

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dan menggunakan metode observasi yaitu untuk mengetahui bakteri selulolitik yang terdapat pada pencernaan rayap dan mengidentifikasi spesies bakteri seluloliknya. Menurut Nazir (1988) penelitian deskriptif adalah penelitian yang menggambarkan dan mendeskripsikan suatu keadaan, fakta, atau fenomena.

3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dimulai pada bulan Februari 2019 sampai dengan Juli 2019 yang dilaksanakan di Laboratorium Riset Biologi Universitas Pendidikan Indonesia di Jalan Dr. Setiabudi No. 299 Bandung.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri pencernaan rayap *Cryptotermes* sp. yang berasal dari kayu kering pada rumah di daerah Geger Arum, Kelurahan Isola, Kecamatan Sukasari, Kota Bandung. Sampel dari penelitian ini adalah bakteri selulolitik yang diisolasi dari pencernaan rayap *Cryptotermes* sp. dan isolat yang terpilih diidentifikasi dengan amplifikasi gen 16S rRNA.

3.4. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel alat dan bahan yang terlampir pada Lampiran 1. Alat dan bahan digunakan untuk menunjang proses penelitian yaitu proses pembuatan medium, isolasi bakteri dari pencernaan rayap *Cryptotermes* sp., pengamatan morfologi bakteri, pembuatan biakan murni, seleksi bakteri selulolitik, isolasi DNA bakteri, uji kualitatif dan kuantitatif sampel DNA, amplifikasi gen 16S rRNA, dan elektroforesis. Alat dan bahan tersedia di Laboratorium Riset, Gedung B Fakultas Pendidikan Matematika dan IPA, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.5. Prosedur Penelitian

Pada pelaksanaan penelitian ini dilakukan beberapa tahap meliputi tahap persiapan, pembuatan medium, pengambilan sampel, isolasi bakteri, pengamatan morfologi bakteri, pembuatan biakan murni, seleksi bakteri selulolitik, isolasi DNA bakteri, uji kualitatif dan kuantitatif sampel DNA, amplifikasi gen 16S rRNA, elektroforesis, sekuensing, *blast* data hasil sekuensing, dan pembuatan pohon filogenetik.

3.5.1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan ialah mempersiapkan alat dan bahan yang digunakan selama penelitian. Alat dan beberapa jenis bahan yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Alat dibungkus dengan kertas hingga rapat sebelum disterilisasi, selanjutnya dibungkus dengan plastik dan bahan yang perlu disterilisasi dimasukkan ke dalam wadah kaca setelah itu dibungkus dengan kertas hingga rapat selanjutnya dibungkus dengan plastik. Sterilisasi dengan cara dimasukkan ke dalam *Autoclave* selama 15-30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm (Lay & Hastowo, 1992). Kegiatan ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

3.5.2. Pembuatan Medium

Menurut Pelczar & Chan (2008) media untuk isolasi terdiri dari tiga jenis yaitu media diferensial, media selektif-diferensial, dan media penyubur. Media yang digunakan dalam penelitian ini antara lain media selektif-diferensial dan media penyuburan. Media selektif-diferensial digunakan untuk tujuan identifikasi. Media penyuburan digunakan hanya untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme (Hidayat *et al.*, 2006). Media penyuburan yang digunakan yaitu medium *Nutrient Broth* dan *Nutrient Broth Agar*. Media selektif yang digunakan yaitu medium CMC.

3.5.2.1. *Nutrient Broth Agar* dan *Nutrient Broth*

Medium *Nutrien Broth Agar* (NBA) dibuat dengan cara menimbang 20 gram NBA ke dalam 1000 ml akuades pada *baker glass*. Larutan dipanaskan sambil diaduk hingga semua bahan terlarut sempurna. Setelah itu media dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml dan 5 ml. Sedangkan medium *nutrient broth* dibuat dengan komposisi bahan yang sama hanya tidak mengandung agar. Semua media kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian disimpan di dalam inkubator.

3.5.2.2. CMC (*Carboxy-Menthyl-Cellulose*)

CMC merupakan media selektif untuk hanya menumbuhkan bakteri yang memiliki kemampuan mencerna selulosa. Media CMC 1% ini dibuat dengan melarutkan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 gr/100 ml, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,5 gr/100 ml, NaCl 0,23 gr/100 ml, *yeast extraxt* 0,2 gr/100 ml, CMC 1 gr/100 ml dan agar 2,5 gr/100 ml (Ji *et al.*, 2003). Bahan dicampurkan kedalam tabung erlemeyer untuk dipanaskan dan diaduk menggunakan *hot plate* dan *magnetic stirrer*. Medium yang telah homogen dituangkan ke cawan Petri setelah itu disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit (Baharuddin, 2015).

3.5.3. Pengambilan Sampel



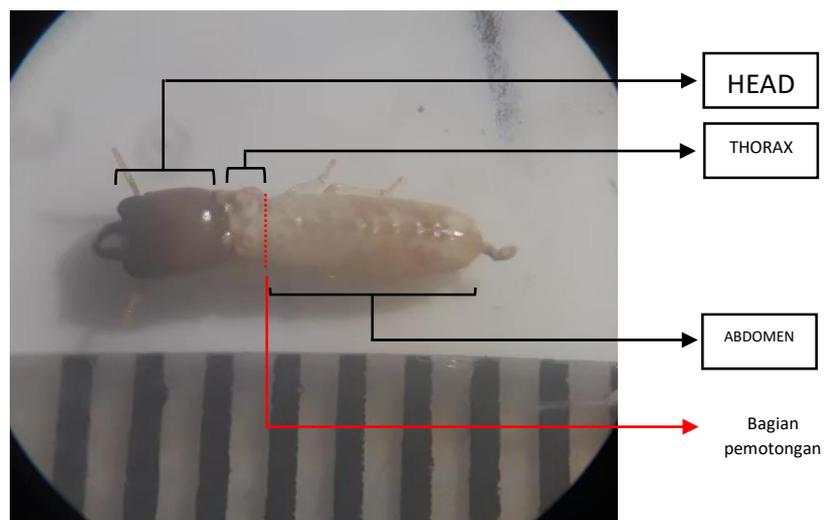
Gambar 3.1 *Cryptotermes* sp. pada Kayu Kering

Cryptotermes sp. merupakan rayap kayu kering yang didapatkan dari kayu kering pada rumah di daerah Geger Arum, Kelurahan Isola, Kecamatan Sukasari, Kota Bandung. Rayap diambil berserta dengan media tempat

hidupnya dan dibawa ke Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

3.5.4. Isolasi Bakteri

Rayap (*Cryptotermes* sp.) sebanyak 15 individu ditempatkan ke dalam cawan Petri, kemudian permukaan rayap dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berisi alkohol 70% untuk sterilisasi (Upadhyaya *et al.*, 2012). Proses isolasi bakteri dilakukan dengan memotong rayap pada bagian perbatasan thorax dan abdomen sehingga memisahkan kedua bagian tubuh tersebut. Bagian abdomen disayat dan dihancurkan dengan batang kaca, selanjutnya dilarutkan kedalam 1 ml larutan fisiologis (NaCl 0,85%) hingga mendapatkan ekstrak rayap yang digunakan dalam pengenceran cawan tuang (Tampoebolon, 2014).



Gambar 3.2 Pemotongan Rayap *Cryptotermes* sp.

Menurut Cappucino & Sherman (1987) teknik isolasi bakteri dapat dilakukan dengan beberapa cara salah satunya dengan *dilution method* yaitu pengenceran bertingkat yang dilakukan dengan menggunakan *pour plate technique*. *Pour plate technique* merupakan teknik isolasi dengan membuat pengenceran bertingkat dan mencampurkan pengenceran tersebut dengan

medium agar. Pada penelitian ini dilakukan enam kali pengenceran ekstrak rayap yaitu 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} dengan tiga kali pengulangan. Pengenceran pertama diambil 1 ml ekstrak rayap dan dimasukkan tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril dan dihomogenkan dengan bantuan alat *vortex*, pengenceran selanjutnya diambil 1 ml suspensi mikroba dari hasil pengenceran sebelumnya dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi baru yang berisikan 9 ml akuades steril dan dilakukan berulang hingga enam kali pengenceran yaitu hingga mendapatkan hasil pengenceran 10^{-6} . Ekstrak rayap hasil pengenceran dituangkan sebanyak 0,1 ml kedalam cawan Petri, setelah itu ditambahkan medium *Nutrien Broth Agar* 15 ml yang masih cair ke dalam cawan Petri tersebut dan diratakan (Hadioetomo, 1990). Medium ditunggu hingga membeku, cawan Petri yang berisi medium ditutup dengan cawan Petri yang lebih besar, lalu dibungkus dengan kertas dan plastik untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Total bakteri yang ditanam yaitu sebanyak 6 pengenceran dan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan yaitu sejumlah 18 biakan bakteri yang selanjutnya diinkubasi (Ed-har *et al.*, 2017). Bakteri yang telah ditanam pada medium tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah inkubasi dilakukan isolasi murni dari koloni yang tumbuh pada medium.

3.5.5. Pemiakan Murni Isolat Bakteri

Isolasi merupakan suatu rangkaian proses pemurnian atau pemisahan mikroorganisme agar dapat dikultur murni (isolasi biakan murni). Isolat bakteri yang akan dikultur murni tersebut selanjutnya ditumbuhkan pada medium terpisah agar dapat tumbuh dengan baik dan menghasilkan isolat bakteri murni (Singleton & Sainsbury, 2006).

Isolasi biakan murni bertujuan untuk mendapatkan biakan yang hanya berisi satu jenis bakteri (Lay, 1994). Koloni bakteri yang diisolasi murni merupakan koloni bakteri dengan karakter morfologi yang berbeda dan tumbuh terpisah (Murthy & Hazmi, 2017). Koloni-koloni yang tumbuh pada cawan Petri biakan campuran selanjutnya dipilih berdasarkan karakter morfologi yang

berbeda yaitu bentuk koloni, dan warna koloni. Koloni bakteri yang dipilih yaitu koloni yang tumbuh terpisah, setelah itu setiap jenis koloni yang berbeda diberi nama atau kode. Koloni yang telah diberi nama atau kode tersebut diinokulasikan ke dalam agar miring pada tabung reaksi, setiap jenis koloni dibuat ke dalam biakan murni. Pada proses isolasi biakan murni terdapat beberapa hal penting yang harus diperhatikan antara lain komponen media yang digunakan, media harus mengandung komponen nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri, selain itu faktor lingkungan seperti suhu dan tingkat keasaman media. Pada sebagian besar bakteri suhu dan keasaman yang ekstrim dapat menghambat proses metabolisme bakteri sehingga tidak dapat tumbuh optimal (Pelczar & Chan, 2008). Biakan murni yang telah dibuat dibungkus dengan plastik dan disimpan ke dalam inkubator pada suhu 37°C dan dijadikan sebagai stok bakteri. Proses pemurnian mikroorganisme diperlukan untuk mengetahui jenis, mempelajari morfologi, fisiologi, dan karakteristik mikroorganisme tersebut (Irianto, 2006). Isolat murni yang diperoleh digunakan sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya, antara lain pengamatan morfologi, uji seleksi CMC, dan isolasi DNA

3.5.6. Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan dengan mengamati karakteristik tiap koloni dari bentuk koloni, warna koloni, tepian koloni, ukuran (diameter), kenaikan permukaan koloni (elevasi), dan permukaan (mengkilat/suram) (Cappucino & Sherman, 2014). Pada umumnya bakteri memiliki bentuk koloni *circular*, *irregular*, *filamentous*, dan *rhizoid*. Bakteri memiliki *elevasi* berbentuk *raissed*, *convex*, *flat*, *umbonate*, dan *crateriform*. Bentuk *margin* yaitu *entire*, *undulate*, *filiform*, *curled*, dan *lobate* (Cappucino & Sherman, 1987). Lay (1994) menyebutkan bahwa data ciri morfologi koloni bakteri dan biakan murni bakteri dapat mendukung proses identifikasi jenis suatu bakteri. Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan dengan menanam bakteri pada cawan Petri berisi medium *nutrien broth agar*, dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri

yang telah diinkubasi selama 24 jam siap untuk diamati morfologinya, menggunakan bantuan mikroskop stereo.

3.5.7. Seleksi Bakteri Selulolitik Pada Media *Carboxyl-Methyl-Cellulose* (CMC)

Isolat bakteri biakan murni ditanam pada medium *Nutrien Broth* dan ditumbuhkan selama 24 jam pada temperatur 37°C. selanjutnya diinokulasi pada medium CMC 1% (1 g CMC; 0,05 g MgSO₄.7H₂O; 0,2 g *Yeast*; 0,5 g Na₂HPO₄.2H₂O; 0,23 g NaCl ; 1,5 g agar) dalam 100 ml akuades. Isolat bakteri diinokulasi sebanyak 1 ose kedalam medium *nutrien broth* 25 ml dan diinkubasi dalam penangas pada suhu 37°C selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Bakteri yang telah ditumbuhkan pada *Nutrien Broth* selama 24 jam diteteskan pada cakram steril dengan diameter 6 mm sebanyak 1 ul pada medium CMC 1 % (Mulyadi *et al.*, 2013; Niswah, 2014). Medium berisi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh selama 24 jam diwarnai oleh 5 ml *congo red* 0,1% dan diinkubasi selama 30 menit kemudian dibilas dengan larutan NaCl 1% (Ji *et al.*, 2003). Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan penggaris untuk dihitung Indeks Selulolitik (IS) (Sudiana *et al.*, 2014).

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

(Sinaga, 2013).

3.5.8. Isolasi DNA Bakteri

Isolasi DNA bakteri dilakukan dengan metode *boiling* (pendidihan). Sampel biakan bakteri yang telah diinkubasi dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml kemudian ditambahkan 1 ml Posfat Buffer Saline (PBS) 1x. Campuran tersebut disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 3 menit dan supernatan dibuang menyisakan pelet pada bagian dasar tabung. Pelet ditambahkan TE 1x sebanyak 100 µl kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*. Tabung 1,5 ml disimpan di dalam penangas pada suhu 100°C selama

10 menit, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Lisat yang terdapat pada tabung kemudian dipindahkan ke tabung yang baru dan ditambahkan 100 µl TE 1x yang sebelumnya disimpan di kulkas. Hasil isolasi DNA disimpan pada suhu 20°C (modifikasi Yanez *et al.*, 2003). Proses pemanasan dengan suhu tinggi (100°C) pada saat isolasi bertujuan untuk meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga dinding sel dan membran sel menjadi lisis (Sunarno, 2013). Proses isolasi DNA dengan metode *boiling* merupakan salah satu metode isolasi DNA yang sederhana, prinsip isolasi metode *boiling* yaitu menghancurkan sel dengan memberikan gangguan fisik berupa pemanasan dengan suhu tinggi yaitu 95–100°C. Isolasi DNA bakteri dengan metode *boiling* ini juga digunakan dalam penelitian Gitaswari & Budayanti (2019), Apriliani & Pinatih (2017), dan Afif & Putri (2019).

3.5.9. Uji Kualitatif dan Kuantitatif

Kualitas DNA dilihat dengan menggunakan spektrofotometer untuk dihitung nilai kemurnian dan konsentrasinya (Sambrook *et al.*, 1989). Uji kualitatif DNA bertujuan untuk mengetahui kualitas DNA dari hasil isolasi DNA dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%, dan uji kuantitatif bertujuan untuk mengetahui kemurnian dan juga konsentrasi DNA dengan menggunakan UV-Spektrofotometer Genesys 10UV Scanning (Thermo Scientific). Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui jumlah DNA yang terkandung dalam larutan sampel. Konsentrasi DNA didapatkan dengan mengukur sampel DNA pada panjang gelombang 260 dan 280 nm, prinsipnya yaitu penyerapan sinar UV oleh nukleotida (260 nm) dan protein (280 nm) dalam larutan sampel dengan menggunakan alat spektrofotometer. Konsentrasi DNA dapat dihitung dengan persamaan $A_{260} \times \text{Faktor Pengenceran} \times 50$ dan faktor pengenceran merupakan jumlah sampel ditambah jumlah pelarut dibagi dengan jumlah sampel yang digunakan. Pada penelitian ini sampel yang digunakan sebanyak 5 ul dan pelarut menggunakan ddH₂O sebanyak 495 ul, sehingga nilai faktor pengencerannya $(5 + 495) : 5$ yaitu 100. Kemurnian DNA dihitung dengan persamaan berikut.

$$\text{Rasio kemurnian DNA} = \frac{\text{Abs pada } \lambda \text{ A260}}{\text{Abs pada } \lambda \text{ A280}}$$

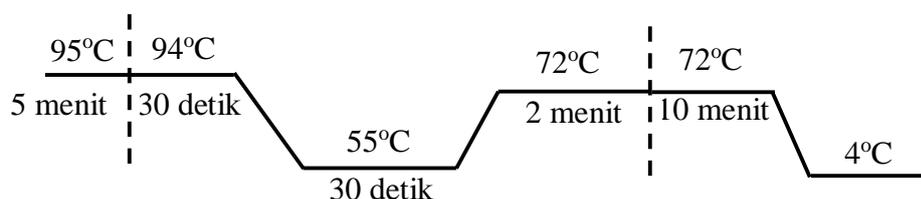
Tingkat kemurnian sampel ditentukan dari rasio hitung antara nilai absorbansi panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dari sampel DNA. Nilai absorbansi panjang gelombang 260 nm merupakan nilai maksimal DNA dapat menyerap cahaya, sedangkan nilai absorbansi panjang gelombang 280 nm merupakan nilai maksimal residu protein dapat menyerap cahaya. Menurut Sambrook *et al.* (1989) kemurnian sampel DNA yang baik yaitu apabila rasio perbandingan A260 nm dan A280 nm adalah 1.8 – 2. Kualitas sampel DNA juga diuji dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 0.3 gr dalam 30 ml buffer TAE 1X, dengan cara dipanaskan dengan bantuan *microwave* hingga larutan gel homogen. Gel agarosa yang telah larut selanjutnya ditunggu hingga hangat kuku untuk ditambahkan *PeqGreen*.

Gel agarosa yang telah ditambahkan dengan *peqgreen* selanjutnya dicetak pada cetakan dan ditunggu hingga gel membeku. Gel agarosa yang telah membeku disimpan pada alat elektroforesis yang telah berisi *buffer* TAE 1X sebanyak 300 ml hingga dapat merendam gel agarosa secara penuh. Selanjutnya disiapkan sampel, *marker (ladder)*, dan *loading dye*. Sampel dan *marker* dicampurkan dengan *loading dye* dengan perbandingan 1 : 5 (1 *loading dye* dan 5 sampel / *marker*). Setelah itu *marker* dimasukkan pada sumur pertama dari gel agarosa, sumur selanjutnya dimasukkan oleh sampel sebanyak yang dimiliki. *Loading dye* ditambahkan sebagai pemberat dan juga berfungsi sebagai pewarna karena mengandung gliserol dan *bromphenol blue*. *Loading dye* membantu melacak DNA ketika bermigrasi dimana ketika migrasi berlangsung akan terdapat warna yang muncul pada agarosa yaitu warna ungu, biru, dan kuning. Setelah *ladder* dan sampel DNA telah selesai dimasukkan ke dalam sumur, selanjutnya alat elektroforesis di set pada *voltase* 100 volt dengan waktu *running* 30 menit. Ketika proses *running* telah selesai selanjutnya gel agarosa diangkat dan diletakkan pada UV-Transiluminator untuk melihat pita DNA yang terbentuk (Lee *et al.*, 2012). Visualisasi pita

DNA diakibatkan oleh pegreen menyisip diantara basa nitrogen (letaknya di ikatan hidrogen) sehingga DNA dapat berpendar saat dilihat dibawah sinar UV. Pendaran pita-pita akan terlihat dari arah migrasi dari kutub negatif ke kutub positif. Hasil DNA yang baik ketika dilakukan elektroforesis adalah dengan munculnya pita DNA yang tebal dan tegas tidak ada *smear* ketika dilihat dibawah sinar UV (Sauer *et al.*, 1998).

3.5.10. Amplifikasi Gen 16S rRNA

Amplifikasi dilakukan untuk memperbanyak sekuen 16S rRNA pada bakteri selulolitik secara *in vitro* menggunakan PCR. Amplifikasi DNA ini dilakukan menggunakan metode yang telah dilakukan oleh James (2010) dengan beberapa modifikasi. DNA sampel sebanyak 1 μ l ditambahkan dengan 5 μ l GoTaq Green PCR Master Mix 2X, *Nuclease Free Water* (NFW) 3 μ l, Mix Primer 16S sebanyak 1 μ l terdiri dari primer *forward* 0,5 μ l dan primer *reverse* 0,5 μ l. Amplifikasi dengan menggunakan alat *Thermocycler* (Protocol GoTaq Green Master Mix, 2016).



Gambar 3.3 Kondisi PCR gen 16S rRNA.

Primer yang digunakan yaitu primer *forward* (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan *reverse* (5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Jiang *et al.*, 2006). Proses amplifikasi terdiri dari predenaturasi yaitu dengan suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi yaitu pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, ekstensi awal pada suhu 72°C selama 2 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR disimpan pada suhu 4°C selama penyimpanan.

3.5.11. Elektroforesis

Hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dengan tegangan 100 *volt*. Gel agarose sebanyak 0,3 g dilarutkan dengan TAE 1X sebanyak 30 ml. Gel agarosa dipasang ke dalam tanki elektroforesis yang berisi larutan TAE 1x. DNA sampel yang telah dicampurkan *loading dye* (2:1) kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel. *DNA ladder* yang telah ditambahkan *loading dye* dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit. Gel yang telah dielektroforesis diambil dan ditempatkan ke dalam UV Transiluminator kemudian didokumentasikan (Basri, 2016).

3.5.12. Sekuensing DNA

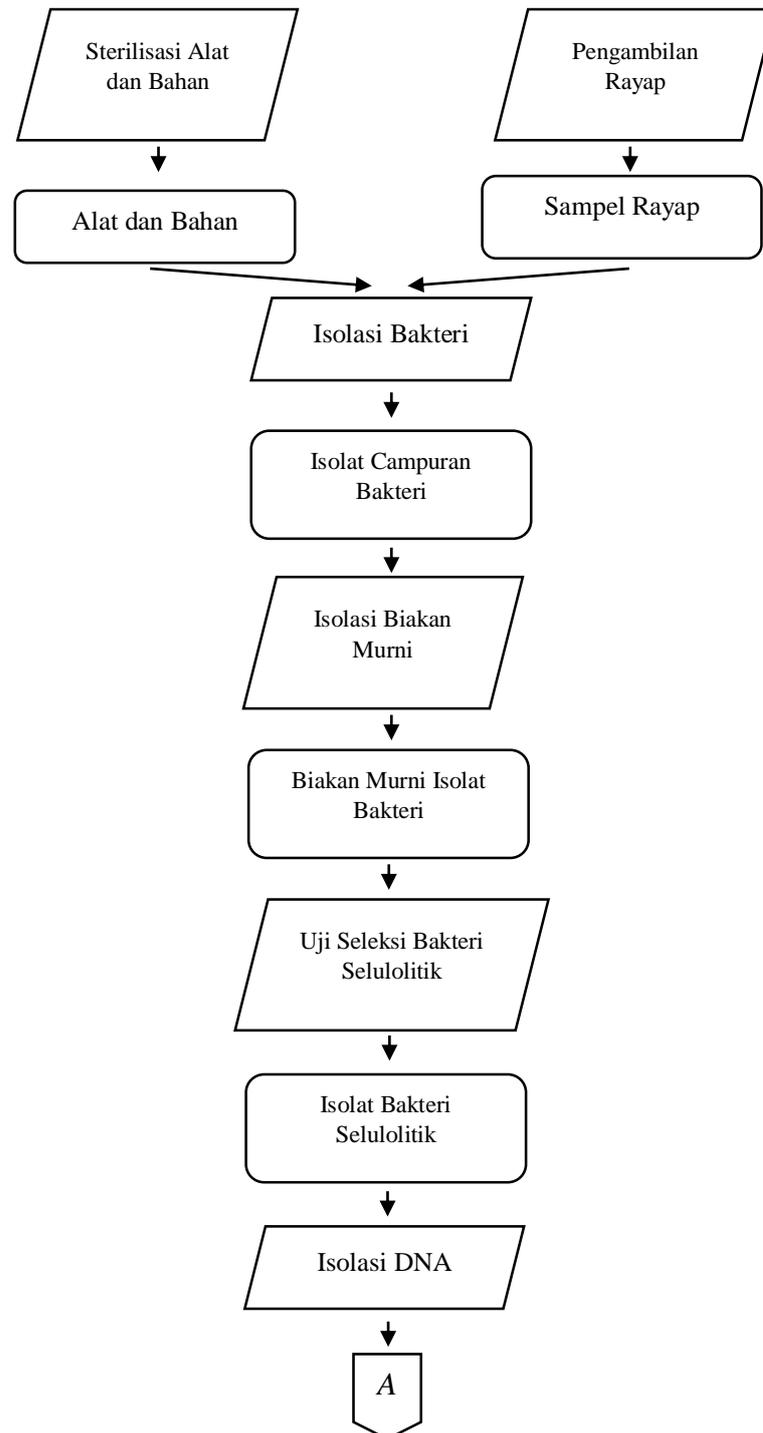
Sekuensing DNA dilakukan dengan *BigDye Applied Biosystem sequencer Engine Model 3730* pada Macrogen Inc. Korea. Hasil sekuensing dianalisis bioinformatik.

3.5.13. Analisis Hasil Sekuensing

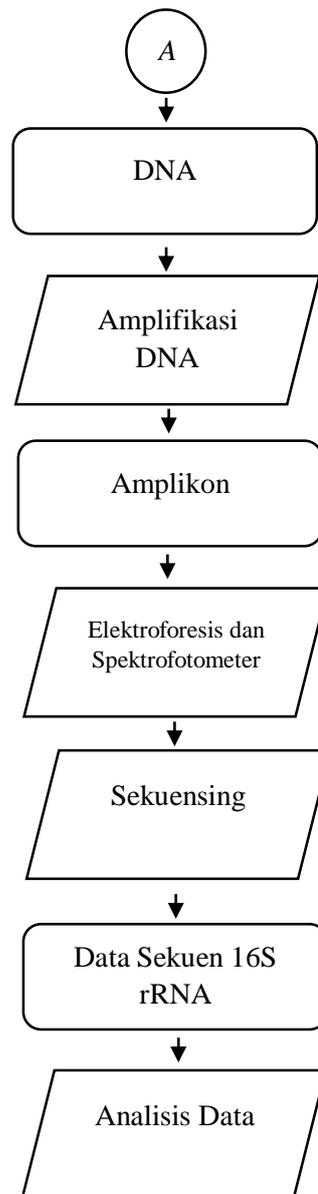
Data hasil sekuensing kemudian dianalisis secara bioinformatik. Sekuen 16S rRNA yang didapatkan dari proses sekuensing selanjutnya dicontig. Contig merupakan sebuah rekonstruksi sekuen DNA yang tumpang tindih dan menggabungkan dua sekuen DNA menjadi satu kesatuan yang komplemen. Sekuen yang telah dicontig selanjutnya masuk ke dalam tahap *homology test* yaitu membandingkan sekuen yang dimiliki dengan data sekuen bakteri pada *gene bank* NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) yaitu pada <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. *Homology test* atau analisis *blast* dilakukan pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi> dan dilakukan pada halaman <https://www.ezbiocloud.net/identify>. Proses alignment dari setiap sekuen gen bakteri menggunakan program *tool multiple sequence alignment* dari *software* Bioedit. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan *software Phylogenetic Analysis Using Parsimoni* (PAUP) (Hidayat, t.t). *Software* TreeView untuk pemilihan pohon filogenetik.

3.6. Alur Penelitian

Alur penelitian terdiri dari tata cara penelitian mulai dari persiapan sterilisasi alat dan bahan, pengambilan sampel rayap, isolasi bakteri, isolasi biakan murni, uji seleksi bakteri selulolitik, isolasi DNA, amplifikasi gen 16S rRNA, elektroforesis dan spektrofotometer, sekuensing, dan analisis data. Analisis data terdiri dari proses pemotongan sekuen, contig menggunakan Bioedit, homologi tes pada laman NCBI dan EzBiocloud, proses pembuatan pohon terdiri dari *retrieve data*, *alignment* pada clustal X, rekonstruksi pohon pada PAUP, dan visualisasi pohon yang terbentuk dengan TreeView.



Gambar 3.4.A Bagan Alur Penelitian.



Gambar 3.5.B Bagan Alur Penelitian.