



**KEMAMPUAN TUMBUH DAN PROFIL PROTEIN BAKTERI  
PENDEGRADASI KAFEIN PADA MEDIA METILXANTIN**

**SKRIPSI**

Oleh:

**ALFIANA RIZQI**

**NIM 161810401064**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**



**KEMAMPUAN TUMBUH DAN PROFIL PROTEIN BAKTERI  
PENDEGRADASI KAFEIN PADA MEDIA METILXANTIN**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

**ALFIANA RIZQI**

**NIM 161810401064**

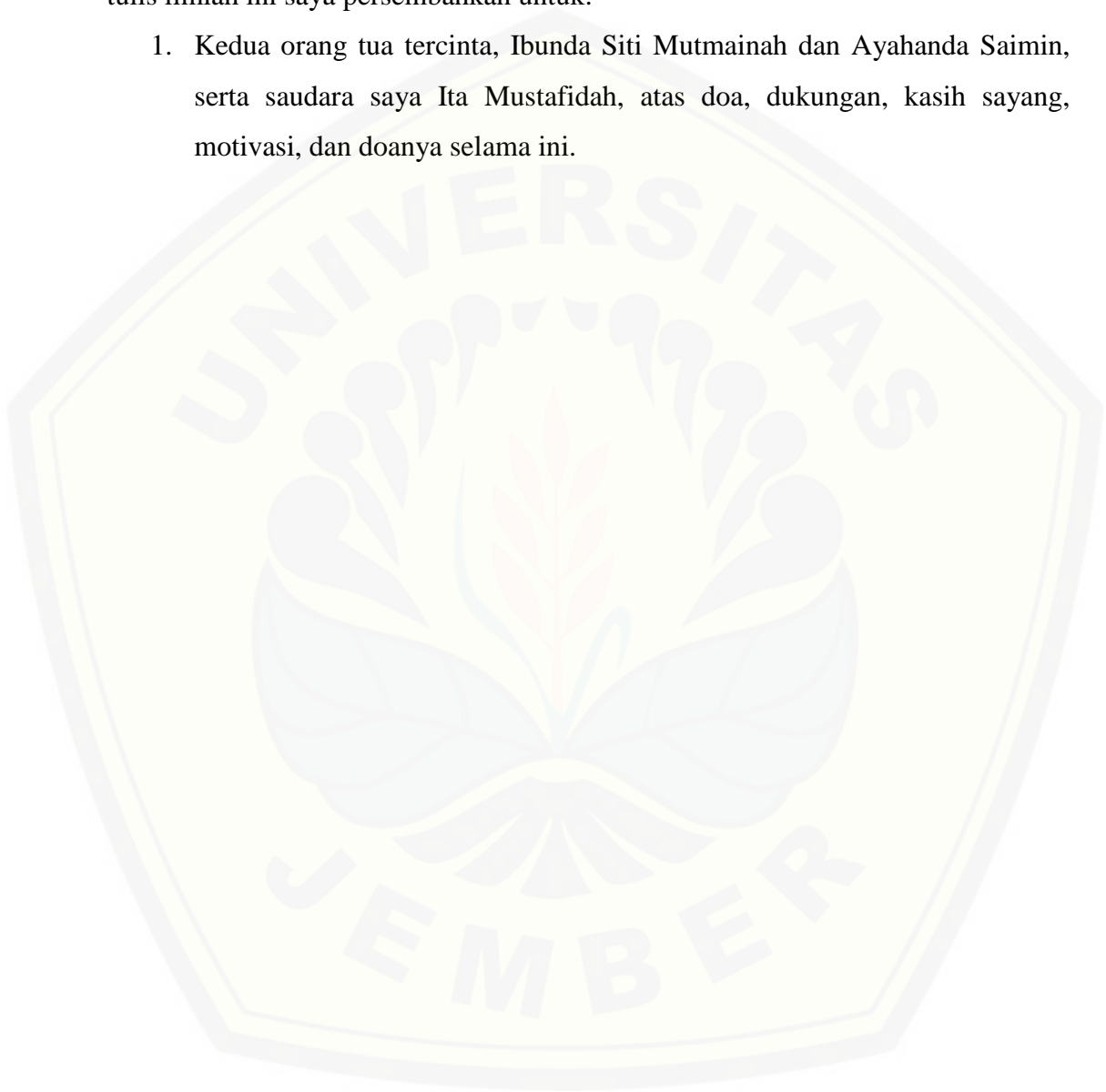
**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

## PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, karya tulis ilmiah ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua tercinta, Ibunda Siti Mutmainah dan Ayahanda Saimin, serta saudara saya Ita Mustafidah, atas doa, dukungan, kasih sayang, motivasi, dan doanya selama ini.



## MOTO

Hidup ini adalah petualangan, semua orang memiliki petualangannya masing-masing, maka jadilah seorang petualang yang melakukan hal terbaik.

(Tere Liye \*)<sup>1</sup>

Jadilah seperti lilin, yang tidak pernah menyesal saat nyala api membakarmu. Jadilah seperti air yang mengalir sabar. Jangan pernah takut memulai hal baru.

(Tere Liye \*\*)<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Tere Liye. 2016. *Matahari*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama

<sup>2</sup> Tere Liye. 2016. *Tentang Kamu*. Jakarta: Republika.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Alfiana Rizqi

NIM : 161810401064

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Kemampuan Tumbuh dan Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein pada Media Metilxantin.” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan proyek penelitian yang dibiayai oleh Dr. Sattya Arimurti, SP., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 11 Agustus 2020

Yang menyatakan,

Alfiana Rizqi

NIM 161810401064

**SKRIPSI**

**KEMAMPUAN TUMBUH DAN PROFIL PROTEIN BAKTERI  
PENDEGRADASI KAFEIN PADA MEDIA METILXANTIN**

Oleh:

Alfiana Rizqi

NIM 161810401064

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Sattya Arimurti, SP., M.Si.

Dosen pembimbing Anggota : Mukhamad Su'udi, Ph.D

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Kemampuan Tumbuh dan Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein pada Media Metilxantin.” karya Alfiana Rizqi telah diuji dan disahkan oleh Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember

Tim penguji :

Ketua,

Anggota I,

Dr. Sattya Arimurti, SP., M.Si.  
NIP. 197403311999032001

Mukhamad Su’udi, Ph.D  
NIP. 760016788

Anggota II,

Anggota III,

Dr. Esti Utarti, SP., M.Si.  
NIP. 197003031999032001

Drs. Siswanto, M.Si.  
NIP. 196012161993021001

Mengesahkan,  
Dekan,

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D.  
NIP. 195910091986021001

## RINGKASAN

**Kemampuan Tumbuh dan Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein pada Media Metilxantin;** Alfiana Rizqi, 161810401064; 2020; 51 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Metilxantin adalah senyawa organik heterosiklik yang tersusun dari cincin pirimidin dan imidazol. Senyawa ini mencakup tiga substansi dasar yang terdapat pada tumbuhan antara lain kafein, teobromin, dan teopilin. Senyawa metilxantin yang mencemari lingkungan dapat menimbulkan beberapa efek negatif. Efek negatif tersebut antara lain dapat mempengaruhi kualitas air dan keseimbangan ekosistem. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengatasi pencemaran akibat keberadaan senyawa metilxantin pada lingkungan, yaitu melibatkan agen biologis berupa bakteri pendegradasi kafein. Bakteri pendegradasi kafein merupakan bakteri yang mampu mendegradasi kafein dan memanfaatkannya sebagai sumber nutrisi. Bakteri pendegradasi kafein memiliki dua jalur katabolisme yaitu N-demetilasi dan oksidasi. Bakteri *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34, dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 sampai saat ini belum diketahui kemampuan tumbuh, profil pertumbuhan dan profil proteinnya pada media metilxantin, sehingga penelitian ini perlu dilakukan.

Metode yang digunakan pada penelitian ini antara lain peremajaan isolat bakteri untuk memindahkan biakan bakteri tersebut pada media baru. Setelah bakteri diremajakan, diuji analisis kemampuan tumbuh pada media metilxantin. Selanjutnya yaitu membuat kurva pertumbuhan bakteri untuk membandingkan pertumbuhan masing-masing isolat. Lalu dipilih bakteri *Paracoccus denitrificans* KAFS 16 untuk dilihat analisis profil proteinnya.

Berdasarkan hasil penelitian, metilxantin dapat digunakan bakteri pendegradasi kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen. Namun, hasil penelitian menunjukkan bahwa respon kemampuan tumbuh tiap bakteri pendegradasi kafein



pada media metilxantin berbeda. Bakteri *Paracoccus denitrificans* KAFS 16 dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 dapat tumbuh pada media minimal M9 dengan sumber karbon dan nitrogen dari kafein, teobromin, dan teopilin. Sementara itu, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34 hanya mampu tumbuh pada media minimal M9 dengan kafein dan teobromin. Hasil pola pertumbuhan menunjukkan bahwa bakteri *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, *Acinetobacter gernerii* KAFS 47, dan *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34 memiliki pertumbuhan sel yang lebih tinggi ketika ditumbuhkan pada media teobromin. Sedangkan pada media teopilin dan kafein pertumbuhan sel cenderung lebih rendah. Pita protein bakteri *Paracoccus denitrificans* KAFS 16 dengan berat molekul sebesar 78, 55, 52, 48, 37, 25, 21, 18, dan 14 kDa merupakan pita protein yang terekspresi pada media metilxantin sehingga diduga merupakan protein inducibel yang digunakan untuk mendegradasi senyawa metilxantin.

## PRAKATA

Alhamdulillah, segala puji ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kemampuan Tumbuh dan Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein pada Media Metilxantin” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Sattya Arimurti, SP., M.Si. selaku dosen pembimbing utama yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, saran, serta motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
2. Mukhamad Su’udi, Ph.D selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan, saran, dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
3. Dr. Esti Utarti, SP., M.Si. dan Drs. Siswanto, M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini.
4. Dr. Rike Oktarianti selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1.
5. Bapak dan Ibu dosen pengajar biologi yang dengan sabar mengajarkan ilmu yang bermanfaat dan berguna dalam kehidupan dan pendidikan penulis.
6. Teknisi laboratorium dan seluruh staff di lingkungan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah membantu selama masa perkuliahan dan penelitian.
7. Kedua orang tua tercinta, Ibunda Siti Mutmainah dan Ayahanda Saimin, serta saudara saya Ita Mustafidah, atas doa, dukungan, kasih sayang, motivasi, dan doanya selama ini.
8. Rekan-rekan kerja “*Caffeine*” di laboratorium yaitu Iva Sindiana, Atiqotul Irsyadah, dan Veni Malasari yang senantiasa memberikan motivasi, masukan, dan bantuan selama penelitian serta penyusunan skripsi.

9. Sahabat baik Rovaqilan yaitu Rosita Dewi Wulandari, Iva Sindiana, dan Dyah Wulan Budyartini, serta sahabat baik K-popers Naomi Berthi Yonindi yang selalu memberikan dukungan, motivasi, dan doa selama empat tahun berjuang meraih S.Si.
10. Teman-teman seperjuangan Biologi 2016 “Banana” yang memberikan dukungan, motivasi, dan doa untuk kebaikan penulis
11. Kos Bu Jutek sebagai rumah kedua yang telah memberikan fasilitas yang baik sehingga memberikan kelancaran penulis dalam menyusun skripsi.
12. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 11 Agustus 2020

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>MOTO</b> .....	iii
<b>PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	v
<b>PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Metilksantin.....	4
2.2 Bakteri Pendegradasi Kafein.....	5
2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Kafein.....	7
2.4 Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein.....	8
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	10
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	10
3.2 Alat dan Bahan.....	10
3.2.1 Alat.....	10
3.2.2 Bahan.....	10
3.3 Prosedur Penelitian.....	11

3.3.1 Peremajaan Isolat Bakteri.....	11
3.3.2 Analisis Kemampuan Tumbuh pada Media Metilxantin.....	11
3.3.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	12
3.3.4 Profil Protein Bakteri.....	13
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>15</b>
4.1 Kemampuan Tumbuh Bakteri Pendegradasi Kafein pada Media Metilxantin.....	15
4.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Kafein pada Media Metilxantin.....	17
4.3 Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein.....	21
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>24</b>
5.1 Kesimpulan.....	24
5.2 Saran.....	24
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>25</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>31</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Kandungan alkaloid purin pada beberapa tanaman.....	4
4.1 Kemampuan tumbuh bakteri pendegradasi kafein.....	15



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Struktur kimia tiga sumber alami utama metilxantin pada tumbuhan....	5
2.2 Katabolisme kafein oleh bakteri melalui jalur N-Demetilasi.....	6
2.3 Katabolisme kafein oleh bakteri melalui jalur Oksidasi.....	7
2.4 Grafik kurva pertumbuhan bakteri pendegradasi kafein pada media minimal cair M9 + 1 g/L kafein selama waktu 60 jam.....	8
2.5 Profil protein <i>Pseudomonas putida</i> CBB5 pada media M9 + soytone 0,4 % + kafein 0,25 % menggunakan analisis SDS-PAGE.....	9
4.1 Uji kemampuan tumbuh bakteri pendegradasi kafein pada media metilxantin.....	17
4.2 Kurva pertumbuhan bakteri pendegradasi kafein pada media metilxantin.....	19
4.3 Visualisasi profil protein bakteri <i>Paracoccus denitrificans</i> KAFS 16 pada media metilxantin.....	22

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Metilxantin adalah senyawa organik heterosiklik yang tersusun dari cincin pirimidin dan imidazol (Talík *et al.*, 2012). Senyawa ini termasuk ke dalam alkaloid purin dan dapat ditemukan pada kurang lebih 80 spesies tumbuhan (Ashihara dan Crozier, 1999). Menurut Talík *et al.*, (2012) metilxantin mencakup tiga substansi dasar yang terdapat pada tumbuhan antara lain kafein, teobromin, dan teopilin. Kafein banyak terdapat pada genus *Camellia* dengan kandungan sebesar 2 - 3 % (Ashihara *et al.*, 2008) dan *Coffea* sebesar 0,4 - 2,4 % berat kering (Mazzafera dan Carvalho, 1992). Teobromin banyak ditemukan pada genus *Theobroma* dengan kandungan sebesar 1,9 % (Ashihara *et al.*, 2008), sedangkan teopilin dapat ditemukan pada genus *Ilex* dengan kandungan kurang dari 0,02 % (Ashihara *et al.*, 2010).

Senyawa metilxantin yang mencemari lingkungan dapat menimbulkan beberapa efek negatif. Efek negatif tersebut antara lain dapat mempengaruhi kualitas air dan keseimbangan ekosistem (Junior *et al.*, 2019). Selain itu, menurut penelitian Smyth (1992), senyawa metilxantin dapat menghambat pertumbuhan tanaman padi. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengatasi pencemaran akibat keberadaan senyawa metilxantin pada lingkungan, yaitu melibatkan agen biologis berupa bakteri pendegradasi kafein (Dash *et al.*, 2008).

Bakteri pendegradasi kafein merupakan bakteri yang mampu mendegradasi kafein dan memanfaatkannya sebagai sumber nutrisi (Dash dan Gummadi, 2006). Bakteri pendegradasi kafein memiliki dua jalur katabolisme yaitu N-demetilasi dan oksidasi. Jalur N-demetilasi merupakan jalur yang lebih banyak digunakan bakteri dalam mendegradasi kafein, lebih dari 80 % isolat bakteri menggunakan jalur ini (Summers *et al.*, 2015). Pada jalur N-demetilasi, bakteri menghasilkan produk degradasi berupa teobromin sebagai produk awal metabolisme kafein. Sedangkan pada tanaman dan fungi, produk awal degradasi berupa teopilin (Ashihara dan Crozier, 1999; Hakil *et al.*, 1998). Pada jalur



oksidasi, bakteri menghasilkan produk awal degradasi berupa 1,3,7-trimetiluric acid. Jalur N-demetilasi dan oksidasi digunakan bakteri untuk mendegradasi kafein menjadi CO<sub>2</sub> dan amonia sebagai produk akhir dari metabolisme kafein oleh bakteri (Summers *et al.*, 2015).

Pada penelitian Hakil *et al.*, (1998), fungi genus *Aspergillus* dan *Penicillium* mampu tumbuh pada kafein dan menghasilkan produk awal degradasi berupa teopilin. Sementara itu, sampai saat ini belum dilaporkan bahwa teopilin merupakan produk awal degradasi kafein oleh bakteri. Namun pada penelitian Summers (2011), bakteri *Pseudomonas putida* CBB5 mampu mendegradasi teopilin melalui jalur metabolisme N-demetilasi. Dalam hal ini, menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan dalam mendegradasi teopilin walaupun senyawa tersebut tidak dihasilkan sebagai produk awal degradasi kafein.

Pada penelitian Arimurti *et al.*, (2019a) ditemukan tiga isolat bakteri pendegradasi kafein antara lain *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34, dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47. Tiga bakteri tersebut diisolasi dari fermentasi alami kulit kopi *Coffea arabica* di daerah Sempol, Bondowoso. Sampai saat ini ketiga bakteri tersebut belum diketahui kemampuan tumbuh, profil pertumbuhan dan profil proteinnya apabila bakteri tersebut ditumbuhkan pada media metilxantin. Profil protein dapat digunakan untuk mengetahui berat molekul protein, karena berat molekul berperan penting dalam identifikasi jalur degradasi kafein oleh bakteri.

## 1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain bagaimana kemampuan tumbuh, profil pertumbuhan, dan profil protein bakteri pendegradasi kafein pada media metilxantin?

### 1.3 Batasan masalah

Batasan masalah pada penelitian ini :

1. Bakteri pendegradasi kafein yang digunakan yaitu bakteri *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34, dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47.
2. Metode yang digunakan dalam membuat profil pertumbuhan tiga bakteri pendegradasi kafein pada media metilxantin menggunakan perhitungan jumlah sel (CFU/ml).
3. Metode yang digunakan dalam mengetahui profil protein bakteri menggunakan SDS-PAGE

### 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan tumbuh, profil pertumbuhan, dan profil protein bakteri pendegradasi kafein pada media metilxantin.

### 1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya tentang identifikasi enzim pendegradasi kafein, selain itu ketiga isolat bakteri dapat digunakan sebagai agen biodegradasi senyawa metilxantin yang mencemari lingkungan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Metilxantin

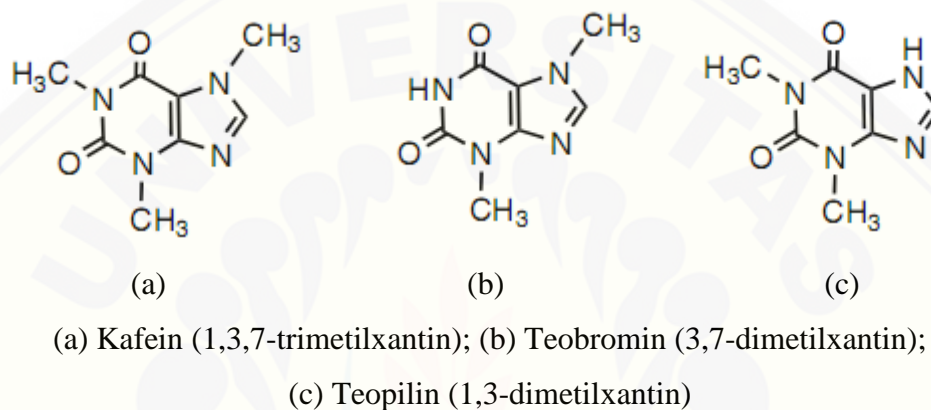
Metilxantin adalah metabolit sekunder tumbuhan yang juga dikenal sebagai alkaloid purin (Ashihara dan Crozier, 1999). Metilxantin hampir terdapat pada 100 spesies tumbuhan dari 13 ordo (Tabel 2.1). Senyawa ini memiliki efek racun terhadap serangga yaitu sebagai pertahanan diri dari lingkungan (Nathanson, 1984). Selain itu menurut penelitian Tanauma *et al.*, (2016) senyawa metilxantin berupa kafein memiliki aktivitas antibakteri yaitu dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* pada ekstrak biji kopi robusta.

Tabel 2.1 Kandungan alkaloid purin pada beberapa tumbuhan

Jenis Tanaman	Alkaloid purin utama	Referensi
Kopi ( <i>Coffea arabica</i> )	Kafein 1.0 % (biji)	Koshiro <i>et al.</i> , 2006
Kopi ( <i>Coffea canephora</i> )	Kafein 1.9 % (biji)	Koshiro <i>et al.</i> , 2006
Teh ( <i>Camellia sinensis</i> )	Kafein 2.8 % (daun muda)	Nagata dan Sakai, 1985
Teh ( <i>Camellia assamica</i> )	Kafein 2.4 % (daun muda)	Nagata dan Sakai, 1985
Kakao ( <i>Theobroma cacao</i> )	Teobromin 2.2 – 2.7 % (kotiledon)	Senanayake dan Wijesekera, 1971
Mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> )	Teobromin 0.08 – 0.16 % (daun)	Mazzafera, 1996
Guarana ( <i>Paullinia cupana</i> )	Kafein 4.3 % (kotiledon)	Bauman <i>et al.</i> , 1995

Metilxantin terdiri dari kafein, teobromin, dan teopilin. Kafein atau 1,3,7-trimetilxantin memiliki tiga kelompok metil berada di posisi 1, 3, dan 7 (Gambar 2.1a). Rumus molekul kafein adalah  $C_8H_{10}N_4O_2$  dan memiliki berat molekul sebesar 194.19 g/mol (Pubchem, 2019). Kafein memiliki gugus karbon dan gugus nitrogen yang berikatan dalam struktur heterosiklik (Zrenner *et al.*, 2006).

Teobromin atau 3,7-dimetilxantin memiliki dua kelompok metil yang terletak di posisi 3 dan 7 (Gambar 2.1b). Senyawa ini tidak memiliki bau dan secara alami terdapat pada tanaman cokelat. Sementara itu, teopilin atau 1,3-dimetilxantin memiliki dua kelompok metil terletak di posisi 1 dan 3 dan memiliki struktur mirip dengan kafein dan teobromin (Gambar 2.1c). Teopilin dan teobromin memiliki rumus molekul yang sama yaitu  $C_7H_8N_4O_2$  dan berat molekulnya sebesar 180.16 g/mol (Pubchem, 2019).



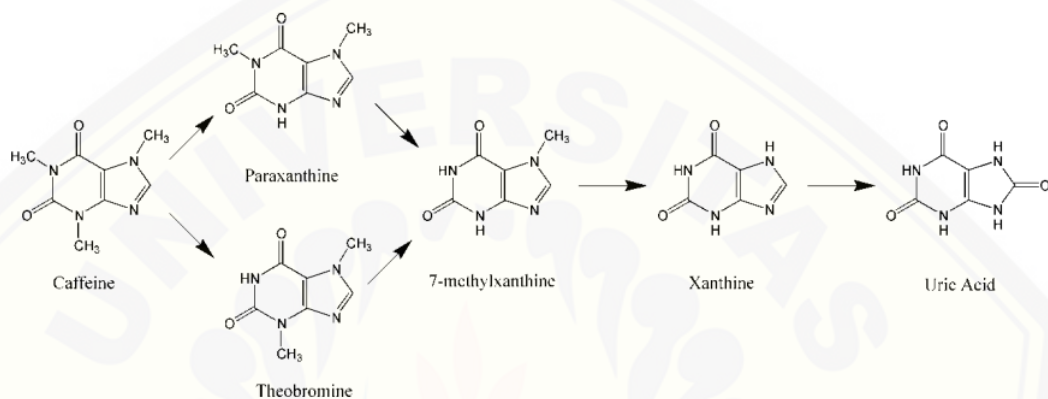
Gambar 2.1 Struktur kimia tiga sumber alami utama metilxantin pada tumbuhan (Sumber : Ashihara *et al.*, 2010).

## 2.2 Bakteri Pendegradasi Kafein

Bakteri pendegradasi kafein merupakan bakteri yang mampu memanfaatkan kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen (Dash dan Gummadi, 2006). Beberapa genus bakteri yang telah dilaporkan mampu mendegradasi kafein melalui jalur N-demetilasi adalah *Pseudomonas*, dan *Serratia*. Sedangkan genus *Rhodococcus* dan *Klebsiella* melalui jalur oksidasi (Ibrahim *et al.*, 2014).

Bakteri dapat mendegradasi kafein melalui dua jalur katabolisme yaitu jalur N-demetilasi dan oksidasi (Dash dan Gummadi, 2006). Pada jalur N-demetilasi, kafein akan didegradasi menjadi teobromin dan paraxantin sebagai produk awal metabolisme. Selanjutnya, teobromin dan paraxantin akan didegradasi menjadi 7-metilxantin, kemudian 7-metilxantin akan didegradasi menjadi xantin. Xantin selanjutnya didegradasi menjadi asam urat, dan asam urat akan didegradasi melalui katabolisme purin. Enzim yang digunakan dalam

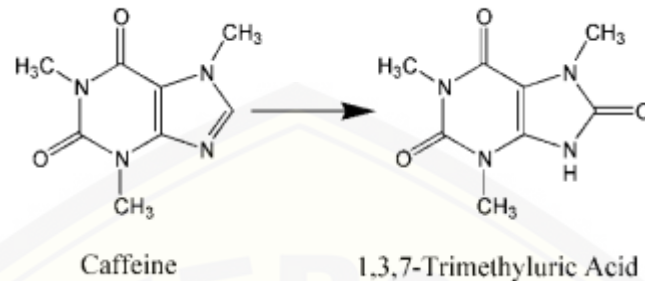
mendegradasi kafein pada jalur N-demetilasi yaitu enzim demetilase (Gambar 2.2). Sementara itu pada jalur oksidasi, bakteri mendegradasi kafein menjadi 1,3,7-trimetiluric acid, selanjutnya 1,3,7-trimetiluric acid akan didegradasi menjadi 3,6,8-trimetil allantoin dan akan didegradasi lebih lanjut melalui katabolisme purin untuk menghasilkan produk akhir metabolisme kafein berupa CO<sub>2</sub> dan ammonia (Gambar 2.3) (Gokulakhrisan *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Katabolisme kafein oleh bakteri melalui jalur N-Demetilasi (Sumber : Summers, 2011)

Bakteri lain yang mempunyai kemampuan untuk mendegradasi kafein juga telah dilaporkan dalam penelitian Arimurti *et al.*, (2019a). Bakteri tersebut antara lain *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34, dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47. Bakteri *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas plecoglossicida*, dan *Acinetobacter gernerii* termasuk ke dalam bakteri Gram-negatif. *Paracoccus denitrificans* memiliki bentuk *coccus*, bersifat non motil, dikenal sebagai bakteri tanah dan memiliki nama lain *Micrococcus denitrificans* (Stouthamer, 1992). *Pseudomonas plecoglossicida* memiliki bentuk batang, bersifat motil karena memiliki flagel. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu antara 10 - 30° C, dan tidak mampu tumbuh pada suhu 4° C atau 41° C (Nishimori *et al.*, 2000). Sedangkan *Acinetobacter gernerii* memiliki bentuk *coccobacilli* (termasuk bakteri yang intermediet memiliki bentuk *coccus* dengan basil). Bakteri ini bersifat non motil (Singh *et al.*, 2014). Pada penelitian Arimurti *et al.*,

(2019a), ketiga bakteri tersebut memiliki aktivitas degradasi kafein diatas 95 % pada media M9 + kafein 1 g/L dengan waktu inkubasi selama 3 hari.



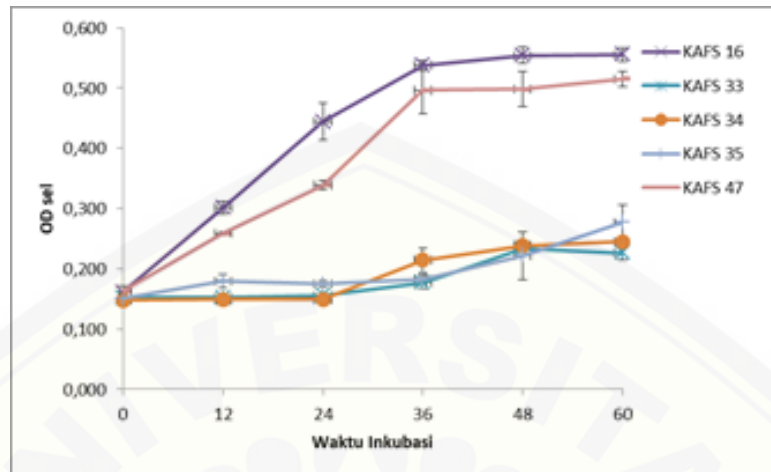
Gambar 2.3 Katabolisme kafein oleh bakteri melalui jalur C-8 oksidasi (Summers, 2011)

### 2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Kafein

Pertumbuhan bakteri merupakan pertambahan jumlah dan ukuran sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva sigmoid. Kurva pertumbuhan bakteri dapat digolongkan menjadi 4 fase antara lain fase lag atau adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian (Rolfe *et al.*, 2012). Fase lag merupakan fase paling awal atau penyesuaian aktivitas mikroba dalam lingkungan barunya, belum terjadi pertambahan massa atau pertambahan jumlah sel sehingga kurva pertumbuhan pada fase ini pada umumnya mendatar. Fase eksponensial merupakan fase peningkatan aktivitas perubahan bentuk maupun pertambahan jumlah mencapai kecepatan maksimum, sehingga kurva dalam bentuk eksponensial (Rolfe *et al.*, 2012). Fase stasioner merupakan fase terjadinya keseimbangan antara penambahan aktivitas dan penurunan aktivitas. Koloni mengalami keseimbangan antara jumlah yang mati dengan jumlah yang hidup. Kurva yang dihasilkan pada fase ini yaitu kurva datar. Fase kematian merupakan fase mulai terhentinya aktivitas dan terjadi kematian koloni mikroba (Nurhajati *et al.*, 2016).

Grafik (Gambar 2.4) merupakan kurva pertumbuhan bakteri pendegradasi kafein. Bakteri tersebut ditumbuhkan pada media minimal cair M9 + 1 g/L kafein selama waktu 60 jam. Kurva tersebut menunjukkan pola pertumbuhan dan

masing-masing isolat mengalami fase pertumbuhan pada waktu inkubasi yang berbeda (Arimurti *et al.*, 2019a).



Gambar 2.4 Grafik kurva pertumbuhan bakteri pendegradasi kafein pada media minimal cair M9 + 1 g/L kafein selama waktu 60 jam (Sumber : Arimurti *et al.*, 2019a)

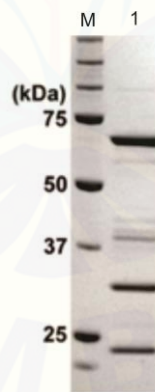
#### 2.4 Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein

Protein adalah polimer dari asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida (Watford dan Wu, 2018). Profil protein merupakan penggambaran kandungan genom yang dimiliki oleh bakteri. Oleh karena itu, penentuan seluruh kandungan protein berperan penting dalam klasifikasi, identifikasi, dan perbandingan dalam studi bakteri (Kustos *et al.*, 1998). Profil protein dapat dianalisis menggunakan metode elektroforesis yaitu SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Elektroforesis adalah suatu metode pemisahan makromolekul dengan menggunakan medan listrik. SDS-PAGE adalah metode yang paling banyak digunakan untuk memisahkan protein yang bermuatan berdasarkan berat molekul (Grabski dan Burgess, 2001).

Prinsip kerja SDS-PAGE melibatkan denaturasi awal protein komponen dengan detergen anionik yang juga mengikat protein. Molekul-molekul yang lebih kecil akan bergerak lebih cepat pada gel, sedangkan molekul yang lebih besar bergerak secara lambat sehingga menghasilkan pita protein (Grabski dan Burgess, 2001). Poliakrilamid merupakan polimer dari monomer akrilamid. Poliakrilamid

membentuk matriks gel yang berfungsi sebagai saringan. Protein bermigrasi melalui pori-pori dalam matriks sebagai respon terhadap medan listrik. Ukuran pori-pori ditentukan oleh konsentrasi akrilamid. Semakin tinggi konsentrasi akrilamid, semakin kecil ukuran pori dalam matriks gel. Selain itu migrasi protein ditentukan oleh ukuran pori gel serta muatan, ukuran, dan bentuk protein (Maizel, 2000).

Bakteri *Pseudomonas putida* CBB5 ketika ditumbuhkan pada media M9 + soytone 0,4 % + kafein 0,25 % menunjukkan degradasi kafein melalui jalur N-demetilasi. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan terdapat 3 pita protein yang terbentuk dengan ukuran 67 kDa, 32 kDa, dan 22 kDa. Pita protein dengan ukuran tersebut merupakan enzim demetilase yang berperan dalam degradasi kafein melalui jalur N-demetilasi (Gambar 2.5) (Summers *et al.*, 2012). Sementara itu pada penelitian Mohapatra *et al.*, (2006) bakteri *Alcaligenes* sp. memiliki protein dengan berat molekul sebesar 65 kDa. Pita protein dengan ukuran tersebut merupakan enzim kafein oksidase, yang digunakan untuk mendegradasi kafein melalui jalur oksidasi.



Gambar 2.5 Profil protein *Pseudomonas putida* CBB5 pada media M9 + soytone 0,4 % + kafein 0,25 % menggunakan analisis SDS-PAGE (Sumber : Summers *et al.*, 2012).



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juli tahun 2020. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember, serta Laboratorium Biosain Politeknik Negeri Jember.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sentrifuse (Hettich Centrifuge Rotina 380), sentrifuse (Sigma), sentrifuse (Hettich EBA 200), spektrofotometer (AMV11), *vortex* (*Vortex Mixer Vm – 300*), *waterbath* (*Digital Thermostatic Waterbath H WBE – 8*), autoklaf (*Tryte Technologies Model AC – 18M*), *Laminar Air Flow* (*Thermo Scientific 1300 Series A*), *micropipet volume* 0,5 – 10 µl (Nesco Dragon Lab), *micropipet volume* 10 – 10 µl (Socorex Acura), *micropipet volume* 100 – 1000 µl (Dragon Lab), elektroforesis, kuvet, mikrotip, *hot plate*, *shaker*, inkubator 30° C dan 50° C, termometer, lemari pendingin -20° C, tabung falcon 15 ml dan 50 ml, tabung reaksi, jarum ose, bunsen, cawan petri, *erlenmeyer*, *beaker glass*, neraca analitik, aluminium foil, gelas ukur, gelas pengaduk, kapas, *eppendorf*, kertas pH.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bakteri *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34, *Acinetobacter gernerii* KAFS 47, kafein, teobromin, teopilin, NA (*Nutrient agar*), akuades, agar, alkohol 70%, larutan garam fisiologis (NaCl 0,85 %), M9; *buffer tris*; *tris buffer* (MgCl<sub>2</sub>)(Lampiran 3.1), *gel acrilamye*, *buffer gel*, ddH<sub>2</sub>O, SDS 10 %, TEMED, APS, β-mercaptoethanol 5%, *loading buffer*, *Coomassie Brilliant Blue*, *Unstained Protein Molecular Weight Marker* dan metanol.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Peremajaan Isolat Bakteri

Tiga isolat bakteri antara lain *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34, dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 diremajakan pada media M9 + kafein 0,25 % miring. Peremajaan dilakukan untuk memindahkan bakteri pada media yang baru. Tahap awal peremajaan yaitu dengan mengambil satu ose masing-masing isolat bakteri dalam media M9 + kafein 0,25% miring. Kultur bakteri kemudian ditumbuhkan pada media M9 + kafein 0,25 % padat dengan metode kuadran. Selanjutnya kultur bakteri disimpan pada inkubator suhu 30°C untuk melihat pertumbuhan koloni tunggal dengan waktu 7 hari. Koloni tunggal bakteri kemudian ditumbuhkan pada media M9 + kafein 0,25 % miring dengan metode goresan, selanjutnya diinkubasi pada inkubator suhu 30°C (Nayak *et al.*, 2012).

#### 3.3.2 Analisis Kemampuan Tumbuh pada Media Metilxantin

Media yang digunakan dalam analisis kemampuan tiga isolat bakteri antara lain media metilxantin yaitu M9 + kafein 0,25 %; M9 + teobromin 0,25 %; dan M9 + teopilin 0,25 %, M9 + agar sebagai kontrol negatif, dan NA (*Nutrient agar*) sebagai kontrol positif. Tiga isolat bakteri yaitu *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34, *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 masing-masing ditumbuhkan pada media cair M9 + kafein 0,25 % dengan volume 50 ml pada Erlenmeyer berukuran 100 ml. Kultur bakteri kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan suhu 25° C dan kecepatan 150 rpm. Setelah jumlah sel bakteri *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34 dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 mencapai  $10^8$  sedangkan *Paracoccus denitrificans* KAFS 16 mencapai  $10^7$ . Jumlah sel bakteri pada masing-masing bakteri berbeda, karena memakai data kurva standar yang diperoleh dari penelitian Irsyadah (2020), Sindiana (2020), dan Malasari (2020). Masing-masing kultur bakteri ditumbuhkan pada media M9 + kafein 0,25 %; M9 + teobromin 0,25 %; M9 + teopilin 0,25 %), M9 + agar; dan NA sebanyak 10 µl menggunakan metode

drop plate. Bakteri kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30°C selama 7 hari (Arimurti *et al.*, 2018).

### 3.3.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

#### a. Pembuatan Starter

Tiga bakteri yaitu *Paracoccus denitrificans* KAFS 16, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34, dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 ditumbuhkan pada media cair M9 + kafein 0,25 % dengan volume 50 ml dalam erlenmeyer 100 ml. Selanjutnya, kultur bakteri diinkubasi pada *shaker* kecepatan 150 rpm dengan suhu 25° C sampai jumlah sel bakteri KAFS 16 mencapai OD 0,280 nm, KAFS 34 mencapai OD 0,122 nm, dan KAFS 47 mencapai OD 0,422 nm (Arimurti *et al.*, 2018).

#### b. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Tiga isolat bakteri ditumbuhkan pada media cair metilxantin antara lain M9 + teobromin 0,25 % dan M9 + teopilin. Bakteri sebanyak 2,5 ml ditumbuhkan pada media dengan volume 72,5 ml, ukuran Erlenmeyer 200 ml. Selanjutnya, kultur bakteri disimpan pada *shaker* kecepatan 150 rpm dengan suhu 25° C selama 72 jam untuk memelihara pertumbuhan bakteri. Densitas bakteri diukur menggunakan pengukuran nilai absorbansi dengan alat spektrofotometer panjang gelombang 600 nm, setiap 6 jam sekali mulai jam ke-0 sampai jam ke-72 (Arimurti *et al.*, 2018). Kurva standar diperoleh dari hasil perhitungan koloni (CFU/ml). Kurva standar yang digunakan pada penelitian ini menggunakan data dari penelitian Irsyadah (2020), Sindiana (2020), dan Malasari (2020) (Lampiran 3.2). Jumlah sel bakteri *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34 dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 sebesar  $10^8$  sedangkan *Paracoccus denitrificans* KAFS 16 sebesar  $10^7$ . Kurva standar digunakan untuk menghitung jumlah sel bakteri secara tidak langsung, yaitu dengan meregresikan nilai absorbansi (OD) dan jumlah koloni (CFU/ml) ke dalam persamaan garis kurva standar.

### 3.3.4 Profil Protein Bakteri

#### a. Panen Sel Bakteri dan Ekstraksi Enzim Intraseluler

Bakteri yang digunakan dalam tahap panen sel dan ekstraksi enzim intraseluler yaitu *Paracoccus denitrificans* KAFS 16. Berdasarkan hasil pola pertumbuhan, dari tiga bakteri dipilih salah satu saja yang mampu tumbuh pada media metilxantin yaitu *Paracoccus denitrificans* KAFS 16. Tahap panen sel dilakukan ketika bakteri sudah memasuki fase eksponensial. Kultur bakteri tersebut sebelumnya telah ditumbuhkan pada media M9 + teobromin 0,25 % dan M9 + teopilin. Tahap awal yang dilakukan ketika panen sel adalah sentrifugasi. Kultur bakteri dalam media cair M9 + teobromin 0,25 % dan M9 + teopilin dengan volume masing-masing 100 ml disentrifugasi kecepatan 5000 rpm dengan suhu 20° C selama 5 menit, agar membentuk pelet dan supernatan. Setelah terbentuk 2 fase, supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan larutan buffer tris sebanyak 1,5 ml agar pelet bersih, setelah itu disentrifugasi kembali. Pencucian pelet menggunakan larutan buffer tris dilakukan dua kali pengulangan. Setelah tahap sentrifugasi, terbentuk 2 fase, supernatan dibuang sementara itu pelet ditimbang dan ditambahkan dengan tris buffer (MgCl<sub>2</sub>) dengan rasio 600 : 3 ml untuk disimpan ke dalam lemari pendingin suhu -20° C selama 24 jam. Tahap selanjutnya yaitu memecah sel bakteri dengan metode *freeze and thaw*. Sampel bakteri yang telah disimpan dalam suhu -20° C, dipanaskan ke dalam waterbath 100° C selama 5 menit. Selanjutnya, sampel bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C selama 25 menit untuk mendapatkan enzim intraseluler. Hasil sentrifugasi membentuk supernatan dan pelet. Pelet yang terbentuk dibuang, sementara itu supernatan yang berisi enzim intraseluler disimpan ke dalam lemari pendingin suhu -20° C untuk digunakan dalam metode SDS-PAGE (Gagne, 2014).

#### b. Elektroforesis SDS-PAGE

Hasil ekstraksi enzim intraseluler masing-masing bakteri kemudian dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE. Sebelum pada tahap elektroforesis SDS-PAGE, enzim intraseluler bakteri yang terdapat pada supernatan disetarakan

konsentrasi proteinnya menggunakan metode Bradford. Pada metode ini, dilakukan pembuatan kurva standar protein (Lampiran 3.3) dengan spektrofotometer, panjang gelombang 595 nm. Kemudian untuk proses SDS-PAGE, dimulai dengan membuat gel yaitu *separating gel* (12,5%) dan *stacking gel* (5%). Bahan dari *separating gel* antara lain gel akrilamid 4,15 ml; *buffer gel* 2,5 ml; ddH<sub>2</sub>O 3,196 µl; SDS 10% 104 µl, TEMED 5 µl; dan APS 50 µl. Bahan untuk membuat *stacking gel* antara lain gel akrilamid 450 µl; *buffer gel* 750 ml; ddH<sub>2</sub>O 3,196 µl; SDS 10% 112,5 µl; TEMED 5 µl; dan APS 10 µl. Selanjutnya untuk membuat buffer sampel, hasil ekstraksi enzim intraseluler sebanyak 40 µl ditambahkan dengan 5% β-mercaptoethanol sebanyak 2,5 µl dan *loading buffer* sebanyak 10 µl, kemudian dipanaskan pada suhu 100° C selama 3 menit dan dimasukkan ke dalam sumuran gel dengan ukuran protein yang telah disetarakan sebesar 40 µg. Elektroforesis dilakukan dengan kuat arus 30 A dan 80 V selama 3 jam. Marker yang digunakan yaitu *Unstained Protein Molecular Weight Marker*. Setelah itu, dilakukan pewarnaan atau *staining* dengan *coomassie brilliant blue* selama *overnight* dan di *destaining* menggunakan metanol. Proses *destaining* dilakukan selama 1 jam dan diulangi sebanyak 3 kali sampai pita terlihat dengan jelas (Grabski dan Burgess, 2001).

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan berdasarkan hasil penelitian ini antara lain :

1. Bakteri pendegradasi kafein *Paracoccus denitrificans* KAFS 16 dan *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 memiliki kemampuan tumbuh pada media kafein, teobromin, dan teopilin. Akan tetapi, *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34 hanya mampu tumbuh pada media teobromin
2. Pertumbuhan sel ketiga isolat bakteri lebih tinggi ketika ditumbuhkan pada media teobromin, dibandingkan pada media kafein dan teopilin
3. Pita protein *Paracoccus denitrificans* KAFS 16 dengan berat molekul sebesar 78, 55, 52, 48, 37, 25, 21, 18, dan 14 kDa terekspresi pada media metilxantin. Protein tersebut diduga merupakan protein inducibel yang digunakan untuk mendegradasi senyawa metilxantin.

### 5.2 Saran

Jalur metabolisme dan produk metabolisme pada ketiga bakteri pada penelitian ini masih belum diketahui. Sementara itu, visualisasi profil protein menggunakan SDS-PAGE untuk melihat enzim yang terlibat dalam proses degradasi belum spesifik, karena hanya melihat ukuran protein saja, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang identifikasi jenis enzim untuk mendukung data yang sudah dihasilkan. Selain itu, konsentrasi protein pada proses SDS-PAGE perlu ditingkatkan untuk mendapatkan pita protein yang lebih tebal.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Arimurti, S., Y. Nurani, T.A. Siswoyo, dan S. Suharjono. 2018. Degradation of caffeine by *Pseudomonas monteilii* KRM9. *Malaysian Journal of Microbiology*. 14(1): 55-60.
- Arimurti, S., Ika, O., dan Suharjono. 2019a. Isolation and screening caffeine-degrading bacteria from *Coffea arabica* pulp waste in Sempol, Bondowoso, Indonesia. *ICOLIB abstract book*.
- Arimurti, S., M. Su'udi., V. Malasari., A. Irsyadah., I. Sindiana., dan A. Rizqi. 2019b. Bacterial profile of *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34 on different caffeine concentration. *ICOLIB Abstrak book*: 25-26 November.
- Ashihara, H., dan A. Crozier. 1999. Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Advances in Botanical Research*. 31: 117-205.
- Ashihara, H., H. Asano, dan A. Crozier. 2008. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function, and genetic engineering. *Phytochemistry*. 69: 841-856.
- Ashihara, H., M. Kato, dan A. Crozier. 2010. Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. *Springer*. 11-31.
- Dash, S.S., dan S.N. Gummadi. 2006. Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology Letters*. 28: 1994-2002.
- Dash, S.S., N.S. Sailaja, dan S.N. Gummadi. 2008. Chemotaxis of *pseudomonas* sp. to caffeine. *Journal of Basic Microbiology*. 48:130-134.
- Fatmariza, M., N. Inayati, dan Rohmi. 2017. Tingkat kepadatan media nutrient agar terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Analis Medika Bio Sains*. 4(2): 66-73.
- Fitri, L., dan Y. Yasmin. 2011. Isolasi dan pengamatan morfologi koloni bakteri kitinolitik. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*. 3(2): 20-25.

- Gagne, F. 2014. *Biochemical Ecotoxicology*. Canada : Academic Press.
- Gokulakrishnan, S., K. Chandaraj, dan S.N. Gummadi. 2005. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology*. 37: 225-232.
- Grabski, A.C., dan R.R. Burgess. 2001. Preparation of protein sample for SDS-polyacrilamide gel electrophoresis : procedures and tips. *Innovations*. 13:10-12.
- Hakil, M., S. Denis, G. Viniestra-Gonzales, dan C. Augur. 1998. Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 22: 355-359.
- Ibrahim, S., M.Y. Shukor, M.A. Syed, N.A.A Rahmani, K.A. Khalil, A. Khalid, dan S.A. Ahmad. 2014. Bacterial degradation of caffeine: a review. *Asian Journal of Plant Biology*. 2(1): 18-27.
- Irsyadah, A. 2020. Pola Pertumbuhan dan Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein *Paracoccus Denitrificans* KAFS 16. *Skripsi*. Jember : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Juariah, S., dan W.P. Sari. 2018. Pemanfaatan limbah cair industri tahu sebagai alternatif pertumbuhan *Bacillus* sp. . *Jurnal Analis Kesehatan Klinik Sains*. 6(1): 24-29.
- Junior, C.A.M., N.D.C. Luchiari, dan P.C.F.L. Gomes. 2019. Occurrence of caffeine in wastewater and sewage and applied techniques for analysis: a review. *Ecletica Quimica Journal*. 44: 11-26.
- Koshiro, Y., X.Q. Zheng, M. Wang, C. Nagai, dan H. Ashihara. 2006. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. *Plant Science*. 171: 242–250.
- Kustos, I., B. Kocsis, I. Kerepesi, dan F. Killar. 1998. Protein profile characterization of bacterial lysates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 19: 2317-2323.
- Ma, Y.X., X.H. Wu, H.S. Wu, Z.B. Dong, J.H. Ye, X.Q. Zheng, Y.R. Liang, dan J.L. Lu. 2018. Different catabolism pathways triggered by various



methylxanthines in caffeine-tolerant bacterium *Pseudomonas putida* CT25 isolated from tea garden soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(7): 1147-1155.

Mahasari, G.M., U. Fajriah, dan S. Subekti. 2010. Karakterisasi protein *Lernaea cyprinacea* dengan metode elektroforesis sds-page. *Jurnal Ilmiah perikanan dan kelautan*. 2 (1):61-66.

Maizel, J.V. 2000. Sds-polyacrylamide gel electrophoresis. *Trends in Biochemicals*. 25: 590-592.

Malaka, R., Metusalach, dan E. Abustam. 2013. Pengaruh Jenis Mineral Terhadap Produksi Eksopolisakarida dan Karakteristik Pertumbuhan *Lactobacillus Bulgaricus* Strain Ropy dalam Media Susu. *Teknologi Peternakan dan Veteriner*. 2(2): 592-598.

Malasari, V. 2020. Analisis Pertumbuhan dan Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein *Pseudomonas Plecoglossicida* KAFS 34. *Skripsi*. Jember : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Mazzafera, P., dan A. Carvalho. 1992. Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea* L.) by interspecific hybridization. *Euphytica*. 59: 55-60.

Mazzafera, P., O. Olsson, dan G. Sandberg. 1996. Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. *Microbial Ecology*. 31(2): 199-207.

Mohapatra, B.R., N. Harris, R. Nordin, dan A. Mazumder. 2006. Purification and characterization of a novel caffeine oxidase from *Alcaligenes* species. *Journal of Biotechnology*. 125: 319-327.

Nagata, T., dan S. Sakai. 1985. Purine base pattern of *Camellia irrawadiensis*. *Phytochemistry*. 24(10): 2271-2272.

Nathanson, J.A. 1984. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Health Sciences Library*. 226: 184-187.

Nayak, S., M.J. Harshitha, Maithi ampah, H.S. Anilkumar, dan C.V. Rao. 2012. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. *Indian Journal of Biotechnology*. 11: 86-91.

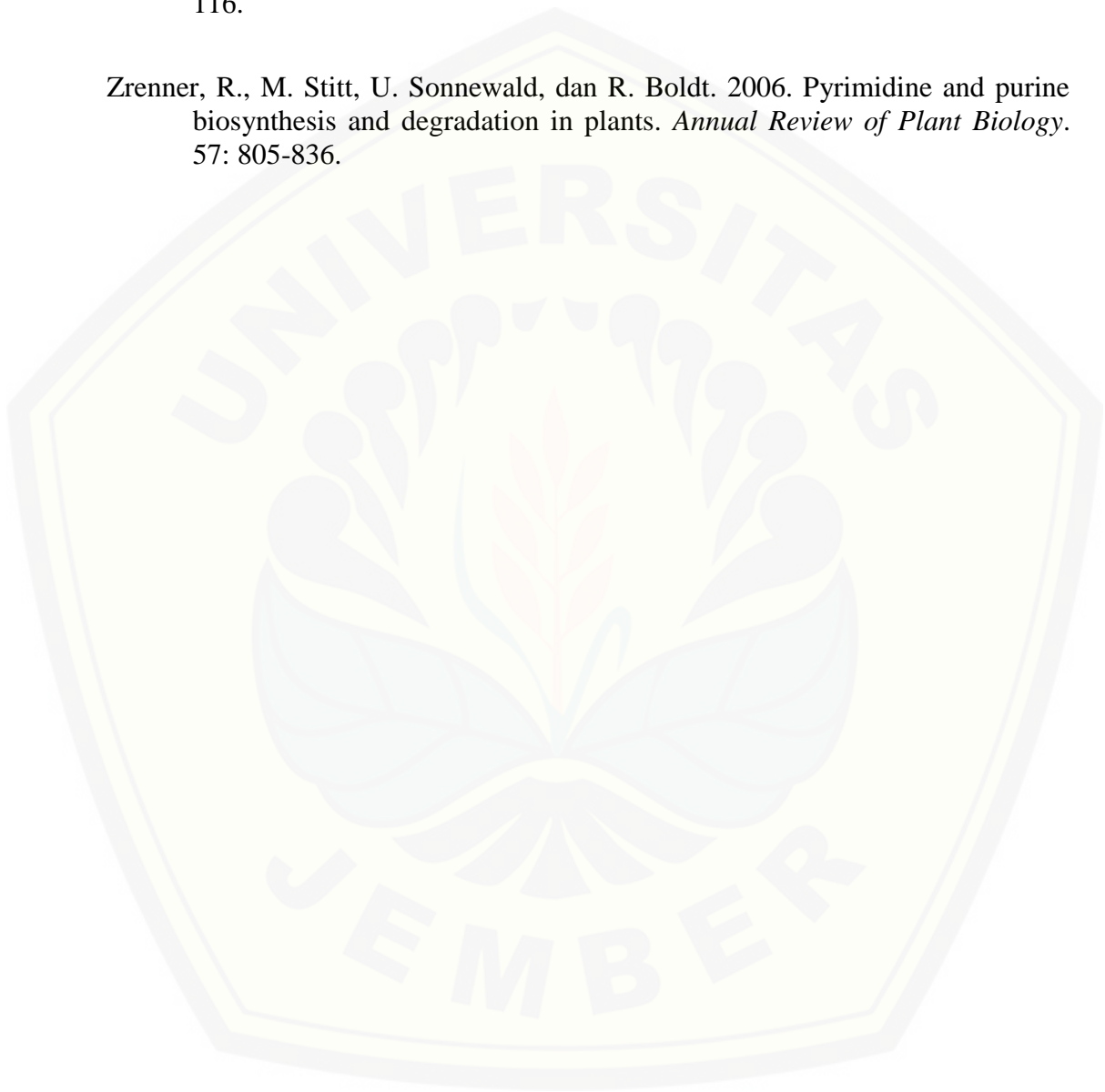
- Nishimori, E., K. Kita-Tsukamoto, dan H. Wakabayashi. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagicascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(1): 83-89.
- Nurhajati, T., K. Soepranianondo, dan W.P. Lokapirnasari. 2016. Uji aktivitas pertumbuhan *Enterobacter cloacae* selulolitik aerob rumen-1 isolat asal limbah cairan rumen sapi peranakan ongole. *Jurnal Veterinre*. 3: 383-388.
- Pubchem. 2019. Caffeine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>. [Diakses pada 9 November 2019].
- Pubchem. 2019. Theobromine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theobromine>. [Diakses pada 10 November 2019].
- Pubchem. 2019. Theophylline. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theophylline> [Diakses pada 10 November 2019].
- Reiny, S.S. 2012. Potensi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4796 sebagai biopreservatif pada rebusan daging ikan tongkol. *Indonesian Journal of Applied Sciences*. 2(2): 604-613.
- Respati, N.Y. 2017. Optimasi suhu dan ph media pertumbuhan bakteri pelarut fosfat dari isolat bakteri termofilik. *Jurnal Program Pendidikan Biologi*. 6(7): 423-430.
- Rolfe, M.D., C.J. Rice, S. Lucchini, C. Pin, A. Thompson, A.D.S Cameron, M. Alston, M.F. Stringer, R.P. Betts, J. Baranyi, dan M.W. Peck, dan J.C.D. Hinton. 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology*. 194(3): 686-701.
- Senanayake, U.M., dan R.O.B. Wijesekera. 1971. Theobromine and caffeine content of the cocoa bean during its growth. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 22(5): 2622-2623.
- Sideso, O., A.C. Marvier., N.A. Katerelos., dan P.W. Goodenough. 2001. The characteristics and stabilization of a caffeine demethylase enzyme complex. *International Journal of Food Science and Technology*. 36(6): 693-698.

- Sindiana, I. 2020. Pola Pertumbuhan dan Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein *Acinetobacter Gernerii* KAFS 47. *Skripsi*. Jember : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Singh, N.K., I. Khatri, S. Subramanian, dan S. Mayilraj. 2014. Genome sequencing and annotation of *Acinetobacter gernerii* strain MTCC 9824. *Genomics Data*.2: 7–9.
- Smyth, D.A. 1992. Effect of methylxanthine treatment on rice seedling growth douglas. *Journal Plant Growth Regulation*. 11: 125-128.
- Stouthamer, A.H. 1992. Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 61:1-33.
- Summers, R.M. 2011. Metabolism, Enzymology, and Genetic Characterization of Caffeine. Degradation by *Pseudomonas putida* CBB5. *Tesis*. Amerika Serikat : Doctor of Philosophy degree in Chemical and Biotechnical Engineering in the graduate College of The University of Iowa.
- Summers, R.M., T.M. Louie, C.L. Yu, L. Gakhar, K.C. Louie, dan M. Subramanian. 2012. Novel, highly specific n-demethylases enable bacteria to live on caffeine and related purine alkaloids. *Journal of Bacteriology*. 194(8): 2041-2049.
- Summers, R.M., S.K. Mohanty, S. Gopishetty, dan M. Subramanian. 2015. Genetic characterization of caffeine degradation by bacteria and its potential applications. *Microbial Biotechnology*. 8(3): 1-10.
- Talik, P., J. Krzek, dan R.J. Ekiert. 2012. Analytical techniques used for determination of methylxanthines and their analogues-recent advances. *Separation and Purifications Reviews*. 41(1): 1-61.
- Tanauma, H.A., G. Citraningtyas, dan W.A. Lolo. 2016. Aktivitas antibakteri ekstrak biji robusta (*Coffea canephora*) terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. 5(4): 243-251.
- Utomo, W.T., N. Suarsana, dan I.G.A.A. Suartini. Karakteristik protein plasma sapi bali. *Jurnal Veteriner*. 18(2):232-238.

Watford, M., dan G. Wu. 2018. Protein advances in nutritions. *Nutrient Information*. 9:1-3.

Yuliana, N. 2008. Kinetika pertumbuhan bakteri asam laktat isolat T5 yang berasal dari tempoyak. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil* .13(2): 108-116.

Zrenner, R., M. Stitt, U. Sonnewald, dan R. Boldt. 2006. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 805-836.



## LAMPIRAN

## Lampiran 3.1 Komposisi Media dan Larutan

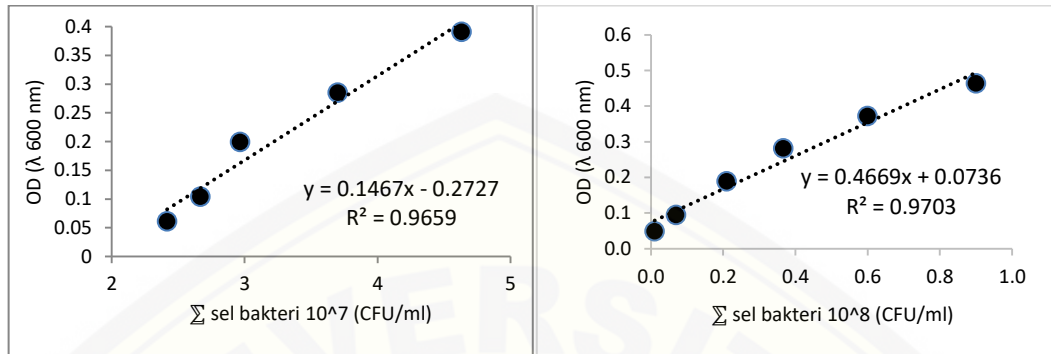
Tabel 3.1.1 Komposisi Bahan untuk Pembuatan Media

No.	Media	Bahan	Komposisi
1.	M9	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 gr
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 gr
		NaCl	0,5 gr
		MgSO <sub>4</sub>	0,25 gr
		NH <sub>4</sub> Cl	1 gr
		Akuades	1000 ml
2.	Media 0,25 % kafein	Kafein	0,25 gr
		M9	1000 ml
3.	Media 0,25 % teobromin	Teobromin	0,25 gr
		M9	1000 ml
4.	Media 0,25 % teopilin	Teopilin	0,25 gr
		M9	1000 ml

Tabel 3.1.2 Komposisi Larutan

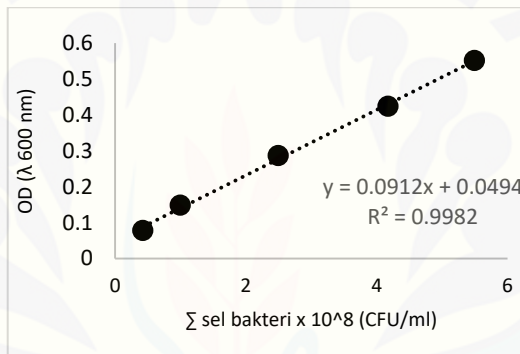
No.	Larutan	Bahan	Komposisi	Keterangan
1.	Bufer MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	203.3 gr	1 m
		ddH <sub>2</sub> O	1000 ml	
2.	Bufer tris-HCl	Tris Base	121,1 gr	pH 8.0
		HCl	40-45 ml	
		ddH <sub>2</sub> O	755-760 ml	

Lampiran 3.2 Gambar Grafik Kurva Standar bakteri pendegradasi kafein



(a)

(b)



(c)

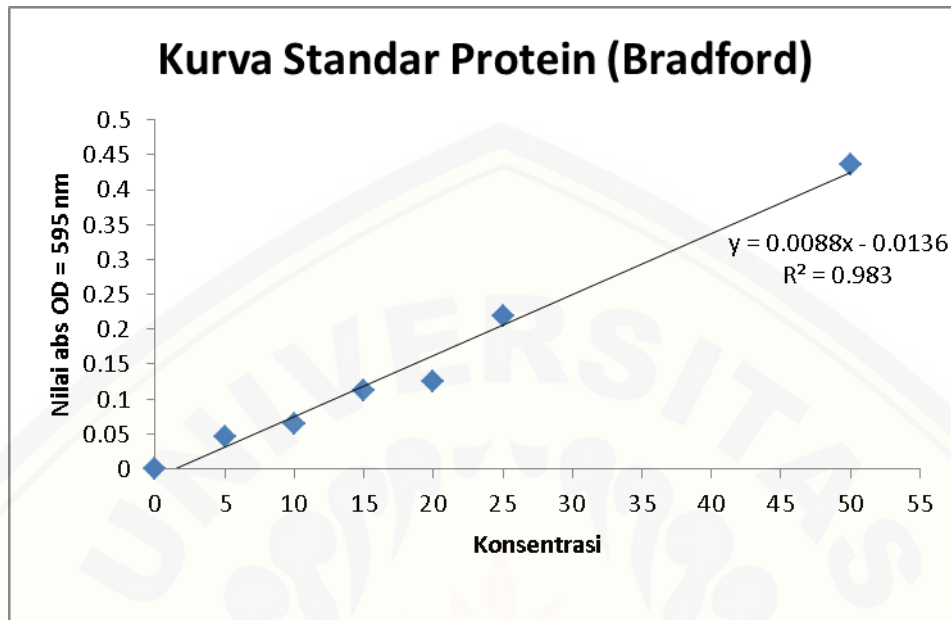
(a) *Paracoccus denitrificans* ; (b) *Pseudomonas plecoglossicida* ;

(c) *Acinetobacter gernerii*

Gambar 3.1 Kurva standar bakteri pendegradasi kafein (Sumber : Irsyadah, 2020;

Malasari, 2020; Sindiana, 2020)

## Lampiran 3.3 Kurva Standar Protein



## Lampiran 4.1 Tabel Hasil Profil Pertumbuhan dan Standar Deviasi

4.1.1 *Paracoccus denitrificans* KAFS 16

waktu inkubasi	<i>Paracoccus denitrificans</i> KAFS 16		
	Media M9 + teobromin 0,25 %		
	Nilai Absorbansi	$\sum \text{Sel} \times 10^7$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
Jam ke 0	0.030	2.063	0.012
Jam ke 6	0.042	2.145	0.009
Jam ke 12	0.087	2.452	0.001
Jam ke 18	0.229	3.420	0.036
Jam ke 24	0.376	4.422	0.011
Jam ke 30	0.610	6.017	0.037
Jam ke 36	0.769	7.101	0.119
Jam ke 42	0.885	7.892	0.142
Jam ke 48	1.069	9.146	0.186
Jam ke 54	1.118	9.480	0.130
Jam ke 60	1.130	9.562	0.262
Jam ke 66	1.124	9.521	0.312
Jam ke 72	1.090	9.289	0.320

4.1.2 *Paracoccus denitrificans* KAFS 16

Waktu inkubasi	<i>Paracoccus denitrificans</i> KAFS 16		
	Media M9 + teopilin 0,25 %		
	Nilai Absorbansi	$\sum \text{Sel} \times 10^7$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
Jam ke 0	0.021	2.002045	0.001
Jam ke 6	0.028	2.049761	0.006
Jam ke 12	0.039	2.124744	0.004
Jam ke 18	0.067	2.31561	0.006
Jam ke 24	0.092	2.486026	0.010
Jam ke 30	0.160	2.949557	0.009
Jam ke 36	0.242	3.508521	0.014
Jam ke 42	0.326	4.081118	0.027
Jam ke 48	0.424	4.749148	0.049
Jam ke 54	0.563	5.69666	0.069
Jam ke 60	0.704	6.657805	0.097
Jam ke 66	0.757	7.019087	0.025
Jam ke 72	0.732	6.848671	0.030



#### 4.1.3 *Pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34

Waktu inkubasi	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> KAFS 34		
	Media M9 + teobromin 0,25 %		
	Nilai Absorbansi	$\sum \text{Sel} \times 10^8$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
Jam ke 0	0.023	0	0.013
Jam ke 6	0.033	0	0.035
Jam ke 12	0.113	0.084386	0.045
Jam ke 18	0.305	0.495609	0.030
Jam ke 24	0.491	0.893982	0.027
Jam ke 30	0.538	0.994646	0.065
Jam ke 36	0.659	1.253802	0.154
Jam ke 42	0.651	1.236667	0.189
Jam ke 48	0.648	1.230242	0.139
Jam ke 54	0.648	1.230242	0.174
Jam ke 60	0.648	1.230242	0.183
Jam ke 66	0.643	1.219533	0.181
Jam ke 72	0.639	1.210966	0.180

#### 4.1.4 *Acinetobacter gernerii* KAFS 47

Perlakuan	<i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47		
	Media M9 + teobromin 0,25 %		
	Nilai Absorbansi	$\sum \text{Sel} \times 10^8$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
Jam ke 0	0.056	0.072368	0.060
Jam ke 6	0.079	0.324561	0.062
Jam ke 12	0.158	1.190789	0.039
Jam ke 18	0.360	3.405702	0.033
Jam ke 24	0.611	6.157895	0.133
Jam ke 30	0.757	7.758772	0.140
Jam ke 36	0.930	9.655702	0.198
Jam ke 42	1.121	11.75	0.311
Jam ke 48	1.098	11.49781	0.315
Jam ke 54	1.059	11.07018	0.460
Jam ke 60	1.042	10.88377	0.486
Jam ke 66	0.932	9.677632	0.313
Jam ke 72	0.919	9.535088	0.370

**4.1.5 *Acinetobacter gernerii* KAFS 47**

Perlakuan	<i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47		
	Media M9 + teopilin 0,25 %		
	Nilai Absorbansi	$\Sigma \text{ Sel} \times 10^8 \text{ (CFU/mL)}$	SD
Jam ke 0	0.029	0	0.003
Jam ke 6	0.038	0	0.003
Jam ke 12	0.062	0.138158	0.003
Jam ke 18	0.089	0.434211	0.002
Jam ke 24	0.159	1.201754	0.008
Jam ke 30	0.264	2.35307	0.009
Jam ke 36	0.353	3.328947	0.021
Jam ke 42	0.424	4.107456	0.029
Jam ke 48	0.521	5.171053	0.031
Jam ke 54	0.611	6.157895	0.044
Jam ke 60	0.706	7.199561	0.056
Jam ke 66	0.718	7.33114	0.004
Jam ke 72	0.684	6.958333	0.010