

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini berjenis deskriptif kuantitatif. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang bertujuan untuk menjelaskan fenomena-fenomena yang terjadi di lapangan berdasarkan data yang diperoleh secara menyeluruh. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang berusaha mendeskripsikan suatu gejala, peristiwa, dan kejadian yang terjadi (Sudjana dan Ibrahim, 1989). Kuantitatif yang dimaksud adalah data yang berupa angka atau data yang dapat dihitung (kuantifikasi). Selaras dengan pendapat dari para ahli metode, data kuantitatif adalah data yang dapat diukur dengan skala numerik atau angka (Kuncoro, 2009).

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2023 hingga bulan Mei 2023. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Sistematika Molekuler Tumbuhan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, beralamat di Jalan Raya Jakarta-Bogor KM 46, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian terbagi menjadi beberapa tahap yaitu ekstraksi DNA (Tabel 3.1), kuantifikasi DNA (Tabel 3.2), elektroforesis DNA genom (Tabel 3.3), amplifikasi DNA (Tabel 3.4), elektroforesis produk PCR, dan analisis data (Tabel 3.5) sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian tertera pada Tabel 3.6. Berikut adalah rincian alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

Tabel 3.1. Alat yang digunakan pada ekstraksi DNA

No.	Alat	Jumlah
1	Mikropipet Gilson (P20, P200, P1000)	3 unit
2	<i>Centrifuge</i> Kubota 6800	1 unit
3	<i>Waterbath</i> Taitec Personal-11	1 unit
4	<i>Vortex</i> Genie 2	1 unit
5	<i>Grinder</i>	1 unit
6	Timbangan analitik AND HW-200	1 unit
7	Pinset	1 unit

Tabel 3.2. Alat yang digunakan pada kuantifikasi DNA

No.	Alat	Jumlah
1	Implen <i>NanoPhotometer</i> P300	1 unit

2	Mikropipet Gilson P20	1 unit
---	-----------------------	--------

Tabel 3.3. Alat yang digunakan pada elektroforesis

No.	Alat	Jumlah
1	Tangki elektroforesis Mupid EXU	1 unit
2	Cetakan agarosa	1 unit
3	Gelas ukur IWAKI 250 ml dan 1000ml	1 unit
4	Sisir agarosa 13 sumuran	1 unit
5	Tabung erlenmeyer IWAKI 250 ml	1 unit
6	Microwave Bompani	1 unit
7	Timbangan analitik AND HW-200	1 unit
8	UV illuminator Bioinstrument ATTO Printgraph	1 unit

Tabel 3.4. Alat yang digunakan pada amplifikasi DNA

No.	Alat	Jumlah
1	Mikropipet P10, P20	1 unit
2	Thermo Cycler Wealtec SEDI G	1 unit
3	Microcentrifuge Oregon Mini	1 unit

Tabel 3.5. Alat yang digunakan pada analisis data

No.	Alat	Jumlah
1	Laptop	1 unit

Tabel 3.6. Bahan yang digunakan pada penelitian

No.	Bahan	Jumlah
1	Sampel <i>Piper aduncum</i>	14 sampel
2	Sampel <i>Piper umbellatum</i>	6 sampel
3	Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant)	1 unit
4	Tip pipet 1000	1 rak
5	Tip pipet 200	1 rak
6	Tip pipet 10	1 rak
7	Tabung mikrosentrifugasi Axygen 1.5 ml	1 pack
8	Tabung mikrosentrifugasi Axygen 2 ml	1 pack
9	Aluminium foil	1 gulungan
10	Plastic wrap	1 gulungan
11	Tabung PCR	1 rak
12	PromegaGoTaq Flexi DNA Polymerase kit (M8295)	1 unit
13	Mytaq TM HS MixBio-25045	1 unit
14	Agarosa Vivantis	1 toples
15	TBE	1 botol
16	DNA ladder 1kb dan 100bp	1 unit
17	Loading dye	1 ml
18	GelRed nuclease acid	1 unit
19	Etanol 70%	1 botol

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sampel yang Digunakan

Sebanyak 14 sampel dari spesies *P. aduncum* dan enam sampel dari spesies *P. umbellatum* yang berasal dari wilayah yang berbeda (Tabel 3.7) digunakan dalam

Fakhri Faturrohman, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN SPESIES ASING, *Piper aduncum* L. dan *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE), BERDASARKAN ANALISIS Sequenced-Related Amplified Polymorphism

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

penelitian ini. Pengambilan sampel dilakukan oleh kolektor yang berbeda ditandai dengan inisial nama pada nomor koleksi. Sampel RA dikoleksi oleh R. Asmarayani, sampel IG dikoleksi oleh I. Gulshiman dkk., sampel WI dikoleksi oleh W. H. Ardi, ketiga kolektor tersebut adalah peneliti BRIN. Sampel MC dikoleksi oleh M. Callmander dkk., adalah ahli botani dari negara Swiss dan satu sampel XXIV.A.VII.29 merupakan koleksi hidup dari Kebun Raya Bogor. Sampel yang digunakan adalah bagian daun dari tumbuhan yang telah diawetkan dalam silika dan memiliki spesimen herbarium yang tersimpan di Herbarium Bogoriense - BRIN. Daftar sampel dengan kolektor dan nomor koleksi yang digunakan ada pada Tabel 3.7 di bawah ini.

Tabel 3.7. Sampel akses *P. aduncum* dan *P. umbellatum*

No.	Kolektor dan No. Koleksi	Lokasi	Spesies
1	DG 3215	Pulau Banggai, Sulawesi Tengah	<i>Piper aduncum</i> L.
2	RA 898	Taman Nasional Bogani Nani wartabone, Gorontalo	<i>Piper aduncum</i> L.
3	RA 560	Taman Nasional Lore Lindu, Sulawesi Tengah	<i>Piper aduncum</i> L.
4	RA 355	Taman Nasional Gede Pangrango, Jawa Barat	<i>Piper aduncum</i> L.
5	RA 621	Hutan Lindung Keledang Saiong, Perak Malaysia	<i>Piper aduncum</i> L.
6	IG 261	Halmahera, Maluku Utara	<i>Piper aduncum</i> L.
7	RA 374	Jayapura, Papua	<i>Piper aduncum</i> L.
8	RA 759	PT. Freeport Indonesia, Papua	<i>Piper aduncum</i> L.
9	RA 166	Raja Ampat, Papua Barat	<i>Piper aduncum</i> L.
10	RA 999	Sorong, Papua Barat	<i>Piper aduncum</i> L.
11	XXIV.A.VII.29	Kebun Raya Bogor, Jawa Barat. Asal : Sumatera Utara	<i>Piper aduncum</i> L.
12	RA 961	Pulau Sebesi, Lampung	<i>Piper aduncum</i> L.
13	RA 683	Simanau, Sumatera Barat	<i>Piper aduncum</i> L.
14	WI 795	Pulau Misool, Papua	<i>Piper aduncum</i> L.
15	RA 805	Hutan Lindung Tenompok, Sabah Malaysia	<i>Piper umbellatum</i> L.
16	RA 504	Taman Nasional Bantimurung-Bulusraung, Sulawesi Selatan	<i>Piper umbellatum</i> L.
17	RA 447	Taman Nasional Bogani Nani Wartabone, Sulawesi Utara	<i>Piper umbellatum</i> L.
18	MC 1129	Halmahera, Maluku Utara	<i>Piper umbellatum</i> L.
19	RA 957	Pulau Sebesi, Lampung	<i>Piper umbellatum</i> L.
20	RA 681	Simanau, Sumatera barat	<i>Piper umbellatum</i> L.

3.4.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA berdasarkan metode dari kit *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant)*, dengan beberapa penyesuaian oleh laboratorium Sistemika Molekuler Tumbuhan. Tahapan isolasi DNA terdiri dari empat bagian yaitu penghancuran

Fakhri Faturrohman, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN SPESIES ASING, *Piper aduncum* L. dan *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE), BERDASARKAN ANALISIS Sequenced-Related Amplified Polymorphism

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

jaringan, lisis, pengikatan DNA, dan elusi DNA. Sampel yang telah ditimbang sebanyak 0.02 g untuk digerus menggunakan *beads* yang dimasukkan ke dalam tabung 2 ml sehingga sampel terhimpit di antara *beads* dan tergerus ketika di gerakan ke atas dan ke bawah secara cepat menggunakan mesin. Serbuk yang sudah terbentuk ditambahkan 400 μ l larutan GPX1 dan 5 μ l RNase lalu dihomogenkan menggunakan *vortex*. Sampel kemudian diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 60°C selama 10 menit dengan kondisi *shaker* menyala.

Setelah proses inkubasi selesai, setiap sampel ditambahkan 200 μ l larutan GP2 lalu dihomogenkan menggunakan *vortex* dan dimasukan ke dalam wadah es selama 3 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. *Supernatant* hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam tabung koleksi 2 ml yang sudah dipasangkan dengan filter, lalu sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 1 menit. Kemudian filter dibuang dan *supernatant* dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml dengan dihitung volumenya.

Sampel ditambahkan larutan GP3 sebanyak 1.5 dari volume *supernatant*, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex*. Tabung koleksi 2 ml yang dipasangkan dengan filter GD disiapkan. Campuran sebanyak 700 μ l dipindahkan ke dalam filter GD lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 selama 2 menit. Cairan yang melewati filter dibuang lalu dimasukkan campuran yang masih tersisa lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Cairan yang melewati filter dibuang, masukkan 400 μ l buffer W1 lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang melewati filter dibuang, ditambahkan 600 μ l *Wash Buffer* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang melewati filter dibuang, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit.

Filter GD dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml ditambahkan 80 μ l elution buffer, diamkan selama 3-5 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Hasil ekstraksi DNA akan berada dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml, filter GD dibuang dan ekstrak DNA dapat digunakan untuk analisis

3.4.3 Elektroforesis DNA Genom

Gel agarosa 1% dibuat dari 0.4 g bubuk agarose yang dilarutkan dalam 40 ml TBE 0.5x. Agarosa dipanaskan menggunakan *microwave*, setelah homogen larutan gel agarosa didiamkan hingga hangat lalu ditambahkan *Gel red nuclease acid* sebanyak 1 µl. Larutan gel agarosa dituangkan pada cetakan yang sudah diberi dasar dan sisiran 13 sumur, gel agarosa didiamkan hingga padat lalu sisiran diangkat, agarose telah bisa digunakan. Sampel DNA hasil ekstraksi sebanyak 2 µl ditambahkan *loading dye* sebanyak 1 µl sebagai pewarna dimasukkan kedalam lubang sumuran, pada lubang sumuran pertama dimasukkan DNA ladder 10kb sebanyak 2 µl. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan tegangan 100 volt. Saat proses elektroforesis selesai gel dimasukan ke dalam kotak UV untuk dianalisis melalui *UV Transilluminator*, sehingga pita dapat dilihat dalam bentuk foto.

3.4.4 Kuantifikasi DNA

Kuantifikasi DNA dilakukan dengan mesin Implen *NanoPhotometer P300*. Mesin Implen *NanoPhotometer P300* disiapkan dengan dimasukkan batang pemindai *NanoPhotometer® P-Class Submicroliter Cell* ke dalam mesin dan disiapkan tutup No. 10 lalu mesin dinyalakan. Batang pemindai dibersihkan dan sampel disiapkan. Sampel dihomogenkan dengan vortex pada mesin, lalu sampel diambil 1 µl dan ditempatkan pada batang pemindai, lalu ditutup dengan penutup No. 10. Pemindai mesin dijalankan, data didapatkan berupa angka konsentrasi dan kemurnian, data dicetak melalui mesin. Batang pemindai dan penutup di bersihkan, sampel berikutnya disiapkan untuk dianalisis.

3.4.5 Amplifikasi DNA

Untuk mengamplifikasi DNA, dipilih jenis PCR *kit* yang menghasilkan hasil pita polimorfik terbanyak pada hasil elektroforesis. PCR *kit* yang diuji adalah Promega *GoTaq Flexi DNA Polymerase kit*(M8295) dengan dua resep dan Boline *Mytaq™HS MixBio-25045*. Ketiga resep kit PCR tersebut diuji pada sampel RA 560 dan MC 1129 ditambahkan juga sampel dari spesies *P. betle* sebagai pembanding karena spesies ini menghasilkan pita polimorfik yang banyak pada beberapa pasangan primer berdasarkan penelitian sebelumnya (Eskalagam, 2019). Perbedaan ketiga komposisi kit PCR adalah pada bahan penyusunnya. Pada

Fakhri Faturrohman, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN SPESIES ASING, *Piper aduncum L.* dan *Piper umbellatum L.* (PIPERACEAE), BERDASARKAN ANALISIS Sequenced-Related Amplified Polymorphism

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

komposisi pertama (Tabel 3.8) menggunakan $MgCl_2$ sebanyak 1 μl sedangkan pada komposisi kedua (Tabel 3.9) menggunakan $MgCl_2$ sebanyak 1.25 μl . $MgCl_2$ yang berperan sebagai kofaktor yang meningkatkan aktivitas enzimatis DNA Polymerase. Pada saat amplifikasi PCR dilakukan, ion Mg^{2+} berikatan dengan dNTP pada gugus alfa fosfatnya dan memfasilitasi penghilangan beta dan gamma fosfat. dNMP yang dihasilkan membentuk ikatan fosfodiester, melalui gugus fosfatnya, dengan 3' OH (hidroksil) dari nukleotida yang berdekatan. Perubahan volume $MgCl_2$ bertujuan untuk meningkatkan ikatan DNA polymerase pada DNA template. Pada komposisi kit PCR ketiga (Tabel 3.10) tidak terdapat perubahan apapun, dikarenakan bahan penyusun sudah terdapat dalam taq DNA yang digunakan. Berikut detail dari komposisi ketiga kit PCR yang diuji.

Tabel 3.8. Komposisi PCR PromegaGoTaq Flexi DNA Polymerase M8295

No.	Bahan	Jumlah
1	Buffer 5x	2.5 μl
2	$MgCl_2$ 25 mM	1 μl
3	dNTPs 10 mM	0.25 μl
4	Taq unit 5 unit/ μl	0.7 μl
5	Primer forward 10 μl	0.25 μl
6	Primer reverse 10 μl	0.25 μl
7	DNA template	1 μl
8	ddH ₂ O (Nuclease Free Water)	7.18 μl
Total volume		12.5 μl

Tabel 3.9. Komposisi PCR Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase M829 Modifikasi

No.	Bahan	Jumlah
1	Bufers 5x	2.5 μl
2	$MgCl_2$ 25 mM	1.25 μl
3	dNTPs 10 mM	0.25 μl
4	Taq Unit 5 unit/ μl	0.7 μl
5	Primer Forward 10 μl	0.25 μl
6	Primer Reverse 10 μl	0.25 μl
7	DNA Template	1 μl
8	ddH ₂ O (Nuclease Free Water)	6.93 μl
Total Volume		12.5 μl

Tabel 3.10. Komposisi PCR Bioline MytaqTMHS Mix Bio-25045

No.	Bahan	Jumlah
1	Bioline Mytaq TM HS Mix Bio-25045	6.25 μl
2	Primer Forward	0.25 μl
3	Primer Reverse	0.25 μl
4	ddH ₂ O (Nuclease Free Water)	4.75 μl
5	DNA Template	1 μl
Total Volume		12.5 μl

Primer yang diuji dalam penelitian ini adalah primer SRAP yang terdiri dari lima primer *forward* (Me1-Me5) dan lima primer *reverse* (Em1-Em5) (Tabel 3.11.), kedua jenis primer tersebut dikombinasikan menjadi 25 kombinasi (Tabel 3.12.). Berdasarkan hasil elektroforesis yang didapat dilakukan skoring pada pita yang dihasilkan sehingga sebanyak 10 pasang kombinasi primer yang menghasilkan pita polimorfik terbanyak dipilih sebagai kombinasi primer yang akan digunakan dalam penelitian.

Tabel 3.11. Primer yang diuji

No.	Nama Primer	Sekuens
1	PRM Forward Me 1	TGAGTCCAAACCGGATA
2	PRM Forward Me 2	TGAGTCCAAACCGGAGC
3	PRM Forward Me 3	TGAGTCCAAACCGGAAT
4	PRM Forward Me 4	TGAGTCCAAACCGGACC
5	PRM Forward Me 5	TGAGTCCAAACCGGAAG
6	PRM Forward Em 1	GAGTGCGTACGAATTAAT
7	PRM Forward Em 2	GAGTGCGTACGAATTTGC
8	PRM Forward Em 3	GAGTGCGTACGAATTGAC
9	PRM Forward Em 4	GAGTGCGTACGAATTTGA
10	PRM Forward Em 5	GAGTGCGTACGAATTGCA

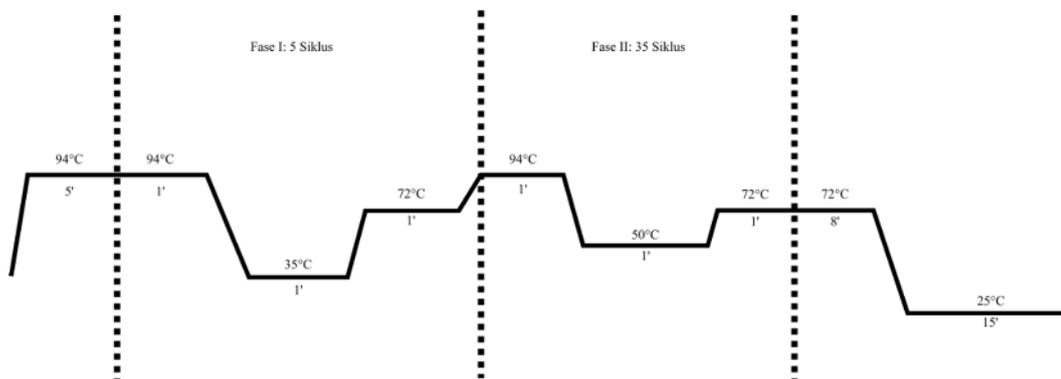
Tabel 3.12. Kombinasi primer yang diseleksi

No.	Kombinasi Primer	No.	Kombinasi Primer	No.	Kombinasi Primer
1	Me1-Em1	11	Me3-Em1	21	Me5-Em1
2	Me1-Em2	12	Me3-Em2	22	Me5-Em2
3	Me1-Em3	13	Me3-Em3	23	Me5-Em3
4	Me1-Em4	14	Me3-Em4	24	Me5-Em4
5	Me1-Em5	15	Me3-Em5	25	Me5-Em5
6	Me2-Em1	16	Me4-Em1		
7	Me2-Em2	17	Me4-Em2		
8	Me2-Em3	18	Me4-Em3		
9	Me2-Em4	19	Me4-Em4		
10	Me2-Em5	20	Me4-Em5		

Proses PCR diawali dengan dipersiapkannya tabung PCR sesuai sampel yang akan digunakan, kemudian sampel DNA dimasukkan ke dalam tabung PCR sebanyak 1 μ l. PCR *MasterMix* Bioline *MytaqTMHS Mix* Bio-25045, dibuat denganddH₂O *free nuclease water* sebanyak 4.75 μ l dimasukkan kedalam tabung PCR, ditambahkan Bioline *MytaqTMHS Mix* Bio-25045 sebanyak 6.25 μ l, ditambahkan primer *forward* dan primer *reverse* masing-masing sebanyak 0.25 μ l. Larutan dihomogenkan dan disatukan di bagian bawah tabung menggunakan *mini microcentrifuge* selama satu detik. *MasterMix* yang homogen dimasukan ke dalam tabung PCR, campuran DNA *template* dan *MasterMix* kembali dihomogenkan dan

disatukan di bagian bawah tabung menggunakan *mini microcentrifuge* selama satu detik. Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR *Wealtec* SEDI G, metode PCR SRAP yang sudah terinput pada mesin dipilih.

PCR akan direaksikan dengan beberapa tahap (Gambar 3.1). Tahap pertama adalah fase pre-denaturasi pada suhu 94 °C selama lima menit. Tahap kedua adalah fase denaturasi pada suhu 94 °C selama satu menit. Tahap ketiga adalah fase penempelan dengan metode touchdown pada suhu 35 °C selama satu menit dan tahap keempat adalah fase ekstensi pada suhu 72 °C selama satu menit. Tahap kedua sampai keempat akan dilakukan sebanyak tujuh belas kali siklus. Tahap kelima adalah fase denaturasi pada suhu 94 °C selama satu menit. Tahap keenam adalah fase penempelan pada suhu 50 °C selama satu menit. Tahap ketujuh adalah fase ekstensi pada suhu 72 °C selama satu menit. Tahap kelima sampai ketujuh akan dilakukan sebanyak 35 kali siklus. Tahap kedelapan adalah fase ekstensi final pada suhu 72 °C selama delapan menit. Tahap terakhir yaitu *holding temperature* pada suhu 25 °C selama lima belas menit.



Gambar 3.1. Grafik program PCR - SRAP

Elektroforesis Produk PCR

Gel agarose 1% dibuat dengan cara melarutkan bubuk agarose sebanyak 0.8 g ke dalam TBE 0.5x sebanyak 80 ml. Agarose dipanaskan menggunakan *microwave* selama 2 menit, setelah homogen larutan gel agarosa didiamkan hingga hangat lalu ditambahkan *Gel red nuclease acid* sebanyak 1 µl. Larutan gel agarosa dituangkan pada cetakan yang sudah diberi dasar dan sisiran 13 sumur. Masing-masing sampel yang sudah di-PCR dimasukkan kedalam sumuran sebanyak 2 µl, dan pada lubang pertama gel ditambahkan DNA *ladder* 100 bp sebanyak 2 µl. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100v selama 90 menit. Setelah proses

Fakhri Faturrohman, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN SPESIES ASING, *Piper aduncum* L. dan *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE), BERDASARKAN ANALISIS Sequenced-Related Amplified Polymorphism

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

elektroforesis selesai, gel dimasukkan ke dalam kotak UV untuk dianalisis melalui *UV Transilluminator*, sehingga pita dapat dilihat dalam bentuk foto.

3.4.6 Analisis Data

Pita DNA yang dihasilkan dari proses elektroforesis diukur panjang biasanya. Ada tidaknya pita DNA diberi skor yang berbeda, pita DNA diberi skor 1 apabila muncul dan diberi skor 0 bila tidak muncul. Analisis kelompok dan konstruksi dendrogram dibuat dengan metode *Unweight Pair Grup Method Using Arithmetic Method* (UPGMA) dan indeks similaritas yang digunakan adalah indeks similaritas Sorrensen's-DICE. Analisis kelompok dan konstruksi dendrogram diolah menggunakan program komputer Ntsys 2.11a. Analisis keanekaragaman genetik dapat diamati dengan parameter genetik seperti jumlah alel teramati (n_a), jumlah alel efektif (n_e), indeks keanekaragaman genetik (h), dan indeks Shannon (I). Berdasarkan jumlah alel efektif (n_e) yang diperoleh dari setiap lokus disimpulkan semakin tinggi nilai n_e semakin banyak juga jumlah individu heterozigot yang terdapat pada suatu populasi. Presentasi lokus polimorfik juga menunjukkan adanya heterozigositas dan heterogenitas antara individu-individu di dalam populasi (Ajambang, Sudarsono, Asmono, & Toruan, 2012). Analisis keanekaragaman genetik diolah menggunakan program komputer Popgene32. PCA (*Principal Component Analysis*) adalah sebuah cara untuk mengidentifikasi pola pada data dan kemudian di visualisasikan dalam bentuk lain yang menghasilkan perbedaan dan persamaan antar pola. PCA mengubah bentuk sekumpulan variabel asli menjadi kumpulan variabel yang lebih kecil yang tidak berkorelasi dan dapat mewakili informasi variabel asli (Radiarta, Hasnawi, & Mustafa, 2013). PCA dilakukan dengan software Ntsys 2.11a. dengan hasil berupa plot dua dimensi.

Jumlah alel teramati (N_a) adalah pengukuran yang digunakan pada genetika populasi untuk menguantifikasi keanekaragaman genetik pada lokus tertentu dalam suatu populasi. N_a mewakili jumlah alel berbeda yang ada di lokus tersebut dalam sampel individu yang diamati dari populasi. Rumus untuk menghitung jumlah alel teramati adalah sebagai berikut.

$$N_a = \text{Jumlah alel berbeda yang teramati dalam sampel}$$

Pada penelitian alel yang berbeda dihitung jumlahnya, perlu diingat pengukuran ini tidak melibatkan frekuensi dari setiap alel, hanya menekankan berapa jenis alel berbeda yang teramati.

Jumlah alel efektif (N_e) adalah pengukuran keanekaragaman genetik lainnya dalam populasi yang melibatkan jumlah alel dan frekuensinya. Pengukuran ini menghasilkan keanekaragaman genetik yang lebih komprehensif dibandingkan jumlah alel teramati. Rumus untuk menghitung jumlah alel efektif bergantung pada frekuensi alel dalam populasi. Jika memiliki frekuensi alel (p_1, p_2, \dots, p_k) untuk k alel pada lokus tertentu, rumus untuk menghitung jumlah alel efektif adalah sebagai berikut

$$N_e = \frac{1}{(1 - h)} = \frac{1}{\sum_{i=1}^k p_i^2}$$

Keterangan: N_e = jumlah alel efektif; p_i = frekuensi dari alel pada lokus; $h = 1 - \sum p_i^2$; k = jumlah total alel

Dalam rumus ini frekuensi alel dikuadratkan dan dijumlahkan. Pengukuran ini memberi bobot lebih pada alel yang langka dan lebih sedikit bobot pada alel yang umum, sehingga mencerminkan dampak keanekaragaman dan frekuensi alel.

Keanekaragaman genetik H juga dikenal sebagai heterozigositas yang diharapkan atau keanekaragaman H yang tidak bias, adalah pengukuran keanekaragaman genetik yang melibatkan jumlah alel dan frekuensi pada lokus tertentu yang ada pada populasi, hal tersebut berdasarkan konsep heterozigositas yang diharapkan. Rumus untuk menghitung Keanekaragaman genetik H bergantung pada frekuensi alel (p_1, p_2, \dots, p_k) untuk k alel pada suatu lokus. Rumus lengkapnya sebagai berikut:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Keterangan: H = keanekaragaman genetik; p_i = frekuensi alel pada populasi; k = jumlah total alel

Indeks Informasi Shannon (I) adalah pengukuran dari informasi keanekaragaman dari suatu populasi atau komunitas. Indeks ini mengukur ketidakpastian atau distribusi spesies atau alel acak yang berada dalam suatu sistem. Dalam konteks genetika populasi, indeks informasi Shannon dapat digunakan untuk mengukur keanekaragaman genetik pada lokus tertentu.

Fakhri Faturrohman, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN SPESIES ASING, Piper aduncum L. dan Piper umbellatum L. (PIPERACEAE), BERDASARKAN ANALISIS Sequenced-Related Amplified Polymorphism

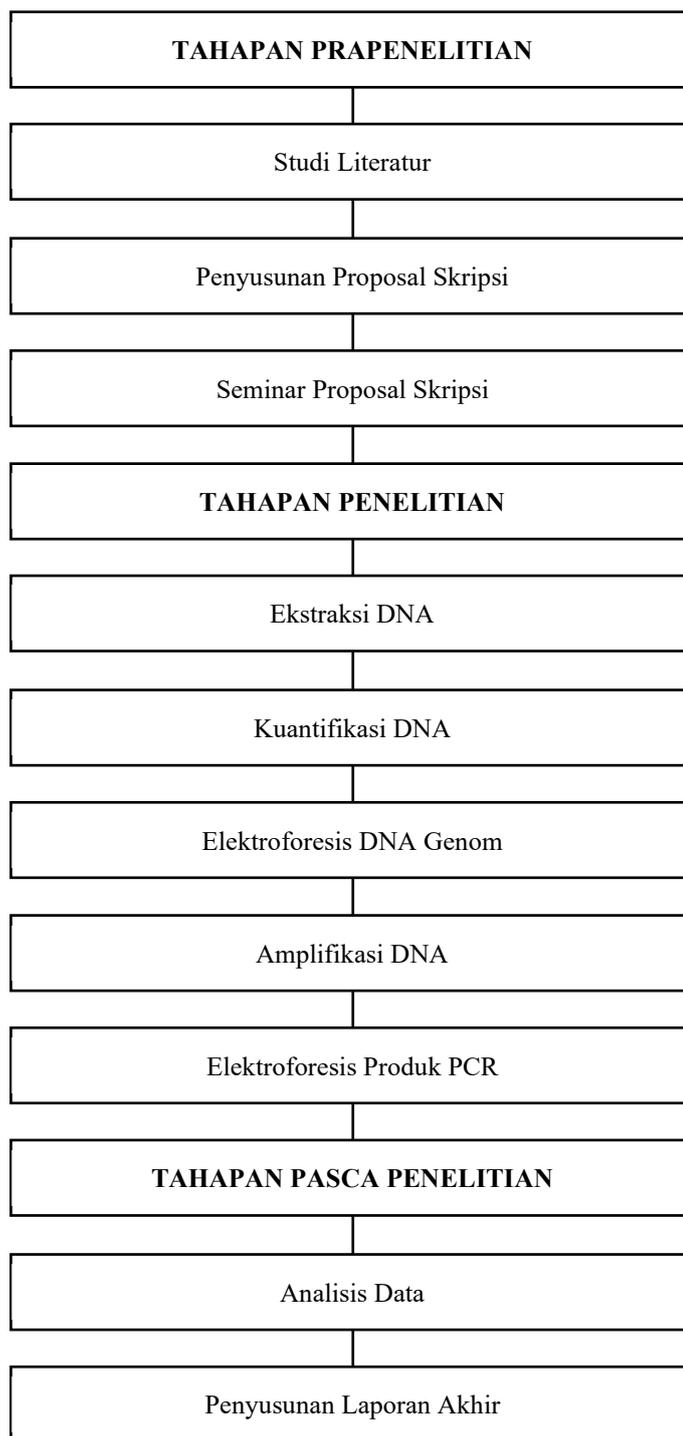
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

$$H = - \sum_{i=1}^k P_i \cdot \ln (P_i)$$

Keterangan: H = indeks informasi shannon; Pi = frekuensi alel atau spesies pada populasi; k = jumlah total alel atau spesies

Alur penelitian secara lebih jelas tertera pada gambar 3.2 dengan terbagi menjadi tiga tahap yaitu, prapenelitian, penelitian, dan pasca penelitian.

3.4.7 Alur Penelitian



Gambar 3.2. Bagan alur penelitian