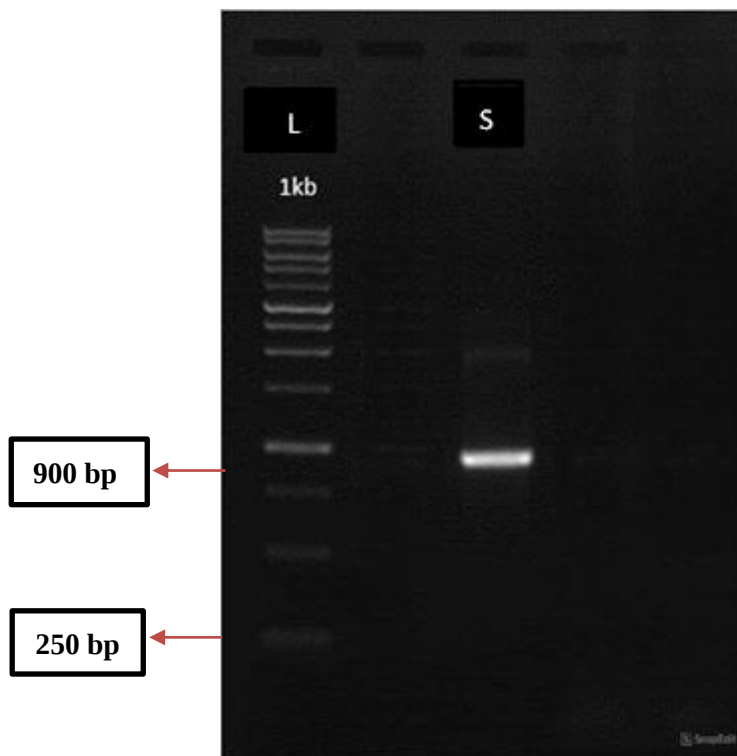


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA *Mangifera pedicellata*

Hasil visualisasi DNA *M. pedicellata* menunjukkan terbentuknya pita yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi. Visualisasi hasil amplifikasi pada penelitian ini memperlihatkan bahwa ITS berhasil mengamplifikasi DNA pada tanaman *M. pedicellata* (Gambar 4.1). Hasil amplifikasi DNA dilakukan menggunakan alat elektroforesis dengan 1% gel *agarose* dan 1 kb ladder, yang diamati melalui UV *transilluminator* untuk melihat panjang dan intensitas pita yang muncul di *gel*.



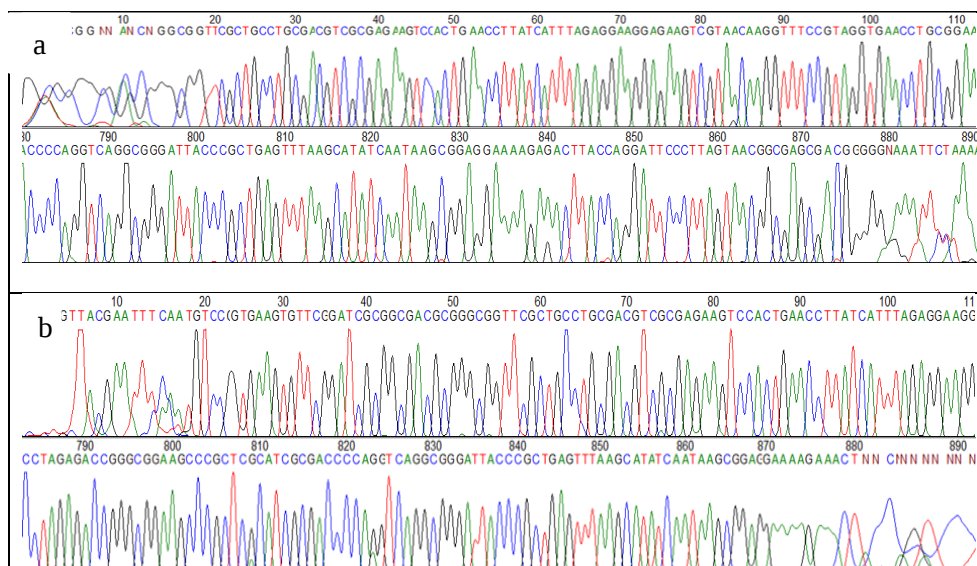
Gambar 4.1 Hasil visualisasi amplifikasi gen ITS pada DNA *Mangifera pedicellata* Kosterm. Vak XXIV.A.156 Koleksi Kebun Raya Bogor (1kb; Ladder, S; sampel *M. pedicellata*).

Hasil visualisasi DNA *Mangifera pedicellata* (Gambar 4.1) menunjukkan keberhasilan amplifikasi DNA *M. pedicellata* pada daerah ITS1 dan ITS2, menggunakan sepasang primer ITS4 dan ITS5. Keberhasilan amplifikasi ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA pada *gel agarose* setelah dilakukan elektroforesis. Hasil amplifikasi sampel *M. pedicellata* menunjukkan pita DNA dengan ukuran 900 bp. Hal tersebut menandakan bahwa daerah ITS dapat teramplifikasi dengan baik, karena ukuran produk amplifikasi sesuai dalam pernyataan Cheng *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa daerah ITS menghasilkan pita DNA biasanya berukuran sekitar 700-900 bp. Dalam penelitian Gardes dan Bruns (1993) juga menyatakan bahwa ampikon ITS berukuran ± 900 bp. Pada gambar 4.3 terlihat pita DNA yang terbentuk berupa pita tunggal dan tidak adanya *smear*, pita yang terbentuk juga terlihat jelas dan tebal. Hal ini menunjukkan suhu *annealing* yang di gunakan sudah optimal untuk menempel pada DNA cetakan.

Konsentrasi DNA dapat dilihat dari ketebalan pita DNA nya, semakin tebal pita menandakan semakin tinggi konsentrasinya begitu juga sebaliknya. Pita DNA yang jelas dan tebal menunjukkan bahwa DNA berkualitas baik dan murni, karena kualitas dan kemurnian DNA yang baik berpengaruh dalam proses amplifikasi. Menurut Sambrook dan Russell (2001) Hasil pita yang baik mempermudah ukuran DNA hasil amplifikasi. Tebalnya pita DNA yang terbentuk (Gambar 4.1) menandakan bahwa DNA target yang teramplifikasi dapat digunakan untuk proses selanjutnya yaitu sekuensing.

B. Hasil Sekuensing *Mangifera pedicellata*

Hasil sekuensing fragmen gen ITS pada *M. pedicellata* memiliki panjang sekitar 890 bp. Analisis sekuensing yang dihasilkan berupa kromatogram dari sekuen *forward* dan *reverse* dalam format AB1 *file* (Gambar 4.2). Kualitas DNA yang baik dilihat dari puncak grafik yang tinggi dan tidak saling tumpang tindih. Kromatogram merupakan gambar visual dari hasil sekuensing DNA yang sudah diamplifikasi dengan proses *polymerase chain reaction* (PCR).



Gambar 4.2 Kromatogram hasil sekuensing DNA *M. pedicellata* Kosterm. Vak XXIV.A.156 koleksi Kebun Raya Bogor (a; *forward*, b; *reverse*).

Hasil kromatogram *M. pedicellata* pada gambar di atas menunjukkan kromatogram dengan grafik yang tinggi dan saling terpisah, maka dapat memberikan informasi bahwa hasil sekuensing dinyatakan baik. sesuai dengan pernyataan Bangol *et al.* (2014) yang menyatakan hasil sekuensing yang baik ditunjukkan dengan grafik yang mempunyai puncak tinggi dan saling terpisah satu dengan yang lain sedangkan yang

tidak baik di tunjukkan dengan puncak yang landai dan terdapat puncak ganda.

Pada garis kromatogram terdapat beberapa warna yang di sesuaikan dengan basa nukleotida untuk memudahkan penentuan basa nukleotida di antaranya adenin (A) berwarna hijau, sitosin (C) berwarna biru, timin (T) berwarna merah, dan guanin (G) berwarna hitam. Maka dari itu warna dari kromatogram akan membantu dalam identifikasi dan analisis sekuen DNA ITS (Dale dan Park, 2010). Pada grafik kromatogram dipilih puncak yang landai agar di hasilkan contig sekuen (Tabel 4.1). Hasil contig memiliki panjang sekuen 641 bp.

Tabel 4.1 Hasil Contig Sekuen *M. pedicellata*

Contig Sekuen
GTCGTGCGGTTGCGTTCTCCCGGCCACGAGCTCCGCGACCCTAGAGACCGGGCGGAAGCCCGCTCGCATCGCGA CCCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAGACTTACCAGGATTG CCTTAGTAACGGCGAGCGACTGTCCGGTGAAGTGTTCCGGATCGCGGCGACGCGGGCGGTTTCGCTGCCTGCGACG TCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC GGAAGGATCATTGTCGAGACCTGCAAAGCAGAACGACCCGTGAACCTCGTGTTTAACTCGGGGACGTGCTTGCC TCGAGCTCGTGCGCCCCCGCCCGTGTGCGGTGCGGGCTTTCGTGCGCGGTGCGCCCTGTGTGTGCGTGTGCGGTGCC GCGCGTGTGCGGTGCTTAACCAACCCCGGCGCGAATCGCGCCAAGGACTTGTAAACGAGAGAGCCCGTCCCGT CGCCCCCGGACACGGTGCGTGTGCGGGACGCGGCGCCTCCTTTCATTATCTATAACGACTCTCGGCAACGGA TATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACC ATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCCGTTAGGGCCGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTT GCGCGCTCTCCAAAGATCGCAAGATCCTTTGCGGTGCGGGCGGCGGAAATTGGCCTCCCGTGTGCGTGTGCGCGGTG CGGTTGGCCCAATCTGAGTTCTCGGTGACGCTTTCCCGGACAGTCGGTGGCGTTTGA AAAACGACCTAGTGAT CCTG

C. Hasil *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

Hasil BLAST yang didapat pada laman NCBI terdapat 19 spesies dari genus *Mangifera* (Tabel 4.1). Dari hasil BLAST pada basis data NCBI dipilih 19 sekuen dari 100 sekuen dengan aksesi yang berbeda. Hasil yang di peroleh dari BLAST akan menunjukkan kesamaan dari sekuen dengan spesies yang ada di *database*. Metode BLAST berfungsi untuk membandingkan suatu sekuen nukleotida yang dimiliki, dengan *database* sekuen nukleotida (Anwar, 2022).

Tabel 4.2 Hasil *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Sekuen ITS

Spesies	Akses	Query	E.	Per.
		Cover	Value	Identity
<i>Mangifera camptosperma</i>	MF444900.1	92%	0.0	95.06%
<i>Mangifera indica</i>	MF444902.1	92%	0.0	94.90%
<i>Mangifera griffithi</i>	MF444899.1	90%	0.0	95.28%
<i>Mangifera indica</i>	KJ833761.1	85%	0.0	93.31%
<i>Mangifera camptosperma</i>	AB598043.1	81%	0.0	94.62%
<i>Mangifera indica</i>	KJ833764.1	82%	0.0	93.66%
<i>Mangifera indica</i>	KJ833765.1	81%	0.0	94.37%
<i>Mangifera indica</i>	KJ833760.1	84%	0.0	92.89%
<i>Mangifera indica</i>	KJ833762.1	83%	0.0	93.45%
<i>Mangifera indica</i>	KJ833758.1	84%	0.0	93.21%
<i>Mangifera odorata</i>	AB598044.1	81%	0.0	94.21%
<i>Mangifera indica</i>	LN552225.1	84%	0.0	93.24%
<i>Mangifera indica</i>	AB598049.1	80%	0.0	94.28%
<i>Mangifera quadrifida</i>	KX347959.1	80%	0.0	96.64%
<i>Mangifera indica</i>	AB598050.1	80%	0.0	93.88%
<i>Mangifera indica</i>	AB598047.1	80%	0.0	93.73%
<i>Mangifera indica</i>	KJ833759.1	85%	0.0	92.14%
<i>Mangifera indica</i>	OL960664.1	80%	0.0	92.93%
<i>Mangifera indica</i>	KJ833763.1	85%	0.0	90.49%
<i>Outgroup</i>				
<i>Bouea macrophylla</i>	AY594589.1	-	-	-

Pemilihan BLAST diambil nilai tertinggi yang mendekati 100%. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sampel *M. pedicellata* mempunyai kemiripan tertinggi dengan sekuen yang ada di *database* yakni pada *M. quadrifida* dengan nilai *percent identity* 96.64% dan *E-value* 0.0. Semakin tinggi *percent identity* nya maka nilai homologi (kemiripan) akan semakin besar. Sekuen yang mempunyai kesamaan tinggi ditunjukkan dengan *maximal score* dan *total score* yang sama, pada *query coverage* mendekati 100%, *E-value* mendekati 0.0, dan *percent identity* mendekati 100%. *Percent identity* adalah persentase kesamaan sekuen target dengan sekuen dalam *database* NCBI, *query coverage* adalah persentase panjang sekuen target yang selaras dengan sekuen dalam *database* NCBI, dan *E-value* adalah nilai kesamaan antara dua sekuen DNA yang terjadi secara kebetulan.

Nilai *E-value* yang baik ditunjukkan dengan angka 0 atau 0.0. Maka dari hasil BLAST di basis data NCBI ini menunjukkan pensejajaran sekuen sangat signifikan. Sesuai dengan pernyataan Fredrick *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa nilai *E-value* yang mencapai <0.05 maka bernilai signifikan. Pada *query cover* dipilih dari rentan nilai 80%, karena hasil BLAST dengan nilai *query coverage* 80% keatas dianggap sebagai indikator terbaik untuk validitas hasil analisis sekuen. Pada umumnya nilai minimal *query cover* sebesar 95%, kecuali untuk sekuen dengan pembacaan lebih rendah dipilih nilai minimal sebesar 75%. Sedangkan untuk nilai *percent identity* dengan persentase di atas 90% dianggap sebagai ambang batas terbaik dalam identifikasi homologi (kemiripan).

Persamaan homologi di atas 97% tergolong mewakili kesamaan pada tingkat spesies, persamaan homologi dengan nilai 93-97% tergolong mewakili identitas pada tingkat genus, sedangkan persamaan homologi

dibawah 93% kemungkinan spesies baru yang urutan basa nitrogennya belum terdapat dalam *GenkBank* (Fatwa *et al.*, 2021). Semakin tinggi tingkat kemiripan, maka tingkat homologi (kemiripan) antara sekuen akan semakin tinggi (Baker, 2018). Dalam hasil analisis BLAST penelitian ini tidak ada aksesori yang mempunyai kemiripan sampai 100%. Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa *M. pedicellata* merupakan spesies yang belum teridentifikasi dan sekuen DNA dari gen ITS belum tersedia di *database GenkBank*, maka sesuai dalam penelitian Roslim *et al.* (2021) apabila sekuen DNA yang diteliti tidak menunjukkan kemiripan 100% dengan *database*, karena tumbuhan yang diteliti sudah diketahui spesiesnya namun barcode DNA nya belum tersedia pada *GenBank* atau kemungkinan tumbuhan tersebut adalah spesies baru.

Berdasarkan data analisis BLAST yang didapat menunjukkan bahwa *M. pedicellata* mempunyai tingkat homologi yang bervariasi pada sekuen ITS, dan mempunyai tingkat kemiripan yang rendah, tidak mencapai 100%. Ditunjukkan juga dalam hasil perbandingan sekuen ITS, bahwa sekuen tersebut memiliki tanda (*) yang sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa ITS mempunyai banyak variasi genetik dari setiap spesies, karena ITS adalah lokus inti yang sering terjadi pindah silang dan menghasilkan rekombinan yang mempunyai banyak variasi genetik. Semakin tinggi variasi genetik menyebabkan tingkat homologi semakin rendah (Tindi *et al.*, 2018). Dari beberapa spesies yang dipilih dalam BLAST memiliki panjang sekuen berbeda-beda yang tertera pada Lampiran 3.

Pembandingan sekuen dilakukan untuk mengetahui tingkat kemiripan, dimana proses penyusunan dilakukan pada beberapa sekuen. Pembandingan sekuen adalah proses penyesuaian dua atau lebih sekuen

secara bersamaan untuk membentuk pohon filogenetik yang menggambarkan kekerabatan pada beberapa sekuen (Pradana *et al.*, 2019). Dari hasil pensejajaran sekuen terdapat beberapa perbedaan basa nukleotid antara sekuen *Mangifera* dan adanya *gap* yang ditandai dengan garis putus-putus. Hal tersebut terjadi karena ITS adalah daerah dengan evolusi cepat sehingga mempunyai sifat yang variatif antara ITS-1 dan ITS-2. Analisis pensejajaran sekuen menunjukkan bahwa *M. pedicellata* dengan *M. quadrifida* tidak mempunyai nilai *gap*, namun adanya sedikit perbedaan nukleotida (Gambar 4.3).

Species/Abbrev	Sequence
1. MF444900.1 Mangifera camptosperma	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
2. MF444902.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
3. MF444909.1 Mangifera griffithii	CCCTTCCTCCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
4. KJ833761.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
5. AB598043.1 Mangifera camptosperma	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
6. KJ833764.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
7. KJ833765.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
8. KJ833769.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
9. KJ833762.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
10. AB598044.1 Mangifera odorata	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
11. KJ833758.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
12. LN52225.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
13. AB598049.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
14. KX347959.1 Mangifera quadrifida	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
15. AB598050.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
16. AB598047.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
17. KJ833759.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
18. OL96066.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
19. KJ833763.1 Mangifera indica	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
20. Mangifera pedicellata	CCCGTTTCCTCCCTCCCGTGCCTTAACCAACCCCGCCGCAATTGCGCCAAAGGACTTGTAAACGAGAGGCTCCGTCCTCGTCCCGCCGACACG
21. AY594509.1 Bouea macrophylla	AATTTTTTAATCAAAAATCTTTTAAATTGGTAAATCTTTCGATCAAGTGTATATGCGAATCAATTGTTCTATGATCTTCTTAG

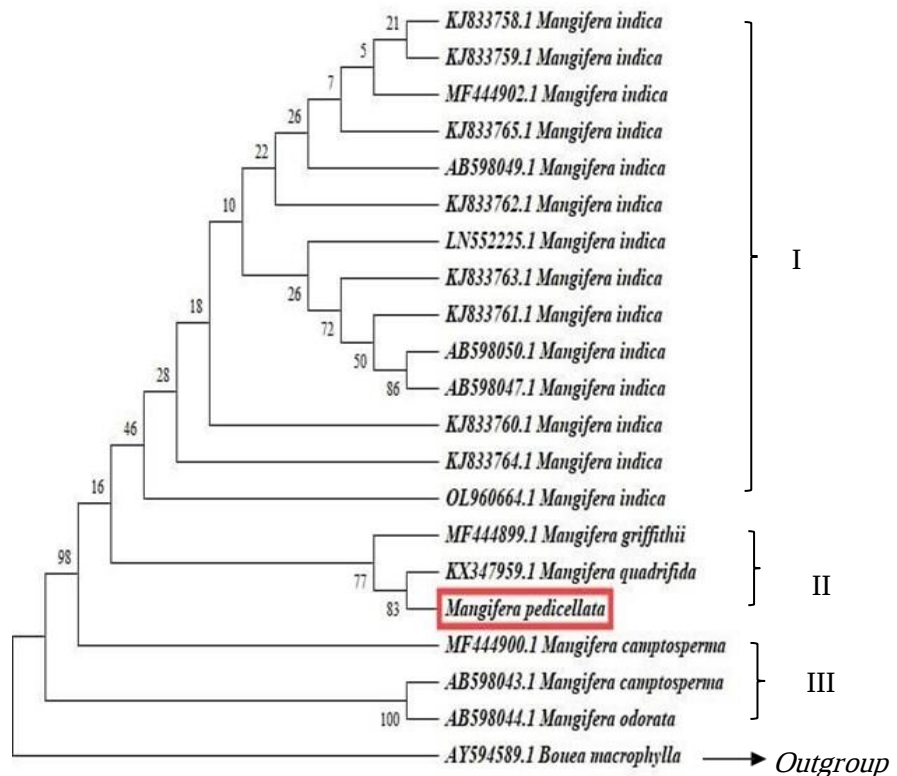
Gambar 4.3 Pensejajaran Sekuen Nukleotid

Berdasarkan analisis pensejajaran (Gambar 4.3) menunjukkan sekuen *M. pdeicellata* dengan *M. camptosperma* (AB598043.1) dan *M. odorata* (AB598044.1) mempunyai banyak perbedaan nukleotida dan adanya sedikit *gap* pada *M. camptosperma* dan *M. odorata*. Perbedaan nukleotid disebabkan karena faktor lingkungan seperti iklim, yang dapat mempengaruhi perbedaan nukleotid. *Gap* merupakan terjadinya proses mutasi yang tinggi berupa *insersi* ataupun *delesi* yang terjadi selama evolusi. *Delesi* adalah penghapusan satu atau beberapa basa dalam urutan DNA, sedangkan *insersi* adalah penambahan satu atau beberapa basa

dalam urutan DNA. Menurut Shen dan Jack (2008) menyatakan bahwa terdapat tipe-tipe mutasi yang terjadi diantaranya (a) mutasi yang disebabkan oleh nukleotida berubah menjadi nukleotida lainnya, (b) mutasi yang disebabkan oleh suatu nukleotida bertukar posisi dengan nukleotida didepan atau di belakang nya, (c) mutasi yang disebabkan oleh nukleotida yang disisipkan pada sekuen, (d) mutasi yang disebabkan oleh nukleotida pada sekuen yang dihapus. Dalam pensejajaran sekuen penelitian ini terdapat posisi sekuen pada nukleotida berubah menjadi nukleotida lain, salah satunya posisi A pada GGGCCCCG menjadi GAGCCCCG, dan nukleotida bertukar posisi dengan nukleotida didepan atau di belakang, salah satunya pada posisi C bertukar dengan T pada GTTCGCC menjadi GTCTGCC (Gambar 4.3).

D. Hasil Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik dilakukan untuk mengidentifikasi kekerabatan antara organisme sampel berdasarkan hubungan evolusionernya dengan sekuen yang ada di *website* NCBI. Hasil analisis filogenetik berdasarkan sekuen ITS (Gambar 4.3) membentuk pohon yang terbagi menjadi III klad. Pada klad I terdiri dari *M. indica* (KJ833758.1) sampai *M. indica* (OL960664.1), pada klad II terdiri dari *M. griffithi* (MF444899.1) sampai *M. pedicellata*, sedangkan pada klad III terdiri dari *M. camptosperma* (MF444900.1) sampai *M. odorata* (AB598044.1). Pembentukan klad terjadi karena adanya kemiripan urutan basa DNA, pada urutan basa DNA yang mirip akan terbentuk menjadi satu kelompok (Ardiana *et al.*, 2021). Menurut Anafarida dan Badruzsafari (2020) juga menyatakan bahwa suatu jenis disatukan dalam kelompok yang sama karena banyaknya urutan sekuen yang mempunyai hubungan yang dekat, dan mempunyai genetik yang sama.



Gambar 4.4 Pohon filogenetik menggunakan metode *neighbor joining* dengan model *kimura 2-parameter* dan nilai bootstrap 1000 ulangan. 21 spesies *ingroup* dan 1 spesies *outgroup*.

Pada Gambar 4.4 menunjukkan bahwa *M. pedicellata* berada pada cabang yang sama dengan *M. quadrifida* (KX347959.1). Berdasarkan garis percabangan pada pohon filogenetik terlihat bahwa *M. pedicellata* dan *M. quadrifida* memiliki garis lebih pendek. Garis dalam pohon filogenetik menunjukkan jarak evolusi dan kesamaan moyang antar spesies. Semakin panjang garis maka semakin jauh jarak evolusinya dan semakin pendek garis menunjukkan kekerabatan paling dekat (Oktafia dan Badruzsafari, 2021). Hal tersebut dapat dinyatakan bahwa *M. pedicellata* berkerabat dekat dengan *M. quadrifida*. Sesuai dengan hasil BLAST yang memiliki presentase identifikasi kesamaan sekuen mencapai

96% pada *M. quadrifida*. menurut Sofro (1994) Hubungan kekerabatan yang tinggi terjadi karena faktor keadaan lingkungan, seperti iklim.

Berdasarkan nilai bootstrap (Gambar 4.4) memiliki nilai bootstrap yang variatif. Pada *M. pedicellata* dengan *M. quadrifida* memiliki nilai bootstrap sebesar 83%. Hal tersebut dapat dinyatakan bahwa kekerabatan *M. pedicellata* dengan *M. quadrifida* dapat diandalkan. Sesuai dalam pernyataan pangestika *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa kekerabatan dalam suatu spesies dapat di percaya jika memiliki nilai *bootstrap* dengan rentan nilai 90%, dan tidak dipercaya dengan nilai *bootstrap* 25%. Menurut Kress *et al.* (2002) juga menyatakan bahwa nilai bootstrap di kategorikan menjadi beberapa kategori diantaranya kuat sebesar (>85%), sedang sebesar (70-85%), lemah sebesar (50-69%), dan buruk (<50%). Nilai *bootstrap* tertinggi dalam penelitian ini yaitu 100% yang dimiliki oleh *M. camptosperma* dengan *M. odorata*. *Bootstrap* merupakan pengujian kestabilan pada pohon filogenetik yang disusun. Semakin tinggi nilai *bootstrap* yang didapat maka pengelompokan dalam spesies akan semakin stabil.

Dalam hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa sekuen ITS mampu mengidentifikasi pada tingkat *interspecies* dan *intraspecies*. Hal ini sesuai dalam pernyataan Yip *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa sekuen ITS dapat dimanfaatkan untuk identifikasi pada tingkat genus dan spesies. Secara *interspecies* sekuen ITS mampu memisahkan *B. macrophylla* dengan spesies lain dari genus *Mangifera*. Pemilihan *outgroup* dipilih dari spesies *B. macrophylla*. Menurut Fitmawati *et al.* (2013) menyatakan bahwa *B. macrophylla* mempunyai panjang yang hampir sama antara ITS 1 dan ITS 2 dengan spesies *Mangifera*, yakni masing-masing 264 bp dan 225 bp.

Outgroup merupakan suatu jenis taksa yang berkerabat dekat dengan sekuen yang di analisa namun terdapat perbedaan signifikan antara sekuen yang di analisa, karena pemilihan *outgroup* yang terlalu jauh dapat memungkinkan pohon menjadi salah akibat perbedaan yang lebih banyak antara *outgroup* dengan sekuen lainnya (Campbell *et al.*, 2003). *Outgroup* ditambahkan pada hasil akhir yang sudah diketahui hubungannya yang jauh dengan sampel agar mendapatkan hasil yang maksimal (Swofford *et al.*, 1996). Penggunaan *outgroup* penting digunakan dalam analisis filogenetik karena untuk menentukan posisi akar pohon (Rahayu dan Jannah, 2019).

Pada penelitian ini dilakukan perhitungan jarak genetik antara *M. pedicellata* dari Kebun Raya Bogor yang dianalisis dengan sekuen ITS. Jarak genetik dilakukan untuk mengetahui perhitungan kemiripan genetik pada *M. pedicellata* dengan spesies lain menggunakan *software* MEGA 11 Menurut Nei (1987) jarak genetik merupakan suatu tingkat perbedaan gen pada populasi atau spesies yang diukur melalui kuantitas numerik. Nilai jarak genetik sekuen *M. pedicellata* dengan sekuen hasil dari BLAST tertera pada Lampiran 4. Hasilnya menunjukkan bahwa sekuen *M. pedicellata* dengan *M. quadrifida* mempunyai jarak genetik terendah yakni sebesar 0.035. Sedangkan sekuen tertinggi pada *M. pedicellata* dengan *M. camptosperma* yang mempunyai nilai sebesar 1,218. Hal tersebut sesuai dalam penelitian Elfianis *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa nilai 0 mempunyai hubungan kekerabatan yang sangat dekat. Semakin besar nilainya maka semakin jauh kekerabatannya. Menurut El Gendy *et al.* (2005) menyatakan bahwa hubungan kekerabatan yang dekat karena adanya komposisi genetik yang spesifik dengan lingkungan.

E. Komposisi Sekuen Nukleotid *Mangifera pedicellata*

Komposisi sekuen nukleotid terdiri dari adenin (A), guanin (G), timin/urasil (T/U), sitosin (C). Komposisi nukleotid berperan penting dalam analisis genetik untuk mengetahui tingkat kemiripan antar spesies berdasarkan laju mutasi dan evolusi. Komposisi nukleotid pada *M. pedicellata* mempunyai nilai yang berbeda-beda (Tabel 4.2).

Tabel 4.3 Komposisi Nukleotid Sekuen ITS

Spesies	Komposisi Nukleotid %				Total
	T(U)	C	A	G	
<i>M. camptosperma</i> (MF444900.1)	22,3	31,7	16,2	29,6	640
<i>M. indica</i> (MF444902.1)	22,3	31,9	16,3	29,3	641
<i>M. griffithi</i> (MF444899.1)	21,4	31,7	17,1	29,6	640
<i>M. indica</i> (KJ833761.1)	22,5	31,4	16,7	29,2	639
<i>M. camptosperma</i> (AB598043.1)	15,8	30,0	22,4	31,6	625
<i>M. indica</i> (KJ833764.1)	22,2	31,6	16,3	29,7	638
<i>M. indica</i> (KJ833765.1)	22,1	32,1	16,3	29,3	641
<i>M. indica</i> (KJ833760.1)	21,8	32,2	16,3	29,5	636
<i>M. indica</i> (KJ833762.1)	22,4	31,9	17,1	28,3	641
<i>M. indica</i> (KJ833758.1)	22,1	32,0	16,5	29,2	636
<i>M. odorata</i> (AB598044.1)	16,3	29,6	22,7	31,3	625
<i>M. indica</i> (LN552225.1)	22,5	31,7	16,7	28,9	639
<i>M. indica</i> (AB598049.1)	22,1	32,1	16,3	29,3	641
<i>M. quadrifida</i> (KX347959.1)	20,4	33,1	16,7	29,6	640
<i>M. indica</i> (AB598050.1)	22,5	31,5	16,7	29,2	640
<i>M. indica</i> (AB598047.1)	22,6	31,5	16,5	29,2	640
<i>M. indica</i> (KJ833759.1)	22,1	32,1	16,4	29,2	640

<i>M. indica</i> (OL960664.1)	22,9	32,0	16,5	29,4	639
<i>M. indica</i> (KJ833763.1)	22,7	31,3	16,6	29,2	639
<i>M. pedicellata</i>	20,4	32,9	16,2	30,3	640
<i>Bouea macrophylla</i>	31,0	13,7	36,6	18,4	638

Pada Tabel 4.3 di atas menunjukkan komposisi sekuen nukleotid dari beberapa spesies. Komposisi nukleotid pada *M. pedicellata* yaitu T(U): 20,4%, C: 32,9%, A: 16,2%, G: 30,3%. Jika dilihat dari hasil BLAST nilai similiritas tertinggi pada *M. pedicellata* yaitu pada *M. quadrifida*. Dalam hasil komposisi nukleotid ini *M. quadrifida* memiliki nilai T(U): 20,4%, C: 33,1%, A: 16,7%, G: 29,6%. Berdasarkan data tersebut dapat dinyatakan bahwa komposisi sekuen nukleotid pada *M. pedicellata* dengan *M. quadrifida* mempunyai komposisi nukleotid hampir sama dibandingkan dengan spesies *Mangifera* lain yang memiliki perbedaan komposisi nukleotid dengan *M. pedicellata*.

Komposisi nukleotid pada sekuen memiliki presentase nilai yang berbeda-beda, tergantung pada primer yang digunakan. Perbedaan komposisi nukleotid menunjukkan adanya variasi genetik di setiap spesies. Komposisi nukleotid penelitian ini memiliki basa sitosin (C) dan basa guanin (G) dengan nilai presentase lebih tinggi dibandingkan dengan basa adenin (A) dan timin (T). Komposisi nukleotid memiliki karakteristik basa yang berbeda antara barkode DNA dari gen inti dan gen kloroplas. Pada gen inti umumnya mengandung basa sitosin (C) yang lebih tinggi, sedangkan pada genom kloroplas mengandung basa adenin (A) dan timin (T) yang lebih tinggi. Sesuai dalam pernyataan Herman (2024) yang menyatakan bahwa sekuen ITS memiliki basa sitosin (C) dan guanin (G) yang lebih tinggi di bandingkan dengan timin (T), dan

adenin (A). menurut Magandhi (2020) juga menyatakan bahwa komposisi nukleotid sekuen ITS memiliki basa sitosin (C) dan guanin (G) yang lebih tinggi dibandingkan dengan basa adenin (A) dan timini (T) gen yang mengandung basa sitosin (C) dan guanin (G) lebih banyak menunjukkan laju mutasi yang tinggi (Niu *et al.*, 2017).