

**UJI KUALITATIF KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DENGAN  
PENANDA GEN N-METHYLTRANSFERASE di KTH BUMI MULYO,  
GAPOKTANHUT LESTARI SEJAHTERA, KPHL KOTA AGUNG UTARA,  
TANGGAMUS**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**Andriyani Wijaya Kusuma  
2017061016**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2024**

## ABSTRAK

### UJI KUALITATIF KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DENGAN PENANDA GEN *N-METHYLTRANSFERASE* DI KTH BUMI MULYO, GAPOKTANHUT LESTARI SEJAHTERA, KPHL KOTA AGUNG UTARA, TANGGAMUS

Oleh

**Andriyani Wijaya Kusuma**

Kopi menjadi salah satu komoditas perkebunan yang berkembang dengan nilai ekonomi cukup tinggi dan tersebar luas di berbagai negara termasuk Indonesia. Lampung merupakan sentra produksi kopi terbesar kedua setelah Sumatera Selatan. Mayoritas petani kopi di Lampung menanam kopi robusta dibandingkan dengan kopi arabika. Masyarakat yang berperan sebagai petani penggarap budidaya kopi robusta di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera memiliki izin mengelola hutan kemasyarakatan di Kawasan Register 31 Pematang Arah dengan kewajiban tata kelola kawasan untuk melindungi lingkungan dan keanekaragaman hayati. Informasi keragaman genetik tanaman kopi pada tingkat individu, spesies, maupun populasi perlu diketahui sebagai dasar pertimbangan dalam menyusun strategi konservasi, pemuliaan, pengelolaan serta pemanfaatan sumberdaya genetik tanaman secara berkelanjutan. Upaya konservasi keragaman genetik kopi saat ini perlu dilakukan dengan penandaan berbasis molekuler untuk konfirmasi spesies kopi robusta dan sebagai data dasar plasma nutfah Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk menguji keberhasilan amplifikasi gen *N-Methyltransferase* sebagai langkah awal analisis molekuler untuk konfirmasi spesies kopi robusta dalam penyusunan data keanekaragaman hayati di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus. Penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu isolasi DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis dan visualisasi. Tahapan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung. Hasil penelitian menyatakan bahwa uji kualitas amplifikasi gen *N-Methyltransferase* berhasil dilakukan pada suhu *annealing* optimal 60°C dengan adanya pendaran pita DNA yang terletak pada ukuran 1858 bp, ditunjukkan pada hasil visualisasi *UV-Vis* dalam elektroforesis.

Kata kunci: analisis molekuler, daun kopi robusta, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, konservasi, KTH Bumi Mulyo.

## ABSTRACT

### **QUALITATIVE ANALYSIS OF ROBUSTA COFFEE (*Coffea canephora*) WITH THE *N-METHYLTRANSFERASE* GENE MARKER AT KTH BUMI MULYO, GAPOKTANHUT LESTARI SEJAHTERA, KPHL KOTA AGUNG UTARA, TANGGAMUS**

By

**Andriyani Wijaya Kusuma**

Coffee has become one of the plantation commodities that has developed with a fairly high economic value and is widely spread in various countries, including Indonesia Lampung is the second largest coffee production center after South Sumatra. The majority of coffee farmers in Lampung cultivate robusta coffee compared to arabica coffee. The community members who play the role of coffee farmers in KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, have permission to manage the community forest in Register 31 Pematang Arahan area, with the obligation to govern the area to protect the environment and biodiversity. Knowledge of genetic diversity in coffee plants at the individual, species, and population levels is essential as a foundation for considering conservation, breeding, management, and sustainable utilization of plant genetic resources. Conservation efforts for coffee genetic diversity currently need to be carried out through molecular-based labeling to confirm robusta coffee species and as fundamental data for Indonesian germplasm. This research aims to test the success of N-Methyltransferase gene amplification as an initial step in molecular analysis for confirming robusta coffee species in compiling biodiversity data at KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus. The research was conducted through several stages, namely DNA isolation, DNA amplification, electrophoresis, and visualization. The research stages are conducted at the Biotechnology Laboratory of the Lampung Veterinary Center. The research findings indicate that the quality test of N-Methyltransferase gene amplification was successfully conducted at the optimal annealing temperature of 60°C, with the presence of a DNA band observed at a size of 1858 bp, as shown in the UV-Vis visualization results during electrophoresis.

Keywords: conservation, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KTH Bumi Mulyo, molecular analysis, robusta coffee leaves

**UJI KUALITATIF KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DENGAN  
PENANDA GEN *N-METHYLTRANSFERASE* di KTH BUMI MULYO,  
GAPOKTANHUT LESTARI SEJAHTERA, KPHL KOTA AGUNG UTARA,  
TANGGAMUS**

**Oleh**

**ANDRIYANI WIJAYA KUSUMA**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI TERAPAN  
JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2024**

Judul Skripsi : **UJI KUALITATIF KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DENGAN PENANDA GEN *N-METHYLTRANSFERASE* di KTH BUMI MULYO, GAPOKTANHUT LESTARI SEJAHTERA, KPHL KOTA AGUNG UTARA, TANGGAMUS**

Nama Mahasiswa : **Andriyani Wijaya Kusuma**

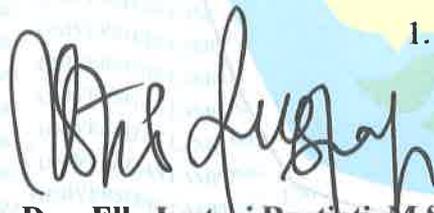
Nomor Pokok Mahasiswa : **2017061016**

Program Studi : **Biologi Terapan**

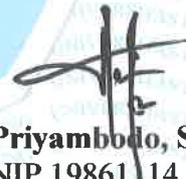
Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. **Komisi Pembimbing**



**Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc.**  
NIP 19631014 198902 2 001



**Priyambodo, S.Pd., M.Sc.**  
NIP 1986114 201504 1 003

2. **Ketua Jurusan Biologi**



**Dr. Jani Master, S.Si., M.Si.**  
NIP 19830131 200812 1 001

**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

Ketua : **Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc.**



Sekretaris : **Priyambodo, S.Pd., M.Sc.**



Anggota : **drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**  
NIP 19711001 200501 1 002

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 18 Juli 2024**

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Andriyani Wijaya Kusuma  
NPM : 2017061016  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya berjudul:

**“Uji Kualitatif Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dengan Penanda Gen *N-Methyltransferase* di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus”**

Baik gagasan dan pembahasannya adalah karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku. Jika di kemudian hari terbukti pernyataan saya ini tidak benar, saya bersedia menerima sanksi akademik baik berupa pencabutan gelar sarjana maupun tuntutan hukum.

Bandarlampung, 30 Juli 2024

Yang menyatakan,

A handwritten signature in black ink is written over a 2000 Rupiah postage stamp. The stamp features the Garuda Pancasila emblem and the text '2000 METERAI TEMPEL' and 'FEFB8ALX287480715'.

Andriyani Wijaya Kusuma  
NPM. 2017061016

## RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandarlampung pada tanggal 07 Maret 2002, sebagai anak kelima dari lima bersaudara, dari Bapak Eddy Supriadi dan Ibu Nyayu Maryamah.

Penulis menempuh pendidikan pertama di Taman Kanak-kanak (TK) Al-Hidayah Bandarlampung diselesaikan tahun 2008, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SDN 2 Sawah Brebes, Bandarlampung pada tahun 2014, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP N 23 Bandarlampung selesai pada tahun 2017, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA S Utama 2 Bandarlampung diselesaikan pada tahun 2020. Penulis resmi terdaftar sebagai mahasiswa di Program Studi S1 Biologi Terapan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam pada tahun 2020 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menempuh pendidikan di Jurusan Biologi, penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Biologi Konservasi, Biologi Molekuler dan Biosistemika. Penulis aktif di Organisasi Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Unila, berkontribusi sebagai Sekretaris Pelaksana dalam kegiatan Pekan Konservasi Sumber Daya Alam (PKSDA) acara tahunan

HIMBIO, serta aktif berkontribusi sebagai panitia Karya Wisata Ilmiah (KWI) tahun 2022.

Pada tahun 2023, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan pada bulan Januari – Februari di Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung dan telah menyelesaikan Laporan Praktik Kerja Lapangan dengan judul **Teknis Deteksi Molekuler *African Swine Fever* (ASF) pada Sampel Darah Babi (*Sus sp.*) di Balai Veteriner Lampung**. Penulis juga melaksanakan Kuliah Kerja Nyata selama 40 hari pada bulan Juni – Agustus 2023 di Desa Kaliwungu, Kecamatan Kalirejo, Kabupaten Lampung Tengah.

***PERSEMBAHAN***

***Bismillahirrahmanirrahim***

***Dengan mengucapkan syukur kepada Allah SWT, kupersembahkan hasil karya  
tulisi ini dengan penuh ketulusan kepada:***

***Ayah, Ibu dan Kakak-kakakku yang telah memberikan cinta kasih dan sayang,  
dukungan, serta doa di setiap langkah yang aku tempuh.***

***Bapak dan Ibu dosen pembimbing yang telah membimbing dengan penuh  
kesabaran untuk menjadikanku insan yang lebih baik***

***Para sahabat seperjuangan yang senantiasa membantu, menemani dan  
mendukungku, serta menerima keluh kesahku setiap saat***

***Semoga hasil karya tulisku ini dapat memberikan manfaat kepada para  
pembaca dalam dunia Konservasi***

***Salam Lestari***

***Almamater Tercinta, Universitas Lampung***

## MOTTO

“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum sebelum mereka mengubah keadaan diri mereka sendiri.”

(Q.S. Ar-Ra'd: 11)

“If you cannot do great things, do small things in a great way.”

Napoleon Hill

“Masa depan tergantung pada apa yang kamu lakukan hari ini.”

Mahatma Gandhi

“Believe in yourself and all that you are. Know that there is something inside you that is greater than any obstacle.”

Christian D. Larson

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT. karena atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan.

Skripsi dengan judul **“Uji Kualitatif Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dengan Penanda Gen *N-Methyltransferase* di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus”** adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) di Universitas Lampung yang dilaksanakan melalui kerja sama dengan Tim Tata Kelola Kawasan, Gabungan Kelompok Tani dan Hutan (Gapoktanhut) Lestari Sejahtera, KPHL Kotaagung Utara dan Balai Veteriner Lampung.

Penulis menyadari banyak pihak yang turut membantu dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi. Dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Orangtua tersayang, Bapak Eddy Supriadi dan Ibu Nyayu Maryamah yang telah memberikan dukungan, doa, perhatian dan kasih sayang yang selalu menyertai penulis.
2. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M. selaku Rektor Universitas Lampung.
3. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
4. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
5. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi Biologi Terapan FMIPA Universitas Lampung.

6. Ibu Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc. selaku Pembimbing I yang telah membimbing dengan sabar dan memberi banyak ilmu pengetahuan selama proses penelitian dan penyusunan skripsi. Terima kasih telah menjadi orangtua yang memberikan banyak dukungan, saran serta mengarahkan penulis untuk menjadi lebih baik dari sebelumnya.
7. Bapak Priyambodo, S.Pd., M.Sc. selaku Pembimbing II yang telah membimbing dengan sabar, memberi ilmu serta perhatian kepada penulis selama proses penelitian dan penulisan skripsi. Terima kasih telah menjadi orangtua yang memberikan banyak dukungan, saran dan mengarahkan penulis untuk menjadi lebih baik.
8. Bapak drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc. selaku Penguji yang telah memberikan bimbingan, arahan serta solusi kepada penulis selama proses penelitian dan penulisan skripsi. Terima kasih telah menjadi orangtua yang memberikan banyak dukungan, saran dan mengarahkan penulis untuk menjadi lebih baik.
9. Ibu Dra. Eti Ernawati, M.P. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberi arahan kepada penulis dari awal perkuliahan dimulai hingga penulis dapat menyelesaikan studi di Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung.
10. Seluruh dosen dan staf karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang turut berjasa.
11. Bapak Ir. Yayan Ruchyansyah, M.Si., selaku Kepala Dinas Kehutanan Provinsi Lampung.
12. Bapak Ariyadi Agustiono, S.Hut., M.Si., selaku Kepala UPTD KPH Kota Agung Utara.
13. Bapak Rendy Hasarudin selaku Ketua Gapoktanhut Lestari Sejahtera.
14. Bapak Joko Supriyanto selaku pemilik kebun dan pengelola KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus.
15. Bapak Supriyadi dan Pak Saidah selaku tim tata kelola kawasan Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus yang ikut turut membantu koleksi sampel selama penelitian.

16. Bapak drh. Hasan Abdullah Sanyata selaku Kepala Balai Veteriner Lampung Periode 2021 – 2023 yang telah memfasilitasi penulis selama pelaksanaan penelitian di Laboratorium.
17. Bapak drh. Suryantana, M.Si. selaku Kepala Balai Veteriner Lampung.
18. Ibu drh. Enny Saswiyanti, M.Si., Bapak Firwantoni, Ibu Ahyul Heni dan Mba Dwi Ayu Febriyani atas ilmu dan pengalaman yang telah diberikan kepada penulis, serta bantuan dan arahan selama penelitian di Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung.
19. Dian Neli Pratiwi, S.Si., M.Ling., dan Alvin Wiwiet Susanto, S.Si. selaku kakak alumni sekaligus *partner* penelitian yang sangat berjasa membantu penulis menyelesaikan penelitian dan senantiasa memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi.
20. Tim penelitian Muhammad Febriansyah dan Aulia Imtitsal yang senantiasa mendampingi penulis selama proses penelitian berlangsung sampai dengan selesainya penyusunan skripsi.
21. Kakak-kakakku tercinta Mifta Fadilah, Akhmad Fahmy, Rina Shofiya Tuzzahra dan Rini Shofiya Tuzzahra yang telah memberikan motivasi dan semangat kepada penulis dalam mencapai suatu keberhasilan.
22. Mutiara Anggita, Putri Lestari, Hudani Nadila dan Melati Rizki Ramadhina teman seperjuangan kehidupan kampus yang selalu berbagi cerita baik suka maupun duka, saling memberi kasih dan perhatian, mendukung, serta menyemangati penulis.
23. Sahabat terkasih Vany Rozauna Jabat, Adisty Dewi Sugiarto dan Prenatha Sandi Mensana yang setia menemani penulis sejak SMA hingga dapat menyelesaikan studi di Universitas Lampung.
24. Teman-teman Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung yang turut memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis.
25. Terima kasih kepada seluruh member EXO khususnya Park Chanyeol yang selalu menemani, menghibur dan memotivasi penulis dalam menyelesaikan skripsi ini melalui bakat dan karya, baik di program tv Korea maupun album musiknya.

26. Kucingku tercinta Jayen, Nganan, Utih dan Pongo yang setia menjadi teman tidur dan sangat sabar menghadapi keusilanku tanpa memberi luka.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini dan jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun masih sangat diperlukan agar dapat menjadi lebih baik dalam penulisan karya ilmiah di kemudian hari. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi seluruh pembaca.

Bandarlampung, 30 Juli 2024

Penulis

**Andriyani Wijaya Kusuma**

## DAFTAR ISI

### Halaman

DAFTAR TABEL ..... xviii

DAFTAR GAMBAR ..... xix

I. PENDAHULUAN ..... 1

1.1 Latar Belakang dan Masalah ..... 1

1.2 Tujuan ..... 4

1.3 Manfaat ..... 4

1.4 Kerangka Teori ..... 5

II. TINJAUAN PUSTAKA ..... 7

2.1 Kopi Robusta (*Coffea canephora*) ..... 7

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi ..... 8

2.1.2 Status Ekologi ..... 10

2.2 Gapoktanhut Lestari Sejahtera, (KPHL) Kota Agung Utara ..... 10

2.3 Analisis Molekuler ..... 12

2.4 Ekstraksi DNA ..... 13

2.5 Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ..... 14

2.6 Elektroforesis ..... 18

III. METODE PENELITIAN ..... 20

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian ..... 20

3.2 Alat dan Bahan ..... 20

3.3 Metode Penelitian ..... 21

3.3.1 Persiapan Penelitian ..... 21

3.3.2 Pengambilan Sampel Kopi Robusta ..... 22

3.3.3 Analisis Laboratorium ..... 23

3.3.4 Analisis Data .....	28
3.3.5 Diagram Alir Penelitian .....	29
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>30</b>
<b>V. KESIMPULAN .....</b>	<b>39</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>40</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Urutan basa nitrogen primer gen <i>N-Methyltransferase</i> kopi robusta (Perrois et al., 2015) .....	21

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daun kopi robusta (Sumber: Pixabay, 2017). .....	9
2. Buah kopi robusta. ....	9
3. Koordinasi pengambilan sampel bersama tim kelola.....	22
4. Pengambilan sampel daun kopi robusta di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera. ....	23
5. Diagram alir uji konfirmasi kopi robusta ( <i>Coffea canephora</i> ) di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus.....	29
6. Sampel daun kopi robusta dari KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus. ....	30
7. Sampel yang telah dikoleksi dan siap di bawa ke Laboratorium Bioteknologi.	31
8. Pemeriksaan kondisi sampel daun kopi yang telah disimpan selama lebih dari 14 hari.....	32
9. Visualisasi elektroforesis hasil ekstraksi DNA daun kopi robusta.....	34
10. Elektroforesis hasil amplifikasi sampel hasil ekstraksi.....	35
11. Visualisasi elektroforesis hasil amplifikasi sampel daun kopi dengan optimasi suhu 60°C (ket: M: Marker dan S: Sampel). ....	37

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang dan Masalah

Indonesia termasuk negara kepulauan beriklim tropis, terletak di antara dua benua yaitu Asia dan Australia, serta dua samudra yaitu Samudra Pasifik dan Hindia pada posisi 6°LU – 11°LS dan 95°BT – 141°BT. Luas Indonesia menempati urutan ke 15 dari negara terluas di dunia (BPS, 2019). Sejumlah 13.466 pulau telah diberi nama dan didaftarkan ke *The United Nations Convention on the Law of the Sea (UNCLOS)* dari total sekitar 17.000 pulau dengan luas daratan seluas 1.919.440 km<sup>2</sup> dan perairan seluas 3.257.483 km<sup>2</sup> (BIG, 2013). Letak yang strategis tersebut menyebabkan Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati yang berperan penting dalam kehidupan.

Keanekaragaman hayati umumnya dapat diartikan sebagai semua makhluk hidup seperti tanaman, hewan, dan mikroorganisme termasuk keanekaragaman genetik dan keanekaragaman ekosistem. Semua jenis yang terdapat dalam keanekaragaman hayati saling berkaitan antara satu dengan lainnya pada proses tumbuh dan berkembang untuk membentuk suatu sistem kehidupan. Keanekaragaman hayati seringkali dimanfaatkan untuk perkembangan sosial, budaya dan ekonomi (Widjaja *et al.*, 2014). Keanekaragaman hayati khususnya pada jenis tanaman sebagian besar telah dikembangkan menjadi tanaman bernilai ekonomi bagi masyarakat dalam memenuhi kebutuhan hidup dan berpotensi sebagai sumber devisa negara dari perdagangan ekspor (Rahayu *et al.*, 2019). Tanaman kopi mampu meningkatkan perekonomian nasional maupun daerah, sehingga kopi menjadi salah satu komoditas andalan Indonesia. Tiga jenis kopi ada di Indonesia, jenis kopi robusta (*Coffea*

*canephora*) dan kopi arabika (*Coffea arabica*) merupakan jenis yang paling banyak diproduksi.

Daerah yang merupakan sentra produksi kopi terbesar kedua di Indonesia, yaitu Lampung setelah Sumatera Selatan. Lampung hanya memproduksi dua jenis tanaman kopi (arabika dan robusta). Mayoritas petani kopi Lampung terutama di Tanggamus menanam kopi robusta dibandingkan dengan kopi arabika. Secara geografis wilayah Lampung lebih cocok ditanami kopi robusta. Lampung memiliki luas areal tanaman kopi robusta seluas 156.395 ha dengan hasil produksinya sebesar 116.281 ton.

Kopi robusta dapat tumbuh pada ketinggian 0 – 800 m dpl (Dermawan *et al.*, 2018; Nurdiansyah *et al.*, 2017). Kopi robusta berasal dari hutan hujan tropis dataran rendah di daerah aliran sungai Kongo sampai Danau Victoria, Uganda. Suhu udara rata-rata di daerah tersebut berkisar antara 23 – 26°C dengan curah hujan 2000 mm yang terdistribusi dalam 9 – 10 bulan (Syakir dan Surmaini, 2017). Pada beberapa penelitian, kopi robusta merupakan salah satu jenis kopi yang cukup tahan terhadap serangan penyakit, serta mempunyai karakteristik rasa lebih pahit, sedikit asam dan mengandung kadar kafein lebih tinggi daripada kopi arabika (Budi *et al.*, 2020).

Budidaya tanaman kopi robusta di Tanggamus telah tersebar luas di seluruh ketinggian mulai dari dataran rendah, sedang hingga ke dataran tinggi, baik di kawasan hutan lindung maupun kawasan lahan pertanian. Menurut Rustiati *et al.*, (2022) lebih dari 50% penduduk Tanggamus memiliki izin untuk bercocok tanam dan memanen kopi yang ditanam di kawasan Perhutanan Sosial. Perhutanan Sosial merupakan sistem pengelolaan hutan lestari yang dilakukan dalam kawasan hutan negara yang dilaksanakan oleh masyarakat setempat sebagai pelaku utama dalam meningkatkan kesejahteraan, keseimbangan lingkungan dan dinamika sosial budaya dalam bentuk Hutan Kemasyarakatan (HKm). Hutan Kemasyarakatan adalah hutan negara yang pemanfaatan utamanya ditujukan untuk memberdayakan masyarakat (Peraturan MENLHK, 2016).

KPHL Kota Agung Utara merupakan salah satu kawasan hutan lindung yang terletak di Kabupaten Tanggamus, di dalamnya terdapat hutan kemasyarakatan berizin dengan perkebunan kopi di bawah Gapoktanhut Lestari Sejahtera berdasarkan Surat Keputusan MENLHK Republik Indonesia Nomor 10098/MENLHK\_PSKL/PKPS/PSL.0/12/2019 tentang pemberian izin usaha pemanfaatan hutan kemasyarakatan untuk melakukan pengelolaan, pengembangan dan pemanfaatan hutan dengan kewajiban melindungi lingkungan dan keanekaragaman hayati.

Pengelolaan keanekaragaman hayati perkebunan kopi robusta merupakan tugas Gapoktanhut Lestari Sejahtera dalam kewajiban tata kelola kawasan. Upaya konservasi keanekaragaman hayati saat ini perlu dilakukan dengan penandaan berbasis molekuler untuk konfirmasi spesies kopi robusta dan sebagai data dasar plasma nutfah Indonesia. Plasma nutfah memiliki fungsi sebagai peluang dalam mencari, menemukan, memanfaatkan dan mengoptimalkan potensi genetik yang belum tergali dalam melakukan upaya konservasi (Sujiprihati dan Syukur, 2012). Menurut Indrawan *et al.* (2007) dalam mendukung upaya konservasi suatu spesies, diperlukan informasi mengenai keragaman genetiknya. Hal ini dapat mempengaruhi keberhasilan dari upaya konservasi suatu spesies pada populasinya. Keragaman genetik dapat menurun pada suatu spesies tanaman yang disebabkan oleh usaha manusia yang menanam dan memperluas spesies-spesies unggul baru sehingga spesies-spesies lokal yang beragam akan terdesak bahkan lenyap (Daradjat *et al.*, 2008).

Pelestarian plasma nutfah tanaman kopi robusta telah dilakukan sebelumnya oleh Herwanto dan Acep (2020) dengan menggunakan sifat-sifat morfologis. Menurut Suparman (2012) penggunaan ciri dan tanda morfologi tanaman memiliki keterbatasan sampel, seperti tidak ditemukan secara lengkap karakter-karakter morfologi sebagai kunci informasi suatu spesies. Saat ini analisis molekuler suatu organisme dalam upaya pelestarian plasma nutfah adalah metode analisis yang paling terpercaya karena dianggap lebih

menunjukkan sifat alaminya (Suparman, 2012). Uji kualitatif gen *N-methyltransferase* spesies kopi robusta di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus, merupakan penelitian awal dalam upaya konservasi keanekaragaman hayati dan untuk konfirmasi spesies kopi robusta serta untuk pelestarian plasma nutfah melalui penandaan secara molekuler. Penelitian ini dilakukan di bawah pendanaan penelitian Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc. dengan judul “Penandaan Molekuler Tanaman Kopi Robusta, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Sedayu, Tanggamus”, yang bertujuan untuk mendukung tugas tim tata kelola kawasan Gapoktanhut Lestari Sejahtera, khususnya di KTH Bumi Mulyo untuk konfirmasi spesies kopi robusta dan penyusunan data keanekaragaman hayati di wilayah UPTD KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus.

## **1.2 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk menguji keberhasilan amplifikasi gen *N-Methyltransferase* kopi robusta di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kawasan Hutan Lindung Pematang Arah Register 31, Kota Agung Utara, Tanggamus berbasis molekuler.

## **1.3 Manfaat**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat untuk mengetahui metode amplifikasi dalam analisis sampel kopi sebagai persiapan awal analisis molekuler lanjutan. Uji kualitatif kopi juga dapat dimanfaatkan sebagai tahapan awal analisis molekuler dalam pembangunan data dasar plasma nutfah untuk sumber informasi mengenai keanekaragaman genetik kopi robusta, penyusunan dan pemutakhiran data keanekaragaman hayati dalam mendukung tugas tim tata kelola kawasan Gapoktanhut Lestari Sejahtera di wilayah UPTD KPHL Kota Agung Utara dan dalam upaya konservasi.

## 1.4 Kerangka Teori

Kopi merupakan komoditas perkebunan yang berkembang dengan nilai ekonomi yang cukup tinggi dan tersebar luas di berbagai negara termasuk Indonesia. Tanaman kopi telah dikembangkan sejak zaman kolonial Belanda, yaitu awal abad ke-18 (Randriani & Dani, 2018) dan menjadi salah satu komoditas andalan di Indonesia karena mampu meningkatkan perekonomian nasional dan daerah, baik penghasilan bagi para petani maupun penghasilan negara. Terdapat tiga jenis kopi yang ada di Indonesia, tetapi jenis kopi robusta (*Coffea canephora*) dan kopi arabika (*Coffea arabica*) merupakan jenis yang paling banyak dibudidayakan (Panggabean, 2011).

Indonesia memiliki perkebunan kopi yang tersebar luas di seluruh ketinggian baik di dataran rendah, sedang maupun dataran tinggi di setiap provinsinya. Lampung merupakan salah satu sentra produksi kopi terbesar kedua setelah Sumatera Selatan. Mayoritas petani kopi di Lampung hanya menanam dan memproduksi kopi robusta dibandingkan kopi arabika, dengan luas areal tanaman kopi robusta seluas 156.395 ha dan hasil produksi sebesar 116.281 ton (BPS, 2021).

Kopi robusta termasuk salah satu jenis kopi yang cukup tahan terhadap serangan penyakit dan memiliki karakteristik rasa lebih pahit, sedikit asam serta mengandung kadar kafein lebih tinggi dari kopi arabika. Kopi robusta dapat tumbuh di ketinggian 0 – 800 m dpl dan berasal dari hutan hujan tropis dataran rendah di daerah aliran sungai Kongo sampai danau Victoria, Uganda. Suhu udara rata-rata di daerah tersebut berkisar antara 23° – 26°C dengan curah hujan 2000 mm yang terdistribusi dalam 9 – 10 bulan. Populasi kopi robusta secara keseluruhan diduga relatif stabil dan tidak termasuk kategori terancam punah, karena tanaman kopi robusta dibudidayakan secara luas yang dapat ditemukan di berbagai habitat (Chadburn dan Davis, 2017). Upaya konservasi harus tetap dilakukan dalam pengelolaan keanekaragaman hayati suatu wilayah, termasuk wilayah UPTD KPHL Kota Agung Utara.

Pendataan kopi robusta perlu dilakukan sebagai langkah awal penyusunan data dasar plasma nutfah melalui penandaan molekuler untuk mengetahui informasi keragaman genetik tanaman kopi robusta. Informasi mengenai keragaman genetik memiliki manfaat sangat penting dalam konfirmasi suatu spesies, serta dalam upaya konservasi keanekaragaman hayati. Penandaan molekuler merupakan suatu metode yang saat ini paling terpercaya dengan menggunakan sekuens DNA untuk menganalisis kemiripan suatu spesies dengan spesies lainnya.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Tanaman kopi ditemukan pada abad ke sembilan di pegunungan negara Ethiopia, Benua Afrika (Rahardjo, 2012). Kopi pertama kali dikenal sebagai minuman ektase berkafein yang dipopulerkan oleh pedagang Arab dan menyebar luas ke negara India berlanjut ke Benua Eropa sehingga sampai di Indonesia pada abad ke-17. Kopi termasuk salah satu komoditas unggulan di sektor perkebunan yang berperan sebagai sumber pendapatan negara. Tanaman kopi banyak dibudidayakan oleh petani Indonesia salah satunya kopi robusta karena memiliki sifat lebih unggul dan cepat berkembang. Kopi robusta dikenal dengan kopi yang tahan terhadap penyakit karat daun.

Kopi robusta termasuk salah satu spesies dari suku *Rubiaceae* yang banyak dibudidaya di negara tropis. Kopi robusta (*Coffea canephora*) merupakan jenis kopi yang paling banyak di ekspor sampai saat ini. Persentase volume ekspor per tahun dapat mencapai angka 85%, sedangkan kopi arabika (*Coffea arabica*) hanya 15% (AEKI, 2020). Kopi robusta tahan terhadap penyakit karat daun yang disebabkan oleh jamur *Hemileia vastatrix* (HV) dapat tumbuh dengan pemeliharaannya yang mudah serta produksinya lebih tinggi (Prastowo, 2010).

Terdapat 100 spesies yang termasuk dalam genus *Coffea*. Penelitian terkait sitogenetika menyebutkan bahwa spesies kopi memiliki dua macam jumlah kromosom, yaitu tetraploid ( $2n = 4x = 44$ ) yang hanya dimiliki oleh kopi arabika (Herrera *et al.*, 2013) dan diploid ( $2n = 2x = 22$ ) yang dimiliki oleh kopi lainnya termasuk kopi robusta (Pierozzi *et al.*, 1999). Perbedaan lainnya

pada kopi arabika mampu melakukan penyerbukan sendiri, sedangkan kopi robusta membutuhkan tanaman berbeda varietas/klon. Menurut Pierozzi *et al.* (1999) ukuran kromosom kopi robusta berkisar antara 0,85 – 2,38  $\mu\text{m}$  dengan bentuk 8 submetasentrik dan 3 metasentrik. Ukuran kromosom kopi arabika sekitar 2,06 – 5,03  $\mu\text{m}$  dengan bentuk 5 metasentrik, 16 submetrasentrik dan 1 akrosentrik (Clarindo and Carvalho, 2008).

### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi kopi robusta menurut Cronquist (1981) dan Froehner (1897) sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae (Tumbuhan)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (Tumbuhan berkeping dua/dikotil)
Bangsa	: Ruubiales
Suku	: Rubiaceae (Suku kopi-kopian)
Marga	: <i>Coffea L.</i>
Jenis	: <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner

Kopi robusta umumnya dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian 400 – 800 mdpl pada suhu rata-rata 24°C – 30°C, dengan curah hujan 2000 – 3000 mm per tahun. Memiliki ciri morfologi pada daun yaitu tajuk yang lebar dan ukuran daun yang lebih besar (Randriani *et al.*, 2016). Daun kopi robusta juga memiliki ketebalan yang lebih tebal dibandingkan dengan kopi arabika, ketika sudah tua maka daun akan berwarna hijau tua, sedangkan daun muda berwarna perunggu (Gambar 1). Kuntum bunga disetiap ketiak daun memiliki 8 – 24, kelopak bunga berwarna hijau tua dan terdiri dari 3 – 8 helai pada mahkota bunga (Andika *et al.*, 2020).



Gambar 1. Daun kopi robusta (Sumber: Pixabay, 2017).

Kopi robusta memiliki buah yang berbentuk elips dengan rerata panjang buah 12 mm dan dapat dipanen setelah berumur 10 – 11 bulan (Gambar 2). Biji kopi berukuran sekitar 20 – 40% dari ukuran buahnya. Kopi Robusta mempunyai berbagai komponen termasuk 42,3% gula (polisakarida), 7,5% protein, 11% lipid, 2,4% kafein, dan 6,4% asam (Panggabean, 2011). Memiliki rasa lebih pahit, sedikit asam dan terdapat kadar kafein yang lebih tinggi dari kopi arabika (*C. arabica*).



Gambar 2. Buah kopi robusta.

### 2.1.2 Status Ekologi

Populasi kopi robusta secara keseluruhan diduga relatif stabil karena dapat ditemukan di berbagai habitat, termasuk hutan sekunder, di kawasan lahan pertanian dan di sejumlah kawasan hutan lindung, akan tetapi dalam 30 tahun terakhir habitat yang tersedia telah berkurang secara signifikan di beberapa negara (Chadburn dan Davis, 2017). Menurut data *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (2017) status ekologi dari tanaman kopi robusta berada pada kategori beresiko rendah (*Least Concern*). Kategori beresiko rendah (LC) adalah kategori IUCN yang diberikan untuk spesies yang telah dievaluasi namun tidak masuk ke dalam kategori terancam punah ataupun ketergantungan konservasi. Tanaman kopi robusta secara ekologis memiliki kemampuan untuk mencegah erosi dengan aliran permukaan sebesar 3,0% yang mempunyai fungsi yang hampir sama dengan vegetasi hutan sebesar 2,5% (Sutedja, 2018). Budidaya tanaman kopi robusta sangat diandalkan untuk memenuhi kepentingan ekonomi bagi para petani, termasuk petani di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara.

## 2.2 Gapoktanhut Lestari Sejahtera, (KPHL) Kota Agung Utara

Kesatuan Pengelolaan Hutan Lindung (KPHL) Kota Agung Utara merupakan salah satu KPHL lingkup Dinas Kehutanan Provinsi Lampung yang terletak di Kabupaten Tanggamus, dengan luas 56.000 ha. Salah satu program yang dilaksanakan adalah perhutanan sosial. Pada tahun 2022 terdapat lima pendamping perhutanan sosial yang dilaksanakan di 10 Gabungan Kelompok Tani dan Hutan (Gapoktanhut) di wilayah Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) KPHL Kota Agung Utara. Skema perhutanan sosial yang diimplementasikan di UPTD KPHL Kota Agung Utara adalah Hutan Kemasyarakatan (HKm). Sampai saat ini, terdapat 17 Gapoktanhut yang telah memiliki akses legal dalam memanfaatkan kawasan

hutan wilayah UPTD KPHL Kota Agung Utara salah satunya pada Gapoktanhut di Kawasan Hutan Lindung (KHL) Register 31 Pematang Arahan (Rustiati *et al.*, 2022).

Masyarakat yang hidup di suatu daerah pedesaan sebagian besar menjalani profesi sebagai petani untuk memenuhi kebutuhan hidup sehari-hari yang bergantung pada sumber daya alam dan hasil hutan. Gabungan Kelompok Tani dan Hutan (Gapoktanhut) Lestari Sejahtera merupakan petani penggarap kopi yang mengelola kawasan hutan kemasyarakatan di kawasan Register 31 Pematang Arahan, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus (Gapoktanhut Lestari Sejahtera, 2019). Gapoktanhut Lestari Sejahtera tercakup di Kawasan Register 31 Pematang Arahan, Kecamatan Semaka, salah satu kecamatan yang berada di ujung bagian barat Kabupaten Tanggamus dan berbatasan langsung dengan Kawasan Taman Nasional Bukit Barisan Selatan dan Kabupaten Pesisir. Berdiri pada tanggal 29 Maret 2019, berdasarkan Surat Keputusan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia Nomor 10098/MENLHK\_PSKL/PKPS/PSL.0/12/2019 tentang pemberian izin usaha pemanfaatan hutan kemasyarakatan kepada Gapoktanhut Lestari Sejahtera dengan luas 683 ha pada kawasan hutan lindung di Pekon Parada Waras, Pekon Way Kerap dan Pekon Sedayu, Kecamatan Semaka, Kabupaten Tanggamus, Provinsi Lampung. Berdasarkan lokasinya Gapoktanhut Lestari Sejahtera terbagi dalam 13 Kelompok Tani Hutan (KTH) antara lain, KTH Mandiri Jaya, KTH Kuyung Jejer 1, KTH Kuyung Jejer 2, KTH Murah Rezeki 1, KTH Murah Rezeki 2, KTH Mancingan Atas, KTH Sido Makmur 1, KTH Sido Makmur 2, KTH Sido Makmur 3, KTH Sepakat Sehati, KTH Subur Makmur 1, KTH Subur Makmur 2 dan KTH Bumi Mulyo (Gapoktanhut Lestari Sejahtera, 2019). Kelompok Tani Hutan (KTH) Bumi Mulyo memiliki luas 43 ha dengan hamparan yang khas berupa sungai/curup atau air terjun. Terdapat beragam tumbuhan yang ditemukan, salah satunya adalah tumbuhan kopi robusta, selain itu terdapat pula tumbuhan lain seperti tapak liman (*Elephantopus scaber L.*) termasuk

jenis gulma yang dikenal masyarakat dengan potensi sebagai obat demam. Anggrek ekor tupai (*Rhynchosyilis retusa*), mempunyai keunikan berbunga satu kali dalam setahun. Buah durian, yang mempunyai nilai ekonomi seperti kopi robusta, dapat ditemukan sebagai sisa pakan tupai. Hal ini menunjukkan keberlangsungan rantai makanan (Rustiati *et al.*, 2022).

### 2.3 Analisis Molekuler

Perkembangan biologi molekuler mulai berperan penting dalam perkembangan berbagai cabang ilmu Biologi, begitu juga peranan Biologi Molekuler dalam identifikasi dan pengelompokan kekerabatan tumbuhan. Semua proses kehidupan seperti perkembangan, fisiologi, dan reproduksi semua organisme dapat dilihat dengan pendekatan molekuler. Studi evolusi saat ini dipengaruhi oleh perkembangan biologi molekuler, dan sebaliknya pendekatan evolusi juga digunakan untuk memahami dan mengembangkan biologi molekuler (Nei dan Kumar, 2000).

Analisis molekuler merupakan teknik yang digunakan untuk mempelajari struktur, fungsi dan interaksi molekul biologis, yaitu DNA, RNA dan protein. Molekul DNA berstruktur pilinan utas ganda dari komponen gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan pasangan basa. Pasangan basa DNA terdiri dari basa purin dan basa pirimidin. Basa purin terdiri atas adenin (A) dan timin (T) berbentuk cincin ganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan guanin (G) dalam struktur cincin tunggal. Adenin selalu berpasangan dengan timin dan sitosin dengan guanin. Kedua basa pada masing-masing pasangan terhubung oleh ikatan hidrogen. Kedua rantai berjalan memilin satu dengan yang lainnya pada untai heliks ganda. Analisis molekuler saat ini memiliki berbagai macam teknik yang digunakan di seluruh dunia, salah lima diantaranya: PCR, *flow cytometry*, *tissue microarray*, *different blots*, dan diagnosis genetik.

## 2.4 Ekstraksi DNA

*Deoxyribonucleic acid* atau asam deoksiribonukleat (DNA) merupakan makro molekul berisi dua rantai polinukleotida yang saling berkaitan. Setiap nukleotida dibentuk dengan tiga susunan komponen yakni nitrogen, gula pentosa, dan gugus fosfat. DNA mengandung materi yang membentuk kromosom-kromosom dan informasi genetik yang tersimpan dalam tubuh makhluk hidup (Haryono, 2018) dan terlibat dalam pewarisan sifat yang dapat diwariskan ke keturunannya.

Ekstraksi DNA merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan DNA, melalui proses pemisahan DNA dari komponen lainnya seperti protein, karbohidrat dan lemak. Proses ekstraksi DNA memiliki tiga langkah utama, yaitu penghancuran dinding sel (lisis), pemisahan DNA, dan pemurnian DNA (Corkill dan Rapley, 2008). Penghancuran sel (lisis) dilakukan untuk memecah membran dan dinding sel sehingga komponen dalam sel dapat dikeluarkan (Holme dan Peck, 1998). Proses pemisahan DNA dari komponen lain seperti protein, fraksi kecil RNA, lipid dan polisakarida (Muladno, 2010; Utami, 2012). Pemurnian DNA dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan residu dari bahan yang digunakan pada dua langkah sebelumnya.

Ekstraksi DNA merupakan teknik pertama yang dilakukan untuk mendapatkan DNA murni dengan menggunakan berbagai metode atau kit konvensional. Secara umum, ekstraksi DNA mencakup lima prosedur, yaitu isolasi dari jaringan, lisis dinding dan membran sel, ekstraksi dalam larutan, pemurnian, dan presipitasi. DNA yang telah diekstraksi dapat divisualisasikan menggunakan sinar UV dengan elektroforesis (Hasanudin, 2023).

## 2.5 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

DNA hasil ekstraksi juga dapat dilakukan uji kuantitas untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer. Spektrofotometer merupakan salah satu instrumen yang umum digunakan untuk menganalisis senyawa. Uji kualitas DNA dilakukan dengan horizontal elektroforesis, yaitu pengujian hasil ekstraksi DNA pada gel agarosa. Pengukuran konsentrasi DNA menggunakan spektrofotometer diukur pada panjang gelombang 260 nm, protein diukur pada panjang gelombang 280 nm (Harahap, 2017). Kemurnian larutan DNA dapat dihitung dengan perbandingan A260 nm dan A280 nm. Umumnya batas kemurnian yang digunakan dalam analisis molekuler pada rasio A260/A280 nm adalah 1,8 – 2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

Prinsip dasar spektrofotometer adalah larutan sampel yang digunakan harus jernih, tidak terdapat partikel koloid terutama suspensi. DNA yang mengandung basa purin dan pirimidin mampu menyerap cahaya UV. Untai ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan protein dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm. Pada perbedaan penyerapan cahaya UV, kemurnian DNA dapat diukur melalui perhitungan nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm ( $\text{Å}260/\text{Å}280$ ) dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8 – 2,0 (Fatchiyah, 2011).

Konsentrasi DNA akan berdampak pada kualitas fragmen hasil amplifikasi. Konsentrasi DNA yang terlalu rendah dapat menghasilkan fragmen yang sangat tipis pada gel, bahkan tidak terlihat secara visual, sebaliknya konsentrasi DNA yang terlalu tinggi akan menghasilkan fragmen terlihat sangat tebal sehingga sulit dibedakan antara satu fragmen dengan fragmen lainnya (Haris *et al.*, 2003).

DNA yang telah diukur konsentrasinya dilakukan pengenceran sehingga menghasilkan konsentrasi yang seragam untuk digunakan dalam analisis PCR. Proses selanjutnya, dilakukan pengujian kualitas DNA dengan elektroforesis gel untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA dari kontaminan RNA dan keutuhan DNA hasil ekstraksi (Syafaruddin dan Santoso, 2011).

## 2.6 Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk memperbanyak DNA suatu organisme. Metode berbasis PCR seringkali digunakan di dalam identifikasi organisme, baik melalui DNA *fingerprinting* maupun melalui DNA *barcoding*. Dalam metode ini terdapat tiga tahapan siklus temperatur yang berurutan, yaitu: denaturasi (pembukaan untai ganda DNA), *annealing* (penempelan), dan *extension* (pemanjangan) (Kusuma, 2010).

### 1. Pembukaan untai ganda DNA (*denaturation*)

Proses denaturasi merupakan proses pemisahan ikatan hidrogen pada pasangan basa nitrogen, mengubah DNA berantai ganda menjadi DNA berantai tunggal. DNA berantai tunggal tersebut akan menjadi cetakan untuk DNA yang akan dibuat. Proses denaturasi dilakukan melalui pemanasan pada suhu 94°C.

### 2. Penempelan sepasang primer (*annealing*)

Proses *annealing* adalah proses penempelan pasangan primer pada segmen DNA target. Proses ini bertujuan untuk menginisiasi proses amplifikasi. Suhu pada proses *annealing* berkisar antara 50°C – 60°C dan sangat bergantung pada primer.

### 3. Pemanjangan primer (*extension*)

Proses *extension* (pemanjangan) adalah proses pembentukan DNA baru. Proses ini akan berjalan dengan bantuan enzim *Taq Polymerase*, yang didapatkan dari bakteri *Thermus aquaticus*. Proses *extension* berjalan

pada suhu optimal dari enzim *Taq Polymerase*, yaitu 72°C. Semua tahapan tersebut melewati 30 – 35 siklus (Fatchiyah, 2005).

Siklus yang dilakukan secara berulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan diamplifikasi secara eksponensial (amplikon yang berupa untai ganda) sehingga jumlah *copy* yang dicapai dapat dirumuskan dengan ( $X=2^n$ ). Jumlah siklus adalah n dan jumlah awal molekul DNA adalah x. Sebelum siklus berlangsung terdapat satu *copy* DNA, maka setelah melewati satu siklus akan menjadi dua *copy*, melewati dua siklus menjadi empat, tiga siklus menjadi delapan dan seterusnya, sehingga perubahan ini berlangsung secara eksponensial (Kurniawan, 2012).

Menurut Kurniawan (2012), PCR umumnya didahului dan diakhiri oleh tahapan berikut:

- 1) Pradenaturasi, dilakukan pada tahap awal reaksi selama 1 – 9 menit untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA *polymerase*.
- 2) Final Elongasi, dilakukan selama 5 – 15 menit pada suhu optimum enzim (70 – 72°C) untuk memastikan bahwa setiap utas tunggal yang tersisa telah diperpanjang dengan baik. Proses ini dilakukan setelah siklus PCR yang terakhir.

Menurut Cheng *et al.*, (2018) menyatakan bahwa tahapan optimasi PCR sangat penting dalam amplifikasi DNA untuk mendapatkan hasil yang akurat dan sensitif. Terdapat lima tahapan yang perlu dilakukan antara lain:

- 1) Konsentrasi primer

Konsentrasi primer perlu dilakukan dengan tepat untuk mengoptimalkan proses *annealing*. Konsentrasi yang tidak tepat (terlalu rendah dan tinggi) dapat mengakibatkan tidak adanya amplifikasi dan dapat menyebabkan pembentukan *primer dimer* (keadaan dimana *band* yang terbentuk diikuti oleh *band* lain yang tidak spesifik) (Padmalatha dan

Prasad, 2006). Menurut Haris (1998) konsentrasi primer dalam PCR yang optimal adalah 0,1 – 1,0  $\mu\text{M}$ .

2) Suhu *annealing*

Suhu *annealing* primer perlu dioptimalkan agar primer dapat berikatan dengan target DNA secara spesifik. Suhu yang terlalu tinggi dapat merusak DNA yang telah didapatkan, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat menghasilkan primer yang tidak berikatan dengan DNA target. Suhu *annealing* antara 50 – 60°C merupakan suhu yang optimal.

3) Konsentrasi magnesium

Magnesium dibutuhkan untuk aktivitas enzim DNA polimerase. Konsentrasi magnesium sangat berperan terhadap aktivitas enzim, apabila konsentrasi terlalu rendah maka dapat menghambat laju aktivitas enzim, dan jika konsentrasi terlalu tinggi maka bisa menghasilkan produk yang tidak diinginkan. Konsentrasi magnesium optimal yang diperlukan berkisar antara 1 – 2 Mm.

4) Suhu elongasi

Suhu elongasi yang optimal sangat penting untuk dilakukan agar enzim DNA polimerase dapat bekerja secara optimal dalam proses penambahan nukleotida pada primer. Suhu elongasi yang optimal umumnya adalah 72°C.

5) Jumlah siklus

Jumlah siklus perlu dioptimalkan dalam pelaksanaan PCR agar proses amplifikasi DNA dapat dilakukan secara efisien. Jumlah siklus optimal bergantung pada target DNA dan sensitivitas deteksi. Jumlah siklus yang umumnya dilakukan antara 25 – 35 siklus.

Faktor-faktor yang dapat menentukan keberhasilan proses PCR, yaitu 1) konsentrasi dan kualitas DNA, 2) temperatur *annealing* kedua primer, 3) konsentrasi  $\text{MgCl}_2$ , 4) enzim polimerase, 5) konsentrasi dan kualitas primer, 6) jumlah siklus PCR, 7) *deoksinukleotida triphosphate* (Dntp), dan faktor lain seperti larutan buffer (Gelfand *et al.*, 1990; Setyawarti dan Zubaidah, 2021).

## 2.7 Elektroforesis

Elektroforesis biasa digunakan setelah dilakukan amplifikasi untuk memisahkan molekul-molekul DNA berdasarkan ukuran dalam suatu medium gel atau larutan elektrolit menggunakan medan listrik (Anam *et al.*, 2021). Teknik ini dapat digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik yang ada pada makromolekul, misalnya DNA yang bermuatan negatif. Jika molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agarosa dialiri listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya (positif), maka molekul tersebut akan tergantung pada nisbah (rasio) muatan terhadap massanya, serta tergantung pada bentuk molekulnya (Maksum *et al.*, 2017). Teknik elektroforesis dapat digunakan untuk analisis DNA, RNA, maupun protein.

Bentuk molekul DNA akan mempengaruhi keadaan konformasi struktur DNA, seperti bentuk sirkuler menghasilkan beberapa konformasi dengan keadaan kecepatan migrasi yang berbeda, sedangkan pada DNA dengan bentuk molekul linier hanya dalam satu bentuk konformasi. Dalam bentuk yang sama, makin kecil ukuran DNA maka makin cepat migrasinya. Untuk mempermudah analisis, molekul DNA yang akan dielektroforesis harus dalam keadaan linier. Proses PCR menghasilkan DNA linier. Daya pisah ukuran molekul DNA juga ditentukan oleh komposisi gel (persentase agarosa dan poliakrilamida) dan tebal lempeng gel tersebut. Persentase agarosa atau poliakrilamida semakin tinggi, maka semakin tinggi daya pisah gel hingga mencapai molekul DNA yang kecil (Maksum *et al.*, 2017).

Hasil elektroforesis akan terlihat dalam bentuk pita fragmen DNA hasil amplifikasi serta menunjukkan potongan jumlah pasang basa (*basepair*) (Klug and Hazel, 1998). Volume sampel hasil amplifikasi dan volume DNA *marker* merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi elektroforesis. Volume DNA hasil amplifikasi mempengaruhi hasil

visualisasi pada elektroforesis. Hasil pita DNA yang baik memudahkan dalam penentuan ukuran DNA hasil amplifikasi (Harahap, 2018). Berat molekul dari suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen DNA yang telah diketahui ukurannya sebagai penanda (*DNA marker* atau *DNA ladder*) (Martin, 1996). Kendala dalam penggunaan *DNA marker* yang ditemui dalam elektroforesis adalah separasi fragmen yang kurang baik, fragmen yang tipis atau kurang tegas dan bentuk fragmen yang tidak lurus (*smile effect*), sehingga menyulitkan pembacaan hasil elektroforesis. Hasil fragmen *DNA marker* yang baik akan memudahkan pembacaan hasil fragmen DNA yang diamplifikasi.

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian “Uji Kualitatif Gen *N-Methyltransferase* Kopi Robusta (*Coffea canephora*) di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus” berada di bawah penelitian Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc. dengan judul “Penandaan Molekuler Tanaman Kopi Robusta, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Sedayu, Tanggamus” yang didanai oleh DIPA BLU Universitas Lampung tahun 2023 dengan nomor kontrak 661/UN26.21/PN/2023 dan dilaksanakan selama enam bulan, dimulai pada bulan November 2023 sampai bulan April 2024. Penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel daun kopi di perkebunan kopi robusta KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Kecamatan Semaka, Kabupaten Tanggamus. Pengambilan sampel daun kopi dilaksanakan bersama tim tata kelola kawasan, Gapoktanhut Lestari Sejahtera. Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung di bawah bimbingan drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc. dan drh. Enny Saswiyanti, M.Si.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk koleksi sampel daun kopi, yaitu gunting, amplop coklat besar, plastik *ziplock*, label *sticker*, karet gelang, *tissue*, sarung tangan, dan masker. Alat yang digunakan dalam analisis molekuler yaitu mikropipet beserta tip, *microtube* (ukuran 1,5 ml dan 2 ml), *spin column*, *collection tubes*, mortar dan pestel, *biosafety cabinet*, *vortex*, *centrifuge*, *water bath*, *PCR Work Station*, *microwave*, *spin down*, *optical tube* 0,2 ml, *thermal*

*cycler*, set alat elektroforesis meliputi cetakan gel, sisir, *chamber*, *power supply*, UV transiluminator dan komputer.

Bahan yang digunakan adalah daun kopi robusta, alkohol 70% dan silika gel. Bahan yang digunakan dalam analisis molekuler adalah Rnase A, *Genomic DNA Mini Kit (Plant)* Cat No. GP100, *bioline MyTaq™ HS Red Mix* Cat No. BIO-25047, satu pasang primer kopi robusta dengan penanda gen *N-Methyltransferase* (Tabel 1), *nuclease-free water*, alkohol absolut, *Phosphate-buffered saline (PBS)*, *DNA marker Invitrogen TrackIt™ 100 bp DNA Ladder* catalog number 104488058, pewarna agar SYBR® *safe DNA gel stain* Cat No. S33102, bubuk gel agarosa REF. 75510-019 dan larutan buffer Tris Asetat EDTA (TAE) REF. 15558-042.

Tabel 1. Urutan basa nitrogen primer gen *N-Methyltransferase* kopi robusta (Perrois *et al.*, 2015)

Primer	Urutan Basa Nitrogen	Produk
<i>Forward</i>	5'- ATG GAG CTC CAA GAA GTC CTG CG -3'	1858 bp
<i>Reverse</i>	5'- TTA CAT GTC TGA CTT CTC TGG CT -3'	1858 bp

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu persiapan penelitian, pengambilan sampel kopi robusta, dan analisis laboratorium.

#### 3.3.1 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian dimulai dengan koordinasi perizinan pada KPHL Kota Agung Utara, Dinas Kehutanan Provinsi Lampung, Tim Kelola Kawasan, Gapoktanhut Lestari Sejahtera dan Balai Veteriner Lampung. Presentasi usulan kegiatan penelitian dilakukan untuk penyamaan pemahaman topik penelitian untuk mendapatkan informasi lebih terkait metode pengambilan sampel, jumlah sampel yang dibutuhkan dan analisis molekuler sampel yang sesuai.

### 3.3.2 Pengambilan Sampel Kopi Robusta

Pengambilan sampel daun kopi robusta dilakukan di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Kecamatan Semaka, Kabupaten Tanggamus. Persiapan dalam pengambilan sampel dimulai dengan koordinasi bersama Bapak Joko Suprianto salah satu anggota dari tim kelola kawasan (Gambar 3). Koleksi daun kopi robusta dilakukan secara aseptis menggunakan alat yang telah disterilisasi. Proses koleksi sampel dimulai dengan memotong daun yang terdiri dari 4 – 6 helai daun muda segar dan bebas penyakit, yaitu tidak terdapat bercak atau lesi pada daun (Gambar 4). Helai daun yang telah dipotong, disemprotkan alkohol 70% pada bagian daun kemudian diusapkan dengan lembut dan merata pada bagian depan dan belakang daun agar bebas dari hama. Pada bagian ujung tulang daun bekas potongan diberi *tissue* yang dibasahi dan ditutup menggunakan selotip bening. Daun yang telah disterilkan, dimasukkan ke dalam amplop coklat besar berisi silika gel, dicatat identitas sampel, nama kolektor, tanggal, dan lokasi temuan, kemudian dimasukkan ke dalam plastik *ziplock* agar tetap kering dari udara yang lembab. Sampel yang sudah dikoleksi dilakukan pengambilan gambar. Sampel dibawa ke Laboratorium Bioteknologi untuk disimpan dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Gambar 3. Koordinasi pengambilan sampel bersama tim kelola kawasan di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera.



Gambar 4. Pengambilan sampel daun kopi robusta di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera.

### 3.3.3 Analisis Laboratorium

Analisis laboratorium merupakan proses penting dalam ilmu pengetahuan pada berbagai bidang yang melibatkan pengujian sampel untuk mengukur komposisi kimia, fisika dan/atau sifat biologis.

Analisis laboratorium digunakan dalam berbagai cabang ilmu, salah satunya yaitu dalam ilmu biologi molekuler yang biasa digunakan sebagai analisis molekuler. Tujuan analisis molekuler pada penelitian ini untuk menguji keberhasilan amplifikasi gen *N-Methyltransferase* kopi robusta di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera. Berikut adalah empat tahapan analisis molekuler kopi robusta.

#### 3.3.3.1 Preparasi Sampel

Preparasi dilakukan pada sampel daun yang telah dikoleksi, dimulai dengan cara memotong bagian daun yang masih segar menggunakan gunting steril. Daun yang telah dipotong kemudian ditimbang dengan bobot 200 mg menggunakan

timbangan analitik dan dimasukkan ke dalam mortar berisi 0,5 ml – 100 ml buffer PBS. Sejumlah 200 mg sampel daun digerus hingga halus dan dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml menggunakan mikropipet 1000 µl beserta tip dan diberi kode sampel agar tidak tertukar dengan sampel lainnya. Sampel disimpan di dalam *freezer* dengan suhu  $-4^{\circ}\text{C}$  (GENEAID, 2023).

### 3.3.3.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan suatu proses untuk memisahkan dan memurnikan DNA dari molekul atau komponen lain yang tidak diperlukan. Asam Deoksiribonukleat (DNA) dapat diekstraksi dari sampel sel dan jaringan yang masih segar, beku, dikeringkan atau di simpan dalam alkohol atau buffer. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan kit ekstraksi DNA dari GENE AID, *Genomic DNA Mini Kit (Plant)* Cat No. GP100 dalam empat tahap, yaitu diawali dengan proses penghancuran struktur sel (lisis) sehingga senyawa DNA dapat dikeluarkan dari dalam sel, senyawa DNA yang telah dikeluarkan maka akan mengalami proses pengikatan (*binding*) pada silika gel, kemudian dilakukan pencucian atau purifikasi (*washing*) untuk menghilangkan zat pengotor yang terdapat pada cairan senyawa DNA, dan tahap yang terakhir adalah pemurnian (*elution*) DNA yang terikat pada silika gel dengan dilarutkan menggunakan *elution buffer* atau TE (GENEAID, 2023).

Proses penghancuran struktur sel (lisis) dimulai dengan dimasukkan sebanyak 200 µl sampel ke dalam *microtube*, ditambahkan 400 µl buffer GP1 dan 5 µl Rnase A, kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan vortex. Inkubasi cairan sampel di dalam *waterbath* pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit.

Selama inkubasi, *microtube* dibalik setiap lima menit. Cairan sampel yang telah diinkubasi, ditambahkan 100  $\mu$ l buffer GP2, kemudian dilakukan homogenisasi kembali dengan vortex dan inkubasi dalam es selama tiga menit. Cairan sampel dipindahkan ke dalam *filter column* beserta *collection tube* 2 ml dan dilanjutkan sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama satu menit. Cairan sampel kemudian dipindahkan dari *collection tube* 2 ml ke dalam *microtube* 1,5 ml dengan hati-hati.

Proses pengikatan (*binding*) dilakukan dengan menambahkan buffer GP3 yang telah ditambahkan isopropanol ke dalam *microtube*. Homogenisasi cairan sampel dilakukan selama lima detik. Cairan sampel sebanyak 700  $\mu$ l dipindahkan ke dalam GD *column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama dua menit. Cairan sampel yang telah disentrifugasi kemudian dibuang dan dimasukkan kembali GD *column* ke dalam *collection tube* 2 ml. Cairan sampel yang tersisa, ditambahkan ke dalam GD *column* dan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 14000 rpm selama dua menit. Endapan cairan yang berada di bawah *collection tube* setelah disentrifugasi kemudian dibuang dan GD *column* dimasukkan kembali ke dalam *collection tube* 2 ml.

Proses pencucian dilakukan dengan menambahkan 400  $\mu$ l buffer W1 ke GD *column* dan sentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 14000 rpm. Cairan yang telah turun dari GD *column* kemudian dibuang dan dimasukkan kembali dalam *collection tube* 2 ml. Buffer wash sebanyak 600  $\mu$ l yang telah ditambahkan etanol, dimasukkan ke dalam GD *column* suspensi dan disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 30 detik. Cairan buffer yang telah turun dalam *collection tube* pada proses *washing*, dimasukkan kembali GD

*column* ke dalam *collection tube* 2 ml. Sampel yang telah dilakukan pencucian (*washing*) disentrifugasi kembali selama tiga menit dengan kecepatan 14000 rpm untuk dikeringkan matriks *column*.

Proses pemurnian (*elution*) dilakukan dengan GD *column* yang telah kering dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 ml yang baru. *Elution* buffer atau TE sebanyak 100 µl ditambahkan dan diamkan selama 3 – 5 menit untuk memastikan *elution* buffer terserap sempurna, kemudian campuran buffer TE dan sampel yang terikat pada silika gel disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 30 detik untuk meluluskan DNA murni.

#### 3.3.3.3 Uji Kualitas DNA

Pengujian kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa untuk mengukur konsentrasi DNA berdasarkan visualisasi pada gel elektroforesis. Proses elektroforesis dimulai dengan pembuatan gel agarosa konsentrasi 1%. DNA sampel hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa sebanyak 5 µl. Tahapan *running* elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan tegangan 100 volt pada media gel agarosa dalam larutan *buffer* TAE. Hasil elektroforesis diamati melalui sinar lampu *bluelight* untuk melihat keberadaan pita DNA pada gel agarosa, kemudian didokumentasikan dengan kamera yang telah terhubung pada komputer.

#### 3.3.3.4 Amplifikasi

Amplifikasi merupakan proses perbanyakan atau penggandaan segmen DNA tertentu melalui *Polymerase Chain Reaction*

(PCR), sehingga jumlah DNA dari suatu sampel dapat meningkat secara signifikan dalam waktu singkat menggunakan alat yang bernama *thermal cycler*. Amplifikasi dimulai dengan proses pencampuran reagen (*master mix*) yang mengandung semua komponen yang dibutuhkan untuk menjalankan reaksi PCR. Proses pembuatan *master mix* dapat dimulai dengan dimasukkan 10 µl MyTaq™ HS Red Mix, 0,8 µl *forward primer*, 0,8 µl *reverse primer*, dan 4,4 µl *nuclease-free water* dalam PCR *tube* 0,2 ml. Reagen yang telah dicampur kemudian disentrifugasi menggunakan *spin down* agar homogen dan terkumpul dibagian bawah PCR *tube*.

DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai *template* pada proses *template addition* untuk dilanjutkan pada proses *running* PCR. Proses *template addition* adalah suatu proses pencampuran *master mix* yang telah disiapkan dengan 5 µl isolat DNA hasil ekstraksi. Amplifikasi dilanjutkan dengan *running* PCR menggunakan *thermal cycler*. Proses *running* PCR diawali dengan pre-denaturasi atau pengaturan suhu awal selama 5 menit dengan suhu 94°C, kemudian dilanjutkan dengan 34 siklus untuk tiga tahapan, yaitu tahap denaturasi selama 1 menit dengan suhu 94°C, tahap *annealing* selama 1 menit menggunakan enam suhu, yaitu 55°C – 60°C, dan tahap ekstensi (*extension*) selama 2 menit dengan suhu 72°C. Proses *running* PCR diakhiri dengan tahap *post-extension* dengan suhu 72°C selama 7 menit (Perrois *et al.*, 2014 (dimodifikasi)).

### 3.3.3.5 Elektroforesis dan Visualisasi

Elektroforesis biasa digunakan setelah dilakukan amplifikasi untuk memisahkan molekul-molekul DNA berdasarkan ukuran dalam suatu medium gel atau larutan elektrolit menggunakan medan listrik. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan

gel agarosa 1%, dibuat dengan cara ditimbang bubuk gel agarosa sebanyak 1 g dan dilarutkan ke dalam buffer TAE 100 ml. Larutan bubuk gel agarosa dan buffer TAE dipanaskan dalam *microwave* selama 3 menit, setelah itu ditambahkan SYBR<sup>®</sup> *safe DNA gel stain* sebanyak 10 µl. Larutan agarosa dituangkan dalam *tray* elektroforesis (cetakan gel) yang telah dipasangkan sisir. Larutan agarosa didiamkan hingga dingin dan mengeras.

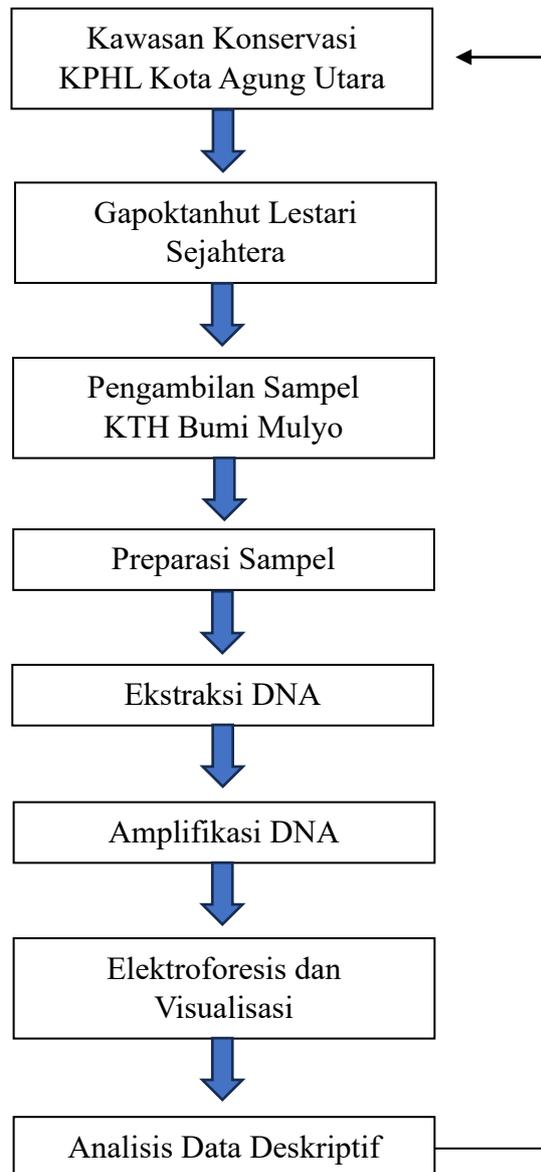
Gel agarosa yang telah mengeras, diambil sisir dari *tray* elektroforesis kemudian dimasukkan dalam *chamber* yang telah terisi buffer TAE. DNA hasil amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur yang telah terbentuk sebanyak 6 µl. DNA *marker* menggunakan Invitrogen TrackIt<sup>™</sup> 100 bp *DNA Ladder* ditambahkan sebanyak 6 µl ke dalam sumur pada bagian tepi kiri sebagai pembanding ukuran molekul DNA hasil amplifikasi. *Chamber* ditutup kemudian dihubungkan dengan *power supply* yang telah diatur dengan tegangan 100 V dan kuat arus 300 A selama 30 menit. Hasil elektroforesis diamati untuk melihat keberadaan pita DNA pada gel agarosa menggunakan sinar lampu *bluelight* dan difoto dengan kamera yang telah terhubung pada komputer melalui aplikasi *EOS Utility*.

#### 3.3.4 Analisis Data

Analisis data yang dinyatakan secara kualitatif (positif/negatif) dengan metode analisis deskriptif meliputi perbandingan hasil pada pendaran pita DNA sampel kopi dengan DNA *marker*.

### 3.3.5 Diagram Alir Penelitian

Penelitian ini dilakukan berdasarkan pada diagram alir berikut (Gambar 5).



Gambar 5. Diagram alir uji konfirmasi kopi robusta (*Coffea canephora*) di KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus.

## V. KESIMPULAN

Amplifikasi sekuens DNA hasil ekstraksi sampel daun kopi robusta dari KTH Bumi Mulyo, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Tanggamus menggunakan primer penanda gen *N-Methyltransferase* berhasil dilakukan dengan suhu *annealing* optimal pada 60°C yang ditandai adanya pendaran pita DNA yang terang dan tebal pada gel agarosa menunjukkan keberhasilan penempelan primer. Hasil visualisasi elektroforesis menunjukkan keberadaan pita DNA dengan ukuran 1858 bp yang mengindikasikan keberhasilan amplifikasi dan keutuhan molekul DNA hasil ekstraksi.

## DAFTAR PUSTAKA

- AEKI. 2020. Ekspor kopi. [http://www.aeki-aice.org/coffee\\_export\\_regulations.html](http://www.aeki-aice.org/coffee_export_regulations.html)., diakses pada Senin, 22 Juli 2024, pukul 10.00 WIB.
- Akbar, N., Aris, M., Irfan, M., Tahir, I., Baksir, A. 2018. Kajian Filogenetik Ikan Tuna (*Thunnus spp*) sebagai Data Pengelolaan di Perairan Sekitar Kepulauan Maluku, Indonesia. *Jurnal Kelautan*. 11(2): 120 – 129.
- Altschul S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403 – 410.
- Anam, K., Widya, C., Ihsanul, A., Kartika, S., dan Rike, O. 2021. Analisis Hasil Elektroforesis DNA dengan Image Processing Menggunakan Metode Gaussian Filter. *Indonesian Journal of Electronics and Instrumentation System (IJEIS)*. 11(1): 37 – 48.
- Andika, A., Sastra, A.A., dan Hamdan, D. 2020. *Memulai dan Mengelola Usaha Kedai Kopi*. Jakarta: PT Agro Meia Pustaka.
- Ariyanti, Y., Sister, S. 2019. Ekstraksi DNA Total dari Sumber Jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode KIT For Animal Tissue. *Journal of Science and Applicative Technology*. 3(1): 40 – 45.
- Artati, D., dan Dini, S.L. 2017. Optimasi Performa DNA Marker pada Elektroforesis Gel. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*. 15(2): 47 – 50.
- Badan Pusat Statistik Provinsi Lampung. 2021. Luas Areal Tanaman (Hektar) 2021. Badan Pusat Statistik (BPS). Lampung.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-vanDillen, P.M.E., VanDerNoordaa, J. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 495 – 503.

- Brown, T.A. 2002. *Genomes 2<sup>nd</sup> Ed.* New York: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Budi, D., Wahyu, M., Yusianto., Atina, R. 2020. Karakterisasi Kopi Bubuk Robusta (*Coffea canephora*) Tulungrejo Terfermentasi dengan Ragi *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Agroindustri*. 10(2): 129 – 138.
- Burland, V., Curtis, F.P., Kusukawa, N. 1996. Agarose gel analysis of 15 – 40-kb PCR amplimers. *Biotechniques*. 21(1): 142 – 144.
- Chadburn, H. and Davis, A.P. 2017. *Coffea canephora*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T18290186A18539466.  
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T18290186A18539466.en>, diakses pada Kamis, 28 September 2023, pukul 22.30 WIB.
- Clarindo, W.R. and Carvalho, C.R. 2008. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Systematics and Evolution*. 274: 237 – 241.
- Corkill, G., Rapley, R. 2018. *The Manipulation of Nucleic Acid: Basic Tools & Techniques in Molecular Biomehtods Handbook*. Ed ke-2. Humana Press. New York.
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York.
- Daradjat, A.A., Silitonga, S., Nafisah. 2008. Ketersediaan Plasma Nutfah untuk Perbaikan Varietas Padi. In Daradjat, A.A., Setyono, A., Makarim, A.K., Hasanuddin, A. (Eds.). *Padi, inovasi teknologi dan produksi*. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. Sukamandi.
- Dermawan, S.T., Mega, I.M., dan Kusmiyarti, T.B. 2018. Evaluasi kesesuaian lahan unyuk tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) di Desa Pajahan, Kecamatan Pupuan, Kabupaten Tabanan. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 7(2): 230 – 241.
- Fatchiyah, Estri, L.A., Sri, W., dan Sri, R. 2011. *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta.
- Fatchiyah. 2005. *PCR: Dasar Teknik Amplifikasi DNA dan Aplikasinya*. Universitas Brawijaya. Malang.

- Fatchiyah. 2011. *Pelatihan analisis fingerprinting DNA tanaman dengan metode RAPD*. [Modul]. Laboratorium sentral ilmu hayati Universitas Brawijaya, Malang.
- Froehner, A. 1897. Übersicht über die Arten der Gattung Coffea. Notizbl. Bot. Gart. Must. Berlin-Dahlem. 4: 230 – 238.
- Gapoktanhut Lestari Sejahtera. 2019. Profil Gapoktan Hutan Lestari Sejahtera, Sedayu. Tanggamus. Tidak dipublikasikan.
- Getty Images. 2005. *Coffea canephora*.  
<https://www.gettyimages.com/detail/news-photo/robusta-coffee-flowers-and-mature-drupes-rubiaceae-costa-news-photo/182130711?adppopup=true>, diakses pada Sabtu, 30 September 2023, pukul 19.48 WIB.
- Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., Innis, M.A. 1990. *PCR Protocols-A Guide to Methods and Applications*. pp 482. Academic Press, London. 19(1): 45 – 60.
- Gnapi, D.E., D.N. Pokon, H. Legnate, Z. Dapeng, D.S. Akaffon, K.C. Koffi, B. Bertrand, C. Montagnon, and A.S. N’Gnetta. 2022. Genetic structuring of parental populations of coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) breeding in Cote d’Ivoire using SNP markers. *Biotechnol. Agron. Soc. Environm.* 26 (3): 178-190.
- Handoyo, D dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*. 9(1): 17 – 29.
- Harahap, A.S. 2017. Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Beberapa Populasi Pohon Kapur Sumatera. *Journal of Animal Science and Agronomy Panca Budi*. 2(2): 1 – 6.
- Harahap, M.R. 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*. 1(2): 21 – 26.
- Haris, N., Hajrial, A., Nurita. T.M., dan Agus, P. 2003. Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) berdasarkan metode amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Menara Perkebunan*. 71(1): 1 – 15.
- Haryono, S.K. 2018. *Sitogenetika*. Lily Publisher. Yogyakarta.

- Herrera, J.C., Camayo, G., De-La-Torre, G., Galeano, N., Salcedo, E., Rivera, L.F., and Duran, A. 2013. Identificaion and distribution of *copia*-like retrotransposon sequences in the coffee (*Coffea L.*) genome. *Agronomia Colombiana*, 31(3): 269 – 278.
- Hofmann, A. and Clokie, S. 2018. *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Holme, D.J., and Peck, H. 1998. *Analytical Biochemistry*. Ed ke-3. Pearson Education Limited. Harlow, England.
- Indrawan, M., Primack, R.B., dan Supriatna, J. 2007. *Biologi Konservasi*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Klug, W.S., and Hazel, P. 1998. *Analytical Biochemistry*. Pearson Education limited. England.
- Kurniawan, K. 2012. *PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Universitas Pendidikan Ganesha. Bali, Indonesia.
- Kusuma, S.A.F. 2010. *PCR*. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Lee, D. W., Gould, K. S. 2002. Why leaves turn red. *American Scientist*. 90(6): 524 – 531.
- Lubis, K. 2014. Cara Pembuatan Pohon Filogeni. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*. 20(75): 66 – 69.
- Maksum, I.P., Sriwidodo, Gaffar, S., Hassan, K., Subroto, T., Soemitro, S. 2017. *Teknik Biologi Molekular*. Alqaprint Jatinangor. Sumedang.
- Malabarba, L.R., Malabarba, M.C. 2020. Phylogeny and classification of Neotropical Fish. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Martin, R. 1996. *Gel Electrophoresis: Nucleid Acids*. Bios Scientific Publisher. Oxford.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.

- Nurdiansyah, Y., Wardana, I., Tajuddin, M., dan Islami, N.I. 2017. Menentukan bibit kopi yang cocok ditanaman di Kecamatan Sumberjambe, Kabupaten Jember menggunakan metode *forward chaining*. *Informatics Journal*. 2(3): 148 – 153.
- Nurhayati, N. 2017. Karakteristik Sensori Kopi Celup Dan Kopi Instan Varietas Robusta Dan Arabika. *Jurnal Ilmiah INOVASI*. 17(2): 80 – 85.
- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan. 2016. *Perhutanan Sosial*. Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan. Republik Indonesia.
- Perrois Charle`ne, Susan R. Strickler, Guillaume Mathieu, Maud Lepelley, Lucie Bedon, Ste´phane Michaux, Jwanro Husson, Lukas Mueller, Isabelle Privat. 2015. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). *Planta*. 241: 179 – 191.
- Pixabay. 2017 . *Robusta Coffee*.  
<https://pixabay.com/id/images/search/robusta/>, diakses pada Sabtu, 30 September 2023, pukul
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2016. *Outlook Kopi*. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal – Kementerian Pertanian. Jakarta. CARI.
- Pusat Pemetaan Kelautan dan Lingkungan Pantai. 2013. *Laporan Tahunan 2013*. Badan Informasi Geospasial (BIG). Bogor.
- Rahardjo, P. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Rahayu, A.Y., Okti, H., Ervina, M.D., dan Rostman. 2019. Pengembangan Budidaya Kopi Robusta Organik pada Kelompok Tani Sido Makmur Desa Pesangkalan Kabupaten Banjarnegara. *Jurnal Pengabdhi*. 5(2): 104 – 109.
- Rainforest Alliance. 2020. Digital Agroforestry Program Pengambilan data dasar perhutanan sosial KPHL Batu Tegi dan KPHL Kota Agung Utara. Tanggamus. Lampung.

- Randriani, E., Dani. 2018. *Pengenalan Varietas Unggul Kopi*. IAARD Press. Jakarta.
- Rustiati, E.L., I. Kurniawan, A.W. Susanto, D.N. Pratiwi, J. Master, I.G. Swibawa. Supriyadi, Tugino, Edi, J. Suprianto, A. Aryandinata, O. Saputra. 2022. *Keanekaragaman hayati Register 31 KPHL Kota Agung Utara: Penelusuran cepat partisipatif bersama Gapoktanhut Lestari Sejahtera*. Aura. Lampung.
- Sahaba, M.A.B., Abdullah, A., Nugraha, R. 2021. DNA *barcoding* untuk autentikasi produk hiu segar dari perairan Nusa Tenggara Barat. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 24(3): 407 – 414.
- Sanderson, B.A., Araki, N., Lilley, J.L., Guerrero, G., Lewis, L.K. 2014. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 454(1): 44 – 52.
- Setyawati, R., Zubaidah, S. 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 – 40.
- Siahaan, J.A. 2008. *Analisis Daya Saing Komoditi Kopi Arabika Indonesia di Pasar Internasional*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor. CARI.
- Sinaga, A., Putri, L.A.P., Bangun, M.K. 2017. Analisis Pola Pita Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* D.C) Berdasarkan Primer OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20, OPN 09. *Jurnal Agroteknologi*. 5(1): 55 – 64.
- Suparman. 2012. Markah Molekuler dalam Identifikasi dan Analisis Kekerabatan Tumbuhan serta Implikasinya Bagi Mata Kuliah Genetika. *Jurnal BIOeduKASI*. 1(1): 59 – 68.
- Susanto, A.W. 2020. Kajian DNA Berbasis Kotoran Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) Liar di Perbatasan Taman Nasional Way Kambas-Desa Labuhan Ratu VII Berdasarkan Gen COI. *Skripsi*. Universitas Lampung, Lampung.
- Syafaruddin dan Santoso, T.J. 2011. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif Pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) *Airy Shaw*). *Jurnal Litri*. 17: 11 – 17.

- Syakir, M., dan E, Sumarni. 2017. Perubahan Iklim dalam Konteks Sistem Produksi dan Pengembangan Kopi di Indonesia. *Jurnal Litbang Pertanian*. 36(2): 77 – 90.
- Tauhida, N., Essy, H., Iskandar, Z.S. 2022. Comparison of Two DNA Extraction Methods for Dry Leaf Dipterocarpaceae. *Jurnal Natural*. 22(3): 168 – 172.
- Utami, A., Meryalita, R., Prihatin, N. A., Ambarsari, L., Kurniatin, P. A., dan Nurcholis, W. 2012. Variasi Metode Isolasi DNA Daun Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb). *Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa*. Surabaya, Indonesia.
- Widjaja, E.A., Yayuk, R., Joeni, S.R., Rosichon, U., Ibnu, M., Eko, B.W., dan Gono, S. 2014. *Kekinian Keanekaragaman Hayati Indonesia 2014*. LIPI Press. Jakarta.
- Wilson, K., and John, M.W. 1994. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge University Press. UK, 760 pp.