

Variabilitas Genetik *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner Berdasarkan Sekuen *Internal Transcribed Spacer*

MAHAT MAGANDHI^{1,2*}, MUHAMMAD RIFQI HARIRI^{1**}

¹Research Center for Plant Conservation and Botanic Gardens – Indonesian Institute of Sciences
Jl. Ir. H. Djuanda No. 13 Bogor, Indonesia. 16122

²Plant Breeding and Biotechnology Program, Graduate School of IPB University
Jl. Raya Dramaga Kampus IPB Dramaga Bogor, Indonesia. 16680

Email: *mahat.magandhi@lipi.go.id, **muhammad.rifqi.hariri@lipi.go.id

ABSTRACT

Coffee, as one of the world's essential commodities, is an important source of foreign exchange in several countries. *Coffea canephora* is a type that is commonly cultivated in the world, including Indonesia. Until now, genetic diversity in *C. canephora* has been widely used using DNA markers but not much use sequence analysis. This study aims to analyze the genetic diversity and haplotypes of *C. canephora* using ITS sequences. The genetic distance between accessions was relatively low and grouped all accessions into five clusters. The diversity of genes and nucleotides of *C. canephora* were 0.9402 ± 0.0202 and 0.0154 ± 0.0081 , respectively. Thirteen haplotypes were successfully constructed with H10 deduced as the parent haplotype of all *C. canephora* accessions used in this study.

Keywords: *Coffea canephora*; genetic variability; haplotype; internal transcribed spacer; UPGMA

INTISARI

Kopi sebagai salah satu komoditas penting dunia merupakan sumber devisa penting di beberapa negara. *Coffea canephora* merupakan jenis yang umum dibudidayakan di dunia, termasuk Indonesia. Hingga saat ini keragaman genetik pada *C. canephora* telah banyak digunakan menggunakan marka DNA tetapi belum banyak menggunakan analisis sekuen. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik dan haplotipe *C. canephora* menggunakan sekuen ITS. Jarak genetik antar aksesori cukup rendah dan mengelompokkan keseluruhan aksesori menjadi lima kluster. Keragaman gen dan nukleotida *C. canephora* secara berurutan $0,9402 \pm 0,0202$ dan $0,0154 \pm 0,0081$. Tiga belas haplotipe berhasil dikonstruksi dengan H10 diduga sebagai haplotipe tetua dari seluruh aksesori *C. canephora* yang digunakan.

Kata kunci: *Coffea canephora*; haplotipe; *internal transcribed spacer*; keragaman genetik; UPGMA

PENDAHULUAN

Kopi (*Coffea* spp.) merupakan salah satu komoditas penting dunia dan sumber devisa yang sangat penting bagi banyak negara di Afrika, Asia, dan Amerika Latin. Kopi juga menjadi komoditas unggulan perkebunan nasional di samping kelapa sawit dan karet. Produksi kopi dari tahun ke tahun cenderung meningkat hingga mencapai 760.963 ton di tahun 2019 dan diperkirakan masih terus meningkat hingga mencapai 773.409 ton di tahun 2020 (Ditjen Perkebunan Kementerian RI, 2019). Bila dilihat dari penerimaan devisa negara, komoditas kopi mampu menyumbangkan devisa hingga mencapai US\$ 254,213 juta di tahun 2018 dengan tujuan ekspor lima besar negara di antaranya Amerika Serikat, Malaysia, Jepang, Mesir, dan Italia (Badan Pusat Statistik, 2019).

Kopi (*Coffea* sp.) termasuk tumbuhan berbunga dari suku Rubiaceae. Anggota marga

Coffea berjumlah sebanyak 126 jenis (The Plant List, 2013), menyebar di berbagai wilayah tropis dunia terutama Afrika tropis. Komoditas kopi yang umum diperdagangkan dunia berasal dari 3 spesies yaitu kopi arabica (*C. arabica* L.), kopi robusta (*C. canephora* Pierre ex A. Froehner), kopi liberika (*C. liberica* Hiern) dan kopi excelsa (*C. liberica* var. *dewevrei* (de Wild. & T. Durand) Lebrun). Namun dari keempat komoditas kopi ini, kopi arabika dan robusta yang lebih banyak diproduksi dan diperdagangkan oleh masyarakat luas.

Coffea canephora (robusta) merupakan tanaman asli hutan tropis Afrika yang membentang dari Afrika Barat melalui Kamerun, Republik Afrika Tengah, Kongo, Uganda, dan Tanzania utara hingga Angola utara (Musoli *et al.*, 2009) dan dibudidayakan secara meluas terutama di dataran rendah Afrika tropis dan wilayah tropis lainnya di dunia (Davis *et al.*, 2006). Kopi robusta mulai

diperkenalkan di Indonesia pada tahun 1900 di Pulau Jawa saat masih dikuasai oleh Hindia Belanda setelah sebelumnya kopi arabika dan liberika lebih dahulu masuk ke Indonesia (Cramer, 1957), dengan tujuan untuk menggantikan kopi arabika yang rusak akibat serangan penyakit karat daun dan memperbaiki performa produksi kopi liberika. Hingga kini kopi robusta telah menyebar luas dan beradaptasi baik di hampir semua wilayah di Indonesia dengan luasan areal produksi di tahun 2019 sekitar 862.049 ha lebih luas dibandingkan dengan kopi arabika yang ditanami di areal lahan sekitar 353.490 ha (Ditjen Perkebunan Kementan RI, 2019).

Coffea canephora secara alami memiliki tingkat ploidi diploid ($2n = 2x = 22$) dan secara umum merupakan *self-incompatible* (Bikila *et al.*, 2017) yang memungkinkan polen tanaman lain menempel pada putik dan terjadi penyerbukan silang. Mekanisme *self-incompatible* ini menyebabkan keragaman genetik dari *C. canephora* yang besar dan memiliki tingkat variasi yang sangat tinggi di berbagai daerah. Untuk melihat seberapa besar keragaman genetik ini perlu dilakukan analisis genotipe dari berbagai lokasi baik secara morfologi maupun molekuler. Analisis menggunakan penanda molekuler

memungkinkan untuk melihat keragaman genetik secara dini di berbagai fase pertumbuhan tanaman dengan meminimalisir pengaruh lingkungan terhadap genotipe yang dianalisis. Salah satu penanda molekuler yang dapat digunakan adalah ITS (*internal transcribed spacer*) yang bersumber dari genom inti, berukuran kecil kurang lebih 700 pasang basa, dan memiliki salinan yang banyak pada genom inti (Suparman, 2012). Studi taksonomi dan analisis kekerabatan (filogenetik) telah banyak menggunakan sekuen ITS karena dapat membedakan inter dan intraspesies (Rahayu *et al.*, 2019). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik dan haplotipe *C. canephora* berdasarkan sekuen ITS.

METODE PENELITIAN

Bahan penelitian yang digunakan adalah sekuen *internal transcribed spacer* (ITS) dari lima belas spesimen *C. canephora* yang berasal dari 5 sumber pengunggah diperoleh melalui basis data GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Informasi mengenai jumlah dan nomor aksesori spesimen *C. canephora* yang digunakan dalam analisis tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Informasi sekuen ITS *C. canephora* dari genbank NCBI

No	Nomor Aksesori	Ukuran Sekuen	Disubmit Oleh
1	AY780425.1	663 pasang basa	L.-Y. Chen dan J.-S. Liu
2	DQ153593.1	784 pasang basa	O. Maurin, A.P. Davis, M. Chester, E.F. Mvungi, Y. Jaufeerally-Fakim, dan M.F. Fay
3	MF417755.1	657 pasang basa	G. Pelayo-Sanchez dan M.J. Yanez-Morales
4	MK615730.1	817 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
5	MK615731.1	781 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
6	MK615732.1	770 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
7	MK615733.1	842 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
8	MK615734.1	767 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
9	MK615735.1	770 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
10	MK615736.1	767 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
11	MK615737.1	790 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
12	MK615738.1	745 pasang basa	A.C. Panaligan, M.D. Baltazar, dan G.J.D. Alejandro
13	MN719952.1	739 pasang basa	A.P. Davis, R. Gargiulo, M.F. Fay, D. Sarmu, and J. Hagggar
14	MN719951.1	738 pasang basa	A.P. Davis, R. Gargiulo, M.F. Fay, D. Sarmu, and J. Hagggar
15	MN719950.1	738 pasang basa	A.P. Davis, R. Gargiulo, M.F. Fay, D. Sarmu, and J. Hagggar

Penghitungan Jarak Genetik dan Konstruksi Fenogram

Penyejajaran sekuen dilakukan dengan metode *Multiple Sequence Comparison by Log-*

Expectation (MUSCLE) (Edgar, 2004). Hasil penyejajaran selanjutnya diperiksa untuk melihat ada tidaknya ambiguitas nukleotida yang disebabkan oleh adanya insersi, delesi,

atau substitusi kemudian dilakukan penyuntingan sekuen jika diperlukan. Hasil penyuntingan sekuen ITS diproses lebih lanjut untuk menghitung jarak genetik dan konstruksi dendrogram. Konstruksi dendrogram dilakukan menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973). Persentase replikasi yang muncul pada cabang dendrogram dihitung melalui 1000 *bootstraps* (Felsenstein, 1985). Jarak genetik dan jarak evolusi antar aksesi diukur berdasarkan parameter Kimura 2 (Kimura, 1980). Laju variasi antar situs dimodelkan melalui distribusi gamma (parameter bentuk = 5). Semua posisi ambigu dihapus pada setiap pasangan yang berurutan melalui pilihan *pairwise deletion*. Semua parameter dan analisis dikerjakan menggunakan software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Analisis Variasi Molekuler

Pengelompokan haplotipe berdasarkan keragaman nukleotida dan jarak genetik antar aksesi dihitung melalui Analisis Variasi Molekuler (AMOVA) menggunakan software DnaSP v6 (Rozas *et al.*, 2017) dan ARLEQUIN

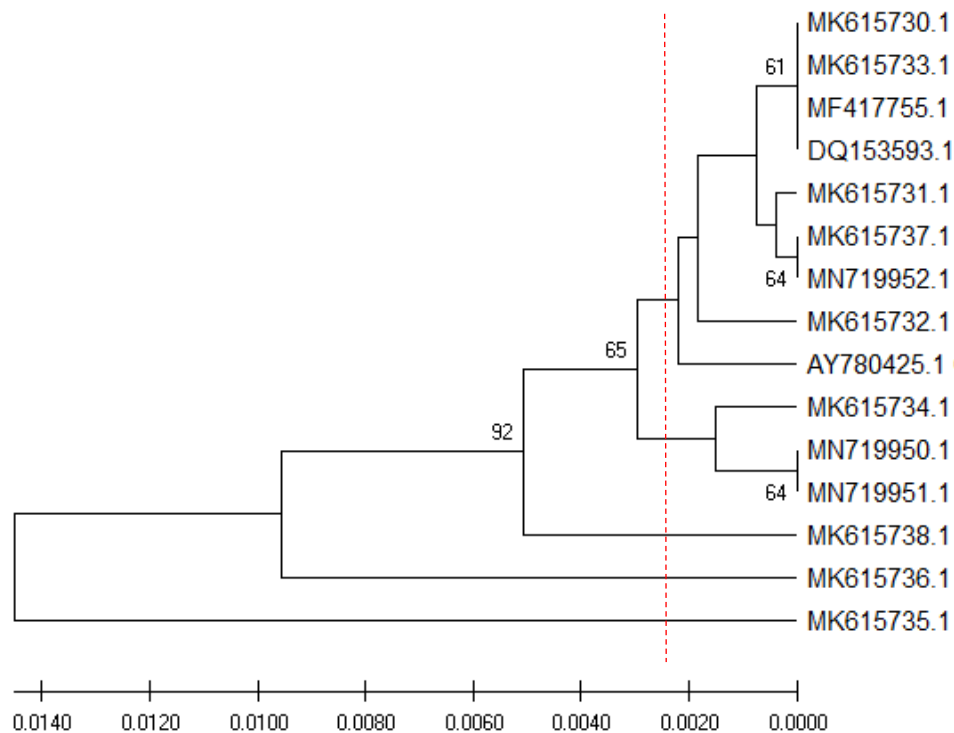
v3.5.2.2 dengan 1000 permutasi (Excoffier & Lischer, 2010). Evolusi sekuen ITS dianalisis dengan metode *Median-Joining* mengikuti Bandelt *et al.* (1999) melalui penghitungan statistik rho dan standar error rho mengikuti Forster *et al.* (1996) dan Saillard *et al.* (2000) menggunakan software Network 5.0.1.1 (<http://fluxus-engineering.com>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lima belas aksesi *C. canephora* dianalisis jarak genetik dan hubungan antar aksesinya menunjukkan adanya variasi yang cukup tinggi. Nilai jarak genetik antar aksesi bervariasi dari terendah 0,000 hingga 0,032 (Tabel 2). Dendrogram antar aksesi menunjukkan bahwa terdapat lima kluster *C. canephora* pada nilai jarak genetik 0,0025, yakni kluster 1 terdiri dari 1 aksesi (MK615735.1), kluster 2 terdiri dari 1 aksesi (MK615736.1), kluster 3 terdiri dari aksesi (MK615738.1), kluster 4 terdiri dari 3 aksesi (MK615734.1, MN719950.1, dan MN719951.1), dan kluster 5 terdiri dari 7 aksesi (MK615730.1, 615733.1, MF417755.1, DQ153593.1, MK615731.1, MK615737.1, dan MN719952.1) (Gambar 1).

Tabel 2. Jarak genetik lima belas aksesi *C. canephora*

Nomor Aksesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
AY780425.1														
DQ153593.1	0,005													
MF417755.1	0,005	0,000												
MK615730.1	0,005	0,000	0,000											
MK615731.1	0,005	0,003	0,003	0,003										
MK615732.1	0,006	0,005	0,002	0,005	0,005									
MK615733.1	0,005	0,000	0,000	0,000	0,003	0,005								
MK615734.1	0,008	0,009	0,008	0,009	0,006	0,008	0,009							
MK615735.1	0,029	0,028	0,025	0,028	0,028	0,028	0,028	0,032						
MK615736.1	0,019	0,020	0,019	0,020	0,020	0,020	0,020	0,018	0,031					
MK615737.1	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002	0,008	0,026	0,018				
MK615738.1	0,006	0,011	0,008	0,011	0,011	0,012	0,011	0,014	0,036	0,023	0,009			
MN719950.1	0,005	0,006	0,006	0,006	0,003	0,008	0,006	0,003	0,031	0,017	0,005	0,011		
MN719951.1	0,005	0,006	0,006	0,006	0,003	0,008	0,006	0,003	0,031	0,017	0,005	0,011	0,000	
MN719952.1	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,005	0,026	0,017	0,000	0,009	0,002	0,002



Gambar 1. Dendrogram aksesi *C. canephora* berdasarkan sekuen ITS yang dikonstruksi melalui metode UPGMA

Keragaman gen pada *C. canephora* berdasarkan sekuen ITS menunjukkan nilai 0,9402. Komposisi nukleotida C-G lebih tinggi dibandingkan A-T dan keragaman nukleotida menunjukkan nilai rendah (0,015432) (Tabel 3). Rendahnya nilai keragaman nukleotida pada sekuen ITS *C. canephora* disebabkan oleh sedikitnya variasi nukleotida antar aksesi. Sebanyak 35 (5,20%) nukleotida dari 672 dataset yang digunakan menunjukkan perbedaan basa pada aksesi yang dibandingkan. Sebaliknya, keragaman genetik pada *C. canephora* menunjukkan nilai yang cukup tinggi yakni 0,9402 ($F_{st}=0,729$) (Tabel 4).

Keragaman genetik *C. canephora* cukup tinggi dan hampir setara dengan beberapa jenis tumbuhan lainnya (Yan 2007; Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2017).

Tingginya keragaman genetik pada *C. canephora* juga dilaporkan oleh Ngugi & Aluka (2019) dan Huded *et al.* (2020). Namun, rendahnya keragaman nukleotida menunjukkan hal yang cukup menarik. Hal demikian juga ditemukan pada *Rhizophora* (Rhizophoraceae), dengan keragaman nukleotida pada sekuen *trnG-trnS* dan *trnH-rpl2* secara berurutan bernilai $0,04 \pm 0,02$ dan $0,03 \pm 0,02$ (Lo *et al.*, 2014). Ketidakseimbangan nilai keragaman genetik dan keragaman nukleotida pada penelitian ini diduga karena sampel sekuen ITS *C. canephora* yang tersedia di genbank NCBI dan dianalisis masih sedikit, yakni berasal dari 7 sumber pengunggah sekuen, sehingga meskipun menunjukkan keragaman genetik yang tinggi tetapi belum mampu menunjukkan keragaman nukleotida dengan baik.

Tabel 3. Komputasi haplotipe *C. canephora*

Komputasi Haplotipe		Nilai
Keragaman gen		0,9402 ± 0,0202
Komposisi nukleotida	C	33,32%
	T	16,68%
	A	19,09%
	G	30,91%
Keragaman nukleotida		0,0154 ± 0,0081
Fst = 0,729		

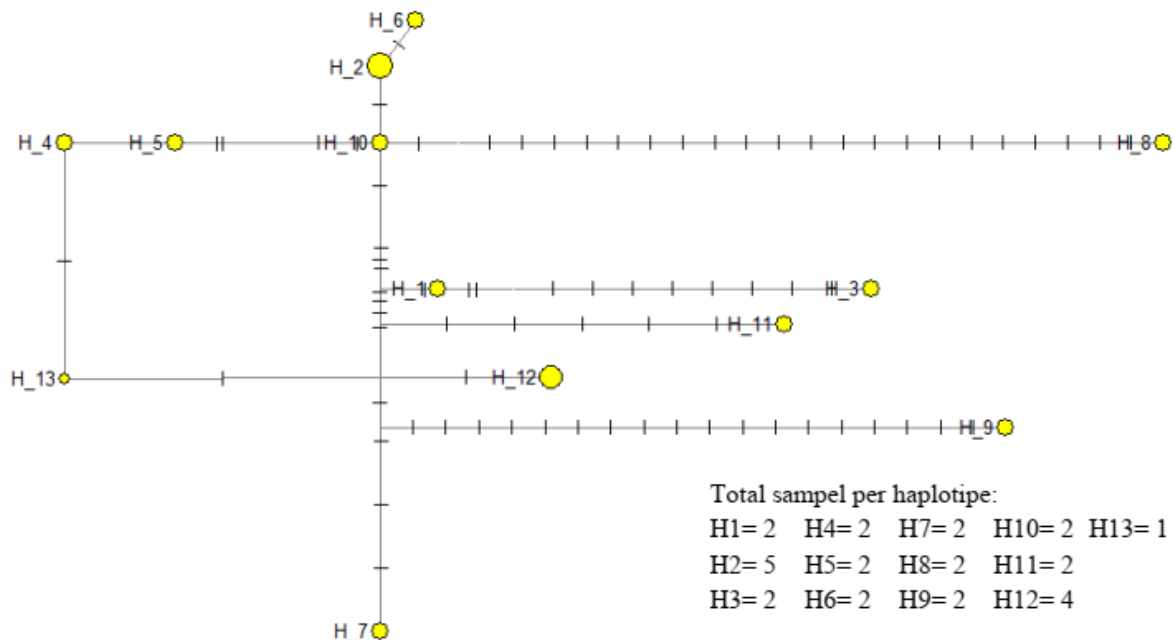
*angka di belakang ± menunjukkan nilai standar deviasi

Tabel 4. Variasi nukleotida pada sekuen ITS *C. canephora*

Nomor Akses	Nukleotida ke-												
	2	4	7	8	16	17	22	27	52	54	65	89	98
AY780425.1	-	-	C	G	C	A	C	C	C	C	-	A	G
DQ153593.1	A	C	-	G	A
MF417755.1	-	-	-	-	G	A
MK615730.1	A	C	-	G	A
MK615731.1	A	C	-	G	A
MK615732.1	A	C	-	G	A
MK615733.1	A	C	-	G	A
MK615734.1	A	C	-	G	.
MK615735.1	A	C	G	C	T	T	T	T	A	T	C	G	A
MK615736.1	A	C	T	.	A	T	T	G	.
MK615737.1	A	C	-	G	A
MK615738.1	C	G	-	G	.
MN719950.1	A	C	-	G	.
MN719951.1	A	C	-	G	.
MN719952.1	A	C	-	G	A
	104	132	192	203	242	387	525	537	584	595	598	609	611
AY780425.1	C	C	C	C	G	T	T	A	T	G	G	G	G
DQ153593.1	.	T
MF417755.1	.	T
MK615730.1	.	T
MK615731.1	C
MK615732.1
MK615733.1	.	T
MK615734.1	C	G	G
MK615735.1	A	A	A
MK615736.1	T	.	T	T	A	.	.	.	G	A	A	.	.
MK615737.1
MK615738.1	A
MN719950.1	C	.	G
MN719951.1	C	.	G
MN719952.1	.	Y	Y	.	K
	631	643	646	654	657	659	661	670	672				
AY780425.1	G	G	G	C	C	G	G	T	T				
DQ153593.1				
MF417755.1				
MK615730.1				
MK615731.1				
MK615732.1	A	A				
MK615733.1				
MK615734.1	A				
MK615735.1	A	A	T	.	.	T	A	.	C				
MK615736.1	.	.	.	-	C				
MK615737.1				
MK615738.1	.	.	.	A	A				
MN719950.1				
MN719951.1				
MN719952.1				

Analisis haplotipe pada *C. canephora* menunjukkan adanya 13 haplotipe terbentuk dari total 15 aksesi. Haplotipe dengan anggota paling banyak terdapat pada haplotipe 2 dan 12, yakni 4 aksesi. Haplotipe tetua merupakan

haplotipe yang terletak di pusat jejaring aksesi (Crandall & Templeton, 1993) yang ditunjukkan dengan H10 yang terdiri dari 2 aksesi (Gambar 2). Komposisi aksesi pada setiap haplotipe ditampilkan pada Tabel 5.



Gambar 2. Jejaring haplotipe aksesi *C. canephora*. Ukuran lingkaran bersesuaian dengan jumlah sampel per haplotipe. Garis lurus yang terletak antar haplotipe menunjukkan jumlah mutasi yang terjadi.

Tabel 5. Komposisi aksesi penyusun haplotipe pada gambar 2

Kode Haplotipe	Aksesi <i>C. canephora</i>
H1	AY780425.1_Coffea_canephora-1 AY780425.1_Coffea_canephora-2
H2	DQ153593.1_Coffea_canephora-1 DQ153593.1_Coffea_canephora-2 MK615730.1_Coffea_canephora-1 MK615730.1_Coffea_canephora-2 MN719952.1_Coffea_canephora-2
H3	MF417755.1_Coffea_canephora-1 MF417755.1_Coffea_canephora-2
H4	MK615731.1_Coffea_canephora-1 MK615731.1_Coffea_canephora-2
H5	MK615732.1_Coffea_canephora-1 MK615732.1_Coffea_canephora-2
H6	MK615733.1_Coffea_canephora-1 MK615733.1_Coffea_canephora-2
H7	MK615734.1_Coffea_canephora-1 MK615734.1_Coffea_canephora-2
H8	MK615735.1_Coffea_canephora-1 MK615735.1_Coffea_canephora-2
H9	MK615736.1_Coffea_canephora-1 MK615736.1_Coffea_canephora-2
H10	MK615737.1_Coffea_canephora-1 MK615737.1_Coffea_canephora-2
H11	MK615738.1_Coffea_canephora-1 MK615738.1_Coffea_canephora-2
H12	MN719950.1_Coffea_canephora-1 MN719950.1_Coffea_canephora-2 MN719951.1_Coffea_canephora-1 MN719951.1_Coffea_canephora-2
H13	MN719952.1_Coffea_canephora-1

Distribusi skala luas *C. canephora* dengan keragaman genetik yang tinggi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan telah mengalami adaptasi dan perubahan sebagaimana ditunjukkan dengan sekian banyaknya mutasi pada beberapa haplotipe. Haplotipe terdekat dengan tetua adalah H2 yang

terdiri dari 5 sampel yang berasal dari aksesi DQ153593.1, MK615730.1, dan MN719952.1. Haplotipe 8 yang terdiri dari 2 sampel (MK615735.1 dan MK615735.1) merupakan haplotipe terjauh dari tetua karena memiliki paling banyak mutasi dibandingkan dengan haplotipe lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa

aksesi dengan sumber pengunggah yang berbeda tidak selalu berbeda satu sama lain, begitu pula dengan akses yang berasal dari pengunggah yang sama sehingga hasil yang ditunjukkan oleh jejaring haplotipe dapat digunakan sebagai salah satu pertimbangan dalam rekomendasi pemanfaatan dan pengembangan plasma nutfah *C. canephora* yang berkelanjutan.

KESIMPULAN

Analisis keragaman genetik dan keragaman nukleotida *C. canephora* menunjukkan nilai yang tinggi dan rendah secara berurutan. Lima belas akses *C. canephora* terbagi menjadi 13 haplotipe dengan H10 sebagai tetua. Haplotipe terdekat dan terjauh dengan tetua secara berurutan adalah H2 dan H8. Lima sumber akses sekuen ITS *C. canephora* tergabung dalam satu klad secara acak dan tidak menyatu sesuai asal sumber pengunggah.

DAFTAR PUSTAKA

Badan Pusat Statistik. 2019. Statistik Kopi Indonesia 2018. Jakarta: BPS.

Bikila BA, Sakiyama NS, and Caixeta ET. 2017. SNPs based molecular diversity of *Coffea canephora*. *Journal of Microbiology & Experimentation*. vol 5(1): 00136: 1-5. doi: 10.15406/jmen.2017.05.00136.

Chen K, Abbott RJ, Milne RI, Tian XM, and Liu J. 2008. Phylogeography of *Pinus tabulaeformis* Carr. (Pinaceae), a dominant species of coniferous forest in northern China. *Molecular Ecology*. vol 17: 4276-4288. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03911.x

Chen SC, Zhang L, Zeng J, Shi F, Yang H, Mao YR, and Cheng-Xin FU. 2012. Geographic variation of chloroplast DNA in *Platycarya strobilacea* (Juglandaceae). *Journal of Systematics and Evolution*. vol 50: 374-385. doi: 10.1111/j.1759-6831.2012.00210.x

Cramer JS. 1957. A Review of Literature of Coffee Research in Indonesia. SIC Editorial. Costa Rica: Inter-American Institute of Agriculture Science, Turrialba.

Crandall KA and Templeton AR. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*. vol 134: 959-969.

Davis AP, Govaerts R, Bridson DM, and Stoffelen P. 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 152(4): 465-512. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x.

Ditjen Perkebunan Kementan RI. 2019. Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Kopi 2018-2020. Jakarta: Sekretariat Ditjen Perkebunan Kementan RI.

Edgar E. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. vol 5(113): 1-19. doi: 10.118/1471-2105-5-113.

Excoffier L and Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. vol 10: 564-567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

Huded AK, Jingade P, Bychappa M, and Mishra MK. 2020. Genetic diversity and population structure analysis of Coffee (*Coffea canephora*) germplasm collections in Indian Gene Bank employing SRAP and SCoT markers. *International Journal of Fruit Science*. doi: 10.180/155383362.2020.1768618.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. vol 16: 111-120. doi: 10.1007/BF01731581.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. vol 35: 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

Lo EY, Duke NC, Sun M. 2014. Phylogeographic pattern of *Rhizophora* (Rhizophoraceae) reveals the importance of both vicariance and long-distance oceanic dispersal to modern mangrove distribution. *BMC Evolutionary Biology*. vol 14:83 doi: 10.1186/1471-2148-14-83.

Musoli P, Cubry P, Aluka P, Billot C, Dufour M, De Bellis F, Pot D, Bieysse D, Charrier A, and Leroy T. 2009. Genetic differentiation of wild and cultivated populations: diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. *Genome*. vol 52(7): 634-646. doi: 10.1139/G09-037.

Ngugi A and Aluka P. 2019. Genetic and Phenotypic Diversity of Robusta Coffee (*Coffea canephora* L.). in Caffeinated and Cocoa based Beverages, Volume 8: The Science of Beverages. India: Elsevier.

Rahayu DA dan Jannah M. 2019. DNA Barcode: Hewan dan Tumbuhan Indonesia. Jakarta: Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.

Sneath PHA and Sokal RR. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco: Freeman.

Suparman. 2012. Markah molekuler dalam identifikasi dan analisis kekerabatan tumbuhan serta implikasinya bagi mata kuliah genetika. *Jurnal Biologedukasi*. vol. 1(1): 59-68.

- The Plant List. 2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (Diakses 11 Agustus 2020).
- Xing R, Gao QB, Zhang FQ, Fu PC, Wang JL, Yan HY, and Chen SL. 2017. Genetic variation and phylogenetic relationships of the ectomycorrhizal *Floccularia luteovirens* on the Qinghai-Tibet Plateau. *Journal of Microbiology*. vol 55: 600–606. doi: 10.1007/s12275-017-7101-4.
- Yan HF. 2007. Phylogeographic structure of *Primula obconica* (Primulaceae) inferred from chloroplast microsatellites (cpSSRs) markers. *Acta Physica Sinica*. vol 45: 488–496.