

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian jenis ini adalah penelitian deskriptif dengan pendekatan kuantitatif. (Sugiyono, 2019) menjelaskan bahwa penelitian deskriptif yaitu, penelitian yang dilakukan untuk mengetahui nilai variabel mandiri, baik satu variabel atau lebih (independen) tanpa membuat perbandingan, atau menghubungkan dengan variabel yang lain. Penelitian kuantitatif menekankan pada fenomena-fenomena objektif dan dikaji secara kuantitatif. Dalam metode penelitian kuantitatif, masalah yang diteliti lebih umum memiliki wilayah yang luas, tingkat variasi yang kompleks. Penelitian kuantitatif lebih sistematis, terencana, terstruktur, jelas dari awal hingga akhir penelitian.

Berdasarkan pengertian tersebut dapat disimpulkan bahwa penelitian deskriptif kuantitatif dilakukan dengan cara mencari informasi berkaitan dengan gejala yang ada, dijelaskan dengan jelas tujuan yang akan diraih, merencanakan bagaimana melakukan pendekatannya, dan mengumpulkan berbagai macam data sebagai bahan untuk membuat laporan. Deskriptif kuantitatif berupa preparasi sampel, ekstraksi DNA sampel hingga analisis keanekaragaman menggunakan primer *trnL-F*.

3.2. Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan dalam mekonstruksi pohon filogenetik merupakan sampel hasil isolasi koleksi kebun raya (Tabel 3.1) kemudian akan ditambah dengan sekuens *Orthosiphon* spp. yang ada di *GenBank* NCBI (Tabel 3.2).

Tabel 3.1. Sampel yang akan diekstraksi

No.	Spesies	Lokasi	No. Koleksi
1	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga ungu	Dramaga, Bogor, Jawa Barat	4894233_BU
2	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga ungu	Dramaga, Bogor, Jawa Barat	4906201_BU2
3	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga ungu	Kebun Raya Balikpapan, Kalimantan Timur	4906205_OBU1

No.	Spesies	Lokasi	No. Koleksi
4	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga putih	Dramaga, Bogor, Jawa Barat	4906203_BP1
5	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga putih	Kebun Raya Bogor	4906208_OBP1
6	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga putih	Kebun Raya Bogor	4906209_OBP2
7	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga putih	Kebun Raya Balikpapan, Kalimantan Timur	4921652_OBP3
8	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga putih	Kebun Raya Balikpapan, Kalimantan Timur	4921655_OBP4
9	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga putih	Dramaga, Bogor, Jawa Barat	4906214_OBP5
10	<i>Orthosiphon aristatus</i> bunga semi ungu	Dramaga, Bogor, Jawa Barat	4894235_BSU
11	<i>Orthosiphon</i> sp. nov.	Gunung Pancar, Jawa Barat	4906199_DP01
12	<i>Orthosiphon</i> sp. nov.	Gunung Pancar, Jawa Barat	4894229_DP02
13	<i>Orthosiphon</i> sp. nov.	Gunung Pancar, Jawa Barat	4894231_DP03
14	<i>Scutellaria discolor</i>	Wanggameti, Sumatera Barat	4939251_1SD
15	<i>Scutellaria slametensis</i>	Gunung Slamet, Jawa Tengah	4939252_3SS

Tabel 3.2. Sampel *Orthosiphon* spp. dari GenBank

No.	Spesies	No. Akses
1	<i>Orthosiphon aristatus</i>	NC085281
2	<i>Orthosiphon aristatus</i>	FJ593460
3	<i>Orthosiphon rotundifolius</i>	AY505476
4	<i>Orthosiphon parshii</i>	AJ505475
5	<i>Orthosiphon rubicundus</i>	AJ505477
6	<i>Orthosiphon wulfenioides</i>	MN116758
7	<i>Orthosiphon wulfenioides</i>	FJ593461

3.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan dari Desember 2023 hingga Februari 2024, bertempat di laboratorium molekuler Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi, Kebun Raya Bogor, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Ir. H. Juanda No. 13 Paledang, Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor, Jawa Barat.

3.4. Prosedur Penelitian

Prosedur dalam penelitian meliputi tahap preparasi sampel, isolasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif, amplikasi DNA, elektroforesis produk hasil PCR,

sequencing, dan analisis data. Adapun penjelasan prosedur penelitian yaitu sebagai berikut.

3.4.1. Preparasi Sampel

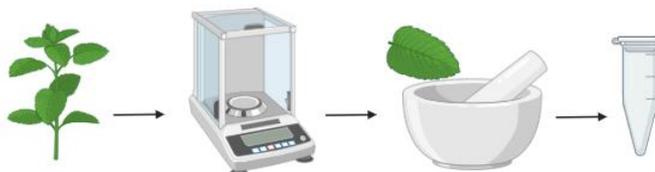
Sampel penelitian yang digunakan merupakan sampel daun segar yang dipetik dari koleksi Taman Obat, Kebun Raya Bogor. Sampel yang digunakan untuk ke tahap ekstraksi sebanyak 15, yaitu 13 aksesori sebagai *ingroup* dan 2 aksesori sebagai *outgroup* (Tabel 3.1).

3.4.2. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan mengikuti prosedur Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant) dengan beberapa penyesuaian oleh laboratorium Molekuler, BRIN, Kebun Raya Bogor. Tahap Isolasi DNA terdiri dari lima bagian yaitu penghancuran jaringan, lisis, pengikatan DNA, pencucian dan elusi DNA.

3.4.2.1. Penghancuran Jaringan (*Tissue Dissociation*)

Penghancuran jaringan dilakukan secara mekanik. Daun ditimbang sebanyak 0,05 gram, dicacah, dan diletakkan ke dalam mortar (Gambar 3.1). Selanjutnya, dalam mortar tersebut, satu sendok pasir silika ditambahkan untuk mempermudah penghalusan dan menjaga agar hasil tetap kering. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 mL menggunakan spatula.



Gambar 3.1. Langkah Penghancuran Jaringan

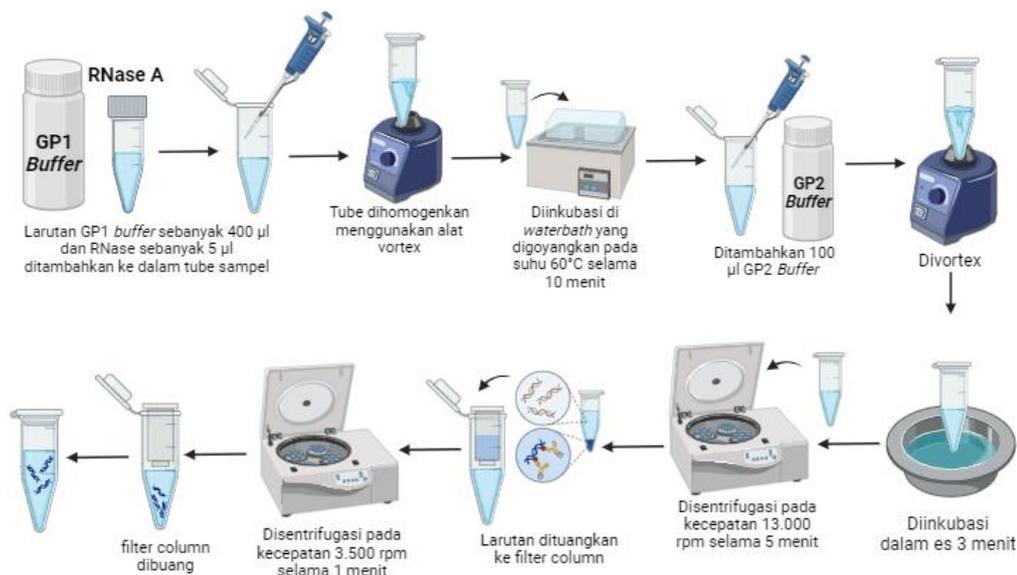
3.4.2.2. Lisis (*Lysis*)

Hasil gerusan di dalam tabung 1,5 mL, ditambahkan larutan lisis buffer GP1 sebanyak 400 μ l dan 5 μ l RNase A, kemudian dicampur menggunakan alat *vortex*. Sampel diinkubasi di dalam *waterbath* yang digoyangkan pada suhu 60°C selama 10 menit, dengan melakukan pembolakan sampel setiap 5 menit agar homogen (Gambar 3.2).

Waktu menunggu sampel sedang diinkubasi, selanjutnya dipersiapkan larutan Elution *Buffer* sebanyak sampel yang diperlukan, yaitu sejumlah 90-100 μ l per

sampel, dan dimasukkan ke dalam satu *microcentrifuge tube*. Larutan *Elution Buffer* dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 60°C tanpa digoyangkan, hal ini dilakukan untuk keperluan dalam Elusi DNA.

Setelah proses inkubasi sampel selesai, larutan *GP2 Buffer* ditambahkan ke dalam *tube* sebanyak 100 µl dan dicampur menggunakan alat *vortex*, kemudian diinkubasi langsung dalam es selama 3 menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Pada tahap berikutnya, *Filter Column* ditempatkan pada 2 ml *Collection Tube* yang telah dilabel sesuai dengan sampel, dan larutan dituangkan ke dalam *Filter Column*. Kemudian, sampel disentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm selama 1 menit, dan *Filter Column* dibuang. Selanjutnya, supernatan dari 2 ml *Collection Tube* dituangkan ke dalam 1,5 ml *microcentrifuge tube* baru yang telah dilabel sesuai dengan sampel.

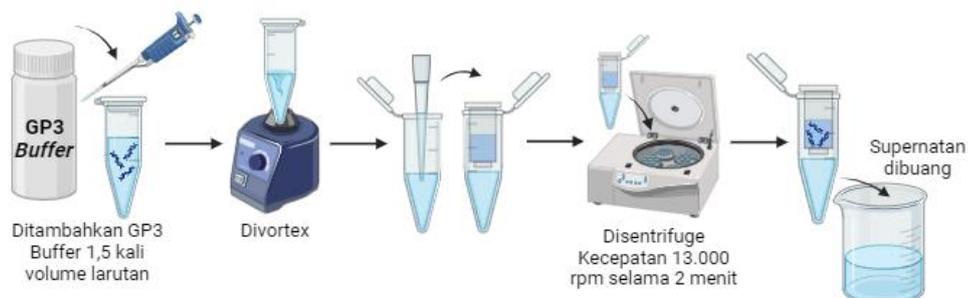


Gambar 3.2. Langkah isolasi DNA tahap lisis

3.4.2.3. Pengikatan DNA (*DNA Binding*)

GP3 Buffer ditambahkan sebanyak 1,5 kali volume larutan, dan kemudian dicampur segera menggunakan *vortex* selama 5 detik. Selanjutnya, *GD Column* ditempatkan dalam 2 ml *Collection Tube* baru yang telah diberi label sesuai dengan sampel (Gambar 3.3). Kemudian, 700 µl larutan yang ada di dalam *microcentrifuge tube* dipindahkan ke dalam *GD Column* dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang ke dalam wadah khusus untuk membuang bahan kimia, yang tersedia di lemari asam. Selanjutnya, *GD Column* ditempatkan kembali

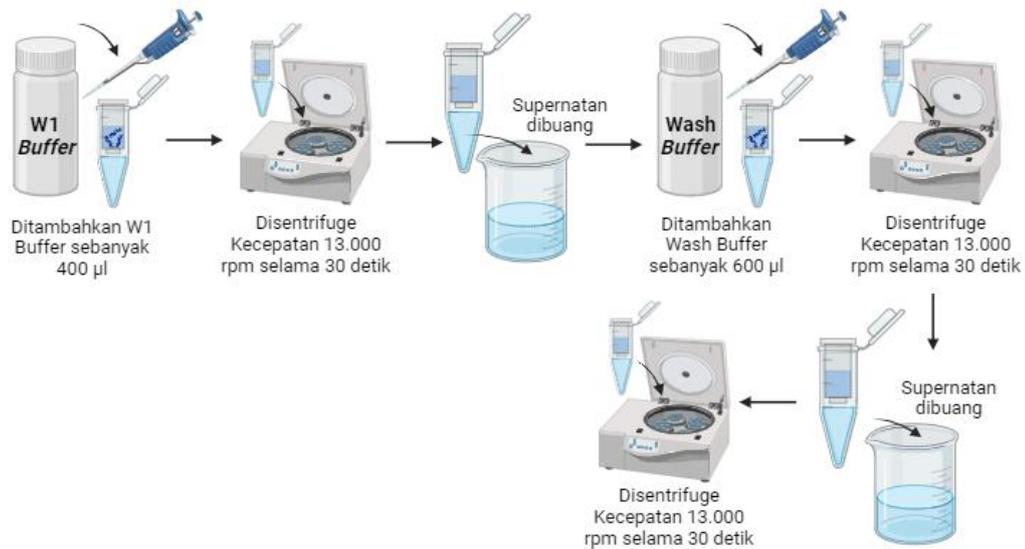
dalam 2 ml *Collection Tube* yang digunakan sebelumnya. Sisa larutan yang ada di *microcentrifuge tube* kemudian dipindahkan ke dalam *GD Column* tersebut dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit. Kemudian, supernatan dibuang ke dalam wadah khusus untuk membuang bahan kimia. Terakhir, *GD Column* ditempatkan kembali dalam 2 ml *Collection Tube* yang digunakan sebelumnya.



Gambar 3.3. Langkah pengikatan DNA dalam isolasi

3.4.2.4. Pencucian (*Wash*)

Larutan *W1 Buffer* ditambahkan ke dalam *GD Column* sebanyak 400 μ l, dan kemudian *GD Column* disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 detik. Supernatan (cairan yang ada di bawah) dibuang ke dalam wadah khusus untuk membuang bahan kimia. Selanjutnya, *GD Column* ditempatkan kembali dalam 2 ml *Collection Tube* yang digunakan sebelumnya. Pada tahap berikutnya, 600 μ l *Wash Buffer* ditambahkan ke dalam *GD Column*, kemudian *GD Column* disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 detik. Kembali, supernatan dibuang ke dalam wadah khusus untuk membuang bahan kimia. *GD Column* ditempatkan kembali dalam 2 ml *Collection Tube* yang digunakan sebelumnya, dan kemudian dilakukan sentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik agar cairan benar-benar habis. Tahapan pencucian (*wash*) divisualisasikan pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4. Langkah isolasi DNA tahap pencucian

3.4.2.5. Elusi DNA (*DNA Elution*)

GD Column yang telah kering dipindahkan ke dalam 1,5 ml *microcentrifuge tube* baru yang telah dilabel sesuai dengan sampel. Kemudian, 80 µl *Elution Buffer* yang telah dipanaskan kemudian ditambahkan tepat di bagian tengah kolom *GD Column* (Gambar 3.5). Setelah itu, dibiarkan selama 3-5 menit untuk memastikan *Elution Buffer* terserap sepenuhnya. Selanjutnya, sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik untuk menurunkan DNA murni ke dalam *microcentrifuge tube*, dan *GD Column* dibuang. Setelah tahap tersebut, DNA total dalam *microcentrifuge tube* diperiksa dengan elektroforesis. Terakhir, sampel DNA total disimpan di dalam *freezer* dan menjadi siap digunakan.



Gambar 3.5. Langkah elusi DNA dalam isolasi

3.4.3. Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA

Pengujian secara kualitatif dilakukan menggunakan proses elektroforesis *Agarose* ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 0,4 gram dan

dilarutkan dalam 40 ml TAE 1x hingga menghasilkan *agarose* 1%. *Agarose* yang telah dilarutkan, dipanaskan dalam *microwave* dalam waktu kurang lebih 1 menit dengan kondisi mulut tabung erlenmeyer ditutup menggunakan *plastik wrap* dan diberi lubang sebagai sirkulasi. Pemanasan gel *agarose* dilakukan hingga larutan homogen berwarna bening. Hasil gel *agarose* bening ditunggu hingga hangat dan setelah hangat ditambahkan 1 μ L Gel *Red Nucluease Acid* dan dihomogenkan secara perlahan. *Agarose* cair dituangkan ke dalam cetakan (*tray*) yang telah dipasang sisiran (*comb*). Sisiran diangkat setelah *agarose* menjadi padat. Sebanyak 5 μ L DNA genom diambil dan dihomogenkan dengan 1 μ L *loading dye* 6x pada tatakan silikon menggunakan mikro pipet kemudian hasil homogen tersebut dimasukkan ke dalam sumuran *agarose*. Kemudian pada ujung sebelah kanan atau kiri sumur *agarose* ditambahkan Ladder 1 Kb sebanyak 1 μ L.

Proses elektroforesis ini dilakukan dalam waktu 25 menit pada tegangan 100 volt. Hasil elektroforesis ditampilkan menggunakan alat transiluminasi UV atau sistem *Gel Documentation System*. Uji kuantitatif menggunakan nano spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Sebanyak 2 μ L DNA genom diletakkan pada *Nano Drop Spektrofotometer Thermo*. Absorbansi Kuantifikasi DNA diukur (λ 260/280) dan hasil akan tervisualisasi pada layar monitor alat.

3.4.4. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA menggunakan mesin TaKaRa PCR Thermal Cycler, dilakukan sebanyak 35 siklus dengan tahapan *pre-denaturation*, *denaturation*, *annealing*, *extension*, dan *final extensions* seperti pada Tabel 3.5 dan Gambar 3.6. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan primer *trnL-F intergenic spacer reverse* dan *forward* yang sudah dilakukan proses optimasi primer untuk mengetahui kondisi optimal proses amplifikasi (Tabel 3.3). Kegiatan amplifikasi diawali dengan pembuatan master mix PCR yang disajikan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.3. Primer *trnL-F intergenic spacer* yang digunakan

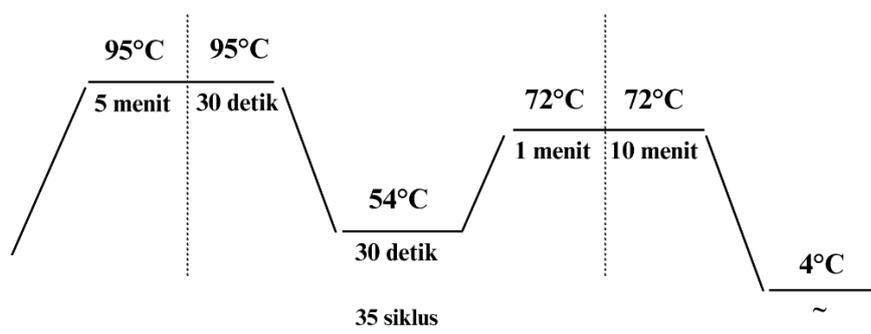
Nama Primer	Urutan Basa	TA	Sumber
Primer f (Reverse)	5' -ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG- 3'	54°C	(Taberlet <i>et al.</i> , 1991)
Primer c Forward	5'- GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC -3'		

Tabel 3.4. Komposisi master mix PCR primer *trnL-F intergenic spacer*

Bahan	Volume
DNA	1 μ l
DreamTaq Green PCR Master Mix 2X	6.25 μ l
Primer <i>trnL-C forward</i> (10 ng/ μ l)	0.25 μ l
Primer <i>trnL-F reverse</i> (10 ng/ μ l)	0.25 μ l
DNA free nuclease water	4.75 μ l
Total vol reaksi/ sampel	12.5 μ l

Tabel 3.5. Tahapan amplifikasi DNA primer *trnL-F intergenic spacer*

Tahapan	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Waktu
<i>Pre-denaturation</i>	95	5 menit
<i>Denaturation</i>	95	30 detik
<i>Annealing</i>	54	30 detik
<i>Extension</i>	72	1 menit
<i>Final extensions</i>	72	10 menit

**Gambar 3.6.** Program PCR untuk Amplifikasi *intergenic spacer trnL-F*

3.4.5. Elektroforesis Produk PCR

Elektroforesis DNA genom menggunakan metode Sambrook dan Russel tahun 2001. *Agarose* ditimbang sebanyak 0.4 gram dan dilarutkan dalam 40 ml *buffer* TAE 1X (Tris Base, asam asetat glasial, EDTA). *Agarose* dipanaskan dalam *microwave* selama 1 menit hingga homogen (bening), selanjutnya ditambahkan 1 μ L GelRed dan homogenkan. *Agarose* cair dituangkan ke dalam cetakan (*tray*) yang telah dipasang sisiran (*comb*). Sisiran diangkat setelah *agarose* menjadi padat. Gel *agarose* 1% dipindah ke *chamber* elektroforesis yang berisi *running buffer* TAE 1x sampai gel terendam. Sebanyak 5 μ L DNA genom diambil dan dihomogenkan dengan 1 μ L *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *agarose*. *Ladder* 1 Kb digunakan pada ujung sebelah kiri atau kanan DNA genom. Setelah itu, dilakukan *running* selama 30 menit pada tegangan 100 volt dengan Mupid-exV.

Visualisasi dilakukan menggunakan BIO-RAD GelDoc™ EZ Imager yang terhubung ke komputer.

3.4.6. Sequencing

Hasil elektroforegram amplifikasi PCR berupa pita tunggal (*single band*) yang tebal dinyatakan berhasil dan untuk sampel dengan pita tipis dilakukan amplifikasi ulang. Hasil amplifikasi PCR dikirim ke jasa *sequencing* Apical Scientific Laboratory, Malaysia. Proses persiapan *sequencing* dilakukan dengan melakukan *double* cek pada seluruh sampel hasil visualisasi elektroforesis. Sampel yang dikirimkan merupakan sampel hasil PCR dengan volume 30-50 µl dengan kualitas pita hasil visualisasi tebal tanpa *smear*. Sampel hasil PCR dipindahkan ke *96-well plate* kemudian *packing* menggunakan *ice pack* dan dimasukkan ke *ice box*.

3.4.7. Analisis Data

1. Analisis Pohon Filogenetik

Data hasil sekuensing berupa kromatogram sekuen *forward* dan *reverse* diolah dan disunting terlebih dahulu untuk dapat sekuen *contig* dengan aplikasi MEGA 11. Penyuntingan sekuen dilakukan dengan pemotongan (*trimming*) beberapa basa yang tidak dapat dilakukan pembacaan/ yang kurang bagus di bagian awal dan akhir dari sekuen *forward* maupun *reverse*. Ujung sekuens yang memiliki gap disatukan hingga dapat sekuens utuh (Nurkholidah, 2019).

Sekuen sampel selanjutnya disejajarkan (*multiple alignment*) kemudian dipotong (*trimming*) supaya sejajar dan setiap sekuen sama Panjang. Kontruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan software MEGA 11 dengan metode *Neighbour-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) dan model *p-distance* dengan 1000 kali *bootstrap*.

2. Analisis Komposisi dan Urutan Basa Nukleotida, Jarak Genetik dan Homologi

Sekuen *contig* diunggah ke laman NCBI untuk dibandingkan dengan data genbank melalui proses Basic Local Alignment Search Tool Blast (BLAST) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. BLAST bertujuan untuk mencari identitas awal sampel *Orthosiphon* sp. nov.. Hasil BLAST diunduh dalam bentuk FASTA untuk selanjutnya dianalisis lebih lanjut menggunakan MEGA 11 guna mengetahui dan mengurutkan kesamaan tiap sekuen DNA (Hariri *et al.*, 2021). Selain itu juga,

dilakukan analisis panjang genetik, jumlah dan urutan nukleotida menggunakan MEGA 11 di fitur bagian analisis serta dilakukan analisis homologi menggunakan nilai CI dan RI menggunakan software PAUP 4.0 beta 10 Win.