



**KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI KAFEIN ISOLAT KAJ36
INDIGENOUS ASAL LIMBAH KULIT KOPI**

SKRIPSI

Oleh

**Reza Billa Afifuddin
NIM 121810401082**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI KAFEIN ISOLAT KAJ36
INDIGENOUS ASAL LIMBAH KULIT KOPI**

SKRIPSI

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

Oleh

**Reza Billa Afifuddin
NIM 121810401082**

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

2016

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua tercinta, Ibunda Nur Hayati dan Ayahanda Abdul Hamid atas dukungan, kasih sayang, nasihat, motivasi dan doa yang terus terpanjat dalam setiap sujudnya;
2. saudara saya Melfin Zainul Asyiqin, atas segala doa, kasih sayang, dukungan dan motivasinya;
3. guru-guru dan dosen-dosen sejak sekolah dasar hingga perguruan tinggi, atas bimbingannya;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
5. Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Ilmu adalah Nur (cahaya), hati juga Nur, dan Nur adalah salah satu nama-nama Allah SWT. Nur Ilahi, hati, dan ilmu berhubung rapat, sucinya hati menjadi tempat untuk menerima pancaran Nur Ilahi.”

(Imam Ibnu Atha'illah*)

“Ilmu menjadi bendera yang menunjukkan kepada jalan menuju tujuan dan menjadi benteng yang menyelamatkan dari segala kesesatan”

(Syekh Al-Zarnuji**)



*)Imam Ibnu Atha'illah. Syarah Al-Hikam.

**)Syekh Al-Zarnuji. 2006. Syarah Ta'limul Muta'allim. - : Al Haromain Jaya Raya.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Reza Billa Afifuddin

NIM : 121810401082

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Kafein Isolat KAJ36 Indigenous Asal Limbah Kulit Kopi” 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 Sattya Arimurti, S.P., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

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

Jember, 29 November 2016
Yang menyatakan,

Reza Billa Afifuddin
NIM 121810401082

SKRIPSI

**KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI KAFEIN ISOLAT KAJ36
INDIGENOUS ASAL LIMBAH KULIT KOPI**

Oleh

Reza Billa Afifuddin
NIM 121810401082

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Siswanto, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Kafein Isolat KAJ36 Indigenous Asal Limbah Kulit Kopi” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.
NIP 196805031994011001

Anggota I,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si.
NIP 197509132000032001

Sekretaris,

Drs. Siswanto, M.Si.
NIP 196012161993021001

Anggota II,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP 19600816119890210001

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D.
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

“Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Kafein Isolat KAJ36 Indigenous Asal Limbah Kulit Kopi”; Reza Billa Afifuddin; 121810401082; 2016; 41 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) merupakan senyawa alkaloid purin dan termasuk dalam kelompok derivat methylxanthine. Kafein mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman, bersifat antimikrob, juga dapat meracuni hewan yang memakan makanan yang mengandung kafein dengan konsentrasi tertentu. Konsentrasi kafein yang tinggi akan menghambat pertumbuhan mikroba saprofit dan juga akan mengakibatkan gangguan pada keseimbangan ekologi karena sifatnya yang toksik (Dash dan Gummadi, 2010). Proses degradasi kafein tidak hanya diperlukan untuk menanggulangi permasalahan lingkungan, namun juga dapat dimanfaatkan dalam menghasilkan produk yang bernilai komersial dari limbah yang mengandung senyawa kafein (Dash dan Gummadi, 2010). Isolat KAJ36 merupakan bakteri pendegradasi kafein yang mampu memanfaatkan kafein pada media minimal (M9) yang mengandung kafein 0,1% sebagai sumber karbon dan nitrogen. Sehingga bakteri ini memiliki potensi yang bagus untuk menurunkan konsentrasi kafein, dan dapat dijadikan kandidat sebagai agen biologis yang dapat diaplikasikan dalam penurunan komposisi kafein yang bersifat toksik bagi makhluk hidup lain.

Identifikasi bakteri yang memiliki potensi dalam mendegradasi kafein menjadi penting dilakukan, untuk perkembangan teknik biodegradasi limbah yang mengandung kafein menjadi produk yang menguntungkan, dan untuk mengetahui potensi lain dari spesies bakteri yang ditemukan (Fan *et al.*, 2011). Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan karakter fenotip yang berupa morfologi, aktivitas fisiologis dan biokimia, namun banyak kelemahan dari identifikasi fenotipik dan prosesnya yang cukup lama. Identifikasi juga dapat ditentukan berdasarkan materi genetik yang dimiliki bakteri tersebut, salah

satunya adalah 16S rRNA (Olsen dan Woese 1993). Acuan kronometer menggunakan 16S rRNA memiliki tingkat keragaman intraspesifik dan dimiliki oleh mayoritas organisme, bank data sekuen DNA pengkode 16S rRNA telah didokumentasi dan cukup lengkap sehingga sangat efektif untuk dijadikan pedoman identifikasi (Clayton *et al.*, 1995; Woese *et al.*, 1980).

Penelitian pada bakteri isolat KAJ36 menunjukkan Aktivitas degradasi kafein cukup tinggi dengan presentase sebesar 86,74 % pada jam ke-168 (7 hari), dengan jumlah sisa kafein yang didapatkan berkisar $\pm 1,220$ g/L kafein dan populasi sel mencapai $4397,56 \times 10^6$ sel/mL pada jam ke-168. Identitas bakteri isolat KAJ36 dari hasil perbandingan karakter morfologi, biokimia, dan analisis sekuen DNA pengkode 16S rRNA menunjukkan bahwa bakteri memiliki kedekatan dengan bakteri *Pseudomonas monteilii* CIP 104883, dengan presentase *Max iIdentity* sekuen DNA sebesar 99% pada BLAST dan nilai similaritas yang mencapai 99,93% pada MEGA software.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Kafein Isolat KAJ36 Indigenous asal Limbah Kulit Kopi” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing akademik yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, saran serta motivasi dalam penyusunan skripsi ini;
2. Drs. Siswanto, M.Si. selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan, saran dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini;
3. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si. dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran membangun dalam penyusunan skripsi ini;
4. Sattya Arimurti, S.P., M.Si. selaku pemilik proyek, terimakasih telah mengizinkan penulis bergabung dalam proyek penelitian. Terimakasih pula telah memberi saya banyak mengajari ilmu baru serta motivasi dan dukungan yang sangat membangun dalam pengerjaan skripsi ini;
5. Ibu Endang, Ibu Arin, Ibu Kamila, Pak Tris, Mas Imam serta satpam Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah membantu dalam proses penelitian;
6. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu selama masa perkuliahan;

7. kedua orang tua saya tercinta AbiAbdul Hamid, mama Nur Hayati yang tulus memberikan kasih sayang, cinta, nasihat, doa, motivasi serta dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini;
8. saudara saya kakak Melfin Zainul Asyiqin yang tulus memberikan kasih sayang, motivasi, doa dan dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini;
9. sahabatku Maulana Jauharil Habib, S.Si., Febri Ramadhan Afaik, Rekanda Isnaqoima Septula, Fita Aprilia, Eny Rukmawati, Nia Alfafia, Dwi Erlinda yang telah memberikan kasih sayang, doa, bantuan dan dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini;
10. rekan seperjuangan Mbak Niar, Mas Syafiq, Mbak Putri, Mbak Sussy, Mbak Eriani, Mbak Hilma, Mbak Tutus, Mbak Anis, Mbak Ruroh, Mbak Atika, Mas Amin, Mbak Dewi, Vivta, Icil, Yatik Cihuy, Ellak, Ifa, Uyung, Putri sultan, Lisa, Neny, Putri endut, Antin, Iim, dan Qurrotul yang telah memberikan dukungan, motivasi serta bantuannya selama ini;
11. keluarga besar PP. Miftahul Ulum Kaliwates Jember dan teman-teman pondok, terima kasih atas dukungan dan doa hingga terselesaikannya skripsi ini;
12. teman-teman Biologi 2012 yang sangat berkesan dan tergabung dalam “Biozva”, terimakasih atas keceriaan, motivasi dan dukungannya selama ini;
13. 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, 29 November 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Kafein.....	4
2.2 Mikroba Pendegradasi Kafein.....	5
2.3 Identifikasi Molekuler menggunakan sekuen DNA	
pengkode 16S rRNA	8
2.4 Penentuan Urutan Basa Nukleotida.....	9
BAB 3. METODE PENELITIAN	10
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	10
3.2 Alat dan Bahan.....	10
3.3 Prosedur Penelitian.....	10

3.3.1	Pembuatan Stok Gliserol Isolat KAJ36	11
3.3.2	Pembuatan Kurva Standart Kafein.....	11
3.3.3	Pembuatan Kurva Standart Pertumbuhan Bakteri	11
3.3.4	Penentuan Kurva Pertumbuhan.....	12
3.3.5	Uji Degradasi Kafein	12
3.3.6	Pengamatan Morfologi Bakteri.....	12
3.3.7	Uji Fisiologis-Biokimia Bakteri.....	13
3.3.8	Ekstraksi DNA Whole Genome	16
3.3.9	PCR DNA Pengkode 16S rRNA.....	17
3.3.10	Analisis Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		19
4.1 Karakter Degradasi Kafein.....		19
4.1.1	Kurva Pertumbuhan	19
4.1.2	Aktivitas Degradasi Kafein.....	20
4.2 Karakterisasi Morfologi dan Biokimia		21
4.3 Karakterisasi Molekuler		22
4.3.1	Amplifikasi Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA	22
4.3.2	Analisis Urutan Nukleotida DNA Pengkode 16S rRNA.....	24
BAB 5. PENUTUP.....		30
5.1 Kesimpulan.....		30
5.2 Saran		30
DAFTAR PUSTAKA		31
LAMPIRAN.....		36

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.2 Perbandingan karakter morfologi dan biokimia bakteri isolat KAJ36 dengan bakteri lain	29



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur kimia kafein.....	4
2.2 Degradasi kafein pada <i>Pseudomonas putida</i>	6
2.3 Degradasi kafein oleh fungi, bakteri, <i>Rhodococcus</i> sp., dan <i>Klebsiella</i> sp.	7
4.1 Kurva pertumbuhan bakteri isolat KAJ36.....	19
4.2 Aktivitas degradasi kafein bakteri isolat KAJ36.....	20
4.3 Morfologi koloni dan sel isolat KAJ36.....	22
4.4 Visualisasi hasil isolasi DNA whole genom bakteri isolat KAJ36.....	23
4.5 Posisi primer 27 F dan 1495 R dalam proses amplifikasi.....	23
4.6 Visualisasi hasil amplifikasi DNA pengkode 16S rRNA bakteri isolat KAJ36.....	24
4.7 Daftar nama spesies bakteri yang memiliki kemiripan dengan bakteri isolat KAJ36 berdasarkan urutan basa nukleotida DNA pengkode 16S rRNA pada <i>Gen Bank Database</i>	25
4.8 Pohon filogeni bakteri isolat KAJ36 dengan bakteri Type Strain.....	26
4.9 Perbandingan urutan basa nukleotida bakteri isolat KAJ36, <i>P. monteilii</i> CIP 104883, <i>P. monteilii</i> NBRC 103158, dan <i>P. plecoglossicida</i> NBRC 103162 yang terdapat pada Type Strain.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Alur Penelitian	36
B. Komposisi Bahan	37
B.1 Komposisi Bahan Untuk Pembuatan Media.....	37
B.2 Komposisi Larutan	40
C. Karakter Uji Fisiologi-Biokimia Bakteri Isolat KAJ36	40
D. Kurva Standart Pertumbuhan Bakteri Isolat KAJ36.....	41
E. Hasil Perhitungan Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	41
F. Kurva Standart Kafein	41

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) merupakan senyawa alkaloid purin dan termasuk dalam kelompok derivat methylxanthine. Kafein dimanfaatkan dalam bidang *pharmaceutical* yang memiliki efek fisiologis pada konsentrasi tertentu, seperti menjadi inhibitor pada penghasilan fosfodiester dalam intraseluler cAMP, tingkat kalsium dalam intraseluler sel, dan efek antagonis pada reseptor adenosin (Indermuhle *et al.*, 2013). Kafein menjadi produk konsumsi yang utama yang dimanfaatkan dan dikembangkan oleh manusia, yang rata-rata tiap individu mengkonsumsi 80-400 mg kafein per hari. Sehingga banyak industri yang memproduksi kafein dari beberapa jenis tumbuhan berbeda, dan pastinya terdapat limbah hasil pengolahan atau pembuatan ekstrak kafein tersebut, baik berupa limbah organik padat, limbah kimia, maupun limbah cair yang dibuang di perairan (Gokulakrishnan *et al.*, 2005). Industri pengolahan kopi dan teh memiliki produk samping berupa limbah dengan konsentrasi kafein yang tinggi yaitu $\pm 3-10$ g/L yang akan mempengaruhi *biological oxygen demand* (BOD) dan *chemical oxygen demand* (COD) pada sebagian besar perairan (Bressani, 1987).

Limbah yang mengandung kafein dapat mengancam kelangsungan hidup berbagai organisme khususnya manusia. Oleh karena itu, limbah tersebut dapat diproses menjadi produk yang lebih bermanfaat dan bernilai komersial dalam bidang bioteknologi, baik berupa pupuk kompos, pakan ternak, substrat pertumbuhan jamur konsumsi, maupun bioetanol (Padmapriya *et al.*, 2013). Proses degradasi kafein tidak hanya diperlukan untuk menanggulangi permasalahan lingkungan, namun juga dapat dimanfaatkan dalam menghasilkan produk yang bernilai komersial dari limbah yang mengandung senyawa kafein (Dash dan Gummadi, 2010).

Isolat KAJ36 merupakan bakteri pendegradasi kafein yang mampu memanfaatkan kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen pada media minimal (M9) yang mengandung kafein 0,1%. Isolat bakteri ini telah diisolasi dari limbah

kulit kopi Arabika yang diolah secara basah dari Perkebunan Perseroan Terbatas Nusantara (PTPN) XII Jampit, Bondowoso koleksi Arimurti (Laboratorium Mikrobiologi, FMIPA, Universitas Jember). Sehingga bakteri ini memiliki potensi yang bagus untuk menurunkan konsentrasi kafein, dan dapat dijadikan kandidat sebagai agen biologis yang dapat diaplikasikan dalam penurunan komposisi kafein yang bersifat toksik bagi makhluk hidup lain.

Identifikasi bakteri yang memiliki potensi dalam mendegradasi kafein menjadi penting dilakukan, untuk perkembangan teknik biodegradasi limbah yang mengandung kafein, dan untuk mengetahui potensi lain dari spesies bakteri yang ditemukan (Fan *et al.*, 2011). Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan karakter fenotip yang berupa morfologi, aktivitas fisiologis dan biokimia, namun banyak kelemahan dari identifikasi fenotipik dan prosesnya yang cukup lama. Identifikasi juga dapat ditentukan berdasarkan materi genetik yang dimiliki bakteri tersebut, salah satunya adalah 16S rRNA (Olsen dan Woese 1993). Acuan kronometer menggunakan 16S rRNA memiliki tingkat keragaman intraspesifik dan dimiliki oleh mayoritas organisme, bank data sekuen DNA pengkode 16S rRNA telah didokumentasi dan cukup lengkap sehingga sangat efektif untuk dijadikan pedoman identifikasi (Clayton *et al.*, 1995; Woese *et al.*, 1980).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas bakteri isolat KAJ36 dalam mendegradasi kafein?
2. Bagaimana hasil identifikasi bakteri isolat KAJ36 berdasarkan karakter morfologi dan biokimia, serta molekulernya berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA?

1.3 Batasan Masalah

1. Aktivitas degradasi kafein ditentukan dengan mengukur penurunan konsentrasi kafein pada absorbansi 273 nm.

2. Karakterisasi morfologi koloni berdasarkan penampakan koloni, mikroskopis berdasarkan bentuk sel dan pengecatan Gram, serta fisiologis-biokimiawi menggunakan berbagai uji biokimia bakteri.
3. Karakterisasi molekuler berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA.

1.4 Tujuan

1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas degradasi kafein bakteri isolat KAJ36 asal limbah kulit kopi.
2. Mengidentifikasi bakteri isolat KAJ36 asal limbah kulit kopi berdasarkan karakter morfologi dan molekuler sekuen DNA pengkode 16S rRNA serta mengetahui hubungan filogenetiknya terhadap bakteri yang telah diidentifikasi pada *Gene Bank*.

1.5 Manfaat Penelitian

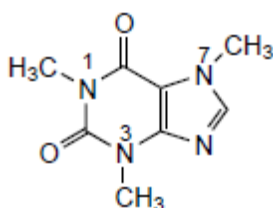
1. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang aktivitas bakteri isolat KAJ36 asal limbah kulit kopi dalam mendegradasi kafein.
2. Mengetahui identitas bakteri isolat KAJ36 asal limbah kulit kopi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kafein

Kafein ($C_8H_{10}N_4O_2$) merupakan senyawa alkaloid purin dan termasuk dalam kelompok derivat methylxanthine (Indermuhle *et al.*, 2013). Kafein memiliki gugus karbon dan gugus nitrogen yang berikatan dalam struktur heterosiklik (Zrenner *et al.*, 2006). Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) terdapat melimpah di alam dan diproduksi oleh beberapa jenis tanaman seperti halnya kopi dan teh yang banyak dimanfaatkan untuk keperluan komersial, residu yang dihasilkan dari proses produksi tersebut juga melimpah yang meliputi tannin, polifenol, dan kafein (Dash dan Gummadi, 2010). Kafein ditemukan terdapat dalam 60 jenis tumbuhan yang meliputi Kopi, Teh, *Theobroma cacao*, Maté (*Ilex paraguariensis*), Guarana dan kacang kola (Spiller, 1998).

Kafein mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman, bersifat antimikrob, juga dapat meracuni hewan yang memakan makanan yang mengandung kafein dengan konsentrasi tertentu. Konsentrasi kafein yang tinggi akan menghambat pertumbuhan mikroba saprofit dan juga akan megakibatkan gangguan pada keseimbangan ekologi karena sifatnya yang toksik (Dash dan Gummadi, 2010). Kafein dapat melisis sel mikrob, kecuali bagi mikroba yang toleran terhadap kafein (Dash dan Gummadi, 2008). Pada konsentrasi 0,1%, kafein dapat menghambat sintesis protein pada bakteri dan yeast (Mazzafera, 2002). Industri pengolahan kopi dan teh mampu menghasilkan limbah dengan konsentrasi kafein yang tinggi yaitu $\pm 3-10$ g/L yang akan mempengaruhi *biological oxygen demand* (BOD) dan *chemical oxygen demand* (COD) pada sebagian besar perairan (Bressani, 1987).



Gambar 2.1 Struktur kimia kafein (Sumber: Ashihara dan Crozier, 2001).

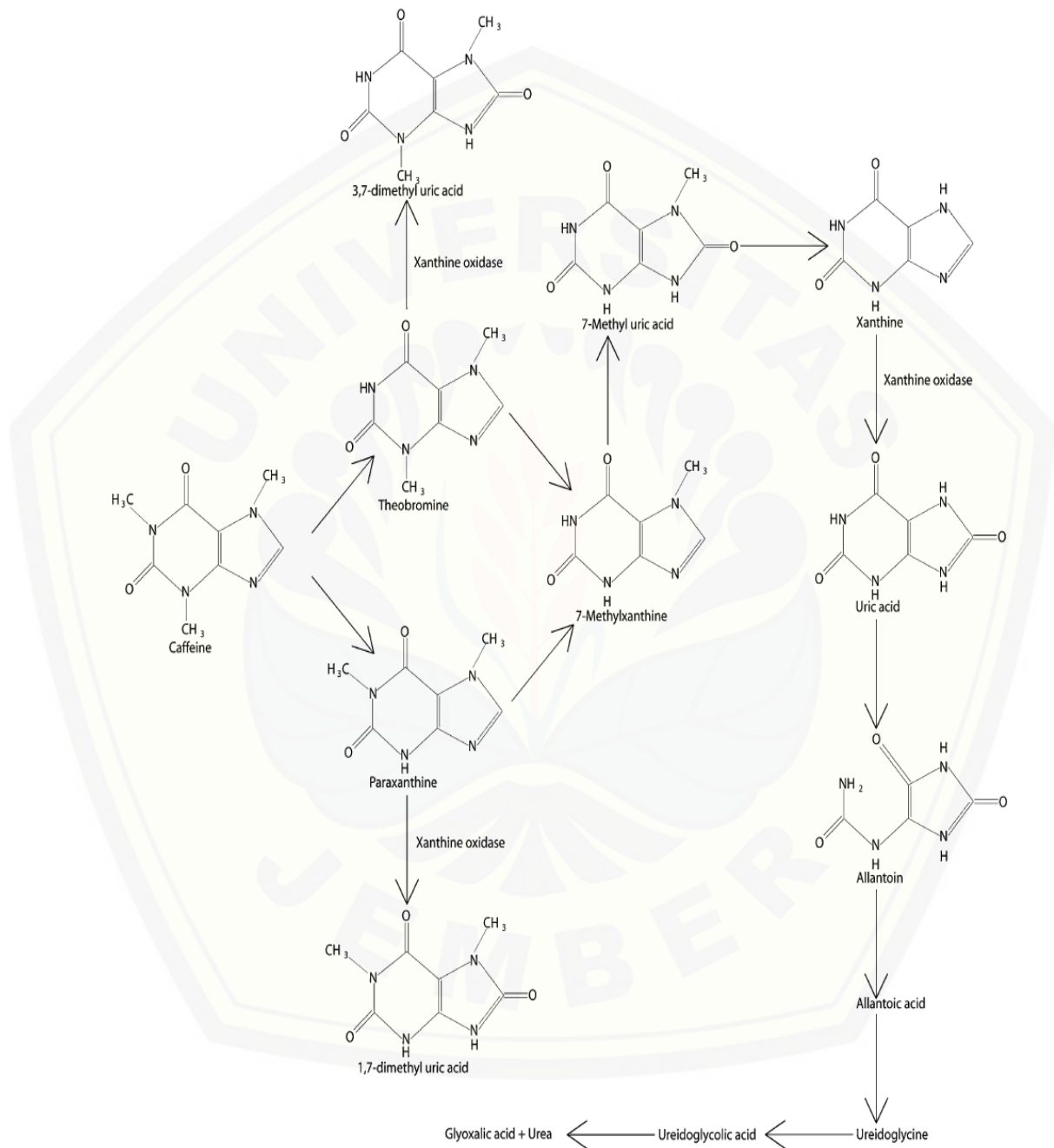
2.2 Mikroba Pendegradasi Kafein

Beberapa mikroba seperti bakteri dan fungi mampu memanfaatkan kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen sehingga mampu menurunkan konsentrasi kafein (Farida *et al.*, 2013). Terdapat beberapa mikrob pendegradasi kafein yakni meliputi *Pseudomonas putida* (Yamaoka-Yano dan Mazzafera, 1999), *Penicillium verrucosum* (Roussos *et al.*, 1994), *Rhizopus delemar* (Tagliari *et al.*, 2003), Genus bakteri *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, dan *Klebsiella* (Dash dan Gummadi, 2006). Bakteri mampu tumbuh dengan cepat dan tidak memerlukan ruang lingkup pertumbuhan yang luas, bakteri juga mampu tumbuh pada kondisi suhu dan pH yang ekstrem dibandingkan mikroba lain (Sadhu dan Maiti, 2013). Mikrob dari golongan bakteri lebih bagus digunakan dalam proses dekafeinasi karena mudahnya untuk dimanipulasi secara genetik dibandingkan fungi (Dash dan Gummadi, 2010).

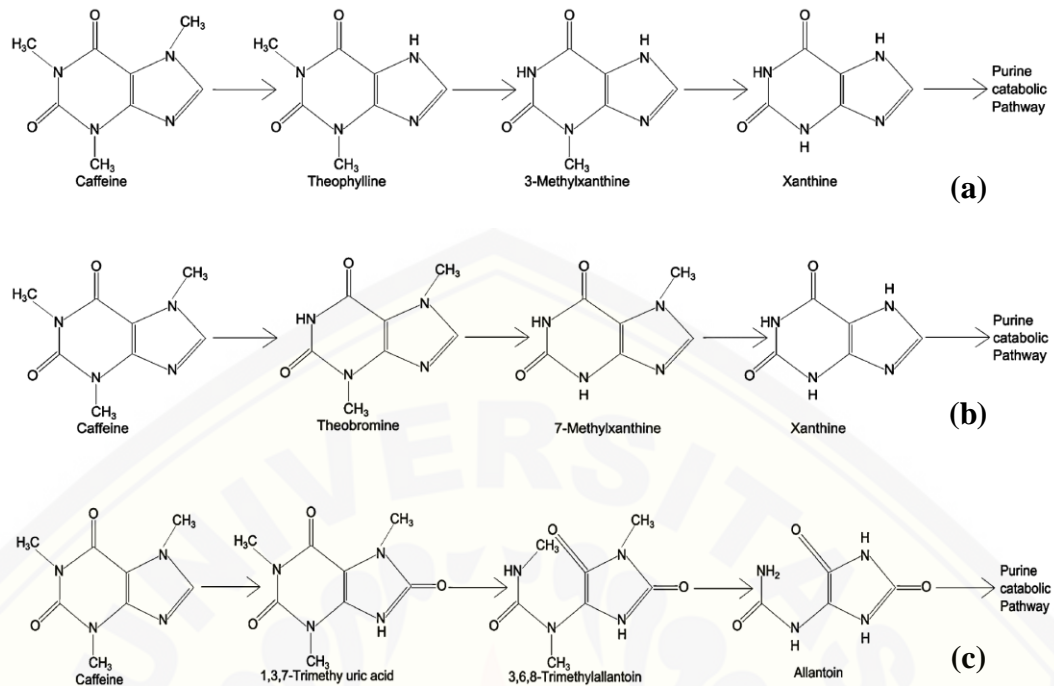
Katabolisme kafein oleh bakteri terjadi melalui dua proses yakni oksidasi dan demetilasi dengan bantuan enzim pendegradasi kafein meliputi N-demethylase, kafein oksidase, dan xanthine oksidase (Dash dan Gummadi, 2006). Pada proses demetilasi kafein diubah menjadi theobromine dan paraxanthine dengan bantuan enzim demethylases oleh *Pseudomonas* sp, sedangkan untuk oksidasi 1,3,7-trimethyluric dikonversi menjadi 3,6,8-trimethylurea oleh enzim kafein oksidase (Gummadi *et al.*, 2012). Senyawa xanthine dapat didegradasi menjadi produk akhir berupa CO₂ dan NH₃ melalui siklus katabolisme purin seperti siklus uric acid, allantoin, dan allantoinat dengan bantuan enzim xanthin oksidase (Ashihara dan Crozier, 2001).

Proses katabolisme atau degradasi kafein pada kelompok fungi merombak kafein menjadi theophylline yang memiliki kesamaan pada siklus degradasi kafein pada tanaman (Hakil *et al.*, 1998), namun pada bakteri umumnya kafein akan dirombak menjadi theobromine dan paraxanthine sebagai metabolisme awal oleh enzim N-demethylase (Asano *et al.*, 1993). Sedangkan untuk *Rhodococcus* sp. dan *Klebsiella* sp. kafein dioksidasi menjadi asam methyluric oleh enzim oksidase (Dash dan Gummadi, 2006). Degradasi kafein pada *Pseudomonas putida* telah dipublikasikan secara lengkap dari setiap langkah perombakan kafein yang

dibantu oleh enzim xanthine oksidase (Yamaoka-Yano dan Mazzafera, 1999), lihat Gambar 2.2 dan Gambar 2.3.



Gambar 2.2 Degradasi kafein pada *Pseudomonas putida* (Sumber : Gummadi *et al.*, 2012)



Gambar 2.3 a. Degradasi kafein oleh fungi; b. Degradasi kafein oleh bakteri; c. Degradasi kafein oleh bakteri *Rhodococcus* sp. dan *Klebsiella* sp. (Sumber : Gummadi *et al.*, 2012).

Aktivitas degradasi kafein tidak terhambat tanpa adanya sumber nitrogen tambahan pada medium pertumbuhan mikroba (Asano *et al.*, 1993). Namun keberadaan senyawa organik dan anorganik sebagai sumber nitrogen mampu menghambat aktivitas degradasi kafein (Hakil *et al.*, 1999).

Bakteri Isolat KAJ36 merupakan biakan bakteri koleksi Arimurti (Laboratorium Mikrobiologi, FMIPA, Universitas Jember). Isolat diisolasi dari limbah padat kulit kopi Arabika yang diolah secara basah dari Perkebunan Perseroan Terbatas Nusantara (PTPN) XII Jampit, Bondowoso. Bakteri ini mampu memanfaatkan kafein pada media minimal (M9) yang mengandung kafein 0,1% sebagai sumber karbon dan nitrogen.

Kafein digunakan sebagai sumber C dan N oleh *Pseudomonas putida* L., terbukti pada media kafein dengan konsentrasi 1 gr/L konsentrasi kafein menurun mencapai 20% pada 33 jam pertumbuhan konsentrasi kafein menjadi sangat sedikit (Yamaoka-Yano dan Mazzafera, 1999). Genus dari *Aspergillus* dan *Penicillium* mampu mendegradasi kafein mencapai 100 % yang ditumbuhkan

pada suhu 25 °C, namun aktivitas degradasi akan menurun 30 % apabila suhu pertumbuhan mencapai 30 °C (Roussos *et al.*, 1995).

2.3 Identifikasi Molekuler menggunakan sekuen DNA pengkode 16S rRNA

Proses identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan karakter fenotip yang berupa morfologi dan aktivitas fisiologis, dan juga dapat ditentukan berdasarkan materi genetik yang dimiliki bakteri tersebut. Ribosom bakteri (70S) terdiri dari 2 sub unit yang berbeda, sub unit kecil (30S) tersusun atas 16S rRNA (1542 basa nukleotida) dan 21 macam protein, sedangkan sub unit besar (50S) disusun oleh 23S rRNA (2904 basa nukleotida) dan 5S rRNA (120 basa nukleotida) dengan 34 macam protein (Barciszewska *et al.*, 2001). RNA ribosom menjadi fungsi yang sangat berguna bagi kelangsungan hidup organisasi seluler, dan memiliki presentase fungsional yang tinggi dan konstan, ukurannya juga sangat besar dengan variasi domain dan posisi. Keberadaan 16S rRNA dimiliki oleh semua organisme (*ubiquitous*), perbedaan sedikit saja pada posisi susunan nukleotida akan membedakan tingkat takson dan kekerabatan filogenetiknya. Berdasarkan ketiga jenis rRNA, 16S rRNA merupakan bagian yang sangat kecil kemungkinan berubah susunannya (konservatif) sehingga menjadi landasan menentukan kekerabatan evolusi, taksonomi, dan sebagai molekul kronometer (Woese, 1987).

Urutan basa 5S rRNA terlalu pendek untuk digunakan sebagai acuan analisis molekuler sehingga tidak ideal untuk digunakan dan membatasi informasi yang diperoleh, sedangkan struktur sekunder dan tersier 23S rRNA yang panjang dan rumit menjadikan sulitnya analisis menggunakan sekuen ini dan menjadikannya tidak praktis. 16S rRNA bukan merupakan gen fungsional yang menjadikannya molekul yang konservatif atau lambat berubah, urutan basa molekul 16S rRNA juga bersifat variatif yang digunakan untuk mencari keragaman dan galur-galur dalam satu spesies (Pangastuti, 2006; Suwanto, 1994).

Jika persentase keseragaman urutan basa nukleotida penyandi 16S rRNA pada individu kurang dari 97% maka dapat dikatakan bahwa individu tersebut merupakan spesies yang belum diidentifikasi sebelumnya atau spesies baru

(Stackebrandt dan Goebel, 1994). Metode untuk membuat pohon filogeni dari sekuen rRNA yang sering dilakukan yaitu dengan menggunakan matriks jarak. Sebanyak 2 sekuen molekul rRNA dipadankan, lalu jarak evolusi (*evolutionary distance*) dihitung antara perbedaan masing-masing pada posisi yang sama. Namun kedekatan urutan sekuen 16S rRNA belum tentu memiliki karakter fenotip yang sama pula, begitu pula sebaliknya dengan perbandingan karakter morfologi dan fisiologi yang sama (Suwanto, 1994).

2.4 Penentuan Urutan Basa Nukleotida

Proses sekuensing dilakukan untuk mendapatkan urutan nukleotida atau basa nitrogen dalam fragmen DNA yang menyandikan informasi genetik organisme dengan konstruksi berbentuk urutan nukleotida. Sekuensing DNA banyak menggunakan metode Sanger pada tahun 1977 karena pengerjaannya yang relatif cepat dan mudah dengan kualitas yang bagus (Gaffar, 2007).

Metode Sanger dapat digunakan sebagai sekuensing DNA melalui terminasi rantai dengan prinsip penggunaan dNTP (2'-deoksinukleosida trifosfat) dan ddNTP (2',3'-dideoksinukleosida trifosfat). Molekul dNTP akan menjadi katalisator dalam polimerisasi DNA oleh DNA Polymerase, sedangkan molekul ddNTP akan menjadi akhir dari reaksi polimerisasi atau terminator (Sanger *et al.*, 1977). Pelaksanaan sequencing dengan metode Sanger yaitu dengan menggabungkan DNA (*single strand*), primer, DNA polymerase, dan label berupa molekul radioaktif atau fluorescen untuk melabeli primer atau ddNTP dalam satu tabung. Setelah itu dilakukan elektroforesis yang akan membentuk band-band dengan panjang dan ujung terminator yang berbeda, terminator (ddNTP) yang telah dilabeli memudahkan untuk divisualisassi dan analisa penentuan urutan basa dari band yang terpendek (Men *et al.*, 2008).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Sekuensing DNA dilakukan di lembaga sekuensing *1st Base* Malaysia. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Mei 2016 – September 2016.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain autoklaf, erlenmeyer, tabung reaksi, mikroskop, gelas ukur, *eppendorf*, mikropipet (20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l), batang pengaduk, *beaker glass*, cawan petri, jarum ose, vortex, spektrofotometer UV/VIS Metash 5200, *Haemocytometer*, *Laminar Air Flow* (LAF), *rotary shaker*, Autoklaf, inkubator, mikroskop binokuler, mikroskop stereo, neraca analitik, pH meter, kertas lakmus, *stirer*, *hotplate*, termometer, pinset, stopwatch, aluminium foil, *centrifuge*, *stop watch*, oven, water bath, *freezer -20°C*, *water bath*, *microtube / eppendorf*, UV gel transilluminator, mesin PCR, elektroforesis, nanodrop.

Adapun bahan-bahan yang digunakan antara lain biakan bakteri isolat KAJ36, media kafein 1 %, media 1% kafein agar miring, media NA (Nutrient Agar), media NB (*Nutrient Broth*), media uji biokimia, kafein, Iod 1%, H₂O₂ 3%, α -naphthylamin, asam sulfanilik, reagent Kovacs, reagent tetramethyl-p-phenylenediamine 1%, KOH 3%, agarose 1,5 %, alkohol 70%, aquades steril, aquabidest steril (ddH₂O), garam fisiologis, kristal violet, Iodine, alkohol asam, safranin, EtBr (Ethidium Bromide), Buffer TE, DNA ladder 1kb sebagai marker, loading dye, forward primer 27F, reverse primer 1495R, dan ekstrak DNA.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskriptif dengan data yang diperoleh adalah data kuantitatif berupa tabel dan grafik.

3.3.1 Pembuatan Stok Gliserol Isolat KAJ36

Peremajaan dilakukan dengan 1 ose isolat KAJ36 ditumbuhkan pada media cair kafein 1 %, dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Selanjutnya isolat 200 µl isolat diambil dan dimasukkan *eppendorf* yang berisi 300 µl gliserol, kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu -20 °C sebagai stok.

3.3.2 Pembuatan Kurva Standart Kafein

Penentuan standart kafein dilakukan dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 273 nm. Stock kafein 0,2 ppm dibuat seri pengenceran menjadi 0,02 ppm, 0,04 ppm, 0,08 ppm, 0,10 ppm, 0,12 ppm, dan 0,16 ppm. Selanjutnya konsentrasi kafein diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 273 nm dan dilakukan sebanyak triplo. Nilai absorbansi yang didapatkan dibuat sebagai data kurva regresi linier yang menunjukkan hubungan antara nilai absorbansi dengan konsentrasi kafein pada sampel.

3.3.3 Pembuatan Kurva Standart Pertumbuhan Bakteri

Standart pertumbuhan sel bakteri didapatkan dengan menghubungkan antara absorbansi kultur dengan jumlah sel bakteri. Isolat KAJ36 yang umur 48 jam ditumbuhkan pada media kafein 1% cair dan diinkubasi shaker selama 24 jam. Kultur diambil dan dilakukan beberapa perbandingan pengenceran yang berbeda yakni 1/10, 2/10, 4/10, 6/10, 8/10, 10/10, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm, dilanjutkan dengan menghitung menggunakan perhitungan secara langsung atau metode *Petroff-Hauser* (*Haemocytometer*) dilakukan sebanyak duplo, data yang diperoleh dibuat grafik regresi linier yang menghubungkan antara absorbansi kultur dengan jumlah populasi sel pada kultur. Berikut rumus perhitungan secara langsung metode *Petroff-Hauser* :

$$\sum \text{ sel 1 ml} = \frac{\sum \text{ sel}}{\text{Volume}} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

3.3.4 Penentuan Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan isolat KAJ36 dilakukan dengan cara menumbuhkan 1 ose isolat umur 24 jam dalam media Kafein 1% cair dan diinkubasi selama 7 hari pada rotary shaker. Setiap harinya mulai hari ke-0 dilakukan pemanenan sebanyak 1,5 ml dengan dimasukkan *eppendorf*, sebanyak triplo. Kultur yg didapatkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm dilakukan sebanyak triplo.

3.3.5 Uji Degradasi Kafein

Uji aktivitas degradasi kafein dilakukan dengan menumbuhkan starter isolat KAJ36 pada media 1% kafein cair dan diinkubasi hingga mencapai *log phase* puncak biakan, kemudian menginokulasikan starter sebanyak 1% dari total volume media 1% kafein cair yang akan diuji degradasi kafein dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang di atas *rotary shaker*. Selanjutnya setiap harinya mulai hari ke-0 sebanyak 1,5 ml kultur diambil dan dimasukkan *eppendorf* sebanyak triplo, kemudian diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 273 nm dengan menggunakan pengenceran 1000x (Middelhoven dan Bakker, 1982).

3.3.6 Pengamatan Morfologi Bakteri

a. Pengamatan Makroskopis

Bakteri isolat KAJ36 diamati koloninya secara makroskopis. Isolat diinokulasikan dengan cara streak plate pada media NA (*Nutrient Agar*) dalam petridish, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C untuk pengamatan koloni yang meliputi warna koloni, bentuk koloni, permukaan koloni, elevasi, bentuk tepi, diameter koloni, warna balik koloni (*reverse colour*), terbentuk atau tidak titik air/eksudat.

b. Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan melihat bentuk sel bakteri dan pengamatan hasil pewarnaan Gram (Gram positif dan Gram negatif). Pengecatan Gram dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat bakteri diencerkan dalam 500

μl , 10 μl suspensi larutan diambil dan diletakkan di atas gelas obyek lalu difiksasi. Selanjutnya ditambahkan Kristal violet (Gram A) selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Setelah kering kemudian ditambahkan 1 tetes larutan iodine (Gram B) selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Setelah kering ditetesi dengan alkohol asam (Gram C), dibiarkan selama 30 detik, setelah itu dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Kemudian isolat bakteri ditetesi safranin (Gram D), dibiarkan selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, selanjutnya diamati dengan mikroskop. Bakteri Gram positif berwarna ungu dan bakteri Gram negatif berwarna merah.

Penentuan Gram bakteri selain menggunakan pengecatan Gram juga dilakukan dengan menggunakan metode uji larutan potassium hidroksida (KOH) 3%. Uji dengan KOH dilakukan dengan meneteskan 50 μl larutan KOH 3% pada gelas benda kemudian direaksikan dengan 2 ose koloni bakteri dari kultur media umur 24 jam dan ditunggu ± 15 detik dengan diaduk merata. Kemudian dilihat kekentalan larutan tersebut. Jika tidak terbentuk lendir berarti bakteri merupakan Gram positif, namun jika terbentuk lendir maka merupakan bakteri Gram negatif (Halebian *et al.*, 1981).

3.3.7 Uji Fisiologis-Biokimia Bakteri

Aktivitas fisiologis dari bakteri ditentukan dari beberapa tahap pengujian yang beragam yang dilakukan sebanyak triplo dan kontrol berdasarkan buku identifikasi bakteri Cowan dan Steel (1970), Berikut beberapa uji yang akan dilakukan :

a. Hidrolisis Pati

Hidrolisis pati dilakukan dengan menginokulasikan isolat umur 24 jam secara tusukan ditengah pada media *starch agar* dalam *petridish*. Kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Kemudian kultur hasil inkubasi ditetesi larutan iodium, reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni.

b. Katalase

Uji katalase dilakukan dengan menggunakan H_2O_2 3 %. Biakan isolat umur 24 jam diinokulasikan pada media NA (*Nutrient Agar*) miring dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Selanjutnya larutan H_2O_2 3% ditambahkan pada permukaan koloni. Indikasi positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara di sekeliling koloni bakteri.

c. Reduksi Nitrat

Isolat KAJ36 umur 24 jam diinokulasikan dalam median NB (*Nutrient Broth*) yang ditambahkan KNO_3 0,1 % lalu diinkubasi selama 2-7 hari dengan suhu 30 °C. Kemudian ditetesi dengan α -naphthylamin dan asam sulfanilik secukupnya. Jika terjadi perubahan menjadi warna merah muda pada media berarti reaksinya positif.

d. Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat menggunakan beberapa jenis gula yang meliputi glukosa, fruktosa, laktosa, dan sukrosa. isolat bakteri umur 24 jam diinokulasikan ke dalam 10 ml media glukosa 0,5% cair lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Jika terbentuk warna kuning pada media atau dasar media dan terbentuk gelembung pada tabung durham maka menunjukkan reaksinya positif. Hal yang sama juga berlaku untuk uji fermentasi fruktosa, laktosa, dan sukrosa.

e. Pengaruh pH

Isolat KAJ36 diuji terhadap berbagai variasi pH diantaranya pH 3, 5, 7, 9. isolat umur 24 jam diinokulasikan pada media NB (*Nutrient Broth*) yang telah disesuaikan pHnya dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam. Selanjutnya diamati pertumbuhan dari biakan pada setiap variasi pH yang dilakukan dengan indikator (++) untuk tumbuh banyak, (+) untuk pertumbuhan sedikit, dan (-) untuk tidak ada pertumbuhan.

f. Pengaruh Suhu

Uji pengaruh variasi suhu pada pertumbuhan isolat KAJ36 dilakukan pada suhu 4 °C, 30 °C, 37 °C, dan 45 °C. Biakan umur 24 jam diinokulasikan dalam media NA (*Nutrient Agar*) miring dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu yang ditentukan. Pengaruh variasi suhu diamati dengan ada tidaknya pertumbuhan

koloni bakteri dengan indikasi (++) untuk tumbuh banyak, (+) untuk pertumbuhan sedikit, dan (–) untuk tidak ada pertumbuhan.

g. Pembentukan Indol

Uji indol dilakukan dengan cara menggunakan menginokulasikan isolat umur 24 jam dalam media *Tryptone Water Broth* dan diinkubasi selama 2-7 hari pada suhu 30 °C. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml reagen Kovacs, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin warna merah/merah muda diatas media.

h. Produksi H₂S

Uji H₂S (asam sulfida) bertujuan untuk mengetahui pembentukan asam sulfida/tidaknya oleh bakteri, dengan menginokulasikan isolat umur 24 jam dalam media *Kligler Iron Agar* dan diinkubasi selama 2-7 hari pada suhu 30 °C. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam/gelap.

i. O-F (Oksidasi dan Fermentasi)

Uji oksidasi fermentasi dilakukan dengan menginokulasikan isolat umur 24 jam dalam media Agar oksidasi-fermentasi, lalu diinkubasi selama 2-7 hari pada suhu 30 °C. Reaksi oksidatif positif ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning pada media yang tidaktertutupi lilin dan media yang tertutup lilin tetap hijau, sedangkan reaksi fermentatif positif apabila media yang ditutupi lilin dan yang tidak tertutup lilin berubah warna menjadi kuning semua.

j. Sitrat *Simmon's*

Uji sitrat *Simmon's* dilakukan dengan menginokulasikan isolat umur 24 jam dalam media agar sitrat *Simmon's* dan diinkubasi selama 2-7 hari pada suhu 30 °C. Reaksi positif terlihat apabila media berubah warna menjadi biru.

k. Pencairan Gelatin

Uji pencairan gelatin dillakukan dengan menginokulasikan isolat umur 24 jam pada media gelatin dan diinkubasi selama 2-7 hari pada suhu 30 °C. Kemudian diinkubasi *ice bath* selama 10-15 menit, reaksi positif menunjukkan terdapat pola pencairan gelatin dari permukaan sampai dasar media.

l. Oksidase

Isolat yang berumur 24 jam diinokulasikan secara *streak plate* pada media NA (*Nutrient Agar*) dalam *petridish* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Koloni tunggal yang didapat diambil 2 ose dan digoreskan pada kertas saring, kemudian ditetesi reagent oksidase 1% (Tetramethyl-p-phenylenediamine) disamping goresan. Reaksi positif akan menunjukkan perubahan warna menjadi biru pada goresan koloni bakteri.

m. Mac Conkey

Pengujian Mac. Conkey dilakukan dengan menginokulasikan isolat umur 24 jam pada media Mac. Conkey agar dalam *petridish* secara *streak plate* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Reaksi positif secara umum dilihat pada dapat tumbuh atau tidaknya isolat bakteri, namun beberapa bakteri dapat merubah warna koloni menjadi merah bata dan dikelilingi endapan garam empedu pada sekitar koloni bakteri.

n. Produksi Pigment

Produksi pigment yang digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan media King's B agar miring, dengan cara diinokulasikan isolat yang berumur 24 jam dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Selanjutnya diamati perubahan warnanya dan diamati pula perubahan warna diatas UV gel transilluminator.

3.3.8 Ekstraksi DNA Whole Genome

DNA Whole Genome Bakteri akan diekstraksi dan diisolasi menggunakan metode *freeze and thaw*. Metode ini memiliki keunggulan dalam segi waktu yang singkat, pengerjaan yang mudah, dan biaya yang murah. Prinsip metode *freeze and twaw* menggunakan suhu ekstrem untuk memecah membran sel bakteri sehingga didapatkan DNA genomnya (Mulyani *et al.*, Tanpa tahun).

Koloni tunggal dari bakteri KAJ36 diambil 1 ose pada media NA (*Nutrient Agar*) diinokulasikan dalam media NB (*Nutrient Broth*) dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam di atas shaker. 1,5 ml kultur dimasukkan dalam *eppendorf* dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit.

Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pelet yang didapatkan dicuci dengan 1 ml PBS dan diresuspensi, lalu disentrifugasi selama 5 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm, dilakukan 3x pengulangan. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet yang diperoleh disimpan pada suhu -20 °C selama *overnight*.

Pelet beku yang sudah disimpan kemudian diekstraksi dengan cara dididihkan selama 4-5 menit, selanjutnya dilarutkan dengan 50 µl aquabides steril (ddH₂O) dan diresuspensi dengan cara mikropipeting kemudian divortex. Setelah itu disentrifugasi pada suhu 4 °C selama 5 menit, 10.000 rpm. Materi genetik yang berada pada supernatan hasil sentrifuge kemudian dielektroforesis untuk dikonfirmasi kualitas dan keberhasilannya. 3 µl DNA dan 2 µl loading dye dimasukkan dalam sumuran gel agarose yang berisi EtBr dan TBE 1x. 2 µl DNA ladder 1 kb digunakan sebagai marker. Proses running dilakukan selama 30-35 menit pada 100 V, kemudian keberadaan pita DNA dilihat dengan cara gel agarose hasil elektroforesis divisualisasi diatas UV transilluminator .

3.3.9 PCR DNA Pengkode 16S rRNA

Identifikasi DNA whole genome bakteri diamplifikasi menggunakan primer DNA pengkode 16S rRNA untuk mengetahui kekerabatan filogenetiknya yaitu dengan primer *forward* 27 F (5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') dan primer *reverse* 1495 R (5' CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA 3'). Larutan yang digunakan untuk proses PCR mengandung campuran 1 µl DNA yang memiliki konsentrasi 500 µg/µl, 5 µl PCR Master Mix, 1 µl primer *forward*, 1 µl primer *reverse*, 2 µl aquabides steril. Standar PCR yang digunakan adalah *initial denaturation* 95 °C selama 5 menit, 35 siklus pada 95 °C selama 20 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 30 detik, 72 °C selama 90 menit, serta *final extention* pada 72 °C selama 5 menit.

Kualitas dan keberhasilan produk PCR dilihat melalui elektroforesis menggunakan marker DNA ladder 1 kb. 1 µl marker dan 1 µl sampel tanpa loading dye dirunning. Produk PCR dikatakan berhasil apabila terdapat pita DNA

yang berukuran antara ± 1.468 bp, dengan divisualisasi diatas UV transillumniator, jika berhasil selanjutnya amplikon dilakukan *squencing*.

3.3.10 Analisis Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA

DNA selanjutnya disekuensing dengan dikirim kepada 1st Base Malaysia. Data DNA hasil sekuensing dilakukan alignment sekuen DNA pengkode 16S rRNA dan dikontrol model pohon filogenetiknya dengan menggunakan software Bioedit dan MEGA 6.06. Kemudian dibandingkan dengan gen pengkode 16S rRNA di Gene Bank menggunakan BLAST online software di GeneBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) untuk menentukan spesies bakteri dan melihat hubungan kekerabatannya melalui pohon filogenetiknya.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Karakter degradasi kafein bakteri isolat KAJ36 cukup tinggi dengan presentase sebesar 86,74 % pada jam ke-168 (7 hari), dengan jumlah sisa kafein yang didapatkan berkisar $\pm 1,220$ g/L kafein. Identitas bakteri isolat KAJ36 dari hasil perbandingan karakter morfologi, biokimia, dan analisis sekuen DNA pengkode 16S rRNA menunjukkan bahwa bakteri memiliki kedekatan dengan bakteri *Pseudomonas monteilii* CIP 104883, dengan presentase *Max identity* sekuen DNA sebesar 99% pada BLAST dan nilai similaritas yang mencapai 99,93% pada MEGA software.

5.2 Saran

Perlunya pengkarakterisasian lebih lanjut mengenai derivat senyawa yang dihasilkan dari setiap tahap degradasi kafein yang berlangsung menggunakan LCMS, serta penentuan kondisi stabil dan optimum dari enzim, dan juga pengaplikasian langsung pada substrat alami.

DAFTAR PUSTAKA

- Asano, Yasuhisa, Toshihiro Komeda, dan Hideaki Yamada. 1993. "Microbial Production of Theobromine from Caffeine." *Biosci. Biotech. Biochem* 57 (8): 1286–89.
- Ashihara, Hiroshi, dan Alan Crozier. 2001. "Caffeine : A Well Known But Little Mentioned Compound in Plant Science." *Trends in Plant Science* 6 (9): 407–13.
- Barciszewska, Mirosława Z, Maciej Szymański, Volker A Erdmann, dan Jan Barciszewski. 2001. "Structure and Functions of 5S rRNA. Review." *QUARTERLY* 48 (1): 191–98.
- Bressani, Ricardo. 1987. *Antiphysiological Factors in Coffee Pulp*. Editor: Braham, J. E, dan Bressani, R. Guatemala: Institute of Nutrition of Central America and Panama.
- Clayton, Rebecca A, Granger Sutton, Paul S Hinkle, Carol Bult, dan Chris Fields. 1995. "Intraspecific Variation in Small-Subunit rRNA Sequences in GenBank : Why Single Sequences May Not Adequately Represent Prokaryotic Taxa." *International Journal of Systematic Bacteriology* 45 (3): 595–99.
- Cowan, S. T., dan K. J. Steel. 1970. *Manual for Identification of Medical Bacteria*. New York: Cambridge University Press.
- Dash, Swati Sucharita, dan Sathyanarayana N. Gummadi. 2006. "Catabolic Pathways and Biotechnological Applications of Microbial Caffeine Degradation." *Biotechnology Letters* 28 (24): 1993–2002.
- Dash, Swati Sucharita, dan Sathyanarayana N. Gummadi. 2008. "Inhibitory Effect of Caffeine on Growth of Various Bacterial Strains." *Research Journal of Microbiology* 3 (6). Academic Journals Inc.: 457–65.
- Dash, Swati Sucharita, dan Sathyanarayana N. Gummadi. 2010. "Biodegradation of Caffeine by *Pseudomonas* sp. NCIM 5235." *Research Journal of Microbiology* 5 (8): 745–53.
- Dharni, Seema, Sanchita, Anupam Maurya, Abdul Samad, Santosh Kumar Srivastava, Ashok Sharma, dan Dharani Dhar Patra. 2014. "Purification, Characterization, and in Vitro Activity of 2,4-Di- Tert - Butylphenol from *Pseudomonas monteilii* PsF84: Conformational and Molecular Docking Studies." *J. Agric. Food Chem.* 62: 6138–46.
- Elomari, Malika, Coroler Loic, Verhille Sophie, Daniel Izard, dan Henri Leclerc.

1997. “*Pseudomonas monteilii* sp. Nov., Isolated from Clinical Specimens.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (3): 846–52.
- Fan, Fang-Yuan, Yan Xu, Yue-Rong Liang, Xin-Qiang Zheng, Devajit Borthakur, dan Jian-Liang Lu. 2011. “Isolation and Characterization of High Caffeine Tolerant Bacterium Strains from The Soil of Tea Garden.” *African Journal of Microbiology Research* 5 (16): 2278–86.
- Farida, Ana, Evi Ristanti, dan Andri Cahyo Kumoro. 2013. “Penurunan Kadar Kafein Dan Asam Total Pada Biji Kopi Robusta Menggunakan Teknologi Fermentasi Anaerob Fakultatif Dengan Mikroorganisme Nopkor MZ-15.” *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri* 2 (3): 70–75.
- Gaffar, Shabarni. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Gokulakrishnan, S, K Chandraraj, dan Sathyanarayana N Gummadi. 2005. “Microbial and Enzymatic Methods for The Removal of Caffeine.” *Enzyme and Microbial Technology* 37: 225–32.
- Gummadi, Sathyanarayana N, B Bhavya, dan Nandhini Ashok. 2012. “Physiology, Biochemistry and Possible Applications of Microbial Caffeine Degradation.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 545–54.
- Hakil, M, F Voisinet, dan C Augur. 1999. “Caffeine Degradation in Solid State Fermentation by *Aspergillus tamarii*: Effects of Additional Nitrogen Sources.” *Process Biochemistry* 35: 103–9.
- Hakil, M., S. Denis, G. Viniegra-Gonzalez, dan C. Augur. 1998. “Degradation and Product Analysis of Caffeine and Related Dimethylxanthines by Filamentous Fungi.” *Enzyme and Microbial Technology* 22: 335–59.
- Halebian, Shushan, Betty Harris, Sydney M Finegold, dan Rial D Rolfe. 1981. “Rapid Method That Aids in Distinguishing Gram-Positive from Gram-Negative Anaerobic Bacteria.” *Journal of Clinical Microbiology* 13 (3): 444–48.
- Handoyo, Darmo, dan Ari Rudiretna. 2001. “Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR).” *Unitas* 9 (1): 17–29.
- Huard, R. C. 2007. *16S rRNA Sequencing in The Clinical Microbiology Laboratory*. New York: Columbia University Medical Centre.
- Indermuhle, Chloe, Maria J Martín, De Vidales, Cristina Sáez, José Robles, Pablo Cañizares, Juan F García-reyes, Antonio Molina-díaz, Christos Comninellis, dan Manuel A Rodrigo. 2013. “Degradation of Caffeine by Conductive Diamond Electrochemical Oxidation.” *Chemosphere* 93 (9). Elsevier Ltd: 1720–25.

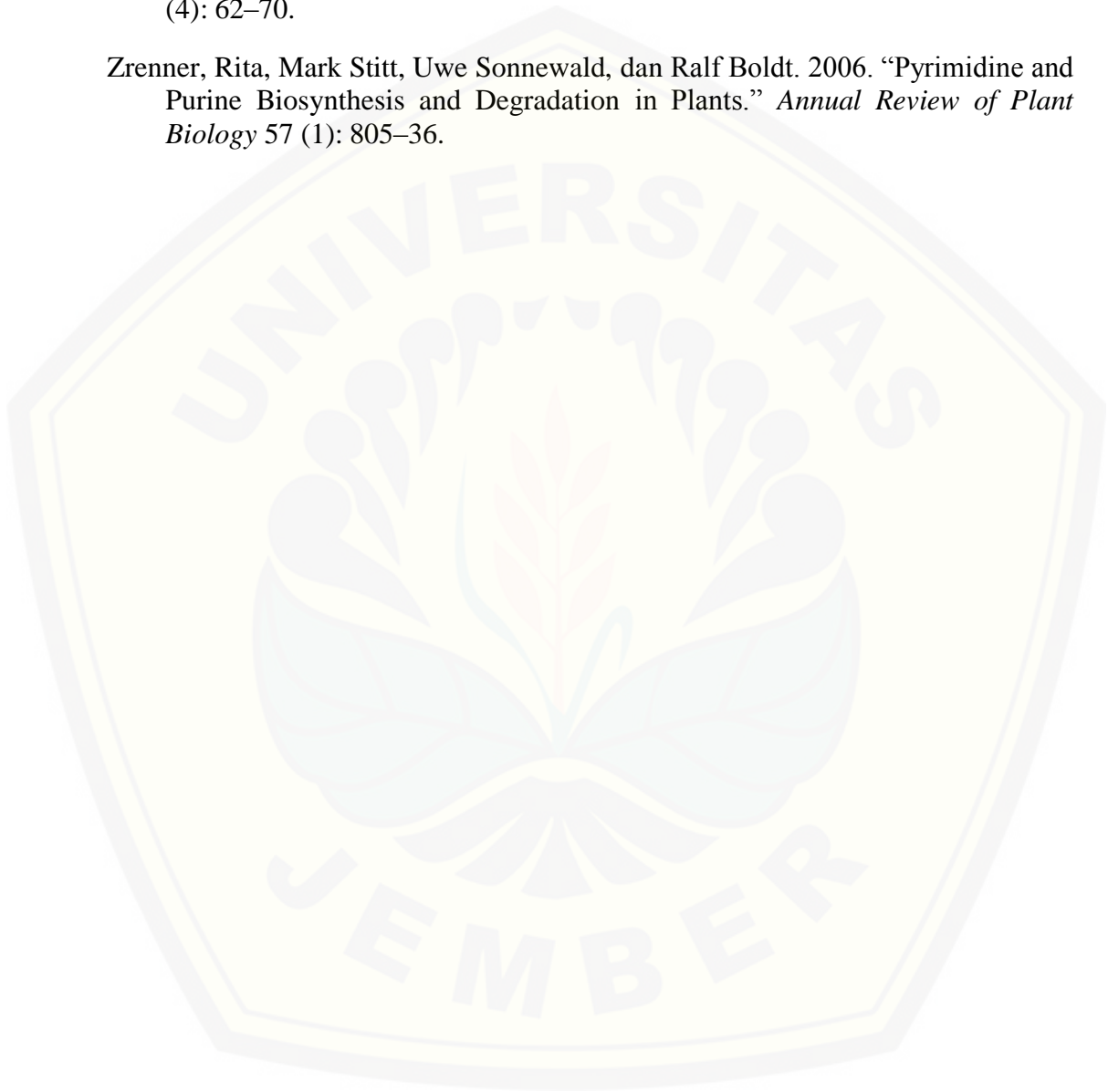
- Ingraham, J. L, O Maaloe, dan F. C Neidhardt. 1983. "Microbial Growth." In *Growth of the Bacterial Cell*, 126–52. Sunderland: Sinauer Associates.
- Jutono, Soedarsono, Hartadi, Suhadi, dan Soesanto. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*. Yogyakarta: Departemen Mikrob Biologi Fakultas Pertanian UGM.
- Maier, Raina M. 2009. "Bacterial Growth." dalam *Basic Microbiological Concepts Enviromnetal Microbiology*, Second, 37–54. USA: Academic Press.
- Mazzafera, Paulo. 2002. "Degradation of Caffeine by Microorganism and Potential Use of Decaffeinated Coffee Husk and Pulp in Animal Feeding." *Scientia Agricola* 59 (4): 815–21.
- Men, Artem E, Peter Wison, Kirby Siemering, and Susan Forrest. 2008. "Sanger DNA Sequencing." dalam *Next Generation Genome Sequencing*, editor : Janitz, Michal, 3–11. Germany: WILEY-VCH.
- Middelhoven, Wouter J, dan Cor M Bakker. 1982. "Degradation of Caffeine by Immobilized Cells of *Pseudomonas putida* Strain C 3024." *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 15: 214–17.
- Monod, Jacques. 1949. "The Growth of Bacterial Cultures." *Annual Rev. Microbiol.* 3: 371–94.
- Mulyani, Yuniar, Agus Purwanto, dan Isni Nuruhwati. n.d. "Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (KHV) Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)." *Universitas Padjajaran*, 1–16.
- Naik, Popavath Ravindra, Gurusamy Raman, Kannan Badri Narayanan, dan Natarajan Sakthivel. 2008. "Assessment of Genetic and Functional Diversity of Phosphate Solubilizing Flourescent *Pseudomonas* Isolated from Rhizospheric Soil." *BMC Microbiology* 14 (230): 1–14.
- Nishimori, E, K Kita-Tsukamoto, dan H Wakabayashi. 2000. "*Pseudomonas plecoglossicida* sp. Nov., The Causative Agent of Bacterial Haemorrhagic Ascites of Ayu , *Plecoglossus altivelis*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 83–89.
- Olsen, Gary J, dan Carl R Woese. 1993. "RNA : A Key to Phylogeny." *The FASEB Journal* 7: 113–23.
- Padmapriya, R, Jenny Anne Tharian, dan T Thirunalasundari. 2013. "Coffee Waste Management-An Overview." *Int. J. Curr. Sci.* 9: 83–91.
- Pangastuti, Artini. 2006. "Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA Dan Gen Penyandi Protein. Review." *BIODIVERSITAS* 7 (3): 292–96.

- Roussos, S., M. de los Angeles Aquíhuatl, M. del Refugio Trejo-Hernández, I. Gaimé Perraud, E. Favela, M. Ramakrishna, M. Raimbault, dan G. Viniegra-González. 1995. "Biotechnological Management of Coffee Pulp - Isolation, Screening, Characterization, Selection of Caffeine-Degrading Fungi and Natural Microflora Present in Coffee Pulp and Husk." *Applied Microbiology and Biotechnology* 42 (5): 756–62.
- Roussos, S., L. Hannibal, M. A. Aquiahuatl, Trejo M. R. Hernandez, dan S. Marakis. 1994. "Caffeine Degradation by *Penicillium verrucosum* in Solid State Fermentation of Coffe Pulp : Critical Effect of Additional Inorganic and Organic Nitrogen Sources." *J. Food Sci. Technol.* 31 (4): 316–19.
- Sadhu, Sangrila, dan Tushar Kanti Maiti. 2013. "Cellulase Production by Bacteria : A Review." *British Microbiology Research Journal* 3 (3): 235–58.
- Sanger, F, S Nicklen, dan A R Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463–67.
- Spiller, Gene A. 1998. *Caffeine*. Editor: Fox, Susan. US America: CRC Press LLC.
- Stackebrandt, E., dan B. M. Goebel. 1994. "Taxonomic Note : A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in The Present Species Definition in Bacteriology." *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (4): 846–49.
- Suslow, T, V, N Schroth, M, dan M Isaka. 1981. "Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining." *The American Phytopathological Society* 72 (7): 917–18.
- Suwanto, Antonius. 1994. "Evolusi Mikroorganismee dan Kaitannya Dengan Sistematik Molekuler." *Hayati* 1 (2): 26–31.
- Tagliari, Cristiane Vanessa, Raquel K Sanson, André Zanette, Telma Teixeira Franco, dan Carlos Ricardo Soccol. 2003. "Caffeine Degradation by *Rhizopus delemar* in Packed Bed Column Bioreactor Using Coffee Husk As Substrate." *Barazilian Journal of Microbiology* 34 (1): 102–4.
- Wang, Li-ting, Chun-ju Tai, Yen-chi Wu, Ying-bei Chen, Fwu-ling Lee, dan Sanlang Wang. 2010. "*Pseudomonas taiwanensis* sp. Nov., Isolated from Soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2094–98.
- Woese, Carl R. 1987. "Bacterial Evolution." *Microbiological Review* 51 (2): 221–71.
- Woese, Carl R, L. J Magrum, R Gupta, R. B Siegel, dan D. A Stahl. 1980. "Secondary Structure Model for Bacterial 16S Ribosomal RNA:

Phylogenetic, Enzymatic, and Chemical Evidence.” *Nucleic Acids Research* 8 (10): 2275–94.

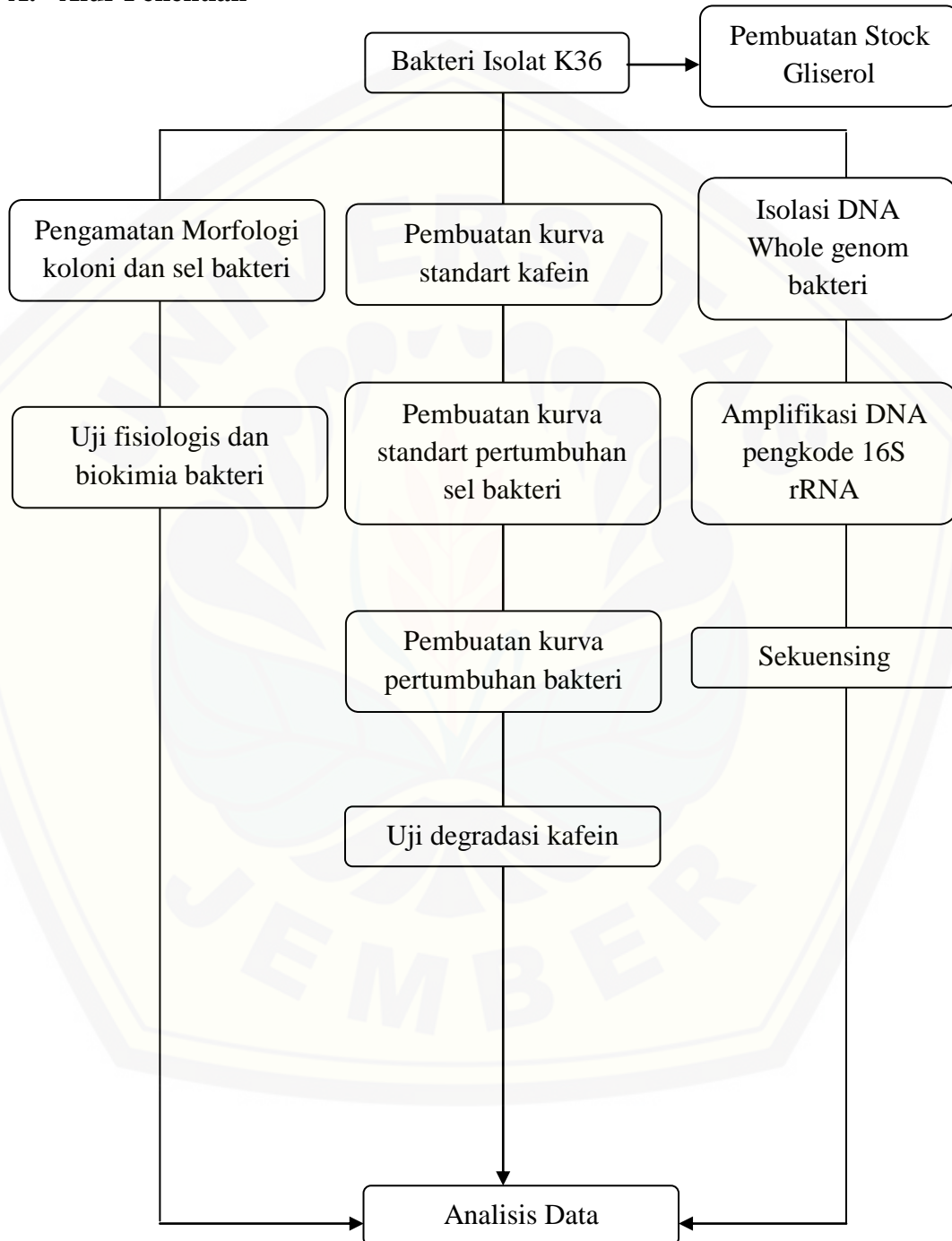
Yamaoka-Yano, Dirce Mithico, dan Paulo Mazzafera. 1999. “Catabolism of Caffeine and Purification of a Xanthine Oxidase Responsible for Methyluric Acids Production In *Pseudomonas putida* L.” *Revista de Microbiologia* 30 (4): 62–70.

Zrenner, Rita, Mark Stitt, Uwe Sonnewald, dan Ralf Boldt. 2006. “Pyrimidine and Purine Biosynthesis and Degradation in Plants.” *Annual Review of Plant Biology* 57 (1): 805–36.



LAMPIRAN

A. Alur Penelitian



B. Komposisi Bahan**B.1 Komposisi Bahan Untuk Pembuatan Media**

No.	Media	Bahan	Komposisi	Keterangan
1.	Pelarut M9	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	6 gr	
		KH ₂ PO ₄	3 gr	
		NaCl	0,5 gr	
		MgSO ₄	0,25 gr	
		NH ₄ Cl	1 gr	
		Akuades	1000 ml	
2.	Media Kafein Cair	Kafein	10 gr	
		Yeast ekstrak	1 gr	
		Pelarut M9	1000 ml	
3.	Media Kafein Agar	Kafein	10 gr	
		Yeast ekstrak	1 gr	
		Agar	15 gr	
		Pelarut M9	1000 ml	
4.	<i>Nutrient Agar</i> (NA)	Ekstrak daging	10 gr	
		Pepton	10 gr	
		NaCl	5 gr	
		Agar	15 gr	
		Akuades	1000 ml	
5.	<i>Nutrient Broth</i> (NB)	Ekstrak daging	10 gr	
		Pepton	10 gr	
		NaCl	5 gr	
		Akuades	1000 ml	
6.	Media Gelatin	Ekstrak daging	3 gr	
		Pepton	5 gr	
		Gelatin	120 gr	
		Akuades	1000 ml	
7.	<i>Starch Agar</i>	Ekstrak daging	1 gr	
		<i>Soluble Starch</i>	2 gr	
		Agar	15 gr	
		Akuades	1000 ml	
8.	Media O-F <i>Hugh & Leifson's</i>	Pepton	1 gr	pH 7,2
		NH ₄ H ₂ PO ₄	1 gr	
		KCl	2 gr	
		MgSO ₄ 7H ₂ O	2 gr	
		Agar	15 gr	
		<i>Bromothymol Blue</i>	0,08 gr	
		Akuades	1000 ml	

No.	Media	Bahan	Komposisi	Keterangan
9.	Media Citrat <i>Simmon's</i> Agar	NaCl	5 gr	
		MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 gr	
		NH ₄ H ₂ PO ₄	1 gr	
		K ₂ HPO ₄	1 gr	
		Na sitrat	2 gr	
		Agar	15 gr	
		<i>Bromothymol Blue</i>	0,08 gr	
		Akuades	1000 ml	
10.	Glukosa <i>Broth</i>	Ekstrak daging	10 gr	pH 7,0
		Pepton	10 gr	
		NaCl	5 gr	
		Glukosa	5 gr	
		Phenol Red 1,6 %	1 ml	
		Akuades	1000 ml	
11.	Fruktosa <i>Broth</i>	Ekstrak daging	10 gr	pH 7,0
		Pepton	10 gr	
		NaCl	5 gr	
		Fruktosa	5 gr	
		Phenol Red 1,6 %	1 ml	
		Akuades	1000 ml	
12.	Sukrosa <i>Broth</i>	Ekstrak daging	10 gr	pH 7,0
		Pepton	10 gr	
		NaCl	5 gr	
		Sukrosa	5 gr	
		Phenol Red 1,6 %	1 ml	
		Akuades	1000 ml	
13.	Laktosa <i>Broth</i>	Ekstrak daging	10 gr	pH 7,0
		Pepton	10 gr	
		NaCl	5 gr	
		Laktosa	5 gr	
		Phenol Red 1,6 %	1 ml	
		Akuades	1000 ml	
14.	Nitrat <i>Broth</i>	Ekstrak daging	10 gr	
		Pepton	10 gr	
		NaCl	5 gr	
		KNO ₃	1 gr	
		Akuades	1000 ml	

No.	Media	Bahan	Komposisi	Keterangan
15.	Kligler Iron Agar	Ekstrak daging	3 gr	
		Ekstrak yeast	3 gr	
		Pepton	15 gr	
		Proteose peptone	5 gr	
		Laktosa	10 gr	
		Dextrose	1 gr	
		Ferrous sulfate	0,2 gr	
		Sodium chlorida	5 gr	
		Phenol Red	0,024 gr	
		Agar	12 gr	
16.	Mc. Conkey Agar	Akuades	1000 ml	
		Pepton	20 gr	
		Laktosa	10 gr	
		Bile salt	1,5 gr	
		NaCl	5 gr	
		Agar	15 gr	
		Neutral Red	0,03 gr	
		Crystal violet	0,01 gr	
17.	Indol Broth	Akuades	1000 ml	
		Ekstrak daging	3 gr	
18.	Urea Broth	Trypton	10 gr	
		Akuades	1000 ml	
		Pepton	1 gr	
		Glukosa	1 gr	
		NaCl	5 gr	
		KH ₂ PO ₄	2 gr	
		Phenol Red	0,012 gr	
		Agar	15 gr	
19.	King's B Agar	Urea	1,2 gr	
		Akuades	1000 ml	
		Proteose peptone	20 gr	
		Glyserol	10 gr	
		K ₂ HPO ₄	1,5 gr	
		MgSO ₄	1,5 gr	
		Agar	15 gr	
Akuades	1000 ml			

B.2 Komposisi Larutan

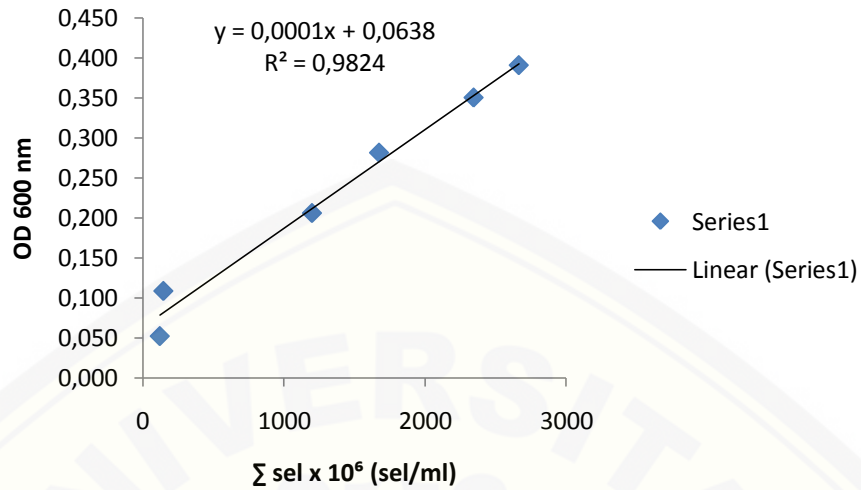
No.	Larutan	Bahan	Komposisi	Keterangan
1.	Phospat Buffer Saline (PBS)	NaCl	8 gr	pH 7,4
		KCl	0,2 gr	
		Na ₂ HPO ₄	1,44 gr	
		KH ₂ HPO ₄	0,24 gr	
		Akuades	1000 ml	
2.	0,5 M EDTA	EDTA	186,12 gr	pH 8,0
		NaOH	2,4 gr	
		Akuades	1000 ml	
3.	TBE 5x	Tris Base	54 gr	pH 8,3
		Boric Acid	27,5 gr	
		0,5 M EDTA	20 ml	
		Akuades	1000 ml	
4.	Gel Agarose 1%	Agarose	0,25 gr	
		EtBr	1 µl	
		Akuades	25 ml	

C. Karakter Uji Fisiologi-Biokimia Bakteri Isolat KAJ36

No.	Uji	Reaksi	No.	Uji	Reaksi
1.	Hidrolisis Pati	(-)	15	Urease	(+)
2.	Oksidase	(+)	16	Motilitas	(+)
3.	Katalase	(+)			(Tipe Rhizoid)
4.	Reduksi Nitrat	(+)	17	Fermentasi Sukrosa	(-)
5.	Indol	(-)	18	Fermentasi Laktosa	(-)
6.	pH 3	(-)	19	Fermentasi Fruktosa	(-)
7.	pH 5	(++)	20	Fermentasi Glukosa	(+)
8.	pH 7	(++)	21	Citrat <i>Simmon's</i>	(+)
9.	pH 9	(++)	22	Produksi H ₂ S	(-)
10.	Hemolitik Blood Agar	(-)	23	Pencairan gelatin	(-)
			24	Produksi Pigment (King's B)	(+)
11.	Suhu 4°C	(+)			(Pigment Pyoverdin)
12.	Suhu 30°C	(++)	25	OF (Parafin)	(-)
13.	Suhu 37°C	(++)	26	OF (Tanpa Parafin)	(-)
14.	Suhu 45°C	(-)	27	Mac. Conkey	(+)

Keterangan : (+ / ++): reaksi positif; (-): reaksi negatif

D. Kurva Standart Pertumbuhan Bakteri Isolat KAJ36



E. Hasil Perhitungan Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Waktu Inkubasi (Jam)	OD 600 nm	Konversi pada standart pertumbuhan [Jumlah sel x 10 ⁸ (sel/mL)]
0	0,038	2,070
24	0,252	15
48	0,346	22,970
72	0,466	32,672
96	0,478	33,648
120	0,489	35
144	0,506	36
168	0,493	35
192	0,507	36,005

F. Kurva Standart Kafein

