

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Menurut Sugiyono (2018) penelitian deskriptif digunakan untuk memberikan gambaran yang lebih terperinci atau menganalisis suatu gejala atau fenomena. Pada penelitian ini, melakukan analisis pengembangan DNA *barcode* tumbuhan langka berdasarkan penanda mat-K dari genom kloroplas secara *in silico*.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari 2022 hingga April 2022. Penelitian ini dilakukan di rumah peneliti, di Jalan Kiara Sari III No. 4, Komp. Kiara Sari Asri, Buahbatu, Bandung.

3.3 Alat dan Bahan

Dalam melakukan penelitian ini dibutuhkan alat (**Tabel 3.1**) dan bahan (**Tabel 3.2**) sebagai berikut:

Tabel 3.1 Alat yang digunakan

No	Alat	Spesifikasi	Kegunaan
1	Laptop (Windows)	Lenovo	Perangkat bantuan untuk mengolah dan menganalisis data penelitian
2	Internet Wi-Fi	Indihome	Akses internet dalam proses penelitian

Tabel 3.2 Bahan yang digunakan

No	Bahan	Kegunaan
1	Sekuen DNA kloroplas daerah mat-K dari GenBank NCBI	Sampel yang akan digunakan pada penelitian
2	Program Microsoft Excel	Membuat tabel data sekuen DNA
3	Program NotePad	Membuat FASTA format (.txt)
4	Program ClustalX	<i>Alignment</i> sekuen DNA
5	Program BioEdit	Membuat konsensus sekuen DNA
6	Program FastPCR	Merancang primer serta uji coba PCR secara <i>in silico</i>

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Inventaris Data Tumbuhan Langka

Tumbuhan langka yang digunakan merupakan tumbuhan yang secara garis besar tumbuh dan berasal dari Indonesia yang terdapat pada *database* IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) *Red List* dengan tiga kategori status kelangkaan *Critically Endangered* (CR; Kritis), *Endangered* (EN; Genting), dan *Vulnerable* (VU; Rentan).

3.4.2 Mengambil Data Sekuen dari GenBank

Data spesies tumbuhan langka yang telah diperoleh sebelumnya, dicari sekuen DNA daerah mat-K yang diperoleh dari *database* Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). **Tabel 3.3** merupakan *database* tumbuhan langka yang ditemukan menggunakan penanda gen mat-K pada GenBank NCBI.

Tabel 3.3 *Database* GenBank Tumbuhan Langka

No	Famili	Spesies	IUCN	Tahun	Accession Number
1	Araceae	<i>Amorphophallus titanum</i>	EN	2018	KY490479.1
2	Araucariaceae	<i>Agathis borneensis</i>	EN	2012	AB023975.1
3	Araucariaceae	<i>Agathis dammara</i>	VU	2012	AB650545.1
4	Dipterocarpaceae	<i>Anisoptera laevis</i>	VU	2017	KY972901.1
5	Dipterocarpaceae	<i>Anisoptera marginata</i>	VU	2019	KY972903.1
6	Dipterocarpaceae	<i>Cotylelobium burckii</i>	EN	2019	KY972911.1
7	Dipterocarpaceae	<i>Dryobalanops aromatica</i>	VU	2017	KY972931.1
8	Dipterocarpaceae	<i>Dryobalanops beccarii</i>	EN	1998	KY972933.1
9	Dipterocarpaceae	<i>Dryobalanops rappa</i>	EN	2019	KY972935.1
10	Dipterocarpaceae	<i>Hopea centipeda</i>	EN	2019	KY972945.1
11	Dipterocarpaceae	<i>Hopea nervosa</i>	CR	1998	KY972949.1
12	Dipterocarpaceae	<i>Hopea pentanervia</i>	VU	2019	KY972953.1
13	Dipterocarpaceae	<i>Hopea vacciniifolia</i>	EN	2019	KY972955.1
14	Dipterocarpaceae	<i>Shorea acuminatissima</i>	VU	2019	KY972970.1
15	Dipterocarpaceae	<i>Shorea albida</i>	VU	2019	KY972975.1
16	Dipterocarpaceae	<i>Shorea atrinervosa</i>	VU	2017	KY973014.1
17	Dipterocarpaceae	<i>Shorea bracteolata</i>	EN	2017	KY972988.1
18	Dipterocarpaceae	<i>Shorea confusa</i>	VU	2019	KY972973.1

19	Dipterocarpaceae	<i>Shorea domatiosa</i>	EN	2019	KY973040.1
20	Dipterocarpaceae	<i>Shorea inaequilateralis</i>	EN	2019	KY973009.1
21	Dipterocarpaceae	<i>Shorea johorensis</i>	CR	1998	KY973023.1
22	Dipterocarpaceae	<i>Shorea laevis</i>	VU	2017	KY972983.1
23	Dipterocarpaceae	<i>Shorea mecistopteryx</i>	VU	2019	KY973033.1
24	Dipterocarpaceae	<i>Shorea obscura</i>	VU	2019	KY973011.1
25	Dipterocarpaceae	<i>Shorea ochracea</i>	VU	2019	KY973041.1
26	Dipterocarpaceae	<i>Shorea ovata</i>	EN	1998	KY973046.1
27	Dipterocarpaceae	<i>Shorea quadrinervis</i>	VU	2019	KY973058.1
28	Dipterocarpaceae	<i>Shorea smithiana</i>	VU	2019	KY973064.1
29	Dipterocarpaceae	<i>Vatica endertii</i>	EN	2019	KY973072.1
30	Ebenaceae	<i>Diospyros celebica</i>	VU	1998	DQ924004.1
31	Euphorbiaceae	<i>Mallotus brachythyrus</i>	VU	2020	EF582634.1
32	Lauraceae	<i>Litsea fenestrata</i>	VU	2019	AB259076.1
33	Lauraceae	<i>Phoebe excelsa</i>	VU	2020	AB259099.1
34	Nepenthaceae	<i>Nepenthes adnata</i>	EN	2013	AF315866.1
35	Nepenthaceae	<i>Nepenthes dubia</i>	CR	2000	AF315869.1
36	Nepenthaceae	<i>Nepenthes lavicola</i>	CR	2000	AF315935.1
37	Nepenthaceae	<i>Nepenthes mapuluensis</i>	EN	2014	AF315918.1
38	Nepenthaceae	<i>Nepenthes mikei</i>	VU	2000	AF315911.1
39	Nepenthaceae	<i>Nepenthes rhombicaulis</i>	VU	2000	AF315874.1
40	Nepenthaceae	<i>Nepenthes sumatrana</i>	CR	2013	AF315872.1
41	Orchidaceae	<i>Paphiopedilum glaucophyllum</i>	EN	2014	AY557205.1
42	Orchidaceae	<i>Paphiopedilum primulinum</i>	CR	2014	JN181451.1
43	Proteaceae	<i>Heliciopsis lanceolata</i>	EN	1998	EU642696.1
44	Taxaceae	<i>Taxus wallichiana</i>	EN	2010	DQ478792.1
45	Zingiberaceae	<i>Boesenbergia loerzingii</i>	CR	2019	MN803392.1
46	Zingiberaceae	<i>Burbridgea stenantha</i>	EN	2018	KY620236.1
47	Zingiberaceae	<i>Etilingera corrugata</i>	EN	2018	KY620239.1
48	Zingiberaceae	<i>Globba variabilis</i>	VU	2019	AY341098.1
49	Zingiberaceae	<i>Hedychium horsfieldii</i>	VU	2019	AF478859.1
50	Zingiberaceae	<i>Scaphochlamys polyphylla</i>	VU	2019	LC148397.1

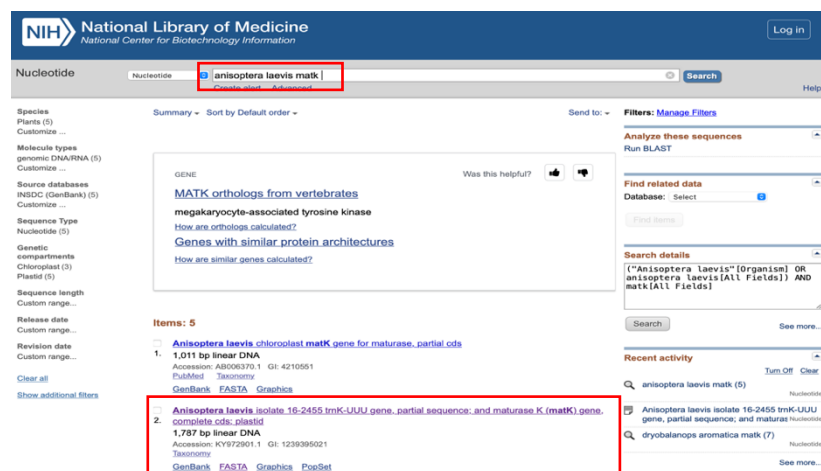
Hanina Dzikrina, 2022

**PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK MENGGUNAKAN PENANDA MAT-K SECARA IN SILICO
UNTUK MENDETEKSI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA**

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

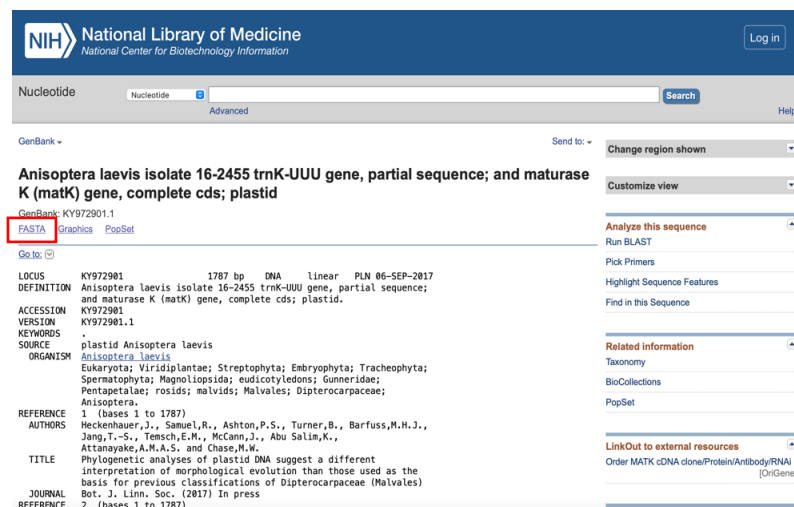
3.4.3 Penyusunan FASTA Format

Sekuen DNA daerah mat-K yang telah diperoleh dari GenBank disusun dalam FASTA (.txt) format menggunakan program *NotePad*. Format FASTA berasal dari FASTA *software package* yang saat ini menjadi standar dalam bioinformatika. Pada **Gambar 3.1** menunjukkan halaman utama pada laman GenBank NCBI, untuk mencari sekuen DNA sampel tumbuhan langka pada **Tabel 3.3** dengan cara memasukkan nama spesies beserta penanda yang digunakan yaitu mat-K kemudian klik *search*. Sekuen DNA yang dipilih yaitu sekuen DNA yang *complete cds*.



Gambar 3.1 Laman GenBank NCBI

Pada **Gambar 3.2** ditemukan informasi data mengenai spesies sampel tumbuhan langka yang dicari, kemudian klik FASTA untuk memperoleh sekuen DNA.



Gambar 3.2 Informasi Data *Anisoptera laevis* berdasarkan Penanda mat-K

Hanina Dzikrina, 2022

PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK MENGGUNAKAN PENANDA MAT-K SECARA IN SILICO UNTUK MENDETEKSI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA

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

Pada **Gambar 3.3** merupakan sekuen DNA yang dicari dan siap digunakan untuk proses selanjutnya dengan meng-copy paste sekuen DNA pada program NotePad.

Anisoptera laevis isolate 16-2455 trnK-UUU gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid

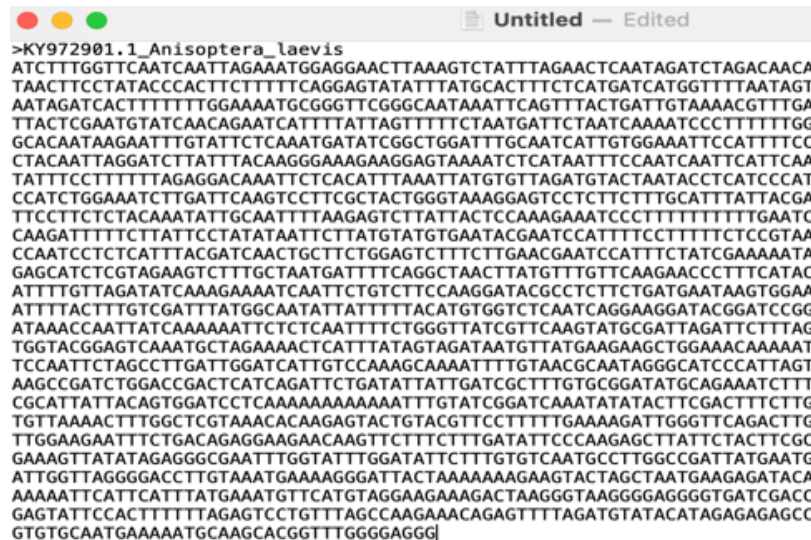
GenBank: KY972901.1

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

```
>KY972901.1 Anisoptera laevis isolate 16-2455 trnK-UUU gene, partial sequence; and
maturase K (matK) gene, complete cds; plastid
ATCTTTGGTTCAATCAATTAGAAATGGAGGAACCTTAAAGTCTATTTAGAAGTCAATAGATCTAGACAACA
TAACCTCTATACCCACTTCTTTTTAGAGGATATATTTATGCACCTTCTCATGATCATGGTTTTAATAGT
AATAGATCACTTTTTTGGAAAATGCGGGTTCGGGCAATAAATTCAGTTTACTGATTGTAAGACGTTTGA
TTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTTTATAGTTTTTCAATGATTTCAATCAAAATCCCTTTTTTGG
GCACAATAAGAATTGTATTTCAAAATGATATCGGCTGGATTTGCAATCATTGGAAAATCCATTTTTCC
CTACAATTAGGATCTTATTTACAAGGGAAGAAGGAGTAAATCTCATAATTTCCAATCAATTCATTCAA
TATTTCTTTTTAGAGGACAATCTCACATTTAAATATGTGTAGATGTAATACTCATCCAT
CCATCTGGAAATCTGATTCAGTCTTCTGCTACTGGTAAAGGAGTCTCTCTCTTTGCATTTATAGGA
TTCTCTCTACAATAATTGCAATTTTAAAGTCTTATTACTCCAAGAAATCCCTTTTTTTTTGAATC
CAAGATTTTTCTTATCTATATAAATCTTATGTATGTGAATACGAATCCATTTCTTTTTCTCGTAA
CCAACTCTCTATTACGATCAACTGCTTCTGGAGTCTTTCTTGAACGAATCCATTTCTATCGAAAATA
GAGCATCTGTAGAAGTCTTGTCAATGATTTTCAAGTAACTATGTTTGTCAAGAACCTTTCTATC
ATTTTGTAGATATCAAGAAAATCAATTCGTCTTCAAGGATACGCCTCTCTGATGAATAAGTGGAA
ATTTTCTTTGCGATTTATGGCAATATTTTACATGTGGTCTCAATCAGGAAGGATACGGATCCGG
ATAAACCAATTATCAAAAATCTCTCAATTTTCTGGGTTATCGTTCAAGTATGCGATTGAAATCTTTAG
TGGTACGGAGTCAAATGCTAGAAAATCATTATAGTAGATAATGTATGAAGAAGCTGAAAACAAAAAT
TCCAATTTAGCTTGTATGGATCATTTGCAAGCAAAATTTGTAACGCAATAGGGCATCCCATTAGT
AAGCGATCTGACCGCATCAGATTCTGATATTTGATGCTTTTGTGGGATGACAGAATCTTT
CGCATTTACAGTGGATCTCAAAAATAAATTTGATCGGATCAATATATACTTGCATCTTCTGG
TGTTAAAATTTGGCTCGTAAACCAAGAGTACTGTACGTTCTTTTGAAGATTGGGTCAGACTTG
TTGGAAGAAATTTGACAGAGGAAGAACAAGTCTTTCTTGTATTTCCCAAGACTTATCTACTTCG
GAAAGTTATATAGAGGGCGAATTTGGTATTTGGATATCTTTGTGCAATGCTTGGCCGATATGAATG
ATTGGTTAGGGGACCTTGTAAATGAAAAGGGATTAATAAAAAGAAGTACTAGCTAATGAAGAGATACA
AAAAATTCATTCATTTATGAAATGTTTCAATGTAGGAAGAAAGACTAAGGGTAAGGGGAGGGGTGATCGAC
GAGTATCCACTTTTTAGAGTCTGTTTACGCAAGAAACAGAGTTTTAGATGTATACATAGAGAGGCC
GTGTGCAATGAAAATGCAAGCAGGTTTGGGAGGG
```

Gambar 3.3 Sekuen DNA dalam Bentuk FASTA Format

Pada **Gambar 3.4** data sekuen DNA telah disimpan dengan format .txt, data diawali dengan tanda “<” dan dilanjut dengan nama spesies yang disambung dengan simbol “_”.



```
Untitled — Edited
>KY972901.1 Anisoptera laevis
ATCTTTGGTTCAATCAATTAGAAATGGAGGAACCTTAAAGTCTATTTAGAAGTCAATAGATCTAGACAACA
TAACCTCTATACCCACTTCTTTTTAGAGGATATATTTATGCACCTTCTCATGATCATGGTTTTAATAGT
AATAGATCACTTTTTTGGAAAATGCGGGTTCGGGCAATAAATTCAGTTTACTGATTGTAAGACGTTTGA
TTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTTTATAGTTTTTCAATGATTTCAATCAAAATCCCTTTTTTGG
GCACAATAAGAATTGTATTTCAAAATGATATCGGCTGGATTTGCAATCATTGGAAAATCCATTTTTCC
CTACAATTAGGATCTTATTTACAAGGGAAGAAGGAGTAAATCTCATAATTTCCAATCAATTCATTCAA
TATTTCTTTTTAGAGGACAATCTCACATTTAAATATGTGTAGATGTAATACTCATCCATCCCAT
CCATCTGGAAATCTTGATTCAGTCTTCTGCTACTGGTAAAGGAGTCTCTCTCTTTGCATTTATAGGA
TTCTCTCTACAATAATTGCAATTTTAAAGTCTTATTACTCCAAGAAATCCCTTTTTTTTTGAATC
CAAGATTTTTCTTATCTATATAAATCTTATGTATGTGAATACGAATCATTTTCTTTTTCTCGTAA
CCAATCTCTCATTACGATCAACTGCTTCTGGAGTCTTTCTTGAACGAATCCATTTCTATCGAAAATA
GAGCATCTGTAGAAGTCTTTGCTAATGATTTTCAAGTAACTTATGTTTGTTCAGAACCTTTCTATC
ATTTTGTAGATATCAAGAAAATCAATTCGTCTTCAAGGATACGCCTCTCTGATGAATAAGTGGAA
ATTTTACTTTGTGATTTATGGCAATATTTTACATGTGGTCTCAATCAGGAAGGATACGGATCCGG
ATAAACCAATTATCAAAAATCTCTCAATTTTCTGGGTTATCGTTCAAGTATGCGATTAGATCTTTAG
TGGTACGGAGTCAAATGCTAGAAAATCATTATAGTAGATAATGTTATGAAGAAGCTGAAAACAAAAAT
TCCAATTTAGCTTGTATGGATCATTTGCAAGCAAAATTTGTAACGCAATAGGGCATCCCATTAGT
AAGCGATCTGGACCGACTCATCAGATTCTGATATTTGATCGCTTTTGTGGGATATGACAGAATCTTT
CGCATTTACAGTGGATCTCAAAAATAAATTTGATCGGATCAAATATACTTGCATCTTCTTTG
TGTTAAAATTTGGCTCGTAAACCAAGAGTACTGTACGTTCTTTTGAAGATTGGGTCAGACTTG
TTGGAAGAAATTTGACAGAGGAAGAACAAGTCTTTCTTGTATTTCCCAAGACTTATCTACTTCG
GAAAGTTATATAGAGGGCGAATTTGGTATTTGGATATCTTTGTGCAATGCTTGGCCGATATGAATG
ATTGGTTAGGGGACCTTGTAAATGAAAAGGGATTAATAAAAAGAAGTACTAGCTAATGAAGAGATACA
AAAAATTCATTCATTTATGAAATGTTTCAATGTAGGAAGAAAGACTAAGGGTAAGGGGAGGGGTGATCGAC
GAGTATCCACTTTTTAGAGTCTGTTTACGCAAGAAACAGAGTTTTAGATGTATACATAGAGAGGCC
GTGTGCAATGAAAATGCAAGCAGGTTTGGGAGGG
```

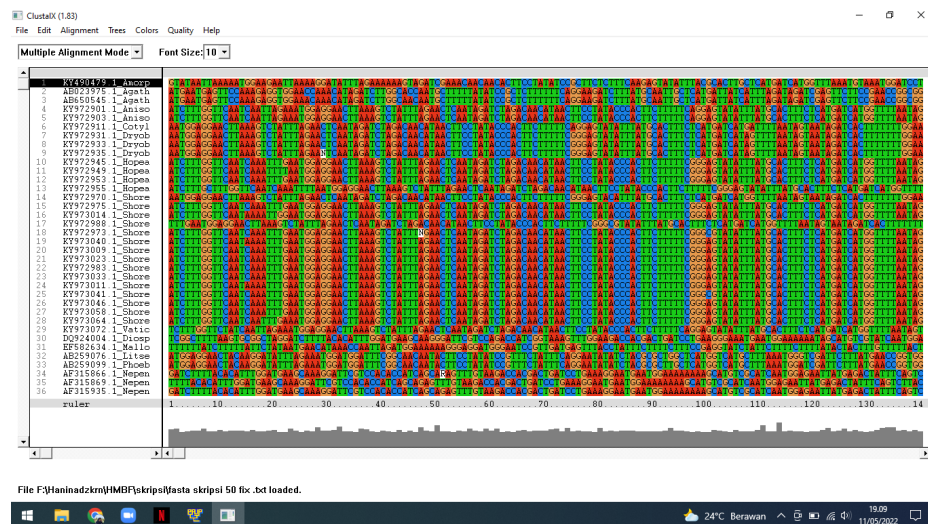
Gambar 3.4 Penyusunan FASTA Format pada Program NotePad

3.4.4 Sequence Alignment

Sequence alignment adalah penyusunan atau penyejajaran sekuen yang dilakukan untuk menentukan tingkat homologi dari urutan basa DNA yang dianalisis (Retnaningati, 2017). *Sequence alignment* digunakan untuk

mendeteksi tingkat kesamaan di antara sekuen-sekuen yang disejajarkan. Pensejajaran sekuen DNA gen mat-K menggunakan perangkat lunak ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Pensejajaran sekuen di ClustalX akan menghasilkan tiga data, yaitu data dengan format ALN file (.aln), NEXUS file (.nxs), dan format (.dnd). Data dengan format (.aln) yang selanjutnya akan diolah menggunakan program BioEdit.

Hasil *alignment* didapatkan pada aplikasi ClustalX, menu *file* dan *load sequence* dipilih. *File* berisi sekuen DNA dipilih dalam bentuk FASTA format. Jika file sekuen DNA telah dimasukkan ke dalam program ClustalX maka akan terlihat seperti pada **Gambar 3.5**. Menu *alignment* dan *do complete alignment* dipilih, maka data dengan format ALN akan tersimpan pada folder yang sama.



Gambar 3.5 Program ClustalX

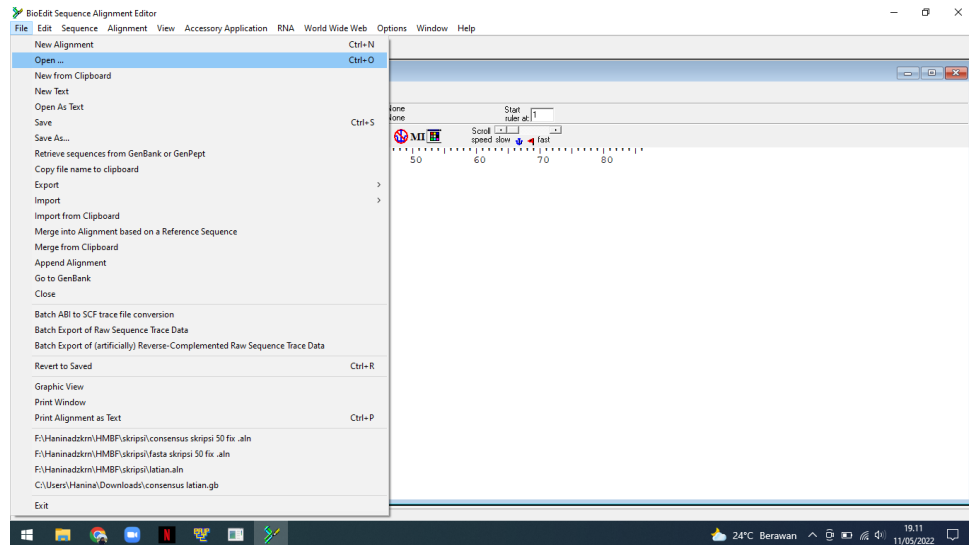
3.4.5 Konsensus Sekuen DNA

Untuk mendapatkan konsensus sekuen DNA menggunakan bantuan perangkat lunak BioEdit. Saat menggunakan BioEdit, fitur *create consensus sequence* digunakan untuk mendapatkan konsensus sekuen DNA dan dilakukan analisis secara manual. Hasil sekuen konsensus DNA diperoleh pada aplikasi BioEdit seperti pada **Gambar 3.6**, kemudian menu *file* dipilih dan diklik *open*. File hasil *alignment* dipilih dalam bentuk format ALN file, lalu menu *alignment* dan *create consensus sequence* dipilih. *Consensus* diblok, kemudian *sequence* FASTA format dicopy dan dipaste pada program NotePad. Pada **Gambar 3.7** merupakan hasil konsensus sekuen DNA yang diperoleh dari tumbuhan langka.

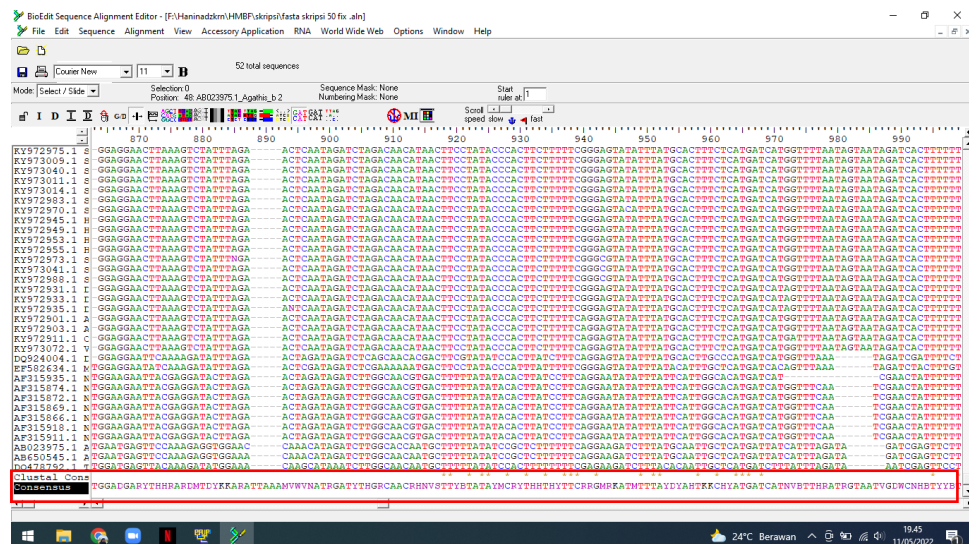
Hanina Dzikrina, 2022

PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK MENGGUNAKAN PENANDA MAT-K SECARA IN SILICO UNTUK MENDETEKSI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA

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



Gambar 3.6 Program BioEdit



Gambar 3.7 Konsensus Sekuen DNA

3.4.6 Desain Primer

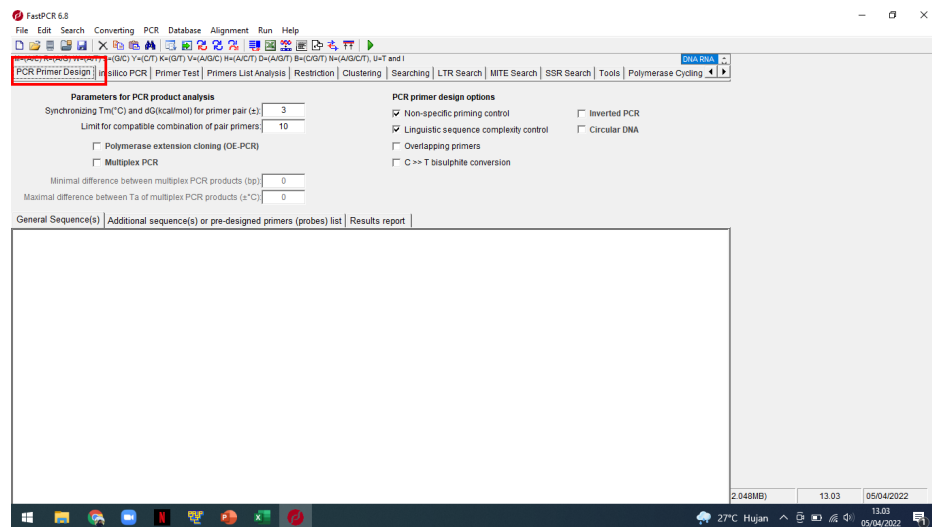
Desain primer dilakukan untuk mendapatkan kandidat primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi DNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) secara *in silico* (Hidayat *et al.*, 2020). Hasil yang didapatkan yaitu kandidat pasangan primer *forward* dan primer *reverse* yang akan di uji coba amplifikasinya pada setiap sekuen DNA daerah mat-K di semua sampel yang digunakan.

Hanina Dzikrina, 2022

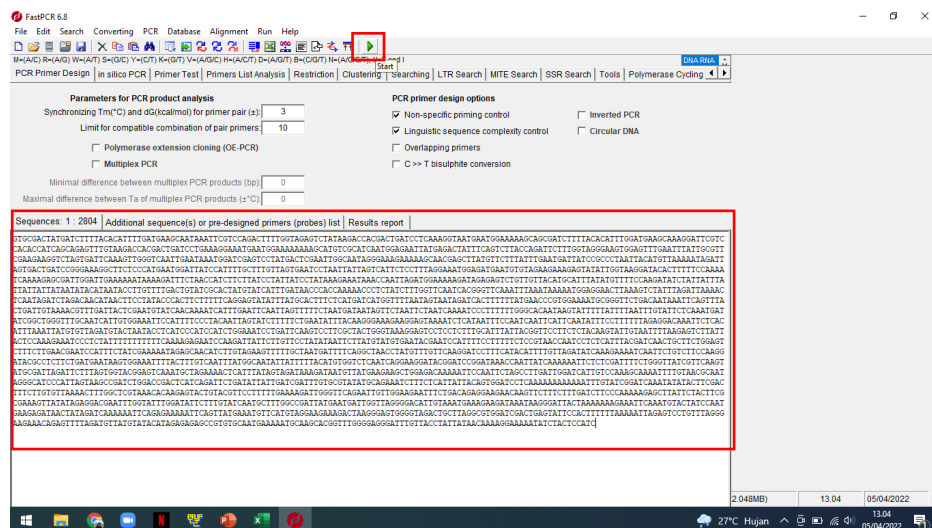
PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK MENGGUNAKAN PENANDA MAT-K SECARA IN SILICO UNTUK MENDETEKSI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA

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

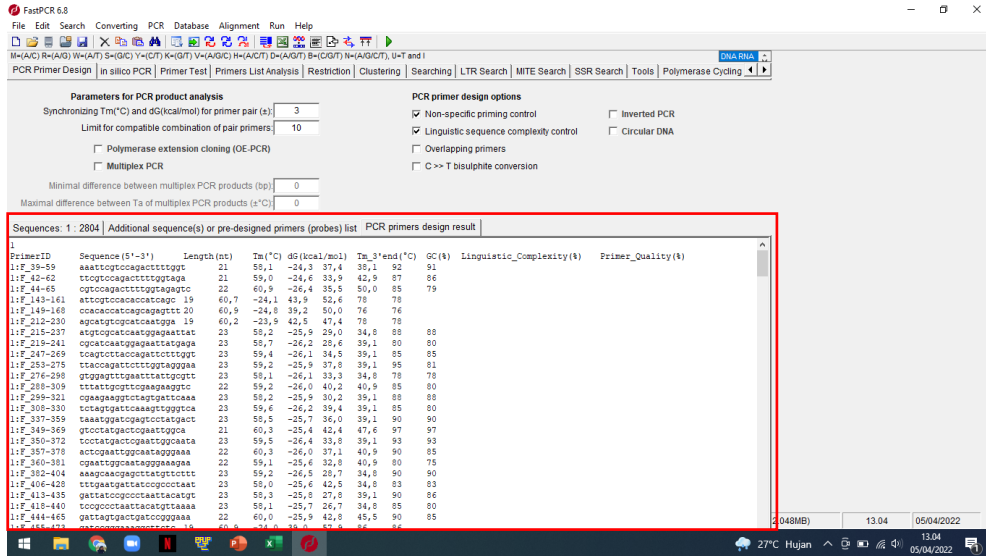
Konsensus sekuen DNA yang dihasilkan kemudian diproses pada program FastPCR (Kalendar *et al.*, 2017) untuk mendapatkan kandidat primer. Pada **Gambar 3.8 PCR Primer Design** merupakan fitur utama yang digunakan, selanjutnya konsensus sekuen DNA dimasukkan pada kolom *General Sequences* dan dilakukan proses *Running* seperti pada **Gambar 3.9**. Hasil kandidat primer akan terlihat pada kolom *Result Report* pada **Gambar 3.10** dan data sekuen kandidat primer dipindahkan ke Microsoft Excel.



Gambar 3.8 Program FastPCR



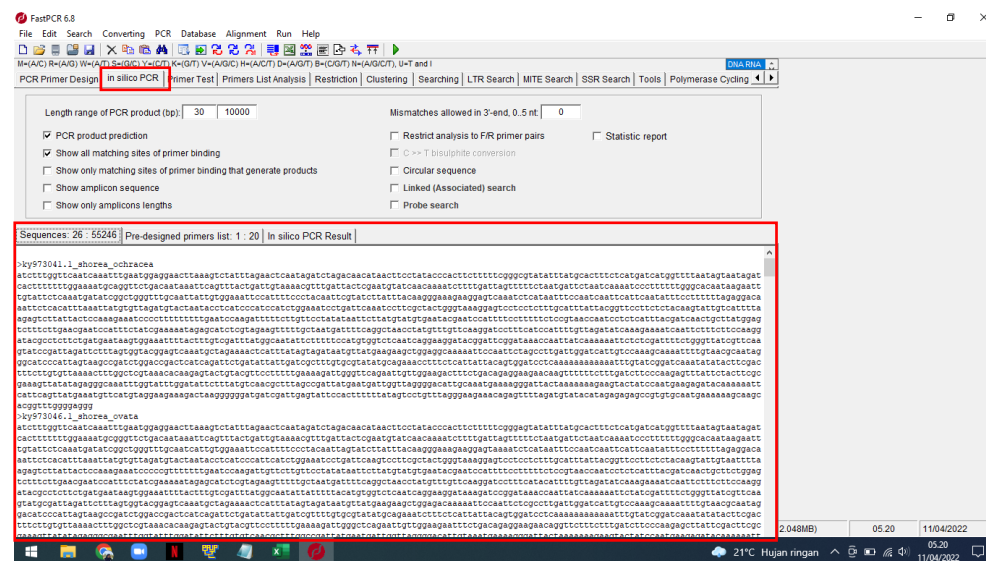
Gambar 3.9 Pemasukan Konsensus Sekuen DNA dan Proses *Running* pada Program FastPCR



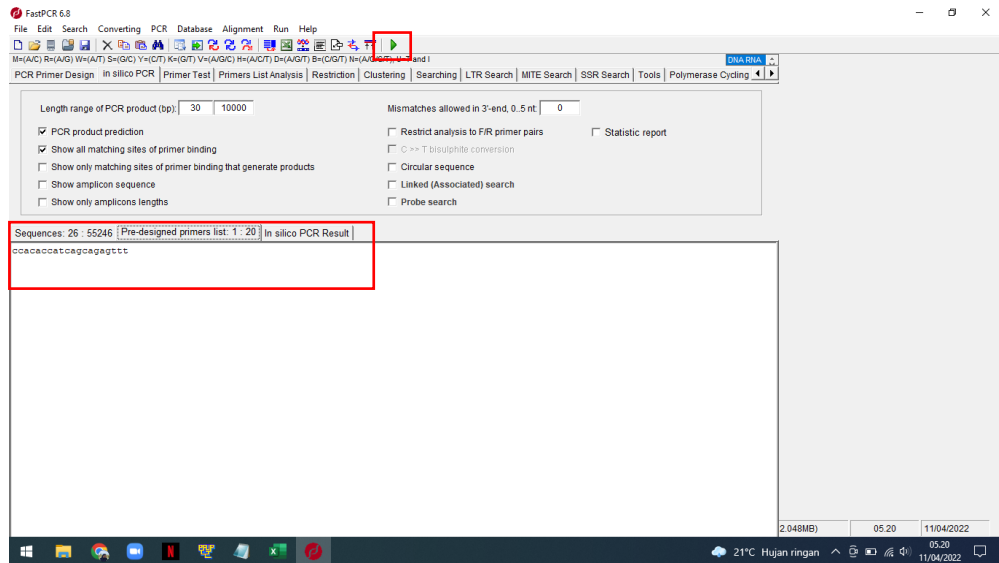
Gambar 3.10 Kandidat Primer yang Diperoleh

3.4.7 *In Silico* PCR

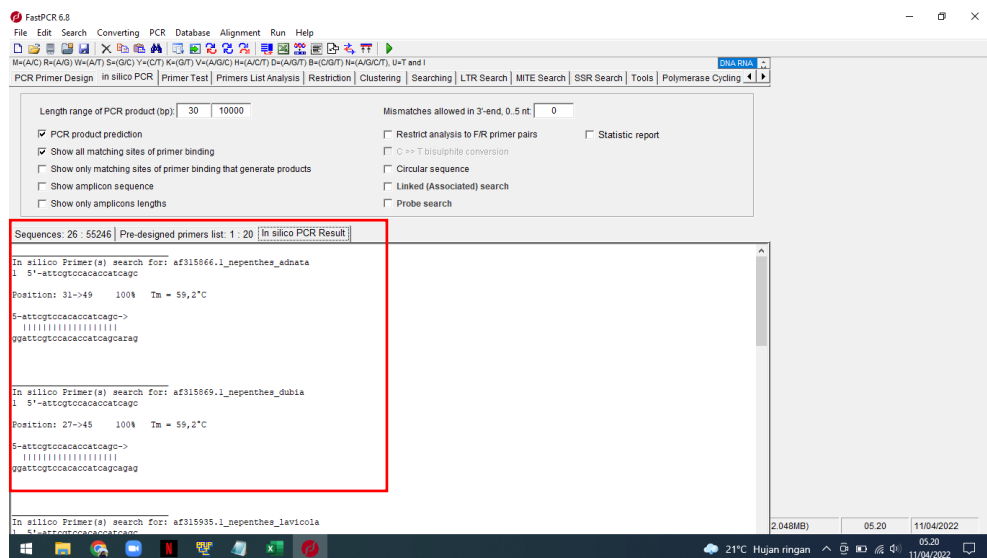
Uji coba PCR secara *in silico* menggunakan program FastPCR (Kalender *et al.*, 2017) dengan menggunakan primer dan sekuen sampel DNA berdasarkan penanda mat-K. *In Silico* PCR merupakan fitur utama yang digunakan, selanjutnya sekuen DNA dimasukkan pada kolom *General Sequences* seperti pada Gambar 3.11. Kandidat primer di uji satu persatu terhadap sekuen DNA dan dimasukkan pada kolom *Additional sequences* serta selanjutnya dilakukan proses *Running* seperti pada Gambar 3.12. Hasil dari *in silico* PCR akan terlihat pada Gambar 3.13 pada kolom *Result report*.



Gambar 3.11 Pemasukan Sekuen DNA



Gambar 3.12 Pemasukan Salah Satu Kandidat Primer



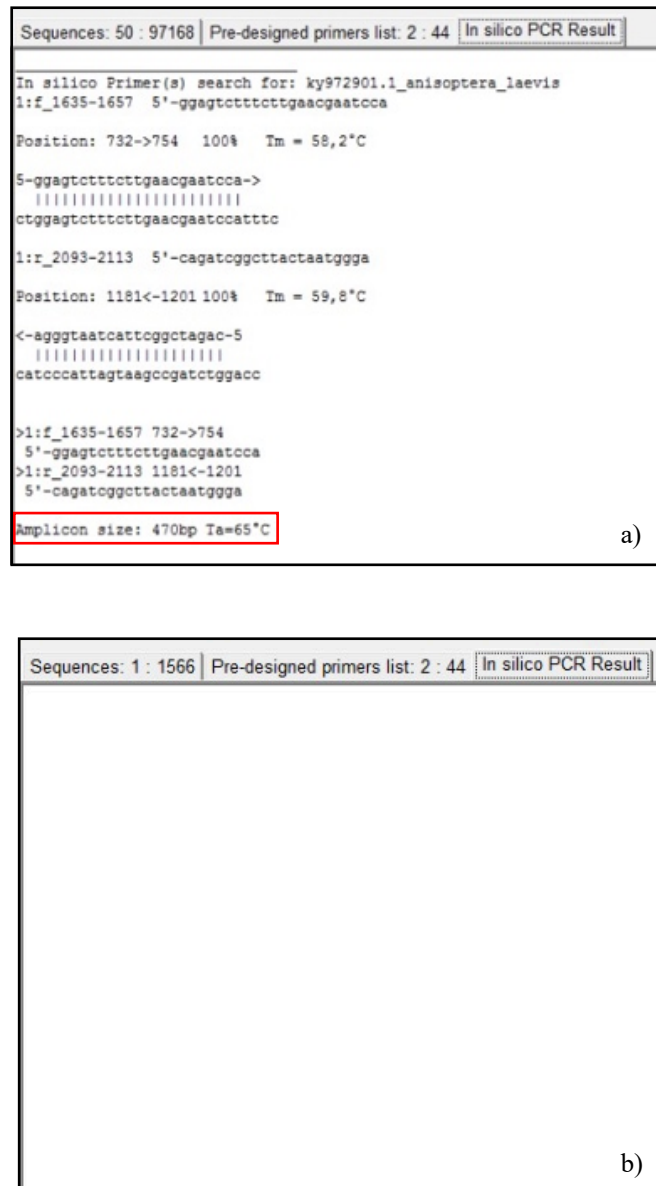
Gambar 3.13 Hasil *Running In Silico* PCR

3.4.8 Uji Efektivitas

Uji efektivitas merupakan hubungan antara hasil yang didapat dan seberapa jauh tingkat keberhasilan *output*. Dapat dikatakan bahwa uji efektivitas ini merupakan uji kelayakan pada penelitian pengembangan, tujuannya untuk melihat sejauh mana keefektifan hasil yang telah dikembangkan atau diperoleh.

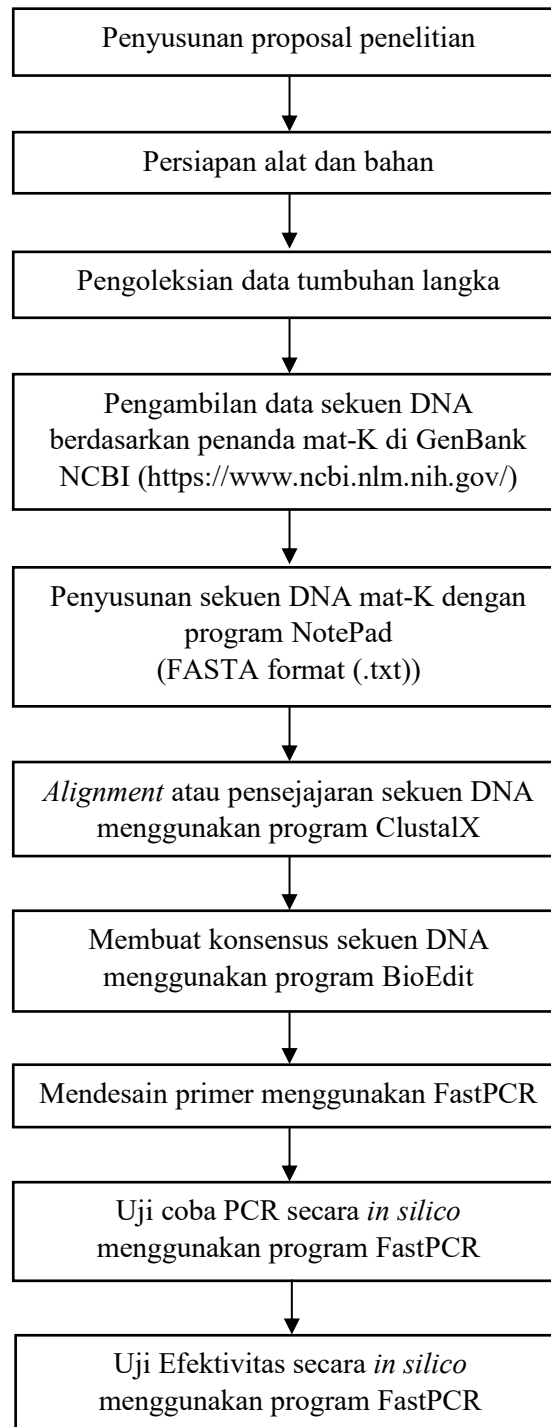
Primer yang sudah didapatkan diuji kembali dengan menggunakan program FastPCR dengan menggunakan sekuen DNA selain pada **Tabel 3.3**.

Sekuen DNA diletakkan pada kolom *General sequences*, selanjutnya primer diletakkan pada kolom *Additional sequences*, dan dilanjutkan proses *Running*. Hasil akan terlihat pada kolom *Result report* seperti pada **Gambar 3.14**, yaitu muncul atau tidaknya segmen DNA atau *amplicon*.



Gambar 3.14 Uji Efektivitas; a) Hasil Positif *In Silico* PCR dan b) Hasil Negatif *In Silico* PCR

3.5 Alur penelitian



Gambar 3.15 Alur Penelitian