

**SELEKSI PRIMER SSR (*Simple Sequence Repeat*) UNTUK
MENGANALISIS KERAGAMAN GENETIK KOPI ROBUSTA (*Coffea
canephora*) LOKAL ASAL KABUPATEN TANGGAMUS, LAMPUNG**

(Skripsi)

Oleh

**Yafia Kayla Nethanya Kurniawan
NPM 2117061038**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI
UNIVERSITAS LAMPUNG
2026**

**SELEKSI PRIMER SSR (*Simple Sequence Repeat*) UNTUK
MENGANALISIS KERAGAMAN GENETIK KOPI ROBUSTA (*Coffea
canephora*) LOKAL ASAL KABUPATEN TANGGAMUS, LAMPUNG**

Oleh

Yafia Kayla Nethanya Kurniawan

Skripsi

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

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI
UNIVERSITAS LAMPUNG
2026**

ABSTRAK

SELEKSI PRIMER SSR (*Simple Sequence Repeat*) UNTUK MENGANALISIS KERAGAMAN GENETIK KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) LOKAL ASAL KABUPATEN TANGGAMUS, LAMPUNG

Oleh

Yafia Kayla Nethanya Kurniawan

Kopi merupakan komoditas penting di Indonesia, dengan robusta sebagai jenis yang paling banyak dibudidayakan, terutama di Provinsi Lampung seperti Kabupaten Tanggamus yang memiliki kondisi lahan yang sesuai. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA dari 26 klon lokal kopi Robusta serta menentukan primer SSR yang cocok untuk di amplifikasi. Karakterisasi morfologi sering dipengaruhi faktor lingkungan sehingga diperlukan pendekatan molekuler yang lebih akurat. Sebanyak 26 klon lokal kopi robusta dianalisis menggunakan metode isolasi DNA dengan CTAB dan Kit, kemudian diukur kualitas dan kuantitas DNA dengan Spektrofotometer NanoDrop sebelum dilakukan amplifikasi PCR menggunakan 28 primer SSR dan dianalisis melalui elektroforesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 12 primer berhasil mengamplifikasi DNA, sehingga dapat digunakan sebagai penanda dalam analisis keragaman genetik kopi robusta di Kabupaten Tanggamus.

Kata Kunci: kopi robusta, *Simple Sequence Repeats*, Kabupaten Tanggamus, klon

ABSTRACT

SSR (*Simple Sequence Repeat*) PRIMER SELECTION TO ANALYZE THE GENETIC DIVERSITY OF LOCAL ROBUSTA COFFEE (*Coffea canephora*) FROM TANGGAMUS REGENCY, LAMPUNG

By

Yafia Kayla Nethanya Kurniawan

Coffee is an important commodity in Indonesia, with robusta being the most widely cultivated type, especially in Lampung Province, such as Tanggamus Regency, which has suitable land conditions. This study aimed to determine the quantity and quality of DNA from 26 local clones of Robusta coffee and to identify suitable SSR primers for amplification. Morphological characterization is often influenced by environmental factors, so a more accurate molecular approach is needed. A total of 26 local robusta coffee varieties were analyzed using the CTAB DNA isolation method and Kit, then the quality and quantity of DNA were measured with a NanoDrop Spectrophotometer before PCR amplification using 28 SSR primers and analyzed by electrophoresis. The results showed that 12 primers successfully amplified DNA, so they can be used as markers in the analysis of the genetic diversity of robusta coffee in Tanggamus Regency.

Keywords : *Coffea canephora*, *Simple Sequence Repeats*, Tanggamus Regency, clone

Judul Skripsi : SELEKSI PRIMER SSR (*Simple Sequence Repeat*) UNTUK MENGANALISIS KERAGAMAN GENETIK KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) LOKAL ASAL KABUPATEN TANGGAMUS, LAMPUNG

Nama Mahasiswa : Yafia Kayla Nethanya Kurniawan

Nomor Pokok Mahasiswa : 2117061038

Jurusan/Program Studi : Biologi/S1 Biologi Terapan

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Pembimbing 1

Pembimbing 2


Dr. Eti Ernawati, M.P

NIP. 196408121990032001

Dr. Juwartina Ida Royani, S.Si., M.Si

NIP. 197301101999032001

2. Ketua Jurusan Biologi


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

NIP.198301312008121001



Dokumen ini ditandatangani secara elektronik menggunakan sertifikat dari BSR-E, silahkan lakukan verifikasi pada dokumen elektronik yang dapat diunduh dengan melakukan scan QR Code

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Dr. Eti Ernawati, M.P.



Sekretaris : Dr. Juwartina Ida Royani, M.Si.

 TT ELEKTRONIK

Anggota : Rochmah Agustrina, Ph.D.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 18 Mei 2026

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Yafia Kayla Nethanya Kurniawan
NPM : 2117061038
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya, bahwa skripsi saya berjudul :

“Seleksi Primer SSR (*Simple Sequence Repeat*) untuk Menganalisis Keragaman Genetik Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Lokal asal Kabupaten Tanggamus, Lampung”

Baik data, hasil analisis, dan kajian ilmiah adalah benar hasil karya yang saya susun sendiri dengan berpedoman pada etika akademik dan penulisan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya

Bandar Lampung, 20 Mei 2026

Yang menyatakan



Yafia Kayla Nethanya Kurniawan
NPM. 2117061038

PERSEMBAHAN

Dengan penuh rasa syukur kepada Tuhan Yesus, skripsi ini saya persembahkan untuk:

Teristimewa untuk kedua orang tua tercinta, yang selalu menjadi alasan terbesar penulis untuk terus berjuang dan tidak menyerah. Terima kasih atas setiap doa yang tidak pernah putus, kasih sayang yang tulus, pengorbanan yang begitu besar, serta dukungan moral maupun materi yang selalu diberikan dengan penuh keikhlasan. Tidak ada kata yang mampu menggambarkan betapa besar cinta dan perjuangan kalian dalam mengantarkan penulis sampai pada tahap ini.

Kakak dan adik saya, terima kasih atas perhatian, dukungan, semangat, serta doa yang selalu menyertai penulis selama menempuh pendidikan hingga penyusunan skripsi ini selesai.

Kepada dosen pembimbing dan seluruh dosen yang telah memberikan ilmu, bimbingan, arahan, motivasi, serta pengalaman yang sangat berharga selama masa perkuliahan.

Sahabat dan teman-teman seperjuangan yang selalu menemani, membantu, dan memberikan semangat dalam suka maupun duka selama menyelesaikan studi.

Almamater tercinta, Universitas Lampung, yang telah menjadi tempat penulis menimba ilmu, memperoleh pengalaman, dan membentuk diri menjadi pribadi yang lebih baik. Semoga ilmu dan pengalaman yang diperoleh dapat bermanfaat bagi masyarakat, bangsa, dan negara.

Serta untuk diri sendiri, terima kasih telah mampu bertahan, berjuang, dan tidak menyerah hingga sampai pada titik ini. Semoga pencapaian ini menjadi awal dari langkah-langkah besar menuju masa depan yang lebih baik.

RIWAYAT HIDUP



Penulis lahir di Kota Palembang, pada tanggal 14 November 2003. Penulis merupakan anak dari Bapak Daniel Abraham Kurniawan dan Ibu Juniaty Christine Sinaga. Penulis beralamat di Jl Letnan Mukmin, Kecamatan Ilir Timur 1, Kota Palembang, Provinsi Sumatera Selatan. Penulis menempuh pendidikan dasar di SDN 160 pada tahun 2009. Kemudian melanjutkan pendidikan di SMPN 09 Palembang pada tahun 2015. Pada tahun 2018 penulis melanjutkan pendidikan di SMA Methodist 1 Palembang. Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2021.

Pada bulan Desember 2023-Februari 2024 penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Pusat Riset Tanaman Perkebunan – Organisasi Riset Pertanian dan Pangan BRIN dengan judul “Karakterisasi Morfologi 6 Klon Kopi Robusta (*Coffea canephora*)”. Kemudian, pada bulan Juli-Agustus 2024 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Toba, Kecamatan Sekampung Udik, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung.

MOTTO

“Sebab Aku ini mengetahui rancangan-rancangan apa yang ada pada-Ku mengenai kamu, demikianlah firman Tuhan; yaitu rancangan damai sejahtera dan bukan rancangan kecelakaan, untuk memberikan kepadamu hari depan yang penuh harapan.”

(Yeremia 29:11)

“Kuatkan dan teguhkanlah hatimu, janganlah takut dan jangan gemetar karena mereka, sebab Tuhan, Allahmu, Dialah yang berjalan menyertai engkau; Ia tidak akan membiarkan engkau dan tidak akan meninggalkan engkau.”

(Ulangan 31:6)

“Marilah kepada-Ku, semua yang letih lesu dan berbeban berat, Aku akan memberi kelegaan kepadamu.”

(Matius 11:28)

SANWACANA

Puji syukur kepada Tuhan Yesus, karena atas kebaikan dan karunia-Nya yang telah memberi kekuatan, peneguhan, kesabaran, dan kelancaran, serta petunjuk dan tuntunan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi dengan judul **“SELEKSI PRIMER SSR (*Simple Sequence Repeat*) UNTUK MENGANALISIS KERAGAMAN GENETIK KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) LOKAL ASAL KABUPATEN KABUPATEN TANGGAMUS, LAMPUNG”** ditulis sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana sains (S.Si) di jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak yang telah membantu dan membimbing jalannya skripsi ini, kepada:

1. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
3. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si., selaku Ketua Program Studi S1 Biologi Terapan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
4. Ibu Dr. Eti Ernawati, M.P, selaku Dosen Pembimbing I, yang telah sabar membimbing dan memberikan nasihat baik, serta dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.
5. Ibu Dr. Juwartina Ida Royani, S.Si., M.Si, selaku Dosen Pembimbing II, yang telah sabar membimbing di laboratorium, serta memberikan penjelasan selama proses penelitian. Bimbingan tersebut membantu saya memahami banyak hal baru dan menyelesaikan penelitian dengan baik. Ilmu dan pengalaman yang saya peroleh sangat berharga.
6. Bapak Dr. Drs. Budi Martono, M.Si., selaku Pembimbing Lapangan yang telah banyak membantu dan memberikan saran kepada penulis.

7. Bapak Ir. Salman Farisi, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan semangat dan dukungan selama kegiatan, pembuatan skripsi dan konsultasi akademik.
8. Ibu Rochmah Agustrina, Ph.D, selaku dosen pembahas yang telah memberikan banyak masukan tentang skripsi kepada penulis.
9. Para pegawai dan staff LAPTIAB BRIN di KST BJ Habibie Serpong serta Laboratorium BRMP Tanaman Industri dan Penyegar, Kabupaten Sukabumi yang telah banyak membantu di laboratorium selama penulis melakukan penelitian.
10. Kepada kedua orang tua saya tercinta, Bapak Ir. Daniel Abraham Kurniawan dan Ibu Juniaty Christine Sinaga, A.Md., yang telah memberikan doa, dukungan, serta kasih sayang yang tidak pernah putus. Segala pengorbanan dan dorongan yang diberikan selama proses studi menjadi sumber kekuatan yang sangat berarti sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
11. Terkhusus saudari-saudari yang sangat penulis sayangi Yudea Thalia Anastasya Kurniawan, S.K.M., dan Yosephine Virginia Natalia K, yang selalu menghibur, memberi semangat dan mendoakan dalam penyusunan skripsi.
12. Edlyn Yoadan Nathania, S.T., M.T., selaku pembimbing rohani yang selalu peduli, mendukung, mendoakan, memberikan motivasi kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.
13. Kepada Pdt. Naek Siregar, S.H., M. Hum., M.Th., selaku penatua gereja GKKD On Fire Lampung yang selalu memberikan semangat, doa, serta dukungan kepada penulis.
14. Kepada teman-teman youth GKKD On Fire Lampung, yang tidak pernah berhenti memberikan dukungan dan doa. Sangat bersyukur dikelilingi oleh komunitas yang penuh perhatian dan kasih.
15. Kepada teman-temanku Eva Sari Silaban, Anastasya Manuella Sidabalok, Kolose Tunggal Silalahi, dan Weike Sandy Putra Matanari yang sudah memberi kegembiraan, warna dalam masa perkuliahan dan selalu memberi semangat kepada penulis.
16. Kepada keluarga kecilku “happy-happy aja” Elisabeth Christella V.J, Rista Evatia Br Sihaloho, Angeline Sekar Ningrum, Sevyra Indra Pratiwi, dan Adelia Putri Ndola Mari, yang selalu menjadi tempat untuk berkeluh kesah serta bercerita. Terima kasih telah membersamai setiap proses perkuliahan dan membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.

Bandarlampung, 20 Mei 2026

Penulis,

Yafia Kayla Nethanya

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Kerangka Pikir	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tanaman Kopi (<i>Coffea sp.</i>).....	6
2.1.1 Asal Usul Tanaman Kopi di Dunia	6
2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi.....	6
2.1.3 Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	8
2.2 Varietas, Klon, dan Kultivar	9
2.3 Keragaman Genetik	9
2.4 <i>Simple Sequence Repeats</i> (SSR).....	10
2.5 Prinsip Isolasi DNA dan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	12
III. METODE PENELITIAN	14
3.1 Tempat dan Waktu.....	14
3.2 Alat dan Bahan	14
3.3 Prosedur Kerja	15
3.3.1 Materi Tanaman	15
3.3.2 Pembuatan Stok.....	16
3.3.3 Isolasi DNA Metode Modern Kit Wizard DNA Extraction Promega	17

3.3.4 Isolasi DNA Metode Konvensional <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> (CTAB).....	18
3.3.5 Uji Kualitas dan Kuantitas Isolasi DNA	20
3.3.6 Seleksi Primer	21
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA	25
4.2 Visualisasi DNA	27
4.3 Amplifikasi Primer SSR	29
V. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Daftar klon yang digunakan pada penelitian	13
2. Rincian Penanda SSR Gen	19
3. Komponen Master Mix PCR.....	20
4. Proses Amplifikasi.....	20
5. Data Kemurnian DNA Menggunakan Kit DNA	24
6. Data Kemurnian DNA Menggunakan Metode Konvensional CTAB.....	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daun kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>)	7
2. Tahap isolasi DNA	12
3. Tahap PCR	13
4. Visualisasi Hasil Isolasi DNA Metode Kit.....	27
5. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer SSR 03	30
6. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer SSR 12	30
7. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer SSR 14	30
8. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer SSR 21	30
9. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer SSR 44	31
10. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer CCRM 16.....	31
11. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer CCRM 19.....	31
12. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer CCRM 34.....	31
13. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer CMA 198	31
14. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer KR 3.....	31
15. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer KR 4.....	32
16. Hasil elektroforesis gel agarosa klon dengan primer KR 14.....	32

LAMPIRAN

Lampiran

- 1. Dokumentasi Pengambilan Sampel di Tanggamus**
- 2. Dokumentasi Proses Isolasi DNA dengan Kit**
- 3. Dokumentasi Proses Isolasi DNA dengan CTAB**

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi termasuk tanaman tropis yang menjadi komoditas ekspor utama sebagian besar negara di dunia. Indonesia merupakan negara penghasil kopi terbesar ke-4 setelah Brazil, Vietnam dan Kolombia (Zarwinda dan Sartika, 2018; Lubis, 2022). Kualitas kopi di Indonesia beragam mulai dari kopi kualitas terendah sampai kualitas terbaik. Jenis kopi yang umum di Indonesia adalah robusta, liberika, dan arabika. Namun, kopi yang banyak dibudidayakan adalah arabika dan robusta (Indrawanto dkk, 2010). Kopi arabika dapat tumbuh pada ketinggian di atas 1000 m dpl. Lahan tanam kopi yang ada pada saat ini sebagian besar berada di ketinggian antara 700 sampai 900 m dpl. Sehingga sekitar 95% jenis kopi di Indonesia adalah kopi robusta (Nurdiansyah, 2014; Yunida dkk., 2021). Kopi robusta tersebar di hampir seluruh kepulauan Indonesia yaitu Sumatera, Jawa, Nusa Tenggara dan Bali. Sisanya terdapat di Kalimantan, Sulawesi, Maluku dan Papua.

Volume ekspor kopi tahun 2017-2019 mencapai rata-rata 368.935 ton dengan sumbangan devisa rata-rata 566.352 USD. Perkebunan kopi di berbagai wilayah Indonesia sebagian besar merupakan perkebunan rakyat, dan sisanya perkebunan milik pemerintah (Rosiana dkk., 2018; Zasari dkk., 2023). Perkebunan kopi robusta tahun 2020 mempunyai luas areal mencapai 860.777 ha dengan jumlah produksi sebesar 550.527 ton (Ditjenbun, 2021; Zasari dkk., 2023).

Provinsi Lampung memiliki potensi dalam mengembangkan komoditas kopi karena karakteristik kesesuaian lahan yang baik bagi pertumbuhan kopi robusta. Karakteristik lahan yang sesuai untuk tanaman kopi robusta yaitu tanah latosol karena mampu menyerap air dengan baik sehingga bisa menahan erosi. Temperatur yang sesuai untuk pertumbuhan kopi antara 22-25°C (Permentan RI Nomor 49/OT.140/4/2014). Mayoritas kopi yang dibudidayakan di Lampung adalah jenis kopi robusta. Salah satu daerah atau kabupaten penghasil kopi terbesar di Lampung adalah Kabupaten Tanggamus. Kabupaten Tanggamus memiliki luas lahan perkebunan kopi sebesar 41.512 ha dengan produksi total sebesar 33.482 ton (Badan Pusat Statistik, 2019; Widiyani dan Hartono, 2021). Petani kopi di daerah Tanggamus memiliki luas lahan antara 0,5- 1,5 ha (Kustyawati dkk., 2017).

Selama ini, karakterisasi materi genetik umumnya dilakukan berdasarkan penanda morfologi. Ketersediaan materi genetik sebagai bahan tanam atau sumber tetua akan mempermudah informasi upaya pengembangan tanaman kopi. Genotipe yang terbaik ditemukan melalui penelusuran dan identifikasi sifat-sifat tanaman budidaya yang diinginkan. Dengan demikian, melalui karakterisasi materi genetik dapat meningkatkan kualitas dan daya saing antar tanaman. Karakter morfologi merupakan salah satu langkah awal dalam identifikasi tanaman (Simangunsong dkk., 2017). Karakter morfologi membutuhkan observasi intensif dan sangat sulit membedakan individu-individu yang memiliki hubungan kekerabatan dekat karena dipengaruhi faktor lingkungan (Hartati dkk., 2010; Nugroho dkk., 2017). Karakterisasi terhadap suatu tanaman mampu memberikan informasi terhadap sifat-sifat penting yang dimiliki oleh suatu tanaman (Putra dkk., 2014; Kencana dkk., 2022).

Marka molekuler DNA digunakan untuk menentukan variasi genetik dan keanekaragaman hayati dengan tingkat akurasi yang tinggi (Arif dan Khan, 2009; Mudaningrat dkk., 2023).

Penggunaan marka molekuler sebagai alternatif teknologi baru untuk uji kemurnian genetik benih yang cepat, tepat akurat, tidak dipengaruhi faktor lingkungan, pertumbuhan tanaman, atau tipe sel benih. Seleksi penanda DNA merupakan tahapan penting dalam penelitian molekuler untuk menentukan keakuratan dan keberhasilan analisis genetik. Penanda yang dipilih memiliki tingkat polimorfisme tinggi, spesifisitas terhadap sekuens target, serta mampu menghasilkan amplifikasi yang konsisten dan dapat direproduksi. Oleh karena itu, penggunaan penanda yang selektif dan informatif akan meningkatkan validitas hasil identifikasi serta analisis keragaman genetik yang dilakukan (Sinha dan Singh, 2022).

Berbagai jenis penanda molekuler berbasis PCR telah dibuat, dan salah satu penanda yang sering digunakan dalam mengidentifikasi tanaman adalah *Simple Sequence Repeats* (SSR). SSR merupakan sekuens berulang sebanyak 2-4 nukleotida yang banyak ditemukan dalam genom organisme eukariotik. SSR memiliki sifat kodominan, tingkat variasi yang tinggi, dan mudah digunakan dalam berbagai aplikasi (Prasetyono dan Tasliah, 2004; Shu dkk., 2009; Nugroho dkk., 2017). Penanda SSR banyak digunakan untuk mempelajari keanekaragaman genetik tanaman, asal usul dan analisis hubungan plasma nutfah yang dibudidayakan. Selain itu, SSR juga digunakan untuk mengidentifikasi plasma nutfah keturunan hibrida dan melakukan studi stabilitas genetik (Zhu dkk., 2023; Oktaviana dkk., 2024).

Klon-klon kopi lokal Tanggamus perlu di karakterisasi secara molekuler karena analisis berdasarkan DNA mampu mengetahui variasi genetik yang tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan fenotip, sehingga hasilnya lebih akurat dan informatif untuk mengetahui keragaman genetik antar klon. Pendekatan ini juga dapat mengidentifikasi hubungan kekerabatan, pola kluster genetik, dan tingkat polimorfisme antar klon yang sering kali tidak tampak hanya melalui morfologi, sehingga mendukung pemuliaan, konservasi plasma nutfah (Adepoju dkk., 2023).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini sebagai berikut :

1. Mengetahui kualitas dan kuantitas DNA kopi Robusta (*Coffea canephora*) berdasarkan metode Kit dan CTAB.
2. Mengetahui marka *Simple Sequence Repeats* (SSR) yang dapat mengamplifikasi DNA kopi Robusta (*Coffea canephora*).

1.3 Kerangka Pikir

Kopi merupakan salah satu komoditas perkebunan penting di dunia dan menjadi sumber devisa utama bagi banyak negara, termasuk Indonesia yang menempati posisi sebagai produsen kopi terbesar keempat di dunia. Jenis kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia adalah kopi robusta. Provinsi Lampung, khususnya Kabupaten Tanggamus, merupakan salah satu sentra produksi kopi robusta dengan luas areal dan tingkat produksi yang tinggi, serta didominasi oleh perkebunan rakyat. Keberadaan berbagai klon kopi lokal di daerah ini menunjukkan potensi sumber daya genetik yang besar untuk dikembangkan lebih lanjut.

Karakterisasi tanaman kopi umumnya masih dilakukan berdasarkan karakter morfologi, yang memiliki keterbatasan karena sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan sulit membedakan individu dengan hubungan kekerabatan yang dekat. Hal ini menyebabkan informasi mengenai keragaman genetik menjadi kurang akurat dan mendukung dalam upaya pemuliaan tanaman. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan yang lebih tepat dan akurat melalui analisis berbasis molekuler. Marka molekuler DNA menjadi salah satu alternatif yang efektif karena mampu mendeteksi variasi genetik secara langsung dan tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Salah satu jenis marka yang banyak digunakan adalah *Simple Sequence Repeats* (SSR) yang memiliki tingkat polimorfisme tinggi, bersifat kodominan,

serta mampu menghasilkan data yang konsisten dan dapat direproduksi. Penggunaan marka SSR dalam penelitian ini difokuskan untuk menyeleksi primer yang informatif dan spesifik dalam mengamplifikasi DNA kopi robusta lokal. Melalui pendekatan ini, diharapkan dapat diperoleh informasi mengenai tingkat keragaman genetik, hubungan kekerabatan, serta pola distribusi genetik antar klon kopi robusta lokal di Kabupaten Tanggamus. Informasi tersebut sangat penting dalam mendukung program pemuliaan tanaman, pengelolaan plasma nutfah, serta pengembangan varietas unggul kopi robusta yang berdaya saing tinggi.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kopi (*Coffea sp.*)

2.1.1 Asal Usul Tanaman Kopi di Dunia

Kopi pertama kali ditemukan di Afrika pada abad ke-9, di negara Ethiopia dan Eritrea. Kopi sebagai minuman pertama kali dikenal luas oleh masyarakat Arab. Sejarah mencatat bahwa pedagang Arab mengendalikan perdagangan biji kopi. Monopoli kopi dilakukan dengan berdagang melalui pelabuhan Mocha di Yaman dan kemudian dikirim ke Eropa. Pada masa itu, Mocha adalah satu-satunya tempat di mana kopi diperdagangkan. Sampai sekarang, kita masih menggunakan istilah "kopi mocha" (Pendergrast, 2010).

Pada abad ke-17, orang-orang Eropa mulai mengembangkan kebun kopi. Namun, karena cuaca tidak sesuai untuk tanaman kopi, orang-orang Eropa mencoba menanam tanaman kopi di daerah jajahan mereka. Belanda kala itu menanam kopi, terutama di Pulau Jawa yang kemudian dikenal sebagai disebut "Cup of Java" (Wintgens, 2009).

2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi

Kopi merupakan tanaman perdu yang memiliki batang kokoh dan kuat dengan tinggi tanaman bisa mencapai 8 - 12 meter. Tanaman kopi memiliki sistem akar tunggang yang tidak mudah rebah. Akar utama hanya tumbuh kurang dari 1 meter ke dalam tanah. Akar lateral tumbuh di atas permukaan tanah dengan panjang hingga 3 - 4 meter. Batang tanaman kopi mempunyai

dua tipe percabangan (dimorfisme) yaitu cabang *orthotrop* dan *plagiotrop*. Cabang *orthotrop* merupakan cabang batang yang tumbuh tegak lurus, sedangkan cabang *plagiotrop* merupakan cabang batang yang tumbuh kesamping atau horizontal dan berfungsi sebagai tempat tumbuh bunga dan buah. Batang pokok memiliki ruas-ruas yang tampak jelas pada saat tanaman itu masih muda (Panggabean, 2011).



Gambar 1. Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) (Sumber : dokumen pribadi, 2024)

Tanaman kopi memiliki daun tunggal berbentuk memanjang (*oblongus*) dengan ukuran panjang berkisar antara 20 - 30 cm dan lebar antara 10 - 16 cm. Ujung daun agak meruncing, tumbuh pada batang, cabang, dan ranting yang tersusun berdampingan pada ketiak. Pangkal daun membulat atau berbentuk baji dengan ujung daun (Siahaan, 2008; Steenis, 2008). Setiap ruas memiliki sepasang daun yang tumbuh berhadapan. Tanaman kopi tumbuh lurus, bercabang, dan bisa mencapai tinggi 12 m jika dibiarkan tumbuh. Urat daun tenggelam di dalam, membuat permukaan daun berlekuk-lekuk dan memiliki pangkal daun yang bulat. Panjang tangkai daun 1 cm, memiliki 10-12 pasang tulang samping. Pinggiran daun bergelombang dengan urat daun yang tenggelam (Panggabean, 2011).

Umumnya tanaman kopi berbunga setelah berumur sekitar dua tahun. Ketika bunga sudah dewasa, terjadi penyerbukan dengan pembukaan kelopak dan mahkota yang akan berkembang menjadi buah. Biasanya bunga mekar pada

awal musim kemarau dan buahnya bisa dipetik di akhir musim kemarau. Bunga kopi kecil, putih dan harum. Kelopak bunga berwarna hijau, lalu menutupi bakal buah yang berisi dua biji. Bunga kopi biasanya akan mekar pada awal musim kemarau. Bunga berkembang menjadi buah dan siap dipetik pada akhir musim kemarau (Najiyati dan Danarti, 2004).

Proses dari bunga menjadi buah matang biasanya memakan waktu sekitar 6-11 bulan, tergantung pada jenis tanaman dan kondisi lingkungan. Kopi arabika butuh waktu 6-8 bulan, sementara kopi robusta butuh 8-11 bulan. Ukuran panjang buah kopi Arabika sekitar 12-18 mm, sedangkan kopi Robusta sekitar 8-16 mm. Buah kopi terdiri dari daging buah dan biji. Buah kopi yang masih muda berwarna hijau, sedangkan yang masak berwarna merah. Daging buah terdiri dari 3 bagian, yaitu lapisan kulit luar (*eksokarp*), lapisan daging (*mesokarp*), dan lapisan kulit tanduk (*endokarp*) yang tipis tetapi keras (Batra, 2016). Daging buah yang sudah masak akan berlendir dan rasanya agak manis. Biji terdiri dari kulit biji dan lembaga (*endocarp*) yang keras biasa disebut kulit tanduk (Najiyati dan Danarti, 2004). Warna bijinya putih dan sebagian besar berupa endosperma. Setiap buah umumnya memiliki dua biji. Buah yang hanya mengandung satu biji disebut dengan peaberry dan dipercaya memiliki rasa yang lebih baik.

2.1.3 Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi robusta ditemukan pertama kali di Kongo pada tahun 1898 oleh ahli botani dari Belgia (Tshilenge, 2009). Robusta merupakan tanaman asli Afrika yang meliputi daerah Kongo, Sudan, Liberia, dan Uganda. Kopi robusta mulai dikembangkan secara besar-besaran di awal abad ke-20 oleh pemerintahan kolonial Belanda di Indonesia. Kopi robusta memiliki keunggulan lebih tahan terhadap serangan hama dan penyakit dibandingkan dengan jenis kopi arabika. Hingga saat ini perkebunan-perkebunan kopi di

Indonesia didominasi jenis robusta. Lebih dari 80% perkebunan kopi di Indonesia ditanami robusta, sekitar 17% ditanami arabika, sebagian kecil sisanya ditanami liberika (GAEKI, 2018).

Kopi robusta umumnya dibudidayakan di daerah dataran rendah hingga menengah (0 - 700 m di atas permukaan laut/ dpl) (Risandewi, 2013) dengan kondisi hangat dan lembab serta lebih tahan terhadap penyakit dan hama. Kopi Robusta dapat tumbuh baik pada daerah dengan suhu tahunan rata-rata 22-28°C (Niyibigira, 2019).

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

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Rubiales
Family	: Rubiaceae
Genus	: <i>Coffea</i>
Species	: <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner

2.2 Varietas, Klon, dan Kultivar

Varietas merupakan sekelompok tanaman yang sudah lulus berbagai uji penelitian sehingga bisa di sebar luaskan secara komersial. Klon merupakan sekelompok tanaman hasil pemuliaan tanaman yang masih dalam proses pengujian (Abror dkk., 2023). Istilah kultivar juga ada dalam Pasal 10 Kode Internasional Tatanama Tanaman Budidaya tahun 1969. Pasal tersebut memberi batasan kultivar sebagai kumpulan atas unit tumbuh-tumbuhan yang dibudidayakan dan dibedakan secara nyata oleh beberapa sifat, baik sifat morfologis, fisiologis, dan kimia.

2.3 Keragaman Genetik

Keragaman genetik dapat memperbesar kemungkinan untuk mendapatkan genotip yang lebih baik melalui seleksi. Keragaman karakter dan keanekaragaman genotip berguna untuk mengetahui pola pengelompokan genotip pada populasi tertentu berdasarkan karakter yang diamati dan dapat dijadikan sebagai dasar kegiatan seleksi (Agustina dan Waluyo, 2017; Effendy dkk., 2018). Keanekaragaman genotip merujuk pada variasi susunan DNA antar individu dalam suatu populasi yang mencerminkan perbedaan genetik sebenarnya dan tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Perbedaan antara keragaman fenotip dan genotip sering kali tidak berkorelasi kuat karena ekspresi fenotip dapat berubah akibat pengaruh lingkungan, sehingga analisis berbasis marka molekuler lebih akurat dalam menggambarkan variasi genetik yang sesungguhnya (Kamau dkk., 2020; Forsman, 2013).

Analisis keragaman genetik dapat dilakukan dengan berbagai jenis marka DNA yang mampu mendeteksi variasi genetik pada tingkat genom, antara lain RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), dan SSR (*Simple Sequence Repeat*), dengan masing-masing marker memiliki karakteristik dan tingkat resolusi yang berbeda. Keragaman yang tinggi akan semakin menguntungkan karena memudahkan dalam proses seleksi pemilihan karakter unggul yang dikehendaki (Harsanti dan Yulidar, 2015; Widyapangesthi dkk., 2022).

2.4 *Simple Sequence Repeats (SSR)*

Teknik bioteknologi seperti pengujian secara biomolekuler (DNA, protein, enzim) tidak hanya dapat dimanfaatkan pada perbanyakan benih dan pemuliaan tanaman, tetapi juga dapat diterapkan untuk mengevaluasi

kemurnian genetik. Berbagai metode menggunakan marka molekuler telah banyak diterapkan untuk pengujian varietas, di antaranya marka mikrosatelit atau marka SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Mulsanti dkk., 2013). Marka SSR sangat banyak dimanfaatkan dalam karakterisasi material genetik di bidang pertanian, analisis sidik jari, pemetaan genetik terkait karakter kuantitatif tertentu dan sebagai *marker-assisted selection* (MAS) pada program pemuliaan tanaman (Madesis dkk., 2013; Sulistiyorini dkk., 2021). Dengan menggunakan penanda SSR yang informatif, peluang kesesuaian antara dua individu acak bisa diminimalkan (Cmejlova dkk., 2021; Oktaviana dkk., 2024).

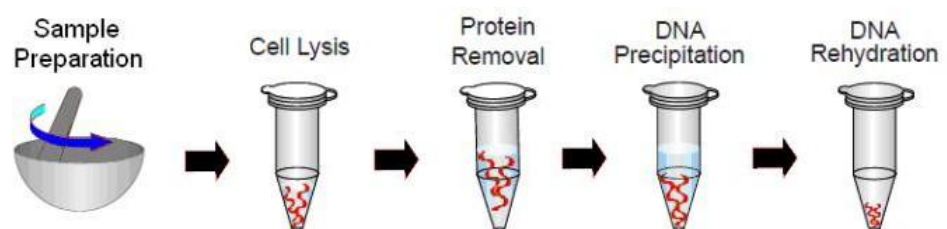
SSR memiliki tingkat informasi polimorfik (PIC) yang tinggi, sehingga memiliki urutan genetik yang stabil dan dapat direproduksi dengan baik. SSR juga memiliki sifat multi alel yang bermanfaat dalam membuat peta fisik berbasis urutan untuk tanaman. Hal ini membantu pemula dan ahli genetika untuk menghubungkan variasi fenotipik dan genotipik dengan efisien (Sabreena dkk., 2021; Zhu dkk., 2023; Oktaviana dkk., 2024). Keunggulan marka SSR dibandingkan dengan marka molekuler lainnya, antara lain adalah bersifat kodominan, tingkat polimorfisme tinggi, dan berbasis PCR yang mudah diaplikasikan (Lightfoot dan Iqbal, 2013; Sulistiyorini dkk., 2021).

Marka SSR diketahui dapat digunakan untuk mengidentifikasi *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, dan spesies terkait (Combes dkk., 2000; Syafaddin dan Pabendon, 2017). Selain itu, marka SSR juga telah digunakan untuk mengetahui polimorfisme antara aksesori *Coffea arabica* liar dan yang dibudidayakan (Rovelli dkk., 2000; Anthony dkk., 2002; Baruah dkk., 2003; Moncada dan McCouch, 2004; Syafaddin dan Pabendon, 2017), serta untuk menganalisis introgresi DNA fragmen dari *Coffea canephora* dan *Coffea*

liberica (Lashermes dkk., 2000; Gichuru dkk., 2008; Prakash dkk., 2002; Syafaddin dan Pabendon, 2017). Dengan demikian, marka SSR merupakan marka molekuler terbaik untuk mempelajari keragaman genetik, struktur populasi, hubungan filogenetik, dan seleksi berbasis marka (Hendre da Aggarwal, 2014; Syafaddin dan Pabendon, 2017).

2.5 Prinsip Isolasi DNA dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

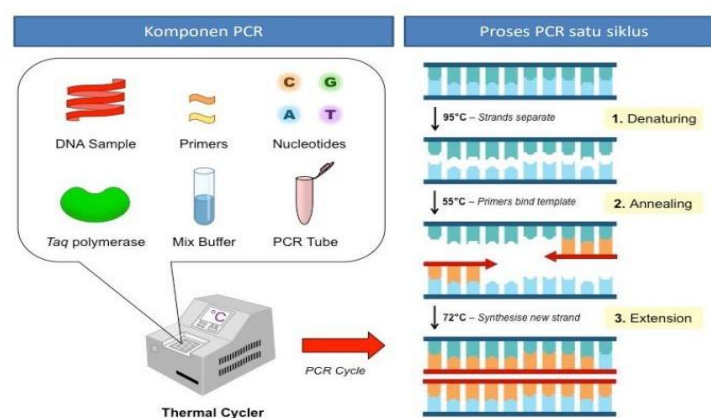
Isolasi DNA merupakan proses pemisahan DNA dari komponen sel lain seperti protein, lemak, karbohidrat, dan RNA sehingga diperoleh DNA murni yang dapat digunakan untuk analisis molekuler, salah satunya PCR. Pada proses isolasi DNA, membran sel dan membran inti dihancurkan menggunakan deterjen atau enzim sehingga DNA dapat keluar dari sel, kemudian protein dipisahkan menggunakan garam berkonsentrasi tinggi, proteinase K, atau pelarut organik seperti fenol-kloroform, selanjutnya DNA diendapkan menggunakan alkohol dingin (etanol/isopropanol) karena DNA tidak larut dalam alkohol, lalu DNA dicuci menggunakan etanol untuk menghilangkan sisa kontaminan, dan akhirnya DNA murni dilarutkan kembali dalam buffer TE atau akuades steril (Syahputra dkk., 2016).



Gambar 2. Tahap Isolasi DNA (Sumber : Richard dkk., 2010)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik biologi molekuler untuk memperbanyak fragmen DNA tertentu secara *in vitro* menggunakan enzim DNA polimerase. Prinsip PCR adalah teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* yang digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA tertentu melalui siklus suhu berulang yang meliputi tahap denaturasi, annealing, dan extension dengan bantuan enzim Taq DNA polymerase sehingga dihasilkan jutaan salinan DNA target dalam waktu singkat.

Pada tahap denaturasi, DNA untai ganda dipisahkan menjadi dua untai tunggal pada suhu tinggi sekitar 94-95°C, kemudian pada tahap annealing suhu diturunkan sekitar 50-65°C agar primer dapat menempel secara spesifik pada DNA target, dan dilanjutkan dengan tahap extension pada suhu 72°C di mana enzim Taq DNA polymerase memperpanjang primer untuk membentuk untai DNA baru. Proses ini diulang sebanyak 25-40 siklus sehingga jumlah DNA meningkat secara eksponensial dan dapat digunakan untuk berbagai analisis molekuler seperti diagnosis penyakit, identifikasi mikroorganisme, dan penelitian genetika (Handayani, 2022).



Gambar 3. Tahap PCR (Sumber : Richard dkk., 2010)

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB), Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Kawasan Sains Teknologi BJ Habibie, Serpong, Kota Tangerang Selatan, dan Laboratorium Balai Perakitan dan Pengujian Tanaman Industri dan Penyegar (BRMP TRI), Kabupaten Sukabumi mulai bulan Maret - September 2025.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu spidol, gunting, plastik, timbangan analitik, *autoclave*, *incubator*, *shaker incubator*, *hotplate*, Spektrofotometer UV-Vis, *Laminar Air Flow*, Elektroforesis gel agarose, PCR, Kit PCR, UV *Transiluminator*, *magnetic stirrer*, mortar dan alu, mikroskop binokuler, *vortex*, jangka sorong, mikropipet (volume 200 – 1000 μl , 20-200 μl , dan 10-100 μl), mikrotip (volume 1000 μl , 200 μl , dan 100 μl), tabung reaksi, tabung falkon, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, *beaker glass*, pinset, *microtube* (volume 1.5 ml dan 2 ml), spatula, bunsen, waterbath, tube, *sentrifuse*, *cover glass*, *object glass*, dan komputer.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu sampel 26 klon daun muda tanaman lokal kopi robusta Kabupaten Tanggamus, Kit Wizard DNA Extraction Promega, TBE *buffer*, Rnase, TE *buffer*, kloroform isoamil alkohol (CIA),

alkohol 70%, PVP, RNase, *water free nuckelase*, 28 primer SSR (CCESSR02, CCESSR03, CCESSR09, CCESSR12, CCESSR13, CCESSR14, CCESSR21, CCESSR44, CCRM16, CCRM19, CCRM34, CCRM38, CMA198, CMA199, CCES1, CCES21, CCES89, CCES5, CCES5, CCES18, CCES19, CCES43, CCES92, CCES13, CCES29, CCES85, CCES87, dan CCES50) (Devasia dkk., 2013) (Sulistiyorini dkk., 2021), mix PCR, agarose, loading dye, mercapto etanol, isopropanol, NaOAC, etanol 95%, marker, gel red, primer *forward* dan *reverse*.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Materi Tanaman

Materi tanaman yang digunakan untuk seleksi terdiri atas 26 klon lokal kopi robusta (Tabel 1) yang dikembangkan di wilayah Kabupaten Tanggamus, Lampung dan Parungkuda, Kabupaten Sukabumi. Sampel daun yang digunakan untuk isolasi DNA diambil dari daun muda dan sehat dari 26 klon lokal kopi. Sampel daun dimasukkan ke dalam kantong plastik dengan silica gel untuk menjaga kelembaban dan memperpanjang umur simpan daun.

Tabel 1. Daftar klon yang digunakan pada penelitian

No	Nama Klon	Asal			Titik Koordinat	
		Desa	Kecamatan	Kabupaten	Lat	Long
1.	Hermanto	Ngarip	Ulubelu	Tanggamus	5.313653°S	104.549787°E
2.	Sarmo	Penantian	Ulubelu	Tanggamus	5.277778°S	104.531895°E
3.	Syawal	Penantian	Ulubelu	Tanggamus	5.277882°S	104.532017°E
4.	Wanto	Penantian	Ulubelu	Tanggamus	5.280460°S	104.530988°E
5.	Sartono	Sukamaju	Ulubelu	Tanggamus	5.328188°S	104.543712°E
6.	Arsat	Sukamaju	Ulubelu	Tanggamus	5.328002°S	104.543738°E
7.	Jantuki	Ngarip	Ulubelu	Tanggamus	5.320416°S	104.539816°E
8.	Glodok Lancip	Ngarip	Ulubelu	Tanggamus	5 315680°S	104.542548°E
9.	Jalal	Muaradua	Ulubelu	Tanggamus	5.333252°S,	104.563230°E
10.	Glodok Kuning	Datarajan	Ulubelu	Tanggamus	5.349065°S	104.611038°E
11.	Berlin	Muaradua	Ulubelu	Tanggamus	5.320179°S	104 563142°E

12.	Linggapura	Muaradua	Ulubelu	Tanggamus	5.320102°S	104.563142°E
13.	Parabola	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.367870°S	104.710074°E
14.	Rosiah	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.367898°S	104.710161°E
15.	Bodong	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.368247°S	104.710218°E
16.	Bali	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.368247°S	104.710218°E
17.	Lengkong	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.368247°S	104.710218°E
18.	Tugu Kuning	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.419009°S	104.704833°E
19.	Tugino	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.419020°S	104.704905°E
20.	Komari	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.419038°S	104.704822°E
21.	Mariah	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.419126°S	104.704822°E
22.	Bagio	Wonoharjo	Sumberjo	Tanggamus	5.419032°S	104.704721°E
23.	K2	Langensari	Parungkuda	Sukabumi	-6.831045°S	106.743128°E
24.	Komarudin 1	Langensari	Parungkuda	Sukabumi	-6.834058°S	106.740271°E
25.	Kopi Putih	Langensari	Parungkuda	Sukabumi	-6.834561°S	106.740229°E
26.	Kopi Kriting	Langensari	Parungkuda	Sukabumi	-6.834561°S	106.740229°E

3.3.2 Pembuatan Stok

a. Pembuatan Larutan 1 M Tris-HCl pH 8

Sebanyak 53 g Trizma base dan 88,8 g Trizma HCl ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 700 mL akuades steril. Larutan dihomogenkan hingga seluruh bahan terlarut sempurna, selanjutnya volume ditera dengan akuades hingga mencapai 1 liter. Derajat keasaman (pH) larutan kemudian diukur menggunakan pH meter dan disesuaikan hingga mencapai pH 8.

b. Pembuatan Larutan 5 M NaCl

Sebanyak 292,2 g NaCl ditimbang, kemudian dilarutkan dalam akuades hingga volume akhir mencapai 1 liter. Larutan dihomogenkan hingga seluruh kristal NaCl larut sempurna.

c. Pembuatan *Buffer* Ekstraksi (Stok 1000 mL)

Sebanyak 100 mL larutan 1 M Tris-HCl pH 8, 280 mL larutan 5 M NaCl, dan 40 mL larutan EDTA pH 8 dicampurkan dalam gelas beker. Selanjutnya ditambahkan 20 g CTAB dan campuran dihomogenkan hingga larut

sempurna. Setelah seluruh komponen tercampur, volume larutan ditambahkan dengan akuades hingga mencapai 1 liter, kemudian dihomogenkan kembali sebelum digunakan.

d. Pembuatan Larutan 3 M NaOAc

Sebanyak 408,24 g NaOAc ditimbang dan dilarutkan dalam 700 mL akuades. Larutan diaduk hingga homogen, kemudian volume ditera dengan akuades hingga mencapai 1 liter.

e. Pembuatan TE *Buffer* 10X

Sebanyak 10 mL larutan 1 M Tris pH 8 dan 2 mL larutan 0,5 M EDTA dicampurkan dalam wadah yang sesuai. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga volume akhir mencapai 1 liter dan dihomogenkan.

f. Pembuatan TE *Buffer* 1X

TE buffer 1X dibuat dengan cara mengencerkan larutan stok TE buffer 10X. Sebanyak 5 mL TE buffer 10X dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas (ditambahkan ± 45 mL akuades) dan dihomogenkan.

g. Pembuatan Larutan Kloroform Isoamil Alkohol (CIA)

Larutan CIA dibuat dengan perbandingan kloroform dan isoamil alkohol sebesar 24:1. Untuk pembuatan 500 mL larutan, sebanyak 480 mL kloroform dicampurkan dengan 20 mL isoamil alkohol, kemudian dihomogenkan dan disimpan dalam botol berwarna gelap pada suhu ruang.

3.3.3 Isolasi DNA Metode Modern Kit Wizard DNA Extraction Promega

Daun kopi terlebih dahulu ditimbang sebanyak 0,200 gram, kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil. Potongan daun tersebut dimasukkan ke dalam mortar yang sudah steril dan ditambahkan nitrogen cair untuk membekukannya. Setelah daun menjadi halus, material tanaman tersebut dihancurkan dengan cepat hingga berbentuk bubuk halus. Sampel yang telah halus kemudian dipindahkan ke dalam tube 10 ml dan diberi label untuk proses analisis selanjutnya ditambahkan 600 μ l *nucleic lysis solution* ke

dalam tube yang sudah berisi sampel, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*. Setelah tercampur, sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit. Selanjutnya, ditambahkan 3 ul RNase *solution*, kemudian mikrotube dibolak-balik secara perlahan agar larutan tercampur merata, lalu diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 15 menit.

Setelah inkubasi, ditambahkan 200 ul *protein precipitation solution*, kemudian sampel divorteks dengan kecepatan tinggi yaitu 16.000 rpm selama 20 detik. Sampel kemudian disentrifugasi pada 16.000 xg selama 3 menit sehingga protein mengendap menjadi pellet. Supernatan yang terbentuk diambil dengan hati-hati dan dipindahkan ke mikrotube baru yang telah berisi 600 ul isopropanol dingin, lalu tabung digoyangkan perlahan untuk melihat terbentuknya benang-benang DNA. Selanjutnya, sampel kembali disentrifugasi pada 16.000 xg selama 1 menit, kemudian supernatan dibuang. Pellet yang tersisa dicuci dengan menambahkan 600 ul etanol 70%, lalu sampel disentrifugasi lagi pada 16.000 xg selama 1 menit. Setelah supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan cara dibiarkan terbuka selama 15 menit hingga sisa alkohol menguap. *Pellet* yang telah kering kemudian ditambahkan 100 ul DNA *dehydration solution* dan diinkubasi pada 65°C selama 60 menit untuk proses rehidrasi DNA. Terakhir, semua sampel disimpan pada suhu 4°C agar kualitas DNA tetap terjaga.

3.3.4 Isolasi DNA Metode Konvensional *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB)

Metode yang dipakai untuk ekstraksi DNA dalam penelitian ini mengikuti metode CTAB (Allen dkk., 2006; Sulistiyorini dkk., 2021). Isolasi DNA dilakukan menggunakan sampel daun muda kopi yang masih segar untuk memperoleh kualitas DNA yang optimal, karena jaringan muda umumnya memiliki kandungan metabolit sekunder lebih rendah dibanding daun tua.

Seluruh alat yang digunakan, seperti mortar dan alu, dicuci hingga bersih, dikeringkan, kemudian disterilisasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dibiarkan hingga benar-benar kering guna mencegah kontaminasi DNA. Sebanyak 0,300 gram daun muda ditimbang menggunakan neraca analitik, kemudian dipotong kecil-kecil untuk memperluas permukaan kontak dengan buffer ekstraksi. Sampel dimasukkan ke dalam mortar, lalu ditambahkan 2 mL *buffer* isolasi CTAB, 0,05 gram PVP, dan 5 μ L β -*mercaptoethanol*. Buffer CTAB berfungsi melisis dinding dan membran sel serta mengikat polisakarida, PVP berperan mengikat senyawa fenolik yang dapat mengganggu kemurnian DNA, sedangkan β -*mercaptoethanol* berfungsi mereduksi oksidasi senyawa fenolik agar tidak merusak DNA. Campuran kemudian digerus hingga benar-benar halus untuk memastikan sel pecah secara maksimal.

Hasil gerusan sampel dimasukkan ke dalam tabung 2 mL dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit dengan pembalikan tabung setiap 15 menit untuk menjaga homogenitas dan meningkatkan lisis sel. Selanjutnya, sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.500 rpm selama 15 menit pada suhu ruang untuk memisahkan supernatan yang mengandung DNA dari debris sel. Sebanyak 800 μ L supernatan dipindahkan ke tabung baru, kemudian ditambahkan larutan CIA (*chloroform isoamyl alcohol*) dengan perbandingan 24:1 atau setara 1:1. Campuran dihomogenkan secara perlahan selama 10-15 menit, lalu disentrifugasi kembali hingga terbentuk dua fase, yaitu fase atas yang mengandung DNA dan fase bawah yang berisi protein serta kontaminan lainnya.

Supernatan sebanyak 800 μ L dipindahkan ke dalam tube 1,5 mL, kemudian ditambahkan 8 μ L NaOAc (1/100 volume supernatan) dan 400 μ L isopropanol (1/2 volume supernatan) untuk mengendapkan DNA. Campuran dibolak-balik perlahan hingga terlihat benang-benang DNA dan diinkubasi

pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.500 rpm selama 10 menit hingga terbentuk pelet DNA di dasar tabung. Supernatan dibuang secara hati-hati, kemudian pelet DNA ditambahkan RNase sebanyak $\pm 2,5 \mu\text{L}$ (1/100 dari volume TE buffer yang digunakan) untuk menghilangkan kontaminasi RNA. Setelah itu ditambahkan $250 \mu\text{L}$ TE *buffer* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit agar RNA terdegradasi sempurna.

Tahap presipitasi ulang dilakukan dengan menambahkan NaOAc sebanyak 1/10 dari volume larutan DNA ($25 \mu\text{L}$) dan $600 \mu\text{L}$ etanol 95% dingin. Campuran dihomogenkan secara perlahan dan diinkubasi pada suhu -20°C selama semalam untuk meningkatkan efisiensi pengendapan DNA. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci menggunakan $500 \mu\text{L}$ etanol 70% dingin untuk menghilangkan sisa garam dan kontaminan, kemudian disentrifugasi kembali selama 10 menit pada kecepatan yang sama. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringkan pada suhu ruang selama semalam hingga sisa etanol menguap sempurna. DNA kering kemudian dilarutkan dalam $200 \mu\text{L}$ TE *buffer* dan dibiarkan pada suhu ruang semalam hingga larut sempurna. DNA hasil isolasi selanjutnya disimpan pada freezer suhu -20°C untuk menjaga stabilitas hingga tahap analisis berikutnya.

3.3.5 Uji Kualitas dan Kuantitas Isolasi DNA

Uji kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan menggunakan metode spektrofotometri dan elektroforesis gel agarosa. Pengukuran kuantitas dan kemurnian DNA dilakukan dengan spektrofotometer seperti *NanoDrop Spectrophotometer* pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA ditentukan berdasarkan nilai absorbansi pada 260 nm (A_{260}), sedangkan tingkat kemurnian DNA dilihat dari rasio A_{260}/A_{280} . DNA yang memiliki rasio kemurnian sekitar 1.8-2.0 menunjukkan tingkat kemurnian yang baik, sedangkan nilai yang lebih rendah dapat

mengindikasikan adanya kontaminasi protein atau senyawa lain. Selain itu, kualitas DNA diuji secara visual menggunakan metode elektroforesis gel agarosa untuk melihat integritas DNA berdasarkan pola pita yang terbentuk pada gel. Pita DNA yang jelas dan tidak mengalami smear menunjukkan bahwa DNA yang diisolasi memiliki kualitas yang baik dan masih utuh sehingga dapat digunakan untuk analisis molekuler selanjutnya, seperti amplifikasi PCR (Sambrook dan Russell, 2001; Green dan Sambrook, 2012).

3.3.6 Seleksi Primer

Penelitian ini menggunakan primer SSR yang dipilih berdasarkan tingkat variasi polimorfisnya. Beberapa dari primer ini juga telah dipetakan pada peta keterpautan genetik kopi robusta (Hendre dan Aggarwal, 2014; Sulistiyorini dkk., 2021). Seleksi primer SSR yang digunakan pada tabel 2 di bawah ini:

Tabel 2. Rincian Penanda SSR Gen yang digunakan (Devasia dkk., 2013) (Sulistiyorini dkk., 2021).

No.	Primer Name	SSR Repeat	Primer Sequence	
			Forward	Reverse
1	CCESSR02	(AT) ₁₁	AAGATATGTTTAGECCAAGTAGTGAC	ATTGGTTGGTACTGITTAGTGTTTCAT
2	CCESSR03	(TC) ₁₀	CAGCGTATCAGACCAGCAT	TTCCAACCEGTCAAAGTCT
3	CCESSR09	(TTC) ₈	CCCCACCCACTTCCTIG	ACAACAAACGAACGCTCTCTGATAA
4	CCESSR12	(CCA) ₆	CCGCCATCCCTTTTGCCTTTC	ACGGCAGCAGAAGTGGAGGTGTT
5	CCESSR13	(TTA) ₆₋₁₀ (TTC) ₆	GCGGGTAGTTTGGGAATATGG	TTTGGGGTCTTTTCCACACAT
6	CCESSR14	(CT) ₁₀	CTTGCCCTCCCTCCACTC	TTCGGCTCCTTGITTTGGGTA
7	CCESSR21	(AG) ₁₇	CGAGCTAGTGAGACAGATTGAGAT	GTCCTTGGGAAATCCCTCAG
8	CCESSR44	(CTT) ₇	AGGAATAATGGAGGAGACGTTGTTG	GCACAAATECCAGTACTICCTCATAGA
9	CCRM16	(TC) ₂₆	TCCTATAGCAGAAACACAAAATGACACAG	GGTITTTGGGTTCTTTTTAGCATATACA
10	CCRM19	(GA) ₂₆	GTITITITITCTTITTTCTTTTGAGCT	AAGGCAATGTTGGTCAGCAGTGG
11	CCRM34	(GA) ₁₀	CCCCAGAACGAAAGGCAATCAT	TTGGGACTATTTATACTGGGGAAGAA
12	CCRM38	(CA) ₁₀	TGAGAATTAAGCAGCAGGGGTATG	GCAAAAAAGGAAAAGCATTACATC
13	CMA198	(TG) ₈ (AG) ₁₈	AGCAACTCCAGTCTCAGGT	TGGAAGCCCGCATATAGTTT
14	CMA199	(CT) ₁₁	CATCCATCATCAATTCCAT	TAGCTAGCTGGATCAGTACCC
15	KR 1	(CTC) ₈	AGTCAGGTATTGCCATTG	AGGCAGCTAAATCAGCCAAG
16	KR 3	(CT) ₁₂	TCGGCTCCAAATATTCATC	TTCTCAATGGTTTCCATG
17	KR 4	(AGGA) ₈	CTTCTGAGTGAAAGCTTC	CCAATCGGACACTCAC
18	KR 5	(TTTA) ₅	TTTGTGCCAAAGGGAAGAG	GACCGGAGAAGTCATTGG
19	KR 6	(GA) ₁₀	GCAGGCTTCACEGGTTTG	ACTGGGATGATGCTCTGGCTC
20	KR 7	(CA) ₈	ACCCAAAACCTGCCTCC	TGTAGAAGCACCCGGAGAG
21	KR 8	(AGA) ₁₀	AAACAGCAGGGAAGCTG	AACCAAGGTCCATAAACCC
22	KR 9	(TG) ₉	CAGCAACCAAACTGCTG	GGGCATACATGAAAAGCC
23	KR 10	(CTT) ₆	AAGGTTTCGAGCCAGGAAG	ATCCTTTGCCTTGGTTGATG
24	KR 11	(A) ₁₉	AGCCAAGGATCTTCCC	GGCCTAGATAGCAGAATCGC
25	KR 12	(AC) ₈	TTATTGACGAATCCCATG	TCCAGGCGTCTGTCTG
26	KR 13	(TTC) ₆	GGCAGGAGGCTTTCTCTC	TGCCTATGGCACAAGTTTC
27	KR 14	(TCGT) ₇	AGGAGCAATTCGTTTCATCG	GTAGGTTGGTGAGACTGGC
28	KR 15	(TCA) ₆	GGCTCTGGAGAGCTCAGG	CCCATCTGCTGACTCTGG

Amplifikasi DNA dilakukan dengan volume total 15 μl yang terdiri atas: primer sebanyak 0,3 μl , DNA sebanyak 4 μl , *nuclease free water* sebanyak 3,2 μl , dan PCR Mix sebanyak 7,5 μl (Tabel 2).

Tabel 3. Komponen Master Mix PCR

Komponen	Volume
Primer SSR (forward dan reverse dengan konsentrasi 0,2 μM)	0,3 μL
DNA <i>template</i>	4 μL
<i>Nuclease Free Water</i>	3.2 μL
PCR mix	7.5 μL
Total Volume	15 μL

Proses amplifikasi dilakukan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan alat *thermal cycle* melalui tiga tahapan utama yaitu *denaturation* pada suhu 95°C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 52°C selama 15 detik dan *extension* pada suhu 72°C selama 15 detik. Seluruh tahapan dalam proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus.

Tabel 4. Proses Amplifikasi

Tahapan	Profil
<i>Pre-denaturation</i>	95°C selama 3 menit
<i>Denaturation</i>	95°C selama 15 detik
<i>Annealing</i>	52°C selama 15 detik
<i>Extention</i>	72°C selama 15 detik
<i>Final Extention</i>	72°C selama 10 menit

Gel agarosa 1% dibuat dengan menimbang serbuk agarosa sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam larutan TBE 0,5×. Magnetic stirrer dimasukkan ke dalam campuran untuk membantu proses homogenisasi. Larutan dipanaskan menggunakan microwave selama ±4 menit hingga agarosa larut sempurna dan larutan menjadi jernih. Setelah pemanasan, suhu larutan diturunkan dengan meletakkannya di atas hot plate tanpa pemanasan (hanya menggunakan putaran/motion 1) hingga suhu menjadi hangat. Setelah suhu cukup hangat, ditambahkan gelred 10× sebanyak 5 µL untuk setiap 100 mL gel agarosa 1%. Apabila volume gel agarosa ditingkatkan, maka volume gelred yang ditambahkan disesuaikan dengan perbandingan yang sama. Campuran kemudian dihomogenkan kembali dan dibiarkan teraduk selama beberapa saat.

Larutan gel dituangkan ke dalam tray cetakan gel yang telah dibersihkan dan dikeringkan menggunakan alkohol 70%. Selama proses penuangan, dihindari terbentuknya gelembung udara atau masuknya partikel asing ke dalam gel. Sisir dipasang pada cetakan untuk membentuk sumur, kemudian gel dibiarkan hingga mengeras pada suhu ruang selama ±20-30 menit. Setelah gel mengeras, silikon penunjang cetakan dilepaskan dan gel dipindahkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi larutan TBE 0,5× hingga gel terendam sempurna. Posisi gel diatur sehingga sumur berada di dekat elektroda negatif (katoda berwarna hitam), sedangkan bagian bawah gel berada di dekat elektroda positif (anoda berwarna merah). Sisir pencetak sumur kemudian dilepaskan secara hati-hati.

Sampel DNA hasil PCR yang telah dicampur dengan loading dye dimasukkan ke dalam sumur gel menggunakan mikropipet. Marker DNA (DNA ladder) juga dimasukkan ke salah satu sumur sebagai pembanding ukuran fragmen. Perangkat elektroforesis kemudian dihubungkan dengan power supply dan dijalankan pada tegangan 100 volt selama ±30-45 menit

atau hingga pewarna migrasi (*tracking dye*) mencapai sekitar $\frac{3}{4}$ panjang gel. Setelah proses elektroforesis selesai dan ditandai dengan bunyi buzzer, perangkat dimatikan dan gel diangkat secara hati-hati dari tangki. Gel selanjutnya divisualisasikan menggunakan alat dokumentasi gel (*gel documentation system*) di bawah sinar UV atau blue light untuk mengamati pola pita DNA serta mengevaluasi ukuran dan kualitas fragmen DNA yang diperoleh.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini sebagai berikut.

1. Isolasi DNA kopi robusta metode konvensional (CTAB) menghasilkan kuantitas dan kualitas yang lebih tinggi daripada menggunakan metode modern (Kit).
2. Terdapat 12 primer yang dapat mengamplifikasi gen target dari 28 primer yang diuji.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang ada, disarankan untuk:

1. Metode isolasi DNA konvensional direkomendasikan untuk penelitian genetik tanaman berkonten fenolik tinggi seperti kopi, untuk memperoleh DNA murni dan hasil PCR yang optimal.
2. Melanjutkan analisis selanjutnya untuk mendapatkan pita-pita DNA yang presisi membedakan alel yang didapat dari masing-masing klon.
3. Dapat menjadi acuan dasar dalam pengelolaan dan konservasi plasma nutfah kopi robusta di tingkat lokal maupun nasional, terutama untuk mendukung pengembangan kopi unggul khas Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abror, M. D., Budi, S., dan Lailiyah, W. N. 2023. Evaluasi Keragaman Morfologi dan Agronomi 7 Klon dan 2 Varietas Tanaman Tebu (*Sacchaum officinarum* L.) Keprasan Satu Di Kebun Ploso Klaten-Kediri. *Gema Agro*, 28(2): 115-122.
- Adepoju, A. F., Sobowale, I. O., dan Adenuga, O. O. 2023. Genetic Diversity of Coffee Genotypes Using *Simple Sequence Repeat* (SSR) Markers. *Eur. J. Med. Plants*, 34, 14-20.
- Agustina, N. I., dan Waluyo, B. 2017. Keragaman karakter morfo-agronomi dan keanekaragaman galur- galur cabai besar (*Capsicum annum* L.). *Jurnal Agro*, 4(2): 120–130.
- Anthony, F., Astorga-Domian, C. G., Quiros, O., Bertrand, B., Etienne, H., Topart, P., dan Lashermes, P. 2002. Genetic diversity of wild and cultivated coffees (*Coffea arabica*), revealed by molecular markers. *Boletin Promecafe*, 96: 7-12.
- Arif, I. A. dan Khan, H. A. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1): 9-17.
- Badan Pusat Statistik. 2019. Provinsi Lampung Dalam Angka 2019. BPS Provinsi Lampung. Lampung. BPS Provinsi Lampung. Lampung.
- Baruah, A., Naik, V., Hendre, P. S., Rajkumar, R., Rajendrakumar, P., dan Aggarwal, R. K. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite emarkers from *Coffea arabica* L., showing wide crossspeciesamplifications. *Molecular Ecology Notes*, 3(4): 647–650.
- Batra, P. 2016. Coffee: The culture, chemistry, and consumption. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Cmejlova, J., Rejlova, M., Paprstein, F., dan Cmejla, R. 2021. A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh). *Plant Science*, 303, 110768.

- Combes, M. ., Andrzejewski, S., Anthony, F., Bertrand, B., Rovelli, P., Graziosis, G., dan Lashermes, P. 2000. F : Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. In *Molecular Ecology*: 1171-1193.
- Cronquist, A. 1981. *An Intergrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press. New York.
- Devasia, J., Madhura, J. N., Kumar, R. R., dan Sheshasayee, M. S. 2013. Development of SSR markers for Robusta coffee (*Coffea canephora*). *Journal of Plantation Crops*, 41(3): 277-286.
- Direktorat Jenderal Perkebunan [Ditjenbun]. 2021. Statistik Perkebunan Unggulan Nasional 2019-2021. Direktorat Jenderal Perkebunan. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Doyle, J. J., dan Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Effendy, E., Respatijarti, R., dan Waluyo, B. 2018. Keragaman genetik dan heritabilitas karakter komponen hasil dan hasil ciplukan (*Physalis sp.*). *Jurnal Agro*, 5(1): 30-38.
- Forsman, A. 2013. Effects of genotypic and phenotypic variation on establishment are important for conservation, invasion, and infection biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 302-307.
- Froehner, A. 1897. Übersicht über die Arten der Gattung Coffea. *Notizbl. Bot. Gart. Must. Berlin-Dahlem*. 4: 230-238.
- Gabriela, T., dan Maret, H. 2003. *A Cup of Java*. Equinox Publishing, Jakarta-Singapore.
- GAEKI, 2018. Data Penghasil Kopi di Indonesia.
- Gichuru, E. K., Agwanda, C. O., Combes, M. C., Mutitu, E. W., Ngugi, E. C. K., Bertrand, B., dan Lashermes, P. 2008. Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology*. 57(6): 1117–1124.
- Green, M.R. dan Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratoryko*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Handayani, S. 2022. Prinsip dan aplikasi polymerase chain reaction (PCR) dalam diagnosis molekuler. *Jurnal Kesehatan Tambusai*, 3(2), 45-53.

- Hartati, Sumadi, Subandriyo, dan Hartatik. T. 2010. Keragaman morfologi dan diferensiasi genetik sapi peranakan Ongole di peternakan rakyat. *JITV*, 15(1): 72-80.
- Harsanti, L., dan Yulidar. 2015. Pengaruh Irradiasi Sinar Gamma Terhadap Pertumbuhan Awal Tanaman Kedelai (*Glycine Max* (L.) Merrill) Varietas Denna 1. *Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir*, 9:59-63.
- Hendre, P. S., dan Aggarwal, R. K. 2014. Development of genic and genomic SSR markers of Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). *PLoS ONE*, 9(12): 1-34.
- Indrawanto, C., Kamawati, E., Munarso., Prastowo, S.J., Rubijo, B., dan Siswanto. 2010. Budidaya dan Pascapanen Kopi. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Bogor.
- Kamau, P., Muluvi, G., dan Runo, S. 2020. Assessing the genetic diversity of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) germplasm collections using phenotypic traits and SNP markers. *BMC Genomic Data*, 21, 70.
- Kencana, Y. A., Mustikarini, E. D., dan Lestari, T. 2022. Eksplorasi dan karakterisasi keragaman plasma nutfah tanaman padi (*Oryza sativa* L.) di pulau Belitung. *Jurnal Agro*, 9(1), 48-63.
- Kementerian Pertanian RI. 2014. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 49/Permentan/OT.140/4/2014 tentang Pedoman Teknis Budidaya Kopi yang Baik. Jakarta: Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Kustyawati, M. E., dan Sartika, D. 2021. Effect of Wet Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae* on Chemical Properties and Sensory of Robusta Coffee (*Coffea canephora*). *Jurnal Teknik Pertanian Lampung*, 10(4), 1-8.
- Lashermes, P., Andrzejewski, S., Bertrand, B., Combes, M. C., Dussert, S., Graziosi, G., dan Anthony, F. 2000. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). *Theoretical*.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., dan Kim, Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62).
- Lestari, S. W., Rustiati, E. L., Priyambodo, P., Wahyuningsih, S., Sandra, S., Winarno, W., dan Permatasari, N. 2025. Amplifikasi Gen N-Methyltransferase Kopi Robusta Di Perkebunan Kopi Rakyat Wiyono Lampung: Amplifikasi Gen N-Methyltransferase Kopi Robusta Di Perkebunan Kopi Rakyat Wiyono Lampung. *Jurnal Biogenerasi*, 10(2):1027-1032.

- Lightfoot, D. A., dan Iqbal, M.J. 2013. Molecular mapping and breeding with microsatellite markers. In: Kantartzi S. (eds), *Microsatellites. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Lubis, S. S. 2022. Karakterisasi mikrofungi patogen pada biji kopi robusta (*Coffea canephora*) asal lamno dengan metode blotter test. *Journal of Biological Sciences and Applied Biology*, 2(1): 48-57.
- Madesis, P., Ganopoulos, I., dan Tsaftaris, A. 2013. Microsatellites : evolution and contribution. In: Kantartzi S. (eds), *Microsatellites. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Moncada, P., dan McCouch, S. 2004. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome*, 47(3): 501-509.
- Mudaningrat, A., Umayana, F., Syahriza, F. A. A., Anggraito, Y. U., dan Setiati, N. 2023. Aplikasi Penanda Molekuler untuk Analisis Keanekaragaman Genetik Hewan. *Jurnal Biologi, Pendidikan dan Terapan*, 10(1): 11-25.
- Mulsanti, I. W., Surahman, M., Wahyuni, S., dan Utami, D. W. 2013. Identifikasi galur tetua padi hibrida dengan marka SSR spesifik dan pemanfaatannya dalam uji kemurnian benih. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 32(1).
- Najiyati, S., dan Danarti. 2004. *Budidaya Kopi dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Niyibigira, E. I., 2019. *Robusta Coffee Handbook A Sustainable Coffee Industry with High Stakeholder Value for Social Economic Transformation*. The Ministry Of Agriculture, Animal Industry and Fisheries. Uganda: Uganda Coffee Development Authority (UCDA).
- Nugroho, K., Slamet, S., dan Lestari, P. 2017. Keragaman Genetik 24 Varietas Padi Sawah dan Padi Gogo (*Oryza sativa* L.) Indonesia Berdasarkan Marka SSR. *Scripta Biologica*, 4(1): 5-10.
- Nurdiansyah, N. F. 2014. Implementasi Sistem Nilai Cacat Kopi Robusta Hasil Proses Pengolahan (Studi Kasus Pengolahan Metode Semi Basah Di Jember Pengolahan Metode Kering Di Banyuwangi Dan Malang). Universitas Jember.
- Oktaviana, E., Setiati, N., dan Anggraito, Y. U. 2024. Tinjauan Pustaka Sistematis: Karakterisasi Keanekaragaman Genetik Spesies Jeruk (*Citrus sp.*) Menggunakan Penanda *Simple Sequence Repeat* (SSR). *Jurnal Biologi, Pendidikan dan Terapan*, 10(2): 202-212.

- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: Agro Media Pustaka
- Pendergrast, M. 2010. *Uncommon grounds: The history of coffee and how it transformed our world* (Revised ed.). New York, NY: Basic Books.
- Prakash, N. S., Combes, M. C., Somanna, N., and Lashermes, P. 2002. AFLP analysis of introgression in coffeecultivars (*Coffea arabica* L.) derived from a natural interspecific hybrid. *Euphytica*. 124(3): 265-271.
- Prasetyono, J., Aswidinnoor, H., Moeljopawiro, S., Sopandie, D., dan Bustamam, M. 2008. Identifikasi marka polimorfik untuk pemuliaan padi toleran defisiensi fosfor. *Jurnal AgroBiogen*. 4(2):51-58.
- Putra, O. D., Samudin, S., Lakani, I., dan Bahan, A. 2014. Asal dataran Lore. *Jurnal Agrotekbis*, 146-154.
- Rachmayanti Y. 2006. Extraction, amplification and characterization of wood DNA from *Dipterocarpaceae*. *Plant Molecular Biology Reporter*, (24): 45-55.
- Richard A. Harvey., Denise R., dan Ferrier. 2010. *Biochemistry* (Lippincott Illustrated Reviews Series) 5th.
- Risandewi, T. 2013. Analisis Efisiensi Produksi Kopi Robusta di Kabupaten Temanggung (Studi Kasus di Kecamatan Candiroto). *Jurnal Litbang Prov Jateng*, 11(1): 87-102.
- Rohlf, F.J. 2018. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0, User Guide.
- Rosiana, N., R, Nurmalina, R., Winandi., dan A, Rifin. 2018. Dynamic of Indonesian robusta coffee competition among major competitor. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 5(1): 1-10.
- Rovelli, P., Mettulio, R., Anthony, F., Anzuetto, F., Lashermes, P., and Graziosi, G. 2000. Microsatellites in *Coffea arabica* L. In T. Sera, C. R. Soccol, A. Pandey, dan S. Roussos (Eds.), *Coffee biotechnology and quality: Proceedings of the 3rd international seminar on biotechnology in the Coffee Agro-Industry, Londrina, Brazil*: 123-133.
- Sabreena, Nazir, M., Mahajan, R., Hashim, M. J., Iqbal, J., Alyemeni, M. N., Ganai, B. A., dan Zargar, S. M. 2021. Deciphering allelic variability and population structure in buckwheat: An analogy between the efficiency of ISSR and SSR markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(11): 6050–6056.
- Sambrook, J., dan Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

- Sembiring, E. R., Terryana, R. T., Anggraheni, Y. G. D., Prihaningsih, A., Batubara, I., Nurcholis, W., dan Harmoko, R. 2023. Efektivitas Metode Ekstraksi DNA pada Daun Segar dan Kering dari Tanaman Obat. *Vegetalika*, 12(3): 211-227.
- Shu, AP., Kim, JH., Zhang, SY., Cao, GL., Nan, ZH., Lee, KS., Lu, Q., dan Han, L, Z. 2009. Analysis on genetic similarity of japonica rice variety from different origins of geography in the world. *Agric Sci China*. 8(5): 513-520.
- Siahaan, 2008. Analisis Daya Saing Komoditas Kopi Arabika Indonesia di Pasar Internasional. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Simangunsong, A. D., Respatijarti, R., dan Damanhuri, D. 2017. Eksplorasi dan Karakterisasi Pisang Mas (*Musa Spp.*) di Kabupaten Nganjuk, Mojokerto, Lumajang dan Kediri. *Jurnal Produksi Tanaman*. 5(3): 363-367.
- Sinha, S., dan Singh, D. 2022. Role of molecular markers for genetic diversity analysis in floricultural crops. *Journal of Ornamental Horticulture*, 25(1&2), 43-48.
- Steenis, V. 2008. Flora. Cetakan ke-12. Jakarta: PT. Pradnya Paramita
- Sulistiyorini, I., Dani, Izzah, N.K., dan Martono, B. 2021. Keragaman Genetik Klon Lokal Kopi Robusta Asal Temanggung Berdasarkan Marka SSR. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*. 8(3): 141–150.
- Syafaddin, D., dan Pabendon, M. B. 2017. Keragaman genetik antar klon kopi Robusta lokal Pagar Alam berdasarkan analisis marka SSR. *Jtidp*, 4(3): 133-144.
- Syahputra, A., Mutaqin, K. H., dan Damayanti, T. A. 2016. Komparasi metode isolasi DNA patogen antraknosa dan bulai untuk deteksi PCR. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 12(4), 124-132.
- Triani, N. 2020. Isolasi DNA tanaman jeruk dengan menggunakan metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*). *Jurnal Teknologi Terapan*, 3(2): 221-226.
- Tshilenge, P., Nkongolo, K.K., Mehes, M., dan Kalonji, A., 2009. Genetic variation in *Coffea canephora* L. (Var. Robusta) accessions from the founder gene pool evaluated with ISSR and RAPD. *African Journal of Biotechnology*, 8(3): 380-390.
- Weinberg, B. A., dan Bealer, B. K. 2001. The world of caffeine: The science and culture of the world's most popular drug. Routledge.

- Widiyani, D. P., dan Hartono, J. S. 2021. Studi Eksplorasi Agroklimat Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Kabupaten Tanggamus, Lampung. *Jurnal Agrinika: Jurnal Agroteknologi Dan Agribisnis*, 5(1): 20-29.
- Widyapangesthi, D. A., Moeljani, I. R., dan Soedjarwo, D. P. 2022. Keragaman Genetik Dan Heritabilitas M1 Mentimun (*Cucumis sativus* L.) Lokal Madura Hasil Iradiasi Sinar Gamma 60CO. *Jurnal Agrium*, 19(2): 191-196.
- Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Wilson, K., dan Walker, J. 2010. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology . Cambridge: Cambridge University Press.
- Wintgens, J. N. 2009. *Coffee: Growing, processing, sustainable production*.
- Yunida, Y., Kamaluddin, M. T., Theodorus, T., dan Mangunsong, S. 2021. Formulasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kafein Hasil Isolasi dari Biji Kopi Robusta. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 7(1): 47-59.
- Zarwinda, I., dan Sartika, D. 2018. Pengaruh suhu dan Waktu Ekstaksi Terhadap kafein Dalam Kopi. *Jurnal Lantanida*, 6(2): 103-202.
- Zasari, M., Kartika, K., dan Altin, D. 2023. Eksplorasi-Karakterisasi Morfologi Kopi Robusta Lokal di Pulau Bangka. *Jurnal Agrikultura*, 34(2): 200-209.
- Zhu, X., Wu, Y., Zhou, J., Lin, J., dan Chen, X. 2023. Morphological, palynological and transcriptomic-based SSR assessment of peony varieties adaptive in the Jiangnan region. *Scientia Horticulturae*, 310.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Pengambilan Sampel di Tanggamus



Klon Parabola



Klon Wanto



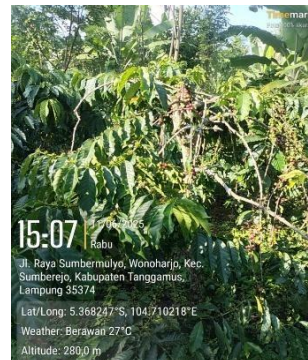
Klon Bodong Lancip



Klon Rosiah



Klon Berlin



Klon Bodong



Klon Sartono



Klon Tugu Kuning



Klon Tugino



Klon Hermanto



Klon Bali



Klon Linggapura



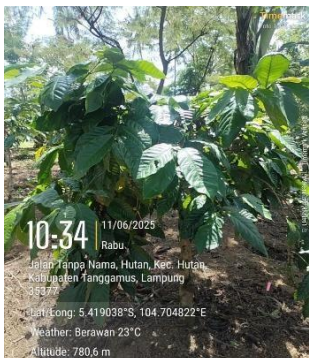
Klon Glodok Kuning



Klon Lengkong



Klon Sarmo



Klon Komari



Klon Jalal



Klon Arsat

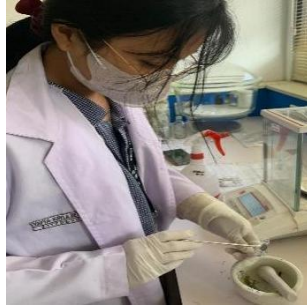
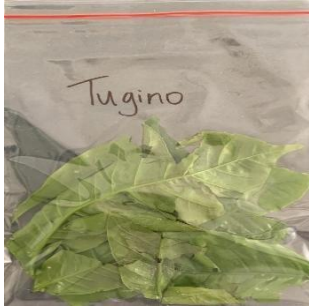


Klon Jantuki

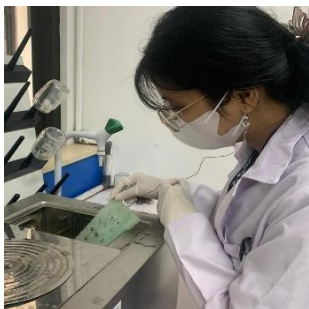


Klon Syawal

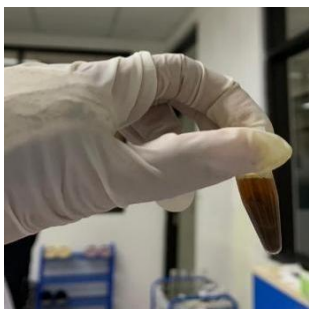
Lampiran 2. Dokumentasi Proses Isolasi DNA dengan Kit



Daun muda kopi robusta Daun di gerus dengan nitrogen cair



Diinkubasi dengan waterbath Sampel disentrifugasi



Terbentuk pellet

Sampel di nanodrop

Lampiran 3. Dokumentasi Proses Isolasi DNA dengan CTAB



Daun di gerus dengan senyawa CTAB



Terbentuk pellet DNA



Terbentuk benang-benang DNA