

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian dasar. Metode penelitian yang digunakan adalah deskriptif, yaitu untuk menganalisis hubungan kekerabatan di dalam jenis *Phyllanthus niruri* L. dengan cara merekonstruksi pohon filogenetika berdasarkan sekuens daerah ITS dari nrDNA.

B. Sampel Penelitian

Tujuh tumbuhan *Phyllanthus niruri* L. yang diperoleh dari daerah Bandung dan Cimahi digunakan dalam penelitian ini. Sampel-sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari daerah Bandung dan Cimahi karena kedua daerah ini berada di ketinggian yang hampir sama (± 1500 dpl) sehingga diperkirakan dapat meminimalkan tingkat plastisitas sampel. *Sauropus androgynus* (L.) Merr. dipilih sebagai *outgroup* karena memiliki kedekatan secara filogenetika dengan *Phyllanthus niruri* L. (Kathriarchchi *et al.*, 2006).

C. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Sikuensing produk amplifikasi daerah ITS dari sampel-sampel tumbuhan dilakukan Macrogen Inc., Korea Selatan.

D. Alat dan Bahan

Tabel 3.1. Daftar alat

Nama alat	Kegunaan
Mesin PCR	Amplifikasi DNA
Autoklaf	Sterilisasi
Tabung mikrosentrifuga	Mencampur larutan
<i>Waterbath</i>	Inkubasi
<i>Centrifuge</i>	Pemisahan fasa larutan
Mikropipet	Memindahkan larutan
Tips mikropipet	Memindahkan larutan
Oven	Mengeringkan bahan
<i>Vorteks</i>	Homogenisasi larutan
<i>Magnetic stirrer dengan hot plate</i>	Memanaskan larutan
<i>Freezer</i>	Preservasi DNA
<i>Refrigerator</i>	Preservasi reagen
<i>Electrophoresis apparatus</i>	Memisahkan sampel DNA
<i>Beaker glass</i>	Membuat bahan
Lampu UV	Dokumentasi
<i>Sequencer</i>	Sekuensing DNA

Tabel 3.2 Daftar bahan



Nama bahan	Kegunaan
<i>Taq</i> Polymerase	Mengatalisis proses polimerasi DNA
dNTPs	Nukleotida untuk proses polimerasi DNA
Primer ITS 4 dan ITS5	Faktor inisiasi dalam polimerasi DNA
MgCl ₂	Katalisator polimerasi DNA
<i>Buffer</i> (NH ₄) ₂ SO ₄	Penyangga dalam polimerasi DNA
Air Deion	Pelarut bahan
Buffer lisis 2x CTAB	Menghancurkan membran sel
Poly Vinil Pyrolidone (PVP)	Menarik plastida sel dalam proses isolasi DNA
B- Mercaptoethanol	<i>Fresh strillizer</i> dalam proses isolasi DNA
Potassium Asetat 5M	Mengendapkan protein yang terdenaturasi dalam proses isolasi DNA
SDS 20%	Melarutkan lemak, mendenaturasi protein dalam proses isolasi DNA
Kloroform & Isoamil alkohol	Memisahkan debris dari asam nukleat dalam proses isolasi DNA
Etanol absolut	Mengendapkan asam nukleat dalam proses isolasi DNA
Alkohol 70%	Memisahkan garam-garam yang menempel pada DNA
Proteinase K	Memutuskan rantai polipeptida protein
RNase	Mendegradasi molekul RNA
<i>Buffer</i> Tris-EDTA	Pelarut DNA
Asam Asetat Glasial	Penyangga untuk elektroforesis DNA
Etidium Bromida (EtBr)	Mewarnai DNA pada proses elektroforesis
Agarosa	Media untuk mengelektroforesis DNA

E. Prosedur Kerja

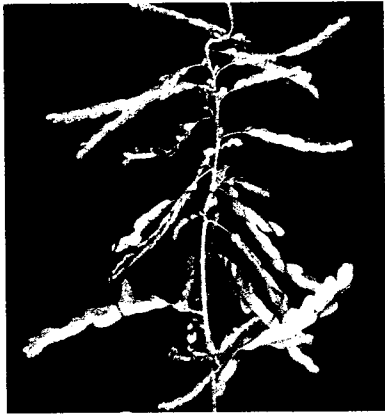

1. Pengambilan sampel

Sampel tumbuhan diambil dari beberapa daerah di Bandung dan Cimahi, dimana mereka tumbuh secara liar (Tabel 3.3). Sampel dimasukkan ke dalam plastik sampel yang telah diberi label. Sampel tumbuhan disimpan pada *ice box* yang telah diisi es batu untuk menjaga DNA sampel agar tidak rusak, selanjutnya di laboratorium sampel tumbuhan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C .

Tabel 3.3 Tumbuhan yang digunakan

No	Sampel	Lokasi Sampling	Keterangan
1	<i>Phyllanthus niruri</i> merah-1	Cimahi	
2	<i>Phyllanthus niruri</i> merah-2	Cimahi	
3	<i>Phyllanthus niruri</i> merah-3	Cimahi	
4	<i>Phyllanthus niruri</i> hijau-1	Bandung	
5	<i>Phyllanthus niruri</i> hijau-2	Cimahi	

Lanjutan Tabel 3.3

No	Sampel	Lokasi Sampling	Keterangan
6	<i>Phyllanthus niruri</i> kuning-1	Bandung	
7	<i>Phyllanthus niruri</i> kuning-2	Cimahi	
8	<i>Sauropus androgynus</i>	Bandung	

2. Isolasi DNA

Genom DNA diekstrak dari bahan segar, yaitu dari jaringan daun sampel. Isolasi DNA mengacu pada Slotta (2000) namun dilakukan beberapa modifikasi. Seberat 0,2 gram (g) jaringan daun digerus dalam nitrogen cair dan PVP sebanyak $\frac{1}{100}$ berat daun yang digunakan. Serbuk daun dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mililiter (ml) yang telah diisi dengan 350 mikroliter (μ l) *buffer* ekstraksi (tanpa CTAB), 150 μ l CTAB 2%, dan 100 μ l SDA 10%. Setelah larutan tercampur, kembali ditambahkan 7 μ l SDS 20% dan 2 μ l B-Mercaptoethanol lalu kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vorteks*.

Setelah larutan benar-benar tercampur secara merata, larutan diinkubasikan pada *waterbath* dengan suhu 65°C selama satu jam. Enzim proteinase K ditambahkan sebanyak 10 µl lalu ekstrak diinkubasi pada suhu 65°C selama dua jam. Setelah dua jam, kembali ditambahkan enzim proteinase K sebanyak 5 µl, lalu larutan dibiarkan selama 12-15 jam. Sebanyak 100 µl potasium asetat ditambahkan lalu dicampur hingga merata. Ekstrak didinginkan pada es batu selama 20 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rotasi per menit (rpm) selama 10 menit.

Bagian supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml yang lain dan ditambahkan isoamil alkohol dan kloroform dengan perbandingan 1:24 sebanyak setengah volume supernatan, lalu larutan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50 kali setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm. Bagian supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml yang baru, lalu ditambahkan alkohol 100% (v/v) yang telah didinginkan pada suhu -20°C hingga mencapai volume 1,5 ml. Ekstrak dihomogenkan dengan cara membolak-balikkannya sebanyak 20 kali dan disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapannya dicuci dengan alkohol 70% (v/v) lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit.

Endapan dikeringkan pada oven dengan suhu 50°C selama 10 menit lalu dilarutkan dalam *buffer* TE yang telah dicampur dengan RNase. DNA kembali diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu jam. Endapan RNA dan debris yang ada setelah dilakukan proses sentrifugasi dibuang dengan cara memindahkan supernatan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml yang baru. Hasil isolasi DNA

dikarakterisasi menggunakan elektroforesis apparatus, yaitu pada gel agarosa 1% (w/v) yang dilarutkan dalam *buffer* Tris Asetat-EDTA (TAE) 1x. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 volt (V) selama 30 menit, dan hasilnya dikarakterisasi di bawah sinar ultraviolet (UV).

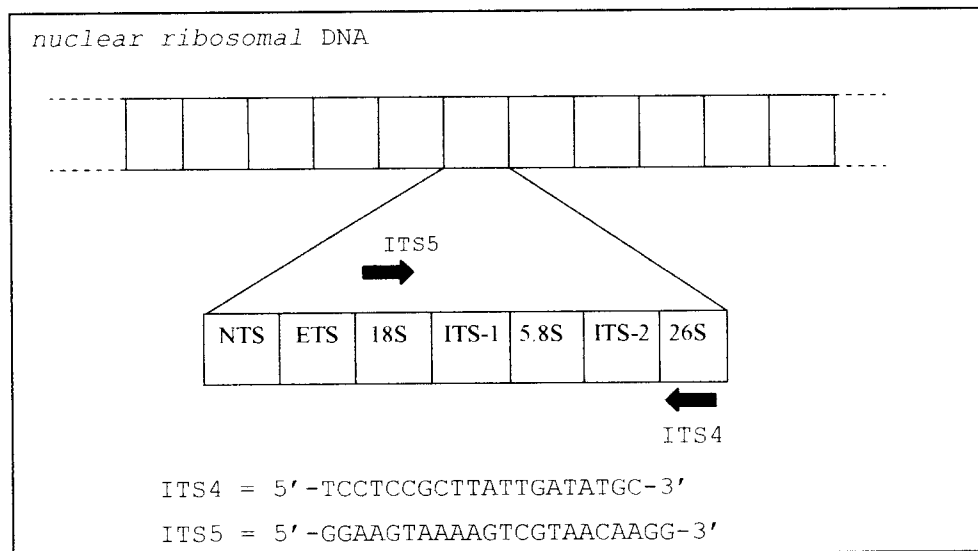
3. Amplifikasi DNA

Amplifikasi daerah ITS yang dilakukan mengacu pada Topik & Pancoro (2001) yang telah dimodifikasi. Amplifikasi daerah ITS nrDNA dilakukan dengan menggunakan satu pasang primer, ITS4 dan ITS5 (Gambar 3.1). PCR dilakukan pada volume 50 μ l dengan komposisi: 10x *buffer* sebanyak 5 μ l hingga konsentrasi akhir adalah sebesar 1x, 0,1 μ l dNTPs dengan konsentrasi 0.2 milimolar (mM), primer ITS4 dan ITS5 sebanyak 2,5 μ l dengan konsentrasi akhir sebesar 10 pmol/ μ l, 2 μ l DNA *template*, 3,125 μ l enzim *Taq* polimerase dengan konsentrasi sebesar 1 U/ μ l, MgCl₂ sebanyak 4 μ l dengan konsentrasi akhir sebesar 1,5mM, dan menambahkan air deion hingga volume akhir *mix* PCR adalah 50 μ l.

Profil PCR dilakukan mengacu pada Topik & Pancoro (2001), secara lengkap profil PCR ditampilkan pada Tabel 3.4. Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 1% (w/v) dalam *buffer* TAE 1x dan kemudian dibuat dokumentasinya.

Tabel 3.4. Profil PCR yang digunakan

Proses	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Siklus
<i>Initial Pre-melt</i>	95°C	0.50	1
<i>Denaturation</i>	95°C	0.30	35
<i>Annealing</i>	57°C	1.00	
<i>Extention</i>	71°C	2.00	
<i>Extention</i>	71°C	10.00	1
<i>Storage</i>	4°C	<i>Overnight</i>	-



Gambar 3.1. Skema daerah ITS yang diamplifikasi primer ITS4 dan ITS5 (Sumber : Topik & Pancoro, 2001)

4. Sikuensing DNA

Sikuensing nrDNA daerah ITS dilakukan di Macrogen Inc., Seoul, Korea Selatan terhadap delapan produk amplifikasi. Sikuensing dilakukan dengan menggunakan primer ITS4 pada mesin otomatis ABI377A dan pewarnaan dengan kit ABI PRISMTM Dye Terminator (Perkin Elmer).

5. Analisis Data

a. Verifikasi Data Hasil Sikuensing

Tahap akhir adalah analisis data hasil sikuensing. Sikuen-sikuen DNA disejajarkan dengan sikuen DNA daerah ITS yang ada di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk melihat homologinya dengan menggunakan fasilitas program BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*). Dari masing-masing proses BLAST, diambil 5-10 sikuen DNA yang paling serupa (dilihat dari

score yang dihasilkan), sikuen-sikuen ini digunakan sebagai sikuen DNA pembanding.

b. Preparasi Data

1) Pencarian motif daerah ITS

Daerah ITS memiliki beberapa motif yang lestari, juga ditandai dengan adanya situs restriksi. Motif yang umum ditemukan ada daerah ITS-1 adalah sikuen 5'-CAAGGAA yang ditemukan oleh Liu & Schardl pada tahun 1994 (Taufik, 2003). Motif yang biasa ditemukan pada daerah gen 5,8S rRNA, yaitu motif 25ds (5'-AAGGAA) dan sikuen terletak kurang lebih pada nukleotida ke-74 pada daerah gen 5.8S rRNA. Motif 5'-GAATTGCAGAATCC terletak *downstream* motif 25ds, motif ini disebut sebagai motif 14pb, ditemukan oleh Jobes & Thien pada tahun 1997 (Taufik, 2003).

Situs restriksi yang umum ditemukan adalah situs *EcoRV* (GATATC) yang terletak di daerah gen 5,8S rRNA (Taufik, 2003). Pencarian motif ini dilakukan dengan menggunakan program Genamics Expression versi 1.080, yaitu dengan menggunakan opsi *enzyme digester* dan *pattern finder*.

2) Penyeragaman arah sikuen daerah ITS

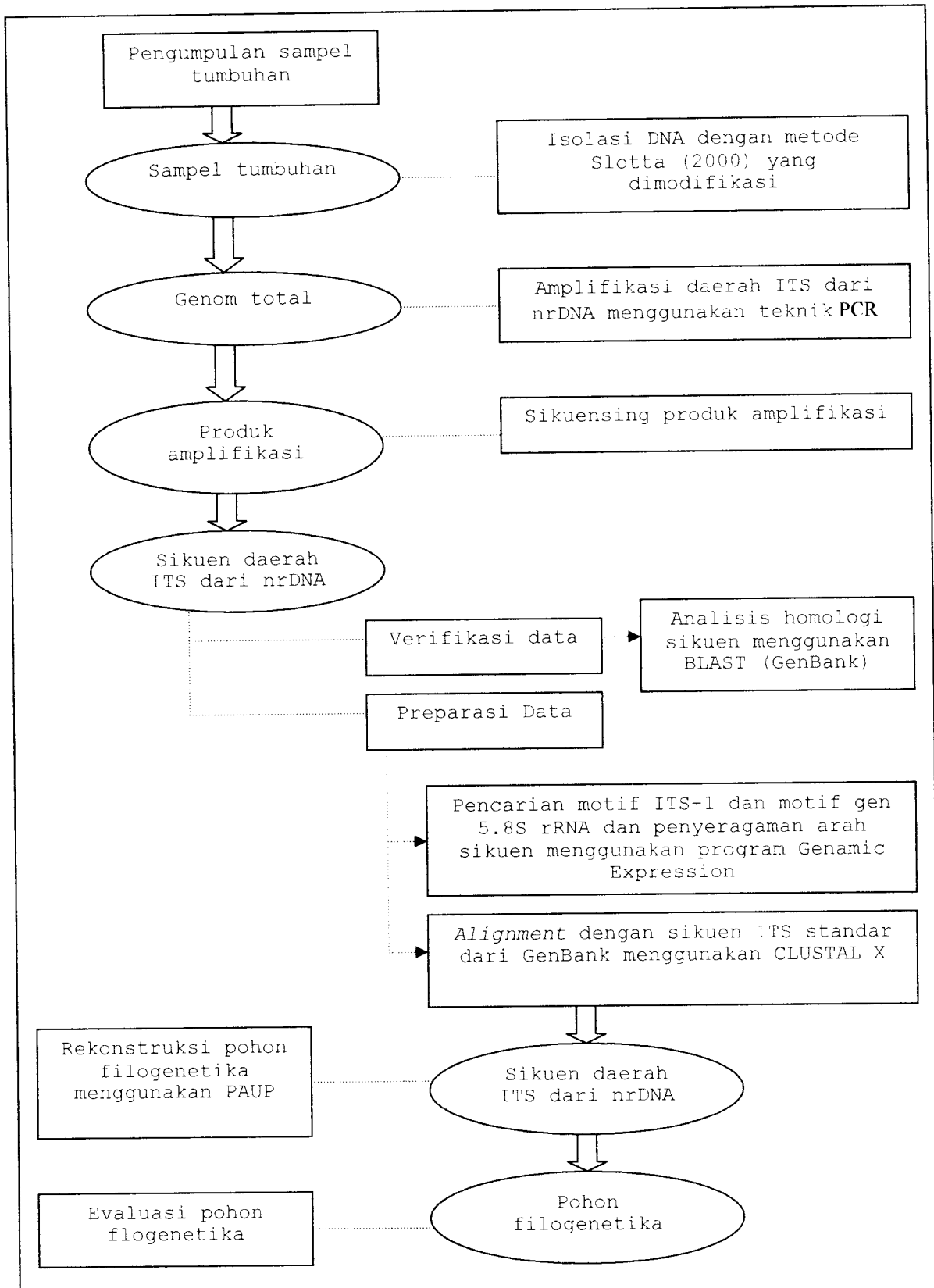
Pencarian motif dengan menggunakan program Genamics Expression memungkinkan identifikasi motif walaupun arahnya terbalik. Urutan motif ITS-1, situs restriksi *EcoRV* dan motif 14pb yang seharusnya ditemukan adalah dari arah ujung 5' ke ujung 3'. Pada sikuen DNA dengan sikuen motif terbalik dan urutan posisi motif terbalik, maka sikuen tersebut tersusun dari arah ujung 3' ke ujung 5' sehingga sikuen DNA tersebut dibalikkan melalui opsi *reverse complement*.

3) *Alignment* sikuen daerah ITS

Alignment sikuen daerah ITS dilakukan bertahap untuk menentukan batas daerah ITS-1, gen 5.8S rRNA, dan daerah ITS-2 dan untuk merekonstruksi pohon filogenetika. Dengan menggunakan program CLUSTAL X versi 1.64b, yaitu dengan menggunakan opsi *realign selected sequence*, sikuen-sikuen DNA sampel disejajarkan dengan sikuen daerah ITS pembanding yang diperoleh dari data GenBank sehingga didapat batas-batas sikuen daerah ITS. Setelah didapat sikuen daerah ITS-1, gen 5.8S rRNA, dan ITS-2, tahap selanjutnya adalah *alignment* kembali dengan menggunakan program CLUSTAL X versi 1.64b, yaitu dengan menggunakan opsi *complete alignment*.

c. Analisis Filogenetika

Analisis filogenetika berdasarkan metode parsimoni dilakukan dengan menggunakan program PAUP versi 4.0b10. Insersi dan delesi diperlakukan sebagai data yang hilang. Semua karakter diberi bobot yang sama. Data set dianalisis dengan *heuristic search method* dan *tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping*. *Random addition sequence* dengan *stepwise addition option* dilakukan sebanyak 1000 ulangan. Evaluasi pohon filogenetika dilakukan dengan menggunakan analisis *bootstrap* sebanyak 1000 ulangan. Indeks konsistensi (CI) dan indeks retensi (RI) dihitung untuk melihat konsistensi dan kekokohan pohon filogenetika yang terbentuk.



Gambar 3.2. Alur penelitian

