



Biogenerasi Vol 10 No 2, 2025

Biogenerasi

Jurnal Pendidikan Biologi
<https://e-journal.my.id/biogenerasi>



AMPLIFIKASI GEN *N-METHYLTRANSFERASE* KOPI ROBUSTA DI PERKEBUNAN KOPI RAKYAT WIYONO LAMPUNG

Septi Wahyu Lestari¹, Elly Lestari Rustiati¹, Priyambodo^{1*}, Sri Wahyuningsih¹, Shifa Sandra¹, Winarno¹, Natasya Thesalonika¹, Muhammad Febriansyah¹, Minanti Mayda Ashari¹, Yuliana Andriyani¹, Aril Afandi¹, Annisa Lidya¹, Dian Neli Pratiwi², Eko Agus Srihanto³, Suhada⁴, Nindy Permatasari⁴

¹Universitas Lampung, Indonesia

²Akar Lestari Indonesia, Indonesia

³Balai Veteriner Lampung, Indonesia

⁴Program Studi Pengelolaan Perkebunan Kopi, Politeknik Negeri Lampung, Indonesia

*Corresponding author E-mail: priyambodo@fmipa.unila.ac.id

Abstract

Robusta coffee (*Coffea canephora*) is one of the commonly cultivated plantation products in Indonesia because it has high economic value. Pesawaran Regency is one of the regions in Lampung that cultivates robusta coffee on a smallholder plantation scale. Gene isolation and amplification is the first step in molecular analysis to determine gene diversity in robusta coffee. This study was intended to analyse the results of isolation and amplification of robusta coffee leaf DNA from smallholder coffee plantations in Pesawaran, Lampung. DNA isolation from 5 robusta coffee leaf samples was carried out referring to the DNA isolation kit protocol from Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant). The extraction results were then amplified using N-methyltransferase primers by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Visualisation of isolation and amplification results was carried out using 1% agarose gel electrophoresis. Visualisation of the extraction results has shown that a good DNA extract was obtained. Visualisation of the amplification results showed that a 600bp DNA fragment was

Keywords: *Coffea canephora*, Pesawaran, *n-methyltransferase*, *polymerase chain reaction*

Abstrak

Kopi robusta (*Coffea canephora*) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang umum ditanam di Indonesia karena memiliki nilai ekonomis tinggi. Kabupaten Pesawaran menjadi salah satu daerah di Lampung yang banyak mengusahakan kopi robusta dalam skala perkebunan rakyat. Isolasi dan amplifikasi gen menjadi langkah awal dalam analisis molekuler untuk mengetahui keragaman gen pada kopi robusta. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hasil isolasi dan amplifikasi DNA daun kopi robusta dari perkebunan kopi rakyat Pesawaran, Lampung. Isolasi DNA dari 5 sampel daun kopi robusta telah dilakukan mengacu pada protokol kit isolasi DNA dari Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant). Hasil ekstraksi kemudian diamplifikasi menggunakan primer *N-methyltransferase* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Visualisasi hasil ekstraksi dan amplifikasi dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Visualisasi atas hasil ekstraksi telah menunjukkan diperolehnya ekstrak DNA yang baik. Visualisasi atas hasil amplifikasi menunjukkan telah diperolehnya fragmen DNA sepanjang 600bp.

Kata Kunci: *Kopi robusta*, Pesawaran, *n-methyltransferase*, *polymerase chain reaction*

© 2022 Universitas Cokroaminoto palopo

Correspondence Author :
Universitas Lampung

p-ISSN 2573-5163
e-ISSN 2579-7085

PENDAHULUAN

Kopi adalah salah satu tanaman dalam suku Rubiaceae, marga Coffea. Tanaman kopi memiliki daun berbentuk bulat meruncing, batang tegak bercabang (Eskani dkk., 2020), berakar tunggang, dan biji berkeping dua (Rahmawati & Iftitah., 2024). Menurut Eskani dkk. (2020) jenis kopi yang umum ditanam di Indonesia yaitu kopi robusta (*Coffea canephora*), kopi arabika (*Coffea arabica*), kopi excelsa (*Coffea excelsa*) dan kopi liberika (*Coffea liberica*).

Nilai citarasa pada kopi menjadikan kopi banyak dikonsumsi oleh berbagai kalangan masyarakat. Tingginya tingkat konsumsi kopi oleh masyarakat Indonesia juga dibarengi dengan banyaknya usahatani perkebunan kopi di Indonesia. Usahatani perkebunan kopi di Indonesia menjadi salah satu sumber pendapatan bagi masyarakat pembudidaya dan devisa bagi negara. Menurut data Badan Pusat Statistik, pada tahun 2022 Indonesia memproduksi sebanyak 774,96 ton kopi. Daerah yang menjadi penghasil kopi terbanyak yaitu Sumatera Selatan, Lampung, Sumatera Utara, Aceh, dan Bengkulu.

Kopi robusta lebih banyak ditanam karena memiliki produktivitas dan nilai ekonomis tinggi. Usahatani kopi robusta di Lampung banyak dilakukan pada skala perkebunan rakyat. Perkebunan rakyat merupakan perkebunan yang dikelola oleh rakyat atau pekebun dalam skala rumah tangga (BPS, 2023). Kopi robusta memiliki senyawa khas berupa kafein. Sintesis kafein pada kopi robusta terjadi melalui tiga langkah metilasi yang dikatalis oleh tiga *N-Methyltransferase* yaitu *Xanthosine-N-methyltransferase* (XMT),

METODE

Sampel diambil dari lima pohon pada salah satu perkebunan kopi rakyat di Desa Wiyono, Kecamatan Gedong Tataan, Kab. Pesawaran, Lampung. Bagian yang diambil berupa daun muda dari cabang utama yang sehat, bebas dari hama dan penyakit.

Ekstraksi DNA

Sampel daun kopi diekstraksi mengacu pada prosedur ekstraksi kit isolasi DNA dari Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant). Sebanyak 0,1 gram daun kopi robusta dihaluskan menggunakan mortal alu kemudian ditambahkan larutan PBS. Sampel yang telah halus kemudian ditambahkan *buffer* lisis (GP1)

7-methylxanthine-N-methyltransferase

(MXMT),

3,7-dimethylxanthine-N-methyltransferase (DXMT) (Raharimalala dkk., 2021). Gen yang menyandi *N-Methyltransferase* dapat dianalisis secara molekuler melalui proses isolasi dan amplifikasi.

Hasil isolasi dan amplifikasi DNA dapat diketahui kualitas dan kuantitasnya secara molekuler menggunakan elektroforesis dan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Elektroforesis merupakan metode analisis kimiawi untuk memisahkan molekul bermuatan menggunakan medan listrik. Molekul dalam elektroforesis akan bergerak berdasarkan ukuran molekul (Maryam dkk., 2022). Penggunaan elektroforesis dapat memberikan gambaran mengenai kualitas DNA produk PCR. Menurut Mulando (2010) PCR merupakan metode *in vitro* untuk menggandaan fragmen DNA tertentu. Sintesis DNA pada PCR terjadi karena adanya DNA target yang berkomplemen dengan enzim, primer dan komponen lainnya dalam suatu alat *thermo cycle*.

Febriansyah (2024) telah melakukan analisis molekuler kopi robusta di kawasan Kelompok Tani Hutan (KTH) Kabupaten Pesawaran, Lampung. Analisis molekuler kopi robusta pada perkebunan kopi rakyat Lampung belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hasil isolasi dan amplifikasi DNA daun kopi robusta dari perkebunan kopi rakyat Pesawaran, Lampung. Hasil dari penelitian ini diharapkan memberikan informasi dan referensi dalam melakukan analisis molekuler terutama pada kopi robusta

sebanyak 1000 µL. Untuk memisahkan RNA ditambahkan RNase lalu dipanaskan selama 30 menit pada waterbath bersuhu 60°C. Selanjutnya ditambahkan *buffer* GP2 sebanyak 130 µl dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Suspensi sampel dan *buffer* GP2 selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 rpm selama 5 menit. Lisat yang diperoleh kemudian disentrifugasi kembali selama 2 menit pada kecepatan 13.500 rpm untuk menyaring protein dalam lisat. Proses binding dilakukan dengan menambahkan *buffer* GP3 sebanyak 130 µl sebagai pengikat DNA ke dalam *microtube* yang berisi lisat hasil proses ekstraksi. Proses ekstraksi dilanjutkan ke tahap pencucian (*washing*)

dengan menambahkan buffer AW1 sebagai wash *buffer* 1 dan *buffer* AW2. Selanjutnya, suspensi DNA dalam *spin column* dipindah ke tube 2 ml baru, lalu ditambahkan *buffer* elusi sebanyak 100 µl dan disentrifus pada 8.000 rpm selama 1 menit hingga homogen dan mendapatkan DNA yang murni.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan primer *N-Methyltransferase Forward* 5'- ACC TTT CCT TGA ACA ATG CAT ACG -3' dan *Reverse* 5'- AAT CCC CAA TTC AAT CAC CAA ACC -3'. Volume reaksi PCR yaitu PCR *mix* (MyTaq HS Red Mix, 2x, 200 *Reactions* BIO-25047) 10,25 µL, primer *N-methyltransferase forward* dan *reverse* 0,8 µL, DNA template 5 µL, Nuclease Free Water (NFW) 4,15 µL. Profil amplifikasi yang digunakan yaitu *Denaturation* 94°C 1 menit, *Annealing* 62°C 1 menit, *Extention* 72°C 2 menit (Perdana dkk., 2024).

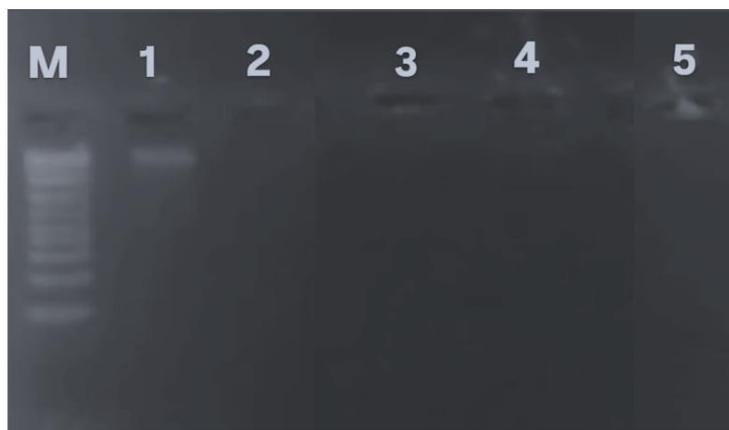
Uji Kualitatif

Hasil ekstraksi dan amplifikasi kemudian divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. 1 gram gel agarosa dilarutkan dalam 100 ml Tris-acetate-EDTA (TAE), kemudian dipanaskan selama 3 menit dalam *microwave*. Selanjutnya larutan ditambahkan SYBR®safe DNA gel stain sebanyak 10 µl lalu dicetak hingga padat pada cetakan gel yang dilengkapi sisir. Sebanyak 6 µl DNA marker yang dijadikan pembanding dimasukkan ke dalam sumuran yang paling awal di bagian kiri. Mesin elektroforesis

dijalankan selama 30 menit pada tegangan 100 V dan kuat arus 300 A. Indikator keberadaan DNA yang diperoleh ditunjukkan dengan munculnya pita fragmen DNA yang jelas dan tebal pada agrosa hasil elektroforesis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi daun kopi robusta divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 1). Visualisasi hasil ekstraksi menggunakan gel agarosa 1% menunjukkan terbentuknya pita tebal pada sampel 1. Sampel 2, 3, 4, 5 menunjukkan pendaran pita yang redup dan tidak jelas. Kuantitas DNA yang dianalisis sangat mempengaruhi terbentuknya pita pada hasil elektroforesis. DNA dengan konsentrasi yang besar akan menghasilkan pita yang tebal dan jelas (Sembiring dkk., 2023). Redupnya visualisasi DNA hasil ekstraksi sampel 2, 3, 4, 5 belum tentu menandakan hasil ekstraksi gagal. Oleh karena itu, perlu dilakukan amplifikasi fragmen DNA menggunakan metode PCR. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan primer *N-methyltransferase*. Hasil amplifikasi kemudian divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Amplifikasi hasil ekstraksi sampel daun kopi robusta menunjukkan pendaran pita DNA yang tebal dan jelas dengan panjang fragmen 600bp (Gambar 2). Keberhasilan amplifikasi ditandai dengan terbentuknya visualisasi pita DNA yang terpisah dengan baik tanpa adanya *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*.



Gambar 1. Visualisasi hasil ekstraksi DNA kopi robusta perkebunan kopi rakyat Wiyono Lampung menggunakan elektroforesis gel agarosa.



Gambar 2. Visualisasi amplicon hasil ekstraksi DNA kopi robusta perkebunan kopi rakyat Wiyono Lampung menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Pembahasan

Ekstraksi DNA merupakan proses mendapatkan DNA murni dari suatu organisme. DNA murni hasil ekstraksi dapat digunakan untuk berbagai analisis molekuler. Data mengenai karakter molekuler suatu organisme bermanfaat dalam pemuliaan tanaman, identifikasi genotip dan identifikasi keragaman genetik. Menurut Sari & Restanto (2022), proses ekstraksi DNA dapat dilakukan secara konvensional dan menggunakan kit komersil. Secara konvensional, DNA diekstraksi menggunakan metode Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). Ekstraksi DNA menggunakan kit komersil umum dilakukan karena pengerjaannya lebih efisien dengan waktu relatif singkat, namun memerlukan biaya yang cukup mahal.

Daun merupakan bagian yang umum digunakan untuk isolasi DNA pada tanaman. Penggunaan daun muda pada penelitian ini dilakukan karena pada daun muda sel penyusunnya masih bersifat meristematik yang aktif membelah saat fase pertumbuhan sehingga memiliki lebih banyak DNA yang dapat diisolasi (Mahadi & Anggraini, 2021). Daun muda juga belum banyak mengandung senyawa metabolit sekunder yang dapat menjadi kontaminan saat proses ekstraksi DNA (Khairani dkk., 2024).

Hasil ekstraksi DNA sampel daun kopi robusta menunjukkan sampel 1 memiliki pita DNA paling jelas dan tebal dari sampel lain. Hal tersebut menandakan bahwa konsentrasi DNA pada sampel 1 lebih tinggi dibandingkan sampel lainnya. Menurut Sadikin dkk. (2021) hasil ekstraksi dengan visual pita DNA yang tebal dan jelas menunjukkan tingginya konsentrasi DNA hasil ekstraksi yang diperoleh. Faktor yang dapat mempengaruhi

tinggi rendahnya konsentrasi DNA hasil ekstraksi yaitu waktu ekstraksi dan komposisi buffer yang digunakan (Emilia & Anhar, 2021).

Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR merupakan proses perbanyakan DNA secara *in vitro* pada siklus berulang sehingga setiap siklusnya menghasilkan duplikat DNA target (Aprilianingsih dkk., 2021). Visualisasi hasil amplifikasi menunjukkan fragmen DNA yang jelas dengan ketebalan berbeda, tidak terdapat *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*. Hal tersebut menandakan bahwa primer yang digunakan menempel sempurna dengan reaksi yang spesifik (Anissa dkk., 2024). *Smear* adalah visual DNA berbentuk garis putih yang memanjang ke bawah, yang dapat disebabkan oleh kurang tepatnya proses ekstraksi dan suhu yang digunakan (Mawardi & Simonapendi, 2016). *Mispriming* adalah keadaan menempelnya primer pada fragmen non target karena kurangnya spesifitas pada primer yang digunakan sehingga menghasilkan produk PCR yang tidak sesuai (Merdekawati & Nurhayati, 2023). Primer *dimer* merupakan produk hasil penempelan antara pasangan primer karena adanya basa nukleotida yang berkompelen (Saraswati dkk., 2019).

Pendekatan molekuler penting dilakukan untuk mengetahui informasi mengenai perbedaan karakter gen suatu organisme. Informasi keragaman karakter plasma nutfah dapat dimanfaatkan untuk program pemuliaan dan konservasi. Untuk dapat mengetahui karakter molekuler, maka diperlukan metode ekstraksi DNA yang tepat agar mendapatkan DNA murni yang dapat digunakan untuk analisis molekuler.

SIMPULAN DAN SARAN

Isolasi dan amplifikasi gen penyandi *N-*

methyltransferase pada kopi robusta dari perkebunan kopi rakyat Pesawaran, Lampung berhasil dilakukan. Uji kualitatif hasil ekstraksi menunjukkan kualitas DNA hasil ekstraksi paling baik yaitu pada sampel 1. Uji kualitatif hasil amplifikasi menunjukkan terbentuknya pita DNA dengan panjang fragmen 600bp. Dalam upaya pemuliaan tanaman dan konservasi selanjutnya perlu dilakukan analisis lebih lanjut mengenai urutan basa nitrogen hasil amplifikasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih terutama ditujukan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Lampung atas Hibah penelitian yang telah diberikan. Selain itu, ucapan terima kasih disampaikan juga kepada Balai Veteriner Lampung atas kerja sama nya dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR RUJUKAN

- Aprilianingsih, R., Wahidah, B. F., dan Hariri, M. R. 2021. Optimasi Suhu Annealing Marka ISSR Sebagai Langkah Awal Dalam Pengejawantahan Keragaman Genetik *Ficus fistulosa* dan *Ficus variegata*. In *Gunung Djati Conference Series*, 6(11): 141-147.
- Badan Pusat Statistik. 2023. Statistik Kopi Indonesia. Statistics Indonesia. 7 (1) 2714-8505.
- Emilia, E., dan Anhar, A. (2021). Optimalisasi Metode Ekstraksi DNA Daun, Kulit Kayu dan Kayu *Pinus merkusii*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pertanian*, 6(4), 766-778.
- Eskani, I. N., Mandegani, G. B., Utamaningrat, I. M. A., dan Sucahyono, A. E. 2020. Pengawetan Kayu Karet (*Havea brasiliensis*) dan Kayu Kopi (*Coffea sp.*) dengan Brotowali (*Tinospora crispa*). *Dinamika Kerajinan dan Batik: Majalah Ilmiah*, 37(2), 185-194.
- Muhammad, F. (2024). Aplikasi Molekuler Dan Analisis Genetik Spesies Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre Ex A. Froehner) Pada Kth Mandiri Jaya, Gapoktanhut Lestari Sejahtera, Kabupaten Tanggamus. Skripsi. Universitas Lampung.
- Khairani, M., Balqis, P., Izza, Y. U., Mutiara, N., dan Rifda. R. 2024. Analisis Jurnal Variasi Genetik Makhluk Hidup Eukariotik. *Jurnal Multidisiplin Ilmu Akademik*, 1(3), 861-871.
- Mahadi, I., dan Anggraini, M. 2021. Using Alternative Buffer for DNA Genomic Isolation In Forest Trees. *Jurnal Penelitian Kehutanan Wallacea*, 10(2), 117-130.
- Maryam, S., Nuryanti, S., dan Rahbuddin, K. E. F. 2022. Karakterisasi Makroskopik dan Mikroskopik Serta Isolasi DNA Isolat Fungi Endofit Daun Ekor Naga (*Rhaphidophora pinnata* LF Schott). *As-Syifaa J Farm*, 14, 139-147.
- Mawardi, A., dan Simonapendi, M. L. 2016. Uji Efektivitas Metode Isolasi DNA Genom Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) asal Kabupaten Jayawijaya. *Jurnal Biologi Papua*, 8(1), 7-12.
- Merdekawati, F., dan Nurhayati, B. 2023. Desain Primer Gen Pengkode RNA Dependent RNA Polimerase (RdRp) untuk Deteksi Sars Cov2 dengan menggunakan *Real Time Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, 15(1), 30-36.
- Raharimalala, N., Rombauts, S., McCarthy, A., Garavito, A., OrozcoArias, S., Bellanger, L., dan Crouzillat, D. 2021. The Absence Of The Caffeine Synthase Gene Is Involved In The Naturally Decaffeinated Status Of *Coffea humblotiana*, A Wild Species From Comoro Archipelago. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14.
- Rahmawati, N. D., dan Ifitah, S. N. 2024. The Effect Of Concentration And Soaking Length Of Aloe Vera Gel On The Growth Of Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Cuttings. *Agrisaintifika: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 8(2), 286-291.
- Sadikin dan Muhammad I. 2021. Optimasi Protokol Ekstraksi DNA Kelapa Sawit (*Elaeis Guineensis* Jacq.) pada Umur Tanaman yang Berbeda: Review." *Agrista: Jurnal Ilmiah Mahasiswa Agribisnis UNS*, 5(1): 1379-1389.
- Saraswati H, Seprianto S, dan Wahyuni F D. 2019. Desain Primer Secara *In Silico* untuk Amplifikasi Gen *cryIII* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 33-38.

Sari, V. K., dan Restanto, D. P. 2022. Review Artikel: Metode Ekstraksi DNA Genom untuk Tanaman Tinggi Kandungan Polisakarida dan Metabolit Sekunder. *Agroteknika*, 5(2), 118-129

Sembiring, E. R., Terryana, R. T., Anggraheni, Y. G. D., Prihaningsih, A., Batubara, I.,

Nurcholis, W., dan Harmoko, R. Efektivitas Metode Ekstraksi DNA pada Daun Segar dan Kering dari Tanaman Obat. *Vegetalika*, 12(3), 211-227.