

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian tentang “Filogeografi Cicak Jari Lengkung (Squamata; Gekkonidae; *Cyrtodactylus*) di Jawa dan Sumatera Berdasarkan Analisis Morfologi dan Molekuler Gen NADH Dehydrogenase Subunit 4 (ND4)” dilaksanakan pada bulan November-Mei 2017 bertempat di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan serta Biologi Molekuler Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

3.2 Kerangka Kerja Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilaksanakan meliputi beberapa langkah, diantaranya sebagai berikut :

1. Studi pendahuluan dilakukan untuk mengetahui dan memperoleh kajian terkait konstruksi Paparan Sunda, persebaran *Cyrtodactylus*, lokasi pengambilan sampel, metode ekstraksi DNA dan rekonstruksi pohon filogenetik.
2. Koleksi sampel *Cyrtodactylus* dari Jawa dan Sumatra.
3. Pengawetan dan pengambilan jaringan *Cyrtodactylus* untuk mendapatkan sampel DNA.
4. Ekstraksi DNA *Cyrtodactylus* yang bertujuan untuk mendapatkan DNA yang murni.
5. Pemotongan gen target (ND4) dan perbanyakkan untai DNA menggunakan mesin *thermal cycler* yang bertujuan untuk menandai DNA target untuk dilakukan sekuensing.
6. Sekuensing gen ND4, bertujuan untuk menterjemahkan urutan DNA dari sampel *Cyrtodactylus* yang dipilih dari setiap wilayah di Paparan Sunda.
7. Pengumpulan data pembanding dan tambahan dari *Cyrtodactylus* diambil dari *Genbank*. Selain itu, dilakukan pencarian data *outgroup* yang bertujuan untuk mengkonfirmasi rekonstruksi filogenetik dari *Cyrtodactylus*
8. Pembuatan pohon filogenetik dari hasil sekuensing untuk mengetahui hubungan kekerabatan genus *Cyrtodactylus* di Paparan Sunda.

3.3 Deskripsi Area Studi

Topografi pulau Sumatra terbagi atas dua bagian, yaitu pegunungan dan dataran rendah. Adanya barrier ekologi berupa pegunungan Bukit Barisan yang membentang membagi Sumatra menjadi dua bagian, sehingga beberapa satwa mengalami diferensiasi dan variasi morfologi akibat adaptasi dengan lingkungannya (Voris, 2000). Berbeda dengan Sumatra, pulau Jawa merupakan daerah yang sebagian besar adalah hutan dataran rendah yang kini telah ditebangi dan banyak berkurang. Hanya sedikit hutan pegunungan yang masih ada saat ini dan membentuk habitat pulau-pulau yang terisolasi tanpa penghubung di antaranya. Kondisi ini kemungkinan menghambat terjadinya aliran gen antara populasi dari barat dan pusat Jawa (Matsui dkk., 2010).



Gambar 5. Peta lokasi sampling *Cyrtodactylus* di Pulau Sumatra dan Jawa

Lokasi pengambilan sampel di pulau Sumatra meliputi Aceh, Sumatra Barat, Sumatra Utara dan Jambi. Sedangkan lokasi pengambilan sampel di pulau Jawa meliputi Jawa Barat dan Jawa Tengah. Setiap provinsi dilakukan pengambilan sampel pada beberapa

kota/kabupaten. Masing-masing dipilih lokasi yang dapat menginterpretasikan wilayah tersebut. Jumlah sampel dan lokasi dapat ditinjau pada tabel 1. Lokasi *sampling Cyrtodactylus* di Jawa dan Sumatra dapat ditinjau pada Gambar 5.

3.4 Pengambilan Sampel *Cyrtodactylus*

Metode pengambilan data *Cyrtodactylus* dilakukan dengan metode *Visual Encounter Surveys* (VES) yang dimodifikasi dengan metode transek (Heyer dkk, 1994). Metode transek digunakan untuk pencarian sampel pada lokasi yang luas dengan waktu yang singkat. Metode transek dilakukan untuk mencari sampel yang umum dengan populasi yang besar dan merata di sepanjang jalur transek. Metode VES dilakukan dengan jelajah bebas pada lokasi pengambilan sampel. VES digunakan untuk mengetahui keragaman jenis pada suatu daerah. Setiap sampel *Cyrtodactylus* diidentifikasi dengan buku panduan lapang dan dikoleksi menggunakan kantong spesimen. Koordinat sampel yang telah ditemukan dicatat menggunakan *Global Positioning System* (GPS). Preservasi sampel dilakukan dengan menyuntik sampel hidup menggunakan etanol 70%. Sampel yang telah mati selanjutnya dilakukan pengambilan gambar bagian dorsal, ventral dan lateral. Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada bagian liver kemudian diawetkan pada etanol absolut 96%. Penyimpanan sampel awetan dilakukan dengan menyuntikkan formalin 10% pada seluruh bagian tubuh. Sampel awetan yang telah diisi formalin ditata seperti halnya sampel yang masih hidup.

Tabel 1. Daftar sampel *Cyrtodactylus*

Nomor			
No.	Lapang	Spesies	Locality
1.	ENS 16026	<i>C. semicinctus</i>	Kerinci, Jambi
2.	ENS 15476	<i>C. cf psarops</i>	Karo, Sumatra Utara
3.	ENS 16108	<i>C. marmoratus</i>	Sukabumi, Jawa Barat
4.	ENS 16889	<i>C. cf psarops</i>	Tapanuli Selatan, Sumatra Utara
5.	ENS 19697	<i>C. consobrinus</i>	Andalas Forest, Sumatra Barat
6.	NK 0018	<i>C. semiadii</i>	Cilacap, Jawa Tengah
7.	NK 0120	<i>C. marmoratus</i>	Nusakambangan, Cilacap
8.	ENS 18770	<i>C. lateralis</i>	Seulawah Agam, Aceh
9.	ENS 16595	<i>C. cf marmoratus</i>	Toba Samosir, Sumatra Utara
10.	ENS 19224	<i>C. cf psarops</i>	Payakumbuh, Sumatra Barat

3.5 Analisis Molekuler

3.5.1 Ekstraksi DNA

Sampel *Cyrtodactylus* yang dikoleksi selanjutnya diambil jaringan otot pada bagian paha/liver, kemudian diawetkan dengan etanol absolut 96%. Sampel jaringan yang telah diambil diekstraksi DNA sesuai dengan protokol QiagenAmp. Prinsip isolasi DNA terbagi atas empat tahap yaitu lisis, *deproteinase*, presipitasi dan pelarutan DNA. Sampel jaringan yang telah diambil ditimbang sebanyak 0,25 g atau 25 μ L sampel DNA, kemudian ditambahkan larutan buffer ATL 180 μ L, kemudian divortex. Selanjutnya, ditambahkan larutan proteinase-K sebanyak 20 μ L. Penambahan larutan ini bertujuan untuk mengurangi kontaminan berupa protein yang dapat mengurangi kemurnian DNA. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama 1 jam 30 menit. Setiap 30 menit dilakukan vortex agar larutan proteinase-K dapat bekerja kembali. Setelah proses inkubasi, sampel disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 detik. Langkah selanjutnya, ditambahkan buffer lisis (buffer AL) sebanyak 200 μ L dan divortex. Buffer AL berfungsi untuk lisis DNA dari histon yang ada pada kromosom. Pemaksimalan kerja buffer AL dilakukan dengan inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit dan kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 detik. Larutan etanol

96% ditambahkan sebanyak 200 μL untuk langkah presipitasi DNA. Langkah ini dilakukan agar DNA tidak tercampur oleh komponen lain, seperti protein dan RNA yang dapat mengurangi kemurnian DNA. Larutan dipindahkan ke dalam tube minispin dan disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, bagian atas minispin diangkat dan dipindahkan pada mikrotube baru.

Prinsip presipitasi pada protokol menggunakan kit dilakukan dengan menambahkan prosedur *washing* untuk memastikan kemurnian DNA. Sampel yang telah berada mikrotube baru selanjutnya ditambahkan larutan buffer AW1 sebanyak 500 μL dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Bagian atas minispin diangkat kembali dan dipindahkan ke mikrotube baru. Selanjutnya ditambahkan larutan buffer AW2 sebanyak 500 μL dan disentrifugasi sebanyak 14000 rpm selama 3 menit. Prinsip isolasi DNA yang terakhir adalah *dissolve* DNA yaitu dengan cara mengangkat bagian atas minispin kemudian dipindahkan ke dalam mikrotube baru dan ditambahkan buffer AE sebanyak 200 μL . Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Bagian atas minispin dibuang dan DNA yang berupa cairan disimpan pada refrigerator -20°C untuk menjaga kondisi DNA. Suspensi DNA yang disimpan selanjutnya digunakan sebagai template dalam amplifikasi gen ND4 dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

3.5.2 Amplifikasi gen ND4

Satu pasang primer yang digunakan untuk mendapatkan sekuens ND4 adalah ND4 (*forward*) 5'TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC 3' dan LEU (*reverse*) 5' TA CCT TTA CTT GGA TTT GCA CCA 3' (Arevalo dkk., 1994). Komposisi PCR mix terdiri dari Go taq green sebanyak 5 μL kemudian ditambahkan ddH₂O sebanyak 3,6 μL . Komplemen primer *forward* dan *reverse* masing-masing ditambahkan sebanyak 0,2 μL . DNA sampel ditambahkan pada komposisi PCR mix dan primer yang berfungsi sebagai template amplifikasi gen ND4. Total volume reaksi sebanyak 10 μL . PCR tube yang telah berisi komponen PCR selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin *thermocycling*. Amplifikasi gen ND4 menggunakan metode PCR dengan pengulangan siklus sebanyak 32 kali. Siklus denaturasi dengan suhu 93°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 45 detik dan *extension* 72°C selama 1 menit. Pre-denaturasi dimulai

sebelum semua siklus PCR dimulai dengan suhu 95° C selama 2 menit. Pemaksimalan siklus PCR dilakukan dengan *post-extension* selama 7 menit pada suhu 72° C. Hasil PCR kemudian diuji secara kualitatif dengan gel agarose 1% untuk konfirmasi keberhasilan amplifikasi gen ND4. Sekuens sampel *Cyrtodactylus* dilakukan dengan jasa dari PT. GENETIKA SCIENCE Jakarta Barat.

3.5.3 Uji kualitatif DNA

Konfirmasi keberhasilan amplifikasi gen target ND4 dilakukan dengan pendekatan kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa. Bubuk agarosa ditimbang sebanyak 0,35 gram kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan dengan buffer TBE 1x sebanyak 35 mL. Erlenmeyer beserta larutan pada dipanaskan pada *panic panas* selama 5 menit. Setelah itu, agar didiamkan beberapa detik hingga tidak terlalu panas, kemudian ditambahkan EtBr 0,3 µL untuk mewarnai sampel DNA. Plate elektroforesis yang telah ditancapkan sisiran 16 sumuran digunakan untuk uji kualitatif. Larutan dimasukkan pada plate elektroforesis dan ditunggu hingga mengeras. Sisiran selanjutnya diambil dari plate dan gel elektroforesis dipindahkan pada chamber elektroforesis. Sampel 1 µL dan 2 µL loading dye dimasukkan. Panjang DNA ditentukan melalui penambahan ladder 1 kilobase (kb). Selanjutnya, alat elektroforesis dirunning pada 90 V selama 30 menit. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan UV transilluminator.

3.5.4 Pengumpulan data sekuens *Cyrtodactylus* di kawasan Paparan Sunda

Pencarian data sekuens beberapa spesies *Cyrtodactylus* yang ada di kawasan Paparan Sunda bertujuan untuk mengetahui pola pengelompokan dan kekerabatan *Cyrtodactylus* dari Jawa dan Sumatra. Selain itu, dilakukan pencarian sekuens *outgroup* yaitu sekuens DNA dari kerabat dekat genus *Cyrtodactylus* yang bertujuan untuk mengkonfirmasi topologi pohon kekerabatan. Menurut Mount (2001), *outgroup* merupakan salah satu prosedur yang digunakan untuk validasi dari sekuens asli. Sekuens dari *outgroup* yang dipilih harus berkorelasi dekat dengan sekuens-sekuens yang dianalisa, tetapi juga mempunyai perbedaan yang signifikan antara *outgroup* dengan sekuens yang lain. Pencarian sekuens DNA yang digunakan gen

Mitokondria (mtDNA) ND4 dengan panjang 527- 702 bp. Berikut sekuens yang didapatkan dari *Genbank* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data sampel *Cyrtodactylus* dan *outgroup* dari *Genbank*

No.	Spesies	Locality	Accession Number
1.	<i>C. consobrinus</i>	Kalimantan Barat, Kalimantan	EU268412.1
2.	<i>C. loriae</i>	Papua Nugini	EU268413.1
3.	<i>Gekko gekko</i>	China	EU268422.1
4.	<i>Cnemaspis limi</i>	Malaysia	NC020039.1

3.6 Rekonstruksi Pohon Filogenetik

3.6.1 *Contig* dan *alignment* sekuens DNA

Sekuens ND4 dari beberapa sampel *Cyrtodactylus* yang telah didapatkan dari hasil sekuensing selanjutnya dilakukan *contig* (penggabungan) untuk mendapatkan sekuens yang utuh. Hasil *contig* dari seluruh sekuens selanjutnya dilakukan *alignment* dengan program MEGA7 menggunakan *alignment* Clustal W. Hasil *alignment* akan terdapat *gap* yang berada pada awal dan akhir sekuens, sehingga dilakukan *trimming* (pemotongan) secara manual sehingga didapatkan 680 bp. Penghapusan *gap* yang muncul dilakukan untuk meminimalisir kesalahan software dalam merekonstruksi pohon filogenetik. Data sekuens yang telah dilakukan *alignment* diexport dalam format fasta dan MEGA.

3.6.2 Analisis *Sequence Divergence* (*p-Distance*)

Munculnya perbedaan basa nukleotida pada hasil *alignment* dianalisis dengan metode *pairwise distance*. Analisis ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui jumlah nukleotida atau asam amino yang berbeda pada lokus DNA. Nilai *p-distance* dapat dijadikan sebagai dasar penentuan spesies namun tidak dapat menjelaskan jejak historis evolusi dari suatu taksa (Lemey dkk., 2009). Dari hasil penelitian ini nilai *p-distance* 15 % pada sekuens gen ND4 sudah dapat dinyatakan beda spesies.

3.6.3 Pemilihan Modeltest untuk Analisis *Maximum likelihood* dan *Bayesian Inference*

Pembuatan *modeltest* dilakukan untuk mendapatkan permodelan pohon yang sesuai dengan hasil *alignment* yang dimiliki, sehingga software tidak perlu melakukan semua uji probabilitas untuk mendapatkan topologi pohon (Lemey, 2009). Pemilihan *modeltest* untuk analisis menggunakan software *Jmodeltest* berdasarkan AIC (*Akaike Information Center*). Pemilihan untuk analisis *Bayesian Inference* dilakukan dengan software Kakusan 4.

3.6.4 Analisis *Maximum Likelihood* dan *Maximum Parsimony*

Metode *maximum parsimony* (MP) memilih kriteria pohon dengan perubahan evolusi paling sedikit atau panjang cabang terpendek sebagai pohon yang paling sesuai dengan kondisi evolusi yang sebenarnya (Lemey, 2009). Pemilihan analisis filogenetik juga harus mempertimbangkan model evolusi pohon filogeni. Penggunaan *maximum likelihood* (ML) didasarkan pada model kemungkinan, yaitu program yang merekonstruksi pohon filogeni terbaik dengan nilai probabilitas yang tinggi. Metode ML akan mencari pohon filogenetik yang mencerminkan proses evolusi yang sebenarnya dengan cara mencari setiap kemungkinan topologi pohon yang terbentuk dan mempertimbangkan setiap posisi nukleotida atau asam amino dalam suatu *alignment*, dengan memanfaatkan model substitusi dan tingkat variasi mutasi dalam setiap sites *alignment* (Nei dan Kumar, 2000). *Maximum likelihood* (ML) dan *maximum parsimony* (MP) dianalisis dengan PAUP* 4.0 (Swofford, 2002). *Heuristic search option* dari MP dianalisis dengan *tree bisection recognition* (TBR) dengan replikasi pencarian (nreps) 10 kali dan *bootstrap* 1000 kali. Permodelan untuk analisis ML berdasarkan AIC didapatkan model evolusi TrN+I+G, dengan instruksi Lset base=(0.3475 0.3759 0.0828) nst=6 rmat=(1.0000 19.9856 1.0000 1.0000 7.6329) rates=gamma shape=0.6080 ncat=4 pinvar=0.2940;). *Heuristic search option* dianalisis dengan TBR replikasi 10 kali dan *bootstrap* 100 kali.

3.6.5 Analisis *Bayesian Inference*

Bayesian Inferior Probablity (BPP) diestimasi melalui MrBayes 3.0b4. *Modeltest* untuk analisis Bayesian dari hasil Kakusan 4 adalah GTR (*General Time Reversible*) dan bentuk parameter *Gamma* yang muncul sebagai *modeltest* terbaik dengan hasil *alignment* yang

dimiliki. Perhitungan mcmc (*monte carlo markov chain*) berjumlah 1.000.000, perhitungan sampel tiap generasi (nreps) 1000 kali generasi.

3.7 Morfometri

3.7.1 Pengambilan data morfometri

Pengambilan data morfometri dilakukan pada sampel awetan yang ada di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan (UB). Selain itu, morfometri juga dilakukan dari foto dengan menggunakan software ImageJ. Metode ini dipilih dikarenakan sampel yang digunakan dalam penelitian ini berada di Laboratorium Amfibi dan Reptil University of Texas at Arlington. Pengambilan data ini bertujuan untuk menguatkan hasil analisis molekuler menggunakan data *clade* yang dibangun dari karakter morfologi. Selain itu, identifikasi morfometri dilakukan juga untuk mengetahui variasi setiap spesies dari *Cyrtodactylus*. Pengukuran karakter morfometri dan meristik yang dilakukan mengacu pada (Riyanto dkk., 2016).

Tabel 3. Karakter morfometri *Cyrtodactylus*

No.	Karakter Morfometri	Singkatan
1.	Panjang mulut sampai kloaka	SVL
2.	Panjang ekor	TailL
3.	Panjang badan diantara anggota gerak	AGL
4.	Panjang kepala	HeadL
5.	Lebar kepala	HeadW
6.	Panjang antara mata dan mulut	EyeS
7.	Diameter mata	EyeD
8.	Panjang jarak mata dan hidung	SnEye
9.	Panjang jarak antara mata dan telinga	EarEye
10.	Panjang jarak antar mata	IO

Tabel 4. Karakter meristik *Cyrtodactylus*

No.	Karakter Meristik	Singkatan
1.	Sisik bibir atas	SupraL
2.	Sisik bibir bawah	InfraL
3.	Tuberkel pada tangan	TB
4.	Tuberkel pada kaki	TA
5.	Tuberkel dorsal	DT
6.	Tuberkel punggung diantara alat gerak	PVT
7.	Sisik perut	VS
9.	Tuberkel pada lipatan ventrolateral	TVF
10.	Jumlah sisik besar <i>femoral</i>	EFS
11.	Jumlah sisik besar <i>precloacal</i>	EPS
12.	Jumlah pori sisik <i>femoral</i>	FP
13.	Jumlah pori sisik <i>precloacal</i>	PP
14.	Bentuk <i>precloacal</i>	PG
15.	Jumlah digiti pada jari kaki ke empat	Lam

Hasil dari pengukuran dan identifikasi meristik dicatat pada *microsoft excel*. Selanjutnya dilakukan pengolahan data dan analisis dengan software PAST untuk mengetahui pengelompokan *Cyrtodactylus* melalui PCA (*Principal Component Analysis*) yang berdasarkan morfologi.

3.7.2 Analisis data morfometri

Analisis data dilakukan dari hasil pengukuran dan identifikasi dari setiap karakter yang diamati kemudian dilakukan pengkonversian standarisasi untuk *Clustering Analysis* dan PCA. Nilai SVL digunakan sebagai pembagi dari setiap karakter yang diamati, kemudian di Log 10 dan dilakukan pengkalian 100 (persamaan 1) (Kurniawan dkk.,2011).

$$= \text{Log}_{10} (\text{Karakter}/\text{SVL}) \times 100\% \quad (1)$$

3.7.3 Analisis *Principal Component Analysis* *Cyrtodactylus*

Analisa hubungan kekerabatan *Cyrtodactylus* dilakukan dengan menggunakan software PAST. *Software* PAST digunakan untuk analisis PCA (*Principal Component Analysis*). *Principal Component Analysis* dilakukan untuk mengetahui pola persebaran berdasarkan karakteristik morfometrik.