

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif. Menurut Sugiyono (2012), penelitian deskriptif adalah suatu metode yang mendeskripsikan atau memberi gambaran tentang objek yang diteliti melalui semua data atau sampel yang telah terkumpul sebagai mana adanya, tanpa melakukan analisis dan membuat kesimpulan yang berlaku umum. Data diperoleh dari sekuens DNA kloroplas daerah *matK* dan *rbcL partial* (sebagian) untuk merekonstruksi pohon fenetik dalam menentukan kekerabatan antara tanaman obat dan non obat dan untuk melakukan analisis fenetik terhadap tanaman 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 tumbuhan obat dan tumbuhan non obat berdasarkan genom kloroplas (*matK* dan *rbcL*).

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 (Zuhud *et al.*, 1994):

1. Obat tradisional, yaitu tanaman yang telah digunakan sebagai bahan baku obat secara tradisional.
2. Obat modern, yaitu tanaman yang telah dibuktikan mengandung senyawa bioaktif yang berkhasiat obat dan penggunaannya dapat dipertanggungjawabkan secara medis.

3. Obat potensial, tanaman yang diduga mengandung senyawa bioaktif berkhasiat obat, namun penggunaannya belum dibuktikan secara ilmiah.
4. Non-obat, tanaman yang tidak ditemukan memiliki zat aktif spesifik (*website Orchids World*, Tanpa Tahun).

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. Sumber Data

Data sekuens DNA daerah kloroplas (penanda *matK* dan *rbcL*) diperoleh dari GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), yaitu sebanyak 120 data sekuens dari 60 spesies. Masing-masing penanda terdiri dari 60 data sekuens. Digunakan dua program komputer, yaitu ClustalX dan MEGA4 untuk proses penyejajaran sekuens DNA dan pembentukan pohon fenetik. Daftar spesies beserta panjang daerah penanda kloroplas sebelum dilakukan *trimming* dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan setelah dilakukan *trimming* dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.1. Nama Spesies dan Panjang Daerah Penanda Kloroplas (Sebelum *Trimming*)

No. (1)	Nama Spesies (2)	No. Akses		Σ Nukleotida	
		<i>matK</i> (3)	<i>rbcL</i> (4)	<i>matK</i> (5)	<i>rbcL</i> (6)
1.	<i>Mangifera indica</i>	JQ586472.1	JQ590136.1	720	552
2.	<i>Citrus reticulate</i>	JQ589071.1	GQ248571.1	778	552
3.	<i>Nephelium lappaceum</i>	KJ709016.1	KX618229.1	731	549
4.	<i>Carica papaya</i>	JX495680.1	JQ025026.1	768	552
5.	<i>Hibiscus mutabilis</i>	KP093589.1	KP094517.1	753	562
6.	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	JQ412251.1	JX887624.1	755	552
7.	<i>Lythrum salicaria</i>	JN895784.1	KT695462.1	774	549

8.	<i>Ficus benjamina</i>	KP093695.1	JX571829.1	758	552
----	------------------------	------------	------------	-----	-----

Tabel 3.1. Lanjutan Nama Spesies dan Panjang Daerah Penanda Kloroplas
(Sebelum *Trimming*)

No. (1)	Nama Spesies (2)	No. Akses		Σ Nukleotida	
		matK (3)	rbcL (4)	matK (5)	rbcL (6)
9.	<i>Malus sylvestris</i>	JN895783	JN893192.1	783	542
10.	<i>Crataegus punctata</i>	KC251121.1	KC251378.1	777	552
11.	<i>Phyllanthus niruri</i>	GU441807.1	KP208913.1	706	537
12.	<i>Passiflora edulis</i>	KM652307.1	KM652402.1	719	599
13.	<i>Mirabilis jalapa</i>	KP149515.1	KP149544.1	771	552
14.	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	JN114741.1	KF381106.1	747	582
15.	<i>Foeniculum vulgare</i>	KP149520.1	KF613031.1	762	552
16.	<i>Centella asiatica</i>	JQ024945.1	JQ025030.1	756	552
17.	<i>Helianthus annuus</i>	JN114750.1	KF613040.1	782	552
18.	<i>Catharanthus roseus</i>	JQ024944.1	JQ025029.1	768	552
19.	<i>Jasminum sambac</i>	JN114754.1	GU135212.1	741	567
20.	<i>Solanum nigrum</i>	KP149508.1	KR737230.1	756	553
21.	<i>Capsicum annum</i>	JQ589211.1	JQ594109.1	772	552
22.	<i>Piper nigrum</i>	KM074010.1	KM055149.1	796	550
23.	<i>Aristolochia clematitis</i>	HE967348.1	HE963331.1	725	583
24.	<i>Arum maculatum</i>	FJ395376.1	JN893086.1	787	542
25.	<i>Acorus calamus</i>	JF953049.1	JF940681.1	729	570
26.	<i>Chelidonium majus</i>	KJ840893.1	KJ841230.1	786	571
27.	<i>Caulophyllum thalictroides</i>	KJ840889.1	HQ590023.1	775	552
28.	<i>Akebia quinata</i>	KU853338.1	KU853420.1	753	574
29.	<i>Ranunculus sceleratus</i>	JN894997.1	JN892284.1	785	542
30.	<i>Annona reticulata</i>	JQ586491.1	JQ590162.1	772	552
31.	<i>Laurus nobilis</i>	JX495730.1	HQ619756.1	777	553
32.	<i>Cinnamomum verum</i>	JX495693.1	KF744229.1	777	559
33.	<i>Cinnamomum camphora</i>	JX495692.1	GU135257.1	754	567
34.	<i>Glycine max</i>	KF022416.1	KR073291.1	738	597
35.	<i>Medicago sativa</i>	HQ593363.1	KJ204375.1	782	548
36.	<i>Oryza sativa</i>	JX192671.1	KT852569.1	826	548
37.	<i>Imperata cylindrica</i>	JN407179.1	GU135272.1	787	567
38.	<i>Triticum aestivum</i>	KM212081.1	KM212132.1	775	552
39.	<i>Asparagus officinalis</i>	JN895939.1	JN893395.1	770	542
40.	<i>Ruscus aculeatus</i>	HE966987.1	KM527354	755	558
41.	<i>Aloe vera</i>	JN228939.1	KP072718.1	781	537
42.	<i>Allium cepa</i>	JN114735.1	KU856590.1	737	577
43.	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	JX286758.1	JQ220362.1	747	596
44.	<i>Cocos nucifera</i>	JQ586726.1	JQ590456.1	769	552

45. *Costus scaber* JQ589593.1 JQ594568.1 741 552
 Tabel 3.1. Lanjutan Nama Spesies dan Panjang Daerah Penanda Kloroplas
 (Sebelum *Trimming*)

No. (1)	Nama Spesies (2)	No. Akses		Σ Nukleotida	
		matK (3)	rbcL (4)	matK (5)	rbcL (6)
46.	<i>Maranta arundinacea</i>	JQ588311.1	JQ592609.1	769	552
47.	<i>Alpinia galanga</i>	JF953101.1	KX758502.1	732	572
48.	<i>Zingiber officinale</i>	KC598025.1	KX756187.1	777	565
49.	<i>Curcuma longa</i>	KX088477.1	JN180552.1	783	564
50.	<i>Amitostigma gracile</i>	KF262014.1	KF296623.1	736	561
51.	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	JN894348.1	JN892999.1	786	542
52.	<i>Anoectochilus lylei</i>	JN894348.1	JN166037.1	786	540
53.	<i>Anoectochilus albolineatus</i>	JN166018.1	JN892999.1	781	542
54.	<i>Gastrodia pubilabiata</i>	JN894348.1	KF695153.1	786	561
55.	<i>Eulophia flava</i>	JN004434.1	JN005456.1	778	586
56.	<i>Agrostophyllum</i> sp.	JN004352.1	JN005374.1	777	589
57.	<i>Bletilla striata</i>	KF262042.1	KF296651.1	736	561
58.	<i>Aerides maculosa</i>	JN004345.1	JN005362.1	762	557
59.	<i>Pelatantheria scolopendrifolia</i>	KF262104.1	KF296713.1	736	561
60.	<i>Acampe rigida</i>	KF421843.1	KF421858.1	725	631

Tabel 3.2. Nama Spesies dan Panjang Daerah Penanda Kloroplas (Setelah
Trimming)

No. (1)	Nama Spesies (2)	No. Akses		Σ Nukleotida	
		matK (3)	rbcL (4)	matK (5)	rbcL (6)
1.	<i>Mangifera indica</i>	JQ586472.1	JQ590136.1	720	552
2.	<i>Citrus reticulata</i>	JQ589071.1	GQ248571.1	778	552
3.	<i>Nephelium lappaceum</i>	KJ709016.1	KX618229.1	731	549
4.	<i>Carica papaya</i>	JX495680.1	JQ025026.1	768	552
5.	<i>Hibiscus mutabilis</i>	KP093589.1	KP094517.1	753	562
6.	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	JQ412251.1	JX887624.1	755	552
7.	<i>Lythrum salicaria</i>	JN895784.1	KT695462.1	774	549
8.	<i>Ficus benjamina</i>	KP093695.1	JX571829.1	758	552
9.	<i>Malus sylvestris</i>	JN895783	JN893192.1	783	542
10.	<i>Crataegus punctata</i>	KC251121.1	KC251378.1	777	552
11.	<i>Phyllanthus niruri</i>	GU441807.1	KP208913.1	706	537
12.	<i>Passiflora edulis</i>	KM652307.1	KM652402.1	719	599
13.	<i>Mirabilis jalapa</i>	KP149515.1	KP149544.1	771	552
14.	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	JN114741.1	KF381106.1	747	582

15.	<i>Foeniculum vulgare</i>	KP149520.1	KF613031.1	762	552
-----	---------------------------	------------	------------	-----	-----

Tabel 3.2. Lanjutan Nama Spesies dan Panjang Daerah Penanda Kloroplas
(Setelah *Trimming*)

No. (1)	Nama Spesies (2)	No. Akses		Σ Nukleotida	
		matK (3)	rbcL (4)	matK (5)	rbcL (6)
16.	<i>Centella asiatica</i>	JQ024945.1	JQ025030.1	756	552
17.	<i>Helianthus annuus</i>	JN114750.1	KF613040.1	782	552
18.	<i>Catharanthus roseus</i>	JQ024944.1	JQ025029.1	768	552
19.	<i>Jasminum sambac</i>	JN114754.1	GU135212.1	741	567
20.	<i>Solanum nigrum</i>	KP149508.1	KR737230.1	756	553
21.	<i>Capsicum annuum</i>	JQ589211.1	JQ594109.1	772	552
22.	<i>Piper nigrum</i>	KM074010.1	KM055149.1	796	550
23.	<i>Aristolochia clematitidis</i>	HE967348.1	HE963331.1	725	583
24.	<i>Arum maculatum</i>	FJ395376.1	JN893086.1	787	542
25.	<i>Acorus calamus</i>	JF953049.1	JF940681.1	729	570
26.	<i>Chelidonium majus</i>	KJ840893.1	KJ841230.1	786	571
27.	<i>Caulophyllum thalictroides</i>	KJ840889.1	HQ590023.1	775	552
28.	<i>Akebia quinata</i>	KU853338.1	KU853420.1	634	503
29.	<i>Ranunculus sceleratus</i>	JN894997.1	JN892284.1	634	503
30.	<i>Annona reticulata</i>	JQ586491.1	JQ590162.1	634	503
31.	<i>Laurus nobilis</i>	JX495730.1	HQ619756.1	634	503
32.	<i>Cinnamomum verum</i>	JX495693.1	KF744229.1	634	503
33.	<i>Cinnamomum camphora</i>	JX495692.1	GU135257.1	634	503
34.	<i>Glycine max</i>	KF022416.1	KR073291.1	634	503
35.	<i>Medicago sativa</i>	HQ593363.1	KJ204375.1	634	503
36.	<i>Oryza sativa</i>	JX192671.1	KT852569.1	634	503
37.	<i>Imperata cylindrica</i>	JN407179.1	GU135272.1	634	503
38.	<i>Triticum aestivum</i>	KM212081.1	KM212132.1	634	503
39.	<i>Asparagus officinalis</i>	JN895939.1	JN893395.1	634	503
40.	<i>Ruscus aculeatus</i>	HE966987.1	KM527354	634	503
41.	<i>Aloe vera</i>	JN228939.1	KP072718.1	634	503
42.	<i>Allium cepa</i>	JN114735.1	KU856590.1	634	503
43.	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	JX286758.1	JQ220362.1	634	503
44.	<i>Cocos nucifera</i>	JQ586726.1	JQ590456.1	634	503
45.	<i>Costus scaber</i>	JQ589593.1	JQ594568.1	634	503
46.	<i>Maranta arundinacea</i>	JQ588311.1	JQ592609.1	634	503
47.	<i>Alpinia galanga</i>	JF953101.1	KX758502.1	634	503
48.	<i>Zingiber officinale</i>	KC598025.1	KX756187.1	634	503
49.	<i>Curcuma longa</i>	KX088477.1	JN180552.1	634	503
50.	<i>Amitostigma gracile</i>	KF262014.1	KF296623.1	634	503

51.	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	JN894348.1	JN892999.1	634	503
52.	<i>Anoectochilus lylei</i>	JN894348.1	JN166037.1	634	503

Tabel 3.2. Lanjutan Nama Spesies dan Panjang Daerah Penanda Kloroplas

(Setelah *Trimming*)

No. (1)	Nama Spesies (2)	No. Akses		Σ Nukleotida	
		matK (3)	rbcL (4)	matK (5)	rbcL (6)
53.	<i>Anoectochilus albolineatus</i>	JN166018.1	JN892999.1	634	503
54.	<i>Gastrodia pubilabiata</i>	JN894348.1	KF695153.1	634	503
55.	<i>Eulophia flava</i>	JN004434.1	JN005456.1	634	503
56.	<i>Agrostophyllum</i> sp.	JN004352.1	JN005374.1	634	503
57.	<i>Bletilla striata</i>	KF262042.1	KF296651.1	634	503
58.	<i>Aerides maculosa</i>	JN004345.1	JN005362.1	634	503
59.	<i>Pelatantheria scolopendrifolia</i>	KF262104.1	KF296713.1	634	503
60.	<i>Acampe rigida</i>	KF421843.1	KF421858.1	634	503

E. Cara Kerja

1. Pengambilan Data DNA

Sekuens DNA tanaman obat dan tanaman non obat dari genom kloroplas yang digunakan adalah dari penanda *matK* dan *rbcL* sebanyak masing-masing penanda 60 (enam puluh) sampel DNA *partial* dan total 120 (seratus dua puluh) sampel diambil dari GenBank yang ada pada *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sekuens DNA yang digunakan adalah sekuens yang *partial* (sebagian) dengan jumlah basa yang sama, *matK* (± 700 pb) dan *rbcL* (± 500 pb). Hal ini dimaksudkan agar kedua penanda tersebut dapat dibandingkan. Sekuens DNA *partial* digunakan karena sulitnya menemukan data DNA yang utuh dan memiliki jumlah pasang basa yang sama untuk penanda genom kloroplas. NCBI memiliki *database* dan *software (analysis tools)* yang sering digunakan untuk analisis, salah satunya adalah GenBank yang merupakan *database* dan *software (analysis tools)* yang sering digunakan untuk analisis pada NCBI yang bekerja sama dengan DataBank of Japan (DDBJ), The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), dan GenBank di NCBI (Miftakunnafishah, 2010).

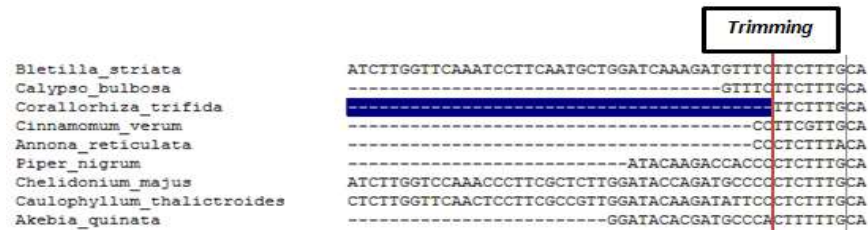
2. Analisis Data

Analisis sekuens untuk masing-masing daerah DNA *matK* dan *rbcL* dilakukan melalui penyejajaran (*alignment*) pada program komputer Clustal X dengan menggunakan opsi *complete alignment*. Clustal adalah program bioinformatika untuk *alignment* multipel (*multiple alignment*), melihat hasilnya, dan jika diperlukan untuk meningkatkan hasil *alignment* (Thompson *et al.*, 1997). Proses ini bertujuan untuk menyusun sekuens DNA agar dapat mengidentifikasi wilayah yang memiliki kesamaan atau homologi yang mungkin merupakan hasil dari hubungan fungsional, struktural, atau evolusioner antara urutan DNA (Higgins & Sharp, 1988).

Hasil *alignment* dengan program Clustal ini kemudian menjadi bahan untuk membangun pohon fenetik. Analisis fenetik berdasarkan metode *Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean* (UPGMA) dilakukan dengan menggunakan program komputer MEGA versi 4 untuk dua set data, yaitu *matK* dan *rbcL*. Pohon fenetik dibuat dengan menggunakan data hasil *alignment* dari program Clustal X dengan format .aln yang akan menghasilkan pohon fenetik yang belum sempurna karena panjang basa (pb) yang tidak sama pada sekuens DNA. Oleh karena itu, perlu dilakukan *trimming* (pemotongan) basa DNA agar jumlah panjang basanya sama.

Proses *trimming* dilakukan dengan menggunakan program MEGA versi 4 dalam format data .meg dengan cara mencari sekuens DNA dengan panjang basa terpendek, lalu sekuens DNA dengan panjang basa yang lebih panjang dihapus di bagian *forward* dan *reverse* agar jumlah panjang basa yang terhapusnya seimbang. Proses *trimming* ini berfungsi untuk menyamaratakan panjang basa sekuens DNA sehingga pada akhirnya menghasilkan pohon filogenetik yang sempurna. Tampilan dari proses *trimming* pada bagian *forward* dapat dilihat pada Gambar 3.1 dan Gambar

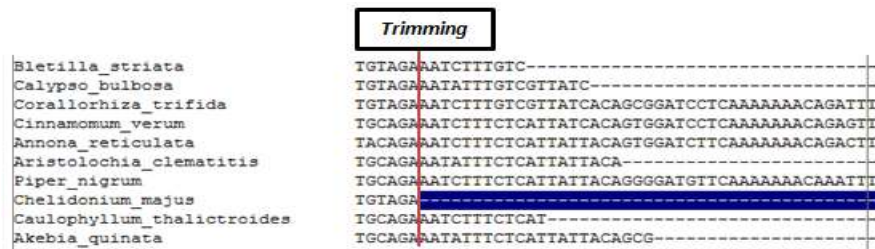
3.2. sedangkan tampilan hasil *trimming* pada bagian *reverse* dapat dilihat pada Gambar 3.3 dan 3.4.



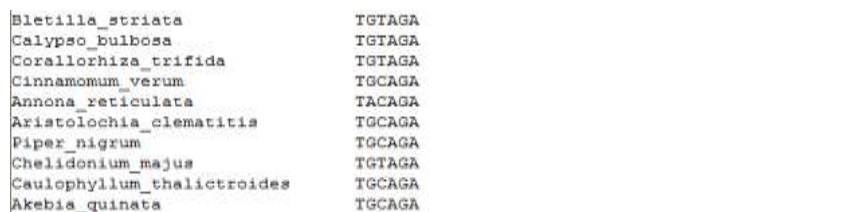
Gambar 3.1. Bagian pada Sekuens DNA Daerah *Forward* yang Akan Dilakukan Proses *Trimming*



Gambar 3.2. Bagian pada Sekuens DNA Daerah *Forward* yang Telah Dilakukan Proses *Trimming*



Gambar 3.3. Bagian pada Sekuens DNA Daerah *Reverse* yang Akan Dilakukan Proses *Trimming*



Gambar 3.4. Bagian pada Sekuens DNA Daerah *Reverse* yang Telah Dilakukan Proses *Trimming*

F. Prosedur Penelitian

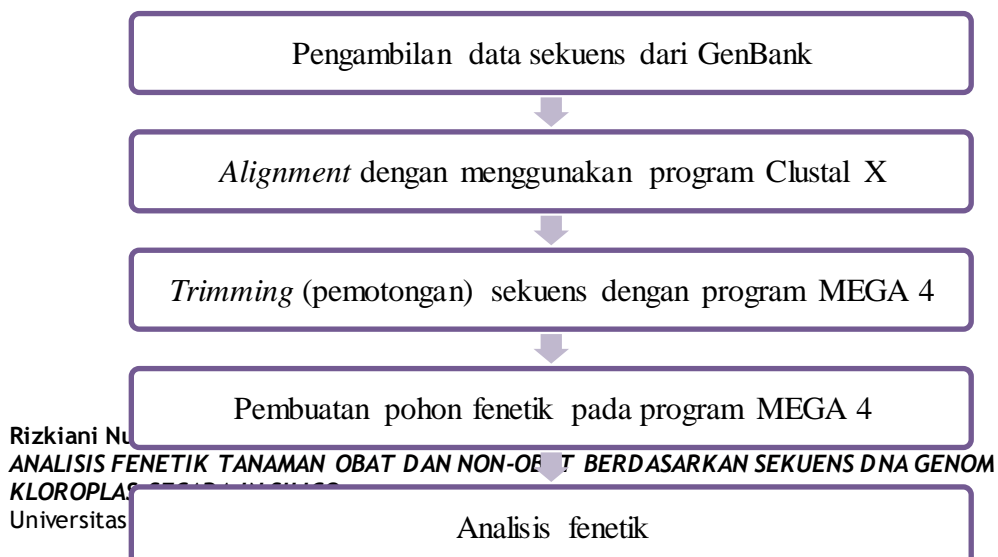
Prosedur penelitian ini terdiri dari tiga tahap, yaitu

1. Tahap persiapan
 - a. Membuat proposal penelitian dan bimbingan.
 - b. Melakukan seminar proposal.
 - c. Merevisi proposal penelitian.

2. Tahap pelaksanaan penelitian
 - a. Melakukan pengambilan sampel penelitian berdasarkan penanda *matK* dan *rbcL*.
 - b. Menyeleksi sampel berdasarkan jumlah pasang basa.
 - c. Membuat pohon fenetik.

3. Tahap pasca penelitian
 - a. Mengumpulkan semua data hasil penelitian.
 - b. Melakukan analisis data.
 - c. Menarik kesimpulan dari hasil penelitian.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.5. Bagan Alur Penelitian

