

**APLIKASI MOLEKULER DAN ANALISIS GENETIK SPESIES KOPI
ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) PADA KTH MANDIRI
JAYA, GAPOKTANHUT LESTARI SEJAHTERA, KABUPATEN
TANGGAMUS**

(Skripsi)

**Oleh
Muhammad Febriansyah**



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

2024

ABSTRAK

APLIKASI MOLEKULER DAN ANALISIS GENETIK SPESIES KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) PADA KTH MANDIRI JAYA, GAPOKTANHUT LESTARI SEJAHTERA, KABUPATEN TANGGAMUS

Oleh

Muhammad Febriansyah

Kabupaten Tanggamus merupakan salah satu Kabupaten di Lampung sebagai penghasil kopi robusta terbesar di Indonesia. Lebih dari 50% penduduk Tanggamus menerapkan perhutanan sosial, salah satunya Kelompok Tani Hutan (KTH), KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, di bawah binaan Kesatuan Pengelolaan Hutan (KPH) Kota Agung Utara. Salah satu tugas utama adalah tata kelola kawasan, menjaga keanekaragaman hayati. Informasi mengenai karakteristik genetik kopi robusta masih terbatas, termasuk di Kabupaten Tanggamus. Dalam upaya pembangunan data dasar plasma nutfah kopi robusta di KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Kabupaten Tanggamus dengan melakukan konfirmasi spesies secara molekuler menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis filogenetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengaplikasikan metode molekuler untuk konfirmasi spesies kopi robusta dan menganalisis genetik spesies kopi robusta yang terdapat di KTH Mandiri Jaya Gapoktanhut Lestari Sejahtera. Sampel yang digunakan adalah daun kopi robusta yang diambil di area perkebunan KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, sedangkan untuk analisis molekuler menggunakan daun muda kopi robusta dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung. Penelitian ini dilaksanakan dengan beberapa tahapan, yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis dan visualisasi DNA, sekuensing DNA, hasil sekuensing dianalisis dengan uji BLAST. Berdasarkan uji BLAST diperoleh bahwa sampel kopi KTH Mandiri Jaya terkonfirmasi sebagai spesies kopi robusta dengan memperoleh nilai *query cover* sebesar 97% dan nilai *percentage identity* sebesar 94,46%. Jarak genetik dan homologi antara sekuens kopi robusta dengan sekuens sampel kopi KTH Mandiri Jaya berkisar antara 8,60 – 13,79 dan 86,21% – 91,40%. Analisis dilanjutkan dengan mengkonstruksi pohon filogenetik menggunakan *software* MEGA, diperoleh bahwa sekuens sampel kopi robusta KTH Mandiri Jaya berada dalam satu kluster dari sekuens DNA *Coffea canephora* lainnya.

Kata kunci: analisis genetik, aplikasi molekuler, BLAST, kopi robusta, KTH Mandiri Jaya, perangkat lunak MEGA

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Skripsi : Aplikasi Molekuler dan Analisis Genetik Spesies Kopi Robusta (*Coffea Canephora* Pierre ex A. Froehner) pada KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus.

Nama Mahasiswa : Muhammad Febriansyah

NPM : 2017061017

Program Studi : Biologi Terapan

Jurusan : Biologi

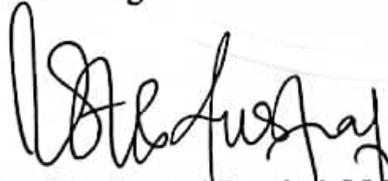
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Bandar Lampung, 16 Mei 2024

Menyetujui,

Komisi Pembimbing,

Pembimbing I



Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc.
NIP 196310141989022001

Pembimbing II



Priyambodo, S.Pd., M.Sc.
NIP 198611142015041003

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

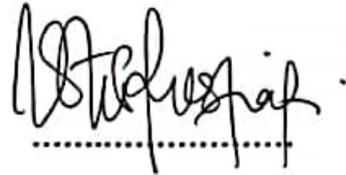


Dr. Jani Master, S.Si., M.Si.
NIP 198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



Anggota : Priyambodo, S.Pd., M.Sc.



Penguji Utama: drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 15 Mei 2024

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Febriansyah
NPM : 2017061017
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya berjudul

“Aplikasi Molekuler dan Analisis Genetik Spesies Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) Pada KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten 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.

Bandar Lampung, 16 Mei 2024
Yang menyatakan,



Muhammad Febriansyah
NPM. 2017061017

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Teluk Betung pada 14 Februari 2002 dan merupakan anak kedua dari pasangan Bapak Rozali dan Ibu Hamidah.

Penulis memulai pendidikan pertama di Sekolah Dasar (SD) Negeri 1 Sukamaju pada tahun 2008 hingga tahun 2014. Penulis melanjutkan pendidikannya pada tingkat Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 27 Bandar Lampung pada tahun 2014 hingga tahun 2017 dan tingkat Sekolah Menengah Kejuruan (SMK) Negeri 6 Bandar Lampung pada tahun 2017 hingga tahun 2020. Penulis resmi diterima sebagai mahasiswa di Program Studi Biologi Terapan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada tahun 2020 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama mengemban pendidikan akademik di Jurusan Biologi, penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Teknik Biomolekuler, Keterampilan Kerja Laboratorium, Biokonservasi, Mikrobiologi Bahan Pangan. Pada tahun 2022, penulis pernah mengikuti salah satu kegiatan Kampus Merdeka yaitu Program Kredensial Mikro Mahasiswa Indonesia (KMMI) yang diselenggarakan oleh Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara (UMSU) secara daring. Pada tahun 2023, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum lapangan mata kuliah Biokonservasi yang dilaksanakan di tiga (3) lokasi yaitu Taman Margasatwa Ragunan, Kebun Raya Cibodas, dan Taman Nasional Gede Pangrango. Penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Penguji Balai Karantina

Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Lampung pada tahun 2023 dengan judul “**Deteksi *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) Pada Sampel Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Laboratorium Penguji, Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Lampung**”. Penulis juga pernah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata selama 40 hari pada Juni – Agustus 2023 di Desa Bangun Rejo, Kecamatan Bangun Rejo, Kabupaten Lampung Tengah. Selain mengikuti kegiatan akademik, penulis juga pernah menjadi Kepala Bidang Kaderisasi dan Kepemimpinan di Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) Periode 2022 dan pernah berkontribusi dalam kegiatan Pekan Konservasi Sumber Daya Alam (PKSDA) yang merupakan acara tahunan Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) sebagai Koordinator Aksi Lingkungan.

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

***Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT,
kupersembahkan hasil karyaku dengan penuh kasih dan sayang kepada:***

***Bapak, Ibu dan keluargaku yang selalu memberikan cinta, kasih sayang, dan
semangat serta senantiasa mendoakan di setiap aku melangkah.***

***Bapak dan Ibu dosen pembimbing yang telah membimbing dan mengarahkan
dengan sangat sabar.***

***Partner dan teman seperjuangan yang senantiasa berjuang dan saling
memberikan dukungan serta semangat antara satu dengan yang lainnya.***

***Harapannya hasil karyaku menjadi bermanfaat untuk orang lain terkhusus di
dalam dunia konservasi walaupun hanya sebesar butir pasir.***

Salam Lestari

Almamater Tercinta, Universitas Lampung

MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”.

(Q.S. Al-Baqarah: 286)

“Pengetahuan yang baik adalah yang memberikan manfaat, bukan hanya diingat”.

Imam Syafi'i

“Success is not measured by how often you fall, but by how often you get back up”.

Vince Lombardi

“If you can't do it well, do it with love”.

Bunda Teresa

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim ...

Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh ...

Alhamdulillahirrabil'alamin ...

Puji syukur penulis haturkan atas kehadiran Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa, karena limpahan rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi sebagai syarat meraih gelar Sarjana Sains.

Skripsi yang berjudul “**Aplikasi Molekuler dan Analisis Genetik Spesies Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) Pada KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus**” telah dilaksanakan pada bulan November 2023 – Mei 2024, bekerja sama dengan KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPH Kota Agung Utara, dan Balai Veteriner Lampung.

Penulis sadar bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak pihak yang sangat membantu dan mendukung dalam pelaksanaan penelitian hingga penyusunan skripsi. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orangtua tersayang, Ibu Hamidah dan Bapak Rozali, yang telah memberikan kasih sayang, perhatian, dukungan serta doa yang tiada henti-hentinya dalam proses pendidikan hingga proses penyusunan skripsi.
2. Ibu Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing I, yang telah sabar membimbing, mendukung serta memberikan ilmu pengetahuan dan pembelajaran selama proses penelitian dan penyusunan skripsi hingga selesai. Penulis mengucapkan banyak terima kasih karena telah menjadi

lebih dari seorang pembimbing skripsi, melainkan menjadi orangtua dan guru.

3. Bapak Priyambodo, S.Pd., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing II, yang turut membimbing dan memberikan arahan, saran, serta masukan kepada penulis dalam proses penyusunan skripsi hingga selesai. Penulis mengucapkan banyak terima kasih karena telah menjadi lebih dari seorang pembimbing skripsi, melainkan menjadi orangtua dan guru.
4. Bapak drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc., selaku Penguji, karena telah turut memberikan ilmu, saran serta bimbingannya kepada penulis dalam proses penyusunan skripsi ini hingga selesai. Penulis mengucapkan banyak terima kasih karena telah menjadi lebih dari seorang penguji, melainkan menjadi orangtua dan guru.
5. Bapak drh. Suryantana, selaku Kepala Balai Veteriner Lampung.
6. Bapak drh. Hasan Abdullah, selaku Kepala Balai Veteriner Lampung Periode 2021-2024.
7. Bapak Supriyadi, selaku pemilik KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPH Kota Agung Utara, Kabupaten Tanggamus.
8. Bapak Rendy Hasarudin, Bapak Joko, Bapak Saidah, selaku Tim Tata Kelola Kawasan, Gapoktanhut Lestari Sejahtera KPH Kota Agung Utara, Kabupaten Tanggamus.
9. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
10. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si., selaku Ketua Program Studi S1 Biologi Terapan, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
11. Bapak Dr. Eng. Heri Satria., S.Si., M.Si., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
12. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., IPM., ASEAN Eng., selaku Rektor Universitas Lampung.
13. Ibu Rochmah Agustrina, Ph.D., selaku dosen Pembimbing Akademik.
14. Bapak dan Ibu dosen serta staf Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.

15. Ibu drh. Enny Saswiyanti, M.Si., dan Bapak Firwantoni atas bantuan serta arahannya selama melakukan penelitian di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung.
16. Dian Neli Pratiwi, S.Si., M.Ling., dan Alvin Wiwiet Susanto, S.Si., selaku kakak sekaligus *mentor* yang sangat membantu dan membimbing penulis dalam melakukan penelitian dan menyusun skripsi.
17. Kepada Muthia Azzahra selaku *partner* yang telah membantu dan memberikan dukungan penuh kepada penulis baik suka maupun duka dalam menyusun skripsi.
18. Kepada teman seperjuangan penulis R Fadly Bayu Dwiyoga, Aditya Fahrezi, Andriyani Wijaya Kusuma, Aulia Imtitsal, yang telah berjuang bersama dalam menyelesaikan skripsi ini.
19. Kepada teman penulis Indra Pratama, Riowansyah, Putri Lestari, Resya Tamara Agustin, Mutiara Anggita, Hudani Nadila, Nurshellia Apherta, dan Wulan Meri yang telah membantu penulis di dalam perkuliahan dan di luar perkuliahan.
20. Kepada teman – teman Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung angkatan 2020 yang tidak dapat disebutkan satu per satu karena telah menjadi bagian dari cerita yang akan selalu dikenang oleh penulis ketika penulis masih mengemban pendidikan di dunia perkuliahan.

Penulis masih menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diperlukan dalam penyusunan karya tulis ilmiah yang akan ditulis di kemudian hari.

Bandar Lampung, 2 Mei 2024
Penulis

Muhammad Febriansyah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL	xx
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan.....	4
1.3 Manfaat	4
1.4 Kerangka Teoritis	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kopi.....	6
2.1.1 Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner)....	6
2.1.2 Klasifikasi dan Morfologi	8
2.1.3 Habitat	10
2.1.4 Status Konservasi.....	10
2.2 Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus	10
2.3 <i>Deoxyribunucleic acid</i> (DNA).....	12
2.4 Analisis Molekuler	13
2.4.1 Ekstraksi DNA	13
2.4.2 Uji Kualitas DNA	14
2.4.3 Metode <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	16
2.4.4 Elektroforesis DNA.....	18
2.4.5 Sekuensing DNA.....	19
2.5 Analisis Data.....	20
2.5.1 Uji <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLAST)	20

2.5.2	Perangkat Lunak <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> (MEGA).....	20
III.	METODE PENELITIAN	22
3.1	Alat dan Bahan	22
3.2	Prosedur Kerja	23
3.2.1	Persiapan dan Perizinan Penelitian	23
3.2.2	Pengambilan Sampel Daun Kopi Robusta	24
3.2.3	Transportasi Pengambilan Sampel Daun Kopi Robusta	25
3.2.4	Ekstraksi DNA	25
3.2.5	Uji Kualitas DNA.....	28
3.2.6	Amplifikasi.....	28
3.2.7	Elektroforesis dan Visualisasi	30
3.2.8	Sekuensing DNA.....	31
3.3	Analisis Data	31
3.3.1	Uji <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLAST)	32
3.3.2	Penjajaran Urutan Basa Nitrogen.....	35
3.3.3	Analisis Jarak Genetik.....	46
3.3.4	Penyusunan Konstruksi Pohon Filogenetik	48
3.4	Diagram Alir Penelitian	50
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	51
4.1	Pengambilan Sampel Daun Kopi Robusta	51
4.2	Analisis Molekuler	54
4.3	Analisis Data	63
4.3.1	Identifikasi Homolog Spesies Kopi Robusta	63
4.3.2	Penjajaran Urutan Basa Nitrogen.....	65
4.3.3	Analisis Jarak Genetik.....	78
4.3.4	Konstruksi Pohon Filogenetik.....	80
V.	SIMPULAN	83
	DAFTAR PUSTAKA	84
	LAMPIRAN.....	94

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman kopi robusta	9
2. Profil Gapoktanhut Lestari Sejahtera	12
3. Proses pemotongan sampel daun kopi di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung	25
4. Penimbangan sampel daun yang telah dipotong di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung	26
5. Proses <i>binding</i> pada ekstraksi DNA	27
6. Hasil elektroferogram	32
7. Tampilan sekuens sampel (<i>forward</i> dan <i>reverse</i>)	32
8. Tampilan awal <i>browser</i> dan langkah awal dalam melakukan uji BLAST	33
9. Langkah kedua dalam melakukan uji BLAST	34
10. Langkah ketiga dalam melakukan uji BLAST	34
11. Tampilan awal dalam aplikasi MEGA XI	35
12. Tahapan awal dalam merunut basa nitrogen	35
13. Tahapan kedua dalam merunut basa nitrogen	36
14. Tahapan ketiga dalam merunut basa nitrogen	36
15. <i>Input</i> sekuen <i>forward</i> dan <i>reverse</i>	37
16. Tahapan penyelarasan basa nitrogen	38
17. Penghapusan deretan kosong pada situs awal	38
18. Penghapusan deretan kosong pada situs terakhir	39
19. Tahap pembuatan consensus dengan memilih sekuen <i>forward</i>	39
20. Tahap penyimpanan sekuen consensus pada <i>notepad</i>	40

21. Proses pembuatan jendela baru	40
22. Tahapan <i>input</i> sekuen pembandingan dari <i>genebank</i>	41
23. Tampilan sekuen pembandingan yang telah masuk.....	41
24. Tahapan perunutan basa nitrogen pada seluruh sekuen	42
25. Tahapan terakhir pada proses perunutan basa nitrogen.....	42
26. Tampilan awal setelah perunutan basa nitrogen.....	42
27. Pemotongan basa nitrogen pada situs awal	43
28. Pemotongan basa nitrogen pada situs akhir	43
29. <i>Export</i> sekuen ke <i>MEGA Format</i>	44
30. Opsi <i>folder</i> untuk menyimpan <i>file</i>	45
31. <i>Input</i> nama judul <i>file</i>	45
32. Tahapan akhir dalam <i>export file</i>	46
33. Langkah pertama dalam melakukan analisis jarak genetik	46
34. Langkah kedua dalam analisis jarak genetik	47
35. Langkah ketiga dalam melakukan analisis jarak genetik	47
36. Langkah keempat dalam melakukan analisis jarak genetik.....	48
37. Langkah kelima dalam melakukan analisis jarak genetik.....	48
38. Langkah pertama dalam membuat pohon filogenetik	49
39. Langkah kedua dalam membuat pohon filogenetik	49
40. Langkah ketiga dalam membuat pohon filogenetik.....	49
41. Diagram alir penelitian dengan judul Aplikasi Molekuler dan Analisis Genetik Spesies Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner) pada KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus	50
42. Pengambilan sampel daun kopi robusta.....	52
43. Sampel daun kopi robusta	52
44. Pelabelan sampel daun kopi robusta	53
45. Hasil uji kualitas DNA kopi robusta KTH Mandiri Jaya.	54
46. Hasil amplifikasi sampel daun kopi robusta KTH Mandiri Jaya.....	55
47. Elektroferogram sampel kopi robusta (<i>C. canephora</i> Pierre ex A. Froehner) KTH Mandiri Jaya <i>forward</i>	57

48. Elektroferogram sampel kopi robusta (<i>C. canephora</i> Pierre ex A. Froehner) KTH Mandiri Jaya <i>forward</i>	58
49. Elektroferogram sampel kopi robusta (<i>C. canephora</i> Pierre ex A. Froehner) KTH Mandiri Jaya <i>forward</i>	59
50. Elektroferogram sampel kopi robusta (<i>C. canephora</i> Pierre ex A. Froehner) KTH Mandiri Jaya <i>reverse</i>	60
51. Elektroferogram sampel kopi robusta (<i>C. canephora</i> Pierre ex A. Froehner) KTH Mandiri Jaya <i>reverse</i>	61
52. Elektroferogram sampel kopi robusta (<i>C. canephora</i> Pierre ex A. Froehner) KTH Mandiri Jaya <i>reverse</i>	62
53. Hasil uji BLAST	63
54. Konstruksi pohon filogenetik hasil sekuensing kopi robusta di KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus	81

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sekuen nukleotida primer amplifikasi kopi robusta	29
2. Profil amplifikasi.....	30
3. Sekuens pembandingan dari <i>genebank</i>	64
4. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 1 – 51	67
5. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 52 – 103	68
6. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 104 – 155	69
7. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 156 – 207	70
8. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 208 – 259	71
9. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 260 – 311	72
10. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 312 – 363	73
11. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 364 – 415	74
12. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 416 – 467	75
13. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 468 – 519	76
14. Hasil analisis urutan basa nitrogen pada nomor urut 520 – 568	77
15. Jarak genetik dan homologi spesies kopi robust KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera	79

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi menjadi salah satu hasil komoditi perkebunan yang memiliki nilai ekonomis tinggi dan diproduksi di berbagai negara. Indonesia menjadi salah satu eksportir kopi terbesar di pasar internasional. Berdasarkan data dari Departemen Pertanian Amerika Serikat (USDA), pada tahun 2022 Indonesia tercatat sebagai negara penghasil kopi terbesar ketiga di dunia dan memproduksi kopi sebanyak 11,85 juta kantong per 60 kg kopi yang terdiri dari 1,3 juta kantong kopi arabika dan 10,5 juta kantong kopi robusta. Menurut laporan Badan Pusat Statistik tahun 2022, Indonesia mengekspor kopi sebanyak 434,19 ribu ton dan mengalami peningkatan sebanyak 12,92% (BPS, 2023).

Kopi dapat ditemukan di berbagai daerah di Indonesia salah satunya Lampung. Menurut Kusmiati dan Reni (2011), Provinsi Lampung terkenal sebagai salah satu penghasil kopi terbesar kedua dan menjadi salah satu pemasok terbesar kopi robusta di Indonesia yaitu sebesar 21% dari jumlah total kopi di Indonesia. Menurut Rustiati *et al.* (2023), Kabupaten Tanggamus menjadi salah satu daerah penghasil kopi terbesar di Indonesia. Lebih dari 50% penduduk Tanggamus memiliki izin menanam dan memanen kopi yang ditanam di kawasan Perhutanan Sosial.

Menurut Undang Undang No 41 Tahun 1999, Kesatuan Pengelolaan Hutan (KPH) merupakan kesatuan wilayah pengelolaan hutan terkecil sesuai fungsi pokok dan peruntukannya sehingga dapat dikelola secara efisien dan

lestari. Kota Agung Utara merupakan salah satu Kesatuan Pengelolaan Hutan Lindung (KPHL) di Kabupaten Tanggamus, Provinsi Lampung dengan memiliki luas kawasan 56.000 ha dan sebagian besar lahan tersebut adalah perkebunan kopi (Rustiati *et al.*, 2023). Awalnya masyarakat sekitar kawasan KPHL Kota Agung Utara memanfaatkan sumberdaya hutan di KPHL secara ilegal, tanpa memperhatikan kelestarian hutan, sehingga untuk mengatasi masalah tersebut pemerintah mengeluarkan suatu kebijakan melalui program Hutan Kemasyarakatan (HKm). Pengelolaan HKm di areal KPHL Kota Agung Utara dilakukan oleh masyarakat yang tergabung di dalam Kelompok Tani Hutan (KTH) atau Gabungan Kelompok Tani dan Hutan (Gapoktanhut). Menurut Rustiati *et al.* (2022), kelompok tani yang bergabung dan bekerja sama untuk meningkatkan skala ekonomi dan efisiensi usaha telah diberikan izin Perhutanan Sosial (PS) di bawah rencana pengelolaan yang berkelanjutan, salah satunya adalah KTH Mandiri Jaya. Dengan melimpahnya kopi robusta di KTH Mandiri Jaya, petani lokal melakukan kultivar spesies kopi dengan menyambungkan antara varietas kopi robusta dan arabika untuk mendapatkan hasil produk dari tanaman kopi yang lebih unggul dan berkualitas.

Informasi mengenai keragaman genetik spesies kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) hingga saat ini masih sangat terbatas (Brokaw, 2013), namun hal ini sangat bermanfaat dalam ketahanan tanaman pertanian dan industri di masa depan (Jump *et al.*, 2008). Informasi genetik yang diperoleh dalam suatu spesies juga dapat digunakan sebagai basis untuk analisis kekerabatan antar spesies (Siburian, 2009). Salah satu upaya untuk menjaga dan melindungi informasi dasar keanekaragaman hayati khususnya kopi robusta di KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Kabupaten Tanggamus dengan melakukan konfirmasi dan analisis genetik spesies kopi robusta secara molekuler dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis filogenetik dengan menggunakan *software* BioMega.

Salah satu metode *in vitro* dalam sintesis DNA dapat menggunakan PCR. Prinsip dasar metode ini adalah memperbanyak fragmen DNA menggunakan enzim polimerase pada temperatur yang tinggi yang dilakukan secara berulang. Keunggulan dari metode PCR dari metode molekuler lain adalah memiliki spesifitas, sensitivitas, efisiensi dan keakuratan yang sangat tinggi. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya dalam mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui jumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polimerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk (Yusuf, 2010).

Kinanti (2018) meneliti keanekaragaman genetik kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) dengan menggunakan penanda DNA *RAPD*, namun penanda *RAPD* memiliki kekurangan yaitu hanya mengamplifikasi alel dominan (Azizah, 2018) sehingga tidak dapat membedakan individu homozigot dan heterozigot (Williams *et al.*, 1990) dan memiliki tingkat keberulangan yang rendah (Azizah, 2018). Sulistiyorini *et al.* (2021) meneliti keragaman genetik klon lokal kopi robusta asal Temanggung berdasarkan marka *SSR*, namun Zulfahmi (2013) menyatakan bahwa penanda *SSR* memiliki kekurangan yaitu pada tahap pemilihan primer perlu dilakukan *screening* dan optimasi terlebih dahulu sebelum diaplikasi karena setiap tanaman memiliki karakteristik spesifik yang berbeda, serta kemungkinan untuk terjadinya *slippage* selama proses amplifikasi sehingga ukuran produk hasil amplifikasi yang berbeda dari ukuran produk yang sebenarnya. Bahagiawati (2011) juga menyatakan bahwa marka *SSR* belum tersedia pada semua spesies tanaman, sehingga untuk merancang primer baru memerlukan waktu yang lama dan biaya yang mahal.

Penelitian mengenai konfirmasi dan analisis genetik spesies kopi robusta dari KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus belum pernah dilakukan. Penelitian ini dilakukan di bawah penelitian dasar Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc., dan Priyambodo, S.Pd.,

M.Sc., dengan judul Aplikasi Molekuler dan Analisis Genetik Spesies Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) pada KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus. Penelitian ini didanai oleh DIPA BLU Universitas Lampung tahun 2023.

1.2 Tujuan

Penelitian ini dilakukan di KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus bertujuan untuk:

1. Mengaplikasikan metode molekuler untuk konfirmasi spesies kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner); dan
2. Menganalisis genetik spesies kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner).

1.3 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini yaitu diharapkan mampu memberikan informasi dasar plasma nutfah, mendukung nilai-nilai konservasi, dan menambah sumber data *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) terkait dengan kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner).

1.4 Kerangka Teoritis

Kopi merupakan salah satu komoditas perkebunan terbesar di Indonesia yang memiliki nilai ekonomis tinggi sehingga produksi kopi di Indonesia bahkan di dunia sangat melimpah. Perkembangan kopi di Indonesia sangat berdampak besar bagi Provinsi Lampung yang merupakan sebagai salah satu penghasil kopi terbesar di Indonesia. Kabupaten Tanggamus menjadi salah satu pemasok kopi robusta terbesar di Indonesia.

Kopi robusta dibudidayakan melalui perhutanan sosial di KPHL Kota Agung Utara, Kabupaten Tanggamus, yang dilakukan oleh Gapoktanhut Lestari

Sejahtera berdasarkan pada Surat Keputusan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia. Salah satu strategi dalam menjaga dan melindungi informasi dasar keanekaragaman hayati khususnya kopi robusta di KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Kabupaten Tanggamus perlu dilakukannya konfirmasi dan analisis genetik spesies kopi robusta secara molekuler.

Kinanti (2018) meneliti keanekaragaman genetik kopi robusta (*C. canephora* Pierre ex A. Froehner) penanda DNA *RAPD*, dan sulistiyorini *et al.* (2021) meneliti keragaman genetik klon lokal kopi robusta asal Temanggung berdasarkan marka *SSR*. Penelitian mengenai konfirmasi dan analisis genetik spesies kopi robusta dari KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus belum pernah dilakukan.

Konfirmasi dan analisis genetik spesies secara molekuler dan pengumpulan informasi data keragaman genetik pada kopi robusta dapat menjadi salah satu cara untuk menjaga, melindungi keanekaragaman hayati, serta dapat menjadi informasi dasar plasma nutfah pada kopi robusta yang terdapat di KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Kabupaten Tanggamus. Kajian ini perlu diketahui dan dikonfirmasi terkait dengan keaslian spesies pada kopi robusta tersebut. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait dasar plasma nutfah dan keanekaragaman hayati pada spesies kopi robusta yang berguna dalam upaya konservasi dari keanekaragaman hayati kopi robusta, terutama dalam memiliki data plasma nutfah kopi robusta.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi

Kopi merupakan komoditas budidaya yang mampu tumbuh dengan baik di daerah tropis (Gnapi *et al.*, 2022). Kopi menjadi komoditas ekspor unggulan yang dikembangkan di Indonesia karena memiliki nilai ekonomis yang relatif tinggi di pasar dunia, sehingga permintaan kopi Indonesia dari waktu ke waktu terus meningkat (Muliani dan Nildayanti, 2018). Menurut Rahardjo (2021), kopi termasuk dalam *genus Coffea* dengan *family Rubiaceae*. *Genus Coffea* yang tersedia mencakup 70 spesies, tetapi hanya terdapat dua spesies yang ditanam dalam jumlah skala besar di seluruh dunia, yakni kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora* var. *robusta*). Sekitar 2% dari total produksi dunia berasal dari dua spesies lain yang ditanam dan produksinya dalam skala terbatas terutama di Afrika Barat dan Asia yaitu kopi ekselsa (*Coffea excelsa*) dan kopi liberika (*Coffea liberica*). Indonesia memiliki empat jenis kopi yang dibudidayakan di Indonesia yaitu kopi arabika, robusta, liberika, dan excelsa (Masduki, 2019).

2.1.1 Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner)

Menurut Tamalene *et al.* (2023), kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) merupakan salah satu spesies dari Famili Rubiaceae yang berasal dari Afrika sub-Sahara Tengah dan Barat. Tanaman ini berasal dari daerah tropis hutan di sekitar Danau Victoria di Uganda dan diperkenalkan ke Asia Tenggara pada tahun 1900.

Sebanyak 36% produksi kopi robusta di dunia berada di daerah tropis antara lain Indonesia, Vietnam, dan Brazil (Campuzano-Duque *et al.*, 2021). Kopi robusta merupakan salah satu jenis kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia dan merupakan komoditas perkebunan unggulan yang tahan terhadap serangan penyakit dan memiliki cita rasa yang pahit dan sedikit asam serta mengandung kadar kafein yang lebih tinggi dibandingkan dengan kopi arabika (Budi *et al.*, 2020).

Jumlah spesies dalam genus *Coffea* L., Famili Rubiaceae, suku *Coffea* masih belum pasti, namun sebagian besar referensi tentang taksonomi kopi menyebutkan bahwa genus tersebut terdiri atas 100 spesies tanaman (Pinto-Maglio, 2006). Spesies kopi memiliki dua macam jumlah kromosom, yaitu tetraploid ($2n = 4x = 44$) yang hanya dimiliki oleh kopi arabika (*Coffea arabica* L.) (Herrera *et al.*, 2013) dan diploid ($2n = 2x = 22$) yang dimiliki oleh kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) dan spesies kopi yang lain (Pierozzi *et al.*, 1999). Perbedaan dari keduanya adalah tanaman kopi arabika mampu melakukan penyerbukan sendiri sedangkan spesies kopi robusta dan spesies lainnya membutuhkan tanaman yang berbeda varietas atau klon untuk melakukan penyerbukan (Herrera *et al.*, 2013). Panjang kromosom tanaman kopi berkisar antara 1,5-3,5 μm (Herrera *et al.*, 2013) dan memiliki karakter morfologi yang hampir sama antara satu dengan yang lainnya. Pierozzi *et al.* (1999) menyatakan bahwa ukuran kromosom kopi robusta berkisar antara 0,85-2,38 μm dengan bentuk kromosom 8 submetasentrik dan 3 metasentrik. Sedangkan panjang kromosom kopi arabika berkisar antara 2,06-5,03 μm dengan bentuk 5 metasentrik, 16 submetasentrik, dan 1 akrosentrik (Clarindo dan Carvalho, 2008).

2.1.2 Klasifikasi dan Morfologi

Cronquist (1981) dan Froehner (1897) mengklasifikasikan kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) sebagai berikut:

Regnum	: Plantae (Tumbuhan)
Divisio	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Classis	: Magnoliopsida (Tumbuhan berkeping dua/dikotil)
Sub-Classis	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Familia	: Rubiaceae
Genus	: <i>Coffea</i>
Species	: <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner (Cronquist, 1981 dan Froehner, 1897)

Karakter morfologi dari tanaman kopi robusta adalah daunnya yang memiliki warna hijau dan berbentuk oval dengan tulang daun yang tegas, bunga kopi yang berwarna putih dan memiliki aroma yang wangi. Buah kopi terdapat dua biji kopi yang dibungkus dengan kulit tanduk (*parchment skin*) (Rahardjo, 2012). Biji kopi robusta memiliki karakteristik yaitu bijinya berbentuk agak bulat, lengkungan bijinya lebih tebal dibandingkan arabika serta memiliki garis tengah dari atas ke bawah hampir lurus (Panggabean, 2011).

Menurut Faza (2023), tanaman kopi varietas robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) memiliki sistem perakaran tunggang, perawakan pohon dan berwarna coklat tua. Batang tanaman kopi varietas robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) berjenis batang berkayu, memiliki bentuk bulat, memiliki permukaan kasar beruas-ruas, memiliki warna putih keabu-abuan, memiliki arah pertumbuhan batang dan cabang yang tegak lurus dan terkulai, serta memiliki tipe percabangan orthotrop (cabang reproduksi), plagiotrop

(cabang primer), dan cabang sekunder. Daun tanaman kopi varietas robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) termasuk ke dalam daun majemuk, memiliki helaian daun yang memanjang, memiliki pangkal daun yang tumpul, memiliki ujung daun yang runcing, memiliki tepi daun yang berombak, permukaan atas daun yang licin dan permukaan bawah daun yang kasar, memiliki tekstur daun seperti kulit/belulang, daun muda berwarna hijau muda dan daun tua berwarna hijau tua. Bunga tanaman kopi varietas robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) memiliki tipe perbungaan majemuk, termasuk ke dalam bunga lengkap dan berwarna putih (Faza, 2023) (Gambar 1).



Gambar 1. Tanaman kopi robusta (Sari, 2019).

2.1.3 Habitat

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 2.000 mm yang terdistribusi dalam 9-10 bulan. Suhu yang tinggi dan udara yang kering dapat merusak tanaman kopi (Coste, 1992). Kopi robusta dapat tumbuh pada ketinggian 0-800 mdpl. Di luar daerah asalnya, kopi robusta dapat tumbuh baik pada daerah dengan suhu tahunan rata-rata 22-26 °C. Menurut Djaenudin *et al.* (2003), kondisi optimal untuk pertumbuhan kopi robusta adalah pada daerah dengan kisaran suhu 22-25 °C, curah hujan 2.000-3.000 mm/tahun, dan 2-3 bulan kering. Tanaman ini memiliki keunggulan lebih resisten terhadap serangan hama dan penyakit (Pratiwi, 2016).

2.1.4 Status Konservasi

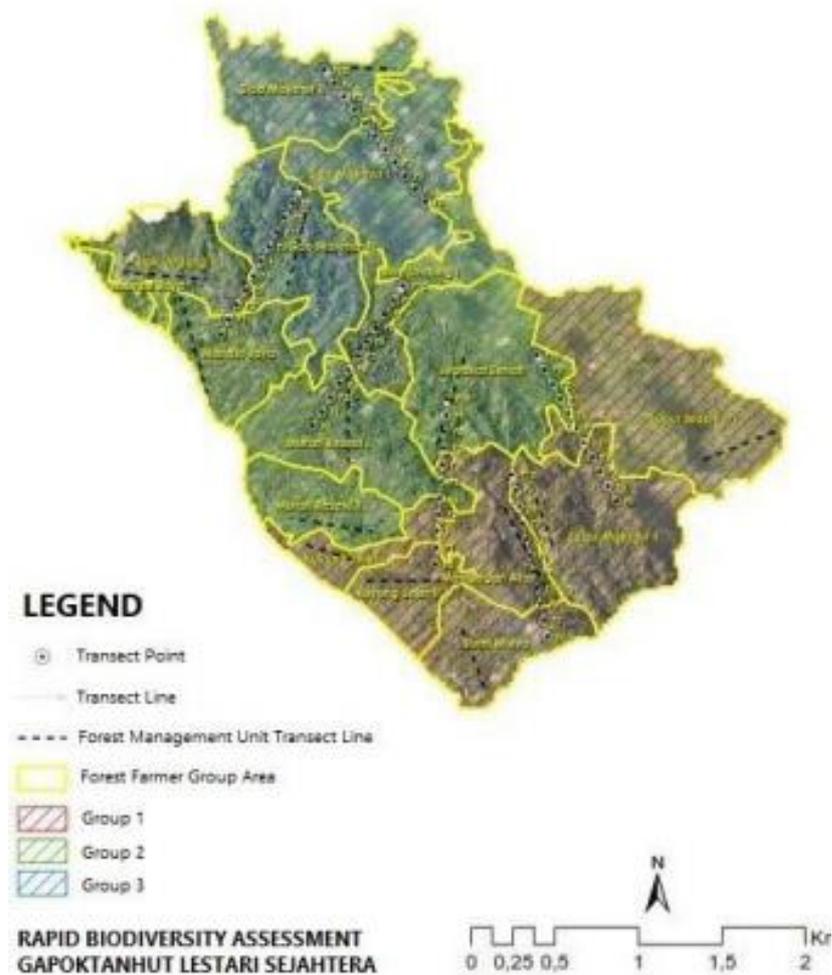
Menurut *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (2023), status konservasi dari kopi robusta berada pada tingkat resiko rendah (*Least Concern*). Hal ini menunjukkan bahwa spesies kopi robusta tidak termasuk ke dalam mendekati terancam punah, atau ketergantungan konservasi. Spesies ini tidak menjadi fokus konservasi spesies karena jumlahnya yang masih banyak di alam. Dengan melimpahnya kopi robusta di KTH Mandiri Jaya, petani lokal melakukan kultivar dengan menyambungkan antara varietas kopi robusta dan arabika untuk mendapatkan hasil tanaman kopi yang lebih unggul.

2.2 Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus

Gapoktanhut atau dapat disebut dengan Gabungan Kelompok Tani dan Hutan adalah suatu wadah atau gabungan kelompok petani yang bergabung

dan bekerja sama dalam meningkatkan ekonomi dan efisiensi usaha di dalam sektor pertanian. Gapoktanhut berada di bawah naungan pemerintah di bidang pertanian. Menurut Holikman *et al.* (2019), gapoktan dibentuk untuk memperkuat kerjasama dalam memperjuangkan kepentingan petani melalui kelembagaan petani.

Kabupaten Tanggamus merupakan salah satu kabupaten yang terdapat di Provinsi Lampung dan merupakan kabupaten hasil pemekaran dari Kabupaten Lampung Selatan yang telah diresmikan pada 21 Maret 1997. Kabupaten Tanggamus memiliki luas wilayah daratan sebesar 2.855,46 km² dan memiliki luas wilayah lautan sebesar 1.799,5 km² (Bazai, 2021). Salah satu mata pencaharian penduduk di Kabupaten Tanggamus adalah petani. Petani tersebut menggarap beberapa hasil perkebunan salah satunya adalah kopi yang tergabung dalam Gapoktanhut Lestari Sejahtera yang menjalankan hutan kemasyarakatan di Hutan Lindung Register 31 Pematang Arahan, KPHL Kotaagung Utara, Tanggamus (Gapoktanhut Lestari Sejahtera, 2019). Kecamatan Semaka merupakan salah satu kecamatan yang berbatasan dengan Kawasan konservasi dan Hutan Lindung yakni Taman Nasional Bukit Barisan Selatan (TNBBS) dan Kawasan Hutan Lindung Register 31 Pematang Arahan. Di Kawasan Hutan Lindung Register 31 Pematang Arahan telah mendirikan Gabungan Kelompok Tani dan Hutan (Gapoktanhut) Lestari Sejahtera. Kelompok petani penggarap telah sesuai dan berdasarkan pada 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 yang memiliki luas sebesar 683 ha pada kawasan hutan lindung di Pekon Parda Waras, Pekon Way Kerap, dan Pekon Sedayu, Kecamatan Semaka, Kabupaten Tanggamus, Provinsi Lampung (Gambar 2).



Gambar 2. Profil Gapoktanhut Lestari Sejahtera (Rustiati *et al.*, 2023).

Gapoktanhut Lestari Sejahtera merupakan termasuk di dalam area Kawasan Register 31 Pematang Arahau dan mencakup 13 Kelompok Tani Hutan (KTH) salah satunya adalah KTH Mandiri Jaya.

2.3 Deoxyribonucleic acid (DNA)

Deoxyribonucleic acid (DNA) merupakan makromolekul berupa benang sangat panjang yang terbentuk dari sejumlah besar deoksiribonukleotida, yang masing-masing memiliki susunan satu basa, satu gula, dan satu gugus fosfat (Rosana dan Yosadhat, 2019). Menurut Nur'aini *et al.* (2019), DNA memiliki karakteristik komponen penyusun antara lain gula deoksiribosa, gugus fosfat

dan basa nitrogen (adenin, guanin, timin dan sitosin). Untai DNA tersusun dari rangkaian nukleotida yang terhubung melalui ikatan fosfodiester yang terbentuk diantara gula pentosa dan gugus fosfat. Sedangkan, untai ganda DNA terhubung melalui ikatan hidrogen yang terbentuk di antara pasangan basa nitrogen. Pasangan basa nitrogen pada DNA meliputi adenin dan timin (dua ikatan hidrogen) serta guanin dan sitosin (tiga ikatan hidrogen).

2.4 Analisis Molekuler

2.4.1 Ekstraksi DNA

Berbagai teknik dalam analisis secara molekuler termasuk pemuliaan tanaman yang berdasarkan pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) membutuhkan DNA dalam jumlah yang cukup dan kualitas yang baik (Milligan, 1992). Ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Ekstraksi merupakan tahap awal yang paling penting dalam penelitian molekuler (Sambrook dan Russel, 2001). Secara umum proses ekstraksi meliputi penghancuran membran sel menggunakan *Sodium Dodesil Sulphate* (SDS) atau sejenis detergen, penghilangan protein dan RNA menggunakan Proteinase K dan RNase, pengendapan DNA, dan pemanenan DNA (Ariyanti dan Sister, 2019). Ekstraksi DNA adalah tahapan untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya seperti protein, karbohidrat, lemak, dan lainnya (Corkill dan Rapley, 2008). Ekstraksi DNA dilakukan dengan 3 tahapan yaitu *lysis*, *binding*, dan *washing*. Lisis pada proses ekstraksi bertujuan untuk menghancurkan membrane dan dinding sel sehingga bagian dalam sel dapat keluar (Holme dan Peck, 1998). Tahap selanjutnya adalah proses *binding* bertujuan untuk memisahkan DNA dari makromolekul lain seperti RNA, lipid, dan polisakarida. Tahap terakhir adalah *washing* yang bertujuan untuk menghilangkan residu dari zat yang digunakan pada tahap lisis dan pemisahan DNA (Hutami *et al.*, 2018).

Ekstraksi DNA dari tumbuhan dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel (*lysis of cell walls*), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa serta penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*), dan pengendapan DNA (*precipitation of DNA*). Proses ekstraksi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen seluler lain seperti protein, RNA, dan lemak (Retnaningati, 2020).

Kualitas DNA yang dihasilkan sangat penting untuk menentukan teknik molekuler selanjutnya, sehingga diperlukan metode ekstraksi yang tepat untuk memperoleh DNA dari berbagai sumber jaringan (Sambrook dan Russel, 2001). Ketepatan metode yang dilakukan sangat mempengaruhi kualitas DNA yang dihasilkan. Menurut Fan dan Gulley (2000) terdapat dua metode dalam ekstraksi DNA yaitu metode ekstraksi tradisional organik (manual) dan metode ekstraksi adopsi non-organik. Metode ekstraksi tradisional organik digunakan oleh banyak laboratorium untuk mendapatkan jumlah molekul DNA yang tinggi. Namun, dalam beberapa tahun terakhir telah terjadi kecenderungan adopsi protokol komersial non-organik, dikenal dengan sebutan kit ekstraksi, dengan waktu pengerjaan yang relatif lebih cepat dan menghindari toksisitas akibat penggunaan phenol (Hajibabael *et al.*, 2005).

2.4.2 Uji Kualitas dan Kuantitas DNA

Pengujian kualitas DNA dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA. Uji kualitas DNA dilakukan dengan horizontal elektroforesis, pengecekan hasil isolasi DNA pada gel agarose (Turrahmi *et al.*, 2021). Uji DNA secara kualitatif untuk mengetahui kualitas DNA yang diisolasi dan dilakukan dengan elektroforesis gel agarose 1% (w/v) menggunakan pewarna SYBR safeTM (Hikmatyar *et al.*, 2015).

Elektroforesis memiliki prinsip kerja memanfaatkan muatan listrik yang ada pada DNA yang bermuatan negatif. DNA yang dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut

akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono 2005). Hasil uji DNA yang baik dengan elektroforesis ditunjukkan dengan pita DNA yang tebal dan tampak sedikit atau tidak ada smear jika divisualisasikan di atas sinar UV (Sauer *et al.*, 1998).

Deteksi DNA kuantitatif dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri. Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittansi atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang, tiap media akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu tergantung pada senyawa atau warna yang terbentuk (Cairns, 2009). Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu objek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut akan diserap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet (Sastrohamidjojo, 2007).

Terdapat beberapa metode yaitu, spektrofotometri sinar tampak (*visible light*) spektrofotometri ultraviolet (sinar ultraviolet), spektrofotometri ultraviolet-tampak (*ultraviolet-visible light*) dan spektrofotometri inframerah (Dewanata dan Miftahul, 2021). Spektrofotometer UV-VIS adalah pengukuran serapan cahaya di daerah ultraviolet (200-350nm) dan sinar tampak (350-800nm) oleh suatu senyawa. Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein diukur pada panjang gelombang 280. Kemurnian larutan DNA dapat dihitung melalui perbandingan A₂₆₀ nm dengan A₂₈₀ nm. Batas kemurnian yang biasa dipakai dalam analisis molekuler pada rasio A₂₆₀/A₂₈₀ adalah 1,8-2,0 (Harahap, 2017).

2.4.3 Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan salinan sekuen DNA. Teknik ini menggunakan metode enzimatik yang diperantarai oleh primer. Prinsip dasar PCR adalah sekuen DNA spesifik diamplifikasi menjadi dua kopi selanjutnya menjadi empat salinan dan seterusnya. Pelipatgandaan ini membutuhkan enzim spesifik yang dikenal dengan polimerase. Polimerase adalah enzim yang mampu menggabungkan DNA cetakan tunggal, membentuk untai molekul DNA yang panjang. Enzim ini membutuhkan primer serta DNA cetakan seperti nukleotida yang terdiri dari empat basa yaitu *Adenine* (A), *Thymine* (T), *Cytosine* (C) dan *Guanine* (G) (Gibbs, 1990).

Reaksi amplifikasi ini dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan yang berantai ganda menjadi rantai tunggal, kemudian suhu diturunkan sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada DNA cetakan yang berantai tunggal. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya sebagai cetakan bagi reaksi polimerase berikutnya (Yuwono, 2006).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) serta terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda pada setiap siklusnya (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Prinsip dari teknik PCR adalah memperbanyak bagian spesifik dengan enzim DNA polimerase yang diinisiasi oleh pelekatan primer dengan menghubungkan deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dalam reaksi termal (Raven dan Johnson, 2002). Komponen - komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah *template* DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan

urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (*Deoxynucleotide trifosfat*); *buffer* PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Menurut Ebd-Elsalam (2003), primer mempengaruhi spesifitas dan sensitivitas reaksi PCR. Rancangan suatu primer merupakan salah satu parameter penentu keberhasilan suatu proses PCR. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Komponen - komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (*Deoxynucleotide triphosphates*); *buffer* PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extention*) dan (5) pemantapan (*post extention*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), dimana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Metode PCR dapat menjadi alternatif karena memiliki keakuratan yang tinggi (Radji *et al.*, 2010).

Faktor-faktor yang menentukan keberhasilan PCR di antaranya adalah konsentrasi dan kualitas DNA, temperatur *annealing* dari kedua primer, konsentrasi $MgCl_2$, enzim polimerase, konsentrasi dan kualitas primer, jumlah siklus PCR, *deoksinukleotida triphosphate* (dNTP), dan faktor lain seperti larutan *buffer*. Primer merupakan potongan pendek DNA untai tunggal yang komplemen dengan urutan target. Primer didesain spesifik karena untuk memperoleh keberhasilan proses amplifikasi DNA pada metode PCR (Diss, 2003). Desain primer yang tepat merupakan salah satu faktor keberhasilan dalam sekuensing (Sasmito *et al.*, 2014). Salah satu

faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan proses amplifikasi adalah pemilihan primer yang tepat. Penggunaan dan pemilihan primer sangat krusial dalam reaksi PCR. Primer berfungsi sebagai agen yang menginisiasi proses amplifikasi DNA pada sampel secara in-vitro dengan menandai *template* DNA yang diinginkan. Kesalahan dalam memilih primer akan menyebabkan primer menempel pada bagian lain dari DNA dan ampikon yang dihasilkan tidak sesuai dengan yang diharapkan (Rahayu dan Jannah, 2019).

2.4.4 Elektroforesis DNA

Elektroforesis merupakan teknik untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya (Nugraha *et al.*, 2014) yang memanfaatkan medan listrik yang dihasilkan dari elektroda-elektroda untuk memisahkan senyawa-senyawa yang memiliki muatan berupa kation ataupun anion (Harahap, 2018). Menurut Nugraha *et al.* (2014) prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), seperti DNA, akan bergerak menuju kutub positif, sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif. Makin kecil ukuran molekulnya maka makin cepat laju migrasinya, karena matriks gel mengandung jaringan kompleks berupa pori-pori sehingga partikel-partikel tersebut dapat bergerak melalui matriks. Ukuran fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA standar (DNA ladder) yang telah diketahui ukurannya.

Harahap (2018) menyatakan bahwa alat elektroforesis terdiri dari medium pemisah yang terhubung dengan dua elektroda dan kertas saring. Media pemisah dapat berupa gel Agarosa, pati atau poliakrilamida. Elektroforesis terdiri dari beberapa komponen utama dalam penggunaannya. Pertama adalah larutan elektrolit yang berfungsi sebagai pembawa komponen.

Umumnya berupa larutan *buffer* dengan pH tertentu sesuai dengan karakteristik senyawa yang akan dipisahkan. Berikutnya adalah media pemisah yang digunakan sebagai tempat proses pemisahan fragmen. Media pemisah dapat berupa kertas (selulosa asetat, selulosa nitrat), gel kanji, gel poliakrilamid, busa poliuretan atau agar-agar. Selanjutnya adalah elektroda yang berfungsi sebagai penghubung arus listrik dengan media pemisah dan baterai atau arus listrik sebagai sumber energi (*source*) pada rangkaian alat (Harahap, 2018).

2.4.5 Sekuensing DNA

Menurut Sjafaraenan *et al.* (2018), sekuensing merupakan tahap akhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi dengan PCR. Sekuensing DNA adalah tahapan dalam penentuan urutan basa nukleotida pada suatu segmen molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sekuensing DNA selanjutnya dapat dimanfaatkan dalam menentukan identitas, fungsi gen atau fragmen DNA dengan cara membandingkan sekuensnya dengan sekuens DNA lain yang telah diketahui (Lokapirnasari, 2017).

Sekuensing dilakukan dengan metode Sanger menggunakan *Automatic DNA Sequencer* yang berdasarkan pada metode *dye terminator labelling* (Sjafaraenan *et al.*, 2018). Metode Sanger (*Sanger dideoxy sequencing*) merupakan metode sekuensing DNA yang pertama kali digunakan, metode ini menggunakan DNA templat dan memerlukan primer spesifik untuk reaksi sekuensing. (Sanger *et al.*, 1977). Metode Sanger sering digunakan karena lebih mudah, praktis, dan efisien (Ridwan, 2008). Panjang sekuens yang dihasilkan di dalam metode ini adalah 1.000-1.200 pasang basa (bp) dan tidak mampu mencapai lebih dari 2.000 bp (Tasma, 2015).

2.5 Analisis Data

2.5.1 Uji *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) merupakan suatu program untuk pencarian kemiripan sekuen (*sequence similarity*) dan merupakan alat dalam identifikasi gen dan karakter genetik (Seprianto, 2017) sehingga dapat memberikan informasi biologis hingga tingkat serovar dari sekuens yang diamati (Achyar *et al.*, 2021). Fungsi BLAST antara lain untuk mengidentifikasi sekuens, menemukan DNA target dengan efisien, menyimpulkan fungsi gen dan menduga *domain architecture* dan struktur proteinnnya, serta merancang primer (Akinola *et al.*, 2019). Menurut Seprianto (2017) terdapat lima jenis pencarian utama dalam BLAST yaitu:

1. BLASTn (*Nucleotide BLAST*) berfungsi untuk membandingkan suatu sekuen nukleotida (*query sequence*) yang dimiliki dengan *database* sekuen nukleotida (Arunima *et al.*, 2020), hal ini berguna ketika dalam menentukan hubungan evolusi antara organisme yang berbeda.
2. BLASTp (*Protein BLAST*) berfungsi dalam membandingkan suatu sekuen asam amino yang dimiliki dengan database sekuen protein.
3. BLASTx berfungsi dalam membanding produk translasi konsep 6-frame sebuah sekuen nukleotida (*translated nucleotide*) yang dimiliki dengan database sekuen protein.
4. tBLASTn berfungsi dalam membandingkan suatu sekuen protein yang dimiliki dengan database sekuen nukleotida yang secara dinamis ditranslasi pada semua pembacaan 6 frame.
5. tBLASTx berfungsi dalam membandingkan suatu translasi 6 frame dari nukleotida.

2.5.2 Perangkat Lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA)

Perangkat lunak (*software*) MEGA adalah program aplikasi *desktop* yang dirancang untuk analisis komparatif rangkaian gen homolog baik dari

keluarga multigen atau dari spesies berbeda dengan penekanan khusus pada menyimpulkan hubungan evolusioner dan pola evolusi DNA dan protein. Program ini menganalisis jauh dekat hubungan kekerabatan berdasarkan identik atau tidak identiknya pasangan nukleotida.

1. Penyelarasan Urutan Basa Nitrogen

Basa nitrogen yang diselaraskan dapat menggunakan program *Clustal W* pada *software* MEGA.

2. Analisis Jarak Genetik

Jarak genetik adalah parameter yang digunakan untuk melihat keragaman genetik spesies yang diteliti. Nilai jarak genetik berkisar 0 – 1, nilai 0 menunjukkan spesies yang diamati memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat, sedangkan nilai 1 menunjukkan spesies yang diamati memiliki hubungan kekerabatan yang sangat jauh (Arifin dan Mulliadi, 2010). Analisis jarak genetik merupakan analisis berdasarkan penghitungan matriks dari “jarak” antar pasangan basa antara sekuens yang mendekati jarak evolusioner (Monalisa *et al.*, 2019).

3. Penyusunan Konstruksi Pohon Kekerabatan (Filogenetik)

Analisis filogenetik adalah salah satu metode yang dilakukan untuk mengetahui keanekaragaman suatu organisme melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan. Analisis filogenetik akan memberikan informasi terkait proses evolusi yang dialami suatu organisme, yang kemudian akan direpresentasikan dalam sebuah sistem percabangan (pohon filogenetika). Karakter yang sama akan menjadi dasar dalam menganalisis hubungan antar spesies yang diamati (Dharmayanti, 2011). Tujuan dari analisis filogenetik ini adalah untuk mengelompokkan serta memberikan informasi terkait evolusi kekerabatan antar spesies kopi agar dapat meningkatkan dan menjaga plasma nutfah dari kopi dalam bidang konservasi.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan dalam kurun waktu 3 bulan (November 2023-Januari 2024) dan di bawah penelitian dasar Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc., dan Priyambodo, S.Pd., M.Sc., dengan judul “Penandaan Molekuler Tanaman Kopi Robusta, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Sedayu, Tanggamus” dengan nomor kontrak 661/UN26.21/PN/2023. Lokasi pengambilan sampel daun kopi robusta yaitu di area perkebunan kopi robusta KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, KPHL Kota Agung Utara, Kecamatan Semaka, Kabupaten Tanggamus. Pengambilan sampel daun kopi robusta telah bekerja sama dengan Tim Kelola Kawasan, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, sedangkan pelaksanaan analisis molekuler bekerja sama dengan pihak Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung di bawah bimbingan drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pengoleksian sampel pada penelitian ini adalah amplop besar yang berwarna coklat, gunting, dan *totebag*. Alat yang digunakan dalam analisis molekuler yaitu, mikropipet (volume 200-1000 μ l, 20-200 μ l, dan 10-100 μ l) beserta tip (volume 1000 μ l, 200 μ l, dan 100 μ l), *microtube* (ukuran 1,5 ml dan 2 ml), *collection tubes*, mortar dan pestel, gelas ukur, cetakan agar, sisir *agarose*, spatula, gunting, *biosafety cabinet class II*, vortex merek IKA GENIUS 3, timbangan analitik, *Microwave* merek electrolux, kulkas, *freezer* merek modena,

sentrifus merek MPW, *waterbath* merek memmert, *thermal cycler* merek BIO-RAD T100™, *electrophoresis apparatus*, kamera, UV *Transilluminator*, dan komputer.

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA dalam penelitian ini adalah daun kopi robusta yang memiliki 3 hingga 5 helai daun yang segar, pena, kertas label, sarung tangan, plastik *ziplock*, masker, alkohol 70%, *tissue* dan silika gel. Bahan yang digunakan dalam analisis molekuler adalah kit isolasi DNA (*Genomic DNA Mini Kit Plant* (Geneaid GP100) yang berisi GP1 *buffer*, GP2 *buffer*, GP3 *buffer*, W1 *buffer*, *Wash buffer*, *Elution buffer*, RNase, alkohol absolut CAS-No. 64-17-5, MyTaq™ HS Red Mix Cat No. B10-25047 (Meridian Bioscience, USA), primer CAF2 *forward* dan CAF2 *reverse*, GD *column*, *filtered column*, *column matrix*, DNA marker Invitrogen TrackIt™ 100 bp DNA Ladder Cat. No. 104488058, larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) REF No. 10010-023, SYBR®safe DNA gel stain REF No. S33102, bubuk gel agarosa REF No. 75510-019, dan larutan *buffer* Tris Asetat EDTA (TAE) REF No. 15558-042.

3.3 Prosedur Kerja

Penelitian ini telah dilakukan melalui enam (6) tahapan yaitu persiapan dan perizinan penelitian, pengambilan sampel daun kopi robusta, ekstraksi DNA, amplifikasi, elektroforesis dan visualisasi, dan sekuensing DNA.

3.3.1 Persiapan dan Perizinan Penelitian

Persiapan dan koordinasi terkait dengan perizinan penelitian dilakukan bersama dengan pihak Tim Kelola Kawasan KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Balai Veteriner Lampung, dan Dinas Kehutanan Provinsi Lampung. Koordinasi terkait perizinan penelitian bersama pihak Tim Tata Kelola Kawasan KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera dilakukan untuk mendapatkan izin dalam pengambilan

sampel daun kopi robusta. Koordinasi bersama Dinas Kehutanan Provinsi Lampung dilakukan untuk mendapatkan izin penelitian di kawasan hutan lindung Kota Agung Utara, Kabupaten Tanggamus. Koordinasi bersama Balai Veteriner Lampung dilakukan untuk mendapatkan izin penelitian di dalam Laboratorium Bioteknologi untuk analisis secara molekuler.

3.3.2 Pengambilan Sampel Daun Kopi Robusta

Pengambilan sampel daun kopi robusta bersama dengan Tim Tata Kelola Kawasan KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus. Pengambilan sampel dilakukan dengan memotong daun yang memiliki jumlah daun kopi robusta 3 hingga 5 helai daun di KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera. Daun yang diambil untuk dijadikan sampel adalah daun yang berisi 3 hingga 5 helai daun yang masih muda, segar, dan bersih dari hama serta penyakit.

Bagian daun yang diambil, selanjutnya disterilkan dengan alkohol 70% agar menjaga dan menghindari sampel dari debu, hama, dan penyakit yang akan menimbulkan kontaminan pada sampel (Triani, 2020). Sampel yang telah disterilkan, selanjutnya diusap dan dikeringkan dengan *tissue* hingga semua bagian telah kering. Selanjutnya sampel diberikan air yang dituang ke dalam *tissue* steril lalu diikatkan pada bagian pucuk daun untuk menjaga kualitas kesegaran sampel hingga sampel diletakkan ke dalam kulkas dengan suhu -4°C pada hari berikutnya. Sampel yang telah diberikan *tissue* steril yang berisi cadangan air lalu dimasukkan ke dalam amplop besar berwarna coklat yang telah diisi dengan silika *gel* yang bertujuan untuk mempercepat penyerapan air dari sampel daun agar cepat kering (Mahadi *et al.*, 2021) dan telah diberi label data yang berisi nama spesies, bagian yang diambil, lokasi pengambilan, tanggal pengambilan sampel, kolektor/pelaksana, dan pemilik kebun. Amplop berisi sampel dimasukkan ke dalam plastik *ziplock*, dan dimasukkan ke dalam *totebag* untuk proses transportasi sampel ke laboratorium bioteknologi untuk proses analisis selanjutnya.

3.3.3 Transportasi Pengambilan Sampel Daun

Sampel daun yang telah dimasukkan ke dalam *totebag*, kemudian dibawa dari KTH Mandiri Jaya menuju laboratorium bioteknologi Balai Veteriner Lampung untuk proses analisis secara molekuler.

3.3.4 Ekstraksi DNA

Tahapan ekstraksi DNA sampel ranting kopi dilakukan dengan menggunakan kit isolasi DNA yaitu *Genomic DNA Kit Mini Plant* yang berasal dari Geneaid yang dioptimalkan untuk memurnikan DNA baik DNA genom, DNA mitokondria maupun DNA kloroplas (Geneaid Protocol, 2020). Sampel diambil dari kulkas lalu dipotong dan diambil bagian daun yang masih muda untuk dilakukan proses ekstraksi. Tahapan awal ekstraksi dalam proses lisis yaitu sampel daun yang telah dipilih dan masih segar (berwarna hijau dan masih terdapat klorofil) dipotong (Gambar 3) dan ditimbang sebanyak 200 mg (Gambar 4). Sampel selanjutnya ditambahkan dengan larutan PBS dan digerus menggunakan mortar dan pestle hingga halus. Sampel yang telah halus selanjutnya dimasukkan ke dalam mikrotube yang berukuran 1,5 ml dengan menggunakan mikrotip.



Gambar 3. Proses pemotongan sampel daun di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung.



Gambar 4. Penimbangan sampel yang telah dipotong di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung.

Sampel yang telah halus kemudian dipindahkan pada *tube* baru dan ditambahkan 400 μ l GP1 *Buffer* untuk melisiskan membran dan dinding sel (Rau *et al.*, 2018) dan 5 μ l RNase untuk menghambat aktivitas RNA selama ekstraksi DNA (Murtiyaningsih, 2017) (Gambar 5), kemudian dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Sampel yang diinkubasi, setiap 5 menit dilakukan perlakuan dengan membalikkan tabung. Secara bersamaan dengan proses inkubasi sampel, dilakukan *pre-heating* terhadap *buffer elution* sebanyak 200 μ l pada suhu 60°C untuk proses *pre heating*. Sampel yang telah diinkubasi, kemudian ditambahkan 100 μ l GP 2 *buffer* dan dihomogenkan dengan vortex, kemudian sampel diinkubasi kembali di dalam es selama 3 menit. Suspensi yang merupakan campuran sampel dan GP2 *buffer* selanjutnya diletakkan ke dalam *filtered coloumn* yang telah dilengkapi oleh 2 ml *collection tube*, kemudian suspensi pada *filtered coloumn* disentrifus selama 1 menit pada 10.000 rpm. Suspensi yang telah tersaring kemudian dipindahkan dari 2 ml *collection tube* ke dalam tube 1,5 ml yang baru.

Tahapan awal *binding* dalam proses ekstraksi yaitu suspensi yang telah dipindahkan ke dalam tube 1,5 ml yang baru ditambahkan 1.125 μ l volume GP3 *buffer* untuk mengikat DNA (Rau *et al.*, 2018) lalu dihomogenkan menggunakan vortex selama 5 detik. Suspensi yang telah dihomogenkan selanjutnya dipindahkan ke dalam GD *coloumn* yang telah dilengkapi oleh 2 ml *collection tube* sebanyak 700 μ l kemudian disentrifus pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. GD *coloumn* selanjutnya dipindahkan ke *collection tube* yang baru, kemudian ditambahkan kembali 700 μ l suspensi dan dilakukan perlakuan yang sama seperti sebelumnya.



Gambar 5. Proses *binding* pada ekstraksi DNA di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung.

Tahap awal *washing* dalam proses ekstraksi yaitu suspensi yang telah disentrifus selanjutnya ditambahkan larutan W1 *buffer* sebanyak 400 μ l untuk menghilangkan residu lainnya (Rau *et al.*, 2018) dan dimasukkan ke dalam GD *coloumn*, lalu disentrifus pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik, kemudian suspensi dipindahkan ke dalam GD *coloumn* yang telah dilengkapi oleh 2 ml *collection tube*. Suspensi yang telah terpisah,

kemudian dimasukkan ke dalam GD *column* dan ditambahkan *wash buffer* sebanyak 600 μ l dan, selanjutnya disentrifus pada kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan *column matrix*.

Suspensi yang telah disentrifus selanjutnya ditambahkan etanol absolut sebanyak 400 μ l dan dimasukkan ke dalam GD *column*, lalu disentrifus pada 14.000 rpm selama 30 detik. Suspensi yang telah disentrifus kemudian dipindahkan ke GD *column* yang telah dilengkapi 2 ml *collection tube*, lalu disentrifus selama 3 menit pada 14.000 rpm untuk mengeringkan *column matrix*. GD *column* yang telah kering lalu dipindahkan ke dalam tube 1,5 ml, lalu sampel ditambahkan 100 μ l *elution buffer* yang sebelumnya telah dilakukan *pre heating* atau TE ke tengah *column matrix*. Mikrotube yang berisi TE didiamkan selama 3-5 menit untuk memastikan *buffer elution* atau TE sepenuhnya diserap, lalu sampel disentrifus pada 14.000 rpm selama 30 detik hingga mendapatkan DNA yang murni.

3.3.5 Uji Kualitas DNA

Pengujian kualitas DNA kopi robusta dilakukan secara sederhana dengan proses elektroforesis DNA menggunakan *gel agarose* 1%. Sebanyak 2 μ L DNA kopi robusta KTH Mandiri Jaya selanjutnya dicampurkan larutan *loading dye* sebanyak 1 μ L. Elektroforesis dilakukan selama 35 menit pada tegangan 100 volt. Visualisasi fragmen hasil elektroforesis dilakukan dengan bantuan pewarna SYBR®safe DNA *gel stain* yang dilihat dengan sinar UV Transilluminator menggunakan mesin *Gel Doc*.

3.3.6 Amplifikasi

Proses amplifikasi dilakukan menggunakan alat *thermal cycler*. Volume reaksi tiap PCR tube adalah sebanyak 21 μ L dengan komponen sebagai berikut: MyTaq™ HS Red Mix Cat No. B10-25047 (Meridian Bioscience,

USA) sebanyak 10 μL , *Nuclease Free Water* sebanyak 4,4 μL , primer CAF2 *forward* dan CAF2 *reverse* Cat No. 4422303 (Tabel 1) masing-masing sebanyak 0,8 μL , dan DNA *template* sebanyak 5 μL .

Tabel 1. Sekuen Nukleotida Primer Kopi Robusta (Perrois *et al.*, 2015)

Primer	Sekuen	Panjang bp
CAF2 <i>Forward</i>	5' - ATGGAGCTCCAAGAAGTCCTGCG - 3'	1858
CAF2 <i>Reverse</i>	5' - TTACATGTCTGACTTCTCTGGCT - 3'	

Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR dengan melalui 3 tahapan utama yaitu denaturasi, *annealing*, dan *extension*. Pada tahap awal dilakukan tahap pre-denaturasi dengan suhu 94°C selama 5 menit merupakan awal dari proses denaturasi. Denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 1 menit merupakan proses awal dalam mengurai untai ganda pada DNA sehingga terbentuk cetakan DNA tunggal. Waktu denaturasi tidak boleh terlalu lama karena dapat merusak kualitas DNA. Setelah melalui denaturasi, amplifikasi dilanjutkan dengan penempelan dan pengenalan (*annealing*) primer untuk mendapatkan lokus gen target. Suhu untuk *annealing* dilakukan pada angka 60°C dengan waktu 2 menit dengan hasil modifikasi pada saat optimasi suhu. Modifikasi terhadap temperatur *annealing* dilakukan pada sampel yang tidak teramplifikasi menggunakan prosedur standar (Pertwi *et al.*, 2015). Kesesuaian suhu ketika proses *annealing* dapat mempengaruhi keberhasilan amplifikasi, suhu yang terlalu rendah (di bawah 37°C) atau terlalu tinggi (di atas 60°C) akan mengakibatkan *mispriming* dan primer tidak dapat menempel (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Proses *annealing* merupakan tahapan yang penting dalam amplifikasi sehingga sangat penting dilakukan pencarian suhu optimum untuk dapat diperoleh DNA hasil dalam jumlah yang maksimum pada daerah yang ditargetkan sehingga memudahkan dalam analisis DNA (Aulia *et al.*, 2021).

Tahap amplifikasi DNA selanjutnya adalah tahap pemanjangan atau *Extension*. Pada tahap ini, untai baru yang terbentuk dimulai dari posisi basa nukleotida yang ditemplei oleh primer mulai dari ujung 5' menuju ke ujung 3'. Tahap *Extension* dilakukan pada suhu 72°C dan waktu 60 detik. Tahap akhir setelah semua siklus berakhir adalah tahapan *Final Extension* yang bertujuan untuk memastikan semua basa nukleotida pada untai DNA dari lokus gen target sudah terbentuk. *Final Extension* berlangsung selama 2 menit dengan suhu 72°C. Seluruh siklus amplifikasi pada PCR, dilakukan berulang-ulang sebanyak 35 siklus (Tabel 2) untuk memenuhi jumlah kelipatan segmen DNA yang diperlukan (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Tabel 2. Profil Amplifikasi

Tahapan	Profil
<i>Pre-denaturation</i>	94°C, 5 menit
35 Siklus	
➤ <i>Denaturation</i>	94°C, 1 menit
➤ <i>Annealing</i>	60°C, 1 menit
➤ <i>Extention</i>	72°C, 2 menit
<i>Post Extention</i>	72°C, 7 menit

Sumber: Perrois *et al.*, 2015 (*Modified*)

3.3.7 Elektroforesis dan Visualisasi

Elektroforesis dilakukan dengan cara mengaliri DNA yang ada di dalam sumur yang berada di dalam wadah dengan bantuan arus listrik. Gel agarosa 1% dibuat dengan cara melarutkan 1 gram bubuk gel agarosa dalam 100 ml larutan TAE lalu dipanaskan di dalam *microwave* selama 3 menit. Setelah itu, larutan gel agarosa ditambahkan dengan SYBR®safe DNA *gel stain* sebanyak 10 µl. Larutan gel agarosa dimasukkan ke dalam cetakan yang telah diberikan sisir dan dibiarkan selama 30 menit hingga mengeras. Larutan gel agarosa yang telah memadat dimasukkan ke dalam *chamber*. Sampel sebanyak 6 µl dimasukkan ke dalam sumuran yang ada di dalam agar. DNA *marker* sebanyak 6 µl juga dimasukkan ke dalam sumur

tersendiri sebagai pembanding. *Chamber* disambungkan pada *power supply*. Proses elektroforesis dijalankan selama 30 menit dengan tegangan 100 V dan kuat arus 400 A. Hasil elektroforesis divisualisasikan di bawah sinar *bluelight* dan difoto dengan menggunakan kamera yang sudah terhubung dengan komputer melalui aplikasi *EOS Utility*. Pengamatan akan dilakukan untuk melihat keberadaan pita DNA dan kualitas DNA sampel pada gel agarosa.

3.3.8 Sekuensing DNA

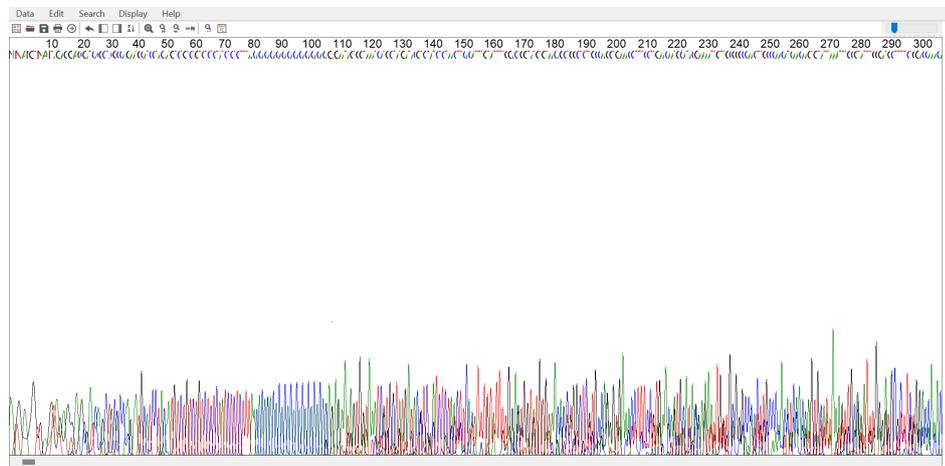
Sampel DNA kopi yang telah didapatkan dari hasil amplifikasi dan elektroforesis dilanjutkan dengan proses sekuensing yang bertujuan untuk menentukan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Sekuensing dilakukan dengan mengirimkan hasil amplifikasi sampel serta primer kopi ke PT Genetika Science Indonesia. *PCR tube* yang berisi amplicon DNA kopi robusta dilakukan penyegelan pada proses pengangkutan pra analisis. Selain *tube* yang berisi amplicon DNA kopi robusta, satu *set* primer dengan volume 100 µl juga disertakan di dalam pengirimannya. Amplicon yang berada di dalam *PCR tube* dimasukkan ke dalam kotak plastik yang telah diisi *styrofoam*. Kotak plastik diisolasi dengan menggunakan pita perekat dan dicantumkan nama pengirim dan penerima pada kotak tersebut.

3.4 Analisis Data

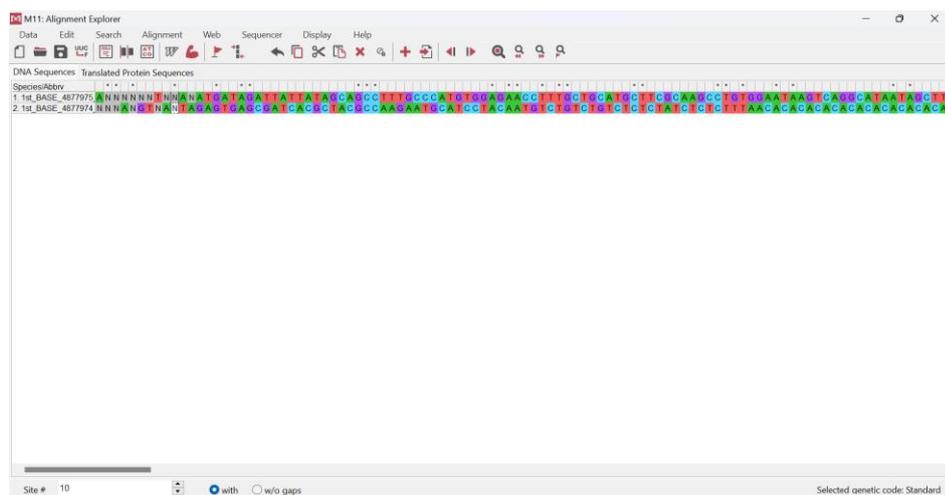
Analisis data yang dilakukan yaitu Uji *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang akan digunakan untuk memastikan hasil sekuensing sesuai dengan target yang diinginkan; dan *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versi kesebelas (MEGA XI) yang akan digunakan dalam menganalisis hasil proses sekuensing seperti penyelarasan basa nitrogen (*alignment*), analisis jarak genetik, dan konstruksi pohon filogenetik. Data yang akan didapatkan dari analisis hasil sekuensing adalah runutan basa nitrogen, nilai jarak genetik, nilai homologi, dan pohon filogenetik (Susanto, 2021).

3.4.1 Uji *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

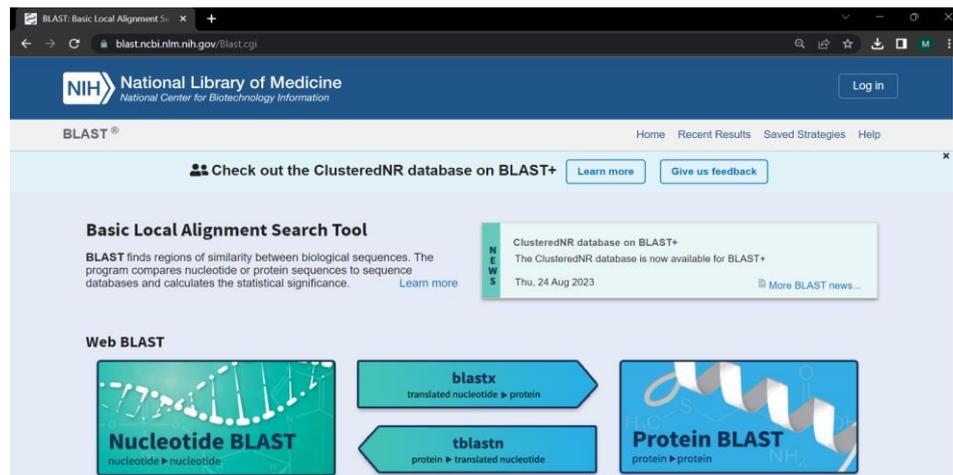
Sampel yang telah disekuensing akan mendapatkan hasil berupa elektroferogram (Gambar 6) untuk melihat kualitas sampel dan urutan basa nukleotida pada sampel. Urutan basa nukleotida yang telah didapatkan selanjutnya diproses ke *software* MEGA untuk proses pemotongan basa nukleotida (*trimming*) (Gambar 7). Susanto (2021) menyatakan bahwa program analisis BLAST dapat diakses melalui *browser* dengan tautan berikut <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Gambar 8).



Gambar 6. Hasil elektroferogram.



Gambar 7. Tampilan sekuen sampel (*forward* dan *reverse*).



Gambar 8. Tampilan awal *browser* dan langkah awal dalam uji BLAST.

Terdapat pilihan “*Nucleotide BLAST*” pada tampilan bawah lalu dipilih untuk dapat melakukan uji BLAST pada sekuen nukleotida. Hasil sekuensing berupa sekuen yang akan diuji dapat diletakkan pada bagian “*Enter Query Sequence*” di dalam kolom “*Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)*” atau dapat juga diunggah secara langsung dengan memilih tombol “*Pilih file*” dan memilih *fasta file* (txt.) yang akan diunggah. Tombol “BLAST” dipilih dan diklik untuk menjalankan proses pencarian (Gambar 9).

Hasil pencarian pada uji BLAST dapat diketahui dengan adanya tampilan awal pada pencarian (Gambar 10). Pada bagian “*Descriptions*” terdapat daftar sekuen *data base* yang memiliki tingkat kemiripan dengan sekuen yang akan dipilih dan dimasukkan. Sekuen yang memiliki kemiripan paling tinggi akan berada pada posisi paling atas dari urutan daftar *data base* tersebut. Persentase dan nilai kesamaan dapat dilihat pada kolom “*Percent Identity*” atau dalam tabel ditulis “*Per. Ident*”.

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface. The top navigation bar includes the NIH logo and 'National Library of Medicine' text. Below this, the 'BLAST' suite is selected, and the 'Standard Nucleotide BLAST' program is chosen. The 'Enter Query Sequence' section contains a text area with a DNA sequence: CTGATCAGCCAGCGTAAAGTCCATGACAAATTAAGGAGATAGTAG (CAATTAAGAGAGTCAATTCATGACCCCTTTCTGGACAGATTTCCAG AAAGCTTTATGCGCTGATACACATAGTCTCAGCATTCATTGGCAACCTC GGGTCTCAAATGGACAGGCTACTATAACTTATCA. Below the text area are fields for 'Query subrange' (From and To), 'Job Title', and 'Align two or more sequences'. The 'Choose Search Set' section has radio buttons for 'Standard databases (nr etc.)', 'rRNA/ITS databases', 'Genomic + transcript databases', and 'Betacoronavirus'. The 'Organism' field is set to 'Nucleotide collection (nr/nt)'. The 'Limit to Entrez Query' section has a 'BLAST' button and a 'Show results in a new window' checkbox. The 'Program Selection' section has radio buttons for 'Highly similar sequences (megablast)', 'More dissimilar sequences (discontiguous megablast)', and 'Somewhat similar sequences (blastn)'. The 'Algorithm parameters' section is expanded.

Gambar 9. Langkah kedua dalam melakukan uji BLAST.

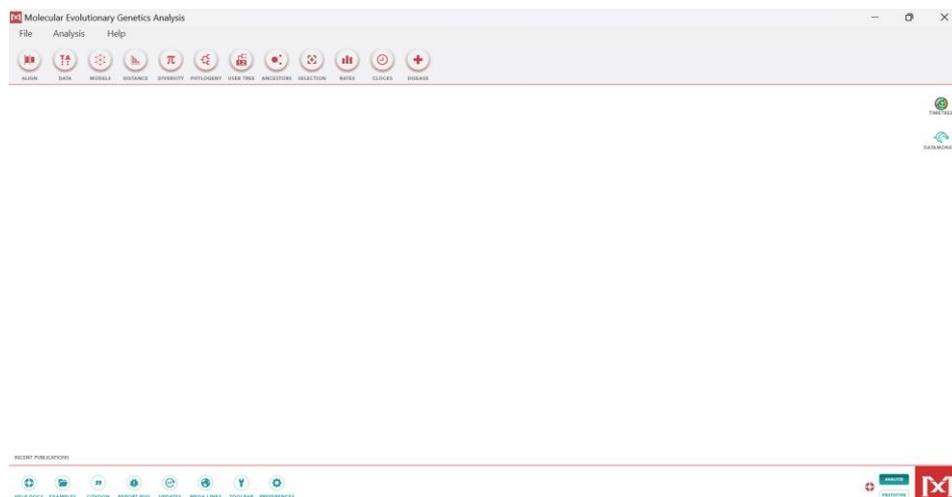
The screenshot shows the NCBI BLAST search results page. The 'Job Title' is '1st_BASE_4877974_3_F_CAF2'. The 'Program' is 'BLASTN'. The 'Database' is 'nt'. The 'Description' is '1st_BASE_4877974_3_F_CAF2'. The 'Molecule type' is 'dna'. The 'Query Length' is '800'. The 'Filter Results' section has a 'Filter' button. The 'Sequences producing significant alignments' section shows a table with columns: Description, Scientific Name, Max Score, Total Score, Query Cover, E value, Per Ident, Acc. Len, and Accession. The table contains several rows of results, including 'Coffea arabica 7-methylxanthine methyltransferase 1 (MOMT1) gene, complete cds' and 'Coffea canephora oxidative caffeine synthase gene, complete cds'.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Coffea arabica 7-methylxanthine methyltransferase 1 (MOMT1) gene, complete cds	Coffea arabica	1139	1139	97%	0.0	93.10%	1838	JX079511.1
Coffea canephora oxidative caffeine synthase gene, complete cds	Coffea canephora	1021	1162	97%	0.0	96.04%	1666	AY273814.1
Coffea canephora clone CX81 zutative N-methyltransferase-like gene, complete sequence	Coffea canephora	991	1127	97%	0.0	94.78%	2003	AY918125.1
Coffea canephora 7-methylxanthine methyltransferase 1 (MOMT1) gene, complete cds	Coffea canephora	985	1122	97%	0.0	94.46%	1829	JX079507.1
Coffea canephora clone PG-5-N-methyltransferase (NMT1) gene, promoter region and complete cds	Coffea canephora	985	1122	97%	0.0	94.46%	2621	DQ205011.1
Coffea canephora clone PG-1-N-methyltransferase (NMT1) gene, promoter region and complete cds	Coffea canephora	985	1117	97%	0.0	94.46%	2452	DQ348077.1
Coffea canephora clone CX10-N-methyltransferase gene, complete cds	Coffea canephora	981	1117	97%	0.0	94.30%	1943	AY918124.1

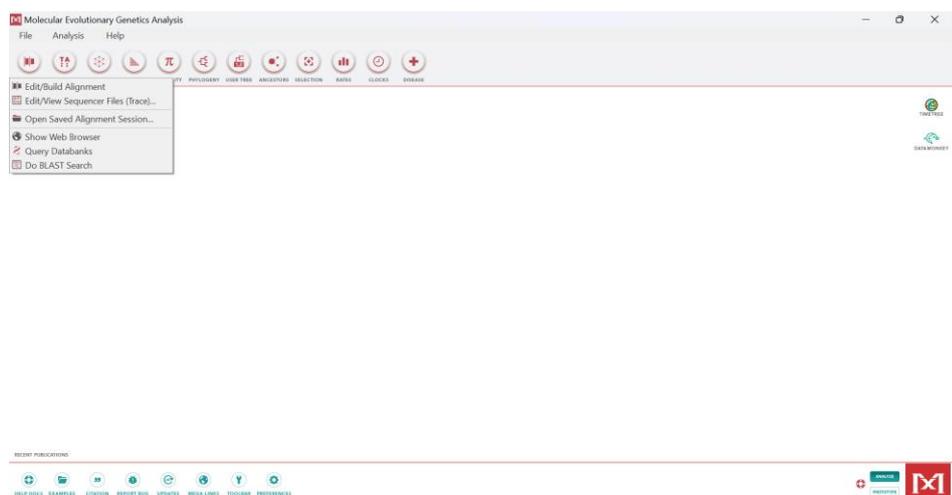
Gambar 10. Langkah ketiga dalam melakukan uji BLAST.

3.4.2 Penjajaran Urutan Basa Nitrogen

Elektroforegram yang didapatkan dari PT Genetika Science Indonesia akan berbentuk *AB1 file*. Urutan basa nitrogen yang dijajarkan bertujuan untuk mengubah *AB1 file* menjadi *fasta file* (txt.). Proses ini diawali dengan membuka aplikasi MEGA XI (Gambar 11) dan tampilan terbuka menampilkan berbagai menu, kemudian menu *Align* dipilih dan opsi “*Edit/Build Alignment*” dipilih untuk melakukan langkah awal dalam penyelarasan urutan basa nitrogen (Gambar 12).

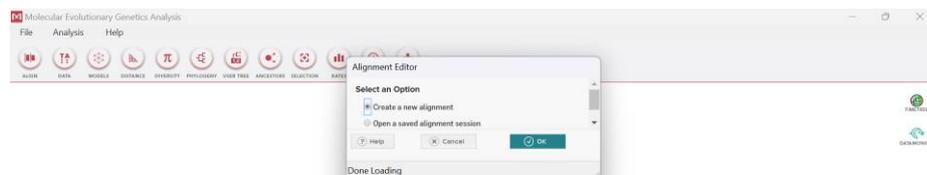


Gambar 12. Tampilan awal dalam aplikasi MEGA XI.

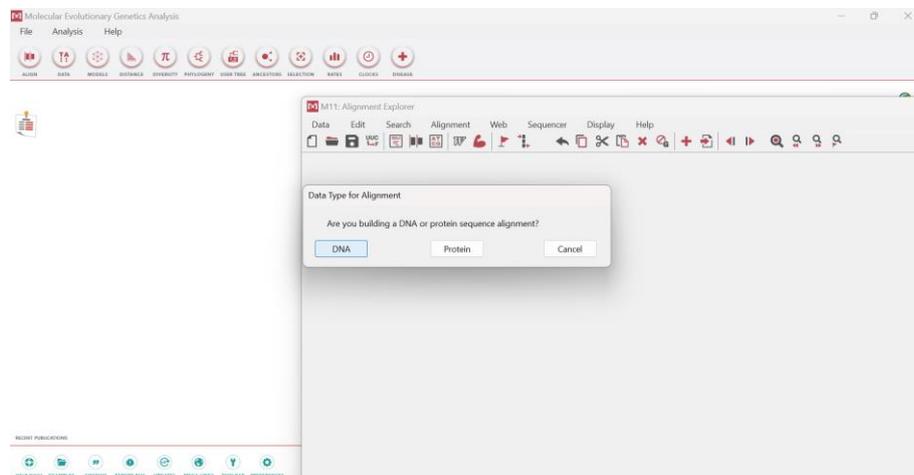


Gambar 12. Tahapan awal dalam merunut basa nitrogen.

Selanjutnya, jendela *Alignment Editor* akan terbuka akan muncul pilihan “*Create a new alignment*” lalu dipilih untuk menampilkan *alignment* baru, selanjutnya pilihan “OK” dipilih dan diklik (Gambar 13). Basa nitrogen dapat dirunut pada molekul DNA dengan memilih pilihan “DNA” pada jendela *Data Type for Alignment* (Gambar 14).



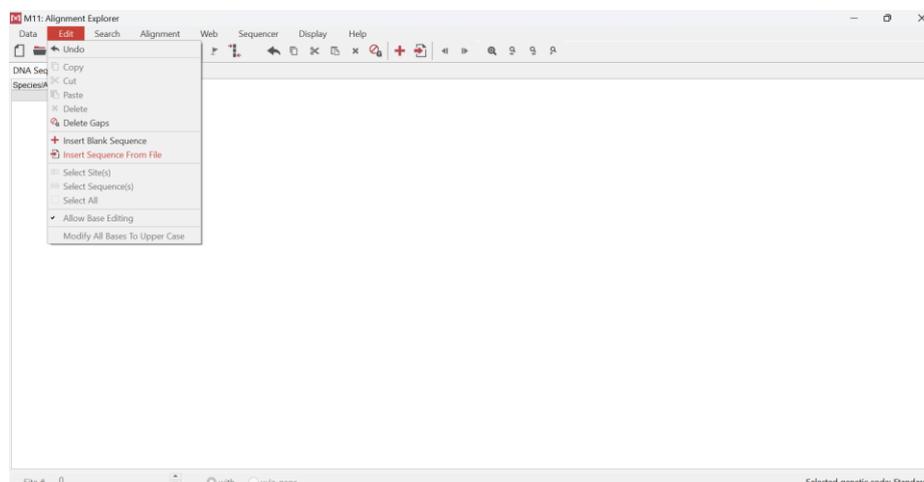
Gambar 13. Tahapan kedua dalam merunut basa nitrogen.



Gambar 14. Tahapan ketiga dalam merunut basa nitrogen.

Pada tampilan selanjutnya, jendela *Alignment Explorer* akan terbuka. Sekuen gen hasil sekuensing, baik sekuen *forward* maupun sekuen *reverse*, dapat dimasukkan dengan cara pergi ke menu *Edit* lalu opsi yang dipilih

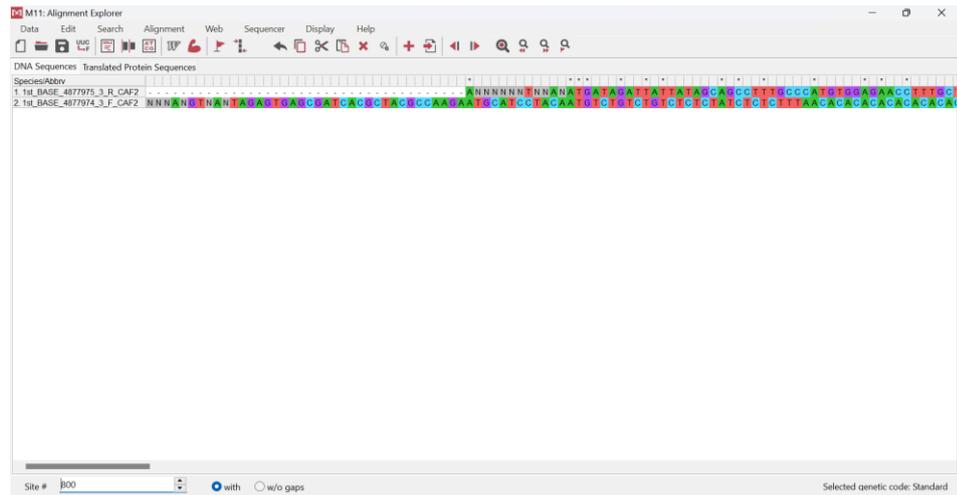
adalah “*Insert Sequence from File*” (Gambar 15). Setelah sekuen dimasukkan akan terlihat urutan basa nitrogen pada setiap sampel.



Gambar 15. *Input* sekuen *forward* dan *reverse*.

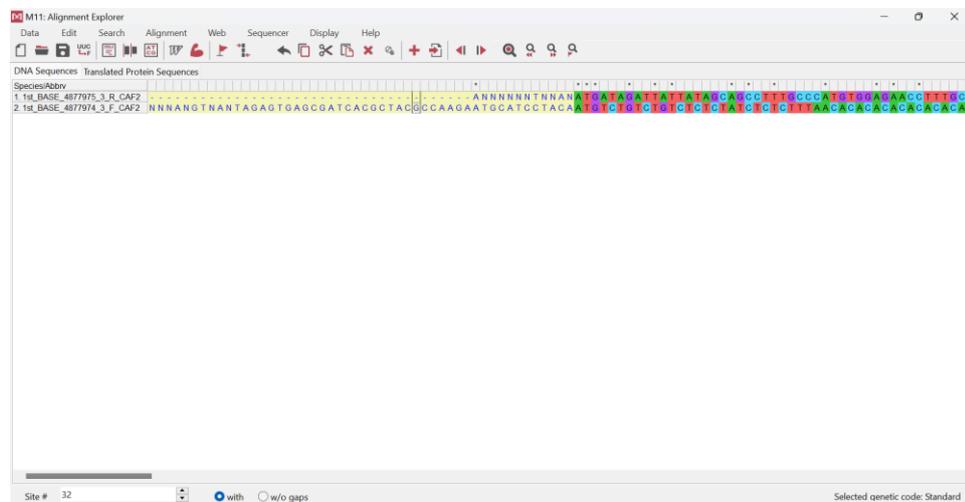
Tahapan berikutnya *reverse complement* merupakan suatu rangkaian DNA dibentuk dengan membalik dan menukar sekuen basa nitrogen yaitu huruf A dan T serta C dan G). *Reverse complement* dapat dilakukan pada sekuen *reverse* (R) dengan cara sekuen *reverse* dipilih dan ditekan, lalu menu “Data” diklik dan opsi “*Reverse Complement*” dipilih, untuk menyelaraskan urutan basa nitrogen pada sampel *reverse*.

Tahapan selanjutnya penyelarasan sekuen basa nitrogen (*multiple alignment*) yang bertujuan untuk menyelaraskan sekuen hingga memiliki ukuran panjang yang sama. *Multiple alignment* dapat dilakukan dengan pergi ke menu *Edit* lalu opsi “*Select All*” dipilih atau dapat juga menekan Ctrl+A. Menu *Alignment* dan opsi “*Align by ClustalW*” dipilih dan diklik, kemudian tombol “OK” pada jendela *ClustalW Options* dipilih untuk melanjutkan tahapan *multiple alignment*. Hasil penyelarasan basa nitrogen dapat dilihat setelah proses *multiple alignment* selesai yang akan menampilkan urutan basa nitrogen sesuai posisi *forward* dan *reverse* (Gambar 16).

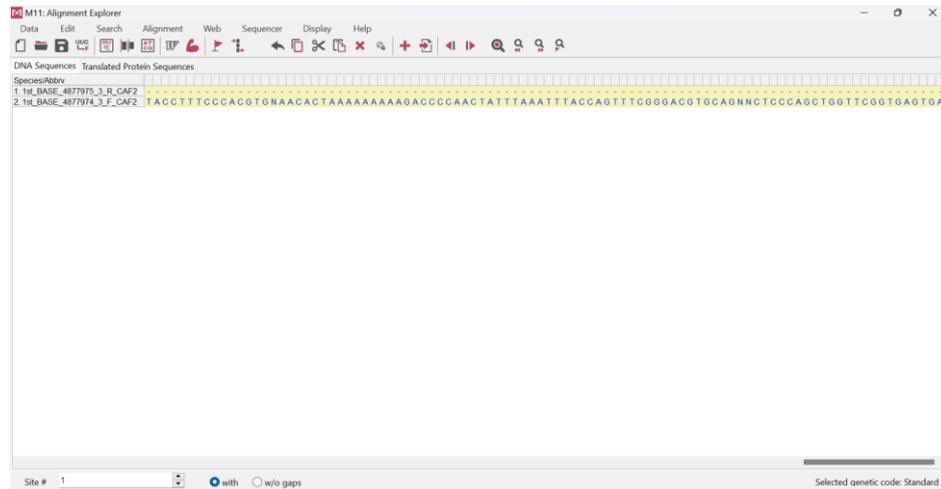


Gambar 16. Tahapan penyelarasan basa nitrogen.

Perunutan basa nitrogen dilanjutkan dengan tahap penghapusan deretan kosong pada hasil runutan pada situs pertama (Gambar 17) dan situs teakhir (Gambar 18) hingga menunjukkan kesamaan basa nitrogen antar sekuen.

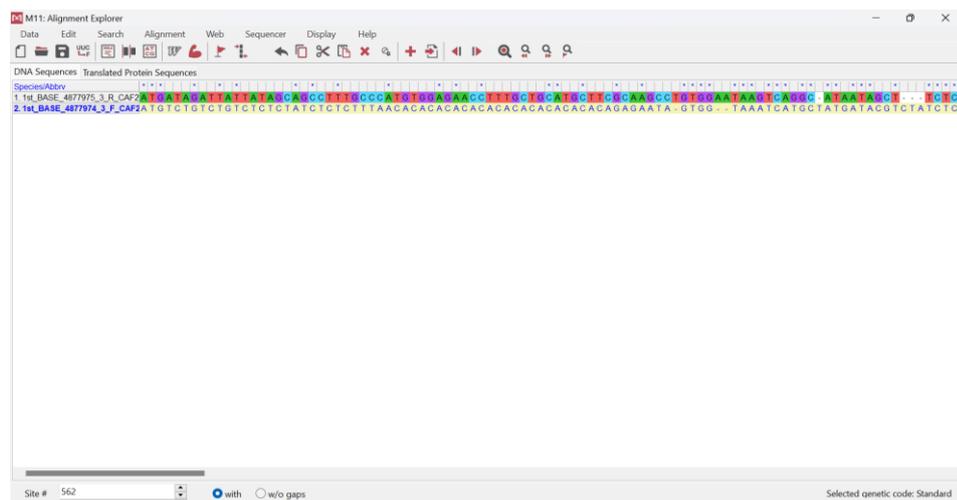


Gambar 17. Penghapusan deretan kosong pada situs awal.

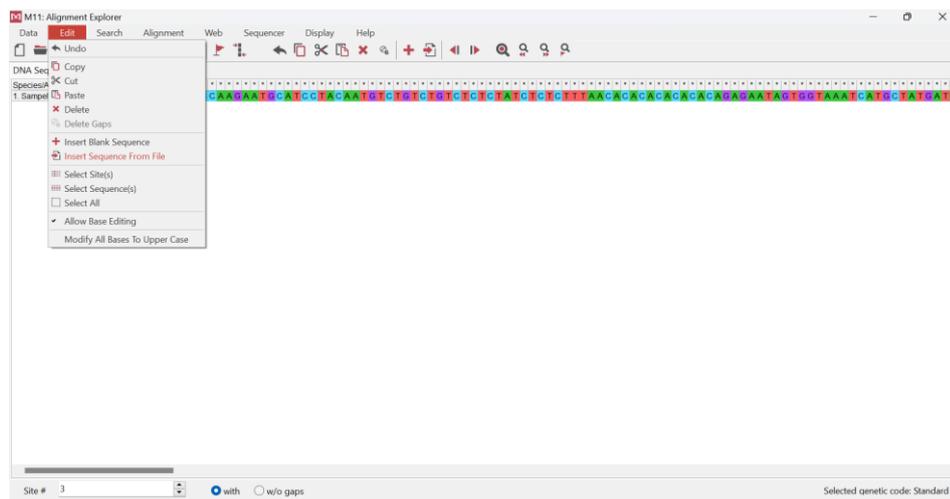


Gambar 18. Penghapusan deretan kosong pada situs terakhir

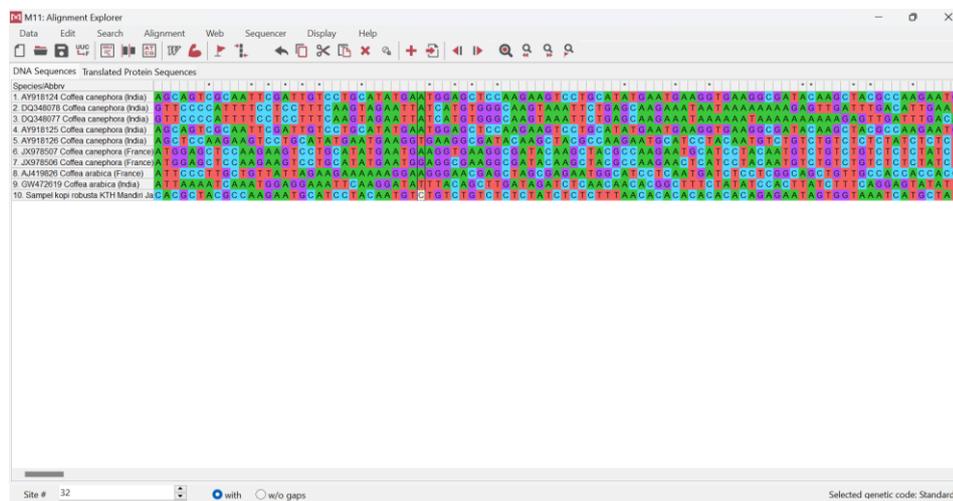
Tahapan selanjutnya adalah pembuatan consensus dengan dilakukan pada sekuen *forward* maupun *reverse* yang telah dirunut urutan basa nitrogennya, sekuen consensus dipilih yang berasal dari sekuen *forward* atau *reverse* (Gambar 19). Consensus dibuat dengan cara menyalin sekuen *forward* maupun *reverse* kemudian disalin dan disimpan pada tools *notepad* dengan diberikan nama *file* “>Sampel kopi robusta KTH Mandiri Jaya” (Gambar 20).



Gambar 19. Tahap pembuatan consensus dengan memilih sekuen *reverse*.

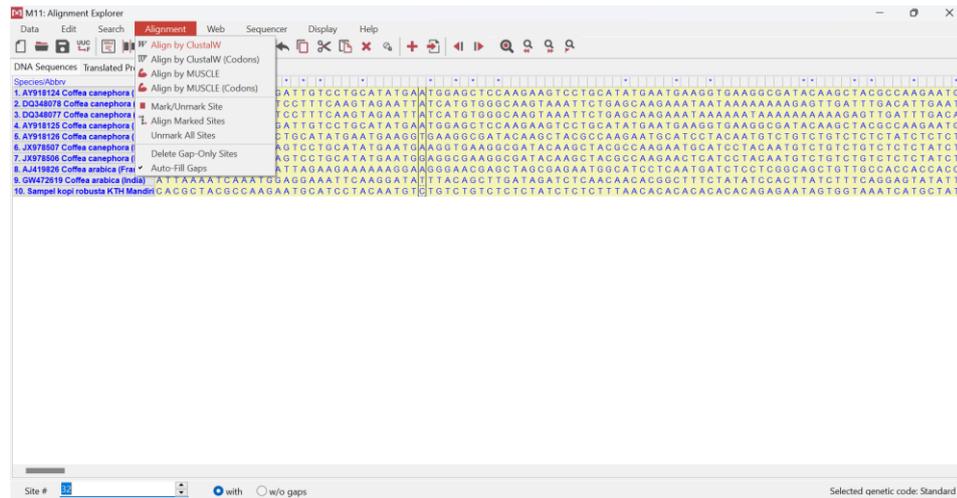


Gambar 22. Tahapan *input* sekuen pembandingan dari *genbank*.

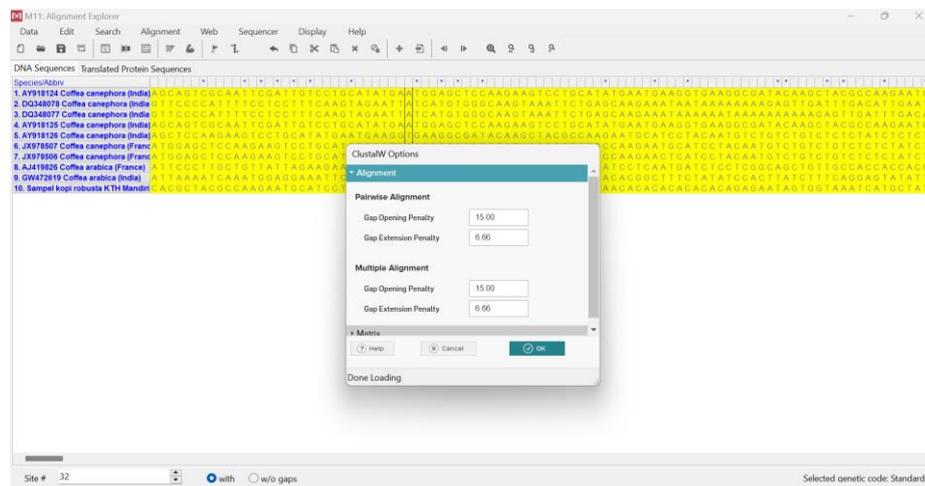


Gambar 23. Tampilan sekuen pembandingan yang telah masuk.

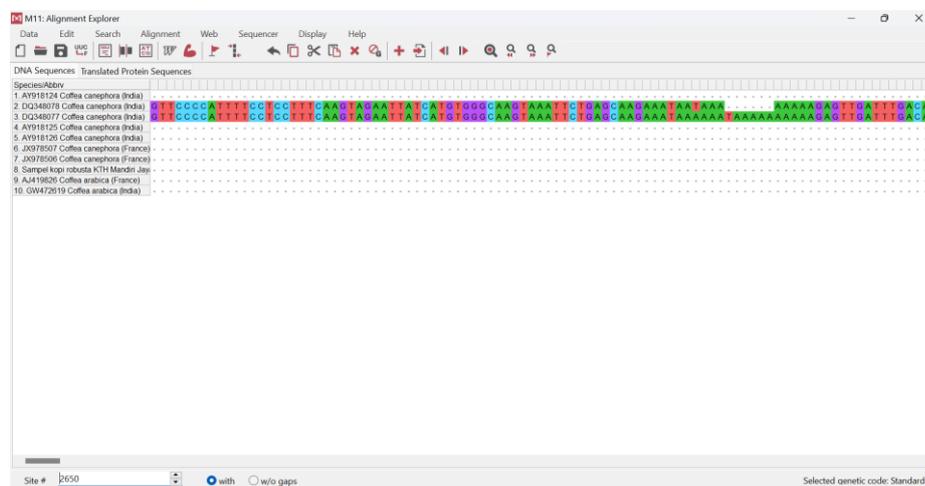
Seluruh sampel dan sekuen pembandingan yang telah masuk akan dilakukan *multiple alignment* untuk penyelarasan urutan basa nitrogen dengan pergi ke menu *Edit* lalu opsi “*Select All*” dipilih atau dapat juga menekan Ctrl+A. Selanjutnya pergi ke menu *Alignment* dan opsi “*Align by ClustalW*” dipilih dan diklik (Gambar 24) dan tombol “OK” pada jendela *ClustalW Options* dipilih (Gambar 25) untuk melanjutkan tahapan *multiple alignment*. Hasil penyelarasan basa nitrogen dapat terlihat setelah proses *multiple alignment* selesai (Gambar 26).



Gambar 24. Tahapan perunutan basa nitrogen pada seluruh sekuen.

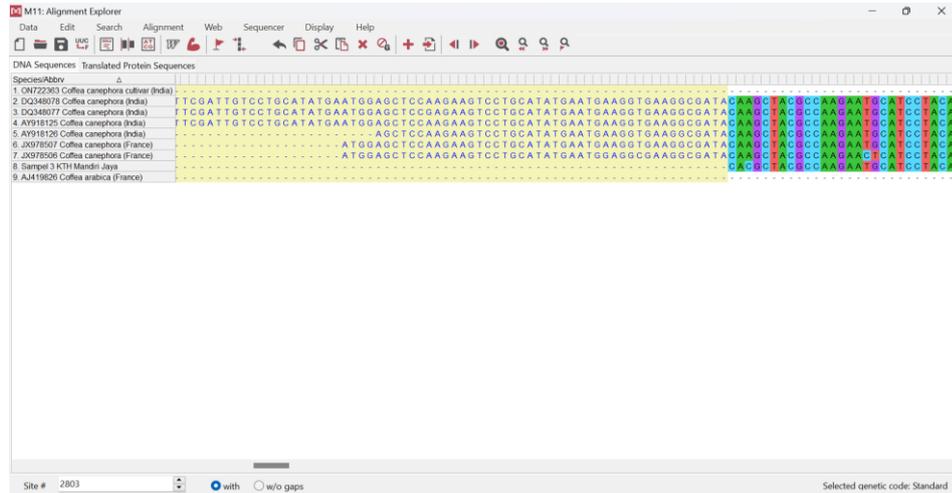


Gambar 25. Tahapan terakhir pada proses perunutan basa nitrogen.

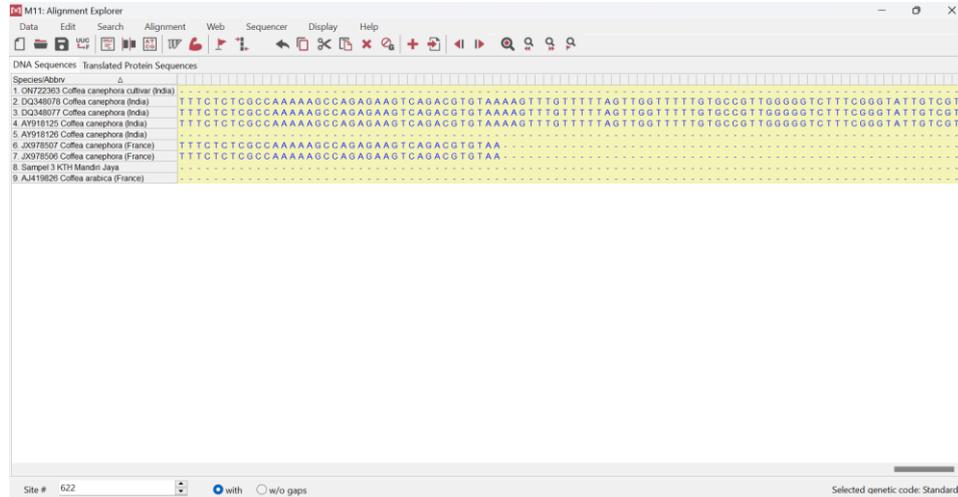


Gambar 26. Tampilan awal setelah perunutan basa nitrogen.

Perunutan basa nitrogen dilanjutkan dengan melakukan penghapusan deretan kosong pada hasil runutan pada situs awal (Gambar 27) dan situs akhir (Gambar 28) hingga menunjukkan kesamaan basa nitrogen antar seluruh sekuen tersebut.



Gambar 27. Pemotongan basa nitrogen pada situs awal.

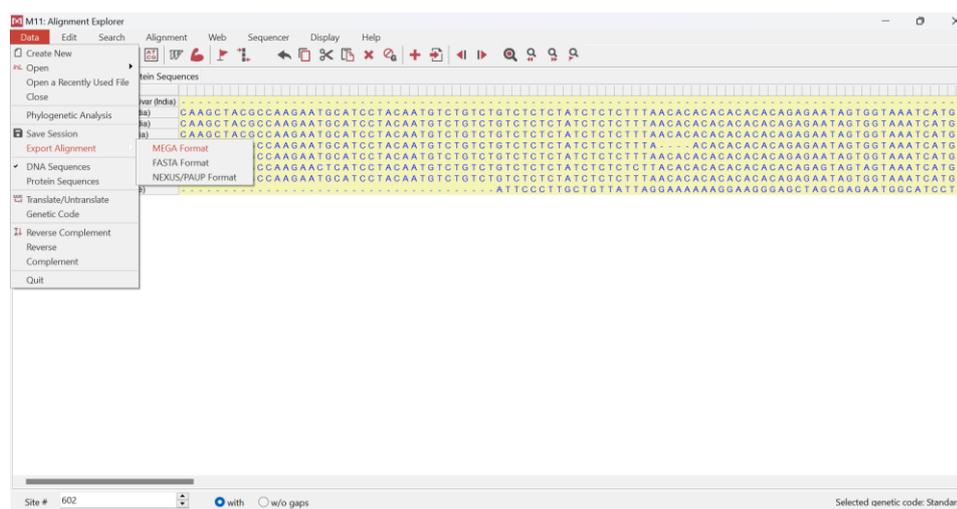


Gambar 28. Pemotongan basa nitrogen pada situs akhir.

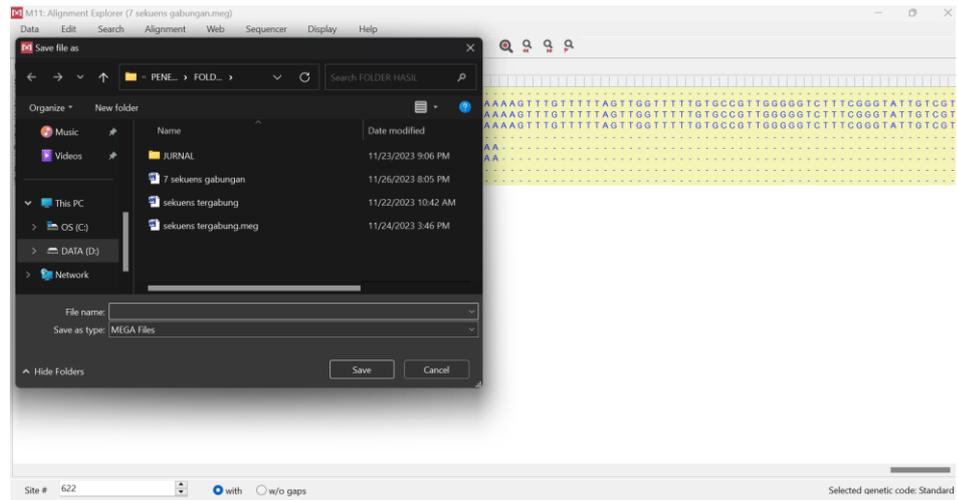
Jika proses pemotongan basa nitrogen dan proses pengisian situs telah selesai, dilakukan perbandingan sekuen dengan melakukan perbandingan sekuen basa nitrogen sampel dengan sekuen basa nitrogen pembanding dilakukan pada urutan basa nitrogen yang tidak berbintang. Basa nitrogen diganti jika terdapat perbedaan pada salah satu sekuen consensus (sampel)

dengan sekuen pembanding. Basa nitrogen tidak diganti jika terdapat perbedaan pada sekuen pembanding, sekuen sampel, atau sekuen pembanding berbeda dengan sekuen sampel. Penggantian basa nitrogen dapat dilakukan dengan menyesuaikan kode basa nitrogen (A/T/G/C) pada tampilan sekuen kemudian tombol *delete* ditekan.

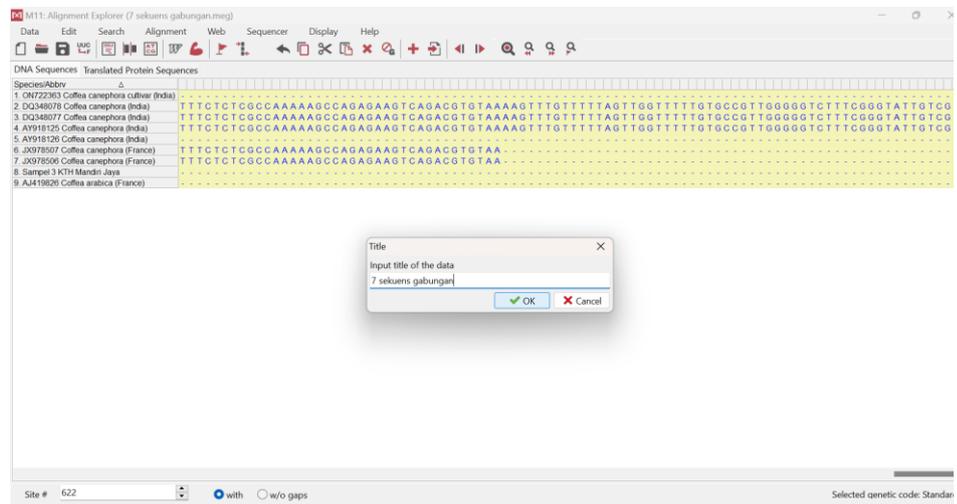
Sekuen yang telah dirunut dan disesuaikan basa nitrogennya, dilanjutkan dengan mengubah sekuen menjadi *file* dengan format *MEGA Format*. Sekuen diubah dengan cara masuk ke menu *Data* lalu opsi “*Export Alignment*” dipilih setelah itu terdapat tiga pilihan untuk dilakukan perubahan pada sekuen lalu pilih “*MEGA Format*” (Gambar 29). Lalu akan ditampilkan pilihan folder yang akan digunakan untuk menyimpan *file* tersebut (Gambar 30) kemudian nama sampel diberikan nama lalu opsi “*OK*” dipilih untuk proses menyimpan *file* (Gambar 31) setelah itu akan ditampilkan pertanyaan bahwa “Apakah data urutan nukleotida termasuk data yang mengkode protein?” jika termasuk pada opsi “*Yes*” dipilih (Gambar 32). Jendela *Alignment Explorer* dapat ditutup untuk melanjutkan proses selanjutnya.



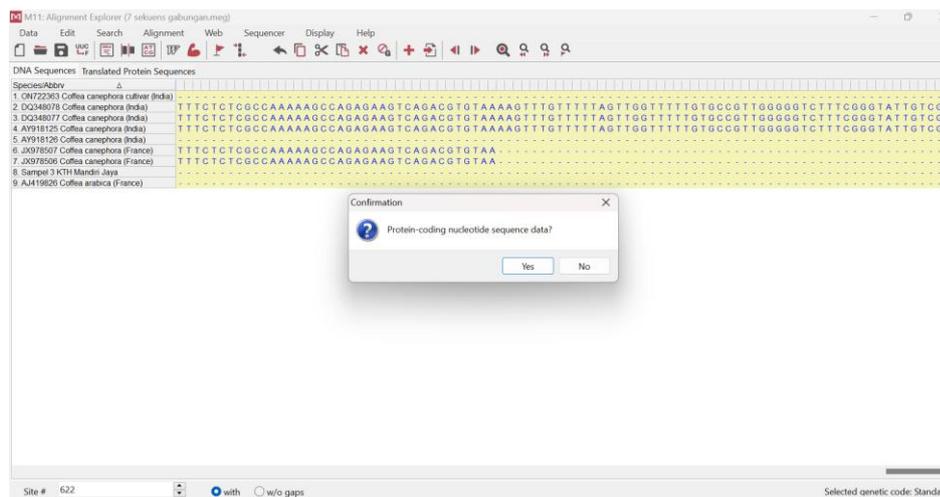
Gambar 29. *Export* sekuen ke *MEGA Format*.



Gambar 30. Opsi *folder* untuk menyimpan *file*.



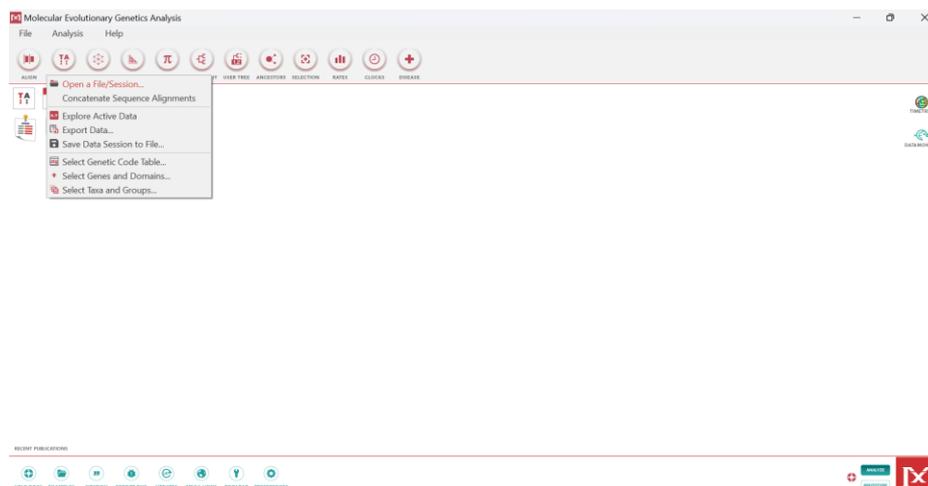
Gambar 31. *Input* nama judul *file*.



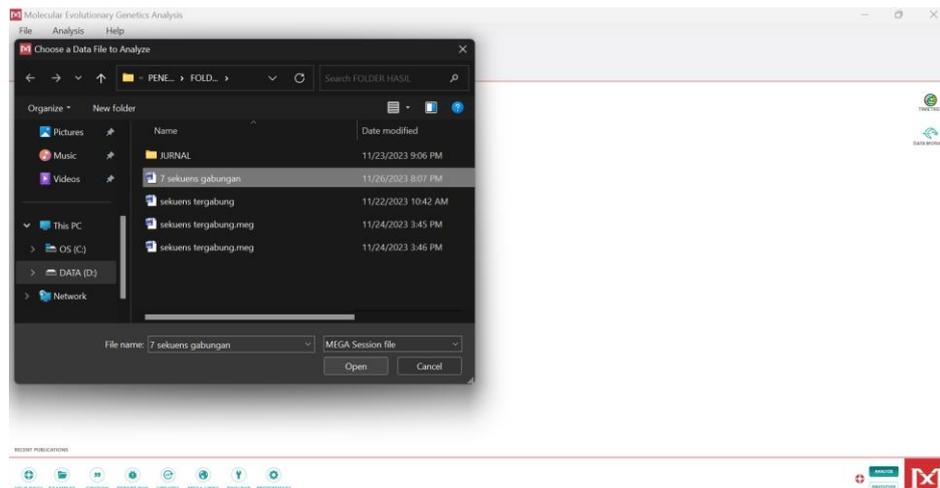
Gambar 32. Tahapan akhir dalam *export file*.

3.4.3 Analisis Jarak Genetik

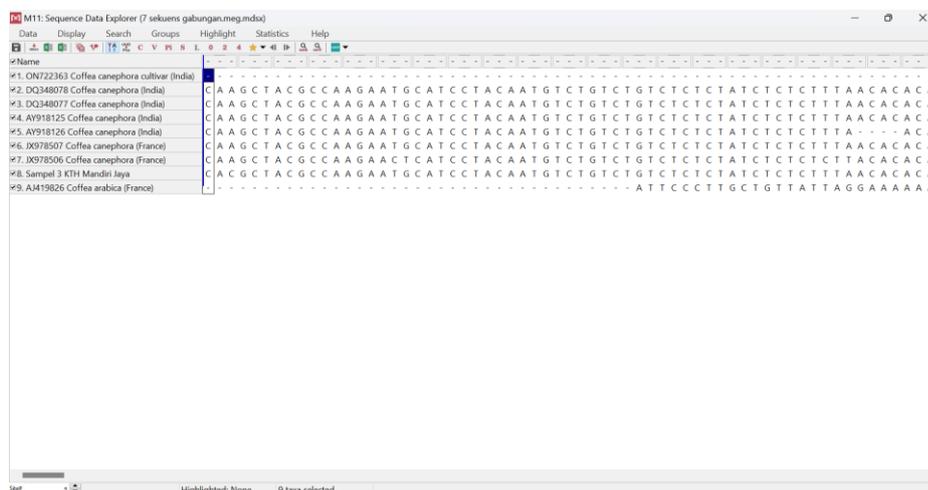
Analisis jarak genetik dapat dilakukan dengan cara pergi ke menu *Data* dan pilih “*Open a File/Session*” (Gambar 33) dan memilih *file* yang telah disimpan dalam bentuk *Mega File* yang sebelumnya telah dilakukan (Gambar 34). Tampilan runutan basa nitrogen akan muncul pada jendela *Sequence Data Explore* (Gambar 35). Basa nitrogen yang memiliki kesamaan antar individu ditandai dengan tanda titik.



Gambar 33. Langkah pertama dalam menganalisis jarak genetik.

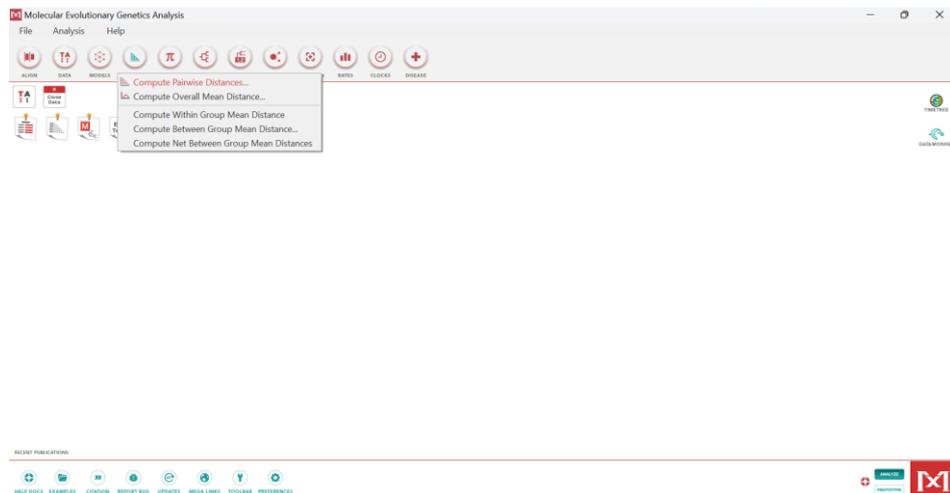


Gambar 34. Langkah kedua dalam menganalisis jarak genetik.

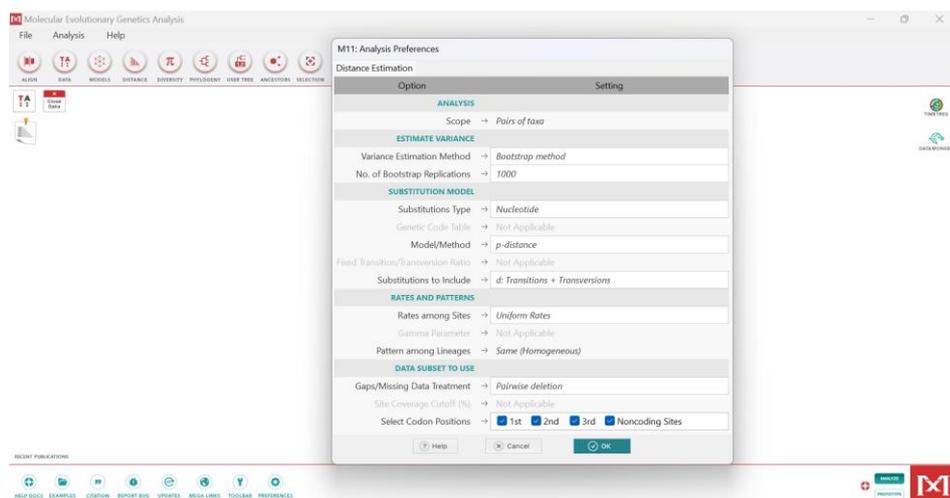


Gambar 35. Langkah ketiga dalam analisis jarak genetik.

Tahapan selanjutnya pergi ke jendela utama pada menu *Distance* lalu opsi “*Compute Pairwise Distance*” dipilih kemudian opsi “*Yes*” diklik (Gambar 36). Tombol “*OK*” pada jendela *Analysis Preferences* diklik, lalu pengaturan *Model/Method* diubah menjadi *p-distance* (Gambar 37). Nilai jarak genetik dan homologi antar individu akan muncul pada jendela *Pairwise Distances*.



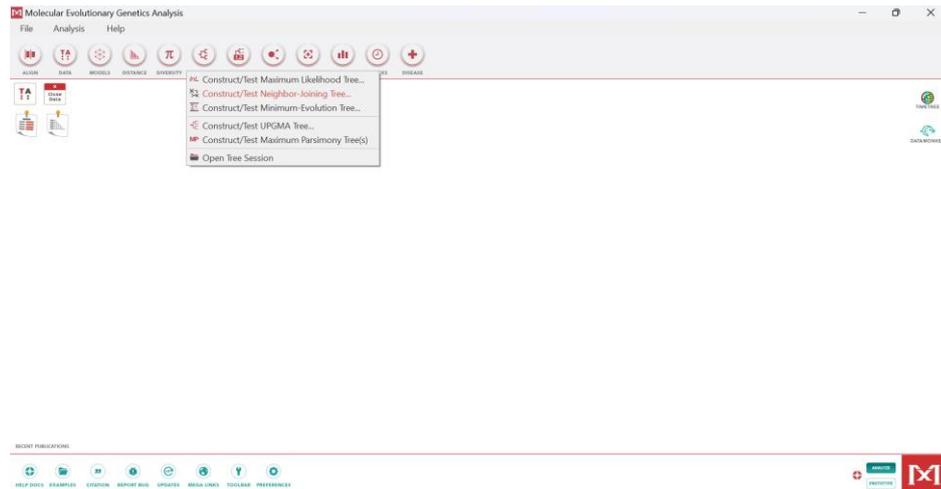
Gambar 36. Langkah keempat dalam melakukan analisis jarak genetik.



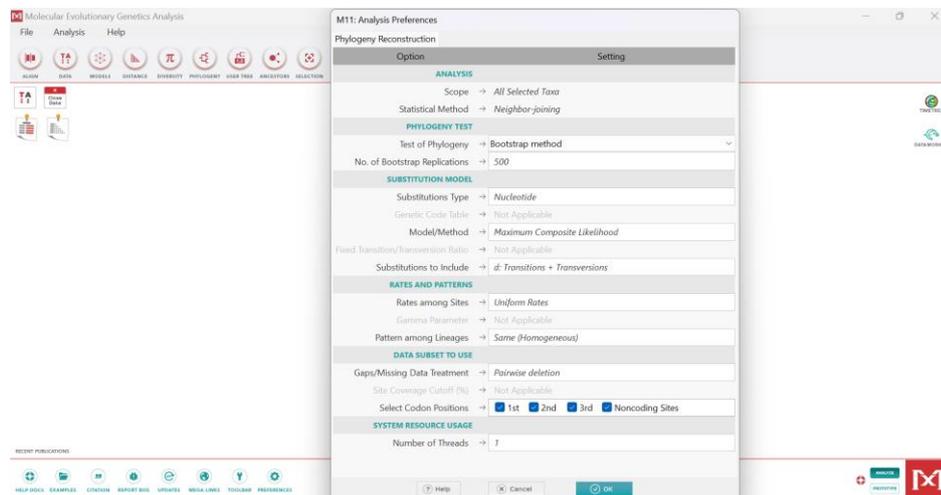
Gambar 37. Langkah kelima dalam melakukan analisis jarak genetik.

3.4.4 Penyusunan Konstruksi Pohon Filogenetik

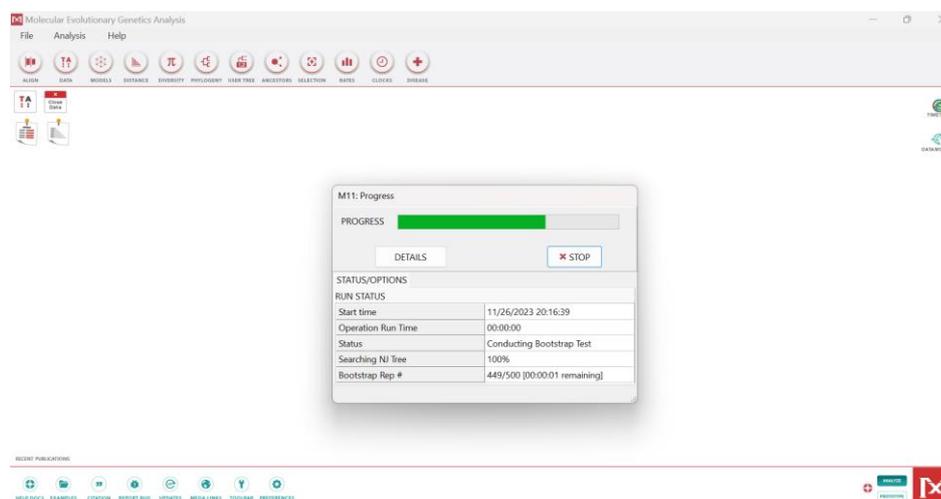
Penyusunan konstruksi pohon filogenetik dapat dibuat dengan cara pergi ke menu *Phylogeny* lalu opsi “*Construct/Test Neighbour Joining Tree*” dipilih dan diklik (Gambar 38) kemudian akan muncul tampilan *Analysis Preferences* dan tombol “OK” dipilih tanpa mengubah peraturan *default* (Gambar 39) selanjutnya proses pembuatan konstruksi pohon filogenetik akan berjalan sesuai program (Gambar 40). Pohon filogenetik akan terbentuk dari hasil *running* operasi (perjalanan) program dan akan menampilkan pohon filogenetik yang menunjukkan kekerabatan dari sampel.



Gambar 38. Langkah pertama dalam membuat pohon filogenetik.



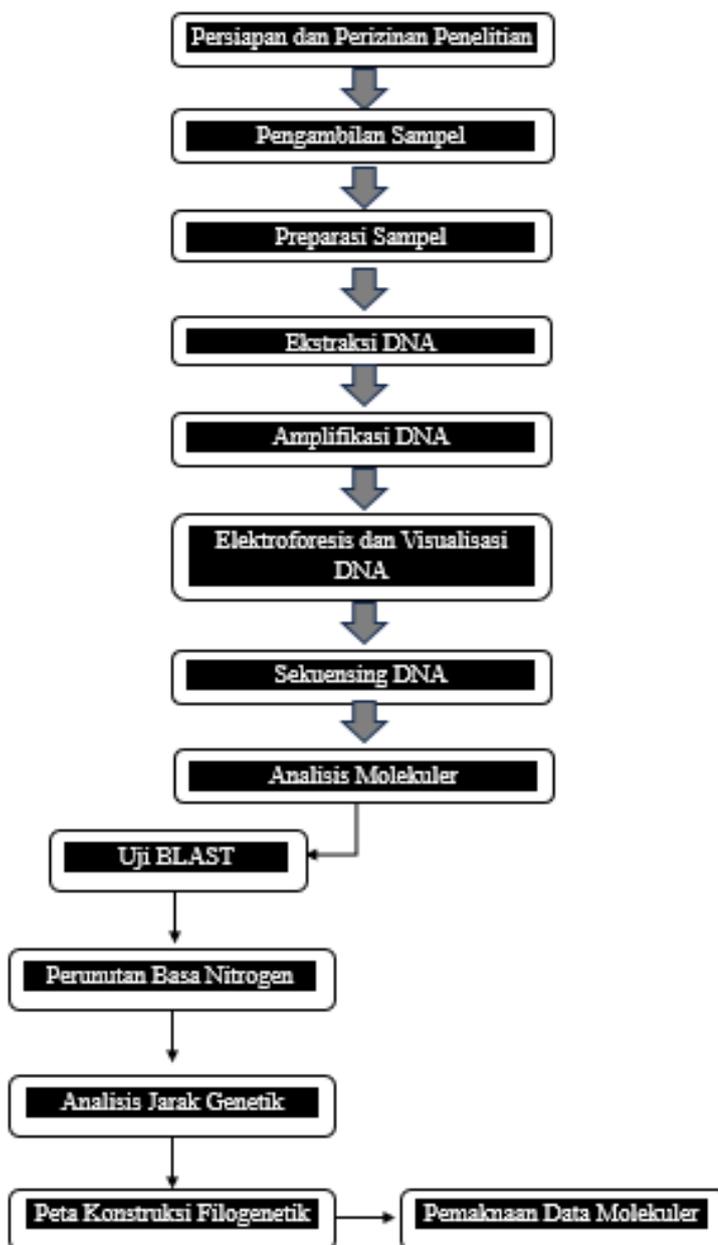
Gambar 39. Langkah kedua dalam membuat pohon filogenetik.



Gambar 40. Langkah ketiga dalam membuat pohon filogenetik.

3.5 Diagram Alir Penelitian

Penelitian yang telah dilakukan didasarkan pada diagram alir sebagai berikut:



Gambar 41. Diagram alir penelitian dengan judul Aplikasi Molekuler dan Analisis Genetik Spesies Kopi Robusta (*C. canepora* Pierre ex A. Froehner) pada KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus.

V. SIMPULAN

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian “Aplikasi Molekuler dan Analisis Genetik Spesies Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) pada KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus” adalah sebagai berikut.

1. Analisis DNA kopi robusta dengan menggunakan aplikasi metode molekuler dapat mengonfirmasi bahwa sampel DNA kopi dari KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus merupakan spesies kopi robusta.
2. Analisis genetik spesies kopi robusta KTH Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus menunjukkan bahwa rentang jarak genetik antara sampel kopi robusta KTH Mandiri Jaya dengan sekuens pembanding berkisar antara 8,60 – 13,79 dan rentang nilai homologi berkisar antara 86,21% – 91,40%.

DAFTAR PUSTAKA

- Achyar, A., Atifah, Y., dan Putri, D. H. 2021. In silico study of developing a method for detecting pathogenic bacteria in refillable drinking water samples. *Journal of Physics: Conference Series*, 1940 (1): 1-6.
- Akinola, S. A., Mulunda M., dan Collins N. A. 2019. Occurrence, genetic diversities and antibiotic resistance profiles of *Salmonella serovars* isolated from chickens. *Infection and Drug Resistance*, 12 (1): 3327-3342.
- Alves R. M., Silva C. R. S., Albuquerque P. S. B., dan Santos V. S. 2017. Phenotypic and Genotypic Characterization and Compatibility among Genotypes to Select Elite Clones of Cupuassu. *Journal of Acta Amazonica.*, 47 (3): 175-184.
- Ambarwati, M. E., G. Sasongko dan W. M. A. Therik. 2018. Dinamika Konflik Tenurial pada Kawasan Hutan Negara (Kasus di BKPH Tanggung KPH Semarang). *Jurnal Sosiologi Pedesaan*, 6 (2): 112-120.
- Anim-Kwapong G. J., Anim-Kwapong E., dan Oppong F. K. 2010. Evaluation of Some Robusta Coffee (*Coffea canephora* Pierre ex a. Froehner) Clones for Optimal Density Planting in Ghana. *African Journal of Agricultural Research*, 5 (1): 84–89.
- Anwar M., Siti N., dan Winiati P R. 2022. APLIKASI BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST) NCBI PADA PENELITIAN MOLEKULER SALMONELLA SPP. *Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia*, 7 (11): 15446-15464.

- Aulia S. L., Rujito A. S., dan Mery H. 2021. Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 18 (1): 44-54.
- Azizah U. D. L. 2018. *Analisis Kekerabatan Plasma Nutfah Tanaman Stroberi (Fragaria sp.) Berdasarkan Karakter Morfologi dan Random Amplified Polymorphic DNA*. Skripsi. Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya. Malang.
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2023. *Laporan Statistik Indonesia*.
<https://databoks.katadata.co.id/datapublish/2023/03/16/dari-as-sampai-rusia-ini-negara-tujuan-ekspor-kopi-indonesia-pada-2022>.
Diakses pada 14 Juni 2023.
- Bahagiawati. 2011. *Peran markah molekuler dalam pemuliaan tanaman*. Badan Litbang Pertanian. Jakarta, Indonesia.
- Bangol E., Momuat L.I., dan Kumaunang M. 2014. Barcode DNA Tumbuhan Pangi (*Pangium edule* R.) Berdasarkan Gen matK. *Jurnal MIPA UNSRAT*, 3 (2): 113-119.
- Bazai F. I. 2021. *Peranan Sektor Pertanian Terhadap Pengembangan Wilayah di Kabupaten Tanggamus (Melalui Pendekatan Analisis Input-Output)*. Tesis. Magister Perencanaan Wilayah dan Kota, Pascasarjana: Universitas Lampung. Lampung.
- Brokaw, J. (2013). *Pollinator habitat availability and diversity in various tropical agroforestry management systems of Coffea arabica in Santa Clara, Chiriqui* (Independent Study Project (ISP) Collection. Paper 1597).
- Budi D., Mushollaeni W., Rahmawati A., dan Tunggadewi T. 2020. Karakteristik Kopi Bubuk Robusta (*Coffea canephora*) Tulungrejo Terfermentasi dengan Ragi *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Agroindustri*, 10 (2): 129-138.

- Campuzano-Duque L. F., Herrera J. C., Ged C., dan Blair M. W. 2021. Bases for the establishment of robusta coffee (*Coffea canephora*) as a new crop for Columbia. *Agronomy*, 11: 1-12.
- Clarindo W. R., dan C. R. Carvalho. 2008. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Systematics and Evolution*, 274: 237-241.
- Corkill G, dan Rapley R. 2008. *The Manipulation of Nucleic Acid: Basic Tools & Techniques in Molecular Biomethods Handbook*. Ed ke-2. New York (US): Humana Press.
- Cronquist A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York.
- Dale J. W., dan Park S. F. 2010. *Molecular Genetics of Bacteria*. United Kingdom: John Wiley dan Sons, Ltd. Publication, 388.
- Dharmayanti N. L. P. I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *WARTAZOA*, 21 (1): 1-10.
- Diss T. 2003. *The Polymerase Chain Reaction: Molecular Biology in Cellular Pathology*. United Kingdom: John Willey and Sons, Ltd.
- Ernawati. Rr., R. W. Arief, dan Slameto. 2008. *Teknologi Budidaya Kopi Poliklonal*. Seri Buku Inovasi: BUN/14/2008. Bogor: Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian.
- Faza I. V. 2023. *Pengembangan Booklet Karakteristik Morfologi Tanaman Kopi Varietas Robusta (Coffea canephora) di Kebun Kopi Sendang Wilis Kabupaten Tulungagung Sebagai Sumber Belajar Biologi*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Sayyid Ali Rahmatullah Tulungagung.
- Froehner A. 1897. Übersicht über die Arten der Gattung Coffea. *Notizbl. Bot. Gart. Mus. Berlin-Dahlem*, 4: 230-238.

- Gaffar. S., dan Sumarlin. 2020. Analisis Sekuen mtDNA COI Pari Totol Biru yang Didaratkan di Tempat Pendaratan Ikan Kota Tarakan. *Jurnal Harpodon Borneo*, 13 (2): 80-89.
- Gnapi D. E., Pokou D. N., Legnate H., Dapeng Z., Montagnon C., Bertrand B., dan N'guetta A. S. P. 2022. Is the genetic integrity of wild *Coffea canephora* from Ivory Coast threatened by hybridization with introduced coffee trees from Central Africa?. *Journal of Euphytica*, 1 (218): 1-22.
- Harahap A.S. 2017. Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Beberapa Populasi Pohon Kapur Sumatera. *Journal of Animal Science Agronomy Panca Budi*, 2 (2): 1-6.
- Harahap M. R. 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2 (1): 21-26.
- Herrera. J. C., Gloria C., Gloria D., Narmer G., Edgar S., Luis F. R., dan Andreas. D. 2013. Identification and Distribution of Copia-like Retrotransposon Sequences in The Coffee (*Coffea L.*) Genome. *Agronomia Colombiana*, 31 (3): 269-278.
- Hewajuli D.A., dan Dharmayanti NLPI. 2014. Perkembangan Teknologi *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* dalam Mengidentifikasi Genom *Avian Influenza* dan *Newcastle Diseases*. *Journal of WARTAZOA: Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 24 (1): 16-29.
- Hidayat T., dan Adi P. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*, 4 (1): 35-40.
- Hikmatyar M. F., Juwartina I. R., dan Dasumiati. 2015. Isolasi dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk Identifikasi Keragaman Genetik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 2 (2): 42-48.

- Ho T., Wilson C., Hoang V-N., dan Nguyen T., T. 2018. Eco-efficiency analysis of sustainability-certified coffee production in Vietnam. *Journal of Cleaner Production*, 183 (10): 251-260.
- Holikman, Afrianto, E., dan Susilawati, W. 2019. Sumay Kecamatan Sumay Kabupaten Tebo the Role of Combined Tani Group (Gapoktan) in Empowerment of Sawah Rice Farmers in Tuo Village Sumay Subdistrict. 45–60.
- Holme DJ, dan Peck H. 1998. *Analytical Biochemistry*. Ed ke-3. Harlow (GB): Pearson Education Limited.
- Horiike T. 2016. An Introduction to Molecular Phylogenetic Analysis. *Reviews in Agricultural Science*, 4: 36-45.
- Hutami R, Hanifah B, Sukarno, Henny N, dan Raafqi R. 2018. Ekstraksi DNA dari Daging Segar untuk Analisis dengan Metode *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). *Jurnal Agroindustri Halal*, 4 (2): 209-216.
- International Coffee Organization (ICO). 2019. *Total Production Coffee by Exporting Countries*. <https://www.ico.org/prices/po-production.pdf>. Diakses pada tanggal 29 Juni 2023.
- International Union for Conservation of Nature (IUCN). 2023. *Robusta Coffee. Coffea canephora (Robusta Coffee) (iucnredlist.org)*. Diakses pada tanggal 26 Juni 2023.
- Khikmah U. N., Evy Y., Ixora S. M., Ratnawati., Djukri., dan Lili S. 2018. Analisis Variasi Genetik Anggrek *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume dengan Marka Molekuler RAPD. *Jurnal Prodi Biologi*, 7 (6): 410-415.
- Kusmiati. A., dan Reni. W. 2011. Analisis Wilayah Komoditas Kopi di Indonesia. *JSEP (Journal of Social and Agricultural Economics)*, 5 (2): 47-58.

- Lokapirnasari W. P., Adriana M. S., Tri N., Koesnoto S., dan Andreas B. Y. 2016. Sekuensing 16S DNA Bakteri Selulolitik Asal Limbah Cairan Rumen Sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Veteriner*, 18 (1): 76-82.
- Mahadi I., Zulfarina., dan Megawati A. 2021. Penggunaan *Buffer* Alternatif untuk Isolasi DNA Genomik pada Tanaman Hutan. *Jurnal Penelitian Kehutanan Wallacea*, 10 (2): 117-130.
- Masduki. 2019. *Analisa Sakarin Pada Kopi Giras Yang Dijual di Daerah Mulyorejo*. Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surabaya.
- Monalisa E., Feky R. M., dan Hanry J. L. 2019. Kajian Variasi Sekuens Interspecies dan Filogeni Kelelawar *Pteropus* sp. Menggunakan Gen COI. *Jurnal MIPA UNSRAT*, 8 (2): 71-77.
- Muhammad F. 2022. *Efektivitas Bantuan Perhutanan Sosial Pada Kups Kopi di Hutan Kemasyarakatan (HKm) Lajoanging di Desa Harapan Kecamatan Tanete Riaja Kabupaten Barru*. Skripsi. Fakultas Pertanian: Universitas Muhammadiyah Makassar.
- Muliani S., dan Nildayanti. 2018. Inventarisasi Hama dan Penyakit pada Pertanaman Kopi Organik. *Jurnal Agrolantae*, 7 (2): 14-19.
- Mulyadin R. M., Surati., dan Ariawan K. 2016. Kajian Hutan Kemasyarakatan Sebagai Sumber Pendapatan: Kasus di Kabupaten Gunungkidul, Yogyakarta. *Jurnal Penelitian Sosial dan Ekonomi Kehutanan*, 13 (1): 13-23.
- Murtiyaningsih H. 2017. Isolasi DNA Genom dan Identifikasi Kekerbatan Genetik Nanas Menggunakan RAPD (*Random Amplified Polimorfic DNA*). *Jurnal Agritrop*, 15 (1): 84-93.
- Nada M. Q. 2022. *Hubungan Kekerbatan Fenetik Kopi Robusta di Kabupapten Jepara, Semarang, dan Kendal Berdasarkan Karakter Morfologi*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Walisongo.

- Nowak M. D., Davis A. P., Anthony F., dan Yoder A. D. 2011. Expression and Trans-Specific Polymorphism of Self-Incompatibility mases in *Coffea* (*Rubiaceae*). *Journal of PLoS ONE*, 6 (6): 1-11.
- Nugraha F., Dewi I. R., Yolla P.A., dan Herman. 2014. Analisis Sebagian Sekuen Gen Ferritin pada Padi (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 6 (2): 94-103.
- Nur'aini S., Arnia S. M., dan Siti M. 2019. Pengenalan Deoxyribonucleic Acid (DNA) Dengan Marker-Based Augmented Reality. *Walisongo Journal of Information Technology*, 1 (2): 91-100.
- Pangestika Y., Anto B., Hermin P. K. 2015. Analisis Filogenetik *Curcuma zedoaria* (Temu Putih) Berdasarkan Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). *Jurnal Biologi*, 4 (4): 8-13.
- Perrois C., Susan R. S., Guillaume M., Maud L., Lucie B., Stephane M., Jwanro H., Lucas M., dan Isabelle P. 2014. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). *Planta*, 241 (10): 179-191.
- Pertiwi N. P. D., I Gede N. K. Mahardika., dan Ni L. W. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Ikan Karang Anggota Famili *Pseudochromidae* (DOTTYBACK) untuk Identifikasi Spesies Secara Molekuler. *Jurnal Biologi*, 19 (2): 1-5.
- Pierozzi N. I., Cecilia A. F. P., dan Neusa D. C. 1999. Characterization of Somatic Chromosomes of Two Diploid Species of *Coffea* L. with Acetic Orcein and C-band Techniques. *Caryologia*, 52: 1-8.
- Pinto-Maglio. C. A.F. 2006. Cytogenetics of Coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18 (1): 37-44.
- Prastowo B., Karmawati E., Rubiyo, Siswanto, Indrawanto, C., dan Munarso, S. J. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.

- Puspitasari, D. 2016. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Interaksi Sosial Antara Masyarakat Samin dan Masyarakat Non-Samin. *Jurnal Societas*, 6 (7): 1-23.
- Rahardjo. P. 2021. *Panduan Berkebun Kopi*. Penerbit Penebar Swadaya, Depok, Jawa Barat.
- Rosana D, dan Yosadhat S. 2019. *Biofisika*. Penerbit Universitas Terbuka, Tangerang Selatan.
- Rustiati, E. L., I Gede. S., Jani M., Alvin W. S., Rendi H., Joko S., Supriyadi., Edi., Tugino., Andi A., Dian N. P., Indra K., Okta S., Intan D. F., dan Mariman. 2023. Community-based rapid biodiversity assessment: A preliminary study identifying potential natural resources in Kota Agung Utara Social Forestry, Tanggamus. *BIOVALENTIA: BIOLOGICAL RESEARCH JOURNAL*, 9 (1): 56-61.
- Rustiati, E. L., I Gede. S., Jani M., Intan. D. F., Bondan. P., Dian. N. P., dan Priyambodo. 2022. Inisiasi Tata Kelola Kawasan Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Sedayu-Tanggamus. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat Tabikpun*, 3 (2): 97-104.
- Sanger F., S. Nicklen, dan A R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 74 (12): 5463–5467.
- Sari. H. P. 2019. *Pengaruh Jenis Daun dan Konsentrasi Seduhan Teh Daun Kopi Robusta (Coffea canephora) Dampit Terhadap Daya Luruh Kalsium Oksalat Secara In Vitro*. Skripsi. Universitas Brawijaya.
- Sastrohamidjojo H. 2007. *Spektroskopi*. Gadjah Mada University. Yogyakarta.
- Shofa A. F., Hariyanti., Prio W. 2019. Penggunaan DNA Mitokondria Sebagai Penanda Sumber Gelatin Sediaan *Gummy* Dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* dan Sekuensing DNA. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 6 (1): 25-31.
- Sjafaraenan, Handayani L, Eva J, Rosana A, dan Arfan S. 2018. Profil DNA Gen *Follicle Stimulating Hormone Reseptor (FSHR)* Pada Wanita Akne

- dengan Teknik PCR dan Sekuensing DNA. *BIOMA: Jurnal Biologi Makassar*, 3 (1): 1-11.
- Sulistiyorini I., Dani., Nur K. I., dan Budi M. 2021. Keragaman Genetik Klon Lokal Kopi Robusta Asal Temanggung Berdasarkan Marka SSR. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 8 (3): 141-150.
- Susanto A.W. 2021. *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.
- Syafaruddin, Randriani E., Dani, Sulistiyorini I., dan Pabendon, M. B. (2014). Genetic Variability of 15 Robusta Coffee Genotypes Selected by Farmer Based on SSRs Markers. *Journal of TIDP*, 1(2): 87–94.
- Syakir, M. dan Surmaini, E. 2017. Perubahan iklim dalam konteks sistem produksi dan pengembangan kopi di Indonesia. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 36 (2): 77-90.
- Tamalene M. N., Bahtiar., Hariyadi S., dan Suparman. 2023. Etnobotany of robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) as a spiced coffee drink of the indigenous people of bale village on Halmahera island. *Biosfer: Jurnal Pendidikan Biologi*, 16 (2): 304-311.
- Tasma I. M. 2015. Pemanfaatan Teknologi Sekuensing Genom Untuk Mempercepat Program Pemuliaan Tanaman. *J. Litbang Per*, 34 (4): 159-168.
- Tindi. M., N. Gustaf F. Mamangkey., dan Stenly W. 2017. DNA Barcode dan Analisis Filogenetik Molekuler Beberapa Jenis Bivalvia Asal Perairan Sulawesi Utara Berdasarkan Gen COI. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 1 (2): 32-38.
- Triani N. 2020. Isolasi DNA Tanaman Jeruk dengan Menggunakan Metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). *G-Tech: Jurnal Teknologi Terapan*, 3 (2): 221-226.

- Turrahmi M., Nurhidayani., Hasyimuddin., dan Marcia B P. 2021. Uji Kualitas dan Kuantitas Tanaman Jewawut (*Setaria italic*) di Balai Penelitian Tanaman Serelia Kabupaten Maros. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 1 (2): 57-62.
- Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 41 Tahun 1999 Tentang Kehutanan.
- Untu P., Inneke F. M. R., dan Elvy L. G. 2015. Identifikasi Mikroba Yang Koeksis dengan Ascidia *Lissoclinum patella* Menggunakan Sekuens Gen 16S rRNA. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 2 (1): 23-33.
- Volsi B., Telles T.S., Caldarelli C.E., dan Camara M.R.G. 2019. The Dynamics of Coffee Production in Brazil. *Journal of PLoS ONE*, 14 (7): 1-15.
- Williams J. G. K., Anne R. K., Kenneth J. L., Antoni J. R., dan Scott V. T. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22): 6531-6535.
- Yuwono, Tribuwono. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Zulfahmi. 2013. Penanda DNA untuk Analisis Genetik Tanaman. *Jurnal Agroteknologi*, 3 (2): 41-52.