

**ANALISIS POLA PERTUMBUHAN, DEGRADASI KAFEIN DAN PROFIL  
PROTEIN BAKTERI *Acinetobacter gerveri* KAFS 47  
PADA MEDIA KAFEIN**

**SKRIPSI**

Oleh

**Iva Sindiana**

**161810401059**

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

**2020**



**ANALISIS POLA PERTUMBUHAN, DEGRADASI KAFEIN DAN PROFIL  
PROTEIN BAKTERI *Acinetobacter gernerii* KAFS 47  
PADA MEDIA KAFEIN**

**SKRIPSI**

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

Oleh  
**Iva Sindiana**  
**161810401059**

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

**2020**

## PERSEMBAHAN

Puji syukur kepada Allah SWT, yang telah memberikan rahmat dan ridhoNya. Skripsi ini penulis persembahkan untuk :

Kedua orang tua tercinta Ayahanda Ponidi dan Ibunda Suwarni yang selalu memberikan dukungan, motivasi, semangat, kasih sayang, nasehat dan doa yang selalu dipanjatkan dalam setiap waktu.



## MOTO

Dan apabila ia berpaling, ia berjalan di muka bumi untuk mengadakan kerusakan padanya, dan merusak tanaman-tanaman dan binatang-binatang ternak, dan Allah tidak menyukai kerusakan

(QS. *Al-Baqarah* : 205)\*



---

\*Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Quran dan Terjemahannya*. Semarang: CV. Asy Syifa'

**PERNYATAAN**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Iva Sindiana

NIM : 161810401059

Menyatakan dengan sebenarnya, bahwa karya ilmiah dengan judul “Analisis Pola Pertumbuhan, Degradasi Kafein dan Profil Protein Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media Kafein” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan salah satu dari riset penelitian Dr. Sattya Arimurti, S.P.,M.Si. dengan judul Analisis Proteomik Bakteri Pendegradasi Kafein Asal Buah Kopi No. 1804/UN25.3.1/LT.2019. Penulis bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini dibuat dengan sebenarnya tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik apabila ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 6 Agustus 2020

Yang menyatakan,

Iva Sindiana

NIM 161810401059

**SKRIPSI**

**ANALISIS POLA PERTUMBUHAN, DEGRADASI KAFEIN DAN PROFIL  
PROTEIN BAKTERI *Acinetobacter gerveri* KAFS 47  
PADA MEDIA KAFEIN**

Oleh

**Iva Sindiana**

**NIM 161810401059**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Sattya Arimurti, S.P, M.Si

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Analisis Pola Pertumbuhan, Degradasi Kafein dan Profil Protein Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media Kafein**” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Sattya Arimurti, S.P.M.Si.  
NIP 197403311999032001

Mukhamad Su’udi, Ph.D.  
NRP 760016788

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Esti Utarti, S.P, M.Si  
NIP 197003031999032001

Drs Siswanto., M.Si  
NIP 196012161993021001

Mengesahkan,  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Analisis Pola Pertumbuhan, Degradasi Kafein dan Profil Protein Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media Kafein;** Iva Sindiana; 161810401059; 2020: 42 halaman; Jurusan Biologi; Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kafein adalah senyawa alkaloid hasil metabolisme sekunder dari tanaman seperti kopi (*Coffea* sp.), teh (*Camellia*), kola (*Cola acuminata*) dan biji kakao (*Theobroma cacao*). Senyawa Kafein terdapat dalam berbagai produk makanan dan minuman. Produk tersebut saat dikonsumsi berlebihan akan menyebabkan jumlah kafein dalam tubuh meningkat dan menimbulkan banyak efek negatif. Efek negatif kafein tersebut dapat dikurangi dengan dekafeinasi dengan bantuan bakteri pendegradasi kafein. *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 (*A. gernerii* KAFS 47) merupakan spesies bakteri yang pertama kali dilaporkan sebagai bakteri pendegradasi kafein. Bakteri ini ditumbuhkan media cair minimal (M9) dengan kandungan kafein 1 g/L inkubasi selama 60 jam dengan kemampuan degradasi kafein sebesar 98,62%. Informasi terkait dengan pola pertumbuhan, degradasi kafein dan profil protein pada kafein sumber karbon dan nitrogen belum diketahui. Penelitian ini, bakteri ini ditumbuhkan pada media kafein sumber karbon dan nitrogen dengan variasi glukosa dan amonium sulfat sebagai kontrol. Hal tersebut untuk mengetahui pola pertumbuhan, degradasi kafein, dan profil protein bakteri *A. gernerii* KAFS 47 terhadap media kafein.

Metode penelitian yang digunakan meliputi: peremajaan isolat bakteri *A. gernerii* KAFS 47 pada media miring M9 + kafein 0,25%. Pembuatan kurva standar pertumbuhan sel, pembuatan sterer, pembuatan kurva pertumbuhan sel bakteri *A. gernerii* KAFS 47. Pembuatan kurva standar kafein dan pembuatan kurva degradasi kafein bakteri *A. gernerii* KAFS 47. Panen sel bakteri dan visualisasi profil protein intraseluler bakteri *A. gernerii* KAFS 47 dengan metode *Sodium Dodecylsulphat Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).



Hasil penelitian ini, bakteri *A. gernerii* KAFS 47 yang ditumbuhkan pada media M9 dengan tambahan variasi sumber karbon dan nitrogen yang berbeda mampu tumbuh dengan baik. Pertumbuhan bakteri pada media kafein lebih rendah dibandingkan pada media kafein + glukosa dan media glukosa. Pertumbuhan pada media kafein + glukosa lebih rendah dibanding pada media glukosa karena bakteri ini memanfaatkan glukosa sekaligus mendegradasi kafein. Hal tersebut didukung dengan degradasi kafein pada media mengalami penurunan awal inkubasi. Pertumbuhan bakteri ini pada media kafein dengan tambahan amonium sulfat lebih lambat dibandingkan dengan media M9 + kafein. Hal tersebut didukung dengan degradasi kafein pada media ini lebih lambat dibandingkan dengan media kafein dan media kafein dengan tambahan glukosa. Analisis profil protein intraseluler bakteri *A. gernerii* KAFS 47 menggunakan metode SDS-PAGE. Band protein intraseluler diperoleh pada semua media. bakteri yang ditumbuhkan pada media glukosa profilnya berbeda dengan yang ditumbuhkan pada media yang mengandung kafein. Profil protein bakteri pada media M9 + kafein dan glukosa ataupun pada media M9 + kafein dan amonium sulfat memiliki kemiripan dengan media M9 + kafein.

Kemampuan tumbuh Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada media kafein lebih rendah dibandingkan dengan media kafein + glukosa dan glukosa. Pertumbuhan bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 diikuti dengan degradasi kafein pada media yang mengandung kafein. Profil protein bakteri *A. gernerii* KAFS 47 yang ditumbuhkan pada media glukosa berbeda dengan yang ditumbuhkan pada media kafein. Band protein yang diduga protein degradasi kafein memiliki berat molekul 77 kDa dan 38 kDa.

## PRAKATA

Syukur Alhamdulillah, segala puja dan puji syukur penulis persembahkan kepada Allah SWT, Tuhan yang maha pengasih lagi maha penyayang atas segala rahmat, taufik dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah skripsi ini dengan judul : **Analisis Pola Pertumbuhan, Degradasi Kafein dan Profil Protein Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media Kafein.** Penulisan Skripsi ini merupakan tugas akhir sebagai syarat untuk menyelesaikan kuliah pada Program Studi Biologi serta mencapai gelar Sarjana Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak – pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan dalam penulisan skripsi ini, antara lain :

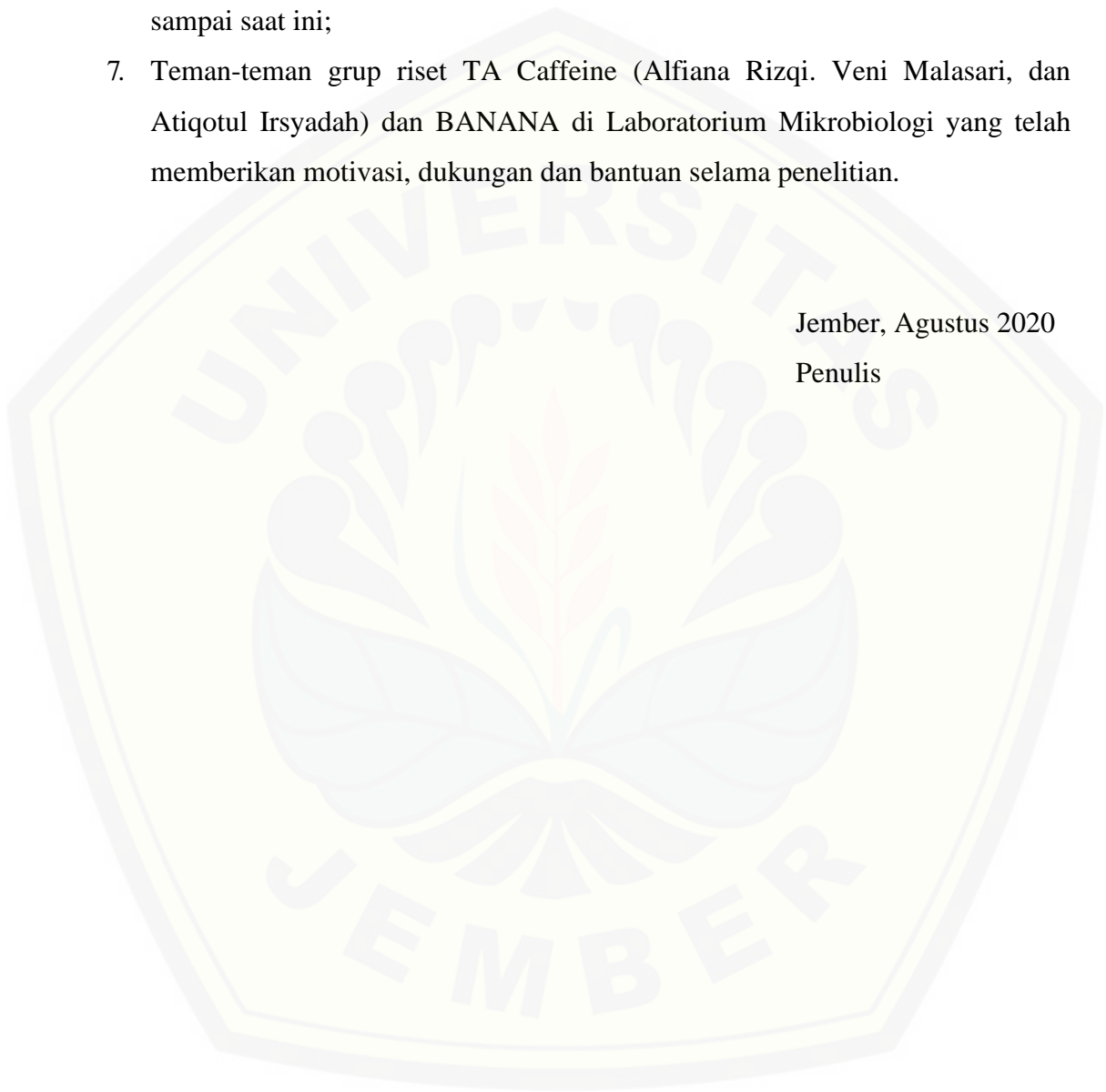
1. Ibu Dr. Sattya Arimurti, S.P,M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Mukhamad Su'udi, Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktunya dan telah sabar dalam memberikan saran, motivasi, dukungan dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini hingga skripsi ini selesai dan mencapai hasil yang maksimal;
2. Ibu Dr. Esti Utarti, S.P,M.Si. dan Bapak Drs. Siswanto, M.Si. serta Bapak Drs. Sutoyo, M.Si. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritikan, saran, masukan, dan pengetahuan yang sangat bermanfaat bagi penulis sehingga menghasilkan karya tulisan yang baik;
3. Ibu Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan saran, motivasi dan bimbingan bagi penulis selama menjadi mahasiswa;
4. Ibu Ir. Endang Soesetyaningsih, selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Jember dan Bapak Frenky Hermawan, selaku teknisi Laboratorium Biosain Politeknik Negeri Jember yang telah memberikan banyak bantuan kepada penulis selama masa penelitian;
5. Kedua orang tua dan seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa,

dukungan, dan motivasi kepada penulis;

6. Teman-teman ROVAQILAN (Rosita Dewi Wulandari, Alfiana Rizqi, dan Dyah Wulan Budyantini) yang sudah menjadi teman dan sahabat yang selalu memberikan dukungan kepada penulis dari masa menjadi mahasiswa baru sampai saat ini;
7. Teman-teman grup riset TA Caffeine (Alfiana Rizqi, Veni Malasari, dan Atiqotul Irsyadah) dan BANANA di Laboratorium Mikrobiologi yang telah memberikan motivasi, dukungan dan bantuan selama penelitian.

Jember, Agustus 2020

Penulis



**DAFTAR ISI**

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah .....	2
1.4 Tujuan.....	2
1.5 Manfaat.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Kafein .....	4
2.2 Bakteri Pendegradasi Kafein .....	5
2.3 Kafein sebagai Sumber Karbon dan Nitrogen untuk Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Kafein .....	7
2.4 Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein .....	9
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	11
3.1 Waktu dan Tempat .....	11
3.2 Alat dan Bahan .....	11
3.3. Prosedur Penelitian.....	12

3.3.1 Peremajaan Bakteri Pendegradasi Kafein	
<i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	12
3.3.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri	
<i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	13
3.3.3 Pembuatan Kurva Degradasi Kafein	
Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	14
3.3.4 Analisis Profil Protein Intraseluler Sel Bakteri	
<i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	15
3.4. Analisis Data .....	17
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	18
4.1 Pola Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	18
4.2 Pola Degradasi Kafein Bakteri Pendegradasi Kafein	
<i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	21
4.3 Hubungan Korelasi Pertumbuhan Sel Bakteri dan Degradasi Kafein	
<i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	24
4.4 Profil Protein Intraseluler Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	25
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	27
5.1 Kesimpulan .....	27
5.2 Saran .....	27
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	28
<b>LAMPIRAN</b> .....	34

**DAFTAR TABEL**

2.1 Daftar Bakteri Pendegradasi Kafein .....6



**DAFTAR GAMBAR**

2.1 Struktur Kimia Kafein.....	4
2.2 Metabolisme Kafein dengan Jalur N-demetilasi .....	7
2.3 Metabolisme Kafein dengan Jalur Oksidasi.....	8
2.4 Perbandingan Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri Pendegradasi Kafein .....	9
2.5 Profil Protein Hasil SDS PAGE Bakteri <i>Pseudomonas putida</i> .....	10
3.1 Rancangan Penelitian Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 .....	12
4.1 Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Variasi Media Sumber Karbon.....	18
4.2 Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Variasi Media Tambahan Unsur Nitrogen .....	20
4.3 Kurva Degradasi Kafein Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Variasi Media yang Mengandung Kafein.....	22
4.4 Hubungan Pola Pertumbuhan Sel dan Degradasi Kafein Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Variasi Media .....	24
4.5 Profil Protein Intraseluler Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Variasi Media Perlakuan .....	25

**DAFTAR LAMPIRAN**

3.1 Komposisi Pembuatan Media Perlakuan .....	34
3.2 Komposisi Larutan .....	34
3.3 Seri Pengenceran Kurva Standar Pertumbuhan Sel Bakteri .....	35
3.4 Seri Pengenceran Kurva Standar Kafein.....	35
3.5 Pembuatan Kurva Standar Kadar Protein .....	35
3.6 Pembuatan Gel SDS-PAGE .....	35
3.7 Pembuatan <i>Buffer</i> Sampel.....	36
3.8 Kurva Standar Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47.....	36
3.9 Kurva Standar Kafein.....	36
3.10 Kurva Standar Kadar Protein .....	37
3.11 Kurva Standar Berat Molekul Marker.....	37
4.1 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Media M9 + Glukosa 0,25 g/L .....	38
4.2 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Media M9 + Kafein 0,25 g/L.....	38
4.3 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Media M9 + Kafein 0,25 g/L dan Glukosa 0,25 g/L.....	39
4.4 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Media M9 + Kafein 0,25 g/L dan Amonium Sulfat 0,25 g/L .....	39
4.5 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri <i>Acinetobacter gernerii</i> KAFS 47 pada Media M9 + Glukosa 0,25 g/L dan Amonium Sulfat 0,25 g/L.....	40
4.6 Hasil Uji SPSS <i>Pearson Correlation</i> Jumlah Sel Bakteri Sel dan Degradasi Kafein pada Media M9 + Kafein 0,25 g/L.....	40-41
4.7 Hasil Uji SPSS <i>Pearson Correlation</i> Jumlah Sel Bakteri Sel dan Degradasi Kafein pada Media M9 + Kafein 0,25 g/L dan Glukosa 0,25 g/L.....	41



4.8 Hasil Uji SPSS *Pearson Correlation* Jumlah Sel Bakteri Sel dan Degradasi Kafein pada Media M9 + Kafein 0,25 g/L dan Amonium sulfat 0,25 g/L ....42



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kafein adalah senyawa alkaloid hasil metabolisme sekunder dari beberapa jenis tanaman seperti kopi (*Coffea* sp.), teh (*Camellia*), kola (*Cola acuminata*) dan biji kakao (*Theobroma cacao*) (Ashihara *et al.*, 2008). Senyawa ini tersusun dari unsur karbon (C), hidrogen (H), nitrogen (N) dan oksigen (O). Kafein ( $C_8H_{10}N_4O_2$ ) merupakan senyawa larut pada air, minyak dan senyawa organik seperti klorofom dan alkohol (Yeboah dan Oppong, 2013). Senyawa kafein terdapat di berbagai produk makanan dan minuman seperti coklat, teh, kopi, *soft drink* dan olahan lainnya (Heckman *et al.*, 2010).. Produk tersebut saat dikonsumsi berlebihan akan menyebabkan jumlah senyawa kafein pada tubuh semakin meningkat dan menimbulkan banyak efek negatif (Bae *et al.*, 2014). Efek negatif pada kafein tersebut dapat dikurangi dengan adanya dekafeinasi. Proses dekafeinasi bisa dengan bantuan bakteri pendegradasi kafein.

Bakteri pendegradasi kafein adalah bakteri yang mampu mendegradasi kafein. Bakteri ini dalam mendegradasi kafein terdapat 2 jalur yaitu oksidasi dan N-demetilasi. Degradasi kafein melalui jalur oksidasi menggunakan bantuan enzim oksidase. Bakteri *Alcaligenes* sp. merupakan salah satu spesies bakteri pendegradasi kafein dengan jalur oksidasi (Mohapatra *et al.*, 2006). Degradasi kafein melalui jalur N-demetilasi yaitu penghilangan gugus metil dengan bantuan enzim *N-demetilase*. *Pseudomonas* merupakan salah satu genus bakteri pendegradasi kafein melalui jalur N-demetilasi (Dash dan Gummadi, 2006). Hasil metabolisme kafein berupa amonia ( $NH_3$ ) dan karbon dioksida ( $CO_2$ ).

Bakteri pendegradasi kafein memanfaatkan kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen. Karbon dan nitrogen adalah unsur organik esensial yang penting bagi sel untuk biosintesis protein dan pertumbuhan sel (Merchant dan Helmann, 2012). Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 (*A. gernerii* KAFS 47) pada penelitian sebelumnya ditumbuhkan pada media cair M9 dengan tambahan

kafein 1 g/L selama 60 jam memiliki kemampuan degradasi kafein sebesar 98,62% (Arimurti *et al.*, 2019).

Bakteri *A. gernerii* KAFS 47 merupakan bakteri hasil isolasi dari limbah kulit buah kopi yang terfermentasi alami di Sempol, Bondowoso. Bakteri ini dilaporkan sebagai bakteri pendegradasi kafein (Arimurti *et al.*, 2019). Informasi terkait dengan pola pertumbuhan, degradasi kafein dan profil protein pada kafein sumber karbon dan nitrogen belum diketahui. Penelitian ini, bakteri ini ditumbuhkan pada media kafein sumber karbon dan nitrogen dengan variasi glukosa dan amonium sulfat. Hal tersebut untuk mengetahui pola pertumbuhan, degradasi kafein, dan profil protein bakteri *A. gernerii* KAFS 47 terhadap media kafein.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu bagaimana pola pertumbuhan, degradasi kafein dan profil protein bakteri *A. gernerii* KAFS 47 pada media kafein?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen pada media pertumbuhan.
2. Media glukosa dan amonium sulfat sebagai kontrol media sumber karbon dan nitrogen.
3. Profil protein intraseluler bakteri *A. gernerii* KAFS 47 menggunakan metode SDS-PAGE.

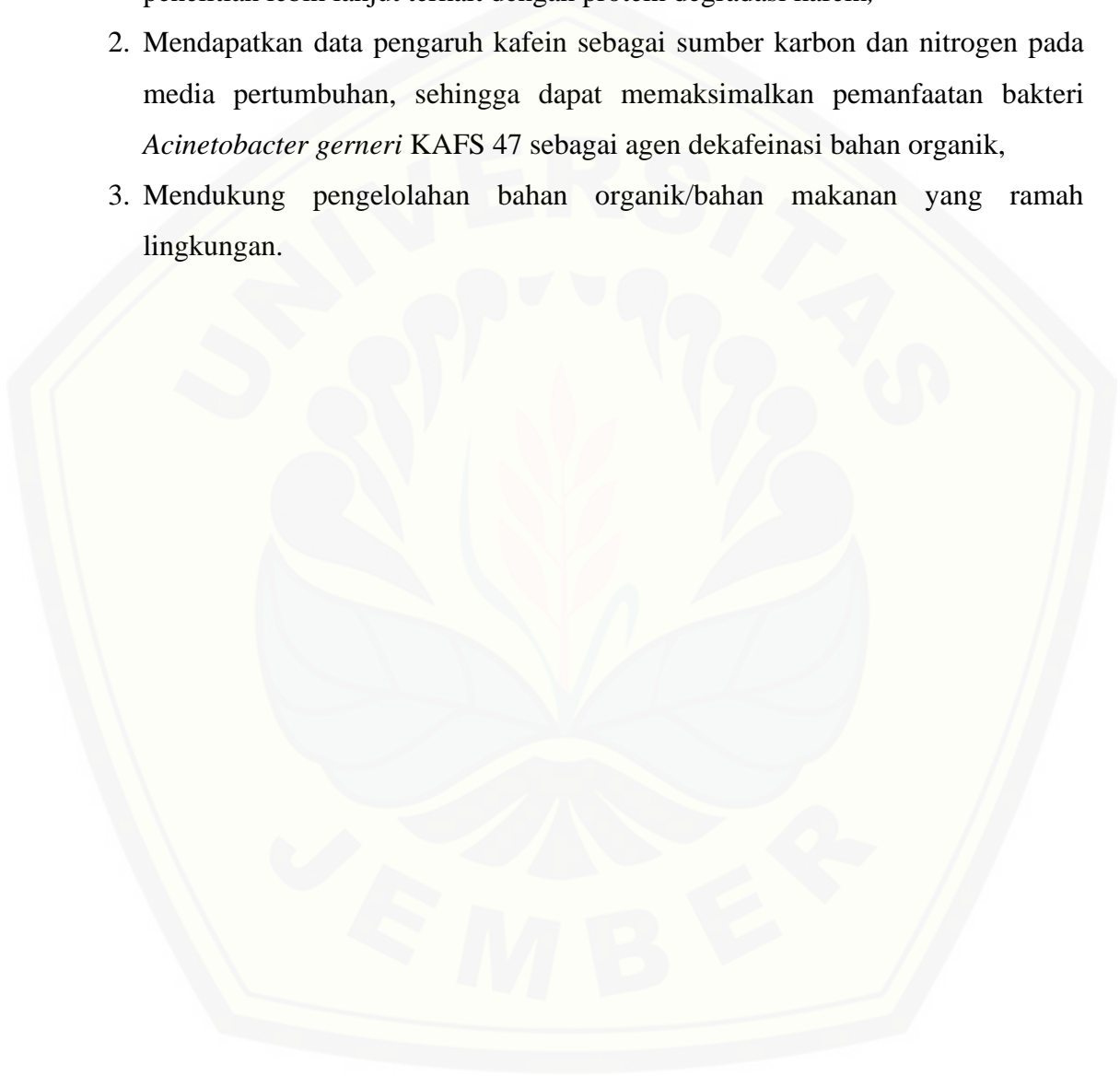
## 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pola pertumbuhan, degradasi kafein dan profil protein bakteri *A. gernerii* KAFS 47 pada media kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen.

### 1.5 Manfaat

Manfaat dalam penelitian ini yaitu:

1. Mendapatkan pola pertumbuhan, degradasi kafein dan profil protein bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47, sehingga dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut terkait dengan protein degradasi kafein,
2. Mendapatkan data pengaruh kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen pada media pertumbuhan, sehingga dapat memaksimalkan pemanfaatan bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 sebagai agen dekafeinasi bahan organik,
3. Mendukung pengolahan bahan organik/bahan makanan yang ramah lingkungan.

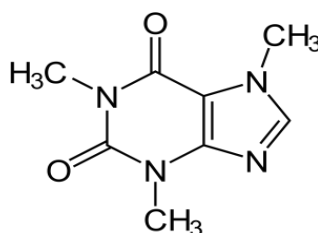


## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kafein

Kafein merupakan alkaloid kristal putih berbentuk serbuk, rasanya pahit, dan dapat berfungsi sebagai obat, menurut Zakir dan Hassan (2013) kafein memiliki formula empiris yaitu  $C_8H_{10}N_4O_2$  (Gambar 2.1). Kandungan kafein pada jenis tanaman kopi, teh, dan kakao kandungannya berbeda-beda. Konsentrasi kandungan kafein pada biji berbagai jenis kopi yaitu: *Coffea arabica* (1%), *Coffea eugenioides* (0,4%), *Coffea salvatrix* (0,7%), *Coffea racemosa* (0,8%), *Coffea canephora* (1,7%), *Coffea dewevrei* (1,2%) dan *Coffea liberica* (1,4%). Kandungan kafein pada tanaman teh bagian pucuk lebih rendah (0,6-2,7%) dibandingkan dengan daun tua. Biji dan daun tanaman kakao memiliki kandungan senyawa kafein sebesar 0,5-0,6%. Senyawa kafein juga terdapat dalam biji bunga matahari (Ashihara dan Suzuki, 2004).

Menurut hasil penelitian Vester dan Keonig (2017), konsumsi produk yang mengandung senyawa kafein banyak terdapat pada *soft drink* (63%), kopi (55%), teh (53%) dan minuman berenergi (4%). Struktur molekul kafein mirip seperti struktur adenosin. Adenosin dalam tubuh berperan untuk menurunkan aktivitas sel dengan mengirimkan sinyal melalui sistem saraf pusat. Molekul kafein dalam sel menjadi inhibitor terhadap reseptor adenosin, sehingga adenosin tidak dapat berikatan dengan reseptor (Cappelletti *et al.*, 2015). Khondker *et al.*, (2017) menyatakan bahwa sifat kimia kafein yaitu hidrofilik dan hidrofobik (amfifilik). Kafein merupakan molekul amfifilik kecil dengan berat molekul 194,19 g/mol. Ukuran molekul kafein yang kecil menyebabkan kafein mampu masuk ke dalam membran.



Gambar 2.1 Struktur kimia kafein (Sumber : Zakir dan Hassan, 2013)

Kafein secara umum mampu bersifat sebagai antibakteria. Keberadaan kafein dapat mempengaruhi pertumbuhan pada beberapa mikroorganisme seperti bakteri (Gaul dan Donengan, 2015). Menurut hasil penelitian Ramanaviciene *et al.*, (2003), bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas fluorescens* dengan adanya kafein pada media menyebabkan penurunan jumlah sel yang tumbuh. Bakteri tersebut tumbuh baik pada media awal *Nutrient Broth* (NB) tanpa kafein, namun jumlah sel yang tumbuh menurun saat ditumbuhkan pada media NB dengan kandungan kafein 0,1 g/L. Konsentrasi kadar kafein yang terlalu tinggi pada media pertumbuhan mampu mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri (Al-Janabi, 2011). Kafein dengan konsentrasi 0,1% pada media pertumbuhan dapat menghambat sintesis protein dan pertumbuhan sel, namun beberapa jenis bakteri tertentu mampu tumbuh dengan baik (Ibrahim *et al.*, 2014).

## 2.1 Bakteri Pendegradasi Kafein

Bakteri pendegradasi kafein adalah bakteri yang memanfaatkan senyawa kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen dari CO<sub>2</sub> dan NH<sub>3</sub>. Bakteri ini sudah banyak dilakukan penelitian dari tahun 1970an dan banyak ditemukan di berbagai benua. Spesies bakteri pendegradasi kafein yang sudah dilaporkan dari berbagai hasil penelitian (Iswanto, 2019) (Tabel 2.1).

Bakteri pendegradasi kafein antar spesies memiliki kemampuan tumbuh dan mendegradasi kafein yang berbeda-beda. Berdasarkan beberapa hasil penelitian El- Mched *et al.*, (2013), *Pseudomonas stutzeri* Gr 21 ZF memiliki kemampuan mendegradasi kafein sebesar 59%. Hasil penelitian Win *et al.*, (2019), Bakteri *Burkholderia spp.* memiliki kemampuan degradasi sebesar 45,5%. Menurut penelitian Yu *et al.*, (2009), genus *Pseudomonas* dalam mendegradasi kafein dan turunannya dengan persen degradasi sebesar 25-59,9% dan 68% (Babu *et al.*, 2005; Gummadi *et al.*, 2012).

Tabel 2.1 Daftar bakteri pendegradasi kafein

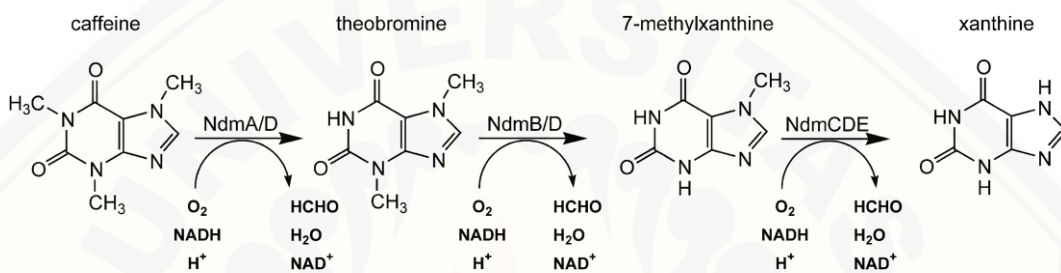
Nama bakteri	sumber isolasi	Lokasi
<i>Bacillus coagulans</i>	Tanah	Tidak diketahui
<i>P. putida</i> strain 40	Tanah	California
<i>P. putida</i> C1	Tanah	Jerman
<i>P. putida</i> C3024	Tanah perkebunan	Netherlands
<i>P. putida</i> WS	Tanah	Jerman
<i>Pseudomonas</i> . sp. No. 6	Tanah	Jepang
<i>P. putida</i> No. 352	Tanah	Jepang
<i>Serratia marcescens</i>	Tanah bawah tanaman kopi	Brazil
<i>P. putida</i> ATCC 700097	Aliran limbah	California
<i>Klebsiella</i> and <i>Rhodococcus</i>	Tanah	India
<i>Acinetobacter</i> sp. (3 strains)	Tanah bawah tanaman kopi	Brazil
<i>Moraxella</i> sp.	Tanah bawah tanaman kopi	Brazil
<i>P. putida</i> IF-3 and its mutants	Tanah	Jepang
<i>P. putida</i> L	Tanah bawah tanaman kopi	Brazil
<i>P. alcaligenes</i> CFR 1708	Tanah tanaman kopi	India
<i>Alcaligenes</i> sp.CF8	Permukaan air danau	Kanada
<i>P. putida</i> NCIM 5235	Tanah tanaman kopi	India
<i>Pseudomonas</i> sp. GSC 1182	Tanah tanaman kopi	India
<i>Pseudomonas</i> sp. CBB1	Tanah	Iowa
<i>P. putida</i> CBB5	Tanah	Iowa
<i>P. stutzeri</i> Gr 21 ZF	Tanah	Lebanon
<i>P. pseudoalcaligenes</i> TPS8	Tanah tanaman teh	Iran
<i>Pseudomonas</i> sp. CES	Limbah kopi	Iowa
<i>P. monteilii</i> KRM9	Limbah ampas kopi	Indonesia
<i>P. putida</i> CT25	Tanah perkebunan teh	China
<i>P. japonica</i> C9	Limbah ampas kopi	Indonesia
<i>P. japonica</i> (3 strains)	Biji kopi Luwak	Indonesia
<i>M. populi</i> C39	Limbah ampas kopi	Indonesia
<i>M. populi</i> C20	Tanah tanaman kopi	Indonesia
<i>M. populi</i> (3 strains)	Biji kopi Luwak	Indonesia
<i>K. quasipneumoniae</i>	Biji kopi Luwak	Indonesia
<i>R. ornithinolytica</i> C28	Biji kopi Luwak	Indonesia
<i>S. chelatiphaga</i> C32	Biji kopi Luwak	Indonesia

(Iswanto *et al.*, 2019)

Berdasarkan (Tabel 2.1) bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 belum masuk ke dalam daftar bakteri pendegradasi. Bakteri ini dilaporkan pertama kali pada tahun 2019 sebagai bakteri pendegradasi kafein. Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 merupakan hasil isolasi bakteri pendegradasi kafein pada limbah kulit buah kopi arabika yang terfermentasi alami. Bakteri ini memiliki kemampuan degradasi kafein sebesar 98,62% (Arimurti *et al.*, 2019a). Similaritas Isolat bakteri KAFS 47 dengan *Acinetobacter gernerii* DSM 14967 sebesar 98% (Arimurti *et al.*, 2018a). Karakteristik biokimia bakteri yaitu mampu memanfaatkan sitrat, mampu fermentasi glukosa (menghasilkan asam), gram Negatif, positif katalase, negatif oksidase. Bentuk bakteri cocobacillus, non motil, bersifat aerobik, tumbuh pada pH 7.3 dan suhu 30 °C (Arimurti *et al.*, 2019a).

### 2.3 Kafein Sebagai Sumber Karbon dan Nitrogen untuk Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Kafein

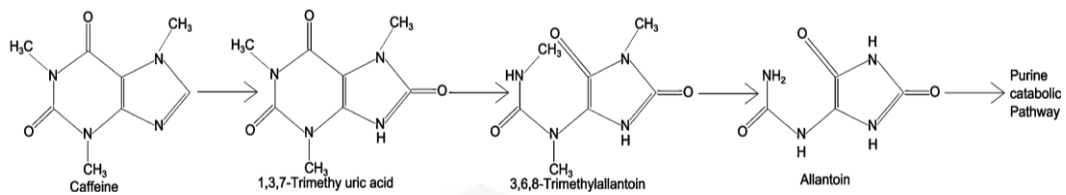
Kafein merupakan molekul yang terdiri dari unsur karbon, hidrogen, nitrogen dan oksigen yang dapat dipecah menjadi senyawa yang sederhana melalui proses katabolisme (Ibrahim *et al.*, 2014). Pemecahan kafein melalui 2 jalur yaitu N-demetilasi dan oksidasi. Jalur katabolisme dengan N-demetilasi yaitu pemecahan molekul dengan menghilangkan gugus metil. Pembentukan turunan kafein seiring dengan berkurangnya gugus metil (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Metabolisme kafein dengan jalur N-demetilasi *Pseudomonas putida* (Sumber: Summers *et al.*, 2013).

Katabolisme kafein melalui jalur demetilasi menghasilkan turunan kafein yang memiliki ukuran lebih sederhana (Gambar 2.2). Bentuk kafein yang paling sederhana dimanfaatkan bakteri sebagai sumber karbon dan nitrogen. Enzim N-demetilase yang bekerja dalam proses katabolisme ada 5 jenis yaitu N-demetilaseABCDE. Enzim-enzim tersebut yang membantu proses pemecahan/pembongkaran molekul kafein menjadi molekul lebih sederhana. Jalur katabolisme ini membutuhkan oksigen dan NADH yang berfungsi untuk memberikan energi dan transfer elektron yang dibantu oleh NdmD yang berpasangan dengan NdmABCE. Enzim N-demetilase diaktifkan dengan adanya keberadaan NADH sebagai koenzim. Jalur tersebut akan menghilangkan gugus metil pada setiap reaksi dengan bentuk formaldehida/CH<sub>2</sub>O (Summers *et al.*, 2013).

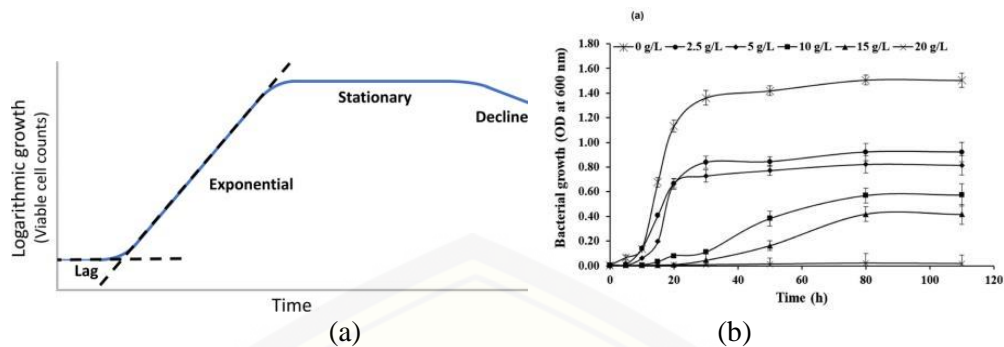




Gambar 2.3 Metabolisme kafein oleh bakteri pendegradasi kafein dengan jalur oksidasi (Sumber: Dash dan Gummadi, 2011).

Jalur katabolisme kafein secara oksidasi yaitu pemecahan molekul kafein menjadi molekul yang lebih sederhana (Gambar 2.3). Bakteri pendegradasi dengan jalur ini jarang ditemukan. Jalur katabolisme ini memerlukan bantuan enzim oksidase. Enzim yang digunakan dalam jalur oksidasi yaitu kafein oksidase, xantin oksidase, heterotermik kafein oksidase (cdh) dan beberapa enzim lainnya. Enzim heterotermik kafein oksidase (cdh) tersebut berperan untuk memecah molekul kafein menjadi *trimethyl uric acid* pada spesies bakteri *Pseudomonas* sp strain CBB1 (Mohanty *et al.*, 2012). Degradasi kafein akan menghasilkan amonia ( $\text{NH}_3$ ) dan karbon dioksida ( $\text{CO}_2$ ) yang dimanfaatkan untuk pertumbuhan sel bakteri.

Pertumbuhan pada mikroorganisme seperti bakteri secara umum meliputi empat yaitu fase adaptasi (lag), fase eksponensial (logaritmik), fase stasioner, dan fase kematian (Gambar 2.4a). Kurva pertumbuhan bakteri *Burkholderia* spp pada media *nutrient broth* (NB) dengan tambahan kandungan kafein dengan berbagai variasi konsentrasi. Variasi konsentrasi media yang digunakan yaitu 2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L, dan 20 g/L. Perbedaan kandungan kafein yang berbeda dalam media mempengaruhi kecepatan sel dalam pertumbuhan sel bakteri. Kurva pertumbuhan bakteri ini pada variasi media menunjukkan fase adaptasi (Lag) sampai fase stasioner (Gambar 2.4b).



(a) Kurva pertumbuhan bakteri; (b) Kurva pertumbuhan bakteri *Burkholderia spp* pada media kafein dengan variasi konsentrasi

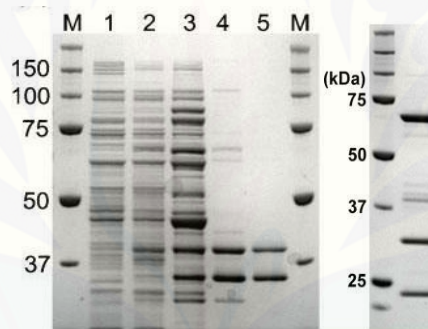
Gambar 2.4 Perbandingan kurva pertumbuhan sel bakteri pendegradasi kafein (Sumber: Bertrand, 2019; Win *et al.*, 2019)

Bakteri pendegradasi kafein merupakan bakteri yang tahan dan mampu memanfaatkan senyawa kafein. Pertumbuhan bakteri pendegradasi kafein akan berbeda pada setiap media pertumbuhan. Lama waktu fase lag, logaritmik, stasioner dan kematian dipengaruhi oleh konsentrasi kafein pada media. pola pertumbuhan bakteri *Burkholderia spp.* pada media kafein konsentrasi 2,5-5 g/L mengalami fase lag jam ke 5, sedangkan pada konsentrasi 10-15 g/L fase lag terjadi pada jam ke 20 (Win *et al.*, 2019). Pertumbuhannya berkaitan dengan sumber karbon dan nitrogen yang dihasilkan dari proses degradasi kafein. Pola pertumbuhan dan degradasi kafein bakteri *Pseudomonas monteilii* KRM9 yang ditumbuhkan pada media kafein 1%. Pemanfaatan kafein pada media pertumbuhan akan berkurang seiring dengan aktivitas degradasi kafein dan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas monteilii* KRM9 yang semakin meningkat (Arimurti *et al.*, 2018).

## 2.4 Profil Protein Bakteri Pendegradasi Kafein

Profil protein bakteri adalah gambaran tentang protein bakteri. Profil protein penting diketahui sebagai salah satu dasar untuk identifikasi jenis protein. Protein bisa mengalami kerusakan karena beberapa faktor yaitu suhu, pH, dan tekanan (Azhar, 2016). Profil protein dapat diketahui dengan menggunakan

*Sodium Dodecylsulphat Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Menurut Roy dan Kumar (2014), SDS-PAGE adalah metode elektroforesis dengan gel poliakrilamid yang dapat memisahkan protein ataupun enzim dengan berdasarkan pada berat molekul proteinnya. Protein ditambahkan dengan larutan SDS untuk memberikan muatan pada protein. Pergerakan protein pada metode ini dari kutub negatif menuju kutub positif. Metode ini sering digunakan untuk melihat seluruh profil protein karena proses pengerjaannya cukup sederhana. Metode SDS-PAGE ini hasilnya relatif cepat dan dapat diketahui ukuran dari protein target serta dapat mengetahui karakteristik makromolekul bakteri. Hasil dari metode SDS-PAGE berupa gel poliakrilamid dan terdapat band protein yang terekspresi (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Profil protein hasil SDS-PAGE bakteri *Pseudomonas putida* (Sumber: Summers *et al.*, 2011 dan 2012)

Visualisasi analisis profil protein dengan menggunakan SDS-PAGE mampu memberikan informasi tentang berat molekul protein dengan bantuan marker. Molekul protein memiliki muatan yang kemudian akan bergerak sesuai dengan muatannya melalui gel poliakrilamid yang terhubung dengan sumber arus listrik (Manns, 2011). Analisis profil protein enzim yang dihasilkan dari metabolisme sel menggunakan metode SDS-PAGE. Bakteri *Pseudomonas putida* yang mendegradasi kafein dengan menghasilkan protein enzim berupa enzim *N-demetilase*. Enzim *N-demetilase*ABCDE memiliki ukuran protein yang berbeda, *NdmA* 40 kDa, *NdmB* 35 kDa, *NdmC* dan *NdmD* berukuran 67 kDa, 32 kDa serta 22 kDa (Gambar 2.5) (Summers *et al.*, 2011).

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Januari – Juli 2020. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember serta Laboratorium BioSain Politeknik Negeri Jember.

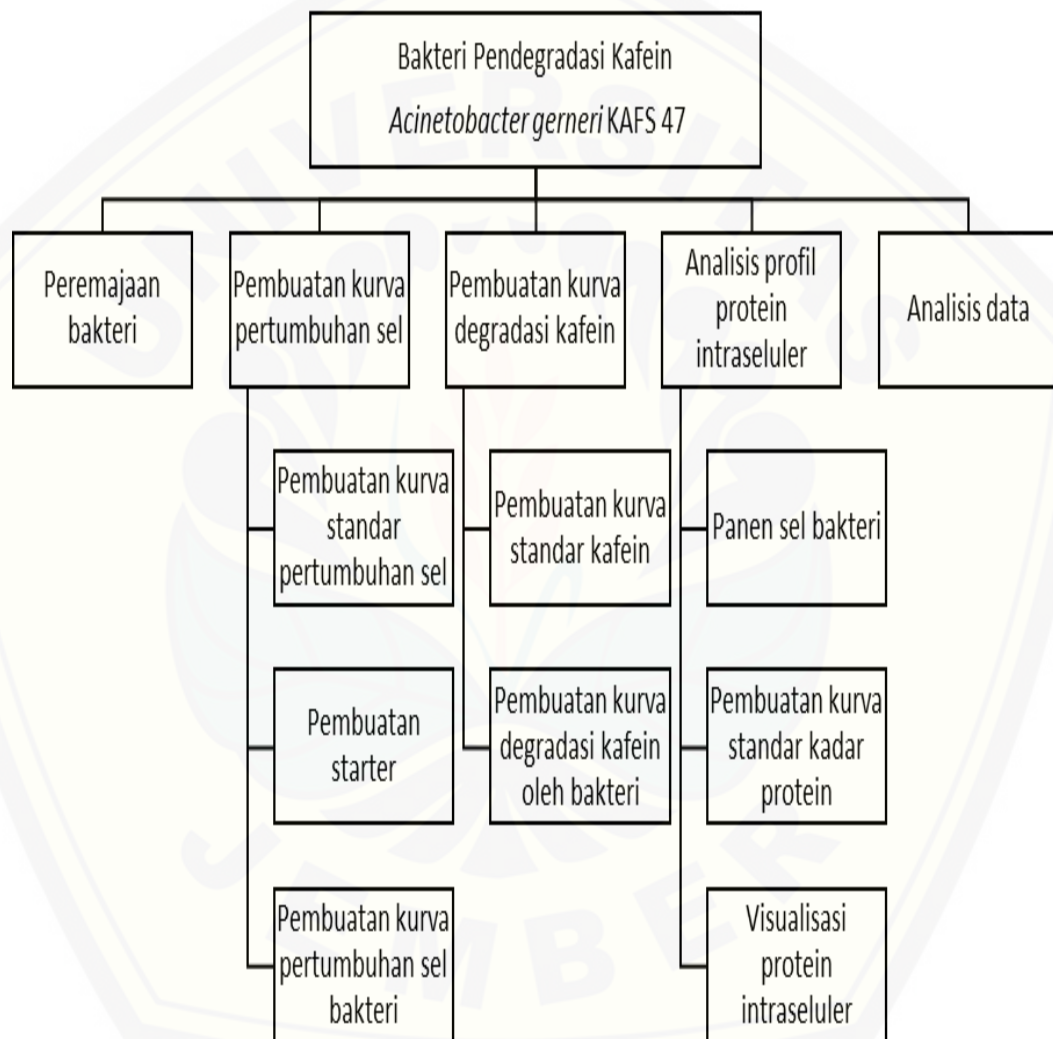
#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tabung reaksi, labu erlenmeyer volume 200 dan 250 ml, gelas beaker, botol falkon, dan cawan petridish. Mikropipet ukuran 10-100  $\mu$ l dan 100-1000  $\mu$ l, *Laminar Air Flow* (LAF), vortek, timbangan analitik, *shaker*, lemari pendingin (-20 °C), spektrofotometer (Spekol JenaAnalyk), kuvet, alat SDS-PAGE (BioRad). Alat yang digunakan untuk panen sel bakteri yaitu sentrifugasi eppendorf (Sigma 2-16P), sentrifugasi botol falkon 15 ml (Hettich EBA 200), sentrifugasi botol falkon 50 ml (Hettich Rotina 380) dan alat pendukung.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47. Bahan untuk pengukuran kadar protein meliputi *reagent bradford*, larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA). Bahan pembuatan media meliputi media minimal/M9 (Snyder dan Atlas 2006), media kafein 0,25 g/L (Sigma), media glukosa 0,25 g/L (Sigma), dan amonium sulfat 0,25 g/L (Merck) (Lampiran 3.1). Pembuatan gel SDS-PAGE meliputi gel *acrylamid*, gel *buffer*, ddH<sub>2</sub>O, SDS 10%, TEMED, dan APS. Bahan pembuatan *buffer sample* meliputi  $\beta$ -mercaptoetanol dan *loading buffer*. Bahan pewarnaan gel SDS-PAGE meliputi larutan *staining* (*Bromophenol blue*) dan larutan *destaining* (Metanol). Penanda ukuran protein menggunakan *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 5 tahapan yaitu peremajaan bakteri pendegradasi kafein *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 (*A. gernerii* KAFS 47). Pembuatan kurva pertumbuhan, pembuatan kurva degradasi kafein, analisis profil protein intraseluler dan analisis data. Adapun rancangan percobaan pada penelitian ini (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Rancangan penelitian bakteri pendegradasi kafein *A. gernerii* KAFS 47

#### 3.3.1 Peremajaan Bakteri Pendegradasi Kafein *A. gernerii* KAFS 47

Peremajaan dilakukan untuk menumbuhkan sel bakteri pada media baru. Proses ini bertujuan untuk memulai kembali metabolisme sel setelah penyimpanan (Wijayati *et al.*, 2014). Proses peremajaan dimulai dengan

pembuatan media padat M9 + kafein 0,25 g/L pada cawan petri dan tabung reaksi (Lampiran 3.1). Bakteri *A. gernerii* KAFS 47 diinokulasi pada media M9 + kafein 0,25 g/L padat menggunakan metode *streak* diinkubasi pada suhu 30°C selama 3-4 hari. Biakan bakteri tersebut diinokulasikan pada media padat M9 + kafein 0,25 g/L miring untuk stok isolat bakteri *A. gernerii* KAFS 47.

### 3.3.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri *A. gernerii* KAFS 47

#### a. Pembuatan Kurva Standar Pertumbuhan Sel Bakteri

Parameter pembuatan kurva standar yaitu nilai absorbansi dan jumlah koloni (CFU/ml). pembuatan kurva standar diawali dari stok biakan isolat KAFS 47 yang ditumbuhkan dalam media miring M9 + kafein 0,25 g/L. Stok biakan isolat KAF 47 diinokulasikan pada media cair M9 + kafein 0,25 g/L dengan volume 100 ml dalam labu erlenmeyer volume 250 ml. Inokulum diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan 125 rpm selama 4 hari. Inokulum bakteri tersebut selanjutnya diencerkan dengan seri pengenceran menggunakan akuades volume total 4 ml (Lampiran 3.3). Pengenceran tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan dengan volume 3 ml dari pengenceran. Panjang gelombang untuk pengukuran nilai absorbansi yaitu 600 nm. Volume 1 ml digunakan untuk perhitungan jumlah koloni (CFU/ml). Jumlah koloni (CFU/ml) diperoleh dengan metode *drop plate*. Metode *drop plate* dilakukan pengeceran biakan dengan garam fisiologi 0,85 % (Lampiran 3.2). pengenceran dilakukan dari  $10^{-1}$ - $10^{-15}$ . Hasil pengenceran diinokulasi sebanyak 10  $\mu$ l pada media padat M9 + kafein 0,25 g/L dalam cawan petridish. Jumlah koloni yang diambil antara 3-30 koloni (Herigstad *et al.*, 2001). Hasil dari pengukuran nilai absorbansi dikonversi dalam jumlah sel (CFU/ml) menggunakan rumus persamaan berikut.

$$\sum \text{koloni bakteri} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{10 \mu\text{l}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} = \dots \text{CFU/ml}$$

#### b. Pembuatan starter

Pembuatan starter dimulai dengan stok biakan *A. gernerii* KAFS 47 diinokulasikan pada media cair M9 + kafein 0,25 g/L volume 100 ml dalam labu erlenmeyer 250 ml sebanyak 1 ose. Media cair dan biakan diinkubasi *shaker* pada suhu ruang kecepatan 125 rpm. Nilai absorbansi starter sebesar 0,422.

#### c. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan setelah diketahui jumlah sel  $10^8$  dan pengukuran OD starter sebesar 0,422. Starter ditambahkan pada media cair (5%) dari media tumbuh selanjutnya. Starter diinokulasikan pada media tumbuh yang terdapat 5 variasi media yang berbeda dengan masing-masing volume 100 ml dalam labu Erlenmeyer 250 ml (Lampiran 3.1), yaitu:

1. Media M9 + kafein 0,25 g/L
2. Media M9 + glukosa 0,25 g/L
3. Media M9 + kafein 0,25 g/L + amonium sulfat 0,25 g/L
4. Media M9 + kafein 0,25 g/L + glukosa 0,25 g/L
5. Media M9 + glukosa 0,25 g/L + amonium sulfat 0,25 g/L

Variasi media tersebut masing-masing 3 kali pengulangan. Variasi media yang sudah ditambahkan starter diinkubasi pada *shaker* suhu ruang, kecepatan 125 rpm selama 72 jam. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer  $\lambda$  600 nm dan pengulangan 2 kali (*duplo*). Blanko dalam pengukuran nilai absorbansi menggunakan media pertumbuhan masing-masing. Pengukuran dilakukan dengan interval waktu 6 jam. Pengukuran nilai absorbansi media pertumbuhan dikonversi dalam persamaan yang diperoleh pada kurva standar menjadi jumlah sel (CFU/ml) (Lampiran 3.8). Kecepatan pembelahan bakteri dihitung dalam rumus waktu generasi dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Laju pertumbuhan} = \frac{\log \text{jumlah sel akhir} - \log \text{jumlah sel awal}}{\log 2}$$

$$\text{Waktu generasi} = \frac{\text{satuan waktu}}{\text{laju pertumbuhan}} \text{ (jam)}$$

### 3.3.3 Pembuatan Kurva Degradasi Kafein Bakteri *A. gernerii* KAFS 47

#### a. Pembuatan Kurva Standar Kafein

Kurva standar kafein diukur dengan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 272,5 nm. Pembuatan standar konsentrasi kafein menggunakan seri pengenceran (Lampiran 3.4). Seri pengenceran menggunakan akuades dengan volume total seri pengenceran 3 ml. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan 3 kali pengulangan dengan blanko berupa akuades. Nilai absorbansi yang telah diperoleh dicari nilai regresinya dengan parameter konsentrasi kafein dan nilai absorbansi (Lampiran 3.9).

#### b. Pembuatan Kurva Degradasi Kafein Bakteri *A. gernerii* KAFS 47

Kurva degradasi kafein dibuat selama 72 jam dengan interval waktu 6 jam. Biakan bakteri diambil 1,5 ml dan disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi diambil supernatannya. Supernatan diambil 30 µl dan diencerkan dalam akuades 2970 µl dan divortek. Hasil pengenceran tersebut diukur nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 272,5 nm. Sinar spektrofotometer yang digunakan adalah sinar uv.

### 3.3.4 Analisis Profil Protein Bakteri *A. gernerii* KAFS 47

#### a. Panen Sel Bakteri *A. gernerii* KAFS 47

Biakan bakteri yang ditumbuhkan pada variasi media perlakuan dengan volume 100 ml dalam labu Erlenmeyer 250 ml. Panen sel bakteri pada variasi media dilakukan pada pertumbuhan fase logaritmik. Biakan bakteri dipindahkan dalam botol falkon volume 50 ml dan disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet hasil sentrifugasi diambil. Pelet dipindahkan pada botol falkon dengan berat awal sudah diketahui. Pelet dicuci dengan Tris *Buffer* HCl (Lampiran 3.2) sebanyak 2 kali dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm suhu 20°C selama 5 menit. Hasil sentrifugasi diambil peletnya (Basu *et al.*, 2007).

Pelet hasil dari proses sentrifugasi ditimbang menggunakan timbangan analitik. Pelet dari masing-masing sampel medium ditambahkan dengan *buffer* Tris MgCl<sub>2</sub> (Lampiran 3.2) dengan perbandingan 600 mg : 3 ml menggunakan



mikropipet 100-1000  $\mu\text{l}$  (Basu *et al.*, 2007). Sampel selanjutnya dipecah selnya dengan metode *freeze and thaw*. Metode ini memecah sel dengan memberikan tekanan suhu yang berbeda drastis sehingga membran sel mengalami lisis (Islam *et al.*, 2017). Sampel dimasukkan pada lemari pendingin  $-20^{\circ}\text{C}$  (*freeze*) selama 24 jam (*over night*). Hasil *freeze* dipanaskan dengan suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit (*thawing*). Hasil *freeze and thaw* di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 25 menit dalam eppendorf. Hasil proses sentrifugasi diambil supernatan (protein intraseluler) untuk visualisasi protein.

#### b. Pembuatan Kurva Standar Kadar Protein

Kurva standar kadar kafein dibuat sebagai acuan dalam perhitungan kadar protein sampel sebelum SDS-PAGE. Pembuatan seri konsentrasi kadar protein (Lampiran 3.5). Kurva standar kadar protein diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm (Ernst dan Zor, 2010). Hasil pengukuran nilai absorbansi kemudian dibuat kurva standar dengan nilai regresi sebesar 0,983 (Lampiran 3.10). Sampel protein yang akan divisualisasi dengan SDS-PAGE kadar proteinnya diukur. Pengukuran kadar protein sampel dengan mengambil 25  $\mu\text{l}$  sampel ditambah akuades 25  $\mu\text{l}$  dan 1 ml *reagent bradford*. Sampel diukur nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran dimasukan dalam persamaan yang telah didapatkan (Lampiran 3.10).

#### c. Visualisasi Protein Intraseluler Bakteri *A. gernerii* KAFS 47

Supernatan yang merupakan hasil panen sel, selanjutnya divisualisasi dengan metode SDS-PAGE. Protein sampel sebelumnya diukur konsentrasi proteinnya dengan menggunakan *reagent bradford*. Proses SDS- PAGE dimulai dengan pembuatan *stacking gel* konsentrasi 5% dan *separating gel* konsentrasi 12.5% (Lampiran 3.6). Protein sampel ditambahkan dengan  $\beta$ -mercaptoetanol dan *buffer loading*, yang kemudian dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit (Lampiran 3.7) (Roy dan Kumar, 2014). Sampel dimasukkan dalam sumuran gel *Poly-Acrylamid* sebanyak 40  $\mu\text{g}$  bagian *stacking gel*. Gel SDS-PAGE selanjutnya di elektroforesis pada kuat arus pertama 30 volt untuk melalui *stacking gel* selama 2 jam. Penambahan kuat arus 85 volt untuk melalui *separating gel* selama 1 jam. Lembaran gel yang telah selesai di elektroforesis di Staining/ pewarnaan

(*Coomassie Blue*) selama satu malam dan *didestaining/* pencucian (Metanol) dilakukan selama 1 jam diulangi sebanyak 3 kali/ sampai band terlihat dengan jelas marker yang digunakan yaitu *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

#### d. Perhitungan Berat Molekul Protein

Perhitungan berat molekul protein dengan menggunakan bantuan kertas milimeter untuk menghitung migrasi protein. Pembuatan kurva berat molekul marker mendapatkan nilai regresi 0,987 dan diperoleh persamaan  $y = -0,0146x + 2,2377$  (Lampiran 3.11). Nilai migrasi sampel dimasukkan pada variabel  $x$ . Nilai hasil substitusi persamaan dimasukkan dalam rumus POWER untuk mengetahui berat molekul protein sampel yang diperoleh.

#### 3.3.5 Analisis Data

Hasil penelitian pola pertumbuhan bakteri *A. gernerii* KAFS 47 pada variasi media dianalisis menggunakan analisis deskriptif. Hubungan antara pertumbuhan dengan degradasi dengan menggunakan uji normalitas dan uji korelasi dengan *Pearson Correlation*. Hubungan korelasi antara pertumbuhan dan degradasi kafein pada media perlakuan. Hasil diuji normalitas data, analisis data uji normalitas data yang diperoleh nilai  $\geq 0,05$ , maka menggunakan uji korelasi *Pearson correlation*. Kekuatan hubungan korelasi tergantung berdasarkan hasil yang diperoleh. Nilai mendekati angka 1 dikatakan korelasi sempurna, jika  $> 0,75-0,99$  korelasi sangat kuat,  $> 0,5-0,75$  korelasi kuat,  $> 0,25-0,5$  korelasi cukup,  $> 0-0,25$  korelasi sangat lemah dan sampai nilai 0 maka tidak ada hubungan korelasi antar variabel (Budiono dan Sarwono, 2012).

## BAB 5 PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kemampuan tumbuh Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada media kafein lebih rendah dibandingkan dengan media kafein + glukosa dan glukosa. Pertumbuhan bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 diikuti dengan degradasi kafein pada media yang mengandung kafein.

Profil protein bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS yang ditumbuhkan pada media glukosa berbeda dengan yang ditumbuhkan pada media kafein. band protein dengan berat molekul 77 kDa dan 38 kDa diduga protein yang berperan pada degradasi kafein.

### 5.2 Saran

Berdasarkan pola pertumbuhan dan degradasi kafeinnya dapat dilakukan penelitian terkait dengan jalur degradasi kafein yang digunakan oleh bakteri ini. Berdasarkan profil protein intraseluler yang diperoleh dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut terkait dengan identifikasi protein dengan metode *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS).

DAFTAR PUSTAKA

- AL-Janabi, A. A. H. S. 2011. Potential Activity of the Purine Compounds Caffeine and Aminophylline on Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*. 3(2): 133-137.
- Arimurti, S., I. Oktavianawati., S. Suharjono. 2018a. Skrining bakteri pendegradasi kafein buah kopi terfermentasi alami sebagai kandidat agen dekafeinasi biji kopi. *Laporan Akhir IDB Batch 2*.
- Arimurti, S., I. Oktavianawati., S. Suharjono. 2019. 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., I. Sindiana., A. Irsyadah., dan A. Rizqi. 2019a. Characterization of *pseudomonas plecoglossicida* KAFS 34 as a caffeine-degrading bacteria. *ICOLIB Abstract Book*.
- Arimurti, S., T. Ardyati., Y. Nurani., T. A Siswoyo., dan S. Suharjono. 2018. Degradation of caffeine by *Pseudomonas monteilii* KRM9. *Malaysian Journal of Microbiology*. 14 (1): 55-60.
- Ashengroph, M dan S. Ababaf. 2013. Biodecaffeination by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* TPS8, an Isolated Strain From Tea Plantation Soil. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*. 24 (4): 305-312.
- Ashihara, H., dan T. Suzuki. 2004. Distribution and Biosynthesis of Caffeine in Plants. *Frontiers in Bioscience*. 9: 1864-1876.
- Ashihara, H., H. Sano., A. Crozier. 2008. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. 69: 841-856.
- Azhar, M. 2016. *Biomolekul sel karbohidrat, protein, dan enzim*. Padang : UNP Press padang.

- Babu, V. R. S., S. Patra., M. S. Thakur., N. G. Karanth., dan M. C. Varadaraj. 2005. Degradation of caffeine by *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708. *Journal Enzyme and Microbial Technology*. (37): 617-624.
- Bae, J., J. Park., S. Im., dan D. Song. 2014. Coffe and health (review article). *Integrative Medicine Research*. 300: 1-3.
- Basu, A., R. Shrivastava., B. Basu., S. K. Apte., dan P. S. Phale. 2007. Modulation of glucose transport causes preferential utilization of aromatic compounds in *Pseudomonas putida* CSV86. *Journal of Bacteriology*. 189(21): 7556-7562.
- Bertrand, R. L. 2019. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of Bacteriology*. 201(7): 1-21.
- Bren, A., J. O. Park., B. D. Towbin., E. Dekel., J. D. Rabinowitz., dan U. Alon. 2016. Glucose becomes one of the worst carbon sources for *e.coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific Report*. 6: 1-10.
- Budiono, H., dan Sarwono, J. 2012. *Statistik Terapan: Aplikasi Untuk Riset Skripsi, Tesis Dan Disertasi*. Jakarta: PT Gramedia.
- Canada, F.L., P.A. Vantsawa., M.S. Abdulsalami., S. Ibrahim., H. Danlami., dan A. Aldo. 2017. Isolation and characterization of caffeine-degrading bacterium from the soil sample *Balanite aegyptiaca* farms in Northern Nigeria. *Katsina Journal of Natural and Applied Sciences*. 6 (1): 11-19.
- Cappelletti, S., P. Daria., G. Sani., dan M. Aromatario. 2015. Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug?. *Journal Current Neuropharmacology*. 13: 71-88.
- Dash, S. S., dan S. N Gummadi. 2006. Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnol Lett*. (28): 1993–2002.

- Dash, S. S., dan S. N Gummadi. 2011. Biotechnological approach to caffeine degradation: current trends and perspectives. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*: 435-451.
- El-Mched, F., Z. Olama, dan H. Holail. 2013. Optimization of the environmental and physiological factors affecting microbial caffeine degradation and its application in caffeinated products. *Basic Research Journal of Microbiology*. 1 (2): 17-27.
- Ernst, O., dan T. Zor. 2010. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiment*. (38): 1-7.
- Gaul, J., dan K. Donegan. 2015. Caffeine and Its Effect on Bacteria Growth. *The Journal of Biological Sciences*. 1(8): 4-8.
- Gummadi, S. N., A.C. Lionel., S.S. Dash., dan S. Gokulakrishnan. 2007. The effect of glucose on growth and degradation of caffeine by *Pseudomonas* sp. *Research Journal of Microbiology*. 2(4): 327-336.
- Gummadi, S., B. Bhavya, dan N. Ashok. 2012. Physiology, biochemistry and possible applications of microbial caffeine degradation. *Application Microbiology Biotechnology* 93: 545–554.
- Haug, R. T. 2020. *Lessons in Environmental Microbiology*. Baco Raton: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Heckman, M. A., J. Weil., dan E. G. Demejia. 2010. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal of Food Science*. 75(3): 77-87.
- Heeswijk, W. C., H. V. Westerhoff., dan F. C. Boogerd. 2013. Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. *Journal Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77(4): 628–695.

Herigstad, B., M. Hamilton., J. Heersink. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 44: 121-129.

Ibrahim, S., M. Y. Shukor., M. A. Syed., N. A. Rahman., K. A. Khalil., A. Khalid dan S. A. Ahmad. 2014. Bacterial degradation of caffeine. *Asian Journal of Plant Biology*. 2(1): 24-53.

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.

Islam, M. S., A. Aryasomayajula., dan P. R. Selvaganapathy. 2017. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*. 83: 2-27.

Iswanto, T., M. Shovitri., A. Altway., T. Widjaja., D.I. Kusumawati., P. Lisdiyanti. 2019. Isolation and identification of caffeine-degrading bacteria from soil, coffee pulp waste and excreted coffee bean in Luwak feces. *Biodiversitas*. 20 (6) : 1580-1587.

Khondker, A., A. Dhaliwal., R. J. Alsop., J. Tang., M. Backholm., A. C. Shi., dan M. C. Rheinstadter. 2017. Partitioning of caffeine in lipid bilayers reduces membrane fluidity and increases membrane thickness. *Journal Physical Chemistry Chemical Physics*: 1-15.

Madyastha, K.M. dan G.R. Sridhar. 1998. A novel pathways for the metabolism of caffeine by a mixed culture consortium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 249: 178-181.

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.

Manns, J. M. 2011. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (sds-page) of proteins. *Current Protocols in Microbiology*: A.3M.1-A.3M.13.

Merchant, S.S dan J. D. Helmann. 2012. Elemental economy: microbial strategies

for optimizing growth in the face of nutrient limitation. *Advances In Microbial Physiology*. 60 : 91-210.

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

Mohanty, S.K., C.L. Yu., S. Dash., T.M. Louie., Gakhar., dan M. Subramanian. 2012. Delineation of the caffeine C-8 oxidation pathway in *Pseudomonas* sp. strain CBB1 via characterization of new trimethyluric acid monooxygenase and genes involved in trimethyluric acid metabolism. *Journal Bacteriology*. 194(15): 3872-3882.

Roy, S., dan V. Kumar. 2014. A practical approach on SDS PAGE for separation of protein. *International Journal of Science and Research*. 3(8): 955-960.

Snyder, J. W., dan R. M. Atlas. 2006. *Handbook of Media for Clinical Microbiology*. Second Edition. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group.

Starr, C., C. A. Evers., dan L. Starr. 2013. *Biology Today and Tomorrow with Physiology. Fourth Edition*. USA: Cengage Learning.

Subagiyo., S. Margino dan Triyanto. 2015. Pengaruh penambahan berbagai jenis sumber karbon, nitrogen dan fosfor pada medium *deMan, Rogosa and Sharpe* (MRS) terhadap pertumbuhan bakteri asam laktat terpilih yang diisolasi dari intestinum udang peneaid. *Jurnal Kelautan Tropis*. 18 (3) : 127-132.

Sumitha, J. dan Sivakumar, T. 2015. Optimisation of medium and its components for efficient caffeine degradation by *Brevibacterium*. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*. Vol. 4(8): 29-37.

Summers, R. M., J. L. Seffernick., E.M. Quandt., C. L. Yu., J. E. Barrick., dan M.



- V. Subramanian. 2013. Caffeine junkie: an unprecedented glutathione s-transferase dependent oxygenase required for caffeine degradation by *Pseudomonas putida* CBB5. *Journal of Bacteriology*. 195(17): 3933-3939.
- Summers, R. M., S. K. Mohanty., S. Gopiahetty., dan . Subramanian. 2015. Genetic characterization of caffeine degradation by bacteria and its potential applications. *Microbial Biotechnology*. 8(3): 1-10.
- Summers, R. M., T. M. Louie., C. L. Yu., dan M. Subramanian. 2011. Characterization of a broad-specificity non-haem iron N-demethylase from *Pseudomonas putida* CBB5 capable of utilizing several purine alkaloids as sole carbon and nitrogen source. *Journal Microbiology*. 157: 583-592.
- Temple, J. L., C. Bernand., S. E. Lipshultz., J. D. Czachor., J.A. Westphal., dan M. A. Mestre. 2017. The Safety of ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Frontiers in Psychiatry*. 8(80).
- Wijayati, N., C. Astutiningsih., dan S. Mulyati. 2014. Transformasi  $\alpha$ -Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Jurnal Biosaintifika*. 6 (1): 24-28.
- Win, Y.Y., M. Singh., M.B. Sadiq, dan A.K.Anal. 2019. Isolation and identification of caffeine-degrading bacteria from coffee plantation area. *Food Biotechnology*. 33(2): 109-124
- Yeboah, F. A dan S. Y Oppong. 2013. Caffeine : The wonder compound chemistry and properties. *Research Signpost*. (2): 27-37.
- Yu, C.L., R.Summers., Y. Kale., S. Gopishetty., dan M. Subramanian. 2009. Two distinct pathways for metabolism of theophylline and caffeine are coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5. *Journal of Bacteriology*. 191: 4624-4632.
- Zakir, Z dan M. Hassan. 2013. Caffeine (1, 3, 7-Trimethylxanthine): The good and the bad: a review. *Journal of Public Health and Biological Sciences*. 2(4): 313-323.

## LAMPIRAN

## 3.1 Komposisi Pembuatan Media Perlakuan

No	Media	Nama bahan	Komposisi	Keterangan
1.	M9	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 gram	
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 gram	
		NaCl	0,5 gram	
		MgSO <sub>4</sub>	0,25 gram	
		NH <sub>4</sub> Cl	1 gram	
		Akuades	1000 ml	
2.	Glukosa	Glukosa	2,5 gram	0,25 g/L
		M9	1000 ml	
3.	Kafein	Kafein	2,5 gram	0,25 g/L
		M9	1000 ml	
4.	Glukosa dan amonium sulfat	Amonium sulfat	2,5 gram	0,25 g/L
		Glukosa	2,5 gram	
		M9	1000 ml	
5.	Kafein dan glukosa	Kafein	2,5 gram	0,25 g/L
		Glukosa	2,5 gram	
		M9	1000 ml	
6.	Glukosa dan amonium sulfat	Kafein	2,5 gram	0,25 g/L
		Amonium sulfat	2,5 gram	
		M9	1000 ml	
7.	Kafein (padat)	Kafein	0,25 gram	0,25 g/L
		Agar	15 gram	
		M9	1000 ml	

## 3.2 Komposisi Larutan

No	Larutan	Bahan	Komposisi	Keterangan
1.	<i>Buffer</i> MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	203,3 gram	1M
		ddH <sub>2</sub> O	1000 ml	
2.	<i>Buffer</i> Tris-HCl	TrisBase	121,1 gram	pH 8,0
		HCl	40,45 gram	
		ddH <sub>2</sub> O	955,960 ml	
3.	Garam fisiologis	NaCl	2,55 gram	0,85%
		Akuades	1000 ml	

### 3.3 Seri Pengenceran Kurva Standar Pertumbuhan Sel Bakteri

Perbandingan	Volume biakan	Volume akuades
1:9	400 $\mu$ l	3600 $\mu$ l
2:8	800 $\mu$ l	3200 $\mu$ l
4:6	1600 $\mu$ l	2400 $\mu$ l
6:4	2400 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
8:2	3200 $\mu$ l	800 $\mu$ l
10:0	4000 $\mu$ l	0 $\mu$ l

### 3.4 Seri Pengenceran Kurva Standar Kafein

Konsentrasi (mM)	Volume biakan	Volume akuades
0,02	300 $\mu$ l	2700 $\mu$ l
0,04	600 $\mu$ l	2400 $\mu$ l
0,08	1800 $\mu$ l	1800 $\mu$ l
0,10	1500 $\mu$ l	1500 $\mu$ l
0,12	1800 $\mu$ l	1200 $\mu$ l
0,16	2400 $\mu$ l	600 $\mu$ l

### 3.5 Pembuatan Kurva Standar Kadar Protein

No.	Konsentrasi	Bovine serum albumin (BSA)	H <sub>2</sub> O	Reagent Bradford
1.	0 $\mu$ g	0 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
2.	5 $\mu$ g	5 $\mu$ l	45 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
3.	10 $\mu$ g	10 $\mu$ l	40 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
4.	15 $\mu$ g	15 $\mu$ l	35 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
5.	20 $\mu$ g	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
6.	25 $\mu$ g	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
7.	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	0 $\mu$ l	1000 $\mu$ l

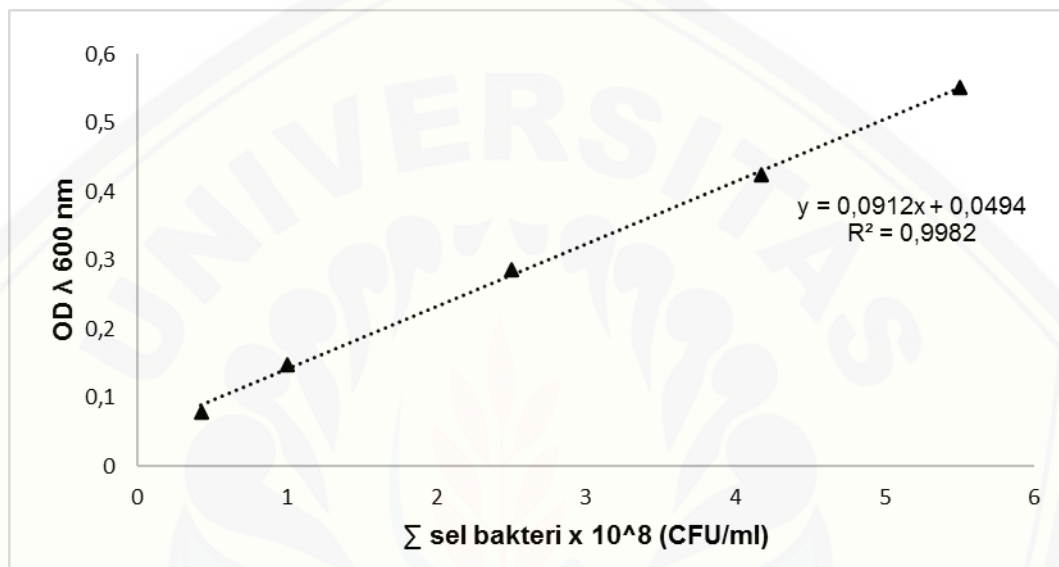
### 3.6 Pembuatan Gel SDS-PAGE

No.	Jenis gel	Bahan	Komposisi
1.	Gel separating	Gel akrilamid	4,15 ml
		Gel <i>buffer</i>	2,5 ml
		ddH <sub>2</sub> O	3196 $\mu$ l
		SDS 10%	104 $\mu$ l
		TEMED	5 $\mu$ l
		APS	50 $\mu$ l
2.	Gel Stacking	Gel akrilamid	450 $\mu$ l
		Gel <i>buffer</i>	750 $\mu$ l
		ddH <sub>2</sub> O	3196 $\mu$ l
		SDS 10%	112,5 $\mu$ l
		TEMED	5 $\mu$ l
		APS	10 $\mu$ l

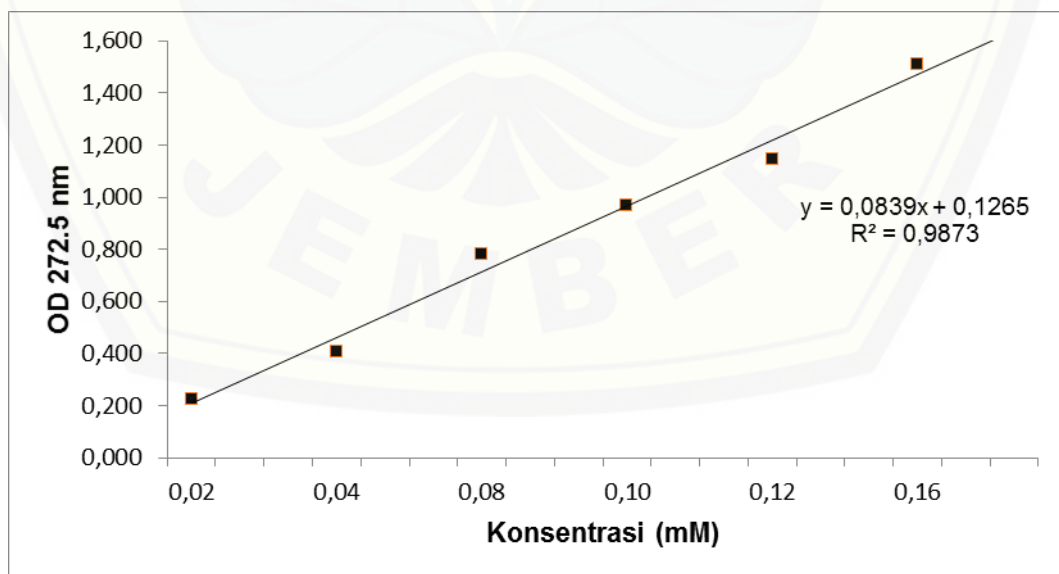
### 3.7 Pembuatan *Buffer* Sampel

No.	Bahan	Komposisi	Keterangan
1.	Sampel protein	40 $\mu$ l	Perbandingan 1:5
2.	<i>Loading buffer</i>	10 $\mu$ l	Perbandingan 1:5
3.	B-Mercaptoetanol	2,5 $\mu$ l	5%

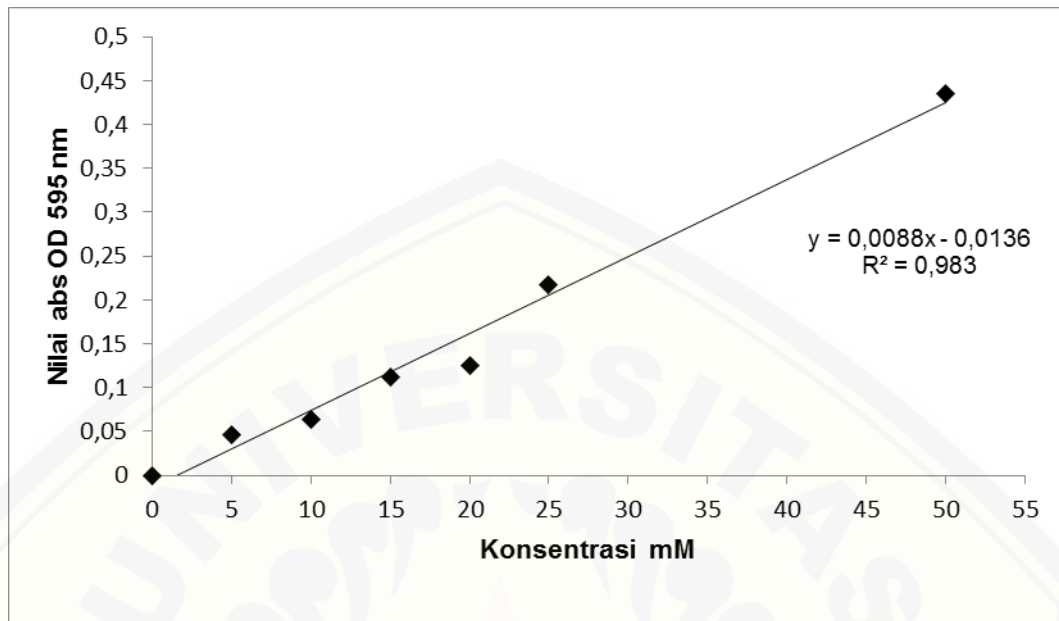
### 3.8 Kurva Standar Pertumbuhan Sel Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47



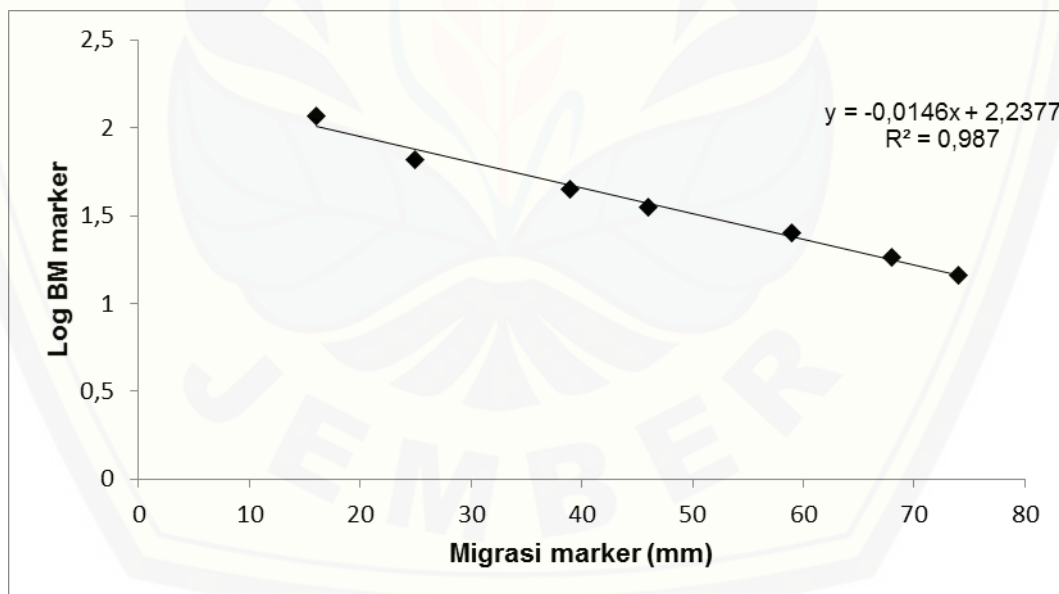
### 3.9 Kurva Standar Kafein Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47



### 3.10 Kurva Standar Kadar Protein



### 3.11 Kurva Standar Berat Molekul Marker



**4.1 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media M9 + glukosa 0,25 g/L**

Waktu Inkubasi (Jam)	Nilai Absorbansi (OD 600 nm)	$\Sigma$ Sel $\times 10^8$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
0	0,024	0,00	0,005
6	0,070	0,23	0,010
12	0,249	2,19	0,016
18	0,773	7,93	0,122
24	0,977	10,17	0,034
30	1,134	11,89	0,149
36	1,226	12,90	0,210
42	1,246	13,12	0,203
48	1,282	13,51	0,131
54	1,217	12,80	0,065
60	1,200	12,61	0,054
66	1,187	12,48	0,053
72	1,218	12,81	0,080

**4.2 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media M9 + kafein 0,25 g/L**

Waktu Inkubasi (Jam)	Nilai Absorbansi (OD 600 nm)	$\Sigma$ Sel $\times 10^8$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
0	0,018	0,00	0,003
6	0,032	0,00	0,001
12	0,045	0,00	0,003
18	0,054	0,04	0,002
24	0,075	0,28	0,011
30	0,107	0,63	0,020
36	0,154	1,14	0,010
42	0,211	1,78	0,012
48	0,314	2,90	0,029
54	0,477	4,69	0,050
60	0,683	6,95	0,043
66	0,796	8,19	0,018
72	0,788	8,10	0,023

**4.3 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media M9 + kafein 0,25 g/L dan glukosa 0,25 g/L**

Waktu Inkubasi (Jam)	Nilai Absorbansi (OD 600 nm)	$\Sigma$ Sel $\times 10^8$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
0	0,017	0,00	0,002
6	0,035	0,00	0,009
12	0,058	0,09	0,015
18	0,093	0,48	0,037
24	0,188	1,51	0,078
30	0,367	3,48	0,172
36	0,606	6,11	0,322
42	0,852	8,79	0,448
48	0,999	10,41	0,427
54	1,117	11,70	0,298
60	1,246	13,12	0,152
66	1,310	13,82	0,137
72	1,399	14,79	0,183

**4.4 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media M9 + kafein 0,25 g/L dan amonium sulfat 0,25 g/L**

Waktu Inkubasi (Jam)	Nilai Absorbansi (OD 600 nm)	$\Sigma$ Sel $\times 10^8$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
0	0,019	0,00	0,004
6	0,027	0,00	0,005
12	0,043	0,00	0,002
18	0,048	0,00	0,006
24	0,075	0,28	0,005
30	0,102	0,58	0,005
36	0,140	0,99	0,008
42	0,203	1,68	0,015
48	0,259	2,30	0,022
54	0,376	3,58	0,042
60	0,503	4,87	0,066
66	0,657	6,67	0,042
72	0,749	7,67	0,038

**4.5 Tabel Hasil Pertumbuhan Sel Bakteri *Acinetobacter gernerii* KAFS 47 pada Media M9 + glukosa 0,25 g/L dan amonium sulfat 0,25 g/L**

Waktu Inkubasi (Jam)	Nilai Absorbansi (OD 600 nm)	$\Sigma$ Sel $\times 10^8$ (CFU/mL)	Standar Deviasi
0	0,019	0,00	0,014
6	0,075	0,28	0,004
12	0,248	2,17	0,021
18	0,611	6,16	0,127
24	0,724	7,39	0,123
30	0,848	8,75	0,110
36	0,945	9,82	0,086
42	1,119	11,73	0,087
48	1,265	13,33	0,071
54	1,145	12,01	0,078
60	1,115	11,68	0,091
66	1,086	11,37	0,075
72	1,109	11,62	0,061

**4.6 Hasil Uji SPSS *Pearson Correlation* Jumlah Sel Bakteri dan Degradasi Kafein pada Media M9 + kafein 0,25 g/L**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		jumlah sel	degradasi kafein
N		13	13
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	2.67	58.7692
	Std. Deviation	3.211	39.81657
Most Extreme Differences	Absolute	.224	.233
	Positive	.224	.161
	Negative	-.203	-.233
Kolmogorov-Smirnov Z		.809	.839
Asymp. Sig. (2-tailed)		.529	.482
a. Test distribution is Normal.			



**Correlations**

		jumlah sel	degradasi kafein
jumlah sel	Pearson Correlation	1	-.983**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	13	13
degradasi kafein	Pearson Correlation	-.983**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	13	13

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**4.7 Hasil Uji SPSS *Pearson Correlation* Jumlah Sel Bakteri dan Degradasi Kafein pada Media M9 + kafein 0,25 g/L dan glukosa 0,25 g/L**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		jumlah sel	degradasi kafein
N		13	13
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	6.47	49.6923
	Std. Deviation	5.828	39.50819
Most Extreme Differences	Absolute	.187	.196
	Positive	.187	.196
	Negative	-.134	-.178
Kolmogorov-Smirnov Z		.676	.705
Asymp. Sig. (2-tailed)		.751	.703
a. Test distribution is Normal.			

**Correlations**

		jumlah sel	degradasi kafein
jumlah sel	Pearson Correlation	1	-.991**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	13	13
degradasi kafein	Pearson Correlation	-.991**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	13	13

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

#### 4.8 Hasil Uji SPSS *Pearson Correlation* Jumlah Sel Bakteri dan Degradasi Kafein pada Media M9 + kafein 0,25 g/L dan amonium sulfat 0,25 g/L

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		jumlah sel	degradasi kafein
N		13	13
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	2.21	64.3846
	Std. Deviation	2.691	36.85227
Most Extreme Differences	Absolute	.213	.222
	Positive	.213	.167
	Negative	-.206	-.222
Kolmogorov-Smirnov Z		.769	.801
Asymp. Sig. (2-tailed)		.596	.543
a. Test distribution is Normal.			

**Correlations**

		jumlah sel	degradasi kafein
jumlah sel	Pearson Correlation	1	-.992**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	13	13
degradasi kafein	Pearson Correlation	-.992**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	13	13

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).