

Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Degradasi Limbah Padat Industri Kopi

Skripsi



GABRIELLA ANINDITA

31110004

**Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana
Yogyakarta
2016**

Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Degradasi Limbah Padat Industri Kopi

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains (S.Si) pada Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana



GABRIELLA ANINDITA

31110004

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2016

Lembar Pengesahan

Skripsi dengan judul:

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI YANG BERPERAN
DALAM DEGRADASI LIMBAH PADAT INDUSTRI KOPI


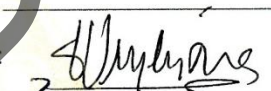
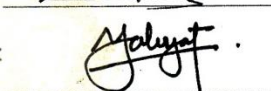
telah diajukan dan dipertahankan oleh:

GABRIELLA ANINDITA

31110004

dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana

dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Sains pada tanggal **13 Januari 2016**

Nama Dosen	Tanda Tangan
1. Dr. Dhira Satwika, M.Sc (Dosen Pembimbing I/ Penguji)	
2. Dr. Charis Amarantini, M. Si (Ketua Tim/ Dosen Pembimbing II/ Penguji)	
3. Tri Yahya Budiarmo, S. Si, MP (Dosen Penguji)	

Yogyakarta, 22.01.2016

Disahkan oleh:

Dekan,

Ketua Program Studi



Dr. Dhira Satwika, M. Sc



Tri Yahya Budiarmo, S. Si. MP

Lembar Pernyataan

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Gabriella Anindita

NIM : 31110004

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul:

“Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Degradasi Limbah Padat Industri Kopi”

Adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi; dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab. Saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 22 Januari 2016



Gabriella Anindita

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis haturkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat dan karunia, dan penyertaanNya, sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Degradasi Limbah Padat Industri Kopi”**. Proses penelitian hingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik berkat bimbingan, bantuan, dan motivasi dari berbagai pihak. Penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Yayasan Van Deventer-Maas Stichting, selaku pemberi beasiswa sehingga penulis dapat menyelesaikan studi S-1 dengan baik.
2. Dr. Dhira Satwika, M. Sc, selaku dosen pembimbing pertama dan Dekan Fakultas Bioteknologi atas kesabaran, dukungan, dan motivasi dalam membimbing penulis selama proses skripsi berlangsung.
3. Dr. Charis Amarantini, M. Si, selaku dosen pembimbing kedua dan wali dosen atas dukungan dan saran, serta arahan selama proses skripsi berlangsung.
4. Tri Yahya Budiarto, S. Si, MP, selaku dosen penguji atas koreksi dan saran dalam penyempurnaan skripsi ini.
5. Staff dan Laboran Fakultas Bioteknologi UKDW atas bantuan, dan bimbingan selama proses skripsi berlangsung, baik itu dalam administratif maupun di laboratorium.
6. Bapak FX Joko Triyanto, Ibu EU Arita Purbayu, Mas Albertus Satria Yudha, dan Michael Aditya Putra Pradana, serta Om Tiyok yang penuh kesabaran mendukung penulis dalam setiap proses penelitian hingga pembuatan skripsi.
7. Kakak angkatan, kak Arga, kak Dewi, mas Deni, kak Diana atas ilmu yang diberikan dalam menangani hal teknis di laboratorium. Teman-teman angkatan 2011, Daniel, Agnes, Lidia, Nike, Icha, Ilona, dan semuanya untuk kebersamaan dan cerita selama 4 tahun ini. Adik-adik angkatan 2012 – 2015, Elna, Dewi, Ratih, Lala, Pinkan, Fina, Jabin, William, Karen, Anggita, dan semuanya untuk bantuan serta keceriaan yang diberikan pada penulis.
8. Semua pihak yang tidak dapat penulis tulis satu per satu, atas bantuan, kritik, motivasi dan dukungan yang telah diberikan.

Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan kemajuan pendidikan, serta ilmu pengetahuan. Penulis berharap, penelitian ini dapat dikembangkan dan dilanjutkan oleh berbagai pihak dan adik-adik di Fakultas Bioteknologi UKDW.

Yogyakarta, 22 Januari 2016

Penulis

HALAMAN PERSEMBAHAN

“Ia membuat segala sesuatu indah pada waktuNya”

(Pengkhotbah 3: 11a)

©UKDWN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk

Kakek dan nenek,

Sunardi Hadiwiyoto (alm) dan Sugiarti

serta ayah dan ibu terkasih,

Ch. Djoko Hastono (alm) dan E.U. Arita Purbayu

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
Abstrak	x
Abstract.....	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II STUDI PUSTAKA	4
BAB III METODE PENELITIAN	10
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	10
3.2. Alat dan Bahan.....	10
3.2.1. Alat	10
3.2.2. Bahan.....	10
3.3. Tahapan Penelitian.....	11
3.3.1. Pengambilan Sampel Ampas Kopi.....	12
3.3.2. Isolasi Mikrobia.....	12
3.3.3. Uji Biokimia dan Pengecatan Gram.....	12
3.3.4. Studi Mikrokosmos	12
3.3.5. Analisa Molekular	13
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	14
4.1. Isolasi Mikrobia	14
4.2. Studi Mikrokosmos.....	16
4.3. Uji Biokimia.....	20
4.4. Analisis Molekular.....	21
BAB V KESIMPULAN	28
DAFTAR PUSTAKA.....	29
LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Contoh jenis mikroorganisme yang mampu mendegradasi kafein dengan teknik fermentasi dan hasilnya	7
Tabel 2. Kunci identifikasi kelompok genus bakteri berdasarkan <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> edisi ke 9 (dimodifikasi)	23
Tabel 3. Hasil uji biokimia pada kedua isolat A dan isolat B yang diduga termasuk dalam kelompok genus <i>Bacillus</i> sp	23
Tabel 4. Hasil uji mikrokosmos isolat A dengan konsentrasi kafein sebesar 10% dan 15%	34
Tabel 5. Hasil uji mikrokosmos isolat B dengan konsentrasi kafein sebesar 10% dan 15%	35
Tabel 6. Hasil uji mikrokosmos kontrol tanpa penambahan kafein	36

©UKDW

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur senyawa kafein	4
Gambar 2. Skema degradasi kafein oleh <i>Pseudomonas putida</i> dengan enzim xantin oksidase.....	9
Gambar 3. Skema tahapan penelitian	11
Gambar 4. Inokulasi sampel pada medium Luria Bertani Broth.....	15
Gambar 5. Isolat potensial pada petridish dalam medium Luria Bertani Agar.....	16
Gambar 6. Hasil inokulasi isolat potensial pada petridish dalam medium CAS (<i>Caffeine Associated Sucrose</i>) Agar	17
Gambar 7. Pertumbuhan isolat A yang diperoleh pada konsentrasi 10% dan 15% yang dibandingkan dengan kontrol	18
Gambar 8. Pertumbuhan isolat B yang diperoleh pada konsentrasi 10% dan 15% yang dibandingkan dengan kontrol	19
Gambar 9. Hasil pengecatan gram pada kedua isolat yang menunjukkan hasil gram positif berbentuk batang	23
Gambar 10. Hasil elektroforesis isolasi DNA isolat A dan B	24
Gambar 11. Hubungan filogenetik berdasarkan 14 sekuen genus <i>Pseudomonas</i> sp. yang terdeteksi pada hasil BLAST gen <i>gyrB</i>	25
Gambar 12. Hasil deteksi molekular menggunakan pasangan primer gen-gen: 16S rDNA, <i>gyrB</i> , dan <i>phlD</i> yang mentarget <i>Pseudomonas</i> sp	26
Gambar 13. Hasil PCR yang mentarget gen <i>gyrB</i> Enterobacteriaceae	27
Gambar 14. Hasil PCR menggunakan <i>primer universal</i> untuk deteksi gram positif.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data hasil uji mikrokosmos.....	35
Lampiran 2. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian.....	38
Lampiran 3. Langkah kerja.....	45

©UKDW

Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Degradasi Limbah Padat Industri Kopi

**Gabriella Anindita
31110004**

**Fakultas Bioteknologi, Program Studi Biologi
Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta**

ABSTRAK

Meningkatnya pembangunan kedai kopi di Yogyakarta memberikan dampak peningkatan akumulasi dan kemungkinan kontaminasi kafein. Kafein merupakan salah satu senyawa rekalsitran yang sulit untuk didegradasi. Namun, ada beberapa mikroorganisme yang mampu mendegradasi senyawa ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi secara molekuler bakteri potensial yang mampu mendegradasi kafein. Sampel limbah diambil dari sampel tanah yang terkontaminasi limbah kafein. Isolat yang didapat diseleksi menggunakan medium pertumbuhan selektif khusus untuk kafein. Selain itu dilakukan uji biokimia dan studi mikrokosmos untuk mengetahui kemampuan isolat terhadap kafein. Identifikasi bakteri secara molekuler dilakukan menggunakan pasangan primer spesifik untuk *Pseudomonas* sp, dan *Enterobacteriaceae* yang menarget gen-gen 16s rDNA, *phlD*, dan *gyrB*, serta primer universal untuk deteksi bakteri gram positif.

Berdasarkan hasil penelitian, ditemukan dua isolat potensial yang termasuk dalam bakteri gram positif dan berbentuk batang. Hasil dari studi mikrokosmos menunjukkan bahwa kedua isolat dapat tumbuh pada medium dengan konsentrasi kafein sebesar 10%. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui kondisi optimal kemampuan degradasi bakteri terhadap kafein, serta memastikan jenis bakteri.

Kata Kunci: kafein, 16S rDNA, *phlD*, *gyrB*.

Isolation and Identification of Degrading Bacteria in Coffee Grounds

Gabriella Anindita
31110004

Faculty of Biotechnology, Dept. of Biology
Duta Wacana Christian University, Yogyakarta

ABSTRACT

The increased number of coffee shop in Yogyakarta give rise to the accumulation and possible contamination of caffeine. It is already known that caffeine is consider as one of the recalcitrant molecule which is not easy to be degraded. However, some microorganisms are able to degrade this molecule.

This research was done with the objective to isolate potential bacteria able to degrade caffeine, and molecularly identify them. Samples are collected from solid waste caffeine-contaminated soil. Bacterial isolation was done by mean of selective media; the resulting isolates were then biochemically tested and microcosm study were set up. Identification of the bacteria were performed by specific primer pairs targeting 16S rDNA, *phlD*, and *gyrB* genes of *Pseudomonas* sp and *Enterobacteriaceae*, and also universal primer for gram positive bacteria.

Two potential isolates for caffeine degradation were obtained, both of gram positive bacil. Microcosm studies showed they were able to grow and degrade caffeine up to 10%. Molecular identification with primer pairs commonly used for *Pseudomonas* sp and *Enterobacteriaceae* confirmed that the two isolates are not the member of those bacteria. One isolate gave a positive result when amplified using universal primer for gram positive bacteria. Further study need to be done to improve optimum degradation condition as well as to better characterize the bacteria obtained.

Keywords: caffeine, 16S rDNA, *phlD*, *gyrB*.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Degradasi Limbah Padat Industri Kopi

**Gabriella Anindita
31110004**

**Fakultas Bioteknologi, Program Studi Biologi
Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta**

ABSTRAK

Meningkatnya pembangunan kedai kopi di Yogyakarta memberikan dampak peningkatan akumulasi dan kemungkinan kontaminasi kafein. Kafein merupakan salah satu senyawa rekalsitran yang sulit untuk didegradasi. Namun, ada beberapa mikroorganisme yang mampu mendegradasi senyawa ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi secara molekuler bakteri potensial yang mampu mendegradasi kafein. Sampel limbah diambil dari sampel tanah yang terkontaminasi limbah kafein. Isolat yang didapat diseleksi menggunakan medium pertumbuhan selektif khusus untuk kafein. Selain itu dilakukan uji biokimia dan studi mikrokosmos untuk mengetahui kemampuan isolat terhadap kafein. Identifikasi bakteri secara molekuler dilakukan menggunakan pasangan primer spesifik untuk *Pseudomonas* sp, dan *Enterobacteriaceae* yang menarget gen-gen 16s rDNA, *phlD*, dan *gyrB*, serta primer universal untuk deteksi bakteri gram positif.

Berdasarkan hasil penelitian, ditemukan dua isolat potensial yang termasuk dalam bakteri gram positif dan berbentuk batang. Hasil dari studi mikrokosmos menunjukkan bahwa kedua isolat dapat tumbuh pada medium dengan konsentrasi kafein sebesar 10%. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui kondisi optimal kemampuan degradasi bakteri terhadap kafein, serta memastikan jenis bakteri.

Kata Kunci: kafein, 16S rDNA, *phlD*, *gyrB*.

Isolation and Identification of Degrading Bacteria in Coffee Grounds

Gabriella Anindita
31110004

Faculty of Biotechnology, Dept. of Biology
Duta Wacana Christian University, Yogyakarta

ABSTRACT

The increased number of coffee shop in Yogyakarta give rise to the accumulation and possible contamination of caffeine. It is already known that caffeine is consider as one of the recalcitrant molecule which is not easy to be degraded. However, some microorganisms are able to degrade this molecule.

This research was done with the objective to isolate potential bacteria able to degrade caffeine, and molecularly identify them. Samples are collected from solid waste caffeine-contaminated soil. Bacterial isolation was done by mean of selective media; the resulting isolates were then biochemically tested and microcosm study were set up. Identification of the bacteria were performed by specific primer pairs targeting 16S rDNA, *phlD*, and *gyrB* genes of *Pseudomonas* sp and *Enterobacteriaceae*, and also universal primer for gram positive bacteria.

Two potential isolates for caffeine degradation were obtained, both of gram positive bacil. Microcosm studies showed they were able to grow and degrade caffeine up to 10%. Molecular identification with primer pairs commonly used for *Pseudomonas* sp and *Enterobacteriaceae* confirmed that the two isolates are not the member of those bacteria. One isolate gave a positive result when amplified using universal primer for gram positive bacteria. Further study need to be done to improve optimum degradation condition as well as to better characterize the bacteria obtained.

Keywords: caffeine, 16S rDNA, *phlD*, *gyrB*.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Industri kuliner merupakan salah satu industri yang saat ini berkembang pesat di Indonesia, terutama pada daerah-daerah tujuan wisata. Industri kuliner ini meliputi makanan dan minuman dari Nusantara. Saat ini industri minuman mengalami peningkatan baik dalam segi kuantitas maupun jenis minuman yang dijual. Kedai atau warung kopi merupakan contohnya. Di kota-kota besar terjadi pembangunan kedai atau warung kopi yang cenderung tinggi, khususnya di Kota Yogyakarta. Pada tahun ini, kedai kopi dapat ditemui di setiap penjuru kota Yogyakarta. Dari data yang ada terdapat sekitar 71 kedai atau warung kopi besar yang akan dibangun di Yogyakarta (Karunasari, 2012).

Peningkatan pembangunan kedai atau warung kopi ini tidak diimbangi dengan pemikiran pembangunan sistem pengolahan limbah industri tersebut. Akibatnya limbah padat produksi kopi ini langsung dibuang ke selokan atau badan sungai. Jika demikian, akan terjadi penumpukan limbah kopi yang semakin meningkat dan akan membuat badan sungai tercemar. Selain limbah cair kopi yang dihasilkan, terdapat pula limbah padat, seperti ampas kopi yang juga dibuang. Pembuangan ampas kopi ini tidak jauh berbeda dengan pembuangan limbah cair kopi. Ampas kopi yang sudah tidak terpakai lagi biasanya hanya dibuang pada tanah atau sekitar lokasi kedai kopi. Akibatnya terjadi penumpukan ampas kopi di tanah sekitar kedai kopi dan lebih lanjut mencemari tanah sekitarnya.

Pembuangan ampas kopi yang berlebihan ke tanah juga mengakibatkan kondisi tidak ideal pada tanah sebagai media pertumbuhan tanaman. Hal ini terlihat dari tanah lokasi pengambilan sampel yang tidak ditumbuhi tanaman. Berbeda dengan kondisi tanah di dekat pembuangan ampas kopi, tanah ini ditumbuhi dengan tanaman-tanaman lain.

Kafein merupakan senyawa yang terdapat pada kopi. Kafein juga termasuk salah satu senyawa toksik yang sulit diurai dengan sendirinya. Akibatnya limbah kafein ini tidak dapat langsung dibuang pada badan sungai ataupun tanah karena dapat mempengaruhi ekosistem akuatik dari badan sungai tersebut (Gummadi *et al*, 2012). Sifatnya yang memiliki kelarutan tinggi menyebabkan senyawa ini mudah terdeposit

dalam tanah. Dengan demikian adanya penambahan sedikit kafein saja, akan mempengaruhi konsentrasi maupun pH tanah.

Senyawa seperti kafein, yang sulit untuk diurai di alam dengan sendirinya disebut sebagai senyawa yang rekalsitran. Senyawa rekalsitran umumnya sulit diurai karena sudah berikatan dengan molekul lain sehingga perlu peran khusus dari mikrobia. Mikrobia yang mampu mengurai senyawa rekalsitran merupakan mikrobia yang telah resisten terhadap senyawa rekalsitran tersebut.

Peran dari mikrobia, seperti bakteri maupun fungi dibutuhkan untuk memecah senyawa kafein dalam tanah. Pada prinsipnya terdapat jenis mikrobia tertentu yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa kafein yang terdeposit dalam tanah. Senyawa kafein ini sendiri tidak terlalu disukai oleh mikrobia dalam bermetabolisme. Meskipun demikian, mikrobia tersebut apabila terpaksa, menggunakan kafein sebagai sumber karbon dalam melakukan metabolisme. Beberapa bakteri yang mampu memecah kafein adalah *Pseudomonas* sp, *Serratia* sp, dan *Bacillus* sp sedangkan fungi yang berperan adalah kelompok *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Stemphylium* sp, *Rhizopus* sp, dan *Phanerochaete* sp (Gummadi *et al.* 2012; Dash & Gummadi 2006).

Penelitian ini menggunakan limbah ampas kopi dari kedai kopi yang berada di sekitar Babarsari, Yogyakarta. Limbah ampas kopi yang digunakan langsung diambil dari limbah buangan ampas kopi yang sudah menumpuk di samping kedai kopi tersebut. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa limbah ampas kopi sudah mengalami kontak yang cukup lama dengan tanah. Pengambilan limbah ampas kopi dilakukan dengan perbedaan kedalaman pengambilan sampel dengan tujuan untuk mencari jenis mikrobia yang mampu hidup dan menggunakan ampas kopi dalam metabolisme.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Mengidentifikasi jenis mikroorganisme yang mampu mendegradasi limbah kafein dengan melakukan isolasi terhadap mikroorganisme yang tumbuh pada limbah kafein. Selain itu juga diuji kemampuan mikroorganisme yang didapat dalam mendegradasi limbah kafein.

1.3. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi jenis bakteri yang berperan dalam degradasi kafein dengan menggunakan penanda molekuler.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

1. Memperkaya koleksi mikrobial kandidat pendegradasi senyawa kafein.
2. Menjadi pertimbangan pihak kedai kopi ketika membuang limbah ampas kopi agar ditangani dengan baik.

©UKDW

BAB V

KESIMPULAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan mengenai isolasi dan identifikasi bakteri yang berperan dalam degradasi limbah kafein, dapat disimpulkan bahwa pada 3 jenis sampel yang diambil (bagian atas ampas kopi, bagian tengah antara ampas kopi dengan tanah, dan bagian bawah tanah) diperoleh 2 jenis isolat yang memiliki kemampuan memanfaatkan kafein sebagai sumber karbon. Berdasarkan uji biokimia yang telah dilakukan kedua isolat diduga merupakan kelompok bakteri *Bacillus* sp. Uji molekular yang dilakukan menunjukkan bahwa isolat A termasuk dalam kelompok bakteri gram positif.

Meskipun demikian perlu dilakukan uji penegasan pada kedua isolat sehingga dapat diketahui lebih pasti spesies kedua isolat tersebut. Selain itu, perlu dilakukan uji biodegradasi dan pengukuran konsentrasi kafein pada kedua isolat pada konsentrasi kafein 10% - 15% sehingga dapat diketahui kemampuan optimal kedua isolat dalam mendegradasi kafein.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation, Second Edition. Academic Press. New York.
- Ashiahra H, Monteiro AM, Gillies FM, Crozier A. 1996. Biosynthesis of Caffeine in Leaves of Coffee. *Plant Physiol* (11) : 747 – 753.
- Babu VS, Patra S, Thakur M, Karanth N, Varadaraj M. 2005. Degradation of Caffeine by *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708. *Enzyme and Microbial Technology* (37): 617-624.
- Dash SS, Gummadi SN. 2006. Catabolic Pathways and Biotechnological Applications of Microbial Caffeine Degradation. *Biotechnology Letters* (28) : 1993 – 2002. doi 10.1007/a10529-006-9196-2.
- Fan YF, Xu Y, Yue RL, Xin QZ, Borthakur D, Jian LL. 2011. Isolation and characterization of high caffeine-tolerant bacterium strains from the soil of tea garden. *African Journal of Microbiology Research* 5(16), pp.2278–2286.
- Fewson CA. 1988. Biodegradation of Xenobiotic and Other Persistent Compounds: The Causes of Recalcitrant. *TIBTECH* Vol 6: 143-153.
- Karunasari, VD. 2012. Pola Sebaran Café Hotspot di Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Kim JS, Mele PM, Crowley DE. 2013. Application of PCR primer sets for detection of *Pseudomonas* sp. functional genes in the plant rhizosphere. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* 02(01): 8–15.
- Gibson AM, Morgan RM, Nikitin AG. 2009. The Effect of Caffeine on the Bacterial Populations in Aquarium System. *Student Summer Scholar* (31) : 1 – 6.
- Gummadi SN, Bhavya B, Ashok N. 2012. Physiology, biochemistry and possible application of microbial caffeine degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* (93) : 525 – 554. doi 10.1007/s00253-011-3737-x.
- Hilson EI. 2015. Sekuen Parsial Gen *rpoB* dan *gyrB* sebagai Penanda Genetik Potensial untuk Deteksi Molekuler *Enterobacteriaceae* pada Sampel Air. Skripsi. Fakultas Bioteknologi. Universitas Kristen Duta Wacana. Yogyakarta
- Olama Z, El-Mched F, Holail H. 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.

- Ogunseitán OA. 2002. Caffeine – inducible enzyme activity in *Pseudomonas putida* ATCC 700097. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (18) : 423 – 428.
- Rompere A, Servais P, Baudart J, de-Roubin, Marie-Renee, Laurent P. 2002. Detection and Enumeration of Coliforms in Drinking Water: Current Methods and Emerging Approaches. *Journal Microbiol.Method* 49: 31 – 54.
- Satwika D, Hilson EI, Prana RA. 2015. *In silico* study for molecular detection of Enterobacteriaceae from drinking water. Proceeding International Conference on Biosciences. Bogor
- Sumitha J, Sivakumar T. 2013. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from West Karnataka, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 2 (8): 338–346.
- Timmis KN, Pieper DH. 1999. Bacteria Designed for Bioremediation. *National Research Centre for Biotechnology* vol 17: 201-204.
- Wangke, GA. 2007. Biodegradasi Fluoranthene oleh Isolat Indigenous dari Sampel yang Tercemar Hidrokarbon. Skripsi. Fakultas Biologi. Universitas Kristen Duta Wacana. Yogyakarta.
- Chi YL, Louie TM, Summers R, Kale Y, Gopishetty S, Subramanian M. 2009. Two Distinct Pathways for Metabolism of Theophylline and Caffeine are Coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5. *Journal of Bacteriology* 191 (14) : 4624 – 4632. Doi 10.1128/JB.00409-09.