

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif untuk mengetahui hubungan kekerabatan status filogenetik genus *Phyllanthus* dengan merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan urutan basa nrDNA daerah ITS.

#### B. Sumber Data

Data sikuen DNA daerah ITS genus *Phyllanthus* didapat dari GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) yaitu sebanyak 80 data sikuen dari 80 spesies. Data sikuen tersebut merupakan hasil publikasi dari beberapa penelitian, yaitu Fong *et al.* (2006), Kathriarachchi *et al.* (2006), Pruesapan *et al.* (2008), dan Topik *et al.* (2008). *Sauropus androgynus* dan *Manihot esculenta* dipilih sebagai *outgroup* berdasarkan penelitian Topik *et al.* (2008). Secara lengkap, species-species genus *Phyllanthus* serta *outgroup* yang diteliti dapat dilihat pada tabel 3.1.

**Tabel 3.1**

Spesies-species dari Genus *Phyllanthus* beserta *outgroup* yang digunakan

No.	Nama Species	No. Akses	$\Sigma$ Nukkelotida	Kontributor (*)
1.	<i>P. acidus</i>	EU623556	659	P
2.	<i>P. amarus</i>	EU623557	654	P
3.	<i>P. sauropodoides</i>	EU623558	662	P

No.	Nama Species	No. Akses	$\Sigma$ Nukkelotida	Kontributor *)
4.	<i>P. sikkimensis</i>	EU623559	636	P
5.	<i>P. aff. Moorei</i>	AY936710	777	K
6.	<i>P. cf. orbicularis</i>	AY936717	775	K
7.	<i>P. muellerianus</i>	AY936711	751	K
8.	<i>P. myrtifolius</i>	AY936712	781	K
9.	<i>P. orbicularis</i>	AY936718	775	K
10.	<i>P. oxyphyllus</i>	AY936719	775	K
11.	<i>P. pachystylus</i>	AY936720	775	K
12.	<i>P. pancherianus</i>	AY936721	776	K
13.	<i>P. pentandrus</i>	AY936722	779	K
14.	<i>P. pervilleanus</i>	AY936723	778	K
15.	<i>P. pinnatus</i>	AY936724	778	K
16.	<i>P. polyphyllus</i>	AY936725	778	K
17.	<i>P. pulcher</i>	AY936726	758	K
18.	<i>P. purpusii</i>	AY936727	703	K
19.	<i>P. reticulatus</i>	AY936728	758	K
20.	<i>P. rheedii</i>	AY936729	773	K
21.	<i>P. nummulariifolius</i>	AY936714	782	K
22.	<i>P. sellowianus</i>	AY936731	782	K
23.	<i>P. sepialis</i>	AY936732	772	K
24.	<i>P. tenellus</i>	AY936733	781	K
25.	<i>P. unifoliatus</i>	AY936734	770	K
26.	<i>P. urinaria</i>	AY936736	725	K
27.	<i>P. vakinankaratrae</i>	AY936737	778	K
28.	<i>P. virgatus</i>	AY936738	660	K
29.	<i>P. welwitschianus</i>	AY936739	760	K
30.	<i>P. wheeleri</i>	AY936740	765	K
31.	<i>P. acuminatus</i>	AY936667	779	K
32.	<i>P. andalangiensis</i>	AY936670	779	K
33.	<i>P. angustifolius</i>	AY936671	724	K
34.	<i>P. calycinus</i>	AY936674	701	K
35.	<i>P. caroliniensis</i>	AY936675	777	K
36.	<i>P. casticum</i>	AY936676	734	K
37.	<i>P. cf. chamaecristoides</i>	AY936679	776	K
38.	<i>P. chacoensis</i>	AY936677	779	K
39.	<i>P. chamaecerasus</i>	AY936678	777	K
40.	<i>P. chrysanthus</i>	AY936680	782	K
41.	<i>P. chryseus</i>	AY936681	774	K
42.	<i>P. cinereus</i>	AY936682	758	K
43.	<i>P. claussenii</i>	AY936683	774	K
44.	<i>P. cochinchinensis</i>	AY936684	725	K
45.	<i>P. comosus</i>	AY936685	775	K
46.	<i>P. debilis</i>	AY936686	770	K

No.	Nama Species	No. Akses	$\Sigma$ Nukkelotida	Kontributor *)
47.	<i>P. discolor</i>	AY936688	775	K
48.	<i>P. gardnerianus</i>	AY936694	779	K
49.	<i>P. graveolens</i>	AY936696	778	K
50.	<i>P. hutchinsonianus</i>	AY936697	775	K
51.	<i>P. kaessneri</i>	AY936700	745	K
52.	<i>P. lokohensis</i>	AY936703	647	K
53.	<i>P. juglandifolius</i>	AY936698	727	K
54.	<i>P. favieri</i>	AY936691	783	K
55.	<i>P. betsileanus</i>	AY936672	638	K
56.	<i>P. kanalensis</i>	AY936701	783	K
57.	<i>P. klotzschianus</i>	AY936702	773	K
58.	<i>P. loranthoides</i>	AY936705	647	K
59.	<i>P. madagascariensis</i>	AY936706	774	K
60.	<i>P. maderaspatensis</i>	AY936707	653	K
61.	<i>P. mannianus</i>	AY936708	772	K
62.	<i>P. microdictyus</i>	AY936709	776	K
63.	<i>P. arenarius</i>	AY765300	618	F
64.	<i>P. clarkei</i>	AY765288	625	F
65.	<i>P. flexuosus</i>	AY765289	621	F
66.	<i>P. glaucus</i>	AY765291	621	F
67.	<i>P. guangdongensis</i>	AY765297	603	F
68.	<i>P. hainanensis</i>	AY765299	600	F
69.	<i>P. parvifolius</i>	AY765294	620	F
70.	<i>P. ruber</i>	AY765298	599	F
71.	<i>P. taxodiifolius</i>	AY765292	621	F
72.	<i>P. ussuriensis</i>	AY765295	621	F
73.	<i>P. niruri Green 4</i>	AB441767	575	T
74.	<i>P. niruri Green 5</i>	AB441770	566	T
75.	<i>P. niruri Red 1</i>	AB441765	573	T
76.	<i>P. niruri Red 2</i>	AB441766	576	T
77.	<i>P. niruri Red 7</i>	AB441769	579	T
78.	<i>P. niruri Yellow 8</i>	AB441771	574	T
79.	<i>Manihot esculenta</i>	AB441756	622	T
80.	<i>Sauruphus androgynus</i>	AB441757	549	T
81.	<i>Aleurites moluccana</i>	AB441753	645	T
82.	<i>Codiaeum variegatum</i>	AB441764	583	T
83.	<i>Ricinus communis</i>	AB441761	606	T

Keterangan \*):

- P = Pruesapan *et al.* (2008)  
 K = Kathriarachchi *et al.* (2006)  
 F = Fong *et al.* (2006)  
 T = Topik *et al.* (2008)

## C. Verifikasi Data

### 1. Pencarian motif daerah ITS

Daerah ITS memiliki beberapa motif dan situs restriksi yang umum ditemukan. Motif dan situs restriksi ini dapat digunakan untuk memeriksa sekuen DNA yang diteliti atau diuji. Pada tahun 1994, Liu dan Schardl menemukan motif 5'-CAAGGAA yang terletak di daerah ITS1 (Taufik, 2003). Kemudian pada tahun 1997, Jobes dan Thien menemukan motif yang terdiri dari 14 pb yaitu 5'-GAATTGCAGAATCC yang terletak pada daerah 5,6S (Taufik, 2003). Motif ini juga sering disebut motif 14pb. Selain itu, ada pula situs restriksi yang umum ditemukan pada daerah ITS. Situs tersebut yaitu situs *EcoRV* (GATATC) yang terletak di daerah 5,8S. Situs ini ditemukan oleh Liston *et al.* pada tahun 1996 (Taufik, 2003).

Pencarian motif dan situs restriksi pada masing-masing sekuen DNA dibantu dengan menggunakan Genamics Expression versi 1.080 (2000) melalui opsi *Pattern Finder* dan *Enzyme Digestor*.

### 2. Analisis Homologi

Analisis kesamaan sekuen DNA dilakukan melalui perbandingan sekuen DNA sampel dengan sekuen DNA yang terdapat di *database* di pusat-pusat *database*. Perbandingan ini dilakukan dengan menggunakan fasilitas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang tersedia di *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) yang bertujuan untuk melihat

tingkat homologinya. Dari masing-masing proses BLAST, diambil 5-10 sekuen DNA yang paling serupa dilihat dari nilai (score) yang dihasilkan.

## D. Preparasi Data

### 1. Penentuan Batas Daerah Uji

Pada setiap sikuen yang didapat dari GenBank pada studi ini, masih terdapat urutan basa-basa yang tidak termasuk ke dalam Daerah ITS. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemotongan agar sikuen yang diuji pada studi ini murni sikuen daerah ITS. Untuk menentukan batas daerah ITS maka diperlukan satu atau beberapa sikuen yang telah diketahui batas daerah-daerahnya. Selanjutnya sikuen tersebut disebut sebagai sikuen pembanding.

Sikuen daerah 5,8S dari seluruh sekuen DNA pembanding disejajarkan (*alignment*) dengan menggunakan CLUSTAL X. Hasil *alignment* diperiksa dengan menggunakan BIOEDIT. Kemudian data sikuen DNA pembanding tersebut dipindahkan kembali ke program CLUSTAL X. Pada program CLUSTAL X, sikuen lengkap DNA uji kemudian ditambahkan pada hasil *alignment* pertama. Lalu dilakukan penyejajaran kembali (*realignment*) dengan opsi '*realign selected sequence*' pada sikuen DNA uji. Penentuan batas untuk daerah ITS1 dan ITS 2 pun dilakukan dengan proses yang sama dengan sekuen 5,8S.

### 2. *Alignment*

Pertama-tama dilakukan *alignment* untuk masing-masing daerah (ITS1, gen 5,8S dan ITS2) dengan menggunakan CLUSTAL X. Masing-

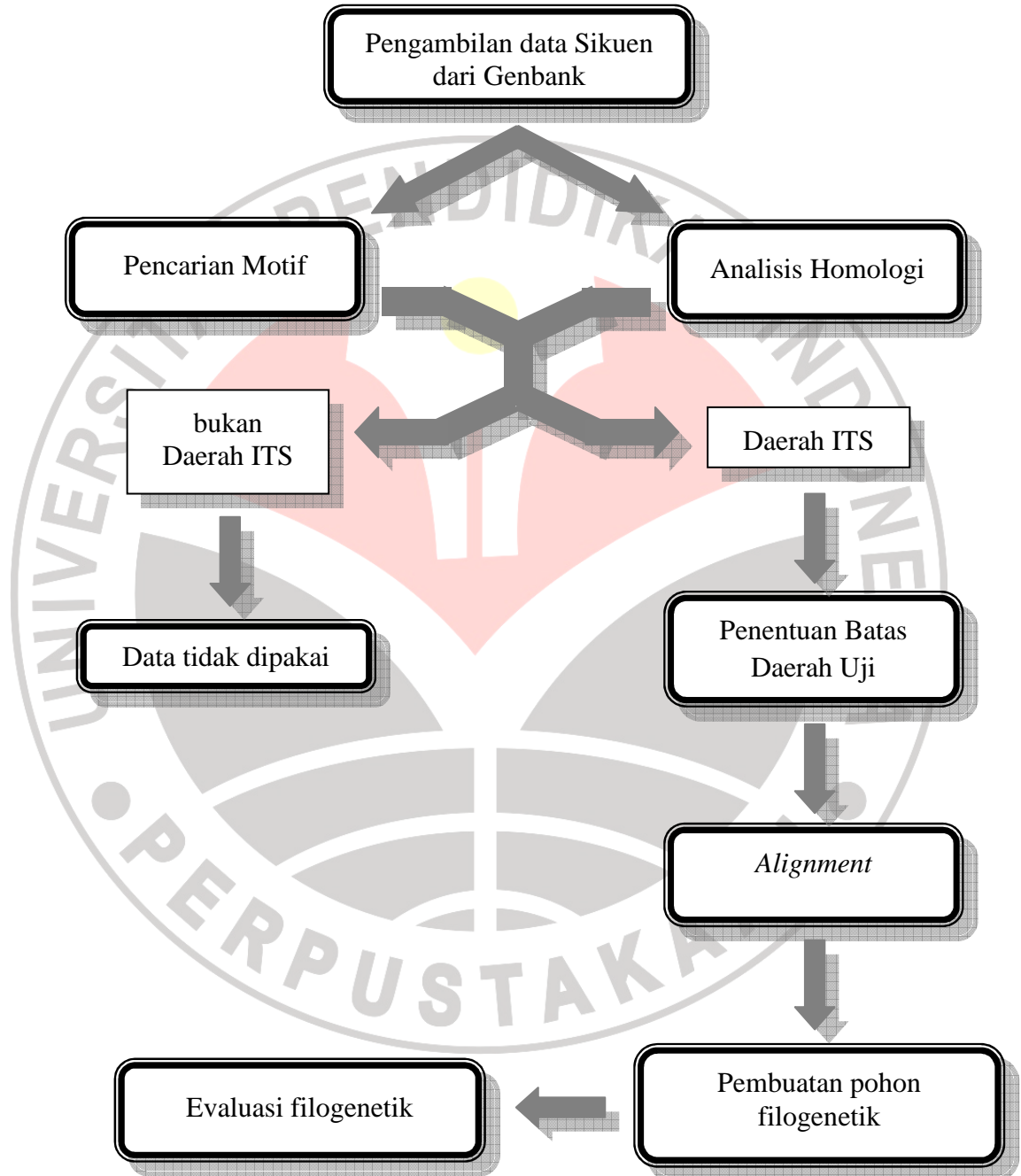
masing *alignment* dilakukan dengan dua parameter, yaitu *fast-approximate* dan *slow-accurate*. Parameter yang lebih terinci dapat dilihat pada lampiran 2.

Kemudian dilakukan *alignment* secara keseluruhan dengan menggunakan opsi *complete alignment*. Hasil *alignment* secara keseluruhan ini yang kemudian akan digunakan untuk membangun pohon filogenetik.

#### **E. Pembuatan Pohon Filogenetik**

Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan PAUP (*Phylogeny Analysis of Using Parsimony*) versi 4.0b10 menggunakan metode *Maximum Parsimony*. Pohon filogenetik yang paling parsimonious dibangkitkan secara *heuristic* dengan cara mengaplikasikan bobot secara acak untuk tiap basa, penambahan sikuen secara acak (*random additions sequence*), serta pertukaran cabang pada pohon filogenetik dengan metode *tree bisection-reconnection* (TBR) *brancs swapping*. Proses ini diulang sebanyak 200 kali. Pohon filogenetik yang digunakan lebih lanjut merupakan pohon konsensus dari semua pohon yang paling parsimony. Uji kestabilan pohon fiolgenetik dilakukan dengan metode *bootstrap* dengan pengulangan 1000 kali. Indeks konsistensi (CI) dan indeks retensi (RI) dihitung untuk melihat konsistensi dan kekokohan pohon filogenetik yang terbentuk.

## F. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian