

**DETEKSI GEN *ZEIN* JAGUNG (*Zea mays*) SEBAGAI BAHAN LAIN PADA
SERBUK KOPI ARABIKA (*Coffea arabica*) MENGGUNAKAN PCR *GEL-*
*BASED***

Laporan Tugas Akhir

**Jeane Luthfiyyah
11161090**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

**DETEKSI GEN ZEIN JAGUNG (Zea mays) SEBAGAI BAHAN LAIN PADA SERBUK
KOPI ARABIKA (Coffea Arabica) MENGGUNAKAN PCR GEL - BASED**

Laporan Akhir

Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

Jeane Luthfiyyah
11161090

Bandung, Agustus 2020

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(Soni Muhsinin, M.Si.)



(apt. R. Herni Kusriani, M.Si.)

ABSTRAK

DETEKSI GEN *ZEIN* JAGUNG (*Zea mays*) SEBAGAI BAHAN LAIN PADA SERBUK KOPI ARABIKA (*Coffea arabica*) MENGGUNAKAN PCR *GEL-BASED*

Oleh :

Jeane Luthfiyyah

11161090

Kopi arabika (*Coffea arabica*) merupakan kopi yang berkualitas tinggi serta banyak dikonsumsi di dunia dan membuatnya rentan terhadap pemalsuan produk serbuk kopi arabika menggunakan bahan yang lebih murah salah satunya jagung (*Zea mays*). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen *Zein* jagung pada serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan menggunakan PCR *Gel-based*. Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel kontrol : jagung (*Zea mays*) segar, biji kopi (*Coffea arabica*) segar, dan sampel uji : empat sampel serbuk kopi arabika (*Coffea arabica*) yang ada diperdagangan. Pada penelitian ini teknik PCR dilakukan secara simpleks menggunakan pasangan primer yaitu gen *Zein* jagung dan gen *ClpP* sebagai perwakilan kopi arabika. Hasil dari penelitian ini yaitu diduga pita yang ditunjukkan keempat sampel uji menandakan keberadaan gen *Zein*, namun diduga hanya dua sampel uji yang menunjukkan terhadap gen *ClpP*. Kesimpulannya metode PCR *Gel-Based* dapat digunakan dalam mendeteksi gen *Zein* jagung (*Zea mays*) pada serbuk kopi arabika (*Coffea arabica*) yang ada diperdagangan, dengan hasil elektroforesis gel yang didapatkan yaitu diduga keberadaan gen *Zein* pada semua sampel uji (serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan) yang artinya keempat sampel uji tersebut diduga mengandung bahan lain yaitu jagung.

Kata Kunci : *Coffea arabica*, gen *Zein*, PCR *Gel-Based*, *Zea mays*

ABSTRACT

DETECTION OF ZEIN GENE IN CORN (*Zea mays*) AS ANOTHER MATERIAL IN ARABICA COFFEE POWDER (*Coffea arabica*) WITH GEL-BASED PCR METHOD

By :

Jeane Luthfiyyah

11161090

*Arabica coffee (*Coffea arabica*) is a high-quality coffee and widely consumed in the world and makes it vulnerable to counterfeiting of the arabica coffee powder products using a cheaper material one of which is corn (*Zea mays*). This study aims to detect the Zein gene in corn on the arabica coffee powder with the Gel-based PCR method. The samples used in this study were the sample controls: raw corn (*Zea mays*), raw coffee beans (*Coffea arabica*), and test samples: four samples of arabica coffee powder (*Coffea arabica*) on the market. In this research, the PCR technique was conducted in simplex using the primer pair the Zein gene in corn, and the ClpP gene as the arabica coffee representative. The result of this study is suspected that the band shown by the four test samples signifies the existence of the Zein gene, but suspected only two test samples showed against the ClpP gene. In conclusion, the Gel-Based PCR method can be used in detecting the Zein gene in corn (*Zea mays*) on the Arabica coffee powder (*Coffea arabica*) on the market, with the results of the Gel electrophoresis obtained that is the suspected existence of the Zein gene in all test samples (arabica coffee powder on the market) which means that the four test samples are suspected to contain another ingredient of corn.*

*Keywords: *Coffea arabica*, PCR Gel-Based, *Zea mays*, Zein gene*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'alamiin, segala puji bagi Allah SWT. Yang Maha Pengasih, Maha Pemilik Ilmu dan yang telah memberikan segala rahmat-Nya kepada penulis hingga dapat menyelesaikan laporan tugas akhir yang berjudul **DETEKSI GEN ZEIN JAGUNG (*Zea mays*) SEBAGAI BAHAN LAIN PADA SERBUK KOPI ARABIKA (*Coffea arabica*) MENGGUNAKAN PCR *GEL-BASED*** sebagai salah satu syarat untuk kelulusan program strata satu farmasi. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Rosulullah SAW.

Dalam proses penelitian dan penyusunan laporan tugas akhir ini, tak luput dari adanya dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Orang tua dan keluarga besar yang telah memberikan do'a terbaik, motivasi serta dukungan moril dan materil
2. Bapak Apt. Dr. Entris Sutrisno, S.Farm., MH.Kes sebagai Rektor Bhakti Kencana University
3. Bapak Soni Muhsinin, M.Si sebagai pembimbing utama, Ibu Apt. R. Herni Kusriani, M.Si sebagai pembimbing serta yang telah memberikan ilmu, motivasi, dan banyak masukan.
4. Semua teman-teman Farmasi seperjuangan
5. Semua pihak yang ikut mendukung dan memberikan bantuan yang tidak bias disebutkan satu persatu.

Penulis sadar bahwa laporan tugas akhir ini belum sepenuhnya sempurna, sehingga besar harapan dan doa semoga laporan tugas akhir ini dapat memberikan kebermanfaatan bagi penulis, pembaca dan masyarakat. Serta kritik dan saran dari pembaca sangat diharapkan untuk pengembangan penelitian dalam laporan ini.

Bandung, Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah	2
1.3. Tujuan dan manfaat penelitian.....	2
1.4. Hipotesis penelitian.....	2
1.5. Tempat dan waktu Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>).....	4
2.1.1. Klasifikasi.....	4
2.1.2. Kandungan Senyawa Kopi (<i>Coffea arabica</i>)	5
2.1.3. Khasiat Kopi (<i>Coffea arabica</i>)	6
2.2. Jagung (<i>Zea mays</i>)	6
2.2.1. Klasifikasi.....	7
2.2.2. Kandungan Senyawa Jagung (<i>Zea mays</i>)	8
2.2.3. Khasiat Jagung (<i>Zea mays</i>).....	8
2.2.4. Gen Marker Jagung (<i>Zea mays</i>)	8
2.3. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	9
2.3.1. Komponen PCR.....	9
2.3.2. Tahapan PCR.....	10
2.3.3. Elektroforesis Gel.....	11
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	13
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	14
4.1. Preparasi Sampel.....	14
4.2. Preparasi Primer.....	14
4.3. Isolasi DNA	15

4.3.1. Sampel Kontrol.....	15
4.3.2. Sampel Uji	16
4.4. Amplifikasi DNA.....	16
4.5. Elektroforesis Gel Agarose.....	17
4.6. Analisis Data.....	17
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
5.1. Evaluasi Isolasi DNA.....	18
5.2. Evaluasi Amplifikasi DNA.....	18
5.3. Hasil Elektroforesis Gel.....	20
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN.....	22
6.1. Kesimpulan	22
6.2. Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Buah kopi arabika (<i>Coffea arabica</i>).....	4
Gambar 2.2. Struktur asam klorogenat.....	5
Gambar 2.3. Struktur kafein.....	6
Gambar 2.4. Tanaman <i>Zea mays</i>	7
Gambar 2.5. Buah <i>Zea mays</i>	7
Gambar 2.6. Struktur kimia karoten pada jagung.....	8
Gambar 2.7. Tahapan PCR.....	11
Gambar 2.8. Interpretasi elektroforesis gel pada 400 bp.....	12
Gambar 4.1. Bagan alir prosedur kerja.....	14
Gambar 5.1. Pengaturan suhu dan waktu amplifikasi DNA (primer ClpP).....	19
Gambar 5.2. Pengaturan suhu dan waktu amplifikasi DNA (primer <i>Zein</i>).....	20
Gambar 5.3. Hasil visualisasi elektroforesis gel deteksi jagung pada serbuk kopi arabika.....	20

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil BLAST Primer.....	28
Lampiran 2. Hasil <i>SnapGene Software</i>	30
Lampiran 3. Hasil evaluasi primer	31
Lampiran 4. <i>Certificate Analysis of Primers</i>	32
Lampiran 5. Surat determinasi jagung dan kopi arabika	33
Lampiran 6. Dokumentasi saat penelitian	34
Lampiran 7. Amplikon Sampel Kontrol dan Uji	36

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	MAKNA
Bp	<i>Base pair</i>
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i>
dGTP	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleoside triphosphates</i>
dTTP	<i>Deoxythymidine triphosphate</i>
EB	<i>Elution Buffer</i>
EB	<i>Elution Buffer</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetra acetic</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra Acetic</i>
HPAEC-PAD	<i>High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
Mdpl	<i>Meter diatas permukaan laut</i>
MgCl ₂	<i>Magnesium Klorida</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PB	<i>Project Buffer</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SPME-GC-MS	<i>Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method</i>
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Kopi arabika (*Coffea arabica*) merupakan jenis kopi yang memiliki kualitas tinggi dan banyak dikonsumsi di dunia. Di Indonesia sendiri kopi arabika hanya dapat tumbuh di dataran yang memiliki ketinggian lebih dari 1000 mdpl (Prastowo et al., 2010). Menurut (USDA Foreign Agricultural Service, 2019) Indonesia adalah negara produsen kopi terbesar ke-4 di dunia. Sehingga para produsen kopi arabika Indonesia diharuskan dapat mempertahankan kualitas produk tersebut.

Namun disisi lain pemalsuan kopi arabika rentan terjadi dikalangan produsen yang memaksimalkan keuntungan dengan mengurangi biaya produksi dibandingkan menjaga kualitas produk. Menurut penelitian ada beberapa bahan lain yang lebih murah dan biasa digunakan sebagai adulterant pada kopi, diantaranya kedelai, gandum (Nogueira & Do Lago, 2009; Oliveira et al., 2009; Pauli et al., 2014), jagung, beras (Ferreira et al., 2016), dan sekam (Reis et al., 2013). Karena Indonesia merupakan produsen jagung terbesar di Asia Tenggara (Asean, 2016), sehingga memungkinkan terjadinya pemalsuan produk kopi arabika menggunakan jagung.

Penelitian sebelumnya telah melakukan pendekatan metode secara fisik, kimia, dan biologi dalam mendeteksi adulterant pada kopi. Dalam metode fisik ada beberapa teknik deteksi yang digunakan yaitu *infrared* (Reis et al., 2013), *digital image processing* (Sano et al., 2003), *Mass spectroscopy* (Garrett et al., 2012), *thermal lens* (Fontes et al., 2001), *photothermal* (Fontes et al., 2006), dan ^1H NMR *spectroscopy* (de Moura Ribeiro et al., 2017). Dalam metode spektrometri tersebut salah satunya *infrared* memiliki keunggulan praktis karena cepat dan tidak memerlukan persiapan sampel sebelumnya. Namun dalam metode spektrometri juga memiliki kekurangan yaitu membutuhkan analisis statistik yang rumit dan diperlukannya keahlian khusus. Dan untuk metode secara kimia diantaranya menggunakan HPLC-HPAEC-PAD (Domingues et al., 2014), HPLC-UV (Núñez et al., 2020), HPLC *with fluorescence* (Alves et al., 2009), SPME-GC-MS (Toci & Farah, 2014). Keuntungan dari metode kromatografi tersebut berdasarkan *screening* kimia yang dilakukan pada sampel memungkinkan identifikasi senyawa penanda potensial adulterant. Akan tetapi metode

kromatografi tersebut merupakan teknologi yang sangat mahal dan membutuhkan keahlian khusus (Habza-Kowalska et al., 2019).

Metode alternatif lainnya yang digunakan untuk deteksi adulterant pada kopi selain metode secara fisik dan kimia, ada juga metode secara biologi dengan pendekatan molekular yaitu teknik PCR (Ferreira et al., 2016). Pada saat ini, PCR merupakan teknik alternatif yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi adulterant pada suatu produk makanan (Habza-Kowalska et al., 2019). Karena PCR adalah teknik berbasis DNA maka diperlukan informasi gen marker target untuk dapat mengidentifikasi keberadaan target pada sampel. Dan gen *Zein* merupakan gen yang hanya dapat ditemukan pada jagung (Anderson & Lamsal, 2011). Oleh karena itu, tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk mendeteksi gen marker *Zein* jagung (*Zea mays*) pada serbuk kopi (*Coffea arabica*) yang ada diperdagangan menggunakan PCR *Gel-Based*.

1.2. Rumusan masalah

Apakah metode PCR *Gel-Based* dapat digunakan dalam mendeteksi gen *Zein* jagung (*Zea mays*) pada serbuk kopi arabika (*Coffea arabica*) yang ada diperdagangan.

1.3. Tujuan dan manfaat penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi gen *Zein* jagung (*Zea mays*) pada serbuk kopi arabika (*Coffea arabica*) yang ada diperdagangan menggunakan PCR *Gel-Based*. Dan penelitian ini diharapkan mempunyai manfaat dalam pengembangan deteksi jagung pada serbuk kopi arabika menggunakan PCR.

1.4. Hipotesis penelitian

Metode PCR *Gel-Based* dapat digunakan dalam mendeteksi keberadaan gen *Zein* jagung (*Zea mays*) pada serbuk kopi arabika (*Coffea arabica*) yang ada diperdagangan.

1.5. Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2019 sampai Maret 2020, yang bertempat di Laboratorium Bhakti Kencana University, Jl. Soekarno Hatta No. 754 - Jawa Barat.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

Kopi adalah salah satu komoditas utama yang memiliki wilayah yang cukup luas di Indonesia dan komoditas ekspor yang menjanjikan. Indonesia adalah negara dengan produsen kopi terbesar ke-4 di dunia (USDA Foreign Agricultural Service, 2019). Ada dua jenis kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*). Kopi arabika (*Coffea arabica*) merupakan jenis kopi yang memiliki kualitas tinggi dan banyak dikonsumsi. Di Indonesia sendiri kopi arabika hanya dapat tumbuh di dataran yang memiliki ketinggian lebih dari 1000 meter di atas permukaan laut (mdpl). (Prastowo et al., 2010)



Gambar 2.1. Buah kopi arabika (*Coffea arabica*) (Lim, 2013)

2.1.1. Klasifikasi

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Subkelas : Asteridae

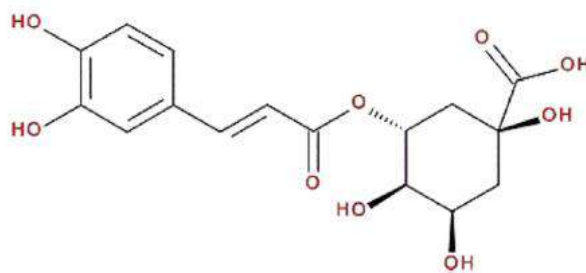
Ordo : Rubiales
 Famili : Rubiaceae
 Genus : *Coffea* L.
 Spesies : *Coffea arabica* L.

(USDA, 2019a)

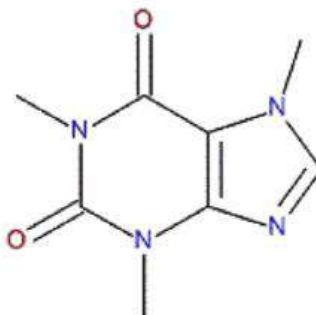
2.1.2. Kandungan Senyawa Kopi (*Coffea arabica*)

Kopi hijau merupakan kopi yang telah di kupas namun belum di panggang (*International Coffee Agreement*). Kopi hijau adalah sumber antioksidan alami yang memungkinkan melindungi tubuh dari radikal bebas. Kopi hijau arabika mengandung 6-7% senyawa polifenol yang merupakan senyawa antioksidan. Senyawa polifenol utama dalam kopi hijau adalah asam klorogenat dengan kadarnya pada kopi arabika yaitu 6-7%. (Perdani et al., 2019)

Selain asam klorogenat kopi juga mengandung beberapa senyawa diantaranya kafein, trigonelin, karbohidrat, lemak, asam amino, asam organik, aroma volatile dan mineral (Farhaty & Muchtaridi, 2014). Senyawa aktif paling berlimpah yang ditemukan dalam kopi yaitu kafein (Hall et al., 2015). Kafein merupakan senyawa metabolit sekunder dari biji kopi dan termasuk kedalam senyawa alkaloid derivate xantin yang mengandung gugus metil (Srikandi & Sutamihardja, 2012).



Gambar 2.2. Struktur Asam Klorogenat (Hall et al., 2015)



Gambar 2.3. Struktur Kafein (Hall et al., 2015)

2.1.3. Khasiat Kopi (*Coffea arabica*)

Kopi banyak mengandung senyawa aktif secara biologis diantaranya polifenol dan alkaloid. Alkaloid yang banyak ditemukan pada kopi yaitu kafein, yang memiliki efek antiinflamasi dan immunosupresan. Sedangkan senyawa polifenol memiliki banyak efek biologis diantaranya efek menguntungkan pada gangguan kardiovaskular dan metabolisme, peradangan dan kanker, stres oksidatif, iskemia serebral, obesitas dan fungsi otak. (Hall et al., 2015)

Terkait dengan otak, polifenol telah terbukti mencegah peradangan saraf (Streit et al., 2004), serta senyawa ini memiliki sifat antioksidan dan kemampuan untuk memodulasi tingkat neurotransmitter seperti serotonin dan noradrenalin (Pathak et al., 2013).

2.2. Jagung (*Zea mays*)

Jagung termasuk kedalam kelompok rumput dengan famili poaceae atau rumput sejati. Jagung adalah tanaman tahunan dengan metabolisme C₄, yang membuatnya efisien dalam fiksasi karbon. Tanaman ini memiliki produksi global terbesar dari setiap spesies tanaman, sekitar 800 juta ton diproduksi diseluruh dunia pada tahun 2013 dan menyumbang 32% dari total produksi sereal. (Scott & Emery, 2015)



Gambar 2.4. Tanaman *Zea mays* (Parle & Dhamija, 2013)



Gambar 2.5. Buah *Zea mays* (Parle & Dhamija, 2013)

2.2.1. Klasifikasi

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Subkelas : Commelinidae
Ordo : Cyperales

Famili : Poaceae

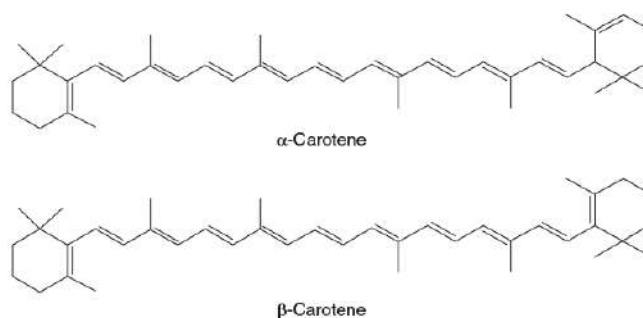
Genus : *Zea* L.

Spesies : *Zea mays* L.

(USDA, 2019b)

2.2.2. Kandungan Senyawa Jagung (*Zea mays*)

Jagung mengandung beberapa senyawa diantaranya yaitu α -karoten dan β -karoten yang termasuk kedalam kelas karoten golongan karotenoid (Luo & Wang, 2012), serta terdapat senyawa fenolik pada batang jagung (Jung et al., 2014).



Gambar 2.6. Struktur kimia karoten pada jagung (Luo & Wang, 2012)

2.2.3. Khasiat Jagung (*Zea mays*)

Dalam beberapa studi tanaman jagung memiliki potensi pada aktivitas farmakologis seperti antioksidan, anti-inflamasi dan efek penghambatan melanogenesis (Ebrahimzadeh et al., 2008; Kim et al., 2010; Wang et al., 2010). Dan untuk senyawa α -karoten dan β -karoten memiliki aktivitas provitamin A dan aktivitas pencegahan kanker (Luo & Wang, 2012).

2.2.4. Gen Marker Jagung (*Zea mays*)

Salah satu gen marker yang sering digunakan dalam penelitian tentang identifikasi jagung adalah gen *Zein*. *Zein* merupakan protein yang hanya ditemukan dalam jagung.

Zein, protein tipe prolamin yang kebanyakan ditemukan di endosperma yang menyediakan nitrogen untuk pertumbuhan jagung kernel selama perkecambahan. (Anderson & Lamsal, 2011)

2.3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode revolusioner yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada 1980-an. PCR didasarkan pada penggunaan kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA komplementer baru pada template. Karena DNA polimerase hanya dapat menambahkan nukleotida ke dalam kelompok 3'-OH yang sudah ada sebelumnya, ia membutuhkan primer yang dapat menambahkan nukleotida pertama. Persyaratan ini memungkinkan untuk menggambarkan wilayah urutan template tertentu yang ingin diperkuat oleh peneliti. Pada akhir reaksi PCR, urutan spesifik akan terakumulasi dalam miliaran salinan (amplikon). (NCBI, 2017)

2.3.1. Komponen PCR

Templat DNA

DNA sampel yang berisi urutan target. Pada awal reaksi, suhu tinggi digunakan pada molekul DNA untai ganda asli untuk memisahkan untai. (NCBI, 2017)

DNA polymerase

Sejenis enzim yang mensintesis untai DNA baru yang saling melengkapi dengan urutan target. Enzim yang paling umum digunakan adalah TaqDNA *polimerase* (dari *Thermus aquaticus*) (NCBI, 2017)

Primer

Potongan pendek DNA untai tunggal yang melengkapi urutan target. Polimerase mulai mensintesis DNA baru dari ujung primer. (NCBI, 2017)

Nukleotida (dNTPs)

Unit tunggal dari basis A, T, G, dan C, yang pada dasarnya adalah "blok bangunan" untuk untai DNA baru. (NCBI, 2017)

Buffer PCR dan $MgCl_2$

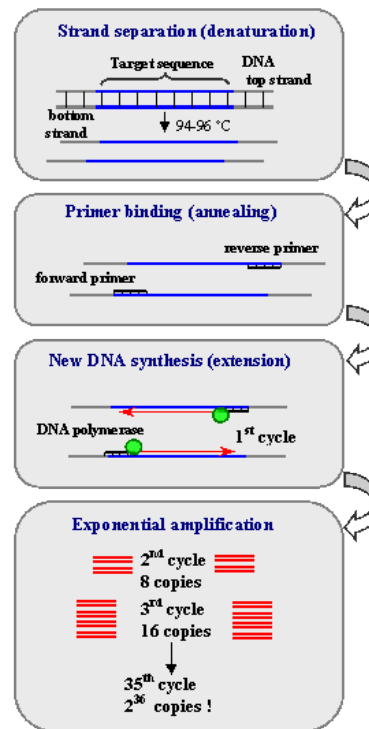
Dalam reaksi PCR dibutuhkan kondisi pH tertentu, maka dari itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Buffer PCR berfungsi untuk menjamin pH medium. Dan selain buffer, dalam reaksi PCR pun diperlukan adanya ion Mg^{2+} , ion tersebut berasal dari $MgCl_2$. $MgCl_2$ ini berperan sebagai kofaktor yang memiliki fungsi dalam menstimulasi aktivitas DNA *polymerase*, dan adanya $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara). Konsentrasi $MgCl_2$ juga berpengaruh pada proses PCR yaitu pada spesifisitas dan perolehan proses. (Handoyo & Rudiretna, 2000)

2.3.2. Tahapan PCR

Tahapan dasar PCR yaitu :

1. Denaturasi ($96^{\circ}C$): Reaksi panas yang kuat dengan tujuan untuk memisahkan, atau mendenaturasi untai DNA, sehingga menjadi untai tunggal.
2. Annealing ($55-65^{\circ}C$): Reaksi pendinginan dengan tujuan primer dapat menempel pada untai tunggal DNA template.
3. Ekstensi ($72^{\circ}C$): Menaikkan suhu reaksi dengan tujuan *Taq polimerase* memperpanjang primer dengan adanya bantuan dari dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai, yang kemudian terjadinya sintesis untaian DNA baru.

(Academy, 2019)



Gambar 2.7. Tahapan PCR (NCBI, 2017)

Siklus pada proses yang ditunjukkan pada **Error! Reference source not found.** yang umumnya memakan waktu 2 - 4 jam, tergantung pada panjang wilayah DNA yang disalin. Jika reaksinya efisien (bekerja dengan baik), wilayah target dapat berubah dari hanya satu atau beberapa salinan menjadi miliaran.

2.3.3. Elektroforesis Gel

Hasil reaksi PCR biasanya divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel. Gel elektroforesis adalah teknik di mana fragmen DNA ditarik melalui matriks gel oleh arus listrik, dan memisahkan fragmen DNA sesuai dengan ukuran. Standar, atau tangga DNA, biasanya disertakan sehingga ukuran fragmen dalam sampel PCR dapat ditentukan. (Khan Academy, 2019)

Fragmen DNA dengan panjang yang sama membentuk "pita" pada gel, yang dapat dilihat oleh mata jika gel tersebut diwarnai dengan pewarna pengikat DNA. Misalnya, reaksi PCR yang menghasilkan fragmen pasangan basa 400 akan terlihat seperti pada gambar 2.8.



Gambar 2.8. Interpretasi elektroforesis gel pada 400 bp (Academy, 2019)

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian yang menggunakan pendekatan kualitatif dengan metode eksperimental. Penelitian ini didesain untuk pengembangan deteksi gen marker jagung (*Zea mays*) pada kopi (*Coffea arabica*) dengan menggunakan PCR *Gel-Based*.

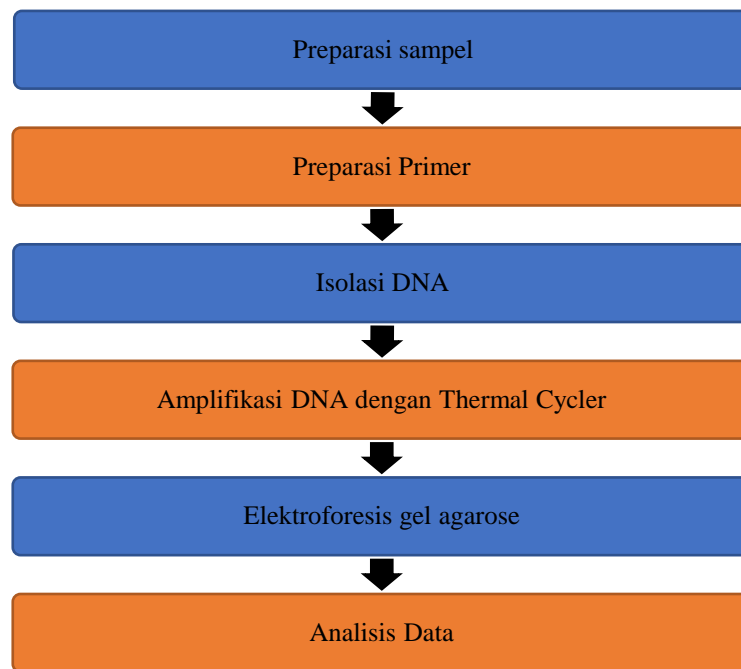
Penyiapan bahan untuk sampel yaitu kopi arabika dalam bentuk biji kopi segar, jagung segar dan serbuk kopi arabika kemasan yang ada di perdagangan.

Tahapan pertama adalah analisis molekular yaitu pemilihan primer yang didapat dari jurnal referensi dan dievaluasi menggunakan *NCBI BLAST software* berbasis web dan *SnapGene software*.

Tahapan kedua yaitu isolasi DNA menggunakan 2 jenis Kit yaitu untuk biji kopi segar dan jagung segar menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) (Promega Corporation, 2019), sedangkan pada sampel serbuk kopi kemasan menggunakan DNeasy mericon Food Kit (Edition, 2014). Hasil isolasi DNA yaitu dalam bentuk DNA murni disimpan pada suhu -20° C.

Tahapan ketiga adalah amplifikasi DNA dengan PCR dan elektroforesis gel agarose dengan hasil berupa pita pada base pair tertentu sebagai analisis kualitatif.

BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN



Gambar 4.1 Bagan alir prosedur kerja

4.1. Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jagung (*Zea mays*) segar, biji kopi (*Coffea arabica*) segar, dan 4 sampel serbuk kopi (*Coffea arabica*) yang ada di perdagangan. Sampel tersebut didapatkan dengan pembelian secara langsung dari supermarket dan toko *online*.

4.2. Preparasi Primer

Pemilihan primer dilakukan dengan beberapa tahap yaitu tahap studi literatur, evaluasi primer dan dilanjutkan dengan pemesanan primer. Studi literatur dalam penelitian ini merujuk pada salah satu jurnal yang kemudian dari hasil yang telah dipilih dilakukan evaluasi primer yaitu dengan dimasukkannya informasi primer yang didapat ke program *tool NCBI BLAST (online)* yang selanjutnya tahap evaluasi oleh *SnapGene software* setelah itu dari urutan primer yang terpilih dicari informasi tentang panjang primer,

%GC, dan *melting temperature* (T_m) yang kemudian dianalisis dan selanjutnya dilakukan pemesanan primer.

T_m adalah suhu di mana separuh dupleks DNA akan berdisosiasi menjadi untai tunggal dan menunjukkan stabilitas dupleks. %GC merupakan nilai yang menunjukkan jumlah G dan C pada primer sebagai persentase dari total basis. Panjang primer menurut *Integrated DNA Technologies* (IDT) berada pada range 18-30 basa dengan amplicon 70-50 bp. (Prediger, 2013)

4.3. Isolasi DNA

4.3.1. Sampel Kontrol

Pada penelitian ini isolasi DNA dari sampel kontrol menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Isolasi dari masing-masing sampel segar dilakukan dengan cara yaitu sampel dimasukkan ke dalam mortir dan ditambahkan nitrogen cair, digerus hingga halus. Selanjutnya 40 mg dari masing-masing sampel ditimbang dan dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL steril kemudian ditambahkan 600 μ L Nuclei Lysis Solution, divortex selama 1-3 detik dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit. Ditambahkan 3 μ L RNase Solution kedalam sel lisat dan tabung dibolak balikkan sebanyak 2-5 kali. Kemudian campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, dan dibiarkan pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya 200 μ L Protein Precipitation Solution ditambahkan dan divortex dengan kecepatan tinggi selama 20 detik. Sampel Disentrifuga pada 14.500 x g selama 3 menit. Supernatan dipindahkan pada tabung mikrosentrifuga 1,5 mL steril baru yang sudah diisi 600 μ L isopropanol dan dikocok secara perlahan. Disentrifuga pada 14.500 x g selama 1 menit pada suhu ruang. Supernatan diambil dan ditambahkan 600 μ L 70% etanol, tabung dibolak balikkan secara perlahan beberapa kali untuk mencuci DNA. Kemudian disentrifuga pada 14.500 x g selama 1 menit pada suhu ruang. Etanol diambil secara perlahan dan pelet dikeringkan dengan cara tabung dibuka dan dibalikkan pada tisu kering dan bersih selama 15 menit. Selanjutnya 100 μ L DNA Rehydration Solution ditambahkan dan diinkubasi pada suhu 4°C semalaman.

4.3.2. Sampel Uji

Pada sampel uji, isolasi DNA yang digunakan berbeda dengan sampel kontrol yaitu menggunakan DNeasy mericon Food Kit (QIAGEN®). Isolasi DNA dari sampel serbuk yaitu dengan 0,2 gram sampel dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL steril, ditambahkan 0,5 mL Food Lysis Buffer, ditambahkan 10 µL proteinase K dan vortex selama 15 detik sampai homogen. Campuran disentrifuga pada kecepatan 1.000 rpm kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 detik dan diamkan pada suhu ruang 30 detik selanjutnya dimasukkan kedalam ice blok selama 10 menit. Disentrifuga pada kecepatan 2.500 x g selama 10 menit, kemudian 350 µL lapisan bening dipindahkan kedalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL steril baru yang telah diisi 250 µL kloroform dan divortex selama 15 detik yang selanjutnya disentrifuga pada kecepatan 14.000 x g selama 15 menit. Diambil 175 µL lapisan bening dan ditambahkan 175 µL buffer PB, kemudian divortex selama 15 detik. Campuran ditempatkan kedalam Qiaquick Spin Column, disentrifuga pada kecepatan 14.500 x g selama 2 menit, kemudian supernatant yang tertampung pada Collection tube dibuang. Ditambahkan 250 µL buffer AW2 dan disentrifuga pada kecepatan 14.500 x g selama 3 menit, supernatant yang tertampung pada Collection tube dibuang. Disentrifuga kembali dengan keadaan Column kosong pada kecepatan 14.500 x g selama 4 menit yang bertujuan untuk mengeringkan membrane. Collection tube dibuang dan ditematkannya Qiaquick Spin Column pada tabung mikrosentrifuga 1,5 mL steril baru. Ditambahkan 30 µL buffer EB dan didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang, kemudian disentrifuga pada kecepatan 14.500 x g selama 2 menit. DNA hasil elusi disimpan pada suhu 20°C, sampai analisis.

4.4. Amplifikasi DNA

DNA 5 µL diamplifikasi dalam Buffer 1X 10 µL, 3,5 µM MgCl₂ 7 µL, 10 µM dNTPs 0,05 µL, 0,25 U/µL Taq polymerase 0,05 µL, dan 0,2 µM primer 0,1 µL. Pengaturan pada PCR Thermal yaitu 95 °C selama 5 menit dan 94°C selama 50 detik (denaturasi), 58°C selama 1 menit (annealing), 72°C selama 50 detik dan 72°C selama 5 menit (elongasi) dengan jumlah 40 siklus untuk primer jagung. Begitupun pengaturan PCR *Thermal* yang menggunakan primer kopi sama dengan pengaturan pada primer jagung

namun yang membedakan adalah dari suhu annealingnya yaitu 50°C selama 1 menit. (Ferreira et al., 2016)

4.5. Elektroforesis Gel Agarose

Amplikon dielektroforesis pada gel 2% yang mengandung 0,5 µL Diamond™ Nucleic Acid Dye dan divisualisasikan menggunakan UV Transilluminator.

4.6. Analisis Data

Hasil dari visualisasi elektroforesis gel agarose ditunjukkan dengan terbentuknya pita pada ukuran 87 bp sebagai verifikasi dari gen *Zein* (jagung) dan pada ukuran 114 bp sebagai gen *ClpP* (kopi arabika). Untuk mengkonfirmasi kedua pita tersebut maka selain sampel produk digunakan pula sampel kontrol yaitu biji kopi segar dan jagung segar. Sehingga pembacaan hasil pita pada sampel produk yaitu berdasarkan ukuran panjang amplikon (bp) dan dibandingkan pula dengan sampel kontrol.

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Evaluasi Isolasi DNA

Analisis elektroforesis gel agarosa yang dapat dilihat pada gambar 5.3 menunjukkan bahwa pada sampel uji pita yang diperoleh memiliki warna yang redup. Hal ini dapat disebabkan karena metode ekstraksi DNA yang digunakan dan pemanasan pada proses pengolahan serbuk kopi arabika tersebut mempengaruhi kualitas DNA yang dihasilkan. Ekstraksi DNA merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan pada metode berbasis PCR (Liao et al., 2017). Dan berdasarkan jurnal (Musto et al., 2013) menjelaskan bahwa perlakuan panas memiliki efek terhadap kualitas DNA yang diekstraksi dari bahan makanan, karena dapat memperpendek panjang fragmen DNA mitokondria dan nuklir.

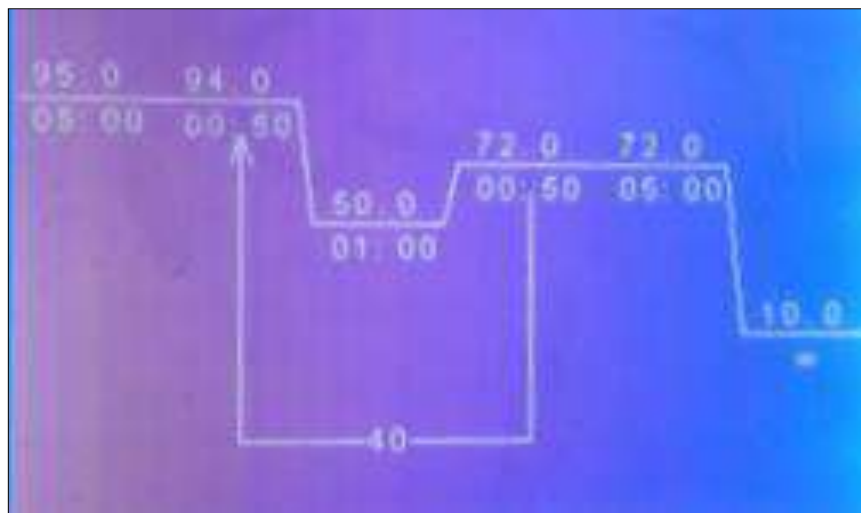
5.2. Evaluasi Amplifikasi DNA

Dalam penelitian ini, sebelum dilakukannya amplifikasi menggunakan PCR perlu adanya preparasi primer. Preparasi primer dari hasil studi literatur yang merujuk pada satu jurnal (Ferreira et al., 2016), didapatkan 2 gen yang akan digunakan dalam penelitian yaitu gen *Zein* dan *ClpP*. Yang kemudian kedua gen tersebut dievaluasi dengan memasukkan informasi dari hasil studi literatur ke program *tool NCBI BLAST (online)* yang ditunjukkan pada Lampiran 1, tahapan ini bertujuan untuk menganalisa kesamaan sekuens dengan spesies lain. Dilanjutkan dengan evaluasi menggunakan *SnapGene software* (Lampiran 2) yaitu untuk memastikan urutan primer yang cocok dengan sekuens yang didapatkan, setelah itu dari urutan primer yang terpilih seperti yang ditunjukkan pada table 5.1, kemudian dicari informasi tentang panjang primer, %GC, dan *melting temperature* (T_m) yang kemudian dianalisis (Lampiran 3). Tujuan dari analisis primer ini adalah untuk menentukan suhu annealing yang cocok yang akan digunakan dalam amplifikasi.

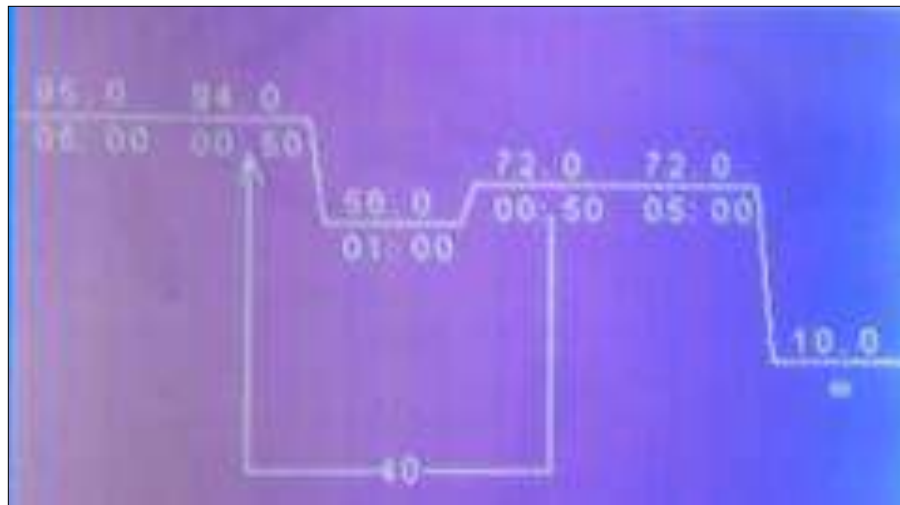
Tabel 5.1. Pasangan Primer dari Jagung dan Kopi Arabika

Organisme	Gen	Nama	Sekuens 5'-3'	Panjang amplikon (bp)	Sumber
Jagung	<i>Zein</i> protein	Zeina1-F	TGG CCA GCT AGC TAC AAC AAA CCG	87	(Ferreira et al., 2016)
		Zeina1-R	GCG GGG TTA GCC GAA AAC TGCT		
Kopi	<i>ClpP</i>	Café1-F	TTC CGA AGT CCT GGA GAG	114	
		Café1-R	CGG AGG ATA TCT CAA TCG		

Dalam amplifikasi DNA, selain konsentrasi dari setiap komponen PCR, pengaturan suhu dan waktu pada tahap denaturasi, annealing dan ekstensi sangatlah penting. Terutama pada tahap annealing, karena tahap ini merupakan salah satu faktor yang akan mempengaruhi hasil penelitian dimana primer spesifik yang digunakan dapat menempel dengan baik atau tidak pada DNA target. Hasil pengaturan yang digunakan dalam amplifikasi DNA pada penelitian ini ditunjukkan oleh gambar 5.1 dan gambar 5.2.



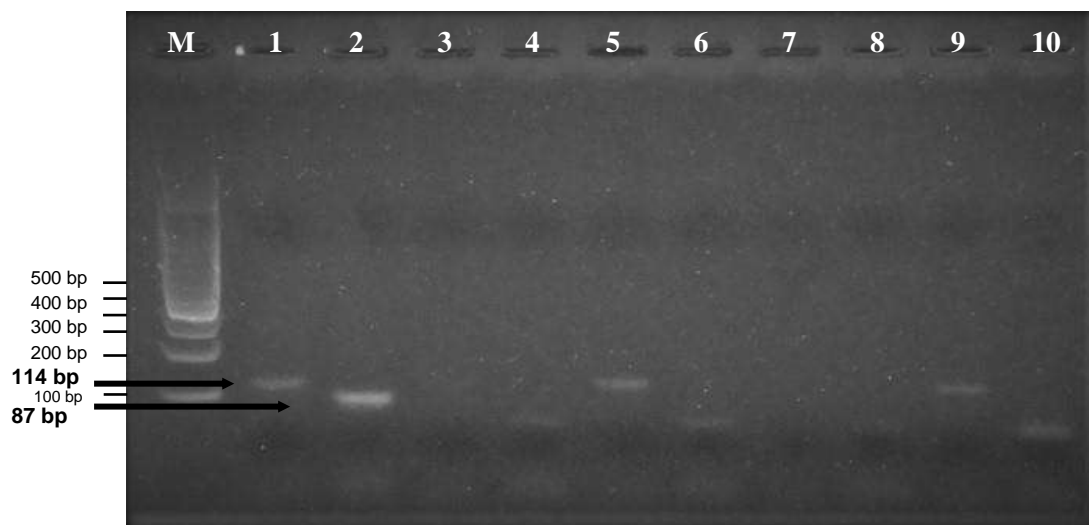
Gambar 5.1. Pengaturan suhu dan waktu amplifikasi DNA (primer ClpP)
Tahap Denaturasi : 95° C selama 5 menit; 94° C selama 50 detik , Annealing : 50° C selama 1 menit dan Elongasi : 72° C selama 50 detik; 72° C selama 5 menit dengan jumlah 40 siklus untuk sampel serbuk kopi arabika kemasan menggunakan primer ClpP (kopi arabika)



Gambar 5.2. Pengaturan suhu dan waktu amplifikasi DNA (primer *Zein*)
Tahap Denaturasi : 95° C selama 5 menit; 94° C selama 50 detik , Anneling : 58° C selama 1 menit dan Elongasi : 72° C selama 50 detik; 72° C selama 5 menit dengan jumlah 40 siklus untuk sampel serbuk kopi arabika kemasan menggunakan primer *Zein* (jagung)

5.3. Hasil Elektroforesis Gel

Hasil dari elektroforesis yang ditunjukkan oleh gambar 5.3 merupakan amplifikasi PCR secara simpleks (tunggal) dengan primer utama yang digunakan adalah pasangan primer *Zein* seperti yang tercantum pada **Error! Reference source not found..** Gen *ein* merupakan gen yang hanya terdapat pada jagung (Anderson & Lamsal, 2011), sehingga primer yang didesain dari sekuen gen *Zein* disebut primer spesifik untuk deteksi keberadaan jagung pada suatu produk.



Gambar 5.3. Hasil visualisasi elektroforesis gel deteksi jagung pada serbuk kopi arabika

Keterangan :

M : 100 bp DNA ladder

1 : Biji kopi arabika segar dengan primer *ClpP*

2 : Jagung segar dengan primer *Zein*

3 : Sampel A serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan dengan primer *ClpP*

4 : Sampel A serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan dengan primer *Zein*

5 : Sampel B serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan dengan primer *ClpP*

6 : Sampel B serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan dengan primer *Zein*

7 : Sampel C serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan dengan primer *ClpP*

8 : Sampel C serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan dengan primer *Zein*

9 : Sampel D serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan dengan primer *ClpP*

10 : Sampel D serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan dengan primer *Zein*

Sampel kontrol : 1 dan 2

Sampel Uji : 3,4,5,6,7,8,9 dan 10

Pada uji kali ini pasangan primer (*Zeina1-F* dan *Zeina1-R*) yang digunakan memiliki ukuran amplikon 87 bp yang akan ditunjukkan oleh sampel kontrol no 2. Untuk pita dengan ukuran amplikon tersebut akan memberikan informasi bahwa pita yang sejajar 87 bp menunjukkan keberadaan gen *Zein* pada sampel. Selain gen *Zein* sebagai gen utama yang dideteksi, digunakan pula gen *ClpP* sebagai perwakilan dari gen spesifik kopi arabika. Pasangan primer gen *ClpP* yang diuji akan menunjukkan amplikon berukuran 114 bp seperti yang tercantum pada table 5.1. Kegunaan gen *ClpP* pada uji ini adalah sebagai kontrol bahwa sampel yang digunakan mengandung kopi arabika atau tidak.

Analisis data hasil amplifikasi secara simpleks yang dielektroforesis gel agarosa pada sampel uji (serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan) menunjukkan pita sejajar 87 bp atau sejajar sampel kontrol maka dapat dikatakan bahwa diduga keberadaan gen *Zein* pada semua sampel uji (gambar 5.3). Artinya semua sampel uji diduga mengandung bahan selain kopi arabika yaitu jagung.

Namun hasil amplifikasi secara simpleks pada sampel uji terhadap keberadaan kopi arabika menunjukkan hasil yang berbeda. Dapat dilihat pada gambar 5.3 tidak semua sampel uji no 3,5,7, dan 9 menunjukkan keberadaan pita dari primer gen *ClpP* karena hanya pada sampel uji no 5 dan 9 diduga menunjukkan pita yang sejajar 114 bp atau sampel kontrol no 1, sedangkan sampel uji no 3 dan 7 diduga tidak menunjukkan keberadaan pita gen *ClpP*. Sehingga dapat dikatakan bahwa sampel uji no 5 dan 9 diduga mengandung kopi arabika, dimana kopi arabika merupakan bahan utama yang seharusnya ada pada semua sampel uji ini.

BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode PCR *Gel-Based* dapat digunakan dalam mendeteksi gen *Zein* jagung (*Zea mays*) pada serbuk kopi arabika (*Coffea arabica*) yang ada diperdagangan, dengan hasil elektroforesis gel yang didapatkan yaitu diduga adanya keberadaan gen *Zein* pada semua sampel uji (serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan) yang artinya keempat sampel uji tersebut diduga mengandung bahan lain yaitu jagung. Sedangkan dari keempat sampel uji tersebut hanya sampel uji no 5 dan 9 yang diduga mengandung kopi arabika.

6.2. Saran

Dari hasil penelitian ini terdapat beberapa saran untuk pengembangan metode PCR *Gel-Based* dalam deteksi jagung pada serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan, yaitu sebagai berikut:

- a. Hasil dari penelitian ini perlu dikonfirmasi kembali dengan menggunakan metode lain seperti spektrofotometer uv-vis.
- b. Untuk penelitian lebih lanjut perlu dilakukannya analisis kuantitatif terhadap hasil isolasi DNA, yang bertujuan untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Academy, K. (2019). *Polymerase chain reaction (PCR)*.
<https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Alves, R. C., Casal, S., & Oliveira, M. B. P. P. (2009). Tocopherols in espresso coffee: Analytical method development and validation. *Food Chemistry*, 115(4), 1549–1555. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.068>
- Anderson, T. J., & Lamsal, B. P. (2011). *Zein Extraction from Corn , Corn Products , and Coproducts and Modifications for Various Applications : A Review*. 88(2), 159–173.
- Asean, M. E. (2016). *Competitiveness of Indonesian ' s Corn in Facing*. Koesrianti 2013. <https://doi.org/10.21082/jp3.v35n2.2016.p89-97>
- de Moura Ribeiro, M. V., Boralle, N., Redigolo Pezza, H., Pezza, L., & Toci, A. T. (2017). Authenticity of roasted coffee using ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 57, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.004>
- Domingues, D. S., Pauli, E. D., De Abreu, J. E. M., Massura, F. W., Cristiano, V., Santos, M. J., & Nixdorf, S. L. (2014). Detection of roasted and ground coffee adulteration by HPLC by amperometric and by post-column derivatization UV-Vis detection. *Food Chemistry*, 146, 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.066>
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of iranian corn silk. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 43–49.
- Edition, F. (2014). *Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies*. November.
- Farhaty, N., & Muchtaridi. (2014). Tinjauan Kimia Dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat Pada Biji Kopi : Review. *Farmaka Suplemen*, 14(1), 214–227. <https://doi.org/10.24198/JF.V15I2.13366>

- Ferreira, T., Farah, A., Oliveira, T. C., Lima, I. S., Vitório, F., & Oliveira, E. M. M. (2016). Using Real-Time PCR as a tool for monitoring the authenticity of commercial coffees. *Food Chemistry*, *199*, 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.045>
- Fontes, A. S., Bento, A. C., Baesso, M. L., & Miranda, L. C. M. (2006). Thermal lens and pH measurements in pure and adulterated brewed coffee. *Instrumentation Science and Technology*, *34*(1–2), 163–181. <https://doi.org/10.1080/10739140500374187>
- Fontes, A. S., Bento, A. C., Miranda, L. C. M., & Baesso, M. L. (2001). Thermal lens evaluation of the presence of adulterants in brewed coffee. *Analytical Sciences*, *17*(January 2014), 526–529.
- Garrett, R., Vaz, B. G., Hovell, A. M. C., Eberlin, M. N., & Rezende, C. M. (2012). Arabica and Robusta coffees: Identification of major polar compounds and quantification of blends by direct-infusion electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(17), 4253–4258. <https://doi.org/10.1021/jf300388m>
- Habza-Kowalska, E., Grela, M., Gryzinska, M., & Listos, P. (2019). Molecular techniques for detecting food adulteration. *Medycyna Weterynaryjna*, *75*(7), 404–409. <https://doi.org/10.21521/mw.6261>
- Hall, S., Desbrow, B., Anoopkumar-Dukie, S., Davey, A. K., Arora, D., McDermott, C., Schubert, M. M., Perkins, A. V., Kiefel, M. J., & Grant, G. D. (2015). A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. *Food Research International*, *76*, 626–636. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.027>
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2000). Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. *Unitas*, *9*(1), 17–29.
- Jung, Y. J., Park, J. H., Seo, K. H., Shrestha, S., Lee, D. S., Kim, Y. C., Kang, H. C., Kim, J., & Baek, N. I. (2014). Phenolic compounds from the stems of *Zea mays*

- and their pharmacological activity. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(3), 379–385. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4104-2>
- Kim, M. J., Kim, S. M., Im, K. R., & Yoon, K. S. (2010). Effect of hydroxycinnamic acid derivatives from corn bran on melanogenic protein expression. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 53(4), 422–426. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.065>
- Liao, J., Liu, Y. F., Ku, T., Liu, M. H., & Huang, Y. (2017). *Qualitative and quantitative identification of adulteration of milk powder using DNA extracted with a novel method*. 1657–1663. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11900>
- Lim, T. K. (2013). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 5, Fruits. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 5, Fruits* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5653-3>
- Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Bioactive Compounds in Corn. *Cereals and Pulses: Nutraceutical Properties and Health Benefits*, 85–103. <https://doi.org/10.1002/9781118229415.ch7>
- Musto, M., Faraone, D., & Musto, E. (2013). *Changes of DNA quality and meat physicochemical properties in bovine supraspinatus muscle during microwave heating*. October. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6441>
- NCBI, N. C. for B. I. (2017). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- Nogueira, T., & Do Lago, C. L. (2009). Detection of adulterations in processed coffee with cereals and coffee husks using capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 32(20), 3507–3511. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900357>
- Núñez, N., Collado, X., Martínez, C., Saurina, J., & Núñez, O. (2020). Authentication of the origin, variety and roasting degree of coffee samples by non-targeted HPLC-UV fingerprinting and chemometrics. Application to the detection and quantitation of adulterated coffee samples. *Foods*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030378>

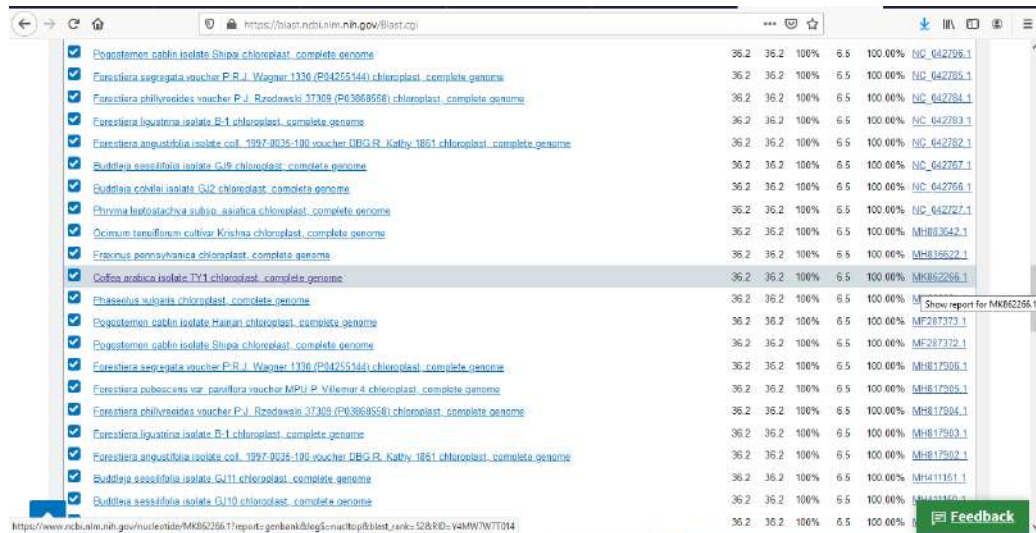
- Oliveira, R. C. S., Oliveira, L. S., Franca, A. S., & Augusti, R. (2009). Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(3), 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.015>
- Parle, M., & Dhamija, I. (2013). Zea Maize: a Modern Craze. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(6), 39–43. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04609>
- Pathak, L., Agrawal, Y., & Dhir, A. (2013). Natural polyphenols in the management of major depression. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(7), 863–880. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.794783>
- Pauli, E. D., Barbieri, F., Garcia, P. S., Madeira, T. B., Acquaro, V. R., Scarminio, I. S., da Camara, C. A. P., & Nixdorf, S. L. (2014). Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat. *Food Research International*, 61, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.032>
- Perdani, C. G., Pranowo, D., & Qonitatilah. (2019). Total phenols content of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) in East Java. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012093>
- Prastowo, B., Karmawati, E., Rubijo, Siswanto, Indrawanto, C., & Munarso, S. J. (2010). *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. [sidolitkaji.litbang.pertanian.go.id > files > BudidayadanPascapanenKopi](http://sidolitkaji.litbang.pertanian.go.id/files/BudidayadanPascapanenKopi)
- Prediger, E. (2013). *How to design primers and probes for PCR and qPCR*. <https://sg.idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes>
- Promega Corporation. (2019). Technical Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit. *Technical Bulletin*, 1–19. www.promega.com
- Reis, N., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2013). Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier

- Transform Spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 715–722.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.016>
- Sano, E. E., Assad, E. D., & Cunha, S. A. R. (2003). Quantifying adulteration in roast coffee powders by digital image processing. *Journal of Food Quality*, 26(2), 123–134. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2003.tb00232.x>
- Scott, M. P., & Emery, M. (2015). Maize: Overview. In *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition* (2nd ed., Vols. 1–4, Issue 2). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00022-X>
- Srikandi, A. W. K., & Sutamihardja, R. (2012). *Tingkat kematangan biji kopi Arabica (Coffea arabica L.) dalam menghasilkan kadar kafein.*
- Streit, W. J., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2004). Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation*, 1, 1–4. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-14>
- Toci, A. T., & Farah, A. (2014). Volatile fingerprint of Brazilian defective coffee seeds: Corroboration of potential marker compounds and identification of new low quality indicators. *Food Chemistry*, 153, 298–314.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.040>
- USDA. (2019a). *Classification for Kingdom Plantae Down to Genus Coffea L.*
<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=COFFE>
- USDA. (2019b). *Classification for Kingdom Plantae Down to Species Zea mays L.*
<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ZEMA>
- USDA Foreign Agricultural Service. (2019). Coffee: World Markets and Trade. *Coffee: World Markets and Trade*, April, 1–9.
<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>
- Wang, Y., Liu, Y. Y., Yang, X. H., Chen, D., Peng, C., & Wang, G. S. (2010). A new flavonoid from the bract of Zea mays L. *Chinese Chemical Letters*, 21(11), 1350–1351. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2010.06.033>

LAMPIRAN

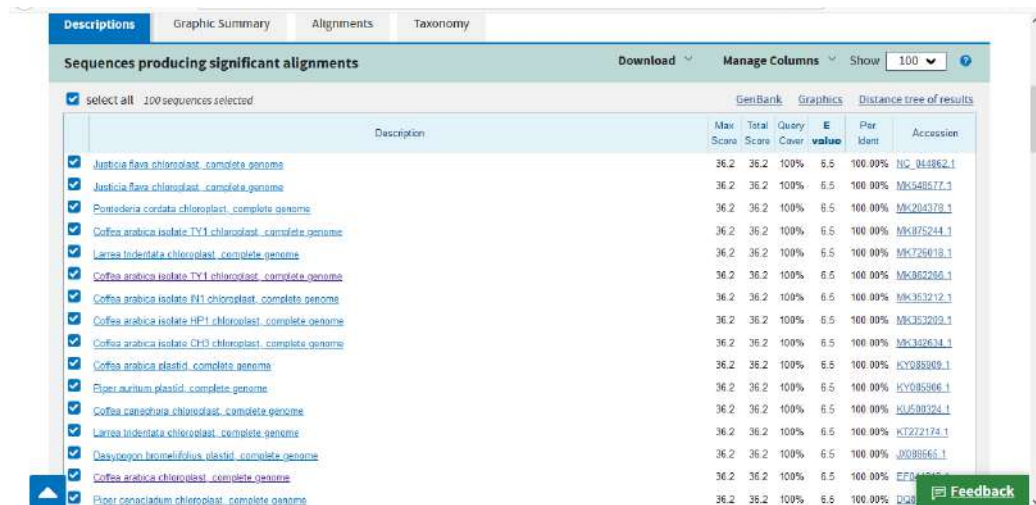
Lampiran 1. Hasil BLAST Primer

Kopi arabika (Coffea arabica)



Species	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Pogostemon cablin isolate Shiga chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_042736.1
Forstiera sagragata voucher P.R.J. Wagner 1136 (P34255144) chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_042785.1
Forstiera phillyroides voucher P.J. Razadawin 37308 (P63868556) chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_042784.1
Forstiera ligustrina isolate R-1 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_042783.1
Forstiera angustifolia isolate coll. 1997-9036-190 voucher D.B.G.R. Kathy 1851 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_042782.1
Buddleia sessilifolia isolate G.19 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_042787.1
Buddleia coccinea isolate G.12 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_042786.1
Phytolacca frutescens subsp. asiatica chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_042727.1
Ocimum tenuiflorum cultivar Krishna chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH813642.1
Fraxinus pennsylvanica chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH818622.1
Coffea arabica isolate TY1 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK852266.1
Phaseolus vulgaris chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH817505.1
Pogostemon cablin isolate Hainan chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MF287373.1
Pogostemon cablin isolate Shiga chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MF287372.1
Forstiera sagragata voucher P.R.J. Wagner 1136 (P34255144) chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH817506.1
Forstiera pubescens var. parviflora voucher MPU P. Vilemar 4 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH817505.1
Forstiera phillyroides voucher P.J. Razadawin 37308 (P63868556) chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH817504.1
Forstiera ligustrina isolate R-1 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH817503.1
Forstiera angustifolia isolate coll. 1997-9036-190 voucher D.B.G.R. Kathy 1851 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH817502.1
Buddleia sessilifolia isolate G.11 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH811161.1
Buddleia sessilifolia isolate G.10 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MH811160.1

Gambar Hasil BLAST Primer *Forward*



Species	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Justicia flava chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	NC_044862.1
Justicia flava chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK548577.1
Pontederia cordata chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK204379.1
Coffea arabica isolate TY1 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK187524.1
Larrea tridentata chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK726618.1
Coffea arabica isolate TY1 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK362260.1
Coffea arabica isolate IN1 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK363212.1
Coffea arabica isolate HP1 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK363209.1
Coffea arabica isolate CH3 chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	MK363204.1
Coffea arabica plastid complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	KY083909.1
Piper auritum plastid complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	KY083906.1
Coffea canephora chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	KU509324.1
Larrea tridentata chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	KT221714.1
Dasyatis bomeloides plastid complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	J008866.1
Coffea arabica chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	EF041515.1
Piper cenacanthum chloroplast complete genome	36.2	36.2	100%	6.5	100.00%	DQ911111.1

Gambar Hasil Primer BLAST Primer *Reverse*

Jagung (*Zea mays*)

Sequences producing significant alignments

select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Zea mays zein mRNA complete cds	48.1	48.1	100%	0.003	100.00%	M80837.1
Parambassis ranja genome assembly chromosome 10	40.1	72.4	83%	0.83	100.00%	LR121361.1
Zea mays alpha zein pseudogene (z1D_2) non-coding RNA	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	NR_153438.1
Zea mays clone 881947 hypothetical protein mRNA complete cds	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	FJ976106.1
Zea mays alpha zein (z1D_1) mRNA	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	U01149063.1
Zea mays clone 1285334 hypothetical protein mRNA complete cds	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	FJ952647.1
Zea mays clone 1284334 hypothetical protein mRNA complete cds	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	FJ952608.1
Zea mays clone FL011043809 c mRNA sequence	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	BT017637.1
Zea mays clone Contig268 mRNA sequence	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	BT016835.1
Zea mays clone Contig322 mRNA sequence	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	BT016489.1
Zea mays 19kD alpha zein G4 pseudogene mRNA sequence	40.1	40.1	83%	0.83	100.00%	AF371273.1
Contiguous genomic DNA sequence comprising the 19 kDa zein gene family from Zea mays complete sequence	40.1	80.3	83%	0.83	100.00%	AF546188.1
Coregonus sp. 'balcheni' genome assembly chromosome 38	38.2	380	96%	3.3	100.00%	LR654381.1
Coregonus sp. 'balcheni' genome assembly chromosome 37	38.2	332	87%	3.3	100.00%	LR654380.1
Coregonus sp. 'balcheni' genome assembly chromosome 31	38.2	328	87%	3.3	100.00%	LR654374.1
Coregonus sp. 'balcheni' genome assembly chromosome 29	38.2	337	91%	3.3	100.00%	LR654373.1

Gambar Hasil BLAST Primer *Forward*

Sequences producing significant alignments

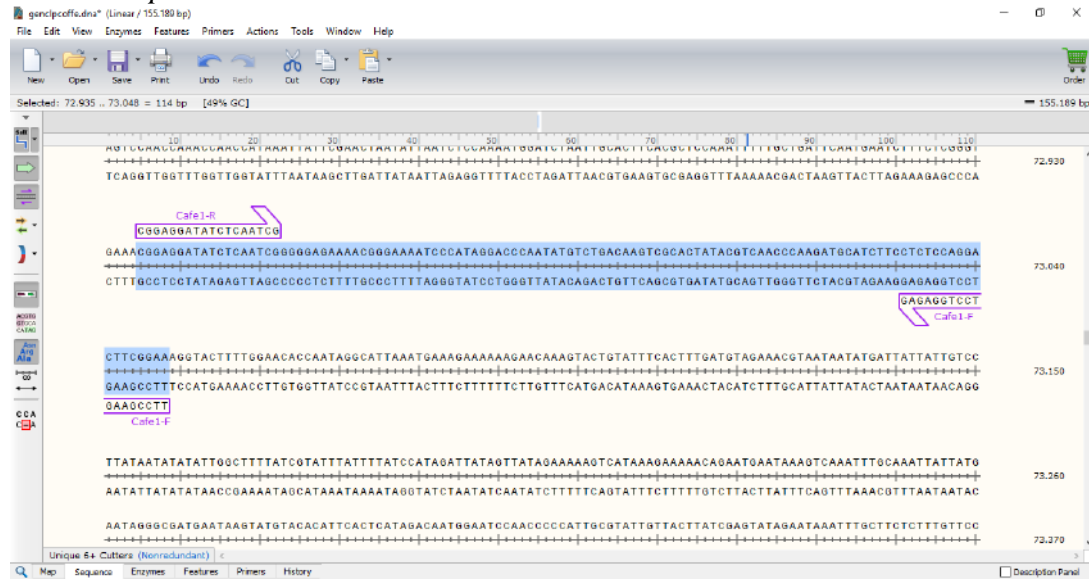
select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Zea mays zein mRNA complete cds	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	M80837.1
Kosmoscoccus olearia TBF 19.5.1 complete genome	38.2	38.2	86%	1.6	100.00%	CP001634.1
Trichoderma asperillum CBS 433.97 hypothetical protein (M41DRAFT_127875) partial mRNA	36.2	36.2	81%	6.5	100.00%	XM_024898953.1
Zea mays alpha zein pseudogene (z1D_6) non-coding RNA	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	NR_153777.1
Zea mays clone Contig19 mRNA sequence	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	BT016186.2
Zea mays clone Contig24 mRNA sequence	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	BT016191.2
Verrucomicrobium bacterium IMCC26134 complete genome	36.2	36.2	81%	6.5	100.00%	CP011265.1
Zea mays full-length cDNA clone 7H BFB0291H08 mRNA complete cds	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	BT089792.1
Zea mays clone 996227 hypothetical protein mRNA complete cds	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	FJ977011.1
Zea mays clone 882183 hypothetical protein mRNA complete cds	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	FJ976416.1
Zea mays clone 1421098 hypothetical protein mRNA complete cds	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	FJ953482.1
Zea mays clone 1414419 hypothetical protein mRNA complete cds	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	FJ953480.1
Zea mays clone 1406421 hypothetical protein mRNA complete cds	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	FJ953193.1
Zea mays clone 1292548 hypothetical protein mRNA complete cds	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	FJ953236.1
Zea mays alpha zein (z1D_4) mRNA	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	U01149063.1
Zea mays clone 1281475 mRNA sequence	36.2	36.2	100%	6.5	95.45%	FJ953482.1

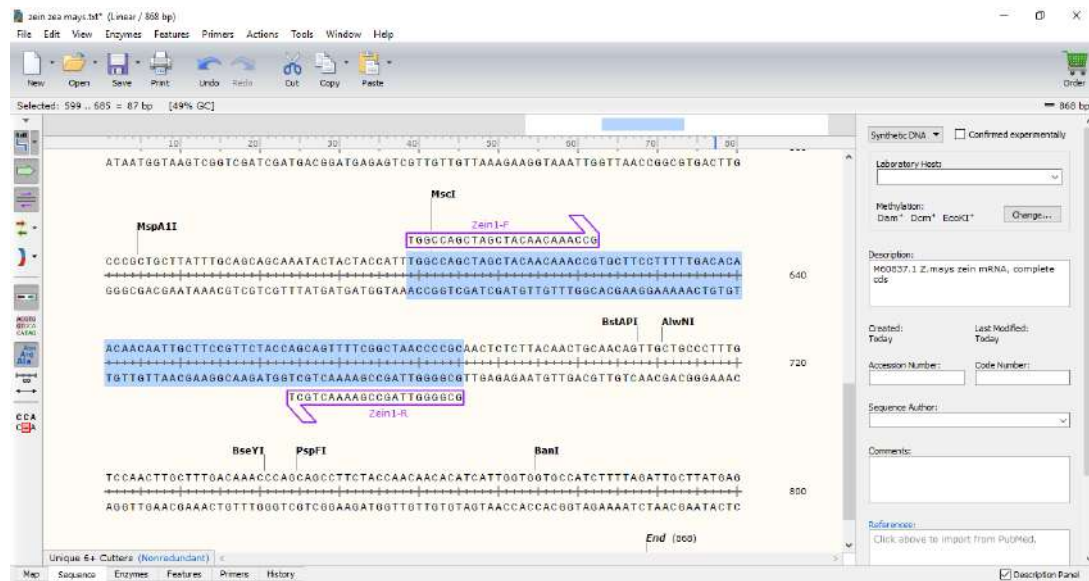
Gambar Hasil Primer BLAST Primer *Reverse*

Lampiran 2. Hasil *SnapGene* Software

a. Gen *ClpP*



b. Gen *Zein*



Lampiran 3. Hasil evaluasi primer

Hasil Evaluasi Primer *ClpP*

Left / Forward : TTC CGA AGT CCT GGA GAG

Right / Reverse : CGG AGG ATA TCT CAA TCG

Software	Primer	Panjang	%GC	Tm Melting Temperature
http://www.sciencelancer.com/oligocalc.html	Left	18	56	50
	Right	18	50	48
http://biotools.nubio.northwestern.edu/OligoCalc.html	Left	18	56	50,3
	Right	18	50	48


Hasil Evaluasi Primer *Zein*

Left / Forward : TGG CCA GCT AGC TAC AAC AAA CCG

Right / Reverse : GCG GGG TTA GCC GAA AAC TGCT

Software	Primer	Panjang	%GC	Tm Melting Temperature
http://www.sciencelancer.com/oligocalc.html	Left	24	54	59
	Right	22	59	59
http://biotools.nubio.northwestern.edu/OligoCalc.html	Left	24	54	59
	Right	22	59	58,6

Lampiran 4. Certificate Analysis of Primers



macrogen

Heince Santoso

Rukan Mudiara Taman Palem Blok E3 No.9 Cengkareng Jakarta

Rukan Mudiara Taman Palem Blok E3 No.9 Cengkareng Jakarta

11730

OG191223 - 187

Order date : 2019/12/23

Packing date : 2019/12/24

Page : 5/8

Oligo	ClpP - F								
SEQ	5'-TTG CGA AGT CCT GGA GAG-3' (18mer)								
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)			
	calculated	measured	OD	nmol					
55.56	5539.6	5535.6	6.4	32.0	0.05	56.1			
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification					
320.0		MOPC							

Oligo	ClpP - R								
SEQ	5'-CGG AGG ATA TCT CAA TCC-3' (18mer)								
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)			
	calculated	measured	OD	nmol					
50.0	5523.6	5519.9	6.5	32.0	0.05	53.9			
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification					
320.0		MOPC							

Oligo	Zein_protein - F								
SEQ	5'-TGG CCA GCT AGC TAC AAC AAA CCG-3' (24mer)								
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)			
	calculated	measured	OD	nmol					
54.17	7315.8	7309.3	8.1	30.0	0.05	67.0			
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification					
300.0		MOPC							

Oligo	Zein_protein - R								
SEQ	5'-GCG CGG TTA GCC GAA AAC TGC T-3' (22mer)								
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)			
	calculated	measured	OD	nmol					
59.09	6800.4	6790.6	7.3	30.0	0.05	65.9			
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification					
300.0		MOPC							

Lampiran 5. Surat determinasi jagung dan kopi arabika



INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG

SEKOLAH ILMU DAN TEKNOLOGI HAYATI

Jalan Ganesha 10 Bandung 40132, Telp: (022) 251 1575, 250 0258, Fax (022) 253 4107
e-mail : sith@itb.ac.id http://www.sith.itb.ac.id

Nomor : 540/II.CO2.2/PL/2020.
Hal : Determinasi tumbuhan

30 Januari 2020

Kepada Yth.
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Bhakti Kencana
Jalan Soekarno Hatta No. 754
Bandung

Memperhatikan surat permintaan Saudara dalam surat No. 0134/03.FF/UBK/I/2020 tanggal 23 Januari 2020 mengenai determinasi tumbuhan, dengan ini kami sampaikan bahwa setelah dilakukan determinasi oleh staf kami, tumbuhan yang dibawa oleh Sdr. Jeane Luthfiyyah (NPM: 11161090), adalah :

No	Sampel	Hasil determinasi	Famili
1.	Jagung	<i>Zea mays</i> L.	Poaceae (Graminae)
2.	Kopi arabica	<i>Coffea arabica</i> L.	Rubiaceae

Referensi:

1. Backer, C.A. & Bakhuizen van den Brink, Jr. R.C. 1965. Flora of Java. Volume II. N.V.P. Noordhoff – Groningen, the Netherlands. pp. 322.
2. Backer, C.A. & Bakhuizen van den Brink, Jr. R.C. 1968. Flora of Java. Volume III. N.V.P. Noordhoff – Groningen, the Netherlands. pp. 625.
3. Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York. pp. Xiii – Xviii.

Demikian yang kami sampaikan. Atas perhatian dan kerjasama yang diberikan, kami ucapkan terima kasih.

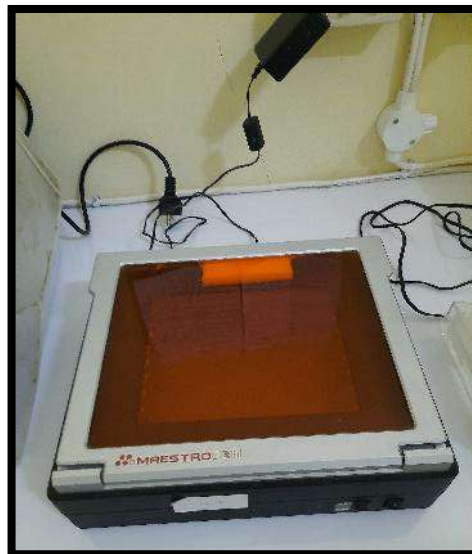


Wakil Dekan Bidang Sumber Daya,

Dr. Iriyanti
NIP. 196203071988032001

Tembusan :
Dekan SITH ITB, sebagai laporan

Lampiran 6. Dokumentasi saat penelitian

Gambar *Thermal Cycler PCR*Gambar *UV Transilluminator*Gambar *Alat elektroforesis*Gambar *Isolasi sampel uji*



Gambar Tahapan isolasi sampel uji



Gambar Vortex 2-3 detik pada tahapan isolasi sampel uji



Gambar Inkubasi suhu 65⁰ C



Gambar Penimbangan sampel kontrol

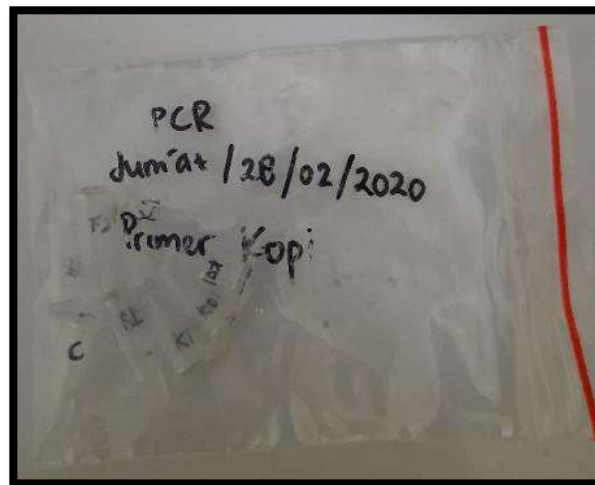


Gambar Penggerusan sampel kontrol

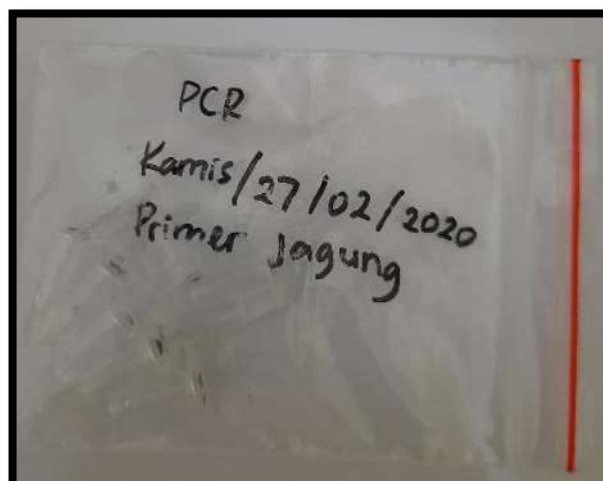


Gambar Sentrifuga sampel tahap isolasi

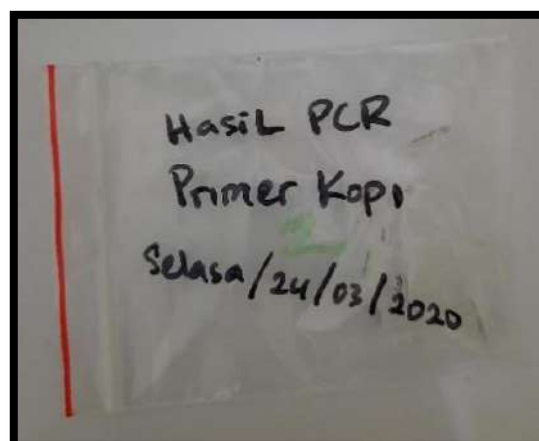
Lampiran 7. Amplikon Sampel Kontrol dan Uji



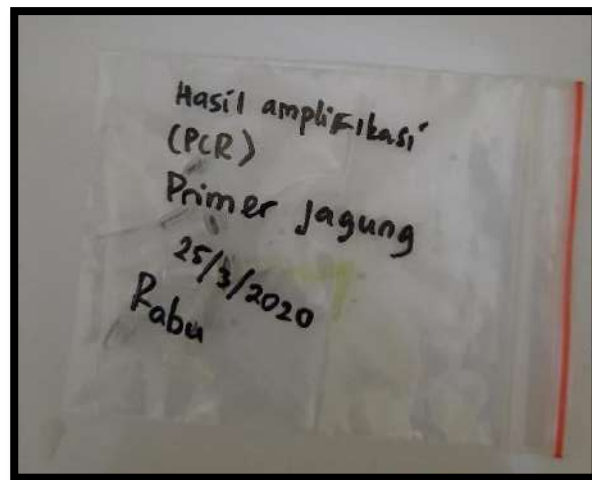
Gambar Amplikon (hasil amplifikasi) sampel biji kopi arabika segar menggunakan primer *ClpP*



Gambar Amplikon (hasil amplifikasi) sampel jagung segar menggunakan primer *Zein*



Gambar Amplikon (hasil amplifikasi) sampel serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan menggunakan primer *ClpP*



Gambar Amplikon (hasil amplifikasi) sampel serbuk kopi arabika yang ada diperdagangan menggunakan primer *Zein*