

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian deskriptif yang dilakukan untuk memberikan gambaran lebih terperinci mengenai suatu gejala atau fenomena (Priyono, 2016). Dalam hal ini, fenomena yang dianalisis adalah pengembangan DNA *barcode* untuk tumbuhan Magnoliopsida dan Liliopsida secara *in silico* berdasarkan sekuen *mat-K* dari genom kloroplas.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini mencakup spesies dari tumbuhan Magnoliopsida, Liliopsida, dan *outgroup*. Sampel tumbuhan Magnoliopsida, Liliopsida, dan *outgroup* yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan ketersediaan sekuen spesies berdasarkan DNA *mat-K* pada *GenBank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). *Outgroup* yang digunakan merupakan anggota dari Divisi Pinophyta (Gymnospermae). Sampel tumbuhan Magnoliopsida, Liliopsida, dan *outgroup* terdapat pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Sampel tumbuhan Magnoliopsida, Liliopsida, dan *Outgroup*

No	Class	Subclass	Ordo	Famili	Species	Accession Number
1	Magnoliopsida	Magnoliidae	Magnoliales	Myristicaceae	<i>Myristica maingayi</i>	AY220452.1
2				Annonaceae	<i>Annona muricata</i>	AF543722.1
3			Piperales	Piperaceae	<i>Piper nigrum</i>	AB040153.2
4			Lurales	Lauraceae	<i>Persea indica</i>	FJ408868.1
5					<i>Laurus nobilis</i>	AF244407.1
6					<i>Cinnamomum verum</i>	AJ247157.1
7		Hamamelidae	Urticales	Moraceae	<i>Ficus carica</i>	AY257530.1
8			Casuarinales	Casuarinaceae	<i>Casuarina equisetifolia</i>	AY191701.1
9		Caryophyllidae	Caryophyllales	Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i>	KP747935.1
10				Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	DQ855850.1
11		Dilleniidae	Theales	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	AJ429305.1
12				Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i>	DQ536649.1
13					<i>Cucumis melo</i>	DQ785847.1
14			<i>Cucumis sativus</i>		DQ536662.1	
15			Violales	Passifloraceae	<i>Passiflora suberosa</i>	GU266608.1
16				Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	AY483221.1
17		Capparales	Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i>	MG924004.1	
18				<i>Raphanus raphanistrum</i>	JN584998.1	
19		Rosidae	Rosales	Rosaceae	<i>Malus domestica</i>	AM042562.1
20					<i>Pyrus communis</i>	JQ391044.1

No	Class	Subclass	Ordo	Famili	Species	Accession Number
21	Magnoliopsida	Rosidae	Rosales	Rosaceae	<i>Prunus persica</i>	AF288117.1
22			Vitales	Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	AJ429274.1
23			Sapindales	Rutaceae	<i>Citrus limon</i>	AB762353.1
24					<i>Citrus sinensis</i>	AB762345.1
25					<i>Citrus tangerina</i>	AB626761.1
26			Fabales	Fabaceae	<i>Cicer arietinum</i>	AY386897.1
27					<i>Vigna unguiculata</i>	JN008199.1
28					<i>Cajanus crassus</i>	MG674204.1
29			Oxidales	Oxalidaceae	<i>Averrhoa carambola</i>	AY935924.1
30					<i>Oxalis latifolia</i>	EU002186.1
31			Fagales	Juglandaceae	<i>Juglans sigillata</i>	KX526663.1
32			Malvales	Malvaceae	<i>Theobroma cacao</i>	AY321195.1
33			Myrtales	Myrtaceae	<i>Syzygium wilsonii</i>	DQ088618.1
34			Rosales	Grossulariaceae	<i>Ribes fasciculatum</i>	KC737242.1
35		Rubiales	Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	DQ401346.1	
36		Solanales	Solanaceae	<i>Solanum rostratum</i>	KT176603.1	
37				<i>Capsicum annuum</i>	EF537266.1	
38				<i>Solanum pseudocapsicum</i>	MF159407.1	
39			Convolvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i>	AJ429355.1	
40			Lamiales	Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i>	HQ384495.1
41					<i>Salvia nemorosa</i>	KT176607.1
42		Verbenaceae		<i>Lippia integrifolia</i>	HM853860.1	
43			Oleaceae	<i>Olea europaea</i>	AJ429335.1	
44		Asterales	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	AJ429380.1	
45				<i>Dahlia coccinea</i>	EU049345.1	

No	Class	Subclass	Ordo	Famili	Species	Accession Number		
46	Magnoliopsida	Asteridae	Apiales	Apiaceae	<i>Apium graveolens</i>	AJ429370.1		
47			Ericales	Actinidiaceae	<i>Actinidia chinensis</i>	U61324.1		
48				Ericaceae	<i>Vaccinium japonicum</i>	AF419706.1		
49					<i>Vaccinium macrocarpon</i>	U61316.2		
50			<i>Vaccinium myrtillus</i>	AF382810.1				
51	Liliopsida	Arecidae	Arecales	Arecaceae	<i>Mauritia flexuosa</i>	AM114545.1		
52					<i>Phoenix dactylifera</i>	AB040211.1		
53					<i>Hyophorbe indica</i>	DQ178697.1		
54			Pandanales	Pandanaceae	<i>Pandanus vandermeersch</i>	JQ435565.1		
55					<i>Pandanus tectorius</i>	MT046148.1		
56		Alismatidae	Triuridales	Petrosaviaceae	<i>Japonolirion sp.</i>	AB040161.1		
57		Commelinidae	Cyperales	Cyperaceae	<i>Cyperus diffusus</i>	LT900075.1		
58			Cyperales	Poaceae	<i>Triticum aestivum</i>	AF164405.1		
59					<i>Oryza sativa</i>	EU434287.1		
60					<i>Avena sativa</i>	AF164395.1		
61			Commelinales	Commelinaceae	<i>Commelina communis</i>	JX903665.1		
62			Typhales	Typhaceae	<i>Typha latifolia</i>	AB088801.1		
63			Bromeliales	Bromeliaceae	<i>Ananas comosus</i>	KU258039.1		
64					<i>Neoglaziovia variegata</i>	KU258043.1		
65					<i>Tillandsia recurvata</i>	KX754174.1		
66					Zingiberales	Strelitziaceae	<i>Ravenala madagascariensis</i>	AF434873.1
67							<i>Strelitzia reginae</i>	KP083047.1
68			Heliconiaceae	<i>Heliconia irrasa</i>			AF478908.1	
69				<i>Heliconia rostrata</i>	JQ435568.1			
70		Musaceae	<i>Musa basjoo</i>	GQ374861.1				

No	Class	Subclass	Ordo	Famili	Species	Accession Number
71	Liliopsida	Commelinidae	Zingiberales	Musaceae	<i>Musa acuminata</i>	EU016987.1
72				Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i>	HM116900.1
73					<i>Curcuma longa</i>	AB551931.1
74					<i>Alpinia intermedia</i>	AB040213.1
75					Cannaceae	<i>Canna flaccida</i>
76		Liliidae	Liliales	Liliaceae	<i>Asparagus officinalis</i>	AB646504.1
77					<i>Hemerocallis fulva</i>	JF972939.1
78					<i>Lilium pumilum</i>	AB030857.1
79				Amaryllidaceae	<i>Galanthus nivalis</i>	JQ044728.1
80					<i>Pancratium maritimum</i>	HM011039.1
81					<i>Sternbergia colchiciflora</i>	HM011036.1
82					<i>Allium cepa</i>	JQ276391.1
83					<i>Allium fistulosum</i>	JQ276390.1
84					<i>Allium thunbergii</i>	JX903547.1
85					<i>Allium microdictyon</i>	JF972927.1
86				Dioscoreaceae	<i>Dioscorea alata</i>	AB040208.1
87					<i>Dioscorea oppositifolia</i>	JF972951.1
88					<i>Dioscorea hispida</i>	AY957589.1
89				Iridaceae	<i>Iris nigricans</i>	HM574676.1
90					<i>Crocus cartwrightianus</i>	JX903624.1
91				Agavaceae	<i>Sansevieria trifasciata</i>	JQ276422.1
92					<i>Agave americana</i>	JX903544.1
93				Smilacaceae	<i>Smilax sp.</i>	JF972950.1
94				Asphodelaceae	<i>Asphodelus aestivus</i>	HM640645.1
95					Orchidales	Orchidaceae

No	Class	Subclass	Ordo	Famili	Species	Accession Number
96	Liliopsida	Liliidae	Orchidales	Orchidaceae	<i>Vanilla planifolia</i>	AJ310079.1
97					<i>Dendrobium findlayanum</i>	KF143672.1
98					<i>Anoectochilus roxburghii</i>	MK451794.1
No	Outgroup	Divisi		Species	Accession Number	
1		Pinophyta (Gymnospermae)		<i>Araucaria angustifolia</i>	EF451975.1	
2				<i>Pinus mugo</i>	AB097782.1	
3				<i>Cupressus torulosa</i>	HM023995.1	

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga April 2021 yang dilakukan di tempat tinggal mahasiswa dengan alamat Villa Tajur C1 Nomor 4, Sindangrasa, Bogor Timur, Kota Bogor.

3.4 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Alat yang digunakan pada penelitian.

No.	Alat	Spesifikasi	Kegunaan
1	Laptop	ASUS VivoBook Flip 14 TP410U, Intel® Core™ i3-7100U CPU	Perangkat yang digunakan untuk mengolah dan menganalisis data penelitian.
2	Wi-Fi	Indihome 10 Mbps	Teknologi komunikasi yang memfasilitasi akses internet dalam proses penelitian.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.3.

Tabel 3. 3 Bahan yang digunakan pada penelitian.

No.	Bahan	Kegunaan
1	Sekuen 101 sampel tumbuhan Magnoliopsida, Liliopsida, dan <i>outgroup</i> (Tabel 3.1) (<i>GenBank</i> NCBI https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	Sampel yang digunakan dalam penelitian.
2	Program Microsoft Excel	Membuat tabel data sekuen DNA sampel.
3	Program NotePad	Membuat FASTA format.
4	Program ClustalX 1.83	Menyejajarkan (<i>alignment</i>) sekuen DNA sampel.
5	Program PAUP 4.0b10	<i>Trimming</i> , analisis clustering, dan rekonstruksi pohon filogenetik.
6	Program TreeView	Memvisualisasi pohon filogenetik.
7	Program BioEdit	Menghasilkan sekuen konsensus DNA Magnoliopsida dan Liliopsida.
8	Program FastPCR	Merancang primer spesifik Magnoliopsida dan Liliopsida, serta uji coba primer.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

Pada tahap ini, judul untuk penelitian disiapkan, selanjutnya melakukan penyusunan proposal penelitian yang akan diajukan untuk seminar proposal skripsi. Setelah proposal disetujui pada saat seminar, alat yang akan digunakan

(Tabel 3.2) diperiksa kesiapannya dan harus dalam kondisi yang baik untuk kelancaran proses penelitian. Program-program yang akan digunakan dalam penelitian ini (Tabel 3.3) diunduh terlebih dahulu pada perangkat keras yang sudah disiapkan. Daftar spesies tumbuhan yang akan digunakan telah ditentukan, selanjutnya sekuen DNA berdasarkan penanda *mat-K* dikoleksi dari situs *GenBank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekuen DNA pada masing-masing spesies tersebut disusun dalam NotePad sehingga menjadi bentuk FASTA format.

3.5.2 Tahap Penelitian

3.5.2.1 Rekonstruksi Pohon Filogenetik Magnoliopsida dan Liliopsida

FASTA format sekuen DNA sampel berdasarkan penanda *mat-K* diolah menggunakan program ClustalX 1.83 untuk dilakukan penyejajaran sekuen (*alignment*) (Thompson et al., 1997). Setelah dilakukan *alignment*, data yang dihasilkan merupakan data dalam bentuk NEXUS file (.nxs) yang selanjutnya akan diolah menggunakan program PAUP 4.0b10 untuk proses *trimming*, analisis *clustering*, dan rekonstruksi pohon filogenetik.

Selanjutnya dilakukan pengolahan data sekuen DNA sampel berdasarkan penanda *mat-K* menggunakan program PAUP 4.0b10 berdasarkan metode *maximum parsimony* (Swofford, 2002). Untuk menguji validitas konstruksi pohon filogenetika, maka dilakukan analisis *bootstrap* dengan 1000 pengulangan (*replicates*) (Felsenstein, 1988), indeks konsistensi (CI) dan indeks retensi (RI) dihitung menggunakan TREE SCORE pada PAUP. Data hasil pengolahan pada PAUP dalam bentuk TRE file (.tre). Data tersebut selanjutnya digunakan dalam program TreeView untuk divisualisasikan menjadi pohon filogenetik dari Magnoliopsida dan Liliopsida beserta *outgroup*. Pohon filogenetik Magnoliopsida dan Liliopsida dianalisis berdasarkan nilai *bootstrap*, karakter konstan, karakter tidak informatif, karakter informatif, indeks konsistensi (CI) dan indeks retensi (RI) (Hidayat, Saputro, Khamid, & Bayfurqon, 2021).

3.5.2.2 Kandidat Primer Magnoliopsida dan Liliopsida

FASTA format sekuen DNA sampel berdasarkan penanda *mat-K* diolah menggunakan program ClustalX 1.83 untuk dilakukan penyejajaran sekuen (*alignment*) (Thompson et al., 1997). Setelah dilakukan *alignment*, data yang dihasilkan merupakan data dalam bentuk ALN file (.aln) yang selanjutnya akan diolah menggunakan program BioEdit. Pada program BioEdit, masing-masing sekuen DNA Magnoliopsida dan Liliopsida diedit untuk dilakukan tahap *trimming*. *Trimming* dilakukan untuk memotong *gap* pada sekuen DNA karena pada penelitian ini, *gap* dianggap sebagai *missing data* (Dharmayanti, 2011). Selanjutnya, digunakan fitur *create consensus sequence* untuk mendapatkan sekuen konsensus DNA Magnoliopsida dan Liliopsida (Bio-Resource, 2014) dan dilakukan analisis secara manual.

Untuk mendapatkan kandidat primer, konsensus DNA diolah menggunakan program FastPCR (Kalendar et al., 2014). Fitur yang digunakan adalah *PCR Primer Design*. Sekuen konsensus DNA diinput pada kolom *General Sequence(s)*, selanjutnya dilakukan proses *running*. Kandidat primer akan muncul pada kolom *Result report*, lalu masing-masing data sekuen kandidat primer Magnoliopsida dan Liliopsida dipisahkan dalam bentuk tabel pada program Excel.

3.5.2.3 *In silico* PCR

Program FastPCR juga digunakan untuk uji coba *in silico* PCR menggunakan kandidat primer dan sekuen sampel DNA berdasarkan penanda *mat-K*. Fitur yang digunakan adalah *In silico PCR* (Kalendar et al., 2014). Satu-persatu kandidat primer diuji coba terhadap sekuen sampel DNA. Sekuen sampel DNA diletakkan pada kolom *General Sequence(s)*, sedangkan sekuen kandidat primer diletakkan pada kolom *Additional sequence(s)* atau *pre-designed primers (probes) list*, selanjutnya dilakukan proses *running*. Hasil dari *in silico* PCR akan terlihat pada kolom *Result report*, yaitu munculnya segmen DNA (*Amplicon*) pada sampel atau tidak munculnya *amplicon*.

3.5.2.4 Pasangan Primer Magnoliopsida dan Liliopsida

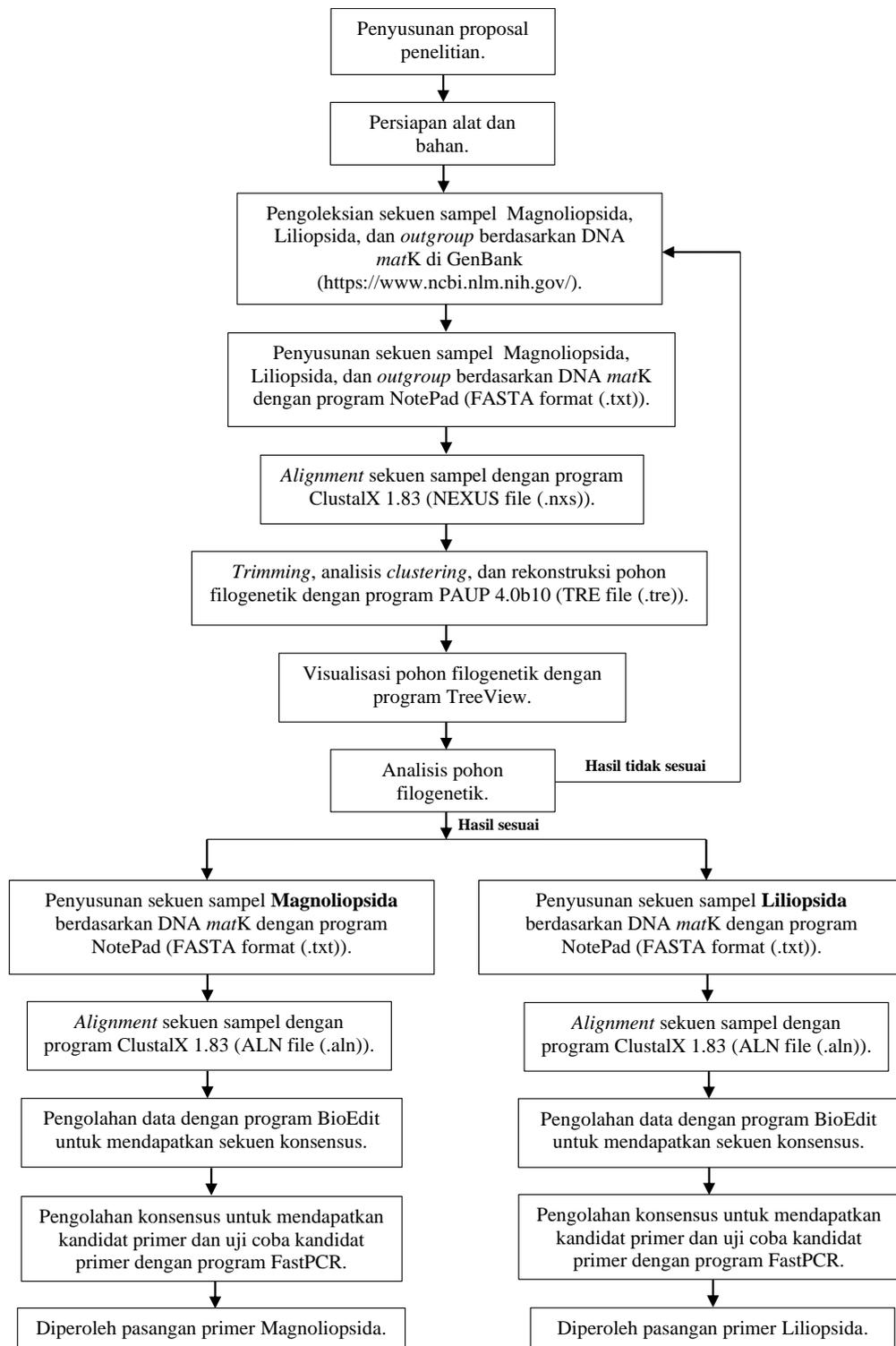
Satu-persatu kandidat primer diuji coba dan mendapatkan hasil dari *in silico* PCR. Hasil tersebut diinput pada tabel Excel kandidat primer yang telah dibuat. Kandidat primer yang berhasil mengamplifikasi sampel diberi tanda positif (+) sesuai kolom yang telah dibuat. Selanjutnya, hasil positif tersebut dihitung dan diolah dalam bentuk persentase keberhasilan amplifikasi sesuai jumlah sampel yang memunculkan *amplicon*.

Kandidat primer dengan persentase keberhasilan tertinggi ditandai dengan warna sesuai kelas Magnoliopsida (merah) dan Liliopsida (biru) pada tabel Excel. Kandidat yang telah diberi warna dilakukan uji coba berlawanan dengan kelasnya, misalnya kandidat primer Magnoliopsida diuji coba dengan sekuen sampel DNA Liliopsida, begitu pun sebaliknya. Uji coba ini dilakukan untuk mendapatkan kandidat primer spesifik untuk digunakan pada masing-masing kelas.

Kandidat primer *forward* dan *reverse* dipasangkan satu-persatu untuk dilakukan *in silico* PCR sebagai pasangan kandidat primer. Keberhasilan amplifikasi pasangan kandidat primer dicatat dalam tabel Excel dan dihitung persentasenya. Pasangan kandidat primer dengan persentase tertinggi dan spesifik menjadi hasil dari penelitian ini dan dapat digunakan dalam uji coba secara *in vitro* PCR untuk tumbuhan kelas Magnoliopsida dan Liliopsida.

3.6 Alur Penelitian

Alur penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 3. 1 Alur penelitian