

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keberadaan variabel (Sugiyono, 2015). Data sekunder berupa sekuen diperoleh dari *GenBank*, kemudian dilakukan analisis hubungan kekerabatan secara fenetik dan mencari konsensus sekuen pada tanaman timun apel.

3.2 Alat dan Bahan

Daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tertera pada Lampiran 1. Alat serta bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA UPI.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan Data

Data yang digunakan pada penelitian ini merupakan beberapa data sekuen DNA tanaman timun apel, tanaman familia Cucurbitaceae, dan tanaman familia Begoniaceae sebagai *outgroup*. Sampel utama untuk dilakukan pengujian yaitu pada tanaman timun apel, sedangkan pada familia Cucurbitaceae sebagai pembanding dengan tanaman timun apel. Familia Begoniaceae dipilih menjadi *outgroup* dikarenakan familia Begoniaceae *sister group* dari familia Cucurbitaceae. Data sekunder sekuen DNA tanaman terdiri dari 8 data sekunder sekuen DNA tanaman timun apel, 99 data sekunder sekuen DNA tanaman familia Cucurbitaceae, dan 4 data sekunder sekuen *outgroup* dari genus *Begonia*. Nomor akses ITS adalah nomor yang digunakan untuk memudahkan pencarian sekuen pada halaman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Pada Tabel 3.1 merupakan kumpulan data sekunder berupa informasi dari tanaman timun apel. Pada tabel tersebut terdapat informasi berupa data nama latin dari tanaman

tersebut, jumlah pasang basa dan nomor akses ITS untuk memudahkan pencarian sekuen DNA pada situs penyedia sekuen DNA dan ukuran dari sekuen tersebut.

Tabel 3.1 Data sekunder tanaman Timun Apel

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
1.	Apple cucumber A	LC435064.1	612 bp
2.	Apple cucumber B	LC435065.1	614 bp
3.	Apple cucumber C	LC435066.1	599 bp
4.	Apple cucumber D	LC435067.1	616 bp
5.	Apple cucumber E	LC435068.1	618 bp
6.	Apple cucumber F	LC435069.1	618 bp
7.	Apple cucumber G	LC435070.1	617 bp
8.	Apple cucumber H	LC435071.1	618 bp

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Tabel 3.2 menunjukkan data sekunder tanaman familia Cucurbitaceae. Pada tabel ini terdapat nama latin tanaman dari familia Cucurbitaceae, jumlah pasang basa, dan nomor akses ITS untuk memudahkan pencarian tanaman familia Cucurbitaceae pada situs penyedia sekuen DNA dan ukuran dari sekuen tersebut. Data sekunder tanaman familia Cucurbitaceae terdapat sebanyak 99 spesies familia Cucurbitaceae.

Tabel 3.2 Data sekunder macam-macam tanaman familia Cucurbitaceae

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
1.	<i>Cucumis melo</i>	EU312159.1	615 bp
2.	<i>Cucumis sativus</i>	KX231334.1	617 bp
3.	<i>Citrulus lanatus</i>	FJ915098.1	617 bp
4.	<i>Cucumis zeyheri</i>	EF093523.1	621 bp
5.	<i>Cucumis metuliferus</i>	EF093517.1	618 bp
6.	<i>Cucumis zambianus</i>	KY434630.1	613 bp
7.	<i>Cucumis rigidus</i>	KY434625.1	624 bp

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
8.	<i>Cucumis maderaspatanus</i>	KY434573.1	615 bp
9.	<i>Cucumis anguria</i>	AJ488210.1	623 bp
10.	<i>Cucumis africanus</i>	AJ488209.1	624 bp
11.	<i>Cucumis trigonus</i>	AJ488234.1	618 bp
12.	<i>Sechium edule</i>	KF815741.1	617 bp
13.	<i>Sechium mexicanum</i>	HQ201993.1	624 bp
14.	<i>Sechium hintonii</i>	MT112278.1	632 bp
15.	<i>Sechium compositum</i>	MT112270.1	643 bp
16.	<i>Sechium chinantlense</i>	MT112275.1	641 bp
17.	<i>Cucurbita moschata</i>	FJ915109.1	597 bp
18.	<i>Cucurbita pepo</i>	FJ915103.2	628 bp
19.	<i>Cucurbita maxima</i>	AF013332.1	607 bp
20.	<i>Citrullus amarus</i>	KY613612.1	615 bp
21.	<i>Citrullus naudinianus</i>	KT757533.1	611 bp
22.	<i>Benincasa hispida</i>	JX073081.1	618 bp
23.	<i>Benincasa fistulosa</i>	KU358563.1	625 bp
24.	<i>Lagenaria siceraria</i>	KJ026937.1	614 bp
25.	<i>Momordica cymbalaria</i>	KX786115.1	652 bp
26.	<i>Luffa acutangula</i>	KF487353.1	610 bp
27.	<i>Luffa graveolens</i>	KX786101.1	645 bp
28.	<i>Luffa aegyptiaca</i>	KX786100.1	642 bp
29.	<i>Dactyliandra welwitschii</i>	HQ201973.1	634 bp
30.	<i>Gymnostemma pentaphyllum</i>	KF269125.1	657 bp
31.	<i>Schizocarpum palmeri</i>	HQ201991.1	615 bp
32.	<i>Cucurbita ficifolia</i>	FJ915115.2	612 bp
33.	<i>Cionosicyos excisus</i>	HQ201966.1	615 bp
34.	<i>Cayaponia prunifera</i>	MF785329.1	632 bp

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
35.	<i>Calycophysum weberbaueri</i>	JX505458.1	631 bp
36.	<i>Abobra tenuifolia</i>	JX505456.1	617 bp
37.	<i>Indofevillea khasiana</i>	JX505443.1	618 bp
38.	<i>Sicyos cucumerinus</i>	JN560229.1	645 bp
39.	<i>Sechium hintonii</i>	MT112278.1	634 bp
40.	<i>Sechiopsis triquerter</i>	JN560205.1	632 bp
41.	<i>Parasicyos maculatus</i>	JN560200.1	642 bp
42.	<i>Microsechium ruderale</i>	JN560196.1	613 bp
43.	<i>Marah macrocarpus</i>	JN560192.1	621 bp
44.	<i>Frantzia talamancensis</i>	JN560187.1	623 bp
45.	<i>Echinopepon paniculatus</i>	JN560183.1	634 bp
46.	<i>Cyclanthera carthagenensis</i>	JN560181.1	613 bp
47.	<i>Zygosicyos tripartitus</i>	HQ202010.1	639 bp
48.	<i>Melothria domingensis</i>	JX505467.1	615 bp
49.	<i>Wilbrindia verticillata</i>	JX505464.1	642 bp
50.	<i>Tricosanthes papuana</i>	MH710708.1	632 bp
51.	<i>Tricosanthes cucumerina</i>	GQ845144.1	634 bp
52.	<i>Thladiantha dubia</i>	HQ202000.1	601 bp
53.	<i>Siraitia grosvenorii</i>	HQ201999.1	643 bp
54.	<i>Fevillea cordifolia</i>	HQ201975.1	614 bp
55.	<i>Siolmatra brasiliensis</i>	HQ201998.1	643 bp
56.	<i>Sicana odorifera</i>	HQ201994.1	645 bp
57.	<i>Ibervillea sonora</i>	KJ531873.1	613 bp
58.	<i>Gymnopetalum scabrum</i>	HQ201979.1	643 bp
59.	<i>Dendrosicyos socotranus</i>	HQ201974.1	622 bp
60.	<i>Cucurbita palmata</i>	HQ201971.1	641 bp
61.	<i>Corallocarpus welwitschii</i>	HQ201969.1	645 bp

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
62.	<i>Coccinia barteri</i>	HQ201968.1	613 bp
63.	<i>Citrullus ecirrhosus</i>	HQ201967.1	642 bp
64.	<i>Brandegea bigelovii</i>	HQ201963.1	646 bp
65.	<i>Apodanthera sagittifolia</i>	HQ201962.1	612 bp
66.	<i>Coccinia trilobata</i>	HQ608222.1	611 bp
67.	<i>Coccinia adoensis</i>	HQ608200.1	604 bp
68.	<i>Coccinia sessilifolia</i>	HQ608220.1	617 bp
69.	<i>Ecballium elaterium</i>	EU102747.1	642 bp
70.	<i>Bryonia verrucosa</i>	EU102739.1	614 bp
71.	<i>Bryonia syriaca</i>	EU102734.1	642 bp
72.	<i>Bryonia monoica</i>	EU102729.1	642 bp
73.	<i>Bryonia melanocarpa</i>	EU102724.1	621 bp
74.	<i>Bryonia marmorata</i>	EU102718.1	615 bp
75.	<i>Oreosyce africana</i>	EF595907.1	617 bp
76.	<i>Myrmecosicyos messorius</i>	EF093527.1	619 bp
77.	<i>Mukia maderaspatana</i>	EF093526.1	671 bp
78.	<i>Muellerargia timorensis</i>	HM596952.1	614 bp
79.	<i>Cucumis sagittatus</i>	EF093521.1	616 bp
80.	<i>Cucumis sacleuxii</i>	EF093520.1	598 bp
81.	<i>Cucumella bryoniifolia</i>	EF091851.1	595 bp
82.	<i>Selysia cordata</i>	HM104679.1	641 bp
83.	<i>Cayaponia triangularis</i>	HM057412.1	614 bp
84.	<i>Mukia javanica</i>	EF174484.1	618 bp
85.	<i>Austrobryonia pilbarensis</i>	EF487547.1	602 bp
86.	<i>Momordica charantia</i>	HQ201988.1	619 bp
87.	<i>Neoalsomitra integrifoliola</i>	EF621642.1	618 bp
88.	<i>Telfairia pedata</i>	FJ389512.1	619 bp

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
89.	<i>Telfairia occidentalis</i>	AM981085.1	620 bp
90.	<i>Trichosanthes cordata</i>	KT347517.1	632 bp
91.	<i>Tricosanthes wallichiana</i>	KT347527.1	634 bp
92.	<i>Tricosanthes lepiniana</i>	KT347519.1	632 bp
93.	<i>Muellerargia timorensis</i>	HM596952.1	597 bp
94.	<i>Hemsleya amabilis</i>	EF424066.1	643 bp
95.	<i>Hemsleya lijiangensis</i>	EF424065.1	623 bp
96.	<i>Thladiantha villosula</i>	JF978975.1	634 bp
97.	<i>Thladiantha oliveri</i>	JF978969.1	615 bp
98.	<i>Psiguria racemosa</i>	GQ490093.1	634 bp
99.	<i>Psiguria warscewiczii</i>	GQ490145.1	623 bp

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Tabel 3.3 menunjukkan data sekunder berupa informasi tanaman *Begonia* sebagai *outgroup*. Tabel berisi nama latin dan jumlah pasang basa dari tanaman genus *Begonia* tersebut, dan nomor akses ITS untuk memudahkan pencarian tanaman genus *Begonia* pada situs penyedia sekuen DNA dan ukuran dari sekuen tersebut.

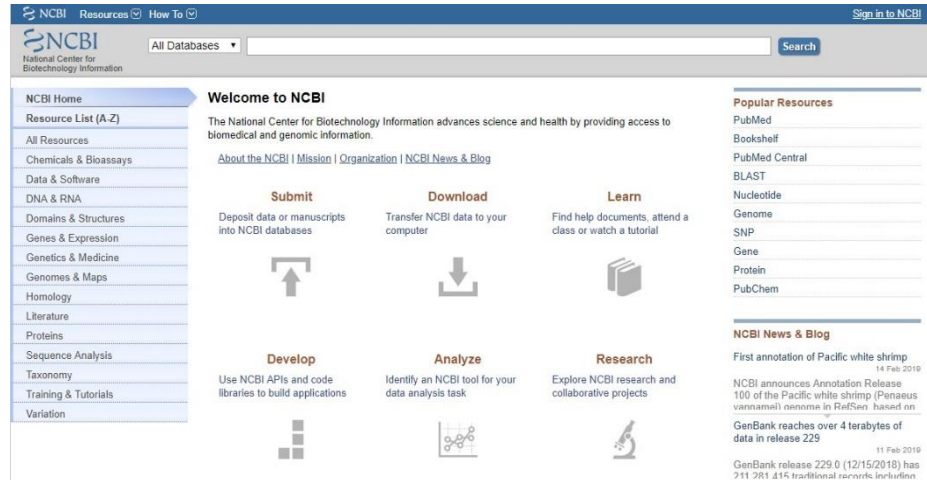
Tabel 3.3 Data Sekunder Tanaman *Begonia*

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
1.	<i>Begonia odorata</i>	AF485168.1	764 bp
2.	<i>Begonia minor</i>	AF485171.1	721 bp
3.	<i>Begonia obliqua</i>	AF485170.1	710 bp
4.	<i>Begonia cubensis</i>	AF485169.1	732 bp

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

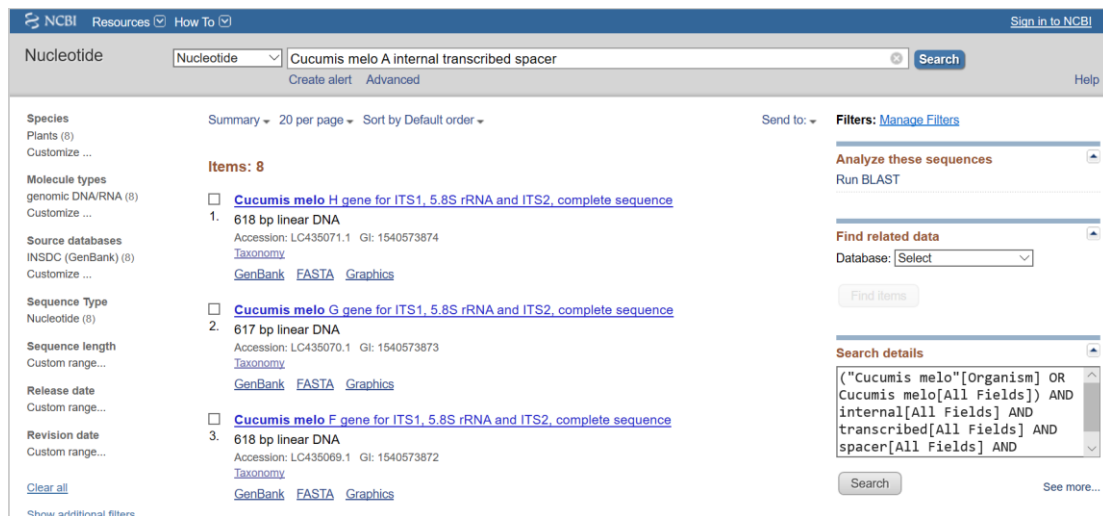
Pada Gambar 3.1 menunjukkan halaman pada situs NCBI, untuk mendapatkan data sesuai pada Tabel 3.1, 3.2, maupun 3.3 dengan cara memasukan nomor akses ITS

pada tabel lalu disisipkan pada kolom pencarian yang ada pada Gambar 3.1 kemudian klik *search*.



Gambar 3.1 Laman NCBI

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)



Gambar 3.2 Laman hasil pencarian

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Gambar 3.2 akan ditemukan data yang berada pada posisi pencarian paling atas, kemudian pilih data tersebut. Setelah terbuka maka dapat dilihat semua informasi mengenai data tersebut pada contoh seperti berikut.

Delian Junior, 2021

**ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

```

LOCUS      LC435071          618 bp  DNA   linear  PLN 18-JAN-2019
DEFINITION Cucumis melo H gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete
sequence.
ACCESSION  LC435071
VERSION   LC435071.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Cucumis melo (muskmelon)
ORGANISM   Cucumis_melo
           Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
           Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
           Pentapetalae; rosids; fabids; Cucurbitales; Cucurbitaceae;
           Benincaseae; Cucumis.
REFERENCE  1
AUTHORS    Hidayat,T., Insanie,A.M. and Saputro,N.W.
TITLE      Phylogenetic Treatment of Apple Cucumber Based on the ITS Region
           Sequence
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 618)
AUTHORS    Hidayat,T., Insanie,A. and Saputro,W.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (26-NOV-2018) Contact:Topik Hidayat Universitas
           Pendidikan Indonesia, Biology Education; Dr. Setiabudhi, Bandung,
           West Java 40154, Indonesia
FEATURES   Location/Qualifiers
           source                1..618
           /organism="Cucumis melo"
           /mol_type="genomic DNA"
           /cultivar="Aceh"
           /isolate="H"
           /db_xref="taxon:3656"
           /tissue_type="Leaf"
           misc_RNA              1..217
           /product="internal transcribed spacer 1"
           rRNA                  218..380
           /product="5.8S ribosomal RNA"
           misc_RNA              381..618
           /product="internal transcribed spacer 2"
ORIGIN
1 tcgatgccta aacatcaaac gaccgcgcaa cgcgtttaa aacaaaactgt tcgcgttagg
61 ggcgggggga agcatgctct ttggctgcct cctccccttc caacgcgttt aaacaaaacc
121 ccggcgcagg tcgcgcacaag gaacttgaaa tgaattcgcc tgcctccctgc cccggcctcg
181 gcgtgcgggg gatggagcat tctagtcgta ttactaacia cgactctcgg caacggatat
241 ctgcgctctc gcatcgatga agaactgtag gaaatgcgat acttggtgtg aattgcagga
301 tcccgcgaac caccgagtct ttgaacgcaa gttgcgccc gagccttctg gccgagggca
361 cgtctgcctg ggcgtcaecg atcgtctccc ccaccacaca actctcccca tgcggggtcg
421 ttgtgaaggc agggacacac actggcctcc cgtacgcacc gtcgtgcgga tggcttaaat
481 tcgagtcctc gatgctcgtc gtcgcgacac tacggtggtt gattcaacct cggtagcgcg
541 tctcgacctc gacgtgactc tcacggactc cttcacgacc cttcgaacgc gcgcccttaa
601 agggagcagc ctctcgac

```

Gambar 3.3 Informasi data *Cucumis melo*

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Informasi data pada Gambar 3.3 merupakan isi informasi dari file secara *default*, file tersebut diunduh dengan format ‘.TXT’ atau ‘.FASTA’. Dari contoh informasi data tersebut dapat dilihat pada baris pertama terdapat judul ‘LOCUS’ diikuti dengan deskripsi ‘LC435071’ yang merupakan nomor akses sekuen tersebut. Informasi selanjutnya ‘618 bp’ yang berarti pada file tersebut memiliki 618 pasang basa atau panjang karakter dari sekuen tersebut. Informasi tanggal ‘18-JAN-2019’ merupakan tanggal publikasinya yaitu 18 Januari 2019. Informasi lainnya terdapat beberapa keterangan yang menjelaskan bahwa data tersebut adalah data sekuen dari ‘*Cucumis melo* H’ serta terdapat beberapa komentar pada judul ‘COMMENT’. Untuk sekuen DNA-nya sendiri terbagi menjadi enam kolom dimana setiap kolom berisi sebelas baris sekuen dengan panjang karakter sepuluh. Pada awal baris sekuens terdapat angka 1

yang menunjukkan indeks awal mula karakter tersebut dan indeks lainnya dapat dilihat pada kolom sebelah kiri pada isi file. Inti atau isi dari file yang berupa sekuen DNA tersebut dimulai setelah kata 'ORIGIN' dan tanda '/' pada bagian paling bawah merupakan penutup atau akhir dari sekuen tersebut. Hal ini dapat memudahkan ketika file ingin langsung di proses tanpa merubah isi terlebih dahulu.

Jika hanya ingin mengambil sekuennya saja tanpa perlu ada informasi- informasi lain terkait dengan sekuen tersebut kita dapat melakukannya dengan cara klik pada tulisan "FASTA" seperti yang ada pada Gambar 3.2, maka akan muncul seperti pada Gambar 3.4 informasi data sekuen beserta namanya tanpa ada informasi lain diluar informasi tersebut.

Pada Gambar 3.4 terlihat isi dari data sekuen yang ingin dicari, data tersebut dapat kita unduh dengan berbagai macam format, pada umumnya menggunakan format fasta, atau langsung dapat kita salin dan masukan ke dalam *text editor* semacam aplikasi *notepad* yang kemudian dapat kita simpan dalam format .txt.

GenBank: LC435071.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>LC435071.1 Cucumis melo H gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete sequence
TCGATGCCTAAACATCAAACGACCCGCGAACGCGTTTAAAAACAAACTGTTTCGCGTTAGGGGCGGGGGGA
AGCATGCTCTTTGGCTGCCTCCTCCCTTCCAACGCGTTTAAACAAAACCCCGCGCAGGTGCGCCAAG
GAACTTGAAATGAATTGCCTGTCCCTGCCCGGCTCGGCGTGCAGGGGATGGAGCATTCTAGTCGTA
TTACTAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGAT
ACTTGGTGTGAATTGCAGGATCCGCGAACCAACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGGAGCCTTCTG
GCCGAGGGCAGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCACACACAACCTCTCCCATGCGGGGTG
TTGTGAAGGCAGGGACACACTGGCCTCCCGTACGCACCGTCTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCCCTC
GATGCTCGTCTGCGGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTGACGCGTCTCGACCTCGACGTCGACT
TCACGGACTCCTTACGACCCTTGAACGCCGCCCTTAAAGGACGACGCTCTCGAC
```

Gambar 3.4 Contoh Isi Data Sekuen

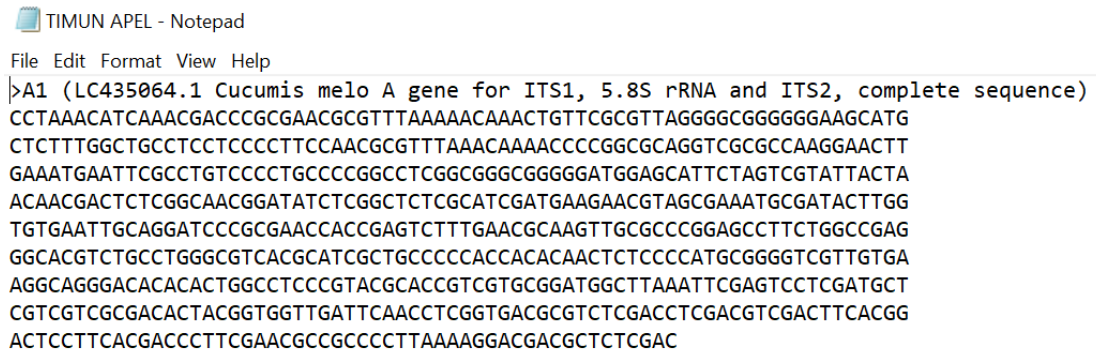
(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Gambar 3.5, data satu sekuen telah disimpan dengan format .txt, data diawali dengan tanda '<' dan dilanjut dengan nama dari sekuen tersebut, jika nama sekuen lebih dari satu kata, maka dapat disambung dengan simbol '_' jika tidak menggunakan simbol tersebut maka nama yang akan terbaca adalah kata pertama dari nama sekuen tersebut.

Delian Junior, 2021

**ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu



TIMUN APEL - Notepad

File Edit Format View Help

```
>A1 (LC435064.1 Cucumis melo A gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete sequence)
CCTAAACATCAAACGACCCGCGAACGCGTTTTAAAAACAACTGTTTCGCGTTAGGGGCGGGGGGAAGCATG
CTCTTTGGCTGCCTCCTCCCCTTCCAACGCGTTTTAAACAAAACCCCGGCGCAGGTCGCGCCAAGGAACTT
GAAATGAATTCGCCTGTCCCCTGCCCCGGCCTCGGCGGGCGGGGATGGAGCATTCTAGTCGTATTACTA
ACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGG
TGTGAATTGCAGGATCCCGGAACCACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGGAGCCTTCTGGCCGAG
GGCAGCTCGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCACCACACAACCTCTCCCATGCGGGGTCGTTGTGA
AGGCAGGGACACACACTGGCCTCCCCTACGCACCGTGTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCTCGATGCT
CGTCGTGCGGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTGACGCGTCTCGACCTCGACGTCGACTTCACGG
ACTCCTTACGACCCTTGAACGCCGCCCTTAAAAGGACGACGCTCTCGAC
```

Gambar 3.5 Contoh Isi Data Sekuen

Pada penelitian ini dibutuhkan lebih dari satu sekuen, maka data sekuen lainnya dapat disimpan dibawah sekuen yang telah ada seperti pada Gambar 3.6.



TIMUN APEL - Notepad

File Edit Format View Help

```
>A1 (LC435064.1 Cucumis melo A gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete sequence)
CCTAAACATCAAACGACCCGCGAACGCGTTTTAAAAACAACTGTTTCGCGTTAGGGGCGGGGGGAAGCATG
CTCTTTGGCTGCCTCCTCCCCTTCCAACGCGTTTTAAACAAAACCCCGGCGCAGGTCGCGCCAAGGAACTT
GAAATGAATTCGCCTGTCCCCTGCCCCGGCCTCGGCGGGCGGGGATGGAGCATTCTAGTCGTATTACTA
ACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGG
TGTGAATTGCAGGATCCCGGAACCACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGGAGCCTTCTGGCCGAG
GGCAGCTCGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCACCACACAACCTCTCCCATGCGGGGTCGTTGTGA
AGGCAGGGACACACACTGGCCTCCCCTACGCACCGTGTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCTCGATGCT
CGTCGTGCGGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTGACGCGTCTCGACCTCGACGTCGACTTCACGG
ACTCCTTACGACCCTTGAACGCCGCCCTTAAAAGGACGACGCTCTCGAC

>A2 (LC435065.1 Cucumis melo B gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete sequence)
TCGATGCCTAAACATCAAACGACCCGCGAACGCGTTTTAAAAACAACTGTTTCGCGTTAGGGGCGGGGGGAAG
CATGCTCTTTGGCTGCCTCCTCCCCTTCCAACGCGTTTTAAACAAAACCCCGGCGCAGGTCGCGCCAAGGTT
CTTGAATGAATTCGCCTGTCCCCTGCCCCGGCCTCGGCGGGGGTGGCATGGGCACTTCTAGTCGTATT
ACAACGACTCTTGGCAACGAATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGG
GGTGAATTGCAGGATCCCGGAACCACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGGAGCCTTCTGGCCG
AGGGCACGTCGCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCACCACACAACCTCTCCCATGCGGGGTCGTTGT
GAAGGCAGGGACACACACTGGCCTCCCCTACGCACCGTGTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCTCGATG
CTCGTCGTGCGGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTGACGCGTCTCGACCTCGACGTCGACTTCAC
GGACTCCTTACGACCCTTGAACGCCGCCCTTAAAAGGACGACGCTCTCGAC

>A3 (LC435066.1 Cucumis melo C gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete sequence)
TCGATGCCTAAACATCAAACGACCCGCGAACGCGTTTTAAAAACAAATGTTTTCGCGTTAGGGGCGGGGGGA
AGCATGCTCTTTGGCTGCCTCCTCCCCTTCCAACGCGTTTTAAACAAAACCCCGGCGCAGGTCGCGCCAAG
GAACTTGAATGAATTCGCCTGTCCCCTGCCCCGGCCTCGGCGTTCGGGGGATGGAGCATTCTAGTCGTA
TTACTAACACGACTCTGGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGAT
ACTTGGTGTGAATTCAGGATCCCGGAACCACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGGGCCCGGAGCCTTCTG
GCCGAGGGCCCTCTGCCTGGGGTCATGCCCCACCACACAACCTCTCCCATGGGGGGGGCGTTGTGA
AGGCAGGGAAACACACTGGCCTCCCCTACGCACCGTGTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCTCGATGCT
CGTCGTGCGGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTGACGCGTCTCGACCTCGACGTCGACTTCACGG
ACTTCTTACGACCCTTGAACGCCGCCCTTAAAAGG
```

Gambar 3.6 Data Sekuen Lebih dari Satu

Delian Junior, 2021

*ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.3.2 Sequence Alignment

Data sekuen DNA yang sudah disiapkan masih bersifat mentah, tidak dapat langsung digunakan untuk mencari *barcode*. Terdapat dua proses yang harus dilakukan hingga data siap digunakan untuk penelitian ini, yaitu proses *sequence alignment* dan *sequence trimming*. Untuk mencari sebuah *barcode* dari suatu spesies dibutuhkan lebih dari satu sekuen yang sejenis, oleh karena itu diperlukan proses *sequence alignment* atau penjajaran sekuen. Selanjutnya adalah *trimming sequence* atau pemotongan, yaitu proses yang dilakukan untuk membuat panjang antar sekuen menjadi sama, awal dan akhir sekuen sejajar atau sama, tujuannya untuk mengambil inti dari sekuen tersebut. Kedua proses *sequence alignment* dan *trimming sequence* dilakukan untuk membuat persamaan antar sekuen.

Untuk melakukan proses *sequence alignment* dibutuhkan bantuan perangkat lunak lainnya bernama clustalX, perangkat lunak ini dapat mudah didapatkan karena gratis dan semua pihak dapat menggunakannya. Aplikasi dapat diunduh pada halaman <http://www.clustal.org/download/current/>. Pada halaman tersebut dapat memilih versi berapa dan sistem operasi yang digunakan. Pada penelitian ini menggunakan clustalX versi 2.1 dan pilihan sistem operasi *windows*. Untuk memudahkan memahami proses dari *sequence alignment* ini menggunakan clustalX dapat melihat langkah berikut ini.

<i>Preprocessing Data – Sequence Alignment</i>
<p>begin</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Jalankan aplikasi ClustalX 2. Pilih menu FILE - Load Sequences... 3. Pilih file mentah yang akan dimasukan, Klik Open 4. Pilih menu ALIGNMENT - Do Complete Alignment 5. Beri nama untuk file yang akan menjadi output, pilih OK 6. Untuk menyimpan ke dalam format FASTA, pilih menu FILE - Save Sequences As, Centang pada Fasta Format, pilih OK <p>End</p>

Gambar 3.7. Langkah proses data *sequence alignment*

Pada Gambar 3.7, jika file sekuen tersebut dimasukan kedalam program perangkat lunak ClustalX maka akan seperti pada Gambar 3.8. Terlihat pada gambar terdiri dari beberapa sekuen dengan panjang sekuen yang berbeda satu dengan lainnya.



Gambar 3.8. Program ClustalX

Proses selanjutnya adalah mengikuti langkah demi langkah seperti pada Gambar 3.7. Jika sudah dilakukan semua langkah maka hasil *file* tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.9. Terlihat perbedaannya sekuen sebelum dilakukan proses *alignment* dengan yang sudah.

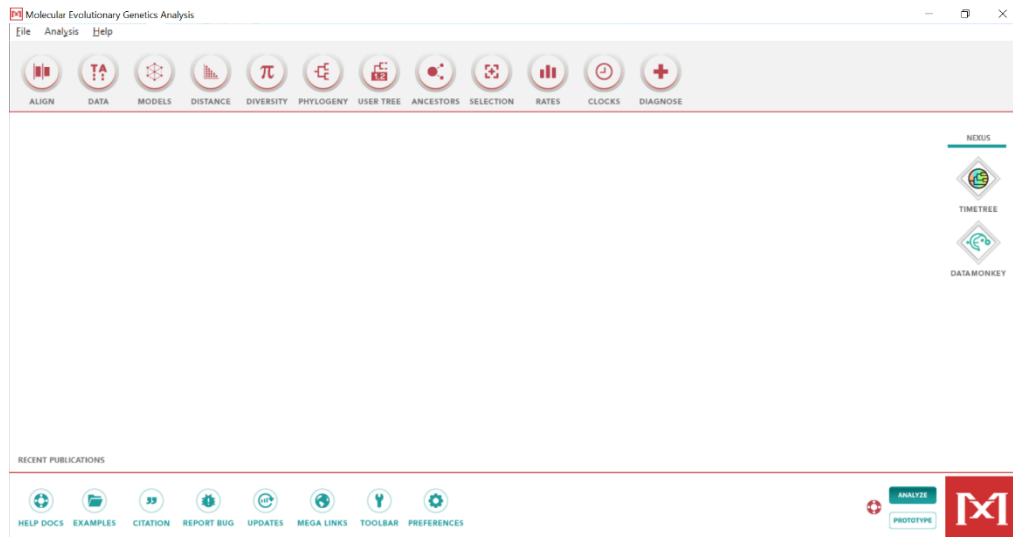


Gambar 3.9. Sekuen DNA setelah proses *Alignment*

dihapus. Pada bagian belakang dilakukan penyejajaran seperti pada Gambar 3.10, namun bedanya jika pada bagian akhir atau belakang, indeks selanjutnya hingga akhir yang dihapus seperti pada Gambar 3.11. Tanda kotak merah pada Gambar 3.10 dan Gambar 3.11 merupakan sekuen DNA yang akan dipotong atau dibuang. Setelah karakter dari seluruh sekuen dihapus sesuai dengan Gambar 3.10 dan 3.11, maka file dapat di simpan. *File* tersimpan dengan format *default* seperti sebelumnya yaitu 'aln'. *File* tersebut dapat dibuka kembali dengan perangkat lunak clustalX dan dapat dikonversi menjadi format 'FASTA' menggunakan perangkat lunak clustalX.

3.3.3 Analisis Fenetik

Proses selanjutnya setelah dilakukan proses *sequences alignment* dan *sequences trimming* dilakukan proses analisis fenetik dengan merekonstruksi pohon fenetik dengan *Unweighted Pair Group Method With Averages* (UPGMA). Proses pembuatan pohon fenetik ini menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) seperti pada Gambar 3.12.



Gambar 3.12. Laman Perangkat Lunak MEGA

Preprocessing Data – Analisis fenetik

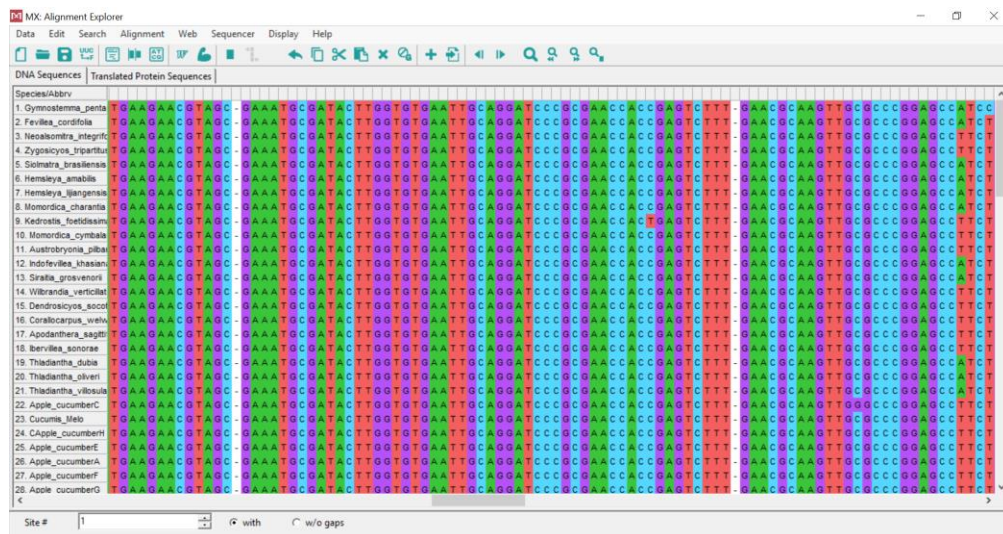
begin

1. Jalankan aplikasi MEGA X
2. Pilih menu ALIGN – Edit/build alignment
3. Pilih create a new alignment, Klik Ok
4. Pilih DNA – lalu pilih edit
5. Pilih insert sequence from file – pilih hasil alignment dengan format ‘aln’
6. Setelah muncul file alignment tersebut – pilih Data
7. Pilih Export Alignment – klik export MEGA
8. Kembali ke menu utama MEGA – Pilih Phylogeny
9. Pilih Construct/Test UPGMA Tree
10. Pilih file yang sudah di export menjadi format mega
11. Pilih open – klik ok – muncul hasil rekonstruksi pohon UPGMA
12. Simpan hasil rekonstruksi pohon UPGMA

End

Gambar 3.13 Langkah proses data analisis fenetik

Pada Gambar 3.13, jika file hasil *alignment* dan *trimming* tersebut dimasukan kedalam program MEGA maka akan seperti pada Gambar 3.14. Terlihat pada gambar terdiri dari beberapa spesies dengan berbagai sekuen seperti pada Gambar 3.14.



Gambar 3.14. Program MEGA

Delian Junior, 2021

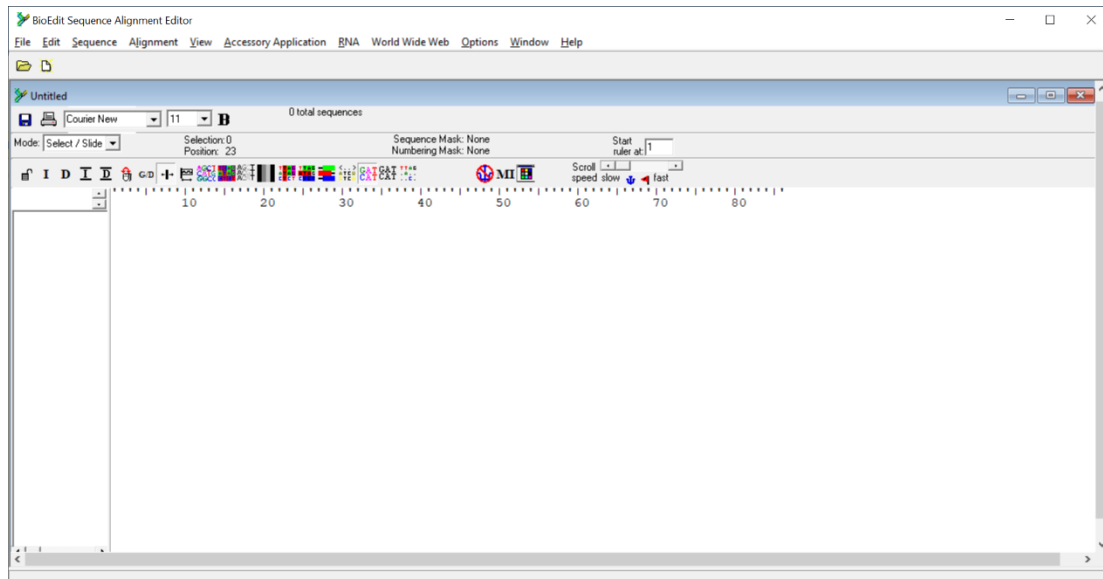
**ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Proses selanjutnya adalah mengikuti langkah demi langkah seperti yang telah dijelaskan pada Gambar 3.13. Jika sudah mengikuti semua langkah maka hasil *file* tersebut dapat membentuk sebuah rekonstruksi pohon UPGMA.

3.3.4 Membuat Konsensus Sekuen

Proses selanjutnya setelah dilakukan proses analisis fenetik menggunakan perangkat lunak MEGA dilakukan proses membuat konsensus sekuen dengan menentukan subsekuen dari sekuen DNA timun apel. Pada proses pembuatan konsensus sekuen yang dilibatkan dalam hal ini hanya sekuen dari tanaman timun apel saja karena yang difokuskan untuk pembuatan DNA *Barcode* pada penelitian ini. Konsensus sekuen dilakukan dengan perangkat lunak lainnya dengan menggunakan BioEdit *Sequence Alignment Editor* seperti pada Gambar 3.15.



Gambar 3.15. Laman Perangkat Lunak BioEdit

Preprocessing Data – Membuat Konsensus Sekuen

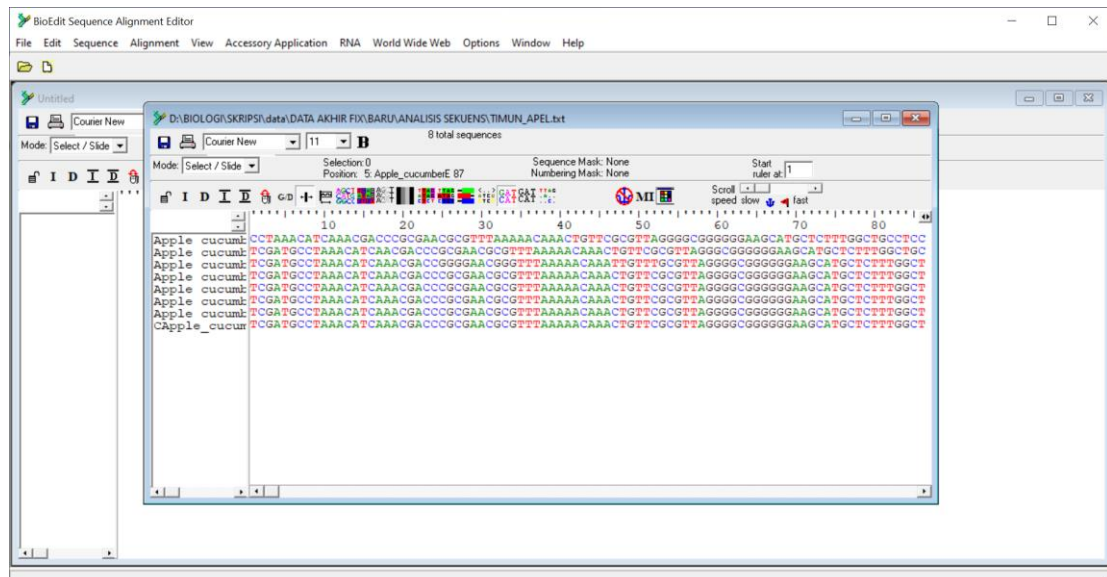
begin

1. Jalankan aplikasi BioEdit
2. Pilih menu File - klik open
3. Pilih daftar sekuen tanaman timun apel dengan format 'txt.'
4. Pilih Alignment - klik Create Consensus Sequences
5. Untuk menyimpan file, pilih menu FILE - Save As, pilih OK, file akan tersimpan dengan format FASTA

End

Gambar 3.16. Langkah proses data konsensus sekuen

Pada Gambar 3.16, file sekuen DNA timun apel diinput ke dalam perangkat lunak BioEdit akan terlihat seperti pada Gambar 3.17. Terlihat pada gambar terdiri dari sekuen tanaman timun apel dengan berbagai sekuen seperti pada Gambar 3.17.



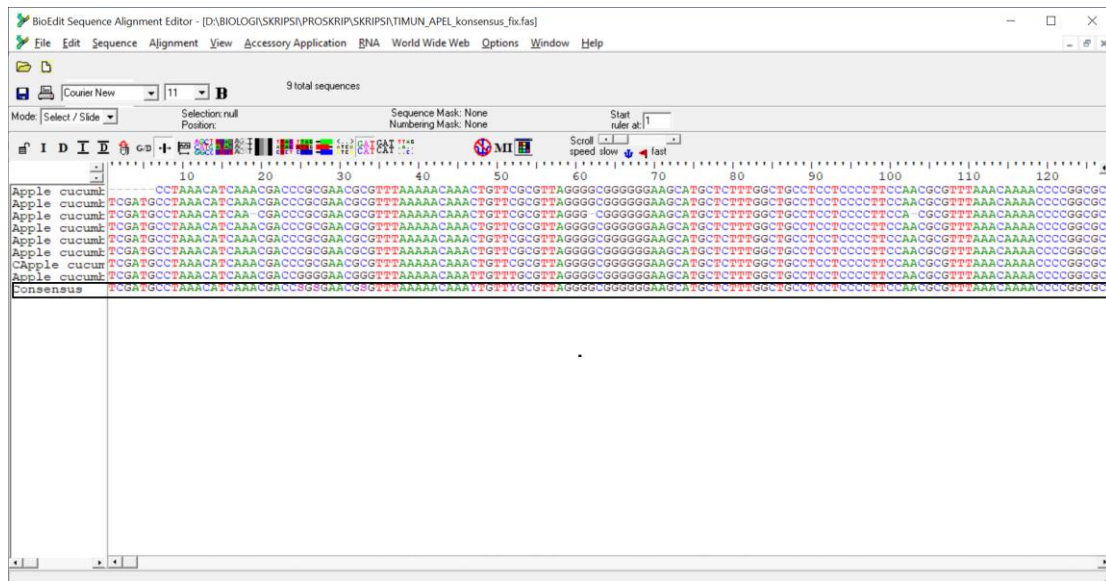
Gambar 3.17. Input data sekuen DNA tanaman timun apel

Proses selanjutnya adalah mengikuti langkah demi langkah seperti pada Gambar 3.16. Jika sudah dilakukan semua langkah maka hasil *file* tersebut dapat dilihat seperti Gambar 3.18, terlihat dengan kotak berwarna hitam hasil dari konsensus sekuen dari tanaman timun apel.

Delian Junior, 2021

**ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu



Gambar 3.18. Hasil dari membuat konsensus sekuen

Hasil dari membuat konsensus sekuen yang berupa deretan subsekuen dari beberapa spesies tanaman timun apel tersebut disimpan dengan format ‘doc.’ Untuk dilakukan proses selanjutnya berupa uji coba sekuen tersebut dengan proses *in-silico* PCR, namun dilakukan terlebih dahulu desain primer.

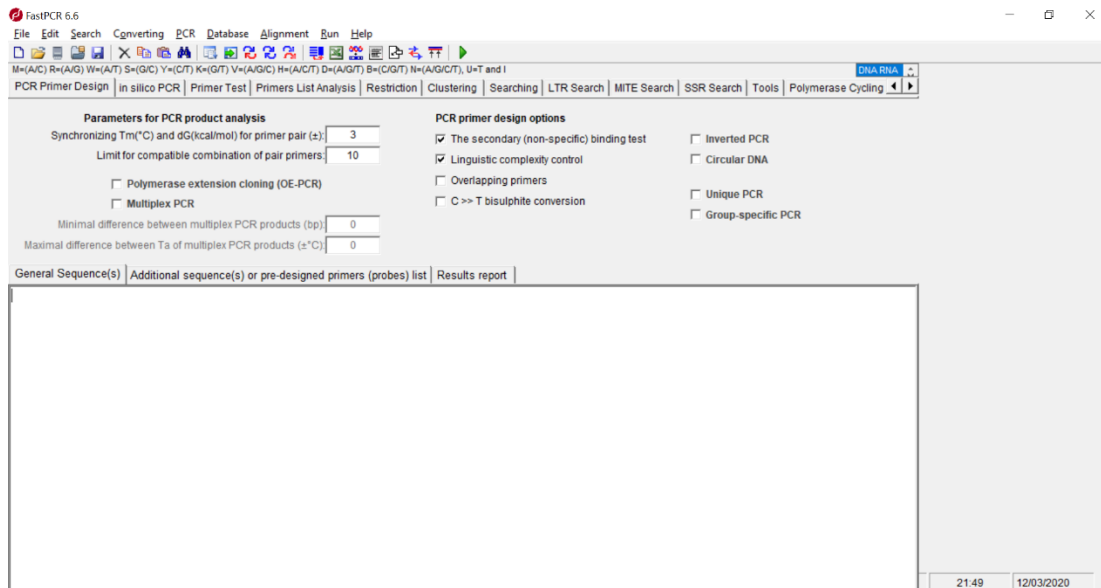
3.3.5 Desain Primer

Pada proses desain primer ini menggunakan perangkat lunak *FastPCR* dengan melibatkan data hasil konsensus sekuen pada proses sebelumnya seperti pada Gambar 3.19. Proses pembuatan desain primer tersebut untuk mengetahui daerah mana saja pada konsensus sekuen tersebut yang dapat dijadikan target untuk menghasilkan kandidat-kandidat primer. Perangkat lunak *FastPCR* ini digunakan untuk mengoptimalkan desain primer untuk urutan DNA atau cDNA target. Optimalisasi primer memiliki dua tujuan: efisiensi dan selektivitas. Selektivitas primer mensyaratkan bahwa pasangan primer tidak secara kebetulan mengikat ke lokasi acak selain dari target tanaman itu sendiri. Desain pasangan primer pendek atau panjang yang sesuai hanya satu tujuan dari prediksi produk PCR. Informasi lain yang disediakan oleh perangkat lunak *FastPCR* dalam *in-silico* dapat mencakup penentuan lokasi primer, orientasi, panjang setiap amplicon.

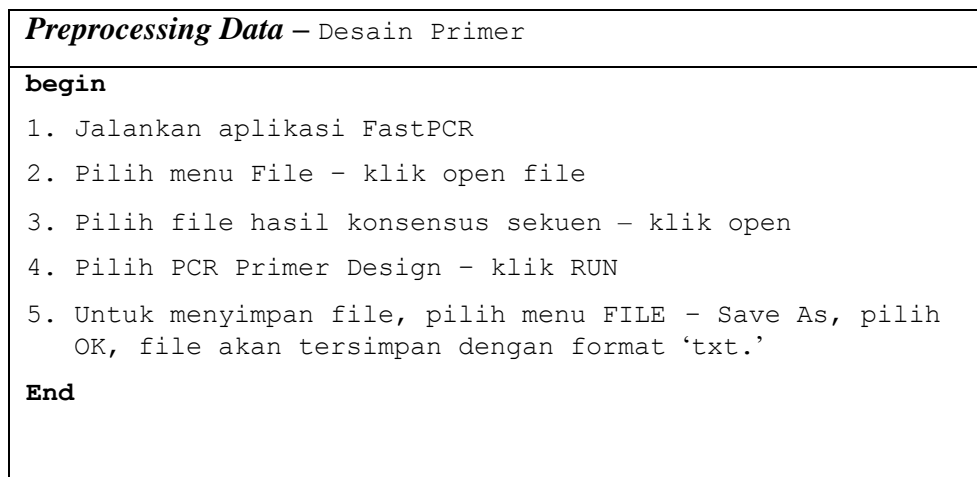
Delian Junior, 2021

ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu



Gambar 3.19 Laman Perangkat Lunak FastPCR



Gambar 3.20. Langkah proses Desain Primer

Pada Gambar 3.20, file konsensus sekuen timun apel diinput ke dalam perangkat lunak FastPCR akan terlihat seperti pada Gambar 3.21. Terlihat pada Gambar 3.21 terdiri dari kandidat-kandidat primer yang memiliki kriteria baik pada primer tersebut. Setelah melakukan desain primer kandidat-kandidat dari primer tersebut disimpan menjadi sebuah *file* dengan format ‘doc.’ untuk dilakukan proses berikutnya uji coba *in-silico* PCR.

The screenshot shows the FastPCR 6.6 software interface. The top menu bar includes File, Edit, Search, Converting, PCR, Database, Alignment, Run, and Help. Below the menu is a toolbar with various icons. The main window is divided into several sections:

- Parameters for PCR product analysis:** Synchronizing Tm(°C) and dG(kcal/mol) for primer pair (z): 3; Limit for compatible combination of pair primers: 10; Polymerase extension cloning (OE-PCR): ; Multiplex PCR: ; Minimal difference between multiplex PCR products (bp): 0; Maximal difference between Ta of multiplex PCR products (±°C): 0.
- PCR primer design options:** The secondary (non-specific) binding test: ; Linguistic complexity control: ; Overlapping primers: ; C >> T bisulphite conversion: ; Inverted PCR: ; Circular DNA: ; Unique PCR: ; Group-specific PCR: .
- Sequences: 1 : 624 | Additional sequence(s) or pre-designed primers (probes) list | PCR primers design result**

PrimerID	Sequence (5'-3')	Length (nt)	Tm (°C)	dG (kcal/mol)	Tm_3'end (°C)	CG (%)	Linguistic_Complexity (%)	Primer_Quality (%)
IF1_1_2-24	cgatgcttaaacatcaaaagacc	23	56,8	-28,4	34,3	47,8	83	80
IF2_1_95-116	cccttccaacgogtttaacaaa	22	56,3	-27,5	31,2	45,5	82	76
IF3_1_143-165	acttgaatgaattgcgctgtcc	23	55,8	-27,8	39,6	43,5	83	79
IF4_1_190-210	ggcatggagcattcttagctgt	21	56,4	-26,6	30,7	52,4	87	87
IF5_1_192-216	catggagcattcttagctgttact	25	54,1	-28,3	28,5	40,0	91	87
IF6_1_213-234	tactaacaagactcttcgcaaa	22	55,3	-27,0	39,2	45,5	75	75
IF7_1_223-243	gactctcggcaacgggatctct	21	55,6	-26,3	30,5	52,4	79	75
IF8_1_255-275	tcgataagagcagctgacgcaa	21	55,5	-26,5	38,7	47,6	82	82
IF9_1_259-279	tgaagaacgtgacgcaaatgc	21	55,5	-26,4	36,9	47,6	82	82
IF10_1_266-286	cgtgacgcaaatcgatcactct	21	55,2	-26,2	31,2	47,6	90	90
IF11_1_269-289	agcgcgaatcgactctctgctc	21	56,3	-26,8	35,7	47,6	92	87
IF12_1_272-295	cgaaatcgatcctggtgtgaat	24	56,1	-28,9	31,9	41,7	81	75
IF13_1_278-299	ggataactggtggaattgca	22	56,0	-27,3	34,0	45,5	88	75
IF14_1_280-302	gatcctggtggaattgcagga	23	54,9	-27,3	34,5	43,5	88	82
IF15_1_284-305	cttgggtggaattgcagatcc	22	56,2	-27,1	35,0	50,0	88	84
IF16_1_308-328	cgaaaccagagctctcttgaa	21	55,0	-26,0	27,8	47,6	79	79
IF17_1_315-336	ccgagctctttgaagcgaagct	22	56,1	-27,4	36,5	45,5	88	88
IF18_1_466-486	gtcgtgggatgcttaaat	21	55,8	-26,5	27,1	47,6	90	80
IF19_1_472-494	cgagtgcttaaatcggatcctc	23	56,7	-28,4	33,1	47,8	95	93
IF20_1_478-500	gcttaaatgagctcctgatgc	23	56,4	-28,2	38,8	47,8	88	77
IF21_1_511-532	gacactcagctggttgattcaa	22	54,7	-26,5	30,8	45,5	90	87

Gambar 3.21 Hasil Desain Primer

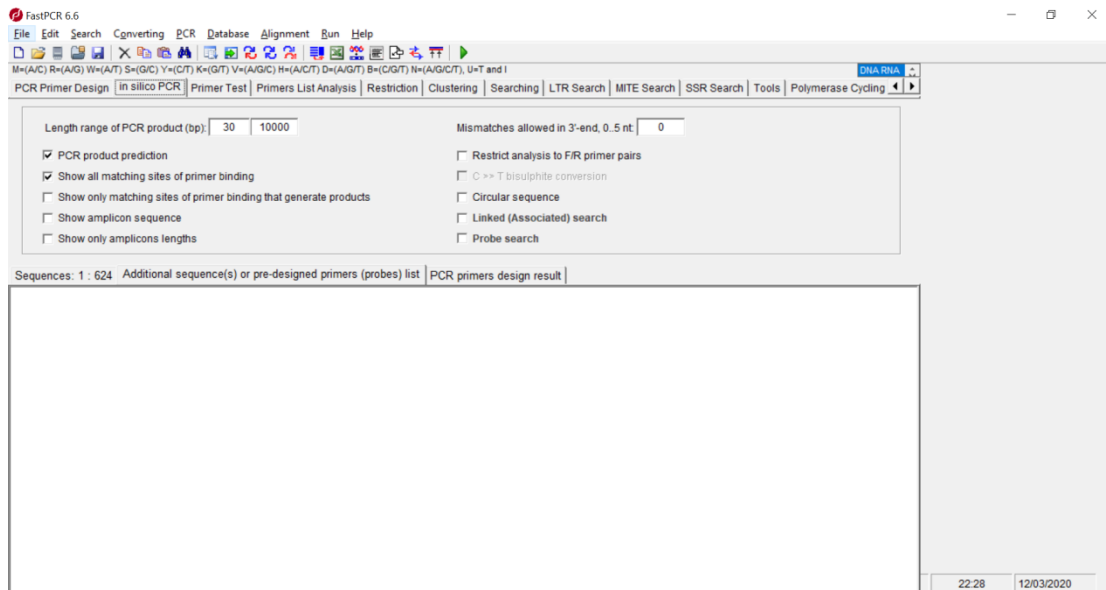
3.3.6 Uji Coba *In-silico* PCR

In silico PCR mengacu pada alat komputasi yang digunakan untuk menghitung hasil reaksi berantai polimerase (PCR). Alat ini digunakan untuk mengoptimalkan desain primer untuk sekuens DNA atau cDNA target. Desain pasangan primer pendek atau panjang yang sesuai hanyalah salah satu tujuan prediksi produk PCR. Informasi lain yang disediakan oleh alat PCR in silico dapat mencakup penentuan lokasi primer, orientasi, panjang setiap ampikon. Template DNA diamplifikasi dengan siklus berulang dua atau tiga langkah termasuk suhu (1) denaturasi panas (denaturasi template DNA untai ganda menjadi untai tunggal), (2) *annealing* (*annealing* primer pada DNA *template*), dan (3) reaksi ekstensi (perpanjangan primer dengan DNA polimerase) (Kalender *et al.*, 2011). Pada tahap ini kandidat-kandidat primer yang baik di uji coba pada beberapa spesimen yang akan menjadi target, namun dalam pemilihan spesimen tidak semuanya melainkan beberapa spesimen yang mewakili pada genus nya, seperti pada genus *Cucumis*, *Cucurbita*, *Sechium*, *Citrullus*, *Benincasa*, *Coccinia*, dan *outgroup* dari penelitian ini genus *Begonia*. Pada proses uji coba *in-silico* ini tetap menggunakan perangkat lunak FastPCR seperti pada Gambar 3.22, karena pada perangkat lunak FastPCR ini bisa digunakan untuk desain primer dan *in-silico* PCR

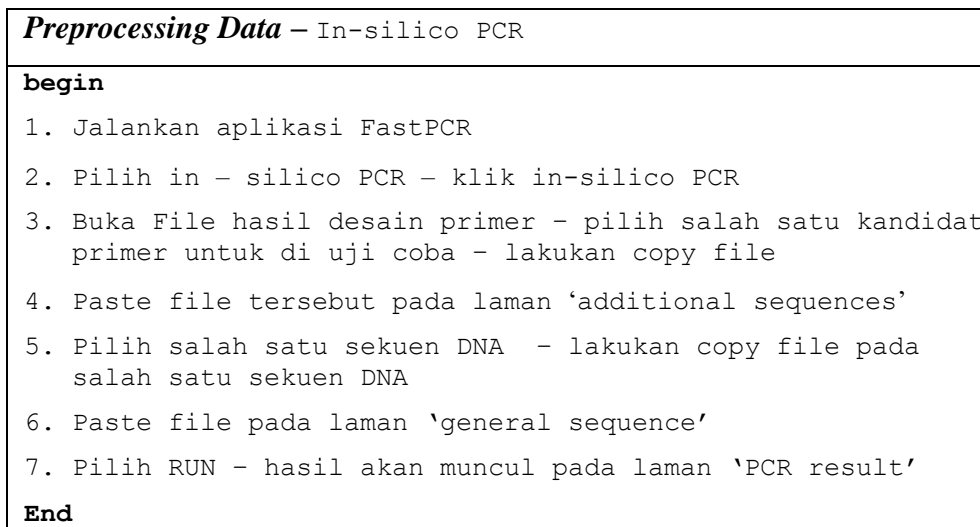
Delian Junior, 2021

ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO

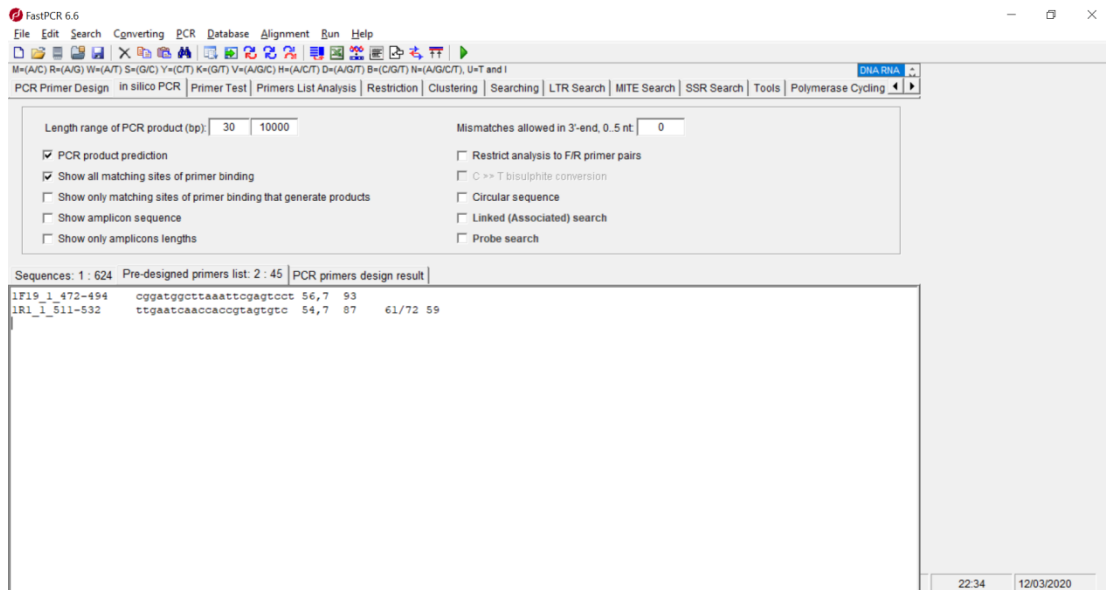
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu



Gambar 3.22. Laman Perangkat Lunak FastPCR

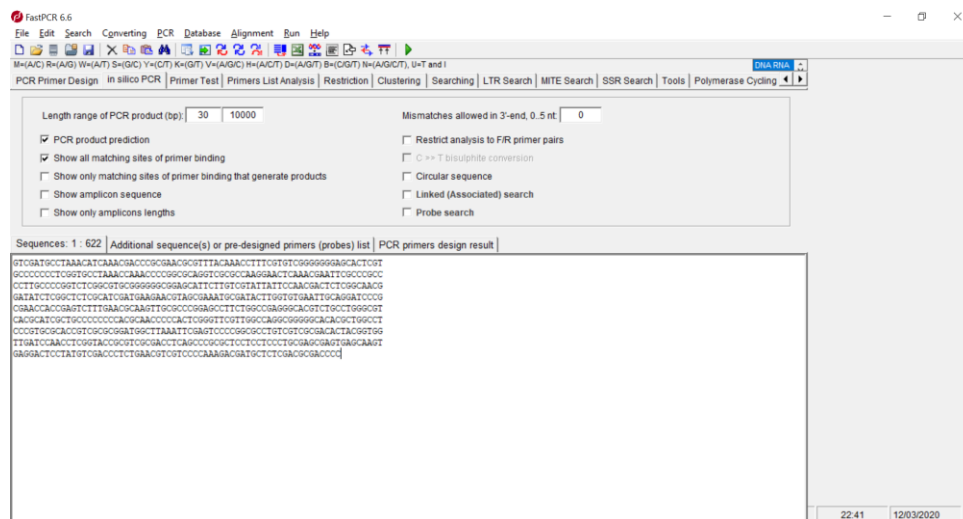
Gambar 3.23. Langkah proses *in-silico* PCR

Pada Gambar 3.23, file desain pimer dipilih salah satu kandidat primer yang akan diuji coba dimasukkan ke dalam perangkat lunak FastPCR pada laman ‘*additional sequences*’ akan terlihat seperti pada Gambar 3.23. Terlihat pada Gambar 3.24 merupakan salah satu kandidat primer.



Gambar 3.24. Salah Satu Kandidat Primer

Pada tahap berikutnya dilakukan pemasukan data sekuen DNA dari salah satu spesies Cucurbitaceae sebagai target untuk melihat hasil *in-silico* PCR seperti pada Gambar 3.24. Setelah dilakukan pemasukan data, data tersebut dijalankan dengan melakukan 'RUN' pada program tersebut, setelah program tersebut dijalankan akan muncul sebuah primer yang terdapat pada laman 'PCR primer design result' seperti pada gambar 3.25.

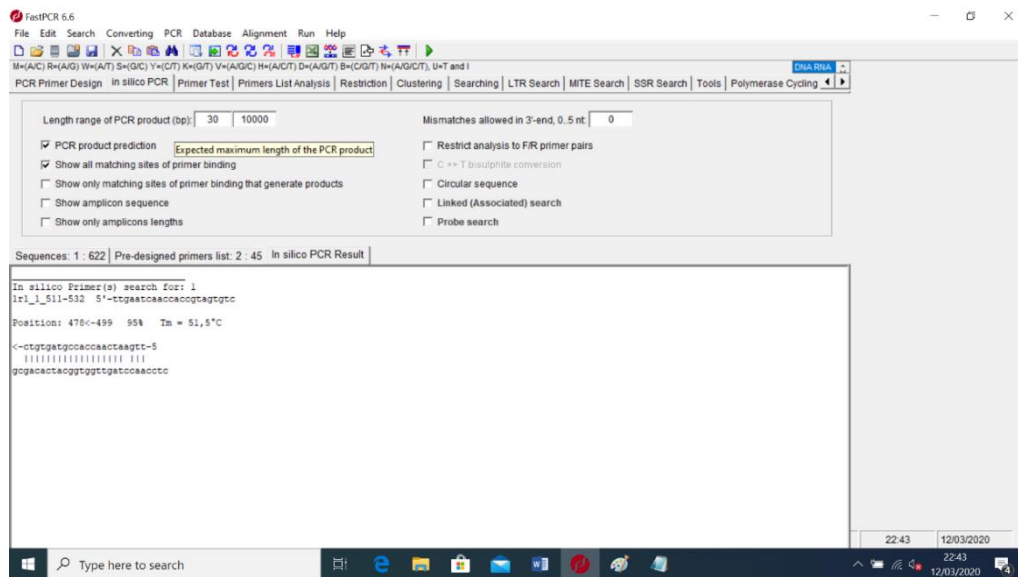


Gambar 3.25. Pemasukan Data salah satu Sekuen DNA

Delian Junior, 2021

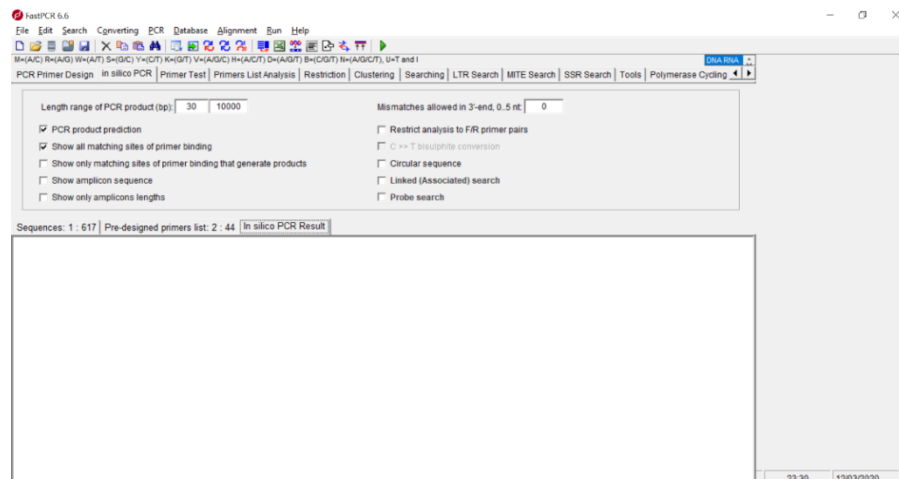
**ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu



Gambar 3.26. Hasil *Running In-silico* Positif PCR

Pada proses *running in-silico* PCR hasil dapat berupa negatif dan positif, hasil negatif itu apabila seperti pada gambar 3.27. Hasil yang positif ditandai dengan adanya hasil primer yang menempel pada target sekuen seperti pada Gambar 3.26. Pada Gambar 3.27, tersebut tidak ada hasil apapun yang artinya bahwa kandidat primer yang diuji coba berhasil tidak menempel pada target atau tidak ada yang sama dengan target, namun kandidat primer itu sendiri akan sama pada target yang sesuai.



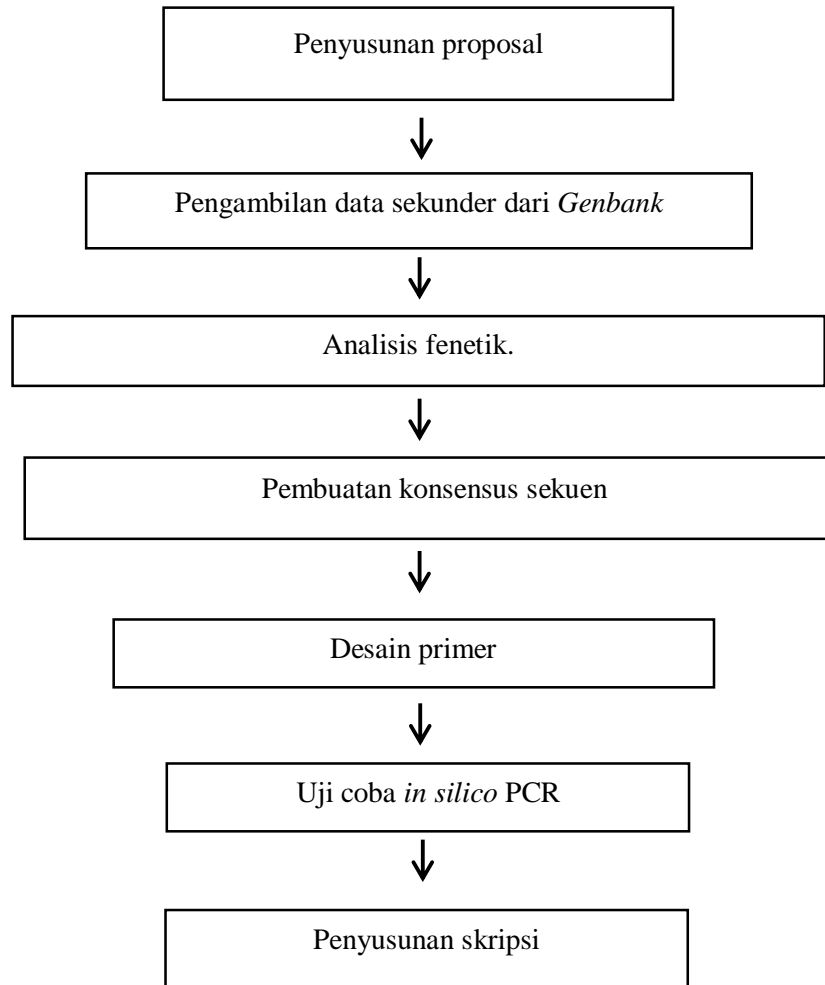
Gambar 3.27 Hasil Negatif *In-silico* PCR

Delian Junior, 2021

**ANALISIS KODE BATANG DNA DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)
TANAMAN TIMUN APEL SECARA IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.4 Alur Penelitian



Bagan alir 3.1 Bagan alir penelitian