

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian merupakan seperangkat prosedur untuk menjawab pertanyaan penelitian (Ranganathan & Aggarwal, 2018). Penelitian ini menggunakan desain penelitian deskriptif yang memiliki tujuan untuk mendeskripsikan secara sistematis dan akurat suatu fenomena (Isaac & Michael, 1979) guna mengungkapkan hubungan serta makna yang baru antar variabel. Dengan demikian, desain penelitian deskriptif digunakan untuk mengungkapkan dan mendeskripsikan hubungan filogenetik Lamiaceae berdasarkan barcode DNA inti dan kloroplas parsial untuk upaya konservasi dan pencegahan adulterasi.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama enam bulan dari Desember 2023 - Mei 2024 secara *in silico*.

3.3 Alat Penelitian

Alat yang dibutuhkan penelitian ini tertera pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Alat penelitian.

No.	Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Laptop	HP Pavilion Laptop 13	1 unit
2.	<i>GenBank</i>	<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i>	1 unit
3.	<i>Barcode of Life Data System (BOLD)</i>	Versi 4	1 unit
4.	<i>Notepad</i>	Versi 11.2306.15.0	1 unit
5.	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)</i>	Versi 11.0.13	1 unit

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengumpulan Sampel Sekuens DNA Lamiaceae

Sampel yang dikumpulkan terdiri atas sekuens DNA 52 spesies yang mewakili 11 genus Lamiaceae (**Tabel 3.2**). Daftar genus diperoleh dari laman

Barcode of Life Data System (<https://www.boldsystems.org/index.php/>). Sekuens yang dikumpulkan berupa *ITS*, *matK*, dan *rbcL* parsial. Khusus untuk *ITS*, sekuens yang dipilih adalah *ITS1* dan *ITS2* parsial serta *5.8S* lengkap. Sekuens DNA diperoleh dari *GenBank National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan memasukkan nama spesies dan barkode DNA-nya ke dalam kotak pencarian. Sekuens setiap gen disimpan di *Notepad* dalam bentuk *FASTA format* dengan penulisan “>Nomor Akses_i>Nama Spesies_Barkode DNA_Sumber” untuk dibuat *database* sekuens DNA multilokus Lamiaceae.

Pemilihan genus dan spesies berfokus pada hasil penelitian-penelitian terdahulu yang membahas adulterasi dan kesulitan dalam merekonstruksi filogenetik Lamiaceae. Dua kriteria lebih lanjut ditentukan dalam pemilihan spesies, yakni ketersediaannya dalam *GenBank* dan jumlah pasangan basa untuk setiap barkode DNA. Satu spesies dari famili *Bignoniaceae*, *Spathodea campanulata*, dipilih sebagai *outgroup* karena merupakan *sister taxon* dari Lamiaceae (ordo Lamiales) (Simpson, 2010).

Tabel 3.2 Sampel sekuens DNA Lamiaceae dan *outgroup*.

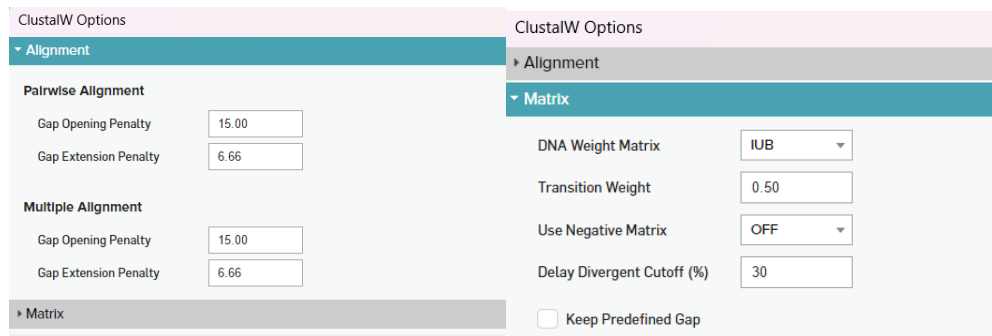
No.	Genus	Spesies	Nomor Akses_i		
			<i>ITS</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
1.	<i>Orthosiphon</i>	<i>Orthosiphon aristatus</i>	FJ593403	LC456391	MW789616
2.		<i>Orthosiphon stamineus</i>	AY506663	KM658969	MH069809
3.	<i>Thymus</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	KR150171	MF350183	MK105914
4.		<i>Thymus caespititius</i>	GU381457	HM850802	HM850398
5.		<i>Thymus vulgaris</i>	AY506646	OP243225	MN972464
6.		<i>Thymus quinquecostatus</i>	EU556524	LC618903	LC618880
7.		<i>Thymus mongolicus</i>	MH808603	MN433407	MN185199
8.	<i>Ocimum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	MW150025	MF694868	ON755091
9.		<i>Ocimum tenuiflorum</i>	MW150027	MF468149	JN114828
10.		<i>Ocimum gratissimum</i>	MW150026	MH552359	MW150006
11.	<i>Mentha</i>	<i>Mentha piperita</i>	KY072944	KX783716	JQ230988
12.		<i>Mentha spicata</i>	GU381394	KC571807	KU499887

No.	Genus	Spesies	Nomor Akses		
			<i>ITS</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
13.	<i>Mentha</i>	<i>Mentha arvensis</i>	KY072946	MG224998	HQ590183
14.		<i>Mentha aquatica</i>	KR611529	KP172053	KC584892
15.		<i>Mentha suaveolens</i>	GU381395	KP172057	MG223550
16.		<i>Mentha longifolia</i>	KR611531	HQ902745	ON755102
17.		<i>Mentha canadensis</i>	KY072951	MT929800	JN407303
18.	<i>Salvia</i>	<i>Salvia splendens</i>	MF622186	KX783777	ON755108
19.		<i>Salvia przewalskii</i>	MH808595	MN433404	JQ934026
20.		<i>Salvia officinalis</i>	KJ584196	HE967482	ON755112
21.		<i>Salvia miltiorrhiza</i>	MT039859	FJ513168	JQ934009
22.		<i>Salvia rosmarinus</i>	OQ165223	MH552339	MT931624
23.		<i>Salvia fruticosa</i>	KJ584194	HQ902726	HM590078
24.		<i>Salvia plebeia</i>	KU563788	MH660151	JQ934021
25.	<i>Clerodendrum</i>	<i>Clerodendrum cyrtophyllum</i>	KP092826	KJ888428	KJ939237
26.		<i>Clerodendrum japonicum</i>	KP092847	MK551817	GQ436521
27.		<i>Clerodendrum bungei</i>	EU591963	MH659049	JQ618463
28.		<i>Clerodendrum colebrookianum</i>	KX079329	MK551754	MK241954
29.	<i>Callicarpa</i>	<i>Callicarpa dichotoma</i>	KP092811	LC680459	LC694383
30.		<i>Callicarpa americana</i>	ON820115	MF350069	KY626890
31.		<i>Callicarpa macrophylla</i>	KP092818	OP032135	KF443315
32.		<i>Callicarpa kochiana</i>	KP092816	OP032127	KJ688019
33.		<i>Callicarpa giraldii</i>	FJ593347	OP032121	MH657300
34.	<i>Lamium</i>	<i>Lamium album</i>	JX893229	MN311840	FJ395588
35.		<i>Lamium amplexicaule</i>	MN718246	MN433402	OL434812
36.		<i>Lamium galeobdolon</i>	KF529538	ON286905	JN891020
37.	<i>Origanum</i>	<i>Origanum majorana</i>	JX162957	KX783725	JQ230991
38.		<i>Origanum vulgare</i>	AY506647	MF694869	ON755119

No.	Genus	Spesies	Nomor Akses		
			<i>ITS</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
39.	<i>Origanum</i>	<i>Origanum onites</i>	JX163054	HQ902752	HQ902807
40.		<i>Origanum dictamnus</i>	EU252137	FR719089	FR720564
41.	<i>Stachys</i>	<i>Stachys sylvatica</i>	KF529644	JN895511	ON755118
42.		<i>Stachys palustris</i>	KF529624	JN894812	HE574636
43.		<i>Stachys floridana</i>	KF529590	OL434945	HQ644074
44.		<i>Stachys recta</i>	KF529631	KJ204541	KJ746271
45.		<i>Stachys arvensis</i>	KF529568	HM850806	MG224452
46.		<i>Stachys cretica</i>	KF529583	HQ902708	HQ902776
47.		<i>Scutellaria</i>	<i>Scutellaria baicalensis</i>	MH711530	MH660079
48.	<i>Scutellaria lateriflora</i>		MK356052	MG225186	HQ590266
49.	<i>Scutellaria indica</i>		MH808599	FJ513171	MN167869
50.	<i>Scutellaria barbata</i>		MF193539	FJ513170	FJ513144
51.	<i>Scutellaria viscidula</i>		MF193526	HQ676587	HQ676583
52.	<i>Scutellaria rehderiana</i>		JX893232	HQ676588	FJ513147
53.	<i>Spathodea</i> (Bignoniaceae)		<i>Spathodea campanulata</i>	MF616608	MF476853

3.4.2 Pensejajaran (*Alignment*) Sekuens DNA

Seluruh sekuens DNA disejajarkan berdasarkan setiap jenis barcode menggunakan perangkat lunak MEGA 11. Dua jenis pensejajaran dilakukan dengan ClustalW yang terintegrasi di dalam MEGA 11, yaitu *pairwise* yang membandingkan dua sekuens dan *multiple alignment* yang membandingkan seluruh sekuens secara bersamaan. Tahapan ini dilaksanakan dengan menggunakan menu *default* (**Gambar 3.1**).



Gambar 3.1 Peraturan menu pensejajaran sekuens DNA dengan ClustalW di MEGA 11.

Tujuan pensejajaran adalah untuk mengidentifikasi sekuens homolog antarsampel (Munjali *et al.*, 2019). Hal tersebut akan tercapai saat MEGA memasukkan celah dengan panjang berbeda sehingga sekuens yang homolog akan berada pada posisi yang sama. Celah yang terbentuk merepresentasikan insersi dan delesi pada genom (Chatzou *et al.*, 2016). Keduanya merupakan parameter pensejajaran krusial dalam rekonstruksi pohon filogenetik (Munjali *et al.*, 2019). Adapun tingkat homologi sampel dilihat dari jumlah situs yang terkonservasi.

3.4.3 Pemotongan (*Trimming*) Sekuens DNA

Sekuens DNA dipotong pada daerah *upstream* dan *downstream* menggunakan program MEGA 11, sesuai dengan jenis barcode DNA. *Trimming* dilakukan untuk menghapus sekuens pada kedua daerah yang tidak sepenuhnya informatif dan dapat menurunkan akurasi analisis filogenetik. Tahapan ini dilakukan secara manual dengan menghapus sekuens pada kedua daerah. Barcode DNA yang telah dipotong akan mempunyai ukuran pasangan basa yang seragam berdasarkan jenisnya.

3.4.4 Rekonstruksi Pohon Filogenetik

Seluruh sekuens DNA digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik model *maximum parsimony* menggunakan MEGA 11. Rekonstruksi pohon bertujuan untuk memvisualisasikan kekerabatan dari semua sampel. Sebanyak empat pohon filogenetik akan dibuat, yakni tiga berbasis setiap barcode DNA dan satu hasil gabungan dari ketiganya. Rekonstruksi pohon dilakukan dengan menggunakan menu *default* yang tersedia di MEGA 11 (**Gambar 3.2**).

M11: Analysis Preferences	
Phylogeny Reconstruction	
Option	Setting
ANALYSIS	
Statistical Method	→ Maximum Parsimony
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	→ Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications	→ 1000
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	→ Nucleotide
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	→ Use all sites
Site Coverage Cutoff (%)	→ Not Applicable
TREE INFERENCE OPTIONS	
MP Search Method	→ Subtree-Pruning-Regrafting (SPR)
No. of Initial Trees (random addition)	→ 10
MP Search level	→ 1
Max No. of Trees to Retain	→ 100
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads	→ 3

Gambar 3.2 Peraturan menu rekonstruksi pohon filogenetik *maximum parsimony* di MEGA 11.

Heuristic search yang dipilih guna menemukan topologi pohon terbaik adalah *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR). Pertama, sebuah sub-pohon dari pohon terbaik saat itu dipisahkan (*pruned*). Kedua, sub-pohon yang terpisah digabungkan ke cabang lain dari pohon yang tersisa (*regrafted*) sehingga terbuat topologi baru yang kemungkinan kecocokannya dapat dihitung ulang. Prosedur ini diulangi untuk semua kemungkinan *regrafting* sub-pohon dan semua bagian dari pohon terbaik. Jika topologi dengan kemungkinan terbaik menunjukkan peningkatan yang signifikan dari pohon terbaik saat itu, topologi tersebut menjadi pohon terbaik yang baru. Hal ini diulangi sampai tidak ada lagi peningkatan perbaikan topologi pohon yang signifikan.

3.4.5 Analisis Data

Pohon filogenetik dianalisis dengan prinsip *parsimony*, *bootstrap* 1.000 ulangan dan perhitungan indeks konsistensi (CI) serta indeks retensi (RI). Prinsip *parsimony* menyatakan bahwa penjelasan yang paling sederhana untuk menjelaskan jumlah pengamatan terbesar lebih diutamakan dibandingkan penjelasan yang lebih kompleks (Kannan & Wheeler, 2012). Metode berbasis karakter (urutan nukleotida) ini meminimalisasi perubahan karakter untuk menyimpulkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik.

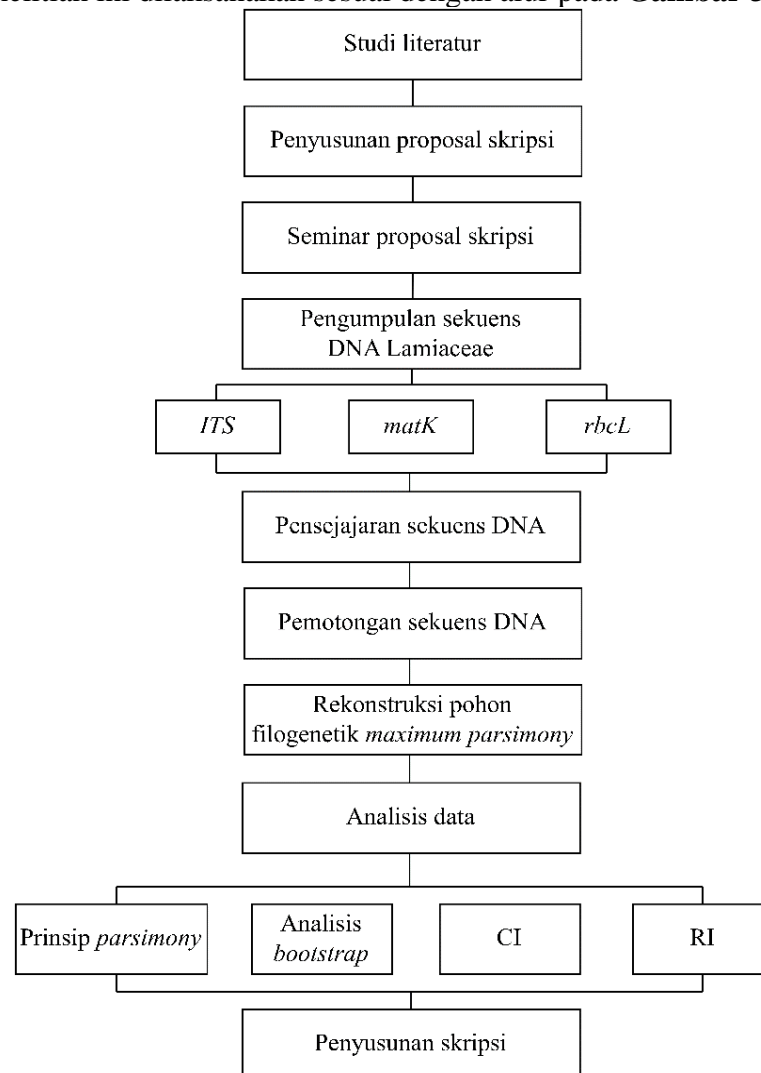
Bootstrapping berfungsi untuk mengevaluasi reliabilitas topologi pohon yang terbentuk. Nilai *bootstrap* menunjukkan bahwa dari 1.000 ulangan, berapa kali cabang yang sama teramati ketika mengulangi rekonstruksi pohon dengan

menyusun ulang sampel sekuens DNA. Secara statistik, nilai yang mendekati 100% mengindikasikan reliabilitas tinggi akan hubungan kekerabatan pada cabang pohon (Ojha *et al.*, 2022).

Nilai CI dan RI digunakan untuk menganalisis kecocokan data pada pohon, yaitu dengan mengukur homoplasi dan sinapomorfi. Keduanya mempunyai rentang nilai dari 0 hingga 1. Nilai CI mendekati 1 mengindikasikan homoplasi yang rendah pada dataset. Artinya topologi pohon konsisten dengan hubungan evolusi yang diusulkan (Klingenberg & Gidaszewski, 2010). Nilai RI yang mendekati 1 menunjukkan sinapomorfi tinggi sehingga dataset lebih akurat dalam menggambarkan hubungan kekerabatan (Mickevich & Lipscomb, 1991).

3.5 Alur Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan sesuai dengan alur pada **Gambar 3.3**.



Gambar 3.3 Bagan alur penelitian.