

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif. Menurut Sugiyono, (2012) penelitian deskriptif merupakan suatu metode yang mendeskripsikan atau memberi gambaran tentang objek yang diteliti melalui semua data atau sampel yang telah terkumpul, tanpa melakukan analisis dan membuat kesimpulan yang berlaku umum. Data diperoleh dari sekuen DNA daerah ITS dengan jumlah 60 species dalam 3 komponen (ITS 1, 5,8S dan ITS 2) untuk merekonstruksi pohon fenetik dalam menentukan kekerabatan antara tumbuhan obat dan non obat.

Data yang diperoleh kemudian dideskripsikan dan dianalisis secara kualitatif berdasarkan sumber literatur dan teori-teori yang relevan hingga menjadi bukti dan fakta mengenai hubungan kekerabatan tanaman obat dan tanaman non obat berdasarkan genom inti.

B. Definisi Operasional

Definisi operasional diperlukan untuk menjelaskan hal-hal khusus yang dimaksud dalam penelitian sehingga tidak terjadi perbedaan persepsi dalam memahami istilah-istilah yang dimaksud dalam penelitian. Berikut definisi operasional yang dijabarkan berdasarkan istilah yang terdapat dalam penelitian ini :

1. Tanaman non obat memiliki kegunaan umum sebagai tanaman hias. Dari hasil studi literatur hingga tanggal 5 Juli 2017, tidak ditemukan khasiat atau zat aktif dari tanaman-tanaman tersebut. Kemungkinan tidak adanya studi mengenai kegunaan tanaman non obat ini sebagai obat karena masyarakat terfokus pada fungsi dari tanaman-tanaman ini tetapi memiliki metabolit sekunder, diantaranya steroid, triterpenoid, benzene, etanol, aseton dan eter yang ditemukan pada batang dan daun (Johnson & Janakiraman, 2013)

2. Menurut Naemah, 2012 tanaman obat dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu tanaman obat tradisional, tanaman obat potensial dan tanaman obat modern.
 - a. Tumbuhan obat tradisional, merupakan jenis tumbuhan yang diketahui atau dipercaya masyarakat memiliki khasiat obat dan telah digunakan sebagai bahan baku obat tradisional.
 - b. Tumbuhan obat modern, merupakan jenis tumbuhan yang secara ilmiah telah dibuktikan mengandung senyawa atau bahan bioaktif berkhasiat obat, dan penggunaannya dapat dipertanggung jawabkan secara medis.
 - c. Tumbuhan obat potensial, merupakan jenis tumbuhan yang diduga mengandung atau memiliki senyawa atau bahan bioaktif obat, tetapi belum dibuktikan penggunaannya secara ilmiah-medis sebagai bahan obat dan penggunaannya secara tradisional belum diketahui.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari hingga April 2017. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Daftar alat dan spesifikasinya yang akan digunakan selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3.1. Alat Penelitian

No. (1)	Alat (2)	Spesifikasi (3)	Kegunaan (4)	Jumlah (5)
1.	Laptop	Asus	Pengolahan data	1 Buah
2.	Koneksi Internet	-	Mencari sekuens DNA	1 buah

Daftar bahan dan jumlahnya yang akan digunakan selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.2

T	No.	Nama Bahan	Kegunaan	Jumlah
a	(1)	(2)	(3)	(4)
b				
e	1.	Sekuens DNA tanaman obat dan non obat dari http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Sumber data sampel	240 sampel
l	2.	Program komputer ClustalX	Alignment data sampel	1 <i>software</i>
3	3.	Program komputer MEGA4	Pembentukan pohon fenetik	1 <i>software</i>

2. Bahan Penelitian

E. Sumber Data

Data sekuen DNA daerah ITS tanaman obat dan non obat didapat dari GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) yaitu masing-masing sebanyak 60 spesies. Dengan rincian tanaman obat 42 spesies dan tanaman non obat 18 spesies.

F. Preparasi Data

1. Penentuan Batas Daerah Target

Pada setiap sekuen 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 sekuen yang diuji pada studi ini murni sekuen daerah ITS. Untuk menentukan batas daerah ITS maka diperlukan satu atau beberapa sekuen yang telah diketahui batas daerah-daerahnya. Selanjutnya sekuen tersebut disebut sebagai sekuen pembanding.

Sekuen daerah ITS1 dari seluruh sekuen DNA pembanding disejajarkan (*alignment*) dengan menggunakan CLUSTAL X. Hasil *alignment* diperiksa dengan menggunakan BIOEDIT. Kemudian data sekuen DNA pembanding tersebut dipindahkan kembali ke program CLUSTAL X. Lalu dilakukan penyajaran kembali (*realignment*) dengan opsi '*realign selected sequence*' pada sekuen DNA uji.

Penentuan batas untuk daerah 5,8S, ITS2 dan gabungan pun dilakukan dengan proses yang sama dengan sekuen ITS1.

2. *Alignment*

Pertama-tama dilakukan alignment untuk masing-masing daerah (ITS1, 5,8S, ITS2 dan gabungan) dengan menggunakan Clustal X. Kemudian masing-masing *alignment* secara keseluruhan dengan menggunakan opsi *complete alignment*. Hasil *alignment* secara keseluruhan ini yang kemudian akan digunakan untuk membangun pohon fenetik.

G. Pembuatan Pohon Fenetik

Analisis fenetik dilakukan dengan menggunakan MEGA versi 4 dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Group with Mean Arithmetic* (UPGMA). Dibuat pohon fenetik dengan menggunakan data awal, yang nantinya akan menghasilkan pohon fenetik yang belum sempurna karena tidak samanya panjanga basa (pb) sekuen DNA, sehingga perlu dilakukan proses trimming (pemangkasan).

H. Proses Trimming

Proses trimming (pemangkasan) dilakukan di Mega versi 4, dengan cara mencari panjang basa (pb) data tanaman yang terpendek, kemudian panjang basa (pb) data tanaman yang terpanjang di hapus, agar panjang basa (pb) sekuen DNA sama. Proses trimming berguna untuk menyamaratakan panjang basa (pb) sekuen DNA sehingga menghasilkan pohon fenetik yang sempurna. Daftar spesies-spesies daerah ITS sebelum proses Trimming dapat dilihat pada Tabel 3.3 dan spesies-spesies daerah ITS setelah proses Trimming dapat dilihat pada Tabel 3.4

Tabel 3.3

Spesies-spesies dan panjang daerah ITS (Sebelum Trimming)

No. (1)	Nama Species (2)	No. Akses (3)	Jumlah Basa Nukleotida (pb)			
			ITS 1 (4)	5,8 S (5)	ITS 2 (6)	Gabungan (7)
1.	<i>Allium sativum</i>	AF037621	236	164	242	642

2.	<i>Allium cepa</i>	FJ664287	236	163	241	640
3.	<i>Apiumsellowianum</i>	GQ379302	214	162	221	597
4.	<i>Phyllanthus acidus</i>	EU623556	212	164	204	580
5.	<i>Zingiber officinale</i>	KC582874	203	164	263	630
6.	<i>Sauropus androgynous</i>	EU623562	212	164	210	586
No. (1)	Nama Species (2)	No. Akses (3)	Jumlah Basa Nukleotida (pb)			
			ITS 1 (4)	5,8 S (5)	ITS 2 (6)	Gabungan (7)
7.	<i>Curcuma longa</i>	JQ409924	176	165	221	562
8.	<i>Alpinia galangal</i>	AF478715	178	164	234	576
9.	<i>Morinda citrifolia</i>	HQ386693	189	164	214	567
10.	<i>Phyllanthus niruri</i>	AY765286	223	155	206	584
11.	<i>Chrysanthemum indicum</i>	AF314601	255	164	222	641
12.	<i>Catharanthus roseus</i>	HQ130657	236	164	249	649
13.	<i>Eclipta prostrate</i>	KJ512896	251	169	219	639
14.	<i>Oryza sativa</i>	KP711058	194	164	233	591
15.	<i>Secale cereal</i>	AF303400	228	164	209	601
16.	<i>Ipomea batatas</i>	AF110938	186	165	220	571
17.	<i>Capsicum annum</i>	JQ885438	245	164	222	853
18.	<i>Glycine max</i>	EF517917	227	164	204	595
19.	<i>Cocos nurifera</i>	HQ265515	311	164	268	743
20.	<i>Gnetum gnemon</i>	AY449562	398	164	291	853
21.	<i>Impatiens balsamina</i>	AY348749	223	164	197	584
22.	<i>Centella asiatica</i>	AF272352	226	162	238	626
23.	<i>Carica papaya</i>	AY461547	231	164	230	625
24.	<i>Brassica chinensis</i>	GQ891878	257	164	187	608
25.	<i>Nephelium lappaceum</i>	EU720401	274	163	199	636
26.	<i>Phalaenopsis amabilis</i>	AY391535	229	163	258	650
27.	<i>Anaphalis javanica</i>	U95292	254	164	213	631
28.	<i>Helianthus annuus</i>	AF047927	267	159	224	650
29.	<i>Mirabilis jalapa</i>	AF212009	235	154	209	598
30.	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	L78087	231	162	208	601
31.	<i>Plumeria alba</i>	HQ130658	226	164	240	630
32.	<i>Passiflora edulis</i>	AF454803	245	165	261	671
33.	<i>Foeniculum vulgare</i>	GQ162780	218	160	222	600
34.	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	AF460187	292	163	227	682
35.	<i>Lansium domesticum</i>	AY695587	266	164	221	651
36.	<i>Durio zibethinus</i>	AF233305	290	163	235	688
37.	<i>Triticum aestivum</i>	AF440676	221	163	217	601
38.	<i>Imperata cylindrical</i>	AF092512	204	164	216	584
39.	<i>Mangifera indica</i>	KF664199	291	165	255	711
40.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AY552528	227	153	217	597
41.	<i>Solanum nigrum</i>	KC540796	232	160	204	596
42.	<i>Ficus Benjamin</i>	JQ773842	200	165	232	597
43.	<i>Cinnamomum verum</i>	KX766399	217	156	222	595
44.	<i>Angraecum scottianum</i>	AB217521	228	163	194	585
45.	<i>Jumellea sagittata</i>	AB217522	224	163	212	599

46.	<i>Microterangis hariotiana</i>	AB217523	228	163	237	628
47.	<i>Abdominea minimiflora</i>	AB217524	230	163	251	644
48.	<i>Acampe ochracea</i>	AB217525	230	163	260	653
49.	<i>Acampe rigida</i>	AB217526	230	163	260	653
50.	<i>Adenoncos parviflora</i>	AB217527	230	163	258	651
No. (1)	Nama Species (2)	No. Akses (3)	Jumlah Basa Nukleotida (pb)			
			ITS 1 (4)	5,8 S (5)	ITS 2 (6)	Gabungan (7)
51.	<i>Aerides flabellate</i>	AB217528	231	163	260	654
52.	<i>Aerides odorata</i>	AB217529	236	163	261	660
53.	<i>Amesiella monticola</i>	AB217530	231	163	259	653
54.	<i>Arachnis flos-aeris</i>	AB217531	233	163	260	656
55.	<i>Ascocentrum christensonianum</i>	AB217532	230	163	260	653
56.	<i>Ascocentrum pusillum</i>	AB217533	230	163	260	653
57.	<i>Ascochilus emarginatus</i>	AB217534	231	163	257	651
58.	<i>Biermannia decipiens</i>	AB217535	232	163	256	651
59.	<i>Bogoria raciborskii</i>	AB217536	229	163	257	649
60.	<i>Brachypeza indusiata</i>	AB217537	229	163	257	649

Tabel 3.4

Spesies-spesies dan panjang daerah ITS (Setelah Trimming)

No. (1)	Nama Species (2)	No. Akses (3)	Jumlah Basa Nukleotida (pb)			
			ITS 1 (4)	5,8 S (5)	ITS 2 (6)	Gabungan (7)
1.	<i>Allium sativum</i>	AF037621	196	19	93	522
2.	<i>Allium cepa</i>	FJ664287	196	19	93	522
3.	<i>Apiumsellowianum</i>	GQ379302	196	19	93	522
4.	<i>Phyllanthus acidus</i>	EU623556	196	19	93	522
5.	<i>Zingiber officinale</i>	KC582874	196	19	93	522
6.	<i>Sauropus androgynous</i>	EU623562	196	19	93	522
7.	<i>Curcuma longa</i>	JQ409924	196	19	93	522
8.	<i>Alpinia galangal</i>	AF478715	196	19	93	522
9.	<i>Morinda citrifolia</i>	HQ386693	196	19	93	522
10.	<i>Phyllanthus niruri</i>	AY765286	196	19	93	522
11.	<i>Chrysanthemum indicum</i>	AF314601	196	19	93	522
12.	<i>Catharanthus roseus</i>	HQ130657	196	19	93	522
13.	<i>Eclipta prostrate</i>	KJ512896	196	19	93	522
14.	<i>Oryza sativa</i>	KP711058	196	19	93	522
15.	<i>Secale cereal</i>	AF303400	196	19	93	522
16.	<i>Ipomea batatas</i>	AF110938	196	19	93	522
17.	<i>Capsicum annum</i>	JQ885438	196	19	93	522
18.	<i>Glycine max</i>	EF517917	196	19	93	522
19.	<i>Cocos nurifera</i>	HQ265515	196	19	93	522

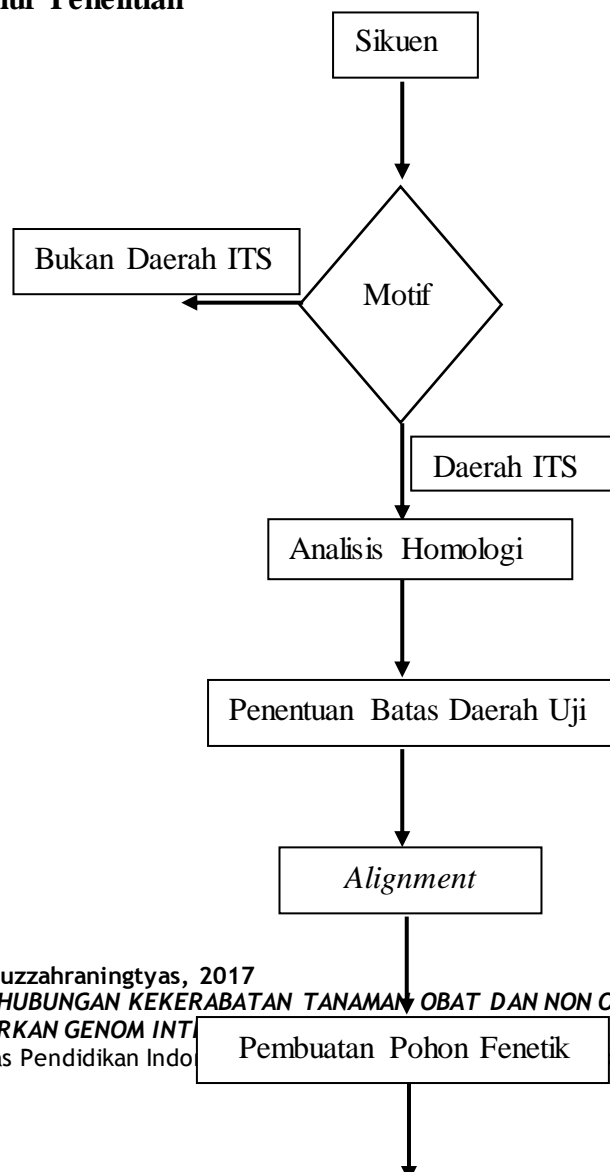
20.	<i>Gnetum gnemon</i>	AY449562	196	19	93	522
21.	<i>Impatiens balsamina</i>	AY348749	196	19	93	522
22.	<i>Centella asiatica</i>	AF272352	196	19	93	522
23.	<i>Carica papaya</i>	AY461547	196	19	93	522
24.	<i>Brassica chinensis</i>	GQ891878	196	19	93	522
25.	<i>Nepheium lappaceum</i>	EU720401	196	19	93	522
No. (1)	Nama Species (2)	No. Akses (3)	Jumlah Basa Nukleotida (pb)			
			ITS 1 (4)	5,8 S (5)	ITS 2 (6)	Gabungan (7)
26.	<i>Phalaenopsis amabilis</i>	AY391535	196	19	93	522
27.	<i>Anaphalis javanica</i>	U95292	196	19	93	522
28.	<i>Helianthus annuus</i>	AF047927	196	19	93	522
29.	<i>Mirabilis jalapa</i>	AF212009	196	19	93	522
30.	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	L78087	196	19	93	522
31.	<i>Plumeria alba</i>	HQ130658	196	19	93	522
32.	<i>Passiflora edulis</i>	AF454803	196	19	93	522
33.	<i>Foeniculum vulgare</i>	GQ162780	196	19	93	522
34.	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	AF460187	196	19	93	522
35.	<i>Lansium domesticum</i>	AY695587	196	19	93	522
36.	<i>Durio zibethinus</i>	AF233305	196	19	93	522
37.	<i>Triticum aestivum</i>	AF440676	196	19	93	522
38.	<i>Imperata cylindrical</i>	AF092512	196	19	93	522
39.	<i>Mangifera indica</i>	KF664199	196	19	93	522
40.	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AY552528	196	19	93	522
41.	<i>Solanum nigrum</i>	KC540796	196	19	93	522
42.	<i>Ficus Benjamin</i>	JQ773842	196	19	93	522
43.	<i>Cinnamomum verum</i>	KX766399	196	19	93	522
44.	<i>Angraecum scottianum</i>	AB217521	196	19	93	522
45.	<i>Jumellea sagittata</i>	AB217522	196	19	93	522
46.	<i>Microterangis hariotiana</i>	AB217523	196	19	93	522
47.	<i>Abdominea minimiflora</i>	AB217524	196	19	93	522
48.	<i>Acampe ochracea</i>	AB217525	196	19	93	522
49.	<i>Acampe rigida</i>	AB217526	196	19	93	522
50.	<i>Adenoncos parviflora</i>	AB217527	196	19	93	522
51.	<i>Aerides flabellate</i>	AB217528	196	19	93	522
52.	<i>Aerides odorata</i>	AB217529	196	19	93	522
53.	<i>Amesiella monticola</i>	AB217530	196	19	93	522
54.	<i>Arachnis flos-aeris</i>	AB217531	196	19	93	522
55.	<i>Ascocentrum christensonianum</i>	AB217532	196	19	93	522
56.	<i>Ascocentrum pusillum</i>	AB217533	196	19	93	522
57.	<i>Ascochilus emarginatus</i>	AB217534	196	19	93	522
58.	<i>Biermannia decipiens</i>	AB217535	196	19	93	522
59.	<i>Bogoria raciborskii</i>	AB217536	196	19	93	522
60.	<i>Brachypeza indusiata</i>	AB217537	196	19	93	522

I. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini terdiri dari tiga tahap, yaitu:

1. Tahap Persiapan
 - a. Melakukan kajian pustaka
 - b. Merumuskan masalah
 - c. Melakukan kajian pustaka kembali
 - d. Membuat proposal penelitian dan bimbingan
 - e. Melakukan seminar proposal
 - f. Merevisi proposal penelitian
2. Tahap pelaksanaan penelitian
 - a. Melakukan pengambilan sampel penelitian
3. Tahap pasca penelitian
 - a. Mengumpulkan semua data hasil penelitian
 - b. Melakukan analisis data (jelaskan)
 - c. Menarik kesimpulan dari hasil penelitian
 - d. Membuat laporan hasil penelitian

J. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian