steril sehingga dihasilkan konsentrasi 10⁻¹. Hasil seri pengenceran 10⁻³ sampai 10⁻⁵ diambil sebanyak 0,1 ml kemudian ditebarkan (*spread plate method*) dan diratakan di atas permukaan medium nutrisi agar (NA) 30.0 g/L (pH 6.5) yang diperkaya asam tanat 5g/L, *beef extract* 2.0 g/L, NaCl 4.0 g/L, pepton 4.0 g/L dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 7x24 jam. Setelah inkubasi selesai, larutan FeCl₃ 0,01 M (dalam HCl 0,01 N) digenangkan di plate agar media tumbuh bakteri dan disimpan selama 5 menit. Kemudian 5 mL larutan FeCl₃ (0,01 M FeCl₃ dalam HCl 0,01 N) dikeluarkan dari plate dan diperiksa pembentukan zona hidrolisis di sekitar koloni bakteri. Koloni yang memiliki morfologi dan menunjukkan aktivitas tanase ditandai terbentuknya area coklat bening disekitar koloni selanjutnya dilakukan proses isolasi dengan metode gores (*spread plate method*).

Uji aktivitas kualitatif enzim tanase

Uji aktivitas tanase secara kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan diameter zona hidrolisis dengan diameter koloni bakteri (Florencio et al., 2012). Rumus indeks enzimatis: a/b, a = diameter zona hidrolisis asam tanat, b = diameter koloni. Penentuan kriteria kualitatif indeks enzimatis berdasarkan asumsi jika kurang dari 1,5 diberi kriteria rendah, sama dengan 1,5 diberi kriteria sedang dan di atas 1,5 diberi kriteria tinggi.

Produksi *crude extract* enzim tanase

Inokulum bakteri 2% yang dinkubasi satu malam diinokulasi ke dalam 25 mL media nutrient broth (NB) dalam labu 150 mL yang mengandung asam tanat 10 g/L, KH₂PO₄ 0,5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/L, NH₄Cl 1,0 g/L, CaCl₂ 0,1 g/L dan glukosa 5,0 g/L (6,5 pH). Kemudian dinkubasi ke dalam labu suhu 37°C dan digoyang dengan shaker 120 rpm selama 48 jam. Setelah inkubasi selesai, kultur diambil 10 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai *crude extract* enzim dan disimpan pada suhu 4°C untuk digunakan lebih lanjut. (Aharwar & Parihar, 2018a).

Uji kuantitatif aktivitas tanase

Uji kuantitatif menurut protokol (Iibuchi, S., Minoda, Y., & Yamada, K. (1968). 0,5 mL *crude extract* enzyme, 2 mL asam tanat 0,35% (b/v), 20 µL larutan buffer sitrat 0,05M (pH 5,5) dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambah etanol hingga larutan menjadi 15 ml, dengan waktu inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 310 nm. Saat setelah penambahan etanol dicatat sebagai t1 dan setelah 10 menit inkubasi dicatat sebagai t2. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghidrolisis 1 µmol ester tiap menit. Aktivitas Enzim (U/mL) dihitung dengan

rumus: $(\Delta 0 - \Delta t) 106. (\epsilon R T)^{-1}$. Δt = Arbsorbansi pada menit ke-t, $\Delta 0$ = Arbsorbansi pada menit ke-0, ϵ = koefisien absorpsivitas molar ester 270,000 cm⁻¹M⁻¹), T = Waktu (menit), R = Volume supernatan enzim (ml).

Identifikasi molekuler bakteri penghasil tanase aktivitas tinggi

Isolasi DNA genom bakteri penghasil tanase menggunakan Presto™ mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid Biotech Ltd.). Amplifikasi gen penyandi 16S rRNA menggunakan MyTaq HS Red Master Mix (Bioline), volume total reaksi 25 µl, forward primer 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan reverse primer 1387r (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3') mengamplifikasi DNA template dengan panjang ampikon sekitar 1300 bp. Program PCR; denaturasi awal 95OC selama 1 menit, 30 siklus, denaturasi 95OC selama 15 detik, anealing 54OC-60OC selama 15 detik, ekstensi 72OC selama 10 detik. Verifikasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa 1,5%.

Hasil Penelitian dan Pembahasan

Hutan Lereng Lawu Utara

Terdapat tiga macam kelompok tegakan yang mendominasi hutan lereng Lawu Utara yaitu; campuran pohon pinus dan kopi, pohon pinus saja dan campuran pohon kopi dan cengkeh (Gambar 1).



Lokasi A



Lokasi B



Lokasi C

Gambar 3. Pohon Dominan di Hutan Lawu Utara. Campuran pohon pinus dan kopi (lokasi A), pohon pinus saja (lokasi B) dan campuran pohon cengkeh dan kopi (lokasi C)

Tanaman hortikultura kebanyakan berupa tanaman kopi ditanam di bawah pohon Pinus, dan sebagian berupa tanaman cengkeh yang ditanam di luar area pohon pinus, sedangkan pohon pinus di dominasi oleh spesies Pinus merkusii. Komposisi serasah di lantai hutan

lereng Lawu Utara didominasi oleh biomassa daun pinus (Gambar 3), hal tersebut disebabkan oleh adanya dominasi pohon pinus dan ditunjang oleh sifat daunnya yang memiliki kandungan tanin cukup tinggi dan bersifat rekalsitran sehingga terjadi akumulasi biomassa

daun pinus cukup tinggi di lantai hutan. Tanin sebagai senyawa proteksi terhadap herbivora, senyawa tersebut merupakan substrat dan

sekaligus sumber karbon yang baik bagi bakteri pendegradasi tanin.



Gambar 4. Penumpukan biomassa daun pinus mendominasi dasar hutan lereng Lawu Utara

Dari skrining menunjukkan bakteri penghasil tanase terdapat di seluruh lokasi pengambilan sampel, terutama pada lokasi yang paling banyak mengandung biomassa daun pinus.

Koloni bakteri penghasil enzim tanase

Koloni bakteri penghasil tanase ditandai dengan terbentuknya zona coklat terang disekitar koloni, zona tersebut merupakan asam tanat yang terhidrolisis oleh aktivitas enzim tanase (Ajayi & Kwokoms, 2022) Terdapat 7 macam karakter morfologi koloni dari keseluruhan sampel (Tabel 1).

Tabel 1. Karakte morfologi koloni bakteri penghasil enzim tanase dari seluruh sampel

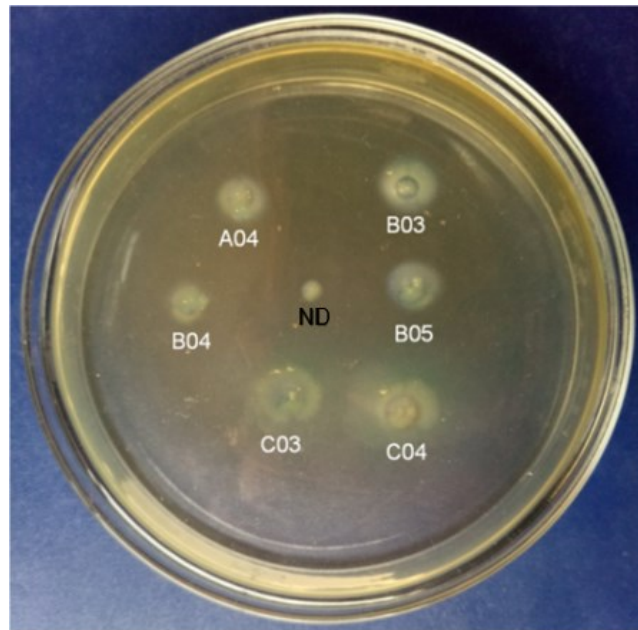
No	Morfologi Koloni			Kode Koloni	Σ
	Bentuk	Warna	Tepian	() = diameter koloni (mm)	
1	Bulat	Putih	Berombak	A04 (7)	1
2	Bulat	Kuning	Berombak	A01 (4), A02 (5), A03 (4), B01 (10), B02 (7), B05 (9),	6
3	Bulat	Kuning pucat	Berombak	B04(7).	1
4	Tdk beraturan	Kuning pucat kusam	Berombak	B03 (6)	1
5	Bulat	Putih	Halus	A05 (10).	1
7	Bulat	Kuning	Halus	C01 (5), C02 (7), C03 (11), C04 (10)	4
Total					14

Koloni bermorfologi bulat-kuning-berombak memiliki jumlah terbanyak.

Aktivitas isolat bakteri penghasil enzim tanase

Dari uji kualitatif menunjukkan terdapat variasi aktivitas enzim tanase isolat bakteri dari

seluruh sampel. Perbedaan aktivitas tersebut ditunjukkan oleh perbedaan diameter zona degradasi (zona hidrolisis) yang mengelilingi koloni bakteri pendegradasi asam tanat pada medium NA yang diperkaya asam tanat (Gambar 5).



Gambar 5. Zona hidrolisis asam tanat oleh beberapa isolat bakteri

Keterangan:

Kode angka warna putih adalah kelompok isolat berindek enzimatik tinggi, kode angka warna hitam isolat bakteri non degradasi asam tanat (ND)

Isolat bakteri penghasil enzim tanase memiliki kemampuan hidrolisis tinggi terhadap asam tanat terdapat di seluruh sampel, terutama

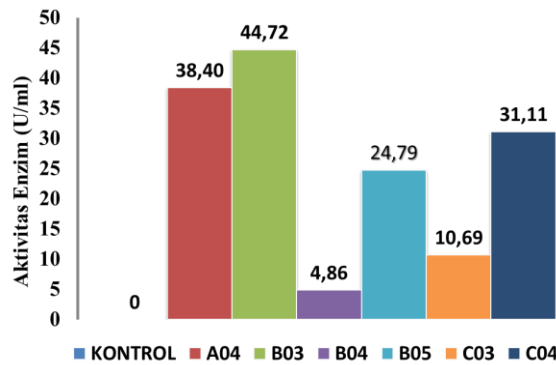
di lokasi b terdapat 3 isolat aktivitas tinggi (B03, B04 dan B05) (Tabel 2)

Tabel 2. Daftar indek enzimatik isolat bakteri penghasil enzim tanase dari seluruh sampel. indek degradasi tertinggi 2,7 terdapat di isolat B03

No	Kode isolat	Diameter (mm)		Indek degradasi	Kriteria
		Koloni	Zona bening		
1	A01	4	6	1,5	Sedang
2	A02	5	5	1,25	Rendah
3	A03	4	9	1,3	Rendah
4	A04	7	17	2,4	Tinggi
5	A05	10	12	1,2	Rendah
6	B01	10	15	1,5	Sedang
7	B02	7	10	1,4	Rendah
8	B03	6	18	2,7	Tinggi
9	B04	7	11	1,6	Tinggi
10	B05	9	18	2,0	Tinggi
11	C01	5	6	1,2	Rendah
12	C02	7	9	1,3	Rendah
13	C03	11	19,5	1,8	Tinggi
14	C04	10	21	2,2	Tinggi

Dari keseluruhan sampel diperoleh 6 isolat berindek enzimatik tinggi dengan urutan dari rendah ke tinggi sebagai berikut; B04, C03, B05, C04, A04 dan B03.

Uji kuantitatif aktivitas tanase menggunakan spektrofotometri UV-Vs, diukur berdasarkan kecepatan perubahan nilai absorbansi per menit

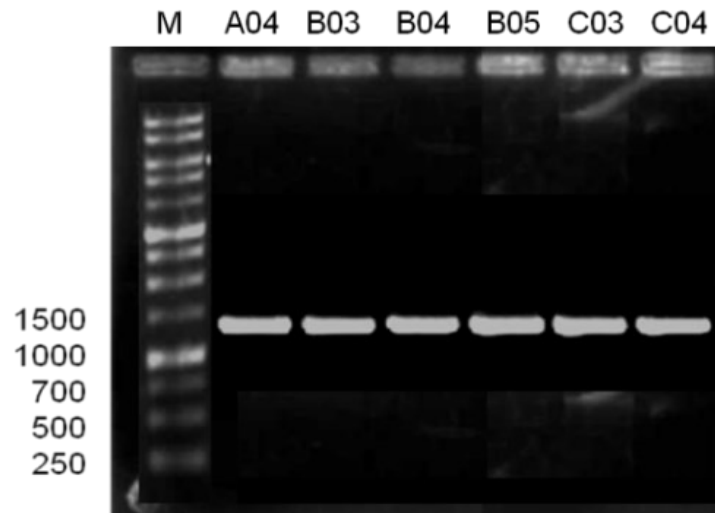


Gambar 6. Grafik aktivitas tinggi enzim tanase dalam reaksi hidrolisis asam tanat oleh 6 isolat bakteri. isolat B03 menunjukkan memiliki aktivitas paling tinggi 44,72 U/ml

Dari gambar 6 diperoleh urutan tingkat aktivitas enzim tanase dalam menghidrolisis asam tanat dari rendah ke tinggi (U/ml) yaitu; B04, C03, B05, C03, A04, B03. Aktivitas tertinggi terdapat pada isolat B03, aktivitas tersebut lebih rendah dari *Bacillus subtilis* (211.97 ± 0.08 U/ml) (Shakir et al., 2022) tetapi lebih tinggi dari *Bacillus haynesii* SSRY4 MN031245 (16.80 U/ml) (Dhiman et al., 2022)

Identifikasi molekuler gen penyandi 16S rRNA isolat bakteri penghasil enzim tanase aktivitas tinggi

Verifikasi ampikon produk PCR menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% (Gambar 7), hasil amplifikasi gen penyandi 16S rRNA memiliki panjang fragmen sekitar 1300 bp.



Gambar 7. Elektroforegram produk PCR Gen 16S rRNA 6 isolat bakteri penghasil tanase aktivitas tinggi

Analisis sekuen nukleotida menggunakan program BLAST untuk dibandingkan dengan sekuen nukleotida bakteri di database GenBank NCBI. Menurut Drancourt et al. (2000) jika persentase similaritas sebesar $\geq 99\%$ maka isolat yang dibandingkan dapat dinyatakan sebagai spesies yang sama, persentase 97-99% dapat dinyatakan sebagai genus yang sama dan persentase similaritas $< 97\%$ dapat dinyatakan bahwa isolat tersebut belum dapat teridentifikasi taksonnya. Penentuan takson berdasarkan berdasarkan sekuen gen 16S rRNA tidak cukup untuk menggambarkan spesies yang identik, sekuen nukleotida yang menunjukkan kemiripan rendah belum dapat ditentukan diskripsi taksonnya secara lengkap (Stackebrandt & Goebel, 1994). Dalam

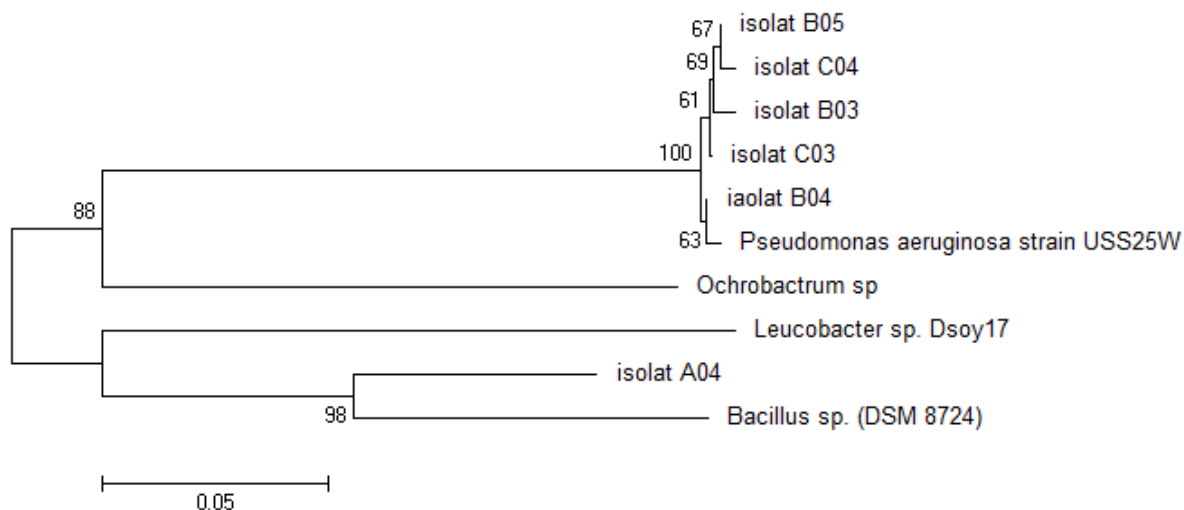
beberapa kasus bakteri dapat dikelompokkan menjadi spesies baru walaupun homologi 16S rRNA di atas 99%, hal tersebut terjadi jika nilai homologi hibridisasi DNA-DNA rendah, atau $< 70\%$ (Jauh-Hsun et al., 1999; Patel et al., 2004). Dari hasil analisis sekuen diperoleh data isolat A04 memiliki similaritas sebesar 99% dengan *Staphylococcus saprophyticus*. B03, B04, B05 dan C04 ketiganya teridentifikasi memiliki similaritas sebesar 98% genus *Pseudomonas* sedangkan isolat C03 memiliki similaritas sebesar 95% dengan *Pseudomonas aeruginosa*.

Hubungan kekerabatan bakteri penghasil tanase

Untuk memvalidasi terhadap hasil analisis BLAST, dilakukan analisis filogenetik,

analisis ini digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik (phylogenetic tree) dan mempelajari hubungan kekerabatan antara

isolat bakteri penghasil tanase hasil penelitian dengan bakteri tanase yang telah teridentifikasi pada penelitian sebelumnya.



Gambar 8. Pohon filogenetik bakteri penghasil tanase hasil penelitian dengan beberapa bakteri penghasil tanase yang telah ditemukan sebelumnya menggunakan *test neighbor-joining tree* dengan bootstrap 500 replikasi

6 isolat bakteri penghasil tanase aktivitas tinggi terdikitomi dalam 2 kelompok besar (Gambar 7), yaitu; Kelompok bakteri gram negatif; isolat B03, B04, B05, C03 dan C04 berada dalam satu sub-kelompok dengan *Pseudomonas aeruginosa*, sedangkan *Ochrobactrum sp.* sebagai outgroup, Kelompok

bakteri gram positif; isolat A04 satu sub-kelompok dengan *Bacillus sp.* sedangkan *Leucobacter sp.* sebagai outgroup. Semakin dekat jarak genetik suatu isolat bakteri dengan isolat lain berarti semakin dekat tingkat kekerabatannya, sebaiknya semakin jauh jarak genetik berarti semakin jauh kekerabatannya

Tabel 3. Uji *Pairwise Distance Calculation* hubungan genetik antara isolat bakteri penghasil tanase aktivitas tinggi dan bakteri yang pernah ditemukan sebelumnya

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. isolat_A04									
2. isolat_B03	0.3								
3. isolat_B04	0.3	0.0							
4. Isolat_B05	0.3	0.0	0.0						
5. <i>Bacillus sp. (DSM 8724)</i>	0.1	0.3	0.3	0.3					
6. isolat_C03	0.3	0.0	0.0	0.0	0.3				
7. isolat_C04	0.3	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0			
8. <i>Leucobacter sp. Dsoy17</i>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3		
9. <i>Ochrobactrum sp.</i>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
10. <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	0.3	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.3	0.3

Dari uji *Pairwise Distance Calculation* (Tabel 3) diperoleh jarak genetik terdekat adalah 0,0 terdapat pada jarak antar isolat B03, B04, B05, C03, C04 dan *Pseudomonas*

aeruginosa. Jarak genetik terdekat ke dua adalah 0,1 terdapat pada jarak antar isolat A04 dengan *Bacillus sp.* Jarak genetik terjauh 0,3 terdapat pada jarak antara isolat A04, B03, B04,

B05, C03, C04, *Leucobacter_sp*, *Ochrobactrum_sp* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Simpulan dan Saran

Simpulan

Lantai hutan BKPH Lawu Utara terdapat 6 isolat bakteri memiliki aktivitas tanase tinggi. Isolat A04 teridentifikasi memiliki similaritas yang tinggi dengan *Staphylococcus saprophyticus*, Isolat B03, B04, B05 dan C04 ketiganya teridentifikasi memiliki similaritas yang tinggi dengan genus *Pseudomonas* dan isolat C03 teridentifikasi similaritas tinggi dengan *Pseudomonas aeruginosa*. B03 merupakan isolat dengan aktivitas tanase tertinggi, dengan kemampuan hidrolisis ester sebesar 44,72 U/L).

Saran

Penelitian ini menggunakan primer yang menghasilkan sekuen parsial gen penyandi 16S rRNA dengan panjang 1300 bp sehingga belum bisa digunakan untuk mendeterminasi spesies dari isolate yang ada, untuk hasil determinasi spesies lebih valid maka disarankan untuk peneliti berikutnya bisa menggunakan primer yang menghasilkan sekuen total gen penyandi 16S rRNA (1500 bp).

Daftar Pustaka

- Aharwar, A., & Parihar, D. K. (2018a). Tannases: production, properties, applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15, 322–334.
- Aharwar, A., & Parihar, D. K. (2018b). Tannases: Production, properties, applications. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 15, pp. 322–334). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.005>
- Ajayi, A. A., & Kwokoms, U. (2022). Characterization of tannase-producing bacteria in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *MICROBIOLOGY RESEARCH*.
- Alcántara, A. R., Dominguez de Maria, P., Littlechild, J. A., Schürmann, M., Sheldon, R. A., & Wohlgemuth, R. (2022). Biocatalysis as key to sustainable industrial chemistry. *ChemSusChem*, 15(9), e202102709.
- Bar-Ya'akov, I., Tian, L., Amir, R., & Holland, D. (2019). Primary metabolites, anthocyanins, and hydrolyzable tannins in the pomegranate fruit. *Frontiers in Plant Science*, 10, 620.
- Belmares, R., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Coronel, A. R., & Aguilar, C. N. (2004). Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *LWT-Food Science and Technology*, 37(8), 857–864.
- Biswas, I., Mitra, D., & Mohapatra, P. K. Das. (2022). Structural and catalytic advancement of fungal tannase: A proteomic contribution in industrial applicability. *Bioresource Technology Reports*, 101103.
- Borah, A., Selvaraj, S., & Murty, V. R. (2023). Production of Gallic Acid from *Swietenia macrophylla* Using Tannase from *Bacillus Gottheilii* M2S2 in Semi-Solid State Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 1–19.
- Condren, A. R., Kahl, L. J., Boelter, G., Kritikos, G., Banzhaf, M., Dietrich, L. E. P., & Sanchez, L. M. (2019). Biofilm inhibitor taurolithocholic acid alters colony morphology, specialized metabolism, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infectious Diseases*, 6(4), 603–612.
- Dhawale, P. V., Vineeth, S. K., Gadhave, R. V., MJ, J. F., Supekar, M. V., Thakur, V. K., & Raghavan, P. (2022a). Tannin as a renewable raw material for adhesive applications: a review. *Materials Advances*.
- Dhawale, P. V., Vineeth, S. K., Gadhave, R. V., MJ, J. F., Supekar, M. V., Thakur, V. K., & Raghavan, P. (2022b). Tannin as a renewable raw material for adhesive applications: a review. *Materials Advances*.
- Dhawale, P. V., Vineeth, S. K., Gadhave, R. V., MJ, J. F., Supekar, M. V., Thakur, V. K., & Raghavan, P. (2022c). Tannin as a renewable raw material for adhesive applications: a review. *Materials Advances*.
- Dhiman, S., Mukherjee, G., Kumar, A., & Majumdar, R. S. (2022). Purification, Characterization and Application Study of Bacterial Tannase for Optimization of Gallic acid Synthesis

- from Fruit Waste. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 81(10), 1029–1036.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.-P., & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623–3630.
- Farha, A. K., Yang, Q.-Q., Kim, G., Li, H.-B., Zhu, F., Liu, H.-Y., Gan, R.-Y., & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751.
- Florencio, C., Couri, S., & Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*, 2012.
- Guan, L., Wang, K., Gao, Y., Li, J., Yan, S., Ji, N., Ren, C., Wang, J., Zhou, Y., & Li, B. (2023). Biochemical and Structural Characterization of a Novel Bacterial Tannase From. *Biocatalysis and Biotransformation Guided by Protein Engineering*, 16648714.
- Jana, A., Halder, S. K., Banerjee, A., Paul, T., Pati, B. R., Mondal, K. C., & Mohapatra, P. K. Das. (2014). Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase: a molecular advancement. *Bioresource Technology*, 157, 327–340.
- Khanbabaee, K., & Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641–649.
- Kumar, R., Kumar, A., Nagpal, R., Sharma, J., & Kumari, A. (2010). A novel and sensitive plate assay for screening of tannase-producing bacteria. *Annals of Microbiology*, 60(1), 177–179.
- Lekshmi, R., Nisha, S. A., Vasan, P. T., & Kaleeswaran, B. (2021a). A comprehensive review on tannase: Microbes associated production of tannase exploiting tannin rich agro-industrial wastes with special reference to its potential environmental and industrial applications. *Environmental Research*, 201, 111625.
- Lekshmi, R., Nisha, S. A., Vasan, P. T., & Kaleeswaran, B. (2021b). A comprehensive review on tannase: Microbes associated production of tannase exploiting tannin rich agro-industrial wastes with special reference to its potential environmental and industrial applications. *Environmental Research*, 201, 111625.
- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1993). Behaviour of tannic acid from various commercial sources towards redox, metal complexing and protein precipitation assays of tannins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(3), 295–299. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620314>
- Mohapatra, P. K. Das, Maity, C., Rao, R. S., Pati, B. R., & Mondal, K. C. (2009). Tannase production by *Bacillus licheniformis* KBR6: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Food Research International*, 42(4), 430–435.
- Natarajan K., Rajendran A., & Thangavelu V. (2008). Tannase enzyme: The most Promising Biocatalist for Food Processing Industries. *Bioseciences, Biotechnology Research Asia*, 5(1) 221-228 (2008), 1–8. <https://www.biotech-asia.org/?p=6611>
- Noguchi, N., Ohashi, T., Shiratori, T., Narui, K., Hagiwara, T., Ko, M., Watanabe, K., Miyahara, T., Taira, S., & Moriyasu, F. (2007). Association of tannase-producing *Staphylococcus lugdunensis* with colon cancer and characterization of a novel tannase gene. *Journal of Gastroenterology*, 42, 346–351.
- Omeroglu, M. A., Albayrak, S., Arslan, N. P., Ozkan, H., Adiguzel, A., & Taskin, M. (2023). Evaluation of wool protein hydrolysate as peptone for production of microbial enzymes. *3 Biotech*, 13(1), 31.
- Patel, J. B., Wallace Jr, R. J., Brown-Elliott, B. A., Taylor, T., Imperatrice, C., Leonard, D. G. B., Wilson, R. W., Mann, L., Jost, K. C., & Nachamkin,

- I. (2004). Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2530–2540.
- Shakir, H. A., Khan, M., Irfan, M., Ali, S., Yousaf, M. A., Javed, I., Qazi, J. I., & Bukhari, S. S. I. (2022). Production and characterization of tannase by *Bacillus subtilis* in solid state fermentation of corn leaves. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 9(1), 516–530.
- Sianto, B. V., Rollando, R., & Tambun, S. H. (2022). Uji Aktivitas Antikolesterol Kombinasi Ekstrak Daun Afrika *Vernonia amygdalina* dan Daun Pinus *Pinus merkusii* Secara In Vitro. *Sainsbertek Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi*, 3(1), 322–333.
- Silva, I. S., Menezes, C. R. de, Franciscon, E., Santos, E. da C. dos, & Durrant, L. R. (2010). Degradation of lignosulfonic and tannic acids by ligninolytic soil fungi cultivated under microaerobic conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 693–699.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 846–849.
- Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F.-C., Nasr, K. Al, Johnson, T., & Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*, 61, 579–601.