

Identifikasi Molekular Kekerbatan Genetik Kopi Wamena Berbasis Marka *Random Amplified of Polymorphic DNA (RAPD)*

I MADE BUDI, ARSYAM MAWARDI*

Program Studi Biologi, Fakultas MIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura.

Diterima: 17 September 2020 – Disetujui: 17 Januari 2021

© 2021 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

Baliem Coffee or Wamena Arabica Coffee (*Coffea arabica*) is one of the best coffees in the world with a distinctive aroma, taste and high commercial value. Wamena Arabica coffee germplasm has not been widely reported so it needs to be identified molecularly, for screening purposes and maintaining its quality. This study aims to molecularly identify the genetic relationships of Wamena Arabica Coffee used the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) marker. The stages of this research were sample collection, morphological observation, DNA isolation using the CTAB method, amplification using PCR-RAPD, measuring DNA concentration using a spectrophotometer, and data analysis using UPGMA NTSYS version 2.1. The results of the electroferogram showed that pRAPD1, pRAPD2 and pRAPD5 primers produced a band pattern with high polymorphism as well as indicating the genetic diversity of coffee. Based on dendrogram analysis, samples of *C. arabica* L. were tested on 5 coffee genotypes, obtained 2 groups of coffee, namely Group 1 with only one variety, namely sample (V) Arabica Typica from the Assolokobal region. Group 2 with four varieties, namely (I) Catimor, (II) USDA, (III) PM 88, and (IV) Linies795, from Wollo. Phylogenetic construction produces a similarity coefficient of up to 72%, indicating that the population of Wamena Arabica coffee is closely related. The results of this study have obtained the genetic fingerprint profile of Wamena Arabica Coffee. The advantages of Wamena Coffee in the future can potentially be derived through much more advanced molecular technology.

Key words: Genetic kinship; arabica coffee; molecular markers; RAPD.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan satu-satunya produsen kopi spesialti terbanyak di dunia. Beberapa diantaranya telah dikenal dunia dan menjadi menu *origin café* di kota-kota besar dunia. Kopi yang sudah mulai dikenal salah satunya adalah *Papua Coffee* (AEKI, 2020). *Papua Coffee (Baliem Coffee)* atau yang lebih akrab disebut Kopi Arabika Wamena merupakan salah satu komoditas tanaman yang memiliki prospek secara ekonomi

memiliki nilai jual dan peran strategis yang begitu vital, terutama untuk tujuan ekspor. Berbagai keunggulan kopi arabika selain aroma dan cita rasa yang khas, juga kandungan metabolik sekunder yang tergolong beragam (AEKI, 2020; ICO, 2020; SCAI, 2020). Kopi dari Wamena memiliki cita rasa yang lembut dan pas di lidah. aromanya sangat kuat dan memiliki nuansa floral. Karakter aroma yang jarang dimiliki oleh kopi-kopi Indonesia dari daerah lainnya dan memiliki tekstur yang sangat halus, aroma biji Kopi Arabika Wamena terasa wangi. Memiliki kadar asam dan kafein yang rendah, kopi ini memiliki rasa manis yang organik. Jadi, jangan kaget kalau Kopi Arabika Wamena menjadi salah satu varian termahal di kelasnya (Coffeeland Indonesia, 2020). Wamena merupakan ibu kota Kabupaten

* Alamat korespondensi:

Program Studi Biologi, FMIPA Universitas
Cenderawasih. Jl. Kamp Wolker Perumnas 3, Waena,
Jayapura, Papua. E-mail: mawardiarsyam@gmail.com.

Jayawijaya yang telah dikenal sebagai salah satu produsen kopi arabika, memiliki banyak perkebunan kopi rakyat yang berada pada ketinggian yang ideal pada tanah vulkanik dari yang tidak subur sampai subur, berkapur sampai tidak berkapur.

Produksi kopi dalam setahun mencapai 5.000-10.000 ton biji mentah. Melihat potensi tersebut, pemerintah Provinsi Papua saat ini perlu segera melakukan usaha konservasi agar plasma nutfah kopi arabika elit ini dapat terus tumbuh terpelihara dan berkembang di pegunungan tinggi yang ada di daerah ini. Terdapat beberapa populasi kopi yang terkenal di pasar internasional yang perkebunannya berada di Indonesia seperti *Gayo Mountain Coffee*, *Mandheling Coffee*, *Toraja Coffee* dan *Kalosi Coffee*, *Java Coffee*, *Bali Coffee*, *Aceh Highland Coffee*, *Flores Coffee* dan *Balliem Highland Coffee* atau yang populer disebut Kopi Wamena. Kopi Arabika Wamena yang ditanam pada daerah tertentu menghasilkan aroma dan rasa kopi yang khas dan sangat disenangi masyarakat dunia. Aroma dan cita rasanya yang khas menjadi alasan kopi arabika disebut sebagai kopi spesialti (AEKI, 2020).

Biodiversitas genetik pada *gene pool* kopi Arabika Wamena dikhawatirkan akan terjadi penggerusan, bukan saja akibat persaingan interspesies tapi juga antar spesies akibat adanya pembukaan lahan hutan untuk tanaman budidaya lainnya. Kondisi ini jika dibiarkan terus akan mengarah kepada musnahnya plasma nutfah kopi arabika Wamena yang telah membawa nama harum Jayawijaya (Wamena) dan Indonesia. Selain itu, akan berpengaruh besar dalam perdagangan kopi internasional yang sangat kompetitif.

Proses identifikasi kekerabatan berdasarkan marka morfologi kurang akurat dan hasilnya sangat dipengaruhi lingkungan, sedangkan penggunaan penanda molekular akan mampu mengamati variabilitas genetik suatu populasi pada tingkat DNA. Molekul DNA tidak dipengaruhi lingkungan. Melalui teknik ini akan diperoleh data molekular genetika yang berhubungan dengan kekerabatan dan peruntutan silsilah dari generasi tanaman kopi yang tumbuh secara lengkap dan akurat. Walaupun demikian,

penggunaan metode karakterisasi molekular tetap membutuhkan data dan informasi morfologi tanaman (Aga, 2005).

Hubungan kekerabatan genetik pada tanaman kopi arabika (*Coffea arabica* L.) akan sangat penting untuk program pemuliaan dan usaha konservasi. Teknik penanda molekular ini cukup sederhana tapi mampu menskrining sejumlah besar genom yang diharapkan menjadi penanda jenis dalam identifikasi variasi yang terdapat dalam populasi kopi arabika di Kabupaten Jayawijaya. Metode RAPD merupakan salah satu metode yang banyak digunakan dalam analisis kekerabatan dan keragaman genetik, karena relatif cepat dan lebih mudah. Selain itu, untuk keperluan analisis keragaman, metode RAPD cukup potensial karena mampu menghasilkan karakter dalam jumlah yang tidak terbatas (Hayford *et al.*, 1999; Qosim *et al.*, 2007).

Penanda molekular adalah perangkat umum yang digunakan untuk mengidentifikasi variasi genetik dari berbagai organisme (Irshad & Idrees, 2014). Sebuah penanda DNA dianggap memiliki keunggulan dibandingkan dengan jenis penanda lainnya karena kemampuannya untuk mengidentifikasi individu dengan keandalan dan ketepatan yang tinggi serta tidak terpengaruh oleh perubahan lingkungan. Ada banyak jenis penanda DNA seperti *Amplification Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Simple Sequence Repeat* (SSR), *Random Amplified of Polymorphic DNA* (RAPD) dan *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) (Nadeem *et al.*, 2018). Dalam beberapa penelitian penanda molekular yang umum digunakan yaitu RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) hemat biaya, relatif sederhana dan tidak membutuhkan pengetahuan awal tentang urutan genom. Penanda RAPD sangat disukai untuk menutupi seluruh genom (Baruah *et al.*, 2018).

Hasil studi juga menunjukkan bahwa penanda RAPD tergolong efektif untuk membedakan populasi. Identifikasi kekerabatan genetik secara molekular mengenai kopi arabika Wamena belum begitu banyak dilaporkan, terutama pada tanaman kopi di sentra-sentra produksi kopi di Papua, sehingga penelitian

kekerabatan genetik dengan memanfaatkan penanda molekular RAPD perlu digalakkan sebagai salah satu upaya untuk menganalisis secara molekular, sehingga menjadi basis data molekular kopi arabika Wamena di sentra produksi Jayawijaya. Dengan pertimbangan tersebut, penelitian ini menjadi sangat penting untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Botani, dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Cenderawasih Jayapura. Penelitian dilakukan pada bulan Juni-September 2020.

Preparasi dan Skrining Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel dari beberapa daerah perbukitan dan pegunungan dengan lereng yang curam, tanahnya terbentuk dari batuan sedimen dan metamorf. Daun kopi arabika diperoleh dari perkebunan di Kabupaten Jayawijaya, yakni Distrik Wollo Kampung Wollo, dan Distrik Assolokobal. Hasil identifikasi diperoleh sampel

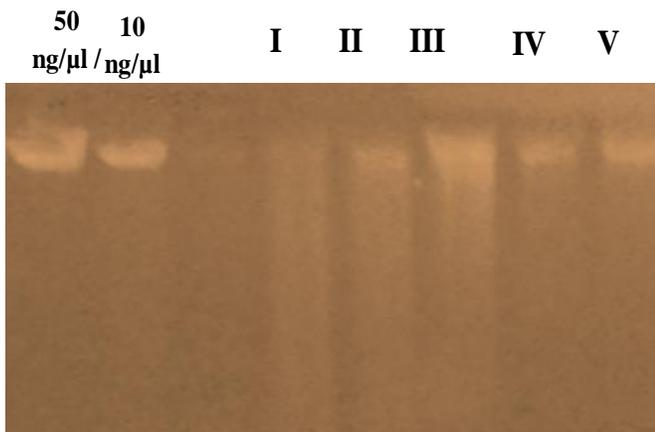
dari jenis Catimor, USDA, PM88, dan Typica.

Sampel diambil dari tanaman Kopi Arabika di Kabupaten Jayawijaya. Organ yang diambil sebagai bahan isolasi DNA dan analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah daun ketiga dari cabang plagiotrop tanaman kopi. Selanjutnya lembar daun muda disimpan dalam termos es berisi *ice pack*. Selanjutnya sampel daun dibawa ke Laboratorium Biologi Universitas Cenderawasih untuk melalui tahapan molekular DNA. Bahan untuk isolasi DNA, yakni daun muda kopi arabika Wamena, nitrogen cair, Kit isolasi DNA genomik, buffer CTAB, etidium bhromida, β -*Mercaptoethanol* 70%, buffer TE, bubuk agarose, *loading dye*. DNA marker. Bahan untuk analisis PCR, DNA taq Polymerase, DNA Sampel, *Nano pure water* dan oligonukleotida Primer.

Isolasi DNA

Sebanyak 250 mg daun segar digerus dalam nitrogen cair dengan mortar dan penambahan 20 mg *polyvinylpyrrolidone* (PVP), 100 mg *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (Khan *et al.*, 2004; George *et al.*, 2008). Bubuk beku kemudian di transfer dalam tube 1,5 mm yang di isi 600 μ l dari 3% *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) dan 5% β -*Mercaptoethanol*, panaskan selama 10 menit pada suhu 65° larutan di inkubasi dalam air selama 30 menit dengan suhu 60°C. Selama inkubasi larutan dibalik beberapa kali dan di tambahkan 600 μ l dari *Chloroform:Isoamyl-alcohol* 24:1 untuk mengikat protein dan di sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 10,000 rpm. Lapisan atas di hilangkan dan di taruh dalam tabung yang lain dengan 600 μ l *Chloroform : Isoamyl-alcohol* 24 : 1.

Larutan dibalik seperti tadi. Lapisan atas diambil dan dimasukan dalam tabung bersih kemudian dicampur dengan 600 μ l isopropanol dingin dan sodium asetat kemudian diletakkan dalam freezer selama 30 menit untuk presipitasi DNA. Sampel disentrifugasi selama 20 menit, supernatan kemudian dibuang tanpa merusak pelet. Selanjutnya dicuci dengan etanol 70% untuk melepaskan sisa supernatan dan beberapa garam larutan. Kemudian disentrifugasi lagi selama 30 menit, supernatan dibuang. Pelet yang tertinggal



Gambar 1. Elektroferogram hasil isolasi DNA genom kopi. Ket.: DNA lambda (λ -DNA) 50 ng/ μ l, dan 10 ng/ μ l, I-V: DNA kopi dari 5 genotip kopi.

dikeringkan untuk membuang residu etanol pelet. Selanjutnya pelet dilarutkan dengan menggunakan *nano pure water* atau TE buffer, larutan DNA disimpan dalam lemari beku -20 °C.

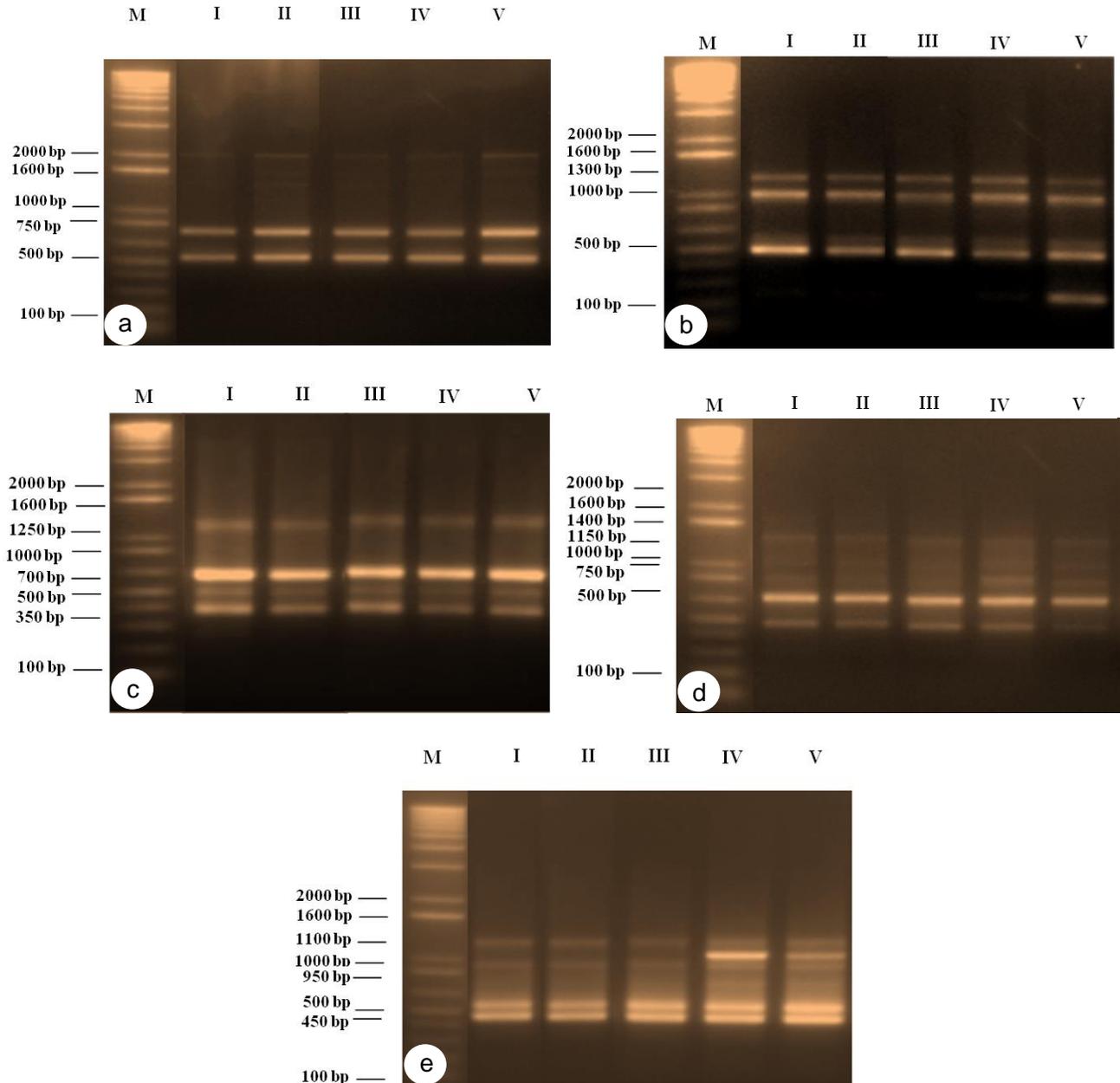
lokal yang diambil dari Wamena. Optimasi PCR dilakukan dengan denaturasi 96 °C selama 1 menit, *anealing* 45- 55 °C, *extention* 72 °C selama 35 siklus (Erlich HA (ed)., 1989).

Optimasi PCR

Marker DNA yang berbeda digunakan untuk mengevaluasi keekerabatan genetik kopi arabika

Penanda Molekular RAPD

Primer PCR yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah lima primer, yaitu: OPG-16



Gambar 2. Elektroferogram amplifikasi dengan berbagai primer. a. primer pRAPD1, b. primer pRAPD2, c. primer PRAPD3, d. PRAPD4, dan e. primer pRAPD5. Ket.: M: DNA lambda (λ -DNA) 50 ng/ μ l, dan 10 ng/ μ l, I-V: DNA kopi dari 5 genotip kopi.

(pRAPD1), OPA-01 (pRAPD2), OPH-02 (pRAPD3), OPN-20 (pRAPD4), OPM-12 (pRAPD5) (Aga, 2005; Hue, 2005; George *et al.*, 2008).

Teknik Pengumpulan data

Pengumpulan data pola pita diperoleh dari uji kualitas dan kuantitas DNA. Untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA maka dilakukan pengecekan dengan menggunakan agarose 1 %, TAE 1X, dan nanopure water pada elektroforesis horizontal. Agarose berfungsi sebagai media dalam elektroforesis.

Pengukuran Konsentrasi DNA

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer.

Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan rumus *Dice*, sedangkan pengelompokan data matriks dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode UPGMA melalui fungsi SIM QUAL pada program NTSYS versi 2.2 (Rohlf, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi DNA Genom Kopi

Hasil isolasi DNA kopi dengan metode CTAB (Khan *et al.*, 2004) menghasilkan larutan kompleks DNA kopi dengan kualitas dan kuantitas yang bervariasi. Kualitas DNA yang dihasilkan dalam penelitian ini ada dua, DNA yang terlihat seperti garis putih tebal yang memanjang ke bawah (*smear*), ini merupakan DNA yang kualitasnya kurang baik. DNA dengan kualitas yang baik terlihat seperti garis putih tebal, tidak memanjang dan berada pada sumur. DNA yang mengalami *smear* kemungkinan disebabkan oleh metode penggerusan sampel yang kurang baik, dan suhu yang tinggi pada saat pemanasan di atas *waterbath*. Kuantitas DNA yang diperoleh bervariasi menunjukkan bahwa konsentrasi stok DNA tersebut sangat tinggi. Hal ini berarti metode yang digunakan untuk isolasi DNA pada tanaman

kopi sudah tepat. Konsentrasi DNA ditentukan dari visualisasi DNA dengan membandingkan ketebalan dan luas permukaan pendaran DNA dibandingkan dengan standard yaitu λ -DNA sebagai pembanding. Konsentrasi dan kualitas DNA yang diperoleh juga banyak dipengaruhi oleh teknik ekstraksi yang digunakan, pengalaman dan tingkat keterampilan dalam menangani proses ekstraksi tersebut (Thieman & Michael, 2013).

Ekstraksi dan Isolasi DNA dilakukan dengan melakukan penggerusan dan menambahkan buffer yang berperan sebagai larutan hipotonis yang nantinya akan menyebabkan sel mengalami hemolisis. EDTA membentuk kompleks ion logam seperti Mg^{2+} sebagai kofaktor DNase. Larutan CTAB akan berikatan dengan kompleks DNA, sedangkan Tris NaCl berfungsi menstabilkan larutan. DNA yang diperoleh belum murni karena masih terdapat protein dan RNA sehingga perlu dibersihkan dengan penambahan RNase yang dapat memecah molekul RNA. Penambahan fenol dan proses sentrifugasi ulang untuk membersihkan protein dan RNA yang tersisa, sekaligus mendapatkan DNA murni. Isolasi DNA kopi arabika menghasilkan DNA murni yang dapat dilihat melalui proses running pada gel agarosa 1%. Proses ini kemudian dinamakan uji kualitas dan kuantitas DNA. Hasil elektroforesis agarosa dari isolasi DNA kopi arabika *C. arabica* (Gambar 1).

Uji kualitas dan kuantitas ini diperlukan sebagai langkah awal sebelum DNA kopi diamplifikasi dengan mesin PCR. Kita perlu mengetahui kondisi DNAnyanya terlebih dahulu karena proses amplifikasi hanya akan berlangsung jika komponen-komponen yang ditambahkan memiliki komposisi yang sesuai, maka dilakukanlah proses elektroforesis pada media gel agarosa, sekaligus untuk melihat apakah hasil isolasi DNA kopi arabika perlu dilakukan pengenceran ataukah telah sesuai dengan standar (Mawardi & Simonapendi, 2016).

Proses pengenceran DNA dilakukan pada sampel DNA yang kuantitasnya lebih besar dari 10 ng/ μ l, dan setelah dilakukan beberapa kali pengenceran dengan menggunakan *nanopure*

water, maka diperoleh konsentrasi DNA yang memenuhi syarat untuk proses amplifikasi PCR, yaitu 10 ng/ μ l. DNA kopi dielektroforesis dan divisualisasi dibawah sinar UV bersama DNA lambda (λ -DNA) sebagai pembanding.

Konsentrasi DNA kopi terlihat dari visualisasi DNA dengan membandingkan ketebalan dan luas permukaan pendaran DNA sampel, dibandingkan dengan DNA lambda (λ -DNA). Hasilnya pun menunjukkan variasi dari segi kualitas dan kuantitas. Gambar tersebut menunjukkan adanya *smear* pada pita DNA kelima sampel yang diujikan. Terjadinya *smear* pada DNA kopi diakibatkan oleh proses ekstraksi yang kurang tepat terutama dalam penggerusan sampel daun kopi. Selain itu, proses pemanasan dengan suhu yang tinggi juga menjadi penyebab terjadinya *smear* (Mawardi & Simonapendi, 2016). Dalam penelitian ini digunakan 10 ng/ μ l DNA dengan volume 1 μ l/reaksi, DNA diamplifikasi dengan menggunakan primer RAPD yang divisualisasikan pada gel agarosa.

Amplifikasi dengan PCR-RAPD

Gambar 2-6 menunjukkan hasil amplifikasi 5 primer RAPD terhadap 5 genotip kopi. Pita yang muncul ada yang tampak jelas dan ada yang kurang jelas, ini terjadi karena materi genetik tersebut tidak memiliki segmen DNA yang bersesuaian dengan primer. Selain itu, kehilangan pita dapat pula diakibatkan karena kesalahan dalam pembuatan *cocktail* PCR. Data profil pita nantinya akan mempengaruhi profil data umum RAPD yang akan berdampak terhadap kelabilan suatu genotip dalam pengelompokan.

Proses amplifikasi DNA berbasis PCR-RAPD melalui 3 prinsip utama yaitu: denaturasi DNA pada suhu 94 °C, *annealing* 32–43 °C dan *ekstension* 72 °C. Proses denaturasi berlangsung pada suhu yang lebih tinggi dari tahap yang lain karena suhu yang tinggi akan memutuskan ikatan hidrogen yang kuat pada DNA yang menjaga kestabilan struktur *double helix*, serta menjadikan DNA kompak dan sulit untuk pelekatan primer. Proses *annealing* memungkinkan melekatnya primer pada segmen DNA yang terbuka, berlanjut pada *extension* melalui penyusunan dNTPs (dATP,

dTTP, dGTP, dCTP). Proses ini dapat berlangsung jika terdapat enzim Taq DNA Polymerase yang bersifat termostabil dan membantu polimerisasi DNA.

Amplifikasi DNA menggunakan lima jenis primer, yakni oligonukleotida pendek yang menempel secara acak (*random*) dalam proses PCR, menghasilkan produk amplifikasi yang berlanjut pada pengujian menggunakan gel elektroforesis horizontal. Hasil amplifikasi menggunakan primer pRAPD terhadap DNA kopi arabika *C. arabica* (Gambar 2).

Pada Gambar 2, amplifikasi dengan primer pRAPD1 menghasilkan 2 pola pita yang berbeda. Pola pita yang pertama terdiri atas 2 pita, berukuran 500 bp dan 750 bp, masing masing sampel III (Arabika PM 88) dan sampel IV (Arabika Linies 795). Pola pita yang kedua terdiri atas 3 pita, berukuran 500 bp, 750 bp, dan 2000 bp yaitu sampel I (Arabika Catimor), sampel II (Arabika USDA), dan sampel V (Arabika Typica). Proses amplifikasi menggunakan primer pRAPD2 terhadap DNA hasil isolasi daun kopi arabika *C. arabica* yang diperlihatkan pada gambar 2 tersebut menunjukkan 2 pola pita yang berbeda. Pola pita yang pertama terdiri atas 3 pita, berukuran 500 bp, 1000 bp, dan 1300 bp, masing-masing adalah sampel I (Arabika Catimor), sampel II (Arabika USDA), sampel III (Arabika PM 88), dan sampel IV (Arabika Linies 795). Pola pita yang kedua adalah pola pita yang terdiri atas 4 pita, berukuran 100 bp, 500 bp, 1000 bp, dan 1300 bp, yang hanya dimiliki oleh satu sampel saja, yakni sampel V (Arabika Typica). Perbandingan jumlah dan pola pita, serta ukuran basa DNA dari hasil amplifikasi menggunakan primer pRAPD3, pRAPD4, dan pRAPD5 (Tabel 1).

Amplifikasi dengan menggunakan primer pRAPD3, dan pRAPD4 masing-masing menghasilkan pola pita yang seragam, sedangkan dengan primer pRAPD5 menghasilkan pola pita yang beragam (Tabel 1). Dengan demikian, polimorfisme profil pita DNA hasil PCR RAPD dengan primer pRAPD1, pRAPD2 dan pRAPD5 adalah tiga primer yang pola pita DNA nya menghasilkan polimorfisme yang bervariasi bila dibandingkan primer 2 lainnya. Berdasarkan

Tabel 1. Perbandingan jumlah pita dan ukuran basa dna hasil amplifikasi menggunakan primer pRAPD3, pRAPD4, dan pRAPD5.

No	Primer	Jumlah pita	Ukuran basa
1.	pRAPD3	4	350 bp, 500 bp, 700 bp, dan 1250 bp
2.	pRAPD4	5	500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1150 bp, 1400 bp
3.	pRAPD5	4	450 bp, 500 bp, 950 bp, 1100 bp
		5	450 bp, 500 bp, 950 bp, 1000 bp, 1100 bp

profil pola pita DNA hasil amplifikasi dari 5 primer, kita dapat menemukan kekhasan kenampakan pita DNA pada sampel V yaitu Arabika Typica. Sifat khas terlihat melalui perbedaan pitanya setelah diamplifikasi dengan semua jenis primer. Ini sejalan dengan teori yang menjelaskan bahwa Arabika Typica adalah jenis arabika tua yang memiliki sifatnya jauh berbeda dengan arabika muda seperti I (Arabika Catimor), II (Arabika USDA), III (Arabika PM 88), IV (Arabika Linies 795). Keempat sampel tersebut bukan merupakan turunan murni dari arabika typica, karena telah mengalami perubahan genetik melalui persilangan dengan beberapa jenis kopi lain.

Profil pita yang dihasilkan oleh primer RAPD (Gambar 2) menunjukkan adanya keragaman jumlah dan ukurannya, sebab RAPD merupakan penanda multi lokus, mengandalkan teknik PCR yang relatif sederhana namun mampu menghasilkan pita yang sangat polimorfik. RAPD meskipun menggunakan primer pendek akan tetapi mudah untuk melekat pada urutan genom komplementer, dan ukuran produk amplikonnya menguatkan adanya polimorfisme dengan pola pita beragam tersebut (Nadeem *et al.*, 2018). Selain itu, primer RAPD menghasilkan beberapa fragmen pita yang biasanya terbentuk pada area yang berbeda dari genom, dengan cara ini beberapa lokus yang beragam dapat terdeteksi dengan cepat (El-Bermawy *et al.*, 2012). Hal ini membuat RAPD digunakan secara luas untuk memperkirakan keragaman genetik pada banyak spesies tumbuhan (Chen *et al.*, 2013).

Elektroferogram hasil amplifikasi semakin meyakinkan bahwa RAPD telah dirancang untuk menunjukkan perbedaan genetik setiap organisme (Issa *et al.*, 2013). Jika penanda ini diaplikasikan untuk proses identifikasi pada organisme dengan skala yang lebih luas, penanda RAPD akan menjadi penanda yang terbaik untuk studi taksonomi populasi serangga (Issa *et al.*, 2013; Slathia *et al.*, 2017). RAPD sangat berguna untuk menemukan pola herediter pada populasi, karena penanda ini dapat mengekspos polimorfisme bagian *noncoding* dari DNA (Jain *et al.*, 2010; Shivashankar *et al.*, 2013). Penanda ini juga dipakai untuk membedakan secara fisik dan alami populasi yang terisolasi (Slathia *et al.*, 2017). Penggunaan teknologi RAPD yang telah dilakukan pada intinya untuk menyelidiki variasi genetik di antara beberapa spesies atau populasi meskipun dengan menggunakan 5 jenis primer pendek dengan urutan nukleotida berbeda. Serangkaian penemuan ini telah memberikan informasi yang sangat berharga untuk pengelolaan plasma nutfah *C. arabica* yang lebih efektif dan berkualitas serta menyiapkan program pemuliaan Kopi Arabika Wamena varietas baru yang berkualitas di masa mendatang.

Profil pola pita yang terbentuk merupakan hasil dari pemanfaatan marka atau penanda molekular dimana penanda molekular sangat membantu untuk membedakan secara akurat dan tepat beberapa varietas. Riset dengan memanfaatkan penanda molekular bertujuan untuk memverifikasi secara informatif mengenai kapasitas dan efektivitas seperangkat penanda molekular dalam membedakan varietas tanaman

Tabel 2. Jarak genetik varietas kopi arabika dengan primer pRAPD1

Varietas	A	B	C	D	E
A	0				
B	0	0			
C	0,2	0,2	0		
D	0,2	0,2	0	0	
E	0	0,25	0,2	0,2	0

Tabel 3. Jarak genetik varietas kopi arabika dengan primer pRAPD2

Varietas	A	B	C	D	E
A	0				
B	0	0			
C	0	0	0		
D	0	0	0	0	
E	0,15	0,15	0,15	0,15	0

Tabel 4. Jarak genetik varietas kopi arabika dengan primer pRAPD3

Varietas	A	B	C	D	E
A	0				
B	0	0			
C	0	0	0		
D	0,14	0,14	0,14	0	
E	0	0	0	0,14	0

Tabel 5. Jarak genetik varietas kopi arabika dengan primer pRAPD4

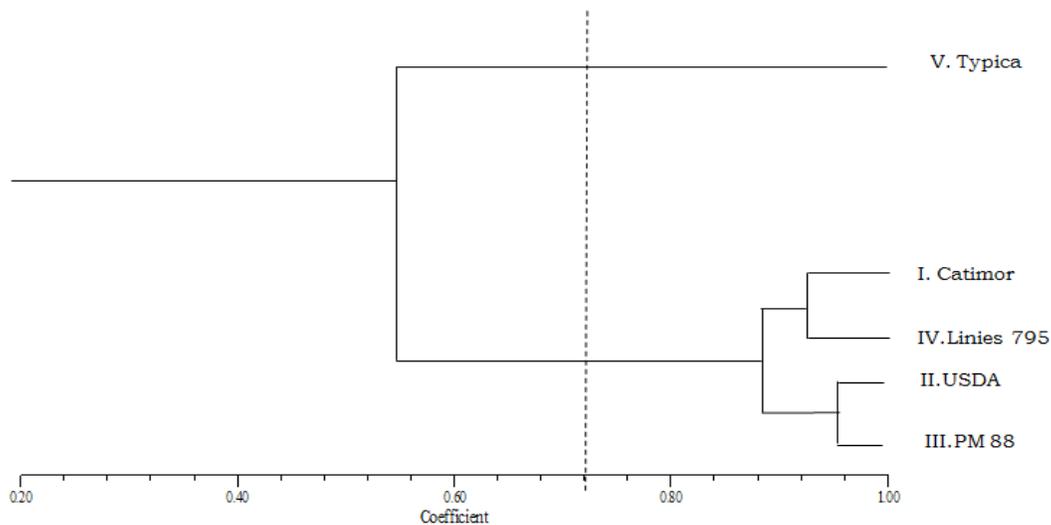
Varietas	A	B	C	D	E
A	0				
B	0	0			
C	0	0	0		
D	0	0	0	0	
E	0,2	0,2	0,2	0,2	0

Tabel 6. Jarak genetik varietas kopi arabika dengan primer pRAPD5

Varietas	A	B	C	D	E
A	0				
B	0	0			
C	0	0	0		
D	0,11	0,11	0,11	0	
E	0,11	0,11	0,11	0	0

C. arabica dengan yang lainnya, berupa basis data profil DNA dan frekuensi alel, menganalisis keragaman genetik dalam populasi, dan

mengeksplorasi kekerabatan genetik (Sousa *et al.*, 2017).



Gambar 3. Dendrogram 5 genotip kopi.

Hasil visualisasi ptofil pita DNA selanjutnya dibuat skor untuk mendapatkan data biner, data tersebut selanjutnya akan dimasukkan dalam program *Microsoft Office Excel 2007*. Data hasil skoring disebut sebagai profil data RAPD. Upaya untuk mengetahui tingkat variasi keragaman genetik varietas kopi, dapat dilakukan melalui perhitungan jarak genetik antara varietas yang satu dengan varietas yang lainnya. Perhitungannya dilakukan secara manual menggunakan rumus Nei & Li (1979). Gambar profil pola pita yang ditunjukkan oleh gambar 2 hingga 6 diterjemahkan dalam bentuk skoring dengan ketentuan nilai 0 (nol) untuk tidak adanya pita dan nilai 1 (satu) untuk adanya pita pada posisi yang sama dari setiap varietas. Semakin mendekati angka 1 nilai jarak genetik, semakin besar variasi keragaman genetik varietas kopi arabika tersebut. Sebaliknya, bila semakin mendekati angka nol, menunjukkan variasi keragamannya semakin kecil atau tidak bervariasi sama sekali. Hasil perhitungan jarak genetik untuk 5 jenis primer (pRAPD1, pRAPD2, pRAPD3, pRAPD4, dan pRAPD5) (Tabel 2).

Analisis kemiripan genetik (*genetic similarity*) (Lee, 1995) dilakukan dengan memasukkan profil pola pita ke dalam program NTSYS pc2.2 (Rohlf, 2009), untuk menentukan hubungan kekerabatan

secara genetik di antara 5 genotip kopi dengan 5 primer penanda. Sementara itu, perhitungan jarak genetik berkaitan erat dengan kesamaan/kemiripan genetik varietas kopi yang satu dengan lainnya. Analisis tersebut digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan secara genetik diantara lima sampel tanaman kopi yang diidentifikasi. Hubungan kekerabatan ini ditampilkan dalam bentuk konstruksi dendrogram melalui program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYSpc 2.1). Dendrogram tersebut dikonstruksi melalui metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical*) pada lima genotip/ varietas yang teridentifikasi dengan lima primer RAPD.

Hasil analisis diperoleh kelompok-kelompok yang tervisualisasikan melalui tiga peluang dendrogram. Munculnya peluang bentuk dari dendrogram ini karena adanya genotip yang belum konsisten dan beberapa faktor seperti: jumlah marka penanda (primer) yang digunakan, pengaruh *missing data*, dan akurasi dalam proses skoring.

Hasil analisis juga memperlihatkan adanya penggolongan genotip yang belum konsisten. Hal ini akan mengakibatkan perbedaan dalam hal pembentukan kelompok (*group*). Hubungan kekerabatan ini ditampilkan dalam bentuk

dendrogram, yang diturunkan dari matriks kemiripan genetik (*genetic similarity*) (Lee, 1995). Berdasarkan penginputan data skoring dari profil pola pita DNA, maka dihasilkan dendrogram (Gambar 3).

Sampel Tanaman kopi yang berjumlah lima genotip dianalisis dengan PCR-RAPD menggunakan lima jenis primer. Pada nilai koefisien similaritas 72% terlihat bahwa kelima kopi yang dianalisis mengelompok menjadi 2 kelompok yang berbeda. Kelompok I terdiri dari 1 varietas yakni (V) Arabika Typica. Kelompok II terdiri atas 4 varietas yaitu (I) Arabika Catimor, (II) Arabika USDA, (III) Arabika PM 88, dan (IV) Arabika Linies 795. Berdasarkan konstruksi dendrogram tersebut, didapatkan bahwa tanaman kopi arabika yang diujikan dalam penelitian ini terbagi ke dalam 2 kelompok. Kelompok pertama berasal dari daerah Assolokobal yaitu sampel Arabika Typica. Sedangkan kelompok kedua berasal dari daerah Wollo. Kedua daerah pengambilan tersebut memiliki potensi sebagai produsen kopi arabika di kabupaten Jayawijaya dengan keragaman genetiknya.

Dendrogram menunjukkan hasil yang sama dengan laporan badan kopi internasional bahwa sampel kopi arabika yang berada di kabupaten Jayawijaya adalah varietas kopi yang tergolong elit. Laporan dari *International Coffee Organization* (ICO) atau badan kopi internasional juga melaporkan bahwa varietas arabika semua musnah di akhir abad ke-18 kecuali varietas typica. Dendrogram menunjukkan bahwa empat varietas, yakni Catimor, USDA, PM 88, dan Linies 795 berada dalam kelompok yang berbeda dengan varietas Typica. Ini menunjukkan bahwa Typica memiliki hubungan kekerabatan yang cukup jauh dengan empat varietas lain. Seperti yang dijelaskan sebelumnya bahwa Arabika Typica adalah jenis arabika tua yang sifatnya jauh berbeda dengan arabika muda yaitu I (Arabika Catimor), II (Arabika USDA), III (Arabika PM 88), dan IV (Arabika Linies 795). Keempat sampel tersebut bukan merupakan turunan murni dari arabika typica, karena telah mengalami perubahan genetik melalui persilangan dengan beberapa jenis kopi lain. Arabika Catimor adalah hasil

persilangan Typica dengan Bourbon, USDA dari persilangan Typica dengan Liberica, Arabika PM 88 dari persilangan Typica dengan USDA, sedangkan Linies 795 adalah hasil persilangan Typica dengan Canephora. Hal tersebut tentu semakin meyakinkan kita bahwa varietas kopi arabika, terkhusus arabika Typica masih terdapat di Kabupaten Jayawijaya. Adanya variasi tersebut disebabkan oleh adanya polimorfisme genetik pada komposisi DNA dari kopi arabika Wamena. Hal tersebut didukung oleh Sousa *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa meskipun jumlah lokus polimorfik adalah sama untuk beberapa kultivar, variabilitas juga ditemukan di dalam populasi mereka.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa hasil elektroferogram memperlihatkan bahwa primer pRAPD1, pRAPD2 dan pRAPD5 menjadi primer yang menghasilkan polimorfisme yang tinggi sekaligus menandakan keragaman genetik sampel kopi arabika *C. arabica* yang diuji. Berdasarkan analisis konstruksi dendrogram, sampel kopi arabika *C. arabica* yang diuji pada 5 genotip kopi, diperoleh 2 kelompok kopi yaitu Kelompok 1 terdiri dari satu varietas yaitu sampel (V) Arabika Typica dari daerah Assolokobal. Kelompok 2 dengan empat varietas yakni sampel (I) Arabika Catimor, (II) USDA, (III) Arabika PM 88, dan (IV) Arabika Linies 795, dari Wollo. Pohon filogenetik (dendrogram) menunjukkan koefisien similaritas sampel kopi arabika *C. arabica* asal Kabupaten Jayawijaya mencapai 72 persen.

DAFTAR PUSTAKA

- AEKI. 2020. *Asosiasi Eksportir dan Industri Kopi Indonesia*. (<http://www.aeki-aice.org/>). Diakses 17 September 2020).
- Agä. 2005. *Molecular genetic diversity study of forest coffee tree (Coffea arabica L.) populations in Ethiopia: implications for conservation and breeding*. [Doctoral Thesis]. Swedish University of Agricultural Sciences. Alnarp. Sweden.
- Baruah, J., S.K. Pandey, T.Begum, N. Sarma, M. Paw, and M. Lal. 2018. Molecular diversity assessed amongst high

- dry rhizome recovery Ginger germplasm (*Zingiber officinale Roscoe*) from NE-India using RAPD and ISSR markers. *Industrial Crops & Products*. 129: 463-471.
- Chen, S.Y., T.X. Dai, Y.T. Chang, S.S. Wang, S.L. Ou, W.L. Chuang, C.Y. Cheng, Y.H. Lin, L.Y. Lin, and H.M. Ku. 2013. Genetic diversity among *Ocimum* species based on ISSR, RAPD and SRAP markers. *Australian Journal of Crop Science*. 7(10): 1463-1471.
- Coffeeland Indonesia. 2020. Arabika Wamena, mengenal kopi daerah ujung timur Indonesia. (<https://coffeeland.co.id/arabika-wamena-mengenal-kopi-daerah-ujung-timur-indonesia/>). Diakses 17 September 2020.
- El-Bermawy, S.M., K.S. Ahmed, H.Z. Al-Gohary, and A.M. Bayomy. 2012. Biochemical and molecular characterization for three subspecies of honey bee worker, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in Egypt. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*. 5 (2): 103-115.
- Erlich, H.A. (Ed). 1989. *PCR Technology: principles and applications for dna amplification*. Stockton Press. New York.
- George, M.L.C., E. Regalado, Li W, M. Cao, M. Dahlan, M. Pabendon, M.L. Warburton, X. Xianchun, and D. Hoisington. 2004. Molecular characterization of asian maize inbred lines by multiple laboratories. *Theor. Appl. Genet.* 109: 80-91.
- Hayford, A.E., A. Petersen, F. Vogensen, and M. Jakobsen. 1999. Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments and *rapd* pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in ghanaiian fermented maize dough. *Appl Environ Microbiol.* 65: 3213-3221.
- Hue, T.T.M. 2005. *Genetic variation in cultivated coffea (Coffea arabica L) accessions New South Wales*. Australia.
- Idrees, M., and M. Irshad. 2014. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *European Academic Research*. 2(1): 1513-1540.
- International Coffee Organization. 2018. *Coffee Market Report Agustus 2020*. (<http://www.ico.org>). Diakses 17 September 2020.
- Issa, M.R.C., V.L.C. Figueiredo, D. De Jong, C.H. Sakamoto, and Z.L.P. Simões. 2013. Rapid method for DNA extraction from the honey bee *Apis mellifera* and the parasitic bee mite *Varroa destructor* using lysis buffer and proteinase K. *Genetics and Molecular Research*. 12(4): 4846-4854.
- Jain, S.K., B. Neekhra, D. Pandey, and K. Jain. 2010. RAPD marker system in insect study: a review. *Indian Journal of Biotechnology*. 9: 7-12.
- Khan, I.A., F.S. Awan, A. Ahmad, and A.A. Khan. 2004. A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22: 89a-89e.
- Lashermes, P., M.C. Combes, J. Cros, P. Trouslot, F. Anthony, and A. Charrier. 2011. Origin and genetic diversity of *Coffea arabica* L. based on DNA molecular markers. *Asic. Colloque Kyoto*. 6: 528-537.
- Lee, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Agronomy*. 55: 265-344.
- Mawardi, A., dan M.L. Simonapendi. 2016. Uji efektivitas metode isolasi DNA genom kopi arabika (*Coffea arabica* L.) asal kabupaten Jayawijaya. *Jurnal Biologi Papua*. 8(1): 7-12.
- Nadeem, M.A., M.A. Nawaz, M.Q. Shahid, Y. Doğan, G. Comertpay, M. Yıldız, R. Hatipoğlu, F. Ahmad, A. Alsaleh, N. Labhane, H. Özkan, G. Chung, and F.S. Baloch. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnology Equipment*. 32(2): 261-285.
- Qosim, W.A., R. Poerwanto, G.A. Wattimena, dan Witjaksono. 2007. Deteksi molekular mutan manggis *in vitro* dengan marka RAPD. *Zuriat*. 18(2): 12-20.
- Rohlf, F.J. 2000. *NTSYS pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.2*. Applied Biostatistic Inc.
- Shivashankar, M., N.M. Guruprasad, and N. Chandan. 2013. Heterogeneity in honeybees populations of india revealed by RAPD analysis. *Journal of Chemical, Biological and Physical Science*. 3(2): 1155-1159.
- Slathia, I., N.K. Tripathi, and V.K. Gupta. 2016. Genetic diversity among bees as detected by random amplified polymorphic DNA marker. *World Journal of Zoology*. 11(3): 148-153.
- Sousa, T.V., E.T. Caixeta, E.R. Alkimim, A.C.B de Oliveira, A.A. Pereira, L. Zambolim, and N.S. Sakiyama. 2017. Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica*. 213(75): 1-15.
- Specialty Coffee Association of Indonesia (SCAI). 2020. *Indonesia dorong ekspor kopi spesialti ke Belanda dan Eropa*. (<https://scai.or.id/>). Diakses 17 September 2020).
- Thieman, W.J., and A.P. Michael. 2013. *Introduction to Biotechnology*. Pearson. New York, USA.