



**ANALISIS POLIMORFISME DAN DESAIN PRIMER *ndmA*  
BAKTERI PENDEGRADASI KAFEIN**

**SKRIPSI**

**Oleh**

**Nadia Nisa Tasania  
201810401041**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
JURUSAN BIOLOGI  
2025**



**ANALISIS POLIMORFISME DAN DESAIN PRIMER *ndmA*  
BAKTERI PENDEGRADASI KAFEIN**

*diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar sarjana pada  
program studi Biologi*

**SKRIPSI**

**Oleh**

**Nadia Nisa Tasania  
201810401041**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
JURUSAN BIOLOGI  
2025**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ibu Ni Komang Budiasih dan Bapak Asari yang telah membesarkan saya dengan penuh kasih sayang, kerja keras, kesabaran, serta doa yang selalu tercurahkan hingga skripsi ini dapat diselesaikan.
2. Adik Nanda Hannifa, Bude Ni Made Suardi, Kakak Sepupu I Putu Eka Dharma Soecita dan Ni Made Pratiwi Puspawati, terima kasih karena selalu memberikan motivasi, dukungan, dan doa untuk saya.
3. Guru, dosen, dan tenaga pendidik yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan hingga perguruan tinggi.
4. Almater Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

## **MOTTO**

Janganlah bersedih, sesungguhnya Allah bersama kita (Terjemahan Surat At-Taubah Ayat 40)<sup>1</sup>

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. (Terjemahan Surat Al-Insyirah Ayat 5)\*

Jatuh tujuh, bangun delapan (Terjemahan Peribahasa Jepang Nana Korobi Ya Oki)

---

<sup>1</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Al Qur'an dan Terjemah*. Bandung: Hilal

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nadia Nisa Tasania

NIM : 20181041041

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *Analisis Polimorfisme dan Desain Primer ndmA Bakteri Pendegradasi Kafein* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, Januari 2025

Yang menyatakan,

(Meterai Rp 10.000,00)

(Nadia Nisa Tasania)

NIM 201810401041

## HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi berjudul *Analisis Polimorfisme dan Desain Primer ndmA Bakteri Pendegradasi Kafein* telah diuji dan disetujui pada:

Hari :  
Tanggal :  
Tempat :

### Tim Penguji

Ketua,

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

Anggota II,

Prof. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.  
NIP 196805031994011001

Anggota I,

Dr. Sutoyo, M.Si.  
NIP 196610141992031002

Anggota III,

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.  
NIP 199009062019031014

Penulis : Nadia Nisa Tasania  
Program Studi : Biologi  
Judul : Analisis Polimorfisme dan desain Primer *ndmA* Bakteri  
Pendegradasi kafein

## ABSTRAK

Enzim N-demetilase berperan dalam mengkatalisis kafein menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui jalur metabolisme N-demetilasi yang dihasilkan oleh bakteri pendegradasi kafein. Enzim ini bekerja dengan memutus ikatan gugus N-metil pada kafein dan memiliki spesifisitas substrat yang luas, dikodekan oleh gen *ndmA*. Studi tentang polimorfisme *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein penting untuk membantu mengidentifikasi enzim tertentu. Penelitian ini dilakukan secara *in silico* menggunakan berbagai *software* dan situs web bioinformatika. Data sekuen *ndmA* yang diperoleh dari NCBI GeneBank dianalisis terhadap polimorfismenya menggunakan *software* DnaSP6 dan *software* BioEdit yaitu dengan metode *multiple alignment* ClustalW. Desain primer *ndmA* dilakukan menentukan konsensus gen *ndmA* bakteri pendegradasi kafein dari hasil *alignment*. Kandidat primer kemudian dianalisis untuk memastikan kesesuaian dengan standar primer ideal menggunakan NEB Tm Calculator, OligoCalc, dan FastPCR untuk uji *in silico* PCR. Hasil penelitian menunjukkan adanya polimorfisme gen *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein, dengan 386 situs polimorfik yang terdiri dari 239 *singleton variable sites* dan 147 *parsimony informative sites*. Analisis alignment gen *ndmA* menunjukkan adanya SNP tipe transisi dan transversi tanpa polimorfisme in-del. Desain primer dari gen *ndmA* telah memenuhi standar primer ideal dengan panjang basa 22bp untuk primer *forward* dan 19bp untuk primer *reverse*, suhu Tm 59°C, dan GC content 50% untuk primer *forward* dan 58% untuk primer *reverse*, serta tidak ditemukan pembentukan struktur sekunder. Uji *in silico* PCR menunjukkan bahwa kedua primer dapat menempel pada template dengan hasil amplikon sebesar 209bp.

Kata kunci: *NdmA*, Polimorfisme, Primer

Author : Nadia Nisa Tasania  
Study Program : Biology  
Title : *Polymorphism Analysis and Primer Design of ndmA Caffeine Degrading Bacteria*

## ABSTRAK

N-demethylase enzymes play a role in catalyzing caffeine into simpler compounds through the N-demethylation metabolic pathway produced by caffeine-degrading bacteria. This enzyme works by breaking the N-methyl group bond on caffeine and has broad substrate specificity, encoded by the *ndmA* gene. The study of *ndmA* polymorphism in caffeine-degrading bacteria is important to help identify specific enzymes. This study was conducted in silico using various bioinformatics software and websites. The *ndmA* sequence data obtained from NCBI GeneBank was analyzed for polymorphism using DnaSP6 software and BioEdit software, namely the ClustalW multiple alignment method. *ndmA* primer design was performed with consensus area from alignment result. Primer candidates were then analyzed to ensure compatibility with ideal primer standards using NEB Tm Calculator, OligoCalc, and FastPCR for in silico PCR tests. The results showed the polymorphism of *ndmA* gene in caffeine degrading bacteria, with 386 polymorphic sites consisting of 239 singleton variable sites and 147 parsimony informative sites. Alignment analysis of the *ndmA* gene showed the presence of transition and transversion type SNPs without in-del polymorphism. The designed primers met the ideal primer standard with a base length of forward primer is 22bp and reverse primer is 19bp, Tm of 59°C, GC content of 50% for the forward primer and 58% for the reverse primer, and did not form secondary structures. The in silico PCR test showed that the primers could attach to the template with an amplicons yield of 209 bp.

Keywords: *NdmA*, Polymorphysm, Primers

## RINGKASAN

*Analisis Polimorfisme dan Desain Primer ndmA Bakteri Pendegradasi Kafein*; Nadia Nisa Tasania; 201810401041; 2025; halaman; Program Studi Sarjana Biologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Enzim N-demetilase merupakan enzim yang berperan dalam mengatalisis kafein menjadi senyawa yang lebih sederhana. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri pendegradasi kafein yaitu melalui jalur metabolisme N-Demtilasi. Enzim N-Demetilase merupakan kompleks enzim yang bekerja dengan memutus ikatan gugus N-metil pada kafein. Enzim N-Demetilase A dikodekan oleh gen *ndmA* yang memiliki kemampuan spesifisitas substrat yang luas. Studi tentang polimorfisme *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein penting dipelajari untuk membantu dalam mengidentifikasi enzim N-demetilase pada bakteri pendegradasi kafein.

Penelitian ini dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan *software* dan *website* bioinformatika. Data sekuen *ndmA* yang telah dikoleksi melalui *website* NCBI GeneBank dianalisis terhadap polimorfisme yang terjadi menggunakan *software* DnaSP untuk mengetahui situs polimorfisme dan metode *ClustalW multiple alignment* menggunakan *software* BioEdit untuk mengetahui tipe polimorfisme yang terjadi. Desain primer *ndmA* dilakukan dengan menggunakan *software* FastPCR untuk merancang kandidat primer *ndmA* dari *Pseudomonas fulva* i14\_MX. Desain primer yang terpilih akan dianalisis untuk memastikan kesesuaian dengan standar primer ideal menggunakan *website* NEB Tm Calculator dan OligoCalc, serta *software* FastPCR untuk uji *in silico* PCR.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat polimorfisme gen *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein, dimana terdapat 386 situs polimorfik yang terdiri *singleton variable sites* sebanyak 239 situs dan *parsimony informative site* sebanyak 147 situs. Hasil analisis tersebut didukung dengan hasil pemeriksaan *alignment* gen *ndmA* berupa SNP dengan tipe transisi dan transversi, namun tidak ditemukan polimorfisme in-del. Desain primer menggunakan konsensus gen *ndmA* menghasilkan primer yang terdiri dari (5'-CGATTGTGAAGAGCGCTATG-3') sebagai primer *forward* dan (5'-CAAACAGCGTGCCTGGATG-3') sebagai primer

*reverse*. Kedua primer tersebut telah memenuhi standar primer ideal untuk primer *forward* dan *reverse* yaitu dengan komponen pada primer panjang basa 22bp untuk primer *forward* dan 19bp untuk primer *reverse*, suhu  $T_m$  59°C, GC content primer *forward* 50% dan primer *reverse* 58%, selain itu tidak ditemukan adanya pembentukan struktur sekunder dari desain primer. Hasil uji *in silico* PCR menunjukkan bahwa kedua primer dapat menempel pada *template* dengan hasil amplikon yaitu 209bp.

## PRAKATA

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Analisis Polimorfisme dan Desain Primer *ndmA* Bakteri Pendeградasi Kafein”**. Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Skripsi ini dapat diselesaikan karena adanya dukungan serta bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Dra. Retno Wimbaningrum, M.Si. selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.
2. Dr. Sattya Arimurti, S.P., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Sutoyo, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan tenaga untuk memberikan ilmu, bimbingan, saran, dan motivasi selama proses penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Prof. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. selaku Dosen Penguji I dan Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan dukungan, saran, arahan kepada penulis.
4. Dr. Esti Utarti, S.P., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis menjadi mahasiswa.
5. Seluruh dosen Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah mengajarkan ilmu pengetahuan yang berguna selama penulis menjadi mahasiswa
6. Orang tua penulis yaitu Ibu Ni Komang Budiasih dan Bapak Asari, serta saudari penulis Nanda Hannifa yang selalu memberikan dukungan dan doa kepada penulis sehingga penyusunan skripsi dapat diselesaikan.
7. Gendis Mayrannisa Setiawan yang memberikan semangat serta energi positif kepada penulis untuk tetap bertahan hingga saat ini.
8. Sahabat-sahabatku Anggraeni Alvia Syahrani, Andrea Wanda Frida, Intan Kartika Putri, Salma Syifa Azizah, Nuraini Puspitaningrum Shinta Kirana,

Indah Nuzulul Rohma, dan Prima Harmadi yang selalu memberikan semangat, motivasi, dan bantuan kepada penulis hingga saat ini.

9. Teman-teman angkatan 2020 Biophilia yang telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis.

Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat dan segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dibalas oleh Allah SWT. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, sehingga penulis menerima berbagai kritik dan saran demi menyempurnakan skripsi ini.

Jember, Januari 2025

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERSEMBAHAN.....	ii
MOTTO .....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN .....	v
ABSTRAK .....	vi
ABSTRAK .....	vii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Batasan Penelitian .....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	2
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN TEORI.....</b>	<b>4</b>
2.1 Bakteri Pendegradasi Kafein.....	4
2.2 Enzim Dekafeinase.....	4
2.3 Gen <i>ndmA</i> Sebagai Pengkode Enzim N-Demetilase.....	5
2.4 Polimorfisme Genetik .....	7
2.5 Desain Primer.....	8
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>10</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	10
3.2 Alat dan Bahan .....	10
3.3 Desain Penelitian.....	11
3.4 Prosedur Penelitian.....	11
3.4.1. Koleksi Sekuen Gen <i>ndmA</i> di GeneBank.....	11
3.4.2. Alignment Sekuens DNA.....	12
3.4.3. Persiapan Desain Primer.....	12
3.4.4. Analisis Desain Primer .....	13
3.5 Metode Analisis.....	13
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>14</b>
4.1 Koleksi Data <i>ndmA</i> .....	14

4.2 Analisis Polimorfisme <i>ndmA</i> .....	14
4.3 Desain Primer Spesifik <i>ndmA</i> .....	16
4.4 Analisis Kualitas Primer <i>ndmA</i> Hasil Desain Primer.....	17
4.4.1. Analisis suhu <i>T<sub>m</sub></i> dan <i>GC content</i> .....	17
4.4.2. Analisis Pembentukan Struktur Sekunder .....	18
4.4.3. Simulasi <i>In Silico PCR</i> .....	18
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>20</b>
5.1 Kesimpulan.....	20
5.2 Saran.....	20
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>21</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>26</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Karakteristik kandidat primer ( <i>forward</i> dan <i>reverse</i> ) .....	17
Tabel 4.2 Simulasi in silico PCR pada gen <i>ndmA</i> bakteri pendegradasi kafein ...	19

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme degradasi kafein melalui jalur N-Demetilasi (Sumber: Summers dkk., 2015) .....	5
Gambar 2.2 Mekanisme degradasi kafein melalui jalur N-Demetilasi (Sumber: Summers dkk., 2015) .....	5
Gambar 2.3 Struktur kristal <i>ndmA</i> ) dan <i>ndmB</i> (Sumber: Kim dkk., 2019) .....	6
Gambar 4.1 Hasil analisis situs polimorfik gen <i>ndmA</i> dengan <i>software</i> DnaSP6 .....	15

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Spesies Bakteri Pendedradasi kafein dari Berbagai <i>Database</i> . 26	26
Lampiran 2. Sekuen Gen <i>ndmA</i> pada Bakteri Pendegradasi Kafein ..... 27	27
Lampiran 3. Hasil <i>Alignment</i> Gen <i>ndmA</i> pada Bakteri Pendegradasi Kafein..... 31	31
Lampiran 4. Tipe substitusi Nukleotida pada SNP Gen <i>ndmA</i> ..... 34	34

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bakteri pendegradasi kafein merupakan bakteri yang mampu memanfaatkan kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen (Ashihara dkk., 2008). Kemampuan bakteri ini didukung oleh keberadaan enzim N-Demetilase yang dimiliki oleh bakteri tersebut. Enzim ini mampu mendegradasi kafein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana melalui jalur N-demetilasi dengan menghilangkan gugus metil pada kafein dan mengubahnya menjadi senyawa yang seperti theobromine, 7-metil xantin, dan xantin. Dalam bidang industri, enzim tersebut dimanfaatkan untuk proses dekafeinasi kopi (Summers dkk., 2015; Lin dkk., 2023).

Enzim N-Demetilase merupakan kompleks enzim yang terdiri enzim-enzim yang dikodekan oleh gen *ndmA*, *ndmB*, *ndmC*, *ndmD*, dan *ndmE*. Dibandingkan dengan enzim yang lain, N-Demetilase A memiliki keunggulan yaitu spesifisitas substrat yang luas, kemampuan tersebut menyebabkan enzim ini mampu mengkatalisis berbagai senyawa turunan xantin seperti paraxantin, metilxantin, teobromin, dan kafein (Summers dkk., 2015; Kim dkk., 2019). Enzim N-Demetilase A disandikan oleh Gen *ndmA*. Menurut Summers dkk. (2012), bahwa *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein memiliki ukuran berkisar antara 900 hingga 1500 bp. Ukuran panjang basa nukleotida dari suatu sekuens DNA bakteri sangat beragam, hal ini menimbulkan potensi terjadinya variasi genetik.

Variasi yang terjadi pada basa nukleotida dalam suatu gen dapat diartikan sebagai polimorfisme. Polimorfisme dapat terjadi pada *ndmA* mengingat adanya genus yang berbeda dari bakteri pendegradasi kafein. Menurut Mock dan Summers (2024) genus bakteri pendegradasi kafein yang ditemukan adalah *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klavisella*, *Microbacterium*, *Paraburkholderia*, dan *Salinivibrio*. Polimorfisme genetik dapat terjadi karena variasi sejumlah sekuens DNA yang

repetitif (*length polymorphism*) dan *single nucleotide polymorphism* (SNP) (Rivolta dan Targovnik, 2006; Mahama dan Suryandari, 2023).

Polimorfisme nantinya akan diwariskan kepada keturunan dan hanya akan mempengaruhi fungsi, metabolisme, transporter, reseptor, dan target potensial enzim tanpa mengubah struktur kompleks enzim tersebut (Flordellis dkk., 2004). Berdasarkan Mock dan Summers (2024), bahwa penelitian terkait bakteri pendegradasi kafein sudah banyak dilakukan, namun diantara penelitian tersebut belum banyak yang berkaitan dengan *ndmA* sebagai gen pengkode enzim N-Demetilase. Pemahaman terkait polimorfisme pada gen *ndmA* penting untuk dipelajari lebih lanjut, karena dapat mempengaruhi aktivitas dari enzim N-Demetilase. Studi terkait polimorfisme *ndmA* dapat membantu dalam mengidentifikasi enzim yang berperan dalam degradasi kafein oleh bakteri pendegradasi kafein. Proses identifikasi diawali dengan perancangan desain primer spesifik gen *ndmA* untuk mengidentifikasi enzim melalui proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Apakah terdapat polimorfisme gen *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein?
2. Bagaimana hasil desain primer spesifik gen *ndmA*?

## 1.3 Batasan Penelitian

Batasan dari penelitian ini yaitu analisis polimorfisme *ndmA* sebagai gen pengkode enzim N-Demetilase berdasarkan hasil alignment dan pemeriksaan situs polimorfik dan pembuatan desain primer spesifik untuk enzim N-Demetilase.

## 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu menganalisis polimorfisme gen *ndmA*, dan merancang desain primer gen *ndmA* yang spesifik untuk bakteri pendegradasi kafein.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Hasil dari penelitian ini diharapkan memberikan pengetahuan terkait adanya polimorfisme pada bakteri pendegradasi kafein. Penelitian ini juga diharapkan dapat menghasilkan desain primer spesifik untuk *ndmA* sebagai gen pengkode enzim N-Demetilase yang berperan untuk proses dekafeinasi. Perancangan primer spesifik diharapkan dapat membantu penelitian lebih lanjut yaitu untuk mengidentifikasi gen *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein. Penelitian ini juga diharapkan akan memberikan referensi kepada mahasiswa maupun peneliti untuk penelitian selanjutnya.

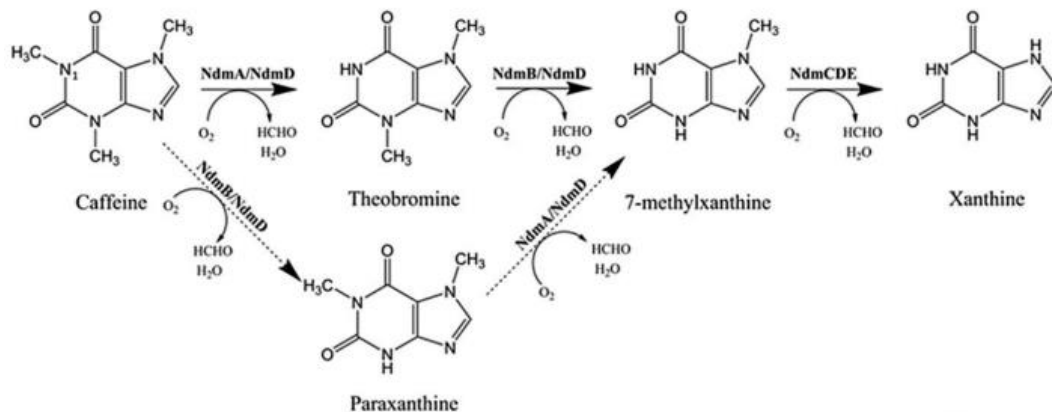
## **BAB 2. TINJAUAN TEORI**

### **2.1 Bakteri Pendegradasi Kafein**

Bakteri pendegradasi kafein dapat digunakan untuk membantu proses dekafeinasi secara biologi. Bakteri ini akan memanfaatkan kafein sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk proses metabolisme dan pertumbuhannya (Summers dkk., 2012). Sebanyak 79 bakteri teridentifikasi mampu mendegradasi kafein, 37 diantaranya berasal dari genus *Pseudomonas* (Mock dan Summers, 2024). Berikut merupakan beberapa strain bakteri yang telah teridentifikasi sebagai bakteri pendegradasi kafein seperti *Pseudomonas putida* CBB5 (Summers dkk., 2012), *Pseudomonas monteilii* KRM9 (Arimurti dkk., 2018), *Pseudomonas japonica* C9 (Iswanto dkk., 2019), *Pseudomonas monteilii* KAJ36 (Arimurti dkk., 2020) dan *Paraburkholderia caffeinilytica* CF1 (Sun dkk., 2020). Bakteri pendegradasi kafein diketahui dapat menghasilkan enzim yang membantu proses dekafeinasi. Pemanfaatan bakteri pendegradasi dalam proses dekafeinasi dinilai lebih menguntungkan jika dibandingkan dengan proses fisik maupun kimiawi yang memerlukan bahan khusus dan biaya yang lebih mahal (Iswanto dkk., 2019).

### **2.2 Enzim Dekafeinase**

Enzim dekafeinase merupakan enzim yang mampu mendegradasi kafein melalui jalur metabolisme yaitu jalur metabolisme N-Demetilasi. Jalur N-Demetilasi jalur metabolisme yang umum ditemui pada bakteri, seperti *Pseudomonas* sp. dan *Serratia* sp. N-Demetilasi merupakan mekanisme degradasi kafein dengan menghilangkan gugus metil pada kafein dengan bantuan enzim N-Demetilase (Summers dkk., 2015; Lin dkk., 2023). Mekanisme tersebut ditunjukkan pada alur degradasi kafein oleh *Pseudomonas putida* CBB5 berikut (Gambar 2.2).

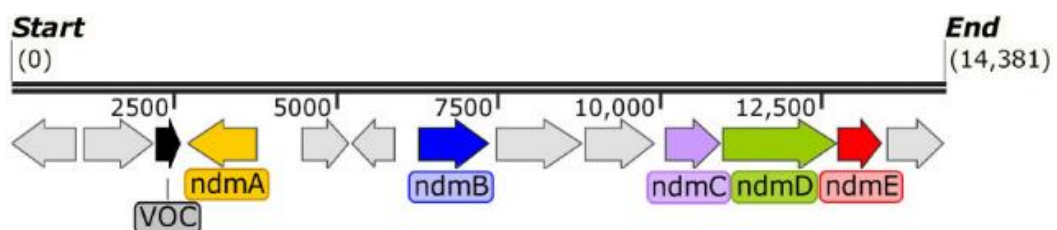


Gambar 2.1 Mekanisme Degradasi Kafein Melalui Jalur N-Demetilasi (Sumber: Summers dkk., 2015)

Jalur metabolisme N-Demetilasi melibatkan enzim N-demetilase. Enzim ini berperan dalam memecah gugus N-Metil (CH<sub>3</sub>) untuk membentuk xantin. Senyawa xantin selanjutnya akan dioksidasi menjadi *uric acid* oleh xantin oksidase. Asam urat kemudian akan diubah menjadi allantoin, sedangkan allantoin akan dihidrolisis menjadi urea dan asam glikolat (Lin dkk., 2023).

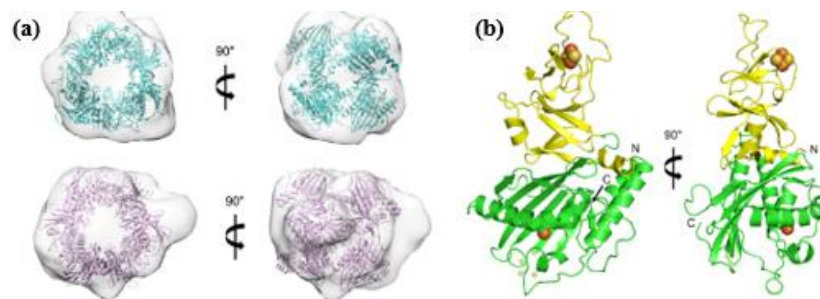
### 2.3 Gen *ndmA* Sebagai Pengkode Enzim N-Demetilase

Enzim N-Demetilase berperan penting dalam proses degradasi kafein oleh bakteri melalui jalur metabolisme N-Demetilasi. Terdapat lima enzim yang berperan dalam mengatalisis kafein pada mekanisme N-Demetilasi, yaitu enzim N-Demetilase ABCDE (Gambar 2.3). Kelima enzim tersebut teridentifikasi pada bakteri *P. putida* CBB5. Masing-masing enzim tersebut secara berurutan dikodekan oleh gen *ndmA*, *ndmB*, *ndmC*, *ndmD*, dan *ndmE* (Summers dkk., 2015).



Gambar 2.2 Susunan Gen *ndm* pada Bakteri *Pseudomonas* sp. (Sumber: Summers dkk., 2015)

Gen *ndmCDE* merupakan heterotrimer yaitu gen yang tersusun dari tiga sub unit yang bergabung membentuk suatu kompleks enzim (Mock dan Summers, 2024). *ndmAB* merupakan gen yang memiliki ukuran dan struktur yang serupa. Kedua tersebut merupakan kompleks homoheksamer (Gambar 2.4 a) yang berperan menginisiasi dua tahapan pertama dari proses N-Demetilasi. *ndmA* dan *ndmB* mengkodekan enzim yang tidak memiliki spesifisitas substrat, sehingga kedua enzim tersebut mampu mendegradasi berbagai senyawa metilxantin (Ma dkk., 2018).



Struktur homoheksamer *ndmA* (cyan) dan *ndmB* (ungu); (b) Struktur monomer *ndmA*  
Gambar 2.3 Struktur Kristal *ndmA* dan *ndmB* (Sumber: Kim dkk., 2019)

Gen *ndmA* merupakan kelompok *Rieske monooxygenase* yang mengandung *nonheme iron* aktif pada bagian tengah. *Rieske nonheme iron oxygenases* (ROs) berperan dalam mengkatalisis raksi oksigenasi awal senyawa aromatik. Struktur monomer *ndmA* (Gambar 2.4 b), berdasarkan peranannya terbagi menjadi dua domain. Bagian N-terminal (ditunjukkan dengan warna kuning) mengandung gugus *Rieske* [2Fe-2S] untuk menerima elektron dari komponen transfer elektron lainnya. Bagian C-terminal (ditunjukkan dengan warna hijau) mengandung *nonheme iron center* (Kim dkk., 2019; Lin dkk., 2023).

Perbedaan antara enzim N-Demetilase A dan N-Demetilase B yaitu terdapat pada substrat yang mampu dikatalisis dalam proses demetilasi, serta efisiensi dalam proses demetilasi tersebut. N-Demetilase A mampu mengkatalisis N-1 Demetilasi dari kafein, theophylline, paraxantin, dan 1-metilxantin, menjadi teobromin, 3-metilxantin, 7-metilxanthin, and xantin. N-Demetilase B mampu mengkatalisis N-3 Demetilasi dari beberapa senyawa seperti kafein, theophylline, teobromin, dan 3-

metilxantin, yang menghasilkan paraxantin, 7-metilxantin, 1-metilxantin, and xantin. Berdasarkan efisiensi katalisis N-Demetilase A mampu mengatalis kafein lebih efisien apabila dibandingkan dengan N-Demetilase B (Kim dkk., 2019).

## 2.4 Polimorfisme Genetik

Variasi genetik umum dijumpai antar individu, variasi tersebut dapat berupa *small insertions and deletion*, polimorfisme (nukleotida tunggal), dan variasi struktural (Mahama dan Suryandari, 2023). Istilah polimorfisme mengacu pada berbagai variasi komposisi basa nukleotida dalam suatu gen (Rivolta dan Targovnik, 2006). Polimorfisme merupakan perubahan pada gen yang menyebabkan adanya variasi pada fungsi suatu protein. Perubahan tersebut tidak mempengaruhi struktur protein. Polimorfisme genetik yang terjadi akan diteruskan kepada keturunan dalam sekuen DNA, sehingga frekuensi polimorfisme dapat berbeda-beda (Hewagama dan Richardson, 2009; Triwani dan Saleh, 2015).

Menurut Flordellis dkk. (2004), bahwa polimorfisme genetik diartikan sebagai variasi genetik yang umum terjadi. Hal ini dapat berdampak pada fungsi metabolisme, transporter, reseptor dan target potensial enzim. Polimorfisme gen merupakan perubahan yang terjadi pada sekuen DNA pada suatu populasi yang umum dengan frekuensi lebih dari 1% (Chiarella dkk., 2020). Polimorfisme genetik umumnya terbagi menjadi dua tipe yaitu *single nucleotide polymorphism* (SNP) dan polimorfisme insersi-delesi (Teama, 2018). SNP pada sekuen DNA dapat terjadi karena adanya substitusi DNA. Substitusi DNA terbagi menjadi tipe transisi dan transversi, tipe transisi terjadi apabila terdapat substitusi basa purin dengan basa purin lainnya atau basa pirimidin dengan basa pirimidin lainnya. Tipe transversi terjadi karena adanya substitusi basa purin dengan pirimidin atau sebaliknya (Aisah dkk., 2015). Analisis polimorfisme dapat dilakukan secara *in silico* menggunakan *software* bioinformatika yaitu BioEdit dan DnaSP (Teama, 2018; Rani dkk., 2024). Metode yang digunakan dari *software* tersebut yaitu *Multiple Sequence Alignment* (MSA) merupakan metode yang digunakan untuk memprediksi kesamaan dan homologi dari beberapa sekuen DNA. Metode *alignment* dilakukan untuk

mengetahui tingkat homologi, variabilitas genetik, dan identifikasi sekuen (Chenna dkk., 2003; Suyono, 2010)

## 2.5 Desain Primer

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik dalam biologi molekuler yang bertujuan untuk mengamplifikasi atau menggandakan DNA secara *in vitro* (Setyawati dan Zubaidah, 2021). Primer merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi selektifitas PCR. Primer merupakan segmen DNA dalam bentuk untai tunggal yang komplemen dengan sekuens *template* DNA (Maftuchah dkk., 2015). Sepasang primer oligonukleotida (primer *forward* dan *reverse*) yang akan dipolimerisasi harus menempel pada sekuens target yaitu pada kedua ujung fragmen yang akan diamplifikasi (Lodge dkk., 2007). Dasar yang digunakan dalam melakukan desain primer yaitu urutan basa yang diduga memiliki kemiripan dengan basa sekuens target. Urutan basa fragmen dari berbagai strain akan disejajarkan untuk mengetahui homologi yang tinggi antar strain. Daerah ini disebut juga sebagai daerah lestari atau *conserved area*. Desain primer yang telah dirancang akan dianalisis dengan menggunakan *website* seperti NEB Tm Calculator dan OligoCalc. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kemungkinan terjadinya dimerisasi serta mengetahui *GC content* dan *melting temperature* pada desain primer yang telah dibuat. Umumnya panjang primer yang optimal untuk proses PCR yaitu 18-24 mer (basa) (Sasmito dkk., 2014; Refai, 2023).

Primer universal umumnya digunakan untuk mengamplifikasi suatu gen, karena primer ini memiliki kemampuan untuk mengamplifikasi daerah DNA yang ditargetkan di berbagai individu dalam kelompok organisme tertentu (Haider, 2011). Primer universal umum digunakan karena memberikan kemudahan dalam penggunaannya, namun dalam beberapa kasus primer universal mengamplifikasi daerah non spesifik. Hal ini ditunjukkan dari penelitian yang dilakukan oleh Sumampow dkk. (2015) bahwa primer universal yang digunakan dalam penelitian tersebut tidak cukup spesifik untuk mengamplifikasi sekuen target. Perancangan desain primer secara spesifik bertujuan untuk meningkatkan spesifisitas dari amplifikasi, apabila sekuen target telah diketahui primer spesifik dapat dirancang

untuk memaksimalkan amplifikasi. Primer yang spesifik memberikan peluang dalam menghindari terjadinya *mispriming* pada proses amplifikasi (Robertson dan Walsh-Weller, 1998).

## **BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

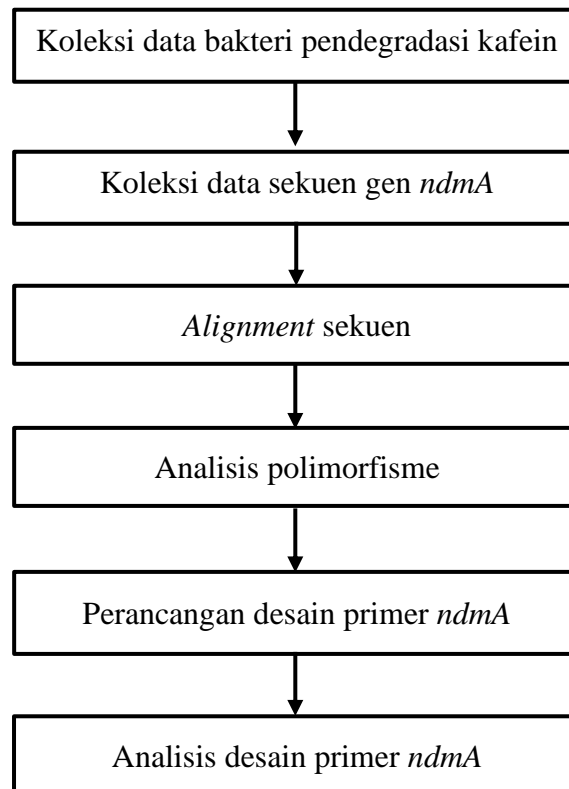
Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober hingga bulan Desember 2024. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

### **3.2 Alat dan Bahan**

Penelitian ini menggunakan sekuen bakteri pendegradasi kafein yang digunakan bersumber dari *National Centre of Biotechnology Information* (NCBI) dan *European National Archive* (ENA) *GeneBank*. *Software* yang digunakan pada penelitian yaitu BioEdit 7.2.5, DnaSP6, dan FastPCR versi 6.9.12. *Website* yang digunakan untuk mendukung penelitian ini seperti OligoCalc, dan NEB Tm Calculator.

### 3.3 Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan berdasarkan rancangan penelitian yang sesuai dengan diagram alir sebagai berikut:



### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1. Koleksi Sekuen Gen *ndmA* di GeneBank

Koleksi data sekuen gen *ndmA* bakteri pendegradasi kafein NCBI GeneBank. Sekuen DNA dikoleksi berdasarkan *accession number* yang tertera pada jurnal ke kolom pencarian *website* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>). Data sekuens DNA akan diunduh dalam format fasta, kemudian setiap sekuens akan disatukan ke dalam *notepad*.

### 3.4.2. *Alignment* Sekuens DNA

*Alignment* sekuens dilakukan dengan menggunakan *software* BioEdit versi 7.2.5. Sekuens DNA yang telah dikumpulkan akan di impor ke *software* BioEdit dengan menekan menu file kemudian *new alignment*. Data sekuens gen *ndmA* akan disejajarkan dengan menekan menu *accessory application*. Metode *alignment* yang akan digunakan yaitu *ClustalW Multiple Alignment*.

### 3.4.4 Analisis Polimorfisme

Hasil dari *alignment* sekuen gen *ndmA* akan dianalisis adanya polimorfisme dengan menggunakan *software* DnaSP6. Analisis polimorfisme dilakukan dengan memilih *polymorphism site* pada menu *analysis*. Tahapan berikutnya yaitu memeriksa adanya polimorfisme gen *ndmA* dari hasil *alignment* yaitu berupa polimorfisme insersi-delesi yang ditunjukkan dari adanya gap pada hasil *alignment* dan polimorfisme nukleotida tunggal (SNP). Polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) ditunjukkan dengan adanya perubahan pasang basa nukleotida tunggal berupa berupa substitusi yang terlihat pada daerah non konservatif pada hasil *alignment*.

### 3.4.3. Persiapan Desain Primer

Tahapan ini diawali dengan penentuan pencarian sekuens gen *ndmA* *Pseudomonas fulva* strain il14\_MX pada website NCBI GeneBank. Sekuens yang diperoleh akan diunduh dalam format fasta. Pembuatan desain primer dilakukan secara manual dengan menentukan konsensus dari hasil *multiple sequence alignment* (MSA). Penentuan konsensus dilakukan dengan menentukan wilayah yang paling konservatif pada hasil *alignment*. Konsensus yang telah ditentukan akan digunakan sebagai kandidat desain primer. Kandidat desain primer akan dianalisis pada tahapan selanjutnya untuk memastikan primer yang dirancang telah sesuai dengan persyaratan primer yang ideal.

#### 3.4.4. Analisis Desain Primer

Desain primer yang telah dibuat akan dilakukan simulasi *in silico* PCR dengan menggunakan *software* FastPCR versi 6.9.12. Primer yang telah dibuat kemudian diperiksa nilai *GC content*, *melting temperature*, dan pembentukan struktur sekunder melalui website *Oligo Calculator* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) dan NEB Tm Calculator (<https://tmcalsculator.neb.com/>).

### 3.5 Metode Analisis

Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif berdasarkan tabel, gambar, dan histogram yang telah diperoleh. Hasil *alignment* akan digunakan untuk menganalisis polimorfisme gen *ndmA*. Hasil pembuatan desain primer dianalisis secara deskriptif terhadap struktur sekunder, *melting temperature*, *GC content*, dan hasil *in silico* PCR.

## **BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **4.1 Koleksi Data *ndmA***

Koleksi data dilakukan melalui jurnal untuk mengumpulkan spesies bakteri pendegradasi kafein. Berdasarkan pencarian tersebut diperoleh sebanyak 4 genus bakteri pendegradasi kafein yaitu genus *Brachybacterium* (Ceja-Navarro dkk., 2015), *Parabukloderia* (Sun dkk., 2020), *Pseudomonas* (Summers dkk., 2012), dan *Salinsvibrio* (Ceja-Navarro dkk., 2015). Bakteri pendegradasi tersebut tergolong ke dalam 16 spesies bakteri pendegradasi kafein yang ditunjukkan pada tabel Lampiran 1. Tahapan berikutnya yaitu proses identifikasi data bakteri pendegradasi kafein yang memiliki gen *ndmA* sebagai gen pengkode enzim N-Demetilase. Hasil identifikasi diperoleh sebanyak 2 genus yaitu *Parabukloderia* (Sun dkk., 2020) dan *Pseudomonas* (Summers dkk., 2012) yang tergolong ke dalam 10 spesies bakteri pendegradasi kafein. Berdasarkan data tersebut dilakukan koleksi data sekuen *ndmA* melalui *website database* NCBI dan ENA kepada 10 sekuen dari bakteri pendegradasi kafein, seperti yang ditunjukkan pada tabel Lampiran 2.

### **4.2 Analisis Polimorfisme *ndmA***

Polimorfisme merupakan variasi genetik pada suatu urutan basa nukleotida dalam suatu gen. Analisis polimorfisme diawali dengan *alignment* gen *ndmA* bakteri pendegradasi kafein (Lampiran 3.) yang dilanjutkan dengan analisis situs polimorfik dengan *software* DnaSP6 dengan hasil seperti ditunjukkan pada Gambar 4.1.

```

Polymorphic Sites
Input Data File: C:\...\[ALIGNMENT] NdmA.gene.10.SP.fas
Number of sequences: 10   Number of sequences used: 10
Selected region: 1-1071   Number of sites: 1071
Total number of sites (excluding sites with gaps / missing data): 901

Sites with alignment gaps or missing data: 170
Invariable (monomorphic) sites: 515
Variable (polymorphic) sites: 386 (Total number of mutations: 499)
Singleton variable sites: 239
Parsimony informative sites: 147

Singleton variable sites (two variants): 183
Site positions: 22 24 28 29 31 37 42 48 54 57 63 70 83
88 99 111 113 114 117 120 129 132 135 142 149 155 158
160 162 181 189 192 201 211 212 213 216 217 218 223 228
230 231 232 233 234 235 243 249 259 264 267 268 272 276
283 284 286 287 289 303 304 312 315 321 328 329 355 356
357 367 373 378 384 385 388 389 394 402 405 417 427 429
430 432 435 438 442 445 451 472 478 486 487 490 504 519
531 537 544 558 561 567 570 591 592 603 606 612 628 629
632 633 638 648 663 664 669 670 672 675 676 677 678 696
703 707 708 711 713 717 720 721 725 728 733 735 738 742
747 750 759 765 768 769 770 772 775 776 786 789 792 802
804 808 811 812 814 815 816 825 826 831 837 843 849 855
858 864 879 882 885 888 895 896 898 901 902 904 905 912
919 921

Parsimony informative sites (two variants): 104
Site positions: 33 36 39 45 60 75 78 91 84 87 109 119 128
136 159 165 168 176 180 183 186 220 226 227 239 240 252
261 269 271 279 285 300 306 322 323 324 334 339 348 354
364 369 376 379 392 393 395 414 420 423 428 437 456 459
465 474 480 501 510 513 522 528 534 549 552 555 576 588
589 600 609 613 618 624 639 642 646 660 666 693 699 712
726 741 744 753 756 762 763 780 783 793 798 819 822 840
846 852 870 873 897 903 915

Singleton variable sites (three variants): 42
Site positions: 30 69 96 100 102 105 138 141 153 156 195 210 219
224 255 291 294 330 363 387 390 439 450 453 462 477 483
546 573 597 615 645 654 714 732 771 773 801 850 900 909
918

```

Gambar 4.1 Hasil Analisis Situs Polimorfik Gen *ndmA* dengan *Software* DnaSP6

Berdasarkan analisis polimorfisme *ndmA* dari 10 sekuen bakteri pendegradasi kafein diperoleh sebanyak 515 situs monomorfik dan 386 situs polimorfik. Situs polimorfisme gen *ndmA* terdiri atas *singleton variable site* (SP) sejumlah 239 posisi dan *parsimony informative site* (PIPs) sejumlah 147 posisi. Situs monomorfik merupakan situs hasil *alignment* yang tidak mengalami perubahan basa nukleotida, sedangkan situs polimorfik merupakan situs yang mengalami perubahan nukleotida. SP merupakan posisi dimana terdapat dua nukleotida yang berbeda, namun salah satunya hanya muncul sebanyak satu kali. PIPs merupakan posisi dimana setidaknya terdapat dua jenis nukleotida yang muncul sebanyak dua kali (Hiariej, 2017). Adanya SP dan PIPs menunjukkan bahwa gen *ndmA* dari 10 bakteri pendegradasi kafein memiliki variasi genetik yang merujuk pada polimorfisme gen. Adanya situs polimorfisme juga terjadi pada hasil polimorfisme gen *Xa21*, *Xa26* dan *xa5* pada bakteri yang resisten pada hawar tanaman padi (Bimolata dkk., 2015). Proses identifikasi polimorfisme dilakukan untuk mengkonfirmasi tipe polimorfisme yang terjadi pada gen *ndmA* yaitu dengan memeriksa tipe substitusi dari variasi genetik yang terjadi.

Hasil proses validasi polimorfisme terhadap data *alignment* gen *ndmA* pada daerah non-konservatif (Lampiran 3.) yaitu yang dimiliki oleh bakteri

*Pseudomonas* sp. NCIM 5235, *P. caffeinilytica* CF1, *P. putida* CBB5, dan *P. fulva* IMX4 yaitu ditemukan adanya polimorfisme nukleotida tunggal (SNP). Namun tidak ditemukan adanya polimorfisme insersi-delesi. SNP yang muncul pada hasil *alignment* berupa substitusi DNA dengan tipe transisi dan transversi (Lampiran 4.). Variasi genetik tersebut termasuk ke dalam polimorfisme nukleotida tunggal (SNP). SNP mengacu pada adanya substitusi pasangan basa nukleotida di lokasi tertentu dalam suatu genom. Hal ini berkontribusi terhadap variasi genetik yang tampak di berbagai populasi (Thomson, 2013; Michael-Asalu dkk., 2019). SNP disebabkan karena adanya substitusi DNA yang mengakibatkan perbedaan gen, dimana substitusi tersebut dapat berupa substitusi transisi ataupun substitusi transversi. Menurut Aisah dkk. (2015), bahwa variasi DNA tipe transisi terjadi apabila terdapat substitusi basa purin dengan basa purin lainnya atau basa pirimidin dengan basa pirimidin lainnya. Tipe transversi terjadi karena adanya substitusi basa purin dengan pirimidin atau sebaliknya.

### 4.3 Desain Primer Spesifik *ndmA*

Sekuens gen *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein yang akan digunakan sebagai kandidat untuk desain primer dipilih berdasarkan hasil proses *alignment* sekuen dan analisis polimorfisme yang telah dilakukan pada tahapan sebelumnya. Perancangan desain primer ditentukan berdasarkan konsensus atau daerah paling konservatif pada hasil *alignment* (Lampiran 3.). Tingkat konservatif gen *ndmA* yang tinggi pada kandidat *template* sekuen memberikan peluang yang tinggi terhadap primer untuk menempel pada sekuen gen *ndmA* target pada bakteri lainnya (Brodin dkk., 2013). Berdasarkan hasil *alignment* daerah konsensus yang dipilih sebagai kandidat primer yaitu posisi 321-342bp untuk primer *forward* dan posisi 511-529bp untuk primer *reverse*. Urutan kandidat sekuen primer *forward* yaitu (5'-CGATTGTGAAGAGCGCTATG-3') dan sekuen primer *reverse* yaitu (5'-CAAACAGCGTGCCTGGATG-3') dengan karakter primer yang ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Karakteristik Kandidat Primer (*Forward* Dan *Reverse*)

No	Karakter Primer	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
1	Panjang Primer (bp)	22	19
2	T <sub>m</sub> (°C)	59	59
3	GC%	50	58
4	Hasil Uji <i>Hairpin</i>	-	-
5	Hasil Uji <i>Self-Dimer</i>	-	-

Keterangan: (-) tidak terdapat pembentukan struktur sekunder

Hasil akhir desain primer menunjukkan bahwa primer *forward* memiliki panjang basa 22bp, sedangkan primer *reverse* memiliki panjang basa 19bp. Panjang basa tersebut sudah sesuai dengan panjang basa yang optimal pada primer yang umumnya berkisar antara 18-24bp. Panjang basa suatu primer akan mempengaruhi spesifisitas target suatu primer (Refai, 2023). Primer yang memiliki panjang basa yang berada di bawah rata-rata dapat menyebabkan terjadinya *mispriming*. *Mispriming* merupakan kondisi suatu primer menempel pada area yang tidak (Maitriani dkk., 2015). Panjang basa primer yang terlalu panjang dapat menyebabkan penurunan spesifisitas primer, terjadinya hibridisasi dengan primer lain, dan menghambat polimerisasi DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

#### 4.4 Analisis Kualitas Primer *ndmA* Hasil Desain Primer

Analisis kualitas primer terpilih dianalisis berdasarkan suhu T<sub>m</sub>, GC *content*, pembentukan struktur sekunder dan simulasi *in silico* PCR, sehingga dapat diketahui kesesuaiannya sebagai primer yang ideal.

##### 4.4.1. Analisis suhu T<sub>m</sub> dan GC *content*

Estimasi kualitas primer dengan *website* NEB T<sub>m</sub> Calculator dilakukan estimasi suhu *melting temperature* dan GC *content* pada masing-masing primer tersebut. Suhu T<sub>m</sub> dari rancangan kedua primer tersebut adalah sama, yaitu pada suhu 59°C (Tabel 4.2). Suhu T<sub>m</sub> primer tersebut sudah memenuhi kriteria primer yang baik. Hal ini sesuai dengan Elsalam (2003), bahwa hasil amplifikasi terbaik biasanya diperoleh jika primer memiliki T<sub>m</sub> sebesar 52-60°C. Suhu T<sub>m</sub> yang baik memiliki selisih suhu berkisar 5°C (Saraswati dkk., 2019). Suhu leleh atau *melting*

*temperature* ( $T_m$ ) merupakan temperatur primer ketika setengah dari untaian ganda DNA akan terpisah menjadi utas tunggal (Messe dkk., 2020).

Persentase GC *content* dari primer *forward* yaitu sebanyak 50%, sedangkan pada primer *reverse* yaitu sebanyak 58% (Tabel 4.1). Persentase GC *content* yang pada suatu primer berperan penting terhadap kualitas primer. GC *content* merupakan jumlah kandungan basa guanin dan sitosin dalam suatu primer, jumlah basa guanin dan sitosin akan mempengaruhi titik leleh primer. Persentase basa GC yang baik umumnya berkisar antara 40-60% (Sasmito dkk., 2014). Kandungan basa GC yang terlalu tinggi akan mengakibatkan pemisahan untai DNA lebih sulit, hal ini disebabkan karena ikatan antara basa guanin dan sitosin lebih kuat jika dibandingkan ikatan basa adenin dan timin. GC *content* yang terlalu rendah akan berdampak pada *inefisiensi* primer, hal ini disebabkan karena dominasi basa adenin dan timin yang memiliki ikatan yang lebih lemah menyebabkan penempelan primer pada template menjadi tidak maksimal (Maitriani dkk., 2015).

#### 4.4.2. Analisis Pembentukan Struktur Sekunder

Hasil analisis pembentukan struktur sekunder primer dilakukan pada *website* OligoCalc untuk mengetahui pembentukan struktur sekunder yaitu *hairpin* dan *self-dimerization* pada primer. Hasil tersebut menunjukkan bahwa primer yang telah dirancang tidak membentuk *hairpin* dan *self-dimerization* (Tabel 4.1). Desain primer yang baik seharusnya tidak mengandung struktur sekunder yang dapat menyebabkan *mispriming* dengan *template* DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

#### 4.4.3. Simulasi *In Silico* PCR

Analisis lanjutan pada primer yang telah dirancang yaitu simulasi *in silico* PCR ke 10 sekuen gen *ndmA* bakteri pendegradasi kafein menggunakan *software* FastPCR. Simulasi *in silico* PCR dapat membantu dalam memberi prediksi terhadap lokasi penempelan primer pada proses amplifikasi, sehingga dapat meminimalisir kesalahan pada saat melakukan PCR secara *in vitro* (Messe dkk., 2020; Purwakasih dan Achyar, 2021). Berdasarkan hasil simulasi *in silico* PCR diketahui bahwa

primer tersebut mampu menempel pada 8 spesies bakteri pendegradasi kafein (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Simulasi *In Silico* PCR pada Gen *ndmA* Bakteri Pendegradasi Kafein

No	Spesies	Posisi Penempelan Primer		Produk Amplikon
		<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
1	<i>Pseudomonas fulva</i> i14_MX	321→342	511←529	209bp
2	<i>Pseudomonas fulva</i> iMX49	321→342	511←529	209bp
3	<i>Pseudomonas fulva</i> iMX4	321→342	511←529	209bp
4	<i>Pseudomonas fulva</i> i1_MX	321→342	511←529	209bp
5	<i>Pseudomonas fulva</i> i7_MX	321→342	511←529	209bp
6	<i>Pseudomonas fulva</i> iJ_MX	321→342	511←529	209bp
7	<i>Pseudomonas fulva</i> i18_MX	321→342	511←529	209bp
8	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	342→363	532←550	209bp
9	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	-	-	-
10	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	-	-	-

Keterangan: (-) primer tidak dapat menempel pada sekuen target

Berdasarkan (Tabel 4.2) ukuran produk amplikon 8 gen *ndmA* bakteri pendegradasi kafein memiliki panjang 209bp. Hal ini sesuai dengan Refai (2023), bahwa standar produk amplikon yang ideal yaitu antara 100-500 pasang basa. Tujuan lain dilakukannya simulasi *in silico* PCR yaitu untuk mengetahui daerah penempelan primer pada keseluruhan sekuen target. Primer yang telah dirancang belum mampu menempel pada sekuen gen *ndmA* yang berasal dari bakteri *P. putida* CBB5 dan bakteri *P. caffeinilytica* CF1. Hal tersebut disebabkan karena tingginya polimorfisme gen pada kedua bakteri tersebut, sehingga sulit untuk memperoleh daerah dengan tingkat konservatif yang tinggi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa primer yang dirancang pada penelitian ini masih bersifat spesifik pada genus tertentu, namun sudah mampu menempel pada spesies dan strain yang berbeda. Primer yang digunakan untuk mengidentifikasi enzim N-Demetilase pada umumnya menggunakan primer yang spesifik hanya kepada sekuen gen *ndmA* dari satu spesies bakteri. Hal ini ditunjukkan dari penelitian Summers dkk. (2012), bahwa desain primer enzim N-Demetilase dirancang dari sekuen gen *ndmA* dari bakteri *P. putida* CBB5.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Polimorfisme genetik pada 10 sekuen gen *ndmA* menunjukkan adanya polimorfisme *ndmA* berupa SNP yang terdiri dari tipe substitusi transisi dan transversasi. Desain primer *ndmA* dari konsensus bakteri pendegradasi kafein menghasilkan primer *forward* yaitu (5'-CGATTGTGAAGAGCGCTATG-3') dan sekuen primer *reverse* yaitu (5'-CAAACAGCGTGCCTGGATG-3') yang telah memenuhi persyaratan primer ideal. Hasil tersebut didukung dengan hasil *in silico* PCR yang menunjukkan bahwa desain primer mampu menempel pada 8 *template* sekuen *ndmA* bakteri pendegradasi kafein .

### 5.2 Saran

Pengujian lanjutan terhadap primer pada penelitian ini perlu dilakukan secara *in vitro*, disertai optimasi kondisi PCR, hingga proses sekuensing. Hal tersebut dilakukan untuk memastikan kemampuan primer dalam mengidentifikasi gen *ndmA* pada bakteri pendegradasi kafein lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aisah, I., E. Kurniadi, dan E. Carnia. 2015. Representasi mutasi kode genetik standar berdasarkan basa nukleotida. *Jurnal Matematika Integratif*. 11(1):25.
- Arimurti, S., T. Ardyati, Y. Nurani, T. A. Siswoyo, dan S. Suharjono. 2018. Degradation of caffeine by *Pseudomonas monteilii* KRM9. *Malaysian Journal Microbiology*. 14(1):55–60.
- Arimurti, S., R. Billa Afifuddin, S. Siswanto, dan K. Muzakhar. 2020. Characterization and identification of caffeine-degrading bacteria KAJ36. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*. 36(2):173–179.
- Ashihara, H., H. Sano, dan A. Crozier. 2008. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. 69(4):841–856.
- Bimolata, W., A. Kumar, M. Sai Kiran Reddy, R. M. Sundaram, G. S. Laha, I. A. Qureshi, dan A. G. Irfan. 2015. Nucleotide diversity analysis of three major bacterial blight resistance genes in rice. *PLoS ONE*. 10(3):1–19.
- Brodin, J., M. Krishnamoorthy, G. Athreya, W. Fischer, P. Hraber, C. Gleasner, L. Green, B. Korber, dan T. Leitner. 2013. A multiple-alignment based primer design algorithm for genetically highly variable dna targets. *BMC Bioinformatics*. 14(1):1.
- Ceja-Navarro, J. A., F. E. Vega, U. Karaoz, Z. Hao, S. Jenkins, H. C. Lim, P. Kosina, F. Infante, T. R. Northen, dan E. L. Brodie. 2015. Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nature Communications*. 6(1):1-9.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, dan J. D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31(13):3497–3500.
- Chiarella, P., P. Capone, dan R. Sisto. 2020. *The Role of Genetic Polymorphisms in the Occupational Exposure*. dalam *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms*. Frankfurt: BoD-Books on Demand.
- Elsalam, K. A. A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*. 2(5):91–95.

- Flordellis, C., A. Manolis, M. Scheinin, dan H. Paris. 2004. Clinical and pharmacological significance of  $\alpha$ 2-adrenoceptor polymorphisms in cardiovascular diseases. *International Journal of Cardiology*. 97(3):367–372.
- Haider, N. 2011. Chloroplast-specific universal primers and their uses in plant studies. *Biologia Plantarum*. 55(2):225–236.
- Handoyo, D. dan A. Rudiretna. 2001. Prinsip umum dan pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas*. 9(1):17–29.
- Hewagama, A. dan B. Richardson. 2009. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*. 33(1):3–11.
- Hiariej, A. 2017. Characterization of *rbcl* gene sequences in tingkat langit banana (*Musa troglodytarum* l.) from Maluku. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 8(3):249–253.
- Iswanto, T., M. Shovitri, A. Altway, T. Widjaja, D. I. Kusumawati, dan 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.
- Kim, J. H., B. H. Kim, S. Brooks, S. Y. Kang, R. M. Summers, dan H. K. Song. 2019. Structural and mechanistic insights into caffeine degradation by the bacterial N-Demethylase complex. *Journal of Molecular Biology*. 431(19):3647–3661.
- Lin, Z., J. Wei, Y. Hu, D. Pi, M. Jiang, dan T. Lang. 2023. Caffeine synthesis and its mechanism and application by microbial degradation, a review. *Foods*. 12(14):1–16.
- Lodge, J., P. Lund, dan S. Minchin. 2007. *Gene Cloning: Principles and Applications*. Birmingham: Taylor & Francis Group.
- Ma, Y. X., X. H. Wu, H. S. Wu, Z. B. Dong, J. H. Ye, X. Q. Zheng, Y. R. Liang, dan J. liang Lu. 2018. Different catabolism pathways triggered by various methylxanthines in caffeine-tolerant bacterium *Pseudomonas putida* CT25 isolated from tea garden soil. *Journal of Microbiology Ang Biotechnol*. 28(7):1147–1155.

- Maftuchah, A. Winaya, dan A. Zainudin. 2015. *Teknik Dasar Analisis Biologi Molekuler*. Yogyakarta: Deepublish.
- Mahama, C. N. dan D. W. I. A. Suryandari. 2023. Analisis polimorfisme gen dan aplikasinya dalam klinik. *Jurnal Biologi Papua*. 15(1):88–98.
- Maitriani, L. K. B., I. N. Wirajana, dan S. C. Yowani. 2015. DESAIN primer untuk amplifikasi fragmen gen *inba* isolat 134 multidrug resistance tuberculosis (*mdr-tb*) dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*. 3(2):89–96.
- Messe, Y., I. Made Budiarsa, dan H. Laenggeng. 2020. Desain primer *Polymerase Chain Reaction* (PCR) secara *in silico* untuk amplifikasi gen *gyra* extensively drug resistant tuberculosis (*xdr-tb*). *Journal of Biology Science and Education*. 8(2):616–622.
- Michael-Asalu, A., G. Taylor, H. Campbell, L.-L. Lelea, dan R. S. Kirby. 2019. Cerebral palsy. *Advances in Pediatrics*. 66:189–208.
- Mock, M. B. dan R. M. Summers. 2024. Microbial metabolism of caffeine and potential applications in bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*. 135(4):1–26.
- Purwakasih, D. B. dan A. Achyar. 2021. Desain primer dan PCR *in silico* untuk deteksi *Shigella* sp. pada sampel air minum isi ulang. *Jurnal Serambi Biologi*. 6(1):1–6.
- Rani, W. M., R. D. Puspita, N. Sefina, N. Sa'adah, dan A. Afifatul. 2024. Analisis variasi genetik gen 11 hpv-52 menggunakan *rflp* secara *in silico*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*. 4(1):82–96.
- Refai. 2023. *Biologi Molekuler I: Konsep Dan Teori*. Yogyakarta: Deepublish Digital.
- Rivolta, C. M. dan H. M. Targovnik. 2006. Molecular advances in thyroglobulin disorders. *Clinica Chimica Acta*. 374(1):8–24.
- Robertson, J. M. dan J. Walsh-Weller. 1998. An introduction to pcr primer design and optimization of amplification reactions. *Methods in Molecular Biology*. 98(12):121–154.

- Saraswati, H., F. Dwi Wahyuni, P. Bioteknologi, F. Ilmu-ilmu Kesehatan, dan U. Esa Unggul. 2019. Desain primer secara *in silico* untuk amplifikasi gen *cryiii* dari *Bacillus thuringiensis* isolat lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 3(1):33–38.
- Sasmito, D. E. K., R. Kurniawan, dan I. Muhimmah. 2014. Karakteristik primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk sekuensing dna: mini review. *Seminar Informatika Medis 2014*. 93–102.
- Setyawati, R. dan S. Zubaidah. 2021. Optimasi konsentrasi primer dan suhu annealing dalam mendeteksi gen leptin pada sapi peranakan ongole (po) menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*. 4(1):36.
- Sumampow, T. C. P., B. J. Kolondam, F. R. Mantiri, dan T. E. Tallei. 2015. Pengujian dua pasang primer universal untuk amplifikasi gen cytochrome oxidase i copepoda. *Jurnal MIPA*. 4(1):93–98.
- Summers, R. M., M. Louie, C. Yu, L. Gakhar, K. C. Louie, dan M. Subramanian. 2012. Novel, highly specific n-demethylases enable bacteria to live on caffeine and related purine alkaloids. *Journal Bactriology*. 194(8):2041–2049.
- Summers, R. M., S. K. Mohanty, dan M. Subramanian. 2015. Minireview genetic characterization of caffeine degradation by bacteria and its potential applications. *Microbial Technology*. 8(3):369–378.
- Sun, D., X. Yang, C. Zeng, B. Li, Y. Wang, C. Zhang, W. Hu, dan X. Li. 2020. Novel caffeine degradation gene cluster is mega-plasmid encoded in *Paraburkholderia caffeinilytica* CF1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104(7):3025–3036.
- Suyono, Y. 2010. Penentuan spesies bakteri *Pseudomonas* dan analisis phylogenetic tree secara bioinformatika. *BIOPROPAL INDUSTRI*. 1(2):24–30.
- Teama, S. 2018. *DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine*. dalam Genetic Diversity and Disease Susceptibility. China: InTech Open.
- Thomson, C. D. 2013. Selenium. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2(4):186–192.

Triwani, T. dan I. Saleh. 2015. Single nucleotide polymorphism promoter -765g / c gen cox-2 sebagai faktor risiko terjadinya karsinoma kolorektal. *Biomedical Journal of Indonesia*. 1(1):2–10.

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Spesies Bakteri Pendedradasi kafein dari Berbagai *Database*

No	Spesies	Kode Akses		Sumber Referensi	
		16s r DNA	Gen <i>ndmA</i>	Jurnal	<i>Database</i>
1	<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	KR047782.1	-	Ceja-Navarro dkk., (2015); Leiva dan Alvarado, 2015)	NCBI
2	<i>Salinivibrio</i> sp. GL6	KT378066	-	Ashengroph dkk., (2017b); Ashengroph, (2015)	NCBI
3	<i>Paraburkholderia caffeinilytica</i> CF1	KT607985	MF139149	Sun dkk., (2020); Gao dkk., (2017)	NCBI
4	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951	OQ121628.1	-	Divine dkk., (2014); Gao dkk., (2017)	NCBI
5	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	AY391278	JQ061127	Summers dkk., (2012); Danko dkk., (2004)	NCBI; ENA
6	<i>Pseudomonas monteilii</i> KRM9	KY319030	-	Arimurti dkk., (2018)	NCBI
7	<i>Pseudomonas japonica</i> C9	MK336722	-	Iswanto dkk., (2019)	NCBI
8	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> IH5	NR_029063	-	Ceja-Navarro dkk., (2015); Peix dkk., (2019)	NCBI
9	<i>Pseudomonas fulva</i> i14_MX	KF913741	KF913844	Ceja-Navarro dkk., (2015)	NCBI; ENA
10	<i>Pseudomonas fulva</i> iMX4	KF913843	KF913843	Ceja-Navarro dkk., (2015)	NCBI; ENA
11	<i>Pseudomonas fulva</i> i1_MX	KF913751	KF913842	Ceja-Navarro dkk., (2015)	NCBI; ENA
12	<i>Pseudomonas fulva</i> iMX49	KF913733	KF913840	Ceja-Navarro dkk., (2015)	NCBI; ENA
13	<i>Pseudomonas fulva</i> i7_MX	KF913762	KF913839	Ceja-Navarro dkk., (2015)	NCBI; ENA
14	<i>Pseudomonas fulva</i> iJ_MX	KF913756	KF913838	Ceja-Navarro dkk., (2015)	NCBI; ENA
15	<i>Pseudomonas fulva</i> i18_MX	KF913770	KF913837	Ceja-Navarro dkk., (2015)	NCBI; ENA
16	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	KT455612	MH016237	Dash dan Gummadi, (2006)	NCBI; ENA

Keterangan: (-) sekuen tidak terpublikasi

## Lampiran 2. Sekuen Gen *ndmA* pada Bakteri Pendegradasi Kafein

```
>Pseudomonas fulva i14_MX
AATGACCGTGAATATCTCCGCCACTTTTGGCATCCCGTTTGTACCGTAACGGAAC TGGAG
AAAGCTCACCCCTCGAGTCTTGGGCCAATGGCCGTTACGCTTCTCAGTGAGCAGTTGGTA
GTGGCAAAGCTAGGTGGTGAGTATGTTGCTATGCACGATCGGTGTGCGCATCGATCCGCG
AAGCTCTCGTTGGGTACAATTGCGAACGACCGCCTTCAATGCCCGTATCATGGATGGCAG
TACGACAGCGAGGGCGCTTGCAAAC TGGTGCCGGCTTGTCCCAATAGCCCAATTCCAAAC
CGAGCAAAGTGCAGCGATTTCGATTGTGAAGAGCGCTATGGTCTGATTTGGGTCAGATTA
GACTCAAGCTACGCATGCACTGAAATTCCTTATTTTCAGTGCTGCAAGTGATCCCAGGTTG
CGAATCGTTATCCAAGAACCTTATTGGTGGAACGCAACAGCGGAGCGCCGCTGGGAAAAT
TTCCTGACTTCTCACACTTCGCTTTTATTCATCCAGGCACGCTGTTTGACCCAAATAAT
GCCGAGCCTCCAATCGTCCCAATGGACAGATTCAACGGTCAGTTCCGCTTCATTTATGAT
ACACCTGAGGACATGGCCGTCCCGAACCGAGCGCCCATCGGCTCGTTTCTTATACCTGC
AGCATGCCATTCGCTATCAACCTGGAAGTAGCGAAATACTCAAGTAAATCACTGCATGTC
CTGTTTAAACGTTTTCGTGCCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCTGTATTTGCG
AGGGAGCAAGCTGACGATTCTGATTATCTGCACATTGCCTTTAATGACCTGGTCTTCGCC
GAAGACAAACCAGTGATTGAGTCTCAATGGCCCAAGGATGCTCCTGCTGACGAAGTCTCA
G
```

```
>Pseudomonas fulva iMX4
AATGACCGTGAATATTTCCGCCACTTTTGGCATCCCGTTTGTACCGTAACGGAAC TGGAG
AAAGCTCACCCCTCGAGTCTTGGGCCAATGGCCGTTACGCTTCTCAGTGAGCAGTTGGTA
GTGGCAAAGCTAGGTGGTGAGTATGTTGCTATGCACGATCGGTGTGCGCATCGATCCGCG
AAGCTCTCGTTGGGTACAATTGCGAACGACCGCCTTCAATGCCCGTATCATGGATGGCAG
TACGACAGCGAGGGCGCTTGCAAAC TGGTGCCGGCTTGTCCCAATAGCCCAATTCCAAAC
CGAGCAAAGTGCAGCGATTTCGATTGTGAAGAGCGCTATGGTCTGATTTGGGTCAGATTA
GACTCAAGCTACGCATGCACTGAAATTCCTTATTTTCAGTGCTGCAAGTGATCCCAGGTTG
CGAATCGTTATCCAAGAACCTTATTGGTGGAACGCAACAGCGGAGCGCCGCTGGGAAAAT
TTCCTGACTTCTCACACTTCGCTTTTATTCATCCAGGCACGCTGTTTGACCCAAATAAT
GCCGAGCCTCCAATCGTCCCAATGGACAGATTCAACGGTCAGTTCCGCTTCATTTATGAT
ACACCTGAGGACATGGCCGTCCCGAACCGAGCGCCCATCGGCTCGTTTCTTATACCTGC
AGCATGCCATTCGCTATCAACCTGGAAGTAGCGAAATACTCAAGTAAATCACTGCATGTC
CTGTTTAAACGTTTTCGTGCCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCTGTATTTGCG
AGGGAGCAAGCTGACGATTCTGATTATCTGCACATTGCCTTTAATGACCTGGTCTTCGCC
GAAGACAAACCAGTGATTGAGTCTCAATGGCCCAAGGATGCTCCTGCTGACGAAGTCTCA
G
```

```
>Pseudomonas fulva i1_MX
AATGACCGTGAATATCTCCGCCACTTTTGGCATCCCGTTTGTACCGTAACGGAAC TGGAG
AAAGCTCACCCCTCGAGTCTTGGGCCAATGGCCGTTACGCTTCTCAGTGAGCAGTTGGTA
GTGGCAAAGCTAGGTGGTGAGTATGTTGCTATGCACGATCGGTGTGCGCATCGATCCGCG
AAGCTCTCGTTGGGTACAATTGCGAACGACCGCCTTCAATGCCCGTATCATGGATGGCAG
TACGACAGCGAGGGCGCTTGCAAAC TGGTGCCGGCTTGTCCCAATAGCCCAATTCCAAAC
CGAGCAAAGTGCAGCGATTTCGATTGTGAAGAGCGCTATGGTCTGATTTGGGTCAGATTA
GACTCAAGCTACGCATGCACTGAAATTCCTTATTTTCAGTGCTGCAAGTGATCCCAGGTTG
CGAATCGTTATCCAAGAACCTTATTGGTGGAACGCAACAGCGGAGCGCCGCTGGGAAAAT
TTCCTGACTTCTCACACTTCGCTTTTATTCATCCAGGCACGCTGTTTGACCCAAATAAT
GCCGAGCCTCCAATCGTCCCAATGGACAGATTCAACGGTCAGTTCCGCTTCATTTATGAT
ACACCTGAGGACATGGCCGTCCCGAACCGAGCGCCCATCGGCTCGTTTCTTATACCTGC
AGCATGCCATTCGCTATCAACCTGGAAGTAGCGAAATACTCAAGTAAATCACTGCATGTC
CTGTTTAAACGTTTTCGTGCCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCTGTATTTGCG
AGGGAGCAAGCTGACGATTCTGATTATCTGCACATTGCCTTTAATGACCTGGTCTTCGCC
GAAGACAAACCAGTGATTGAGTCTCAATGGCCCAAGGATGCTCCTGCTGACGAAGTCTCA
G
```

>Pseudomonas fulva iMX49

```
AATGACCGTGAATATCTCCGCCACTTTTGGCATCCCGTTTGTACCGTAACGGAAC TGGAG
AAAGCTCACCCCTCGAGTCTTGGGCCAATGGCCGTTACGCTTCTCAGTGAGCAGTTGGTA
GTGGCAAAGCTAGGTGGTGAAGTATGTTGCTATGCACGATCGGTGTGCGCATCGATCCGCG
AAGCTCTCGTTGGGTACAATTGCGAACGACCGCCTTCAATGCCCGTATCATGGATGGCAG
TACGACAGCGAGGGGCGCTTGCAAAC TGGTGCCGGCTTGTCCCAATAGCCCAATTCCAAAC
CGAGCAAAGTGCAGCGATTTCGATTGTGAAGAGCGCTATGGTCTGATTTGGGTCAGATTA
GACTCAAGCTACGCATGCACTGAAATTCCTTATTTTCAGTGCTGCAAGTGATCCCAGGTTG
CGAATCGTTATCCAAGAACCTTATTGGTGGAACGCAACAGCGGAGCGCCGCTGGGAAAAAT
TTCCTGACTTCTCACACTTCGCTTTTATTTCATCCAGGCACGCTGTTTGACCCAAATAAT
GCCCAGCCTCCAATCGTCCCAATGGACAGATTCAACGGTCAGTTCCGCTTCATTTATGAT
ACACCTGAGGACATGGCCGTCGCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCCTGTTATTTGCG
AGCATGCCATTTCGCTATCAACCTGGAAGTAGCGAAATACTCAAGTAAATCACTGCATGTC
CTGTTTAAACGTTTTCGTGCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCCTGTTATTTGCG
AGGGAGCAAGCTGACGATTCTGATTATCTGCACATTGCTTTAATGACCTGGTCTTCGCC
GAAGACAAACCAGTGATTGAGTCTCAATGGCCCAAGGATGCTCCTGCTGACGAAGTCTCA
G
```

>Pseudomonas fulva i7\_MX

```
AATGACCGTGAATATCTCCGCCACTTTTGGCATCCCGTTTGTACCGTAACGGAAC TGGAG
AAAGCTCACCCCTCGAGTCTTGGGCCAATGGCCGTTACGCTTCTCAGTGAGCAGTTGGTA
GTGGCAAAGCTAGGTGGTGAAGTATGTTGCTATGCACGATCGGTGTGCGCATCGATCCGCG
AAGCTCTCGTTGGGTACAATTGCGAACGACCGCCTTCAATGCCCGTATCATGGATGGCAG
TACGACAGCGAGGGGCGCTTGCAAAC TGGTGCCGGCTTGTCCCAATAGCCCAATTCCAAAC
CGAGCAAAGTGCAGCGATTTCGATTGTGAAGAGCGCTATGGTCTGATTTGGGTCAGATTA
GACTCAAGCTACGCATGCACTGAAATTCCTTATTTTCAGTGCTGCAAGTGATCCCAGGTTG
CGAATCGTTATCCAAGAACCTTATTGGTGGAACGCAACAGCGGAGCGCCGCTGGGAAAAAT
TTCCTGACTTCTCACACTTCGCTTTTATTTCATCCAGGCACGCTGTTTGACCCAAATAAT
GCCCAGCCTCCAATCGTCCCAATGGACAGATTCAACGGTCAGTTCCGCTTCATTTATGAT
ACACCTGAGGACATGGCCGTCGCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCCTGTTATTTGCG
AGCATGCCATTTCGCTATCAACCTGGAAGTAGCGAAATACTCAAGTAAATCACTGCATGTC
CTGTTTAAACGTTTTCGTGCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCCTGTTATTTGCG
AGGGAGCAAGCTGACGATTCTGATTATCTGCACATTGCTTTAATGACCTGGTCTTCGCC
GAAGACAAACCAGTGATTGAGTCTCAATGGCCCAAGGATGCTCCTGCTGACGAAGTCTCA
G
```

>Pseudomonas fulva iJ\_MX

```
AATGACCGTGAATATCTCCGCCACTTTTGGCATCCCGTTTGTACCGTAACGGAAC TGGAG
AAAGCTCACCCCTCGAGTCTTGGGCCAATGGCCGTTACGCTTCTCAGTGAGCAGTTGGTA
GTGGCAAAGCTAGGTGGTGAAGTATGTTGCTATGCACGATCGGTGTGCGCATCGATCCGCG
AAGCTCTCGTTGGGTACAATTGCGAACGACCGCCTTCAATGCCCGTATCATGGATGGCAG
TACGACAGCGAGGGGCGCTTGCAAAC TGGTGCCGGCTTGTCCCAATAGCCCAATTCCAAAC
CGAGCAAAGTGCAGCGATTTCGATTGTGAAGAGCGCTATGGTCTGATTTGGGTCAGATTA
GACTCAAGCTACGCATGCACTGAAATTCCTTATTTTCAGTGCTGCAAGTGATCCCAGGTTG
CGAATCGTTATCCAAGAACCTTATTGGTGGAACGCAACAGCGGAGCGCCGCTGGGAAAAAT
TTCCTGACTTCTCACACTTCGCTTTTATTTCATCCAGGCACGCTGTTTGACCCAAATAAT
GCCCAGCCTCCAATCGTCCCAATGGACAGATTCAACGGTCAGTTCCGCTTCATTTATGAT
ACACCTGAGGACATGGCCGTCGCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCCTGTTATTTGCG
AGCATGCCATTTCGCTATCAACCTGGAAGTAGCGAAATACTCAAGTAAATCACTGCATGTC
CTGTTTAAACGTTTTCGTGCCAATAGACGATACTACGACCAAGAACTTCCTGTTATTTGCG
AGGGAGCAAGCTGACGATTCTGATTATCTGCACATTGCTTTAATGACCTGGTCTTCGCC
GAAGACAAACCAGTGATTGAGTCTCAATGGCCCAAGGATGCTCCTGCTGACGAAGTCTCA
G
```

>Pseudomonas fulva i18\_MX

AATGACCGTGAATATCTCCGCCACTTTTGGCATCCCGTTGTACCGTAACGGAACGGAG  
 AAAGCTCACCCCTCGAGTCTTGGGCCAATGGCCGTTACGCTTCTCAGTGAGCAGTTGGTA  
 GTGGCAAAGCTAGGTGGTGAATATGTTGCTATGCACGATCGGTGTGCGCATCGATCCGCG  
 AAGCTCTCGTTGGGTACAATTGCGAACGACCGCCTTCAATGCCCGTATCATGGATGGCAG  
 TACGACAGCGAGGGCGCTTGCAACTGGTGCCGGCTTGTCCCAATAGCCCAATTCCAAAC  
 CGAGCAAAAGTGCAGCGATTTCGATTGTGAAGAGCGCTATGGTCTGATTTGGGTCAGATTA  
 GACTCAAGCTACGCATGCACTGAAATTCCTTATTTTCAGTGCTGCAAGTGATCCAGGTTG  
 CGAATCGTTATCCAAGAACCTTATTGGTGAACGCAACAGCGGAGCGCCGCTGGGAAAAAT  
 TTCCTGACTTCTCACACTTCGCTTTTATTTCATCCAGGCACGCTGTTTGACCCAAATAAT  
 GCCGAGCCTCCAATCGTCCCAATGGACAGATTCAACGGTCAGTTCCGCTTCATTTATGAT  
 ACACCTGAGGACATGGCCGTCGCGAACCCAGCGCCCATCGGCTCGTTTTCCTATACCTGC  
 AGCATGCCATTTCGCTATCAACCTGGAAGTAGCGAAATACTCAAGTAAATCACTGCATGTC  
 CTGTTTAAACGTTTTTCGTGCCAATAGACGATACTACGACCAAGAAGCTTCTGTATTTGCG  
 AGGGAGCAAGCTGACGATTCTGATTATCTGCACATTGCCTTTAAATGACCTGGTCTTCGCC  
 GAAGACAAACCAGTGATTGAGTCTCAATGGCCCAAGGATGCTCCTGCTGACGAAGTCTCA  
 G

>Pseudomonas putida CBB5

ATGGAACAGGCAATCATTAAATGATGAACGGGAGTATCTTCGCCATTTCTGGCATCCCGTA  
 TGTACTGTAAGTGAAGCTTGAAGGGCGCATCCTTCCAGCCTCGGCCCTTGGCCGTTAAG  
 CTGCTGAATGAACAGCTCGTTGTGCGCAAGCTAGGCGATGAGTACGTGCGGATGCGTGAT  
 AGATGCGCTCATCGATCAGCTAAGCTTTTCTTGGGTACAGTAAGTGGAAACCGCTACAG  
 TGCCCCATACACGGATGGCAATATGATACGCATGGCGCTTGCCAGCTCGTACCAGCGTGC  
 CCCAACAGCCCAATACCCAACAAGGCTAAAGTTGATCGCTTCGATTGCGAAGAACGCTAT  
 GGATTGATTTGGATTTCGATTGGACTCTAGTTTTGACTGCACTGAAATTCCTACTTTAGT  
 GCAGCCAACGATCCTAGGTTGCGTATTGTTATACAAGAACCTTACTGGTGGGATGCGACT  
 GCAGAACGATAGTGGGAAAATTTTACAGATTTTTTCTACTTTGCATTCATTCACCCAGGC  
 ACGCTTTTTTCGATCCAAATAATGCTGAACCTCCAATTGTTCCGATGGATTCGATTCATG  
 CAGTTTTCGGTTTGTCTACGACACCCAGAAGATATGGCTGTCCCAATCAGGCTCCAATT  
 GGTTCATTTTTCGTATACTTGCAGCATGCCGTTTGTCTATTAACCTTGAAGTATCCAAATAC  
 TCCAGCAGTTTCGCTGCATGTGTTATTCAATGTGTTCATGTCCGGTAGACAGCCACACCAG  
 AAAAACTTTCTGATCTTCGCTAGGGAGCAATCGGACGACTCGGATTATCTGCACATTGCA  
 TTTAATGATCTCGTCTTCGCTGAAGACAAACCAGTAATTGAGTCCCAATGGCCTAAAGAC  
 GCGCCAGCAGATGAGGTCTCAGTAGTCGACGATAAGGTATCGATACAATATAGAAAATGG  
 CTGCGGGAACATAAAGAAGCTCATAAAGAAGGTTCAACAAGCCTTCCGAAGTGTCTTTGTTA  
 GACCCAGTCATTGAAAGCGATAGGAGCTACATATAA

>Paraburkholderia caffeinilytica CF1

ATGGAACACCTACCGCTGATTAAGGATAACCAGTACCTCCGGCACTTTTGGCATCCCGTA  
 TGCACGGTGGCCGAGCTTGAAGGGCGAAGCCTTTCGAGTTTTGGTCCGCTGGCAGTTACT  
 CTGCTTAGAGAGCAACTGGTGGTCCGAGGCTGGATGGCAAGTATGTCGCGATGCGGGAC  
 CGATGCGCGCACCGGTCCGGCGAAGCTGTGCTGTGGTTCAGGTGGTTGGCAGCGAACTCCAA  
 TGTCCATAACCACGGCTGGAAATACGACGCGGCGCGCTGCACGAAAAATTCCTGCATGT  
 CCCGACAGCCCCGATTCCGAACAAGGCCCGCGTGAACGCTTCGATTGCGAAGAAAAATAT  
 GGCTTGCTCTGGGTGCGTCTCGACTCGTTCGTTCAACTGCACAGAGATTCCGTATTTTCAGC  
 GCTGCCGATGACCCCAAGATGCGCATTTGCTGTCAGGAGCCGTATTGGTGGAAATGCCCTCT  
 GCGGAGCGTTCGTTGGGAAAACCTTACAGGACTTTTTCGCATTTTCGCTTCATTCACCCGGGC  
 ACGCTCTTCGATCCGAACAACGCAGAGCCTCCCATCGTACCGATGGACC GCGTCAACGGGA  
 CAATTCGGTTTCGTTACGAGACGCCCCCGGCATGGACGTTCCGGACCAGGCGCCGATT  
 GGCACATTTACCTATCACTGCAGCATGCCGTTTCGCTATCAACCTCGCGGTCGAGAAAATAT  
 TCGACCAACTCTCTGCATGTGCTGTTTAAACGTGTGCTGCCGATCGACGAGACACGAACG  
 AAGAATTTCTCATCTTCGCGCGGAGCAAGGAAGTACTCGGACCATCTGCACATTGCA  
 TTTAACGACGTCGTGTTTCGAGAGGACAAGCCGGTTCATCGAATCTCAGTGGCCGGCGCAG  
 ATGATGGCGGACGAGGTGCCAGTGATCACCGACAAGGTGTCTGTTCAATATCGGAAGTGG  
 ATGCGCGAGCTAAGCGAAGCCGCTCGGGACGGTCCCGAGGCATTCAGGCAGCGCTGCAT

GAACCGGTTATCGAAAGTGAGCGACAGTACTCGGACCTGCGGACTGTTTAG

>Pseudomonas sp. NCIM 5235

ATGGAACAGGCAATCATTAAATAATGATCGTGAATACCTTCGCCATTTTTGGCACCCAGTT  
TGTACGGTCACAGAGCTTGAAAAAGCTCATCCGTCAAGTGTGGGGCCCCCTGGCGTCAAG  
CTACTAAATGAGCAGCTTGTAATTGCTAAGCTTGGGGGCGAATACGTCGCAATGCGTGAC  
CGATGTGCGCATCGCTCTGCGAAGCTTTCAGTGGGAACCGTCGCCAACGATCGCTTGCAG  
TGCCCATATCATGGGTGGCAGTACGACACTCAAGGTGCCTGCAAGCTAGTGCCGGCGTGC  
CCAAATAGCCCAATTCCCAATCGAGCCAAGGTCGATCGCTTCGATTGTGAAGAGCGCTAT  
GGTTTGATCTGGGTGAGACTGGATCCAAGCTTTGATTGCACTGAAATTCATACTTCAGC  
GCAGCGAGTAATCCCAAACCTGAGGGTGGTATCCAGGAGCCCTACTGGTGGAACGCAACA  
GCTGAGAGACGTTGGGAAAACCTTCACAGATTTTTCCCACTTTGCATTTATCCATCCAGGC  
ACGTTGTTTGACCCGAATAATGCTGAGCCCCCTATTGTGCCCATGGATCGATTCAAGGGA  
CAGTTCCGGTTCATTTATGACACACCGGAAGACATGGCTGTTCCCTGACCAGGCCCTATT  
GGCTCGTTCTCCTACACCTGCAGCATGCCTTTTTGCAATTAACCTTAGAAGTATCTAAGTAC  
ACCAGCAATTCATTACACGTGCTATTTAACGTTTCATGCCCAGTAGATGATAGCACCACG  
AAAACTTCCTGATTTTTGCAAGGGAGAAAGCGGACGACTCGGATTATCTCCACATAGCC  
TTCAACGACTTGGTCTTTGCTGAAGACAAGCCGGTTATTGAGTCTCAATGGCCGAAAGAT  
GCTCCAGCTGACGAAGTATCTGTTGTCGCCGACAAAGTCTCAATCCAGTATCGAAAATGG  
CTTCGCGAGTTGAAGGAAGCGCATAGGGAAGGAGCCGAAGCGTCCGTAGTGCTTTGCTG  
GACTCGGTCATCGAAAGTGATCGTAGCTACACCTGA

Lampiran 3. Hasil *Alignment* Gen *ndmA* pada Bakteri Pendegradasi Kafein





	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
<i>Pseudomonas fulva</i> i14 MX	A	T	G	G	C	C	A	A	G	G	A	T
<i>Pseudomonas fulva</i> iMX49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Pseudomonas fulva</i> iMX4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Pseudomonas fulva</i> i1 MX	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Pseudomonas fulva</i> i7 MX	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Pseudomonas fulva</i> iJ MX	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Pseudomonas fulva</i> i18 MX	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	.	G	.	A	.	.	.	A	.	.	.	A
<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	.	T	.	A	.	C	.	G	.	A	.	A
<i>Paraburkholderia caffeinilytica</i> CF1	G	.	.	G	.	G	.	G	.	C	.	G
	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070
<i>Pseudomonas fulva</i> i14 MX												
<i>Pseudomonas fulva</i> iMX49												
<i>Pseudomonas fulva</i> iMX4												
<i>Pseudomonas fulva</i> i1 MX												
<i>Pseudomonas fulva</i> i7 MX												
<i>Pseudomonas fulva</i> iJ MX												
<i>Pseudomonas fulva</i> i18 MX												
<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	A	T	G	G	C	T	T	C	G	C	A	G
<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	A	T	G	G	C	T	T	C	G	C	A	G
<i>Paraburkholderia caffeinilytica</i> CF1	G	T	G	G	A	T	G	C	G	A	G	C

Lampiran 4. Tipe substitusi Nukleotida pada SNP Gen *ndmA*

No	Spesies	Posisi	Substitusi	Tipe
1	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	22	A→G	Transisi
2	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	24	T→G	Transversi
3	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	27	C→T	Transisi
4	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	27	C→A	Transversi
5	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	27	C→T	Transisi
6	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	28	C→A	Transversi
7	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	29	G→A	Transisi
8	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	30	T→A	Transversi
9	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	30	T→C	Transisi
10	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	31	G→C	Transversi
11	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	33	A→G	Transisi
12	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	33	A→G	Transisi
13	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	36	T→C	Transisi
14	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	36	T→C	Transisi
15	<i>Pseudomonas fulva</i> iMX4	37	C→T	Transisi
16	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	39	C→T	Transisi
17	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	39	C→T	Transisi
18	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	45	C→T	Transisi
19	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	48	T→C	Transisi
20	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	54	T→C	Transisi
21	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	57	C→A	Transversi
22	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	60	T→A	Transversi
23	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	60	T→A	Transversi
24	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	63	T→C	Transisi
25	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	69	A→C	Transversi
26	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	69	A→G	Transisi
27	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	70	A→G	Transisi
28	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	83	A→G	Transisi
29	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	84	A→G	Transisi
30	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	84	A→G	Transisi
31	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	87	T→G	Transversi
32	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	87	T→G	Transversi
33	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	88	C→A	Transversi
34	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	93	C→G	Transversi
35	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	93	C→T	Transisi
36	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	93	C→T	Transisi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
37	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	96	G→A	Transisi
38	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	96	G→C	Transversi
39	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	99	T→C	Transisi
40	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	100	C→G	Transversi
41	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	100	C→T	Transisi
42	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	105	G→C	Transversi
43	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	105	G→T	Transversi
44	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	108	A→C	Transversi
45	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	108	A→C	Transversi
46	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	108	A→G	Transisi
47	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	111	G→T	Transversi
48	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	113	C→G	Transversi
49	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	104	C→A	Transversi
50	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	117	T→C	Transisi
51	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	120	G→T	Transversi
52	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	128	C→A	Transversi
53	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	128	C→A	Transversi
54	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	129	G→T	Transversi
55	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	132	G→A	Transisi
56	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	135	G→A	Transisi
57	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	138	G→T	Transversi
58	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	138	G→C	Transversi
59	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	142	G→A	Transisi
60	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	149	A→G	Transisi
61	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	160	G→A	Transisi
62	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	162	G→A	Transisi
63	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	165	T→C	Transisi
64	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	165	T→C	Transisi
65	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	176	A→G	Transisi
66	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	176	A→G	Transisi
67	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	176	A→G	Transisi
68	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	180	T→C	Transisi
69	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	180	T→C	Transisi
70	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	181	C→A	Transversi
71	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	186	T→C	Transisi
72	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	186	T→C	Transisi
73	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	189	G→T	Transversi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
74	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	192	T→C	Transisi
75	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	195	A→C	Transversi
76	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	195	A→G	Transisi
77	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	198	C→T	Transisi
78	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	198	C→A	Transversi
79	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	198	C→G	Transversi
80	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	201	G→T	Transversi
81	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	211	T→C	Transisi
82	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	212	T→G	Transversi
83	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	213	G→T	Transversi
84	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	216	T→A	Transversi
85	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	217	A→C	Transversi
86	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	218	C→A	Transversi
87	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	223	G→A	Transisi
88	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	226	A→G	Transisi
89	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	226	A→G	Transisi
90	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	227	A→G	Transisi
91	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	227	A→G	Transisi
92	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	228	C→A	Transversi
93	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	229	G→A	Transisi
94	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	229	G→A	Transisi
95	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	230	A→G	Transisi
96	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	231	C→T	Transisi
97	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	232	C→G	Transversi
98	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	233	G→A	Transisi
99	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	234	C→A	Transversi
100	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	235	C→T	Transisi
101	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	237	T→G	Transversi
102	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	237	T→A	Transversi
103	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	237	T→C	Transisi
104	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	240	A→G	Transisi
105	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	240	A→G	Transisi
106	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	243	C→T	Transisi
107	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	249	T→C	Transisi
108	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	252	T→C	Transisi
109	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	252	T→C	Transisi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
110	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	255	A→G	Transisi
111	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	255	A→C	Transversi
112	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	259	C→A	Transversi
113	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	261	G→A	Transisi
114	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	261	G→A	Transisi
115	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	264	C→T	Transisi
116	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	267	C→T	Transisi
117	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	268	A→G	Transisi
118	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	269	G→C	Transversi
119	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	269	G→C	Transversi
120	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	269	G→C	Transversi
121	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	270	C→T	Transisi
122	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	270	C→G	Transversi
123	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	270	C→G	Transversi
124	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	271	G→C	Transversi
125	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	271	G→C	Transversi
126	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	272	A→C	Transversi
127	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	276	C→T	Transisi
128	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	279	T→C	Transisi
129	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	279	T→C	Transisi
130	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	283	A→C	Transversi
131	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	284	A→C	Transversi
132	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	286	A→C	Transversi
133	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	287	T→A	Transversi
134	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	289	G→A	Transisi
135	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	291	G→A	Transisi
136	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	291	G→T	Transversi
137	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	294	G→A	Transisi
138	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	294	G→T	Transversi
139	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	300	T→C	Transisi
140	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	300	T→C	Transisi
141	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	303	C→A	Transversi
142	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	304	A→G	Transisi
143	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	306	T→C	Transisi
144	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	306	T→C	Transisi
145	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	312	A→G	Transisi
146	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	315	T→A	Transversi
147	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	321	C→T	Transisi
148	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	322	C→A	Transversi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
149	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	322	C→A	Transversi
150	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	323	G→A	Transisi
151	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	323	G→A	Transisi
152	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	324	A→G	Transisi
153	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	324	A→G	Transisi
154	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	328	A→C	Transversi
155	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	329	A→G	Transversi
156	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	330	A→G	Transversi
157	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	330	A→C	Transversi
158	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	336	G→T	Transversi
159	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	336	G→T	Transversi
160	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	336	G→A	Transisi
161	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	354	G→A	Transisi
162	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	354	G→A	Transisi
163	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	355	C→A	Transversi
164	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	356	G→A	Transisi
165	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	357	C→A	Transversi
166	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	363	T→A	Transversi
167	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	363	T→C	Transisi
168	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	364	C→T	Transisi
169	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	364	C→T	Transisi
170	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	364	C→T	Transisi
171	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	367	A→C	Transversi
172	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	369	T→C	Transisi
173	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	369	T→C	Transisi
174	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	373	G→A	Transisi
175	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	376	A→C	Transversi
176	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	376	A→C	Transversi
177	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	378	A→T	Transversi
178	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	379	C→T	Transisi
179	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	379	C→T	Transisi
180	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	381	A→G	Transisi
181	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	381	A→G	Transisi
182	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	381	A→C	Transversi
183	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	384	C→T	Transisi
184	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	385	T→C	Transisi
185	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	387	A→T	Transversi
186	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	387	A→G	Transisi
187	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	388	A→T	Transversi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
188	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	389	G→C	Transversi
189	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	390	C→T	Transisi
190	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	390	C→G	Transversi
191	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	392	A→T	Transversi
192	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	392	A→T	Transversi
193	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	392	A→T	Transversi
194	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	393	C→T	Transversi
195	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	393	C→T	Transversi
196	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	394	G→A	Transisi
197	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	402	T→A	Transversi
198	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	405	A→G	Transisi
199	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	414	T→C	Transisi
200	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	414	T→C	Transisi
201	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	417	C→T	Transisi
202	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	429	T→C	Transisi
203	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	430	G→A	Transisi
204	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	432	T→C	Transisi
205	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	435	C→T	Transisi
206	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	437	G→A	Transisi
207	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	437	G→A	Transisi
208	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	438	G→A	Transisi
209	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	439	T→C	Transisi
210	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	439	T→A	Transversi
211	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	442	C→A	Transversi
212	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	451	A→G	Transisi
213	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	453	T→G	Transversi
214	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	453	C→G	Transversi
215	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	456	A→G	Transisi
216	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	456	A→G	Transisi
217	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	459	A→G	Transisi
218	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	459	A→G	Transisi
219	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	462	T→C	Transisi
220	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	462	T→G	Transversi
221	<i>Pseudomonas sp. NCIM 5235</i>	465	T→C	Transisi
222	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	465	T→C	Transisi
223	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	472	A→G	Transisi
224	<i>Pseudomonas putida CBB5</i>	474	C→T	Transisi
225	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	474	C→T	Transisi
226	<i>Parabukholderia caffeinilytica CF1</i>	478	A→T	Transversi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
227	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	480	C→T	Transisi
228	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	480	C→T	Transisi
229	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	483	G→T	Transversi
230	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	483	G→A	Transisi
231	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	486	G→A	Transisi
232	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	487	C→A	Transversi
233	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	490	C→A	Transversi
234	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	501	T→C	Transisi
235	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	501	T→C	Transisi
236	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	504	C→T	Transisi
237	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	510	C→T	Transisi
238	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	510	C→T	Transisi
239	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	519	C→T	Transisi
240	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	528	T→C	Transisi
241	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	528	T→C	Transisi
242	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	531	A→G	Transisi
243	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	537	A→G	Transisi
244	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	544	C→T	Transisi
245	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	558	T→C	Transisi
246	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	561	T→C	Transisi
247	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	567	G→A	Transisi
248	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	570	T→C	Transisi
249	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	573	A→T	Transversi
250	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	573	A→C	Transversi
251	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	576	C→T	Transisi
252	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	576	C→T	Transisi
253	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	588	C→T	Transisi
254	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	588	C→T	Transisi
255	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	591	A→C	Transversi
256	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	592	T→G	Transversi
257	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	597	C→G	Transversi
258	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	597	C→T	Transisi
259	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	600	T→A	Transversi
260	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	600	T→A	Transversi
261	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	603	G→A	Transversi
262	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	606	C→T	Transisi
263	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	612	C→T	Transisi
264	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	613	A→G	Transisi
265	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	613	A→G	Transisi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
266	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	615	T→C	Transisi
267	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	615	T→G	Transversi
268	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	618	T→C	Transisi
269	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	618	T→C	Transisi
270	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	624	A→G	Transisi
271	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	624	A→G	Transisi
272	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	628	G→C	Transversi
273	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	629	A→C	Transversi
274	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	632	A→G	Transisi
275	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	633	C→T	Transisi
276	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	638	C→A	Transversi
277	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	639	C→T	Transisi
278	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	639	C→T	Transisi
279	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	642	C→T	Transisi
280	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	642	C→T	Transisi
281	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	645	G→T	Transversi
282	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	645	G→A	Transisi
283	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	646	A→G	Transisi
284	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	646	A→G	Transisi
285	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	648	C→T	Transisi
286	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	654	G→C	Transversi
287	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	654	G→T	Transversi
288	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	663	C→T	Transisi
289	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	664	T→A	Transversi
290	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	669	T→C	Transisi
291	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	670	T→A	Transversi
292	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	672	C→G	Transversi
293	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	675	T→C	Transisi
294	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	676	A→C	Transversi
295	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	677	C→A	Transversi
296	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	678	C→T	Transisi
297	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	690	A→T	Transversi
298	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	690	A→G	Transisi
299	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	690	A→G	Transisi
300	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	703	C→T	Transisi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
301	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	707	A→C	Transversi
302	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	708	A→G	Transisi
303	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	711	A→C	Transversi
304	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	717	A→G	Transisi
305	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	720	C→T	Transisi
306	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	721	T→A	Transisi
307	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	725	G→C	Transversi
308	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	728	A→G	Transisi
309	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	732	A→G	Transisi
310	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	732	A→T	Transversi
311	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	733	C→T	Transisi
312	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	735	G→A	Transisi
313	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	738	C→T	Transisi
314	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	742	C→T	Transisi
315	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	744	G→A	Transisi
316	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	744	G→A	Transisi
317	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	747	T→C	Transisi
318	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	750	C→T	Transisi
319	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	753	T→G	Transversi
320	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	753	T→G	Transversi
321	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	756	G→A	Transisi
322	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	756	G→A	Transisi
323	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	759	C→T	Transisi
324	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	762	A→G	Transisi
325	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	762	A→G	Transisi
326	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	765	A→C	Transversi
327	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	768	T→C	Transisi
328	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	769	G→A	Transisi
329	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	770	A→G	Transisi
330	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	771	T→C	Transisi
331	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	771	T→G	Transversi
332	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	772	A→C	Transversi
333	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	773	C→G	Transversi
334	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	773	C→A	Transversi
335	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	775	A→C	Transversi
336	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	776	C→G	Transversi
337	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	783	G→A	Transisi
338	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	783	G→A	Transisi
339	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	786	C→T	Transisi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
340	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	789	C→T	Transisi
341	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	792	G→C	Transversi
342	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	798	T→C	Transisi
343	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	798	T→C	Transisi
344	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	801	G→A	Transisi
345	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	801	G→T	Transversi
346	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	802	A→C	Transversi
347	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	804	G→C	Transversi
348	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	808	C→A	Transversi
349	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	811	G→T	Transversi
350	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	812	C→G	Transversi
351	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	814	G→A	Transisi
352	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	815	A→G	Transisi
353	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	816	C→T	Transisi
354	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	825	T→C	Transisi
355	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	826	T→C	Transisi
356	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	831	G→C	Transversi
357	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	837	T→A	Transversi
358	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	849	C→T	Transisi
359	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	850	C→T	Transisi
360	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	850	C→G	Transversi
361	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	855	C→G	Transversi
362	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	858	C→T	Transisi
363	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	861	C→T	Transisi
364	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	861	C→T	Transisi
365	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	861	C→A	Transversi
366	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	864	A→G	Transisi
367	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	870	A→G	Transisi
368	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	870	A→G	Transisi
369	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	873	A→G	Transisi
370	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	873	A→G	Transisi
371	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	879	T→C	Transversi
372	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	882	G→A	Transisi
373	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	885	T→C	Transisi
374	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	888	A→G	Transisi
375	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	894	T→C	Transisi
376	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	901	G→A	Transisi
377	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	902	C→T	Transisi
378	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	903	T→G	Transversi

No	Spesies	Posisi	Subtitusi	Tipe
379	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	903	T→G	Transversi
380	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	904	C→A	Transversi
381	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	905	C→T	Transisi
382	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	909	T→A	Transisi
383	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	909	T→G	Transversi
384	<i>Pseudomonas putida</i> CBB5	912	C→T	Transisi
385	<i>Parabukholderia caffeinilytica</i> CF1	919	T→C	Transisi
386	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIM 5235	921	A→C	Transversi