

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Endofit

Bakteri adalah kelompok organisme mikroskopis yang pada umumnya bersel tunggal, dan tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini sering kali tidak memiliki klorofil tetapi memiliki dinding sel. Bakteri sangat penting bagi kehidupan sehari-hari meskipun ukurannya kecil, dan beberapa jenis tertentu bahkan dikenal baik untuk kehidupan. Bakteri dapat diklasifikasi berdasarkan bentuknya, cara memperoleh makanan, pewarnaan gram, berdasarkan kebutuhan oksigen, berdasarkan dinding selnya dan berdasarkan tempat hidup bakterinya (Febriza *et al.*, 2021)

Endofit merupakan bakteri yang terdapat pada jaringan tanaman sehat dan tidak menimbulkan gejala penyakit atau merugikan tanaman inangnya. Bakteri endofit dapat diisolasi menggunakan teknik sterilisasi permukaan dan diekstraksi ke dalam media pertumbuhan bakteri. Mikroorganisme endofit diketahui menghasilkan senyawa aktif yang dapat berperan sebagai senyawa antimikroba. Penggunaan endofit sebagai agen hayati mempunyai implikasi terhadap penggunaan endofit sebagai agen biologis, karena endofit telah terbentuk dan bertahan di dalam jaringan selama perkembangan tanaman untuk melindungi tanaman (Magharaniq *et al.*, 2014).



Gambar 2. 1 Bakteri Endofit

Bakteri endofit awalnya berasal dari lingkungan eksternal dan masuk kedalam tanaman melalui stomata, lentisel, luka (seperti adanya trichomes yang rusak), melalui akar lateral dan akar yang berkecambah (Suriaman Nim, 2010). Mikroorganisme endofit mempunyai efek menguntungkan dan positif terhadap tanaman inang, seperti agen antimikroba, hormon pertumbuhan, fiksasi nitrogen, transfer fosfat, produksi siderofor, induksi SAR dan ISR, serta peningkatan toleransi terhadap cekaman lingkungan (Hanif *et al.*, 2017).

Bakteri endofit dapat diidentifikasi secara molekuler atau konvensional (mikrobiologis). Identifikasi secara konvensional dibutuhkan pemahaman mengenai ciri-ciri morfologi dan biokimia bakteri. Marker universal yang diperlukan untuk identifikasi molekuler Gen 16S rRNA bakteri endofit. Marker ini sering digunakan untuk mengidentifikasi taksonomi spesies bakteri yang belum teridentifikasi (Linelaian *et al.*, 2018).

Produk potensial yang dapat dihasilkan oleh bakteri endofit tertentu diantaranya:

- a. Dalam media cair buatan, bakteri endofit *Bacillus polymixa* yang diisolasi dari tanaman Anuma (*Artemisia annua*) dapat mensintesis komponen kimiawi antimalaria artemisinin.
- b. Asam p-aminoacetophenonic diproduksi oleh *Streptomyces griseus* dari tanaman *Kandelia candel* sebagai antimikroba.
- c. *Streptomyces NRRL 30562* dari tanaman *Kennedia nigriscans* menghasilkan munumbicin (antibiotik) dan munumbicin D (antimalaria).
- d. Oocydin A dihasilkan oleh *Serratia marcescens* sebagai antijamur berasal dari tanaman *Rhyncholacis penicillata*.
- e. Fusaricidin A-D diproduksi oleh *Paenibacillus polymyx* dari tanaman gandum sebagai antijamur (Desriani *et al.*, 2014)
- f. *Bacillus cereus* dapat menghasilkan antibiotik yang memiliki aktivitas antibakteri yang baik. Isolat *Bacillus cereus* dari sedimen pantai Mentigi telah menunjukkan potensi antibiotik yang cukup bagus (Indrawati *et al.*, 2018).

2.2 Rimpang Kunyit

Curcuma domestica Val atau kunyit adalah tanaman yang digunakan dalam pengobatan herbal. Masyarakat sudah tidak asing lagi dengan tanaman ini karena harganya yang murah dan mudah didapat. Budaya secara tradisional menggunakan kunyit sebagai ramuan terapeutik. Senyawa utama yang terkandung dalam rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) yaitu kurkumin dan minyak atsiri, antibakteri, antitumor, antikanker, antioksidan, antiseptik, dan anti-inflamasi. Terapi herbal menggunakan kunyit sering digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit (Carolia *et al.*, 2019).

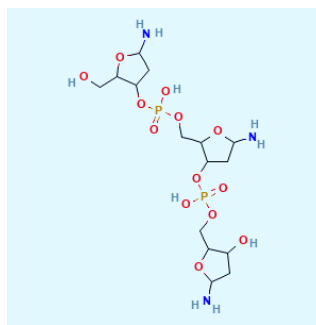


Gambar 2. 2 Rimpang Kunyit

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub-divisio	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Ordo	: Zingiberales
Family	: Zingiberaceae
Genus	: Curcuma
Spesies	: <i>Curcuma longa</i> Linn (Anggun, 2020).

2.3 Isolasi DNA

Deoxyribonucleic acid (DNA), juga dikenal sebagai asam deoksiribonukleat, adalah makromolekul yang sangat penting bagi semua makhluk hidup. Semua informasi biologis yang membedakan setiap organisme hidup dan beberapa virus disimpan dalam DNA atau disebut juga sebagai asam nukleat. *Deoxyribonucleic acid* memiliki struktur kimia makromolekul kompleks yang terdiri dari tiga molekul yaitu gula pentosa, asam fosfat dan basa nitrogen (Aisah *et al.*, 2017).



Gambar 2. 3 Struktur Kimia *Deoxyribonucleic acid*

Isolasi DNA merupakan proses mengekstraksi atau melisiskan DNA dari sel. Dalam proses isolasi, homogenisasi dan penambahan *buffer* lisis atau ekstraksi dilakukan untuk menghindari kerusakan DNA. Isolasi DNA dilakukan untuk mendapatkan DNA murni bebas dari sel kontaminan lain seperti molekul protein, fenol, lipid, karbohidrat, dan RNA (Setiawan *et al.*, 2021).

Isolasi DNA dapat dilakukan dengan metode konvensional maupun menggunakan kit. Secara konvensional isolasi DNA dilakukan dengan beberapa cara antara lain, metode CTAB/NaCl, metode SDS dan metode fenol kloroform. Seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, kit dari berbagai produsen dapat digunakan untuk mengekstrak DNA (Fitriya *et al.*, 2015).

Ada perbedaan antara metode isolasi DNA menggunakan kit dan metode konvensional antara lain, metode konvensional/manual memerlukan persiapan alat dan bahan yang relatif rumit dan lama, sedangkan kit menggunakan senyawa kimia dan protokol yang sudah diterapkan secara standar. Kebutuhan alat dan bahan yang

lebih sedikit dan proses yang lebih sederhana dan efektif membuat kit lebih populer untuk isolasi DNA (Octavia *et al.*, 2021).

Isolasi DNA dilakukan dalam 5 tahapan yaitu:

1) Isolasi atau pemanenan sel

Dengan menggunakan sentrifugasi, langkah pemanenan sel selesai. Prinsip dasar sentrifugasi adalah menggunakan gaya sentrifugal untuk memisahkan zat menurut berat molekulnya, dengan zat yang lebih cair (supernatan) di bagian atas dan zat yang lebih kental (pelet) di bagian bawah. Sisa protein dan komponen lipopolisakarida dari dinding sel bakteri terdapat pada supernatan, sedangkan pelet yang dihasilkan adalah jaringan sel yang telah mengendap. DNA yang dihasilkan dalam proses ini biasa disebut sebagai DNA templat.

2) Penghancuran sel (lisis sel)

Salah satu langkah penting yang memengaruhi hasil isolasi DNA adalah proses lisis atau penghancuran sel. Untuk mengekstraksi dan memurnikan DNA, lisis sel dilakukan untuk melepaskan DNA dari dinding dan membran sel. Pada tahap lisis, ada dua metode utama yang dapat digunakan yaitu secara kimiawi dan fisik. Faktor mekanisme seperti *freeze thaw*, *bead mill* *homogenization* dan resonansi seperti sonikasi secara fisik memecah sel. Sedangkan secara kimia sel dirusak dengan buffer lisis yang mengandung bahan kimia seperti SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dan CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) yang dapat melemahkan integritas penghalang dinding sel.

3) Penghilangan protein dan RNA (ekstraksi)

Tahap ini dilakukan dengan menggunakan enzim proteinase K dan larutan alkohol absolut untuk memisahkan DNA dari zat pengotor seperti protein dan RNA.

4) Pemurnian (purifikasi) DNA

Pemurnian DNA adalah proses yang dilakukan untuk menghilangkan residu dari zat yang digunakan pada tahap lisis dan pemisahan DNA.

5) Pengendapan (presipitasi)

Presipitasi, nama lain dari pengendapan DNA, adalah langkah penting dalam isolasi DNA yang bertujuan untuk membersihkan kontaminan dan meningkatkan kualitas DNA. Berikut adalah beberapa metode dan langkah untuk presipitasi DNA:

a. Pengendapan dengan etanol dingin:

Untuk mengendapkan DNA dan menghilangkan kontaminan seperti protein dan RNA, teknik ini memerlukan penambahan etanol dingin ke dalam larutan DNA. Untuk memisahkan DNA murni, etanol dingin membantu mengikat dan mengendapkan molekul DNA.

b. Pengendapan dengan Polietilen Glikol (PEG) dan NaCl:

Teknik ini digunakan untuk memisahkan DNA dari virus atau bakteriofag. Partikel fag diendapkan dan kontaminan lainnya dihilangkan dengan menggunakan PEG dan NaCl. Pengendapan ini menghasilkan DNA yang lebih murni.

c. Pengendapan dengan Garam:

Untuk mengendapkan DNA dan menghilangkan kontaminan, teknik ini memerlukan penambahan garam ke dalam larutan DNA, seperti natrium asetat atau natrium klorida. Untuk memisahkan DNA murni, garam membantu mengikat dan mengendapkan molekul DNA.

d. Pengendapan dengan Densitas Gradien Sentrifugasi:

Teknik ini termasuk menghilangkan kontaminan seperti protein dan RNA dari DNA dengan mengendapkannya menggunakan sentrifugasi gradien densitas dengan CsCl. Untuk mengisolasi DNA murni, protein dan RNA akan menyebabkan DNA terpecah menjadi pita-pita yang berbeda.

2.4 Gen

Sebagai unit dasar biologi, gen merupakan materi genetik yang diperlukan untuk mensintesis protein. *Deoxyribonucleic Acid* atau DNA, membentuk gen dan mengandung kode genetik yang diperlukan untuk mensintesis protein. Materi genetik yang diperlukan untuk sintesis protein terkandung dalam gen, yang dapat berupa DNA atau RNA (*Ribonucleic Acid*). *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) adalah

makromolekul yang terdiri dari untaian panjang yang terdiri dari banyak *deoksiribonukleotida*, yang masing-masing terdiri dari basa, gula, dan gugus fosfat (Rosana, 2019).

Lebih dari 20.000 gen terdapat dalam DNA seseorang; setiap gen bersifat spesifik dan dapat ditemukan dalam kromosom atau DNA mitokondria. Genom terdiri dari DNA pengkode dan DNA non-kode. Kromosom terdiri dari dua rantai DNA yang berjalan berlawanan arah satu sama lain, dengan basa-basa yang berpasangan membentuk anak tangga yang dipilin membentuk heliks ganda (Khalifah Mustami *et al.*, 2021).

Setiap gen berada pada lokus yang berbeda, lokus yang merupakan tempat gen dalam struktur kromosom. Selama ini kromosom dikenal memiliki bentuk yang linier. Kelompok organisme hidup memiliki jenis kromosom yang berbeda. Kromosom prokariotik merupakan jenis DNA untai ganda yang berbentuk sirkular atau cincin. Kromosom eukariotik berbentuk batang atau linier dan seperti pada kelompok prokariotik, kromosom dalam organel mitokondria dan kloroplas memiliki bentuk sirkuler atau cincin. Bentuk kromosom yang beragam berdasarkan letak sentromernya; ada yang berbentuk metasentris, submetasentris, akrosentris, dan telosentris (Effendi, 2020).

DNA terdiri atas tiga macam molekul, yaitu gula pentosa (*deoksiribosa*), asam pospat, basa nitrogen yang dibedakan atas pirimidin yang terdiri atas *cytosine* (C) dan *thymine* (T) serta purin yang terdiri atas *adenine* (A) dan *guanine* (G). Selain DNA, asam ribonukleat (RNA) adalah asam nukleat penting lainnya yang ada pada gen. Sama seperti DNA, RNA terdiri dari tiga jenis molekul yang berbeda: basa nitrogen, asam pospat, dan gula pentosa. Basa pirimidin adalah salah satu ciri khas DNA dan RNA yang membedakannya antara satu sama lain. Basa pirimidin dalam RNA adalah sitosin dan urasil (U), sedangkan basa pirimidin dalam DNA adalah sitosin dan timin (Aisah *et al.*, 2017).

2.5 Identifikasi 16S rRNA

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan gen 16S rRNA. Pengujian sekuens mutasi gen 16S rRNA dapat digunakan untuk mengetahui keragaman genetik komunitas mikroba dan hubungan filogenetik antar mikroorganisme. Gen 16S rRNA (16S *ribosomal Ribonucleic acid*/Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S, S menyatakan singkatan dari *Svedberg*, yaitu satuan ukuran ribosom) (Utami, 2017)

Gen 16S rRNA ini merupakan bagian dari prokariot yang memiliki bagian yang bersifat “lestari” (*conserved*). Struktur yang lestari ini membuat gen 16S rRNA dapat digunakan dalam PCR dan analisis sekuens. Gen 16S rRNA memiliki ukuran sekitar 1550 pasang basa dan di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan *hypervariable region*, merupakan ciri khas yang membedakan setiap organisme. Daerah yang terkonservasi ini juga yang menyebabkan gen ini dapat digunakan sebagai primer universal yang digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) serta dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing (Sihombing *et al.*, 2018).

Gen 16S rRNA digunakan secara luas dalam berbagai bidang ilmu karena manfaatnya, terutama yang berkaitan dengan identifikasi. Gen 16S rRNA telah digunakan secara luas dalam berbagai jenis penelitian yaitu antara lain:

- 1) Bidang Medis: teknik 16S rRNA digunakan sebagai prosedur di bidang klinis untuk mendiagnosis penyakit. Tingginya biaya pemeriksaan telah mencegah penggunaan teknik 16S rRNA secara luas untuk diagnosis penyakit. Dalam hal mengidentifikasi sampel klinis yang berbeda dengan cepat dan akurat, metode ini dianggap sangat akurat karena spesifisitas dan sensitivitasnya yang tinggi.
- 2) Bidang Kelautan dan Perikanan: sejumlah penelitian yang memanfaatkan gen 16S rRNA telah dilakukan di bidang kelautan dan perikanan. Tujuan umum dari penelitian bidang ini adalah untuk menemukan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit dan membuat metabolit yang berguna dalam berbagai konteks.

- 3) Gen 16S rRNA memberikan keuntungan yang sebanding di bidang pertanian, terutama dalam bentuk identifikasi bakteri yang dapat menemukan bakteri yang dapat merusak tanaman dan mengurangi hasil panen. Selain itu, bakteri endofit dapat dikenali dan digunakan sebagai salah satu spesies penghasil metabolit sekunder yang bermanfaat.
- 4) Gen 16S rRNA adalah metode yang sangat berguna yang dapat digunakan di berbagai bidang, termasuk peternakan, untuk mendeteksi bakteri. Aplikasi gen 16S rRNA dalam peternakan berguna untuk membedakan antara bakteri yang sehat dan bakteri penyebab penyakit pada sapi (Akihary *et al.*, 2020).

2.6 Amplifikasi (PCR)

Dikenal juga sebagai reaksi berantai polimerase, atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik enzimatik untuk melipatgandakan (amplifikasi) urutan nukleotida tertentu secara *in vitro*. PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan dua primer oligonukleotida yang saling melengkapi dengan ujung 5' sekuen target pada kedua rantai. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (primer PCR) sehingga DNA polimerase dapat menyalin DNA template (Anggereini, 2008) .

Baru-baru ini *Real-Time* PCR adalah kemajuan terbaru dalam teknologi PCR yang semakin penting dalam diagnosis klinis dan penelitian di laboratorium karena kemampuannya dapat menghasilkan data kuantitatif. Tidak seperti PCR konvensional, yang hanya menampilkan data kualitatif, metode ini memungkinkan reaksi dan hasil reaksi ditampilkan dengan lebih cepat dan akurat. Jenis-jenis PCR antara lain: PCR Konvensional, *Restriction Fragment, Length Polymorphism* (RFLP), *Inverse-PCR*, *Nested-PCR*, *Quantitative-PCR* (qPCR), *Reverse Transcription-PCR* (RT-PCR), *Real-time PCR* (Agne *et al.*, 2009).

Menurut (Jannah, 2023) Metode PCR sangat sensitif dan kualitas hasil sangat bergantung pada ketepatan suhu, komponen yang digunakan dan lama waktu pada setiap tahapan siklus PCR. Beberapa komponen dibutuhkan dalam proses ini antara lain yaitu cetakan DNA, sepasang primer oligonukleotida spesifik, enzim DNA

polimerase yang termostabil, nukleotida (dNTP), *buffer* PCR dan ion Mg^{2+} .

Proses penggandaan DNA dengan teknik PCR terjadi melalui puluhan siklus berulang yang meliputi 3 tahapan, yaitu:

1) Denaturasi

Proses mengubah DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal disebut denaturasi DNA. Untuk menjamin bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal, proses ini biasanya membutuhkan waktu tiga menit. Proses PCR gagal karena denaturasi yang tidak sempurna menyebabkan DNA dengan cepat mengalami renaturasi (membuat DNA untai ganda lagi). Masa denaturasi yang terlalu lama dapat menyebabkan enzim Taq polimerase menjadi kurang aktif. Aktivitas enzim memiliki waktu paruh masing-masing lebih dari 2 jam, 40 menit, dan 5 menit. Pada suhu masing-masing yaitu 92,5°C, 95°C, dan 97,5°C.

2) Penempelan primer (*Annealing*)

Primer yang baik biasanya harus memenuhi tiga persyaratan: panjangnya harus sama (18-25 basa), mengandung 50-60% G+C, dan kedua primer harus identik. Selain itu, urutan DNA masing-masing primer tidak boleh saling berkomplemen karena hal itu akan menyebabkan primer membentuk struktur sekunder, yang akan menurunkan efektivitas PCR. Biasanya, PCR menggunakan masa annealing 30 hingga 45 detik. Dengan semakin panjang ukuran primer maka semakin tinggi suhunya. Sementara suhu rata-rata penempelan antara 50°C dan 60°C.

3) Pemanjangan Primer (*Extension*)

Pada fase ini, Taq polimerase mulai memperpanjang ujung 3' dari DNA utama. Diperkirakan bahwa enzim ini dapat menyusun nukleotida dengan kecepatan 35 hingga 100 nukleotida per detik pada suhu 72°C, tergantung pada molekul DNA target, buffer, pH, dan konsentrasi garam. Oleh karena itu, waktu 1 menit seharusnya lebih dari cukup untuk fase pemanjangan primer pada produk PCR yang terdiri dari 2000 pasang basa atau lebih. Langkah ini biasanya diberikan

tambahan waktu 5 menit di akhir siklus PCR untuk memastikan bahwa semua produk PCR menjadi DNA untai ganda (Jannah, 2023).

2.7 Sequencing

Metode atau proses untuk memastikan urutan basa nukleotida dari suatu bagian molekul DNA dikenal sebagai sekuensing DNA. Urutan ini disebut sebagai sekuens DNA karena mencakup instruksi yang diperlukan untuk produksi tubuh makhluk hidup. Ini adalah bagian paling mendasar dari gen atau genom. Kode genetik molekul DNA dapat ditemukan melalui pengurutan asam nukleat. Dengan membandingkan urutan gen atau fragmen DNA dengan urutan DNA lain yang telah diketahui, sekuensing DNA kemudian dapat digunakan untuk mengidentifikasi gen atau fragmen DNA dan menentukan fungsinya (Lokapirnasari *et al.*, 2017a).

Menurut (Tasma *et al.*, 2015) berikut adalah beberapa metode pengurutan DNA (sekuensing) yang umum digunakan:

- 1) Metode Sanger (juga dikenal sebagai *Sanger dideoxy sequencing*) adalah metode awal untuk pengurutan DNA generasi pertama. Primer tertentu diperlukan untuk reaksi pengurutan dalam pendekatan ini, yang menggunakan *DNA template*. Panjang sekuens yang dihasilkan adalah antara 1000 dan 1200 pasangan basa (bp), dengan panjang maksimum 2000 bp. Metode ini melibatkan pemotongan templat DNA dengan enzim restriksi, mengkloning potongan DNA ke vektor sekuensing, dan mengurutkan setiap fragmen DNA setiap klon secara terpisah.
- 2) *Next-generation sequencing* (NGS) adalah istilah untuk teknologi sekuensing generasi kedua. Di seluruh genom, templat DNA dibaca secara acak oleh teknologi NGS. Hal ini dilakukan dengan membuat segmen DNA pendek dan menggabungkannya dengan adaptor-segmen DNA pendek yang dibuat khusus untuk penggunaan ini-sehingga mesin NGS dapat membacanya secara acak ketika proses sintesis DNA sedang berlangsung (*sequencing by synthesis*). Saat ini, NGS menghasilkan sekuens DNA dengan panjang antara 50 dan 500 bp. Singkatnya sekuens yang dihasilkan oleh NGS mengharuskan dilakukannya

beberapa kali pengurutan setiap fragmen DNA agar sesuai dengan ukuran genom (*genome sequence coverage*).

Mengisolasi DNA dari kultur bakteri padat dan cair adalah langkah pertama dalam proses analisis sekuensing. Pada langkah amplifikasi PCR, DNA yang diekstraksi akan digunakan sebagai cetakan. Ukuran tertentu dari produk PCR digunakan sebagai cetakan selama tahap sekuensing. Sekuensing menggunakan primer yang sama dengan yang digunakan pada tahap PCR. Sekuensing memberikan hasil dengan ukuran yang bervariasi dibandingkan dengan PCR. Hal ini karena terminator dNTP berlabel pewarna atau deoksiribonuklease trifosfat (ddNTP) ditambahkan selama sekuensing. Sekuens konsensus adalah sekuens DNA yang dibuat oleh pensejajaran pembacaan primer *forward* dan *reverse*. Setelah itu, dengan menggunakan perangkat lunak tertentu, sekuens konsensus ini dibandingkan dengan data sekuens yang tersimpan di dalam database (Rinanda, 2011).

2.8 Identifikasi

2.8.1 Bioinformatika

Integrasi biologi, ilmu komputer, informatika, matematika, dan bidang lain yang relevan ke dalam satu bidang dikenal sebagai bioinformatika. Ada tiga kategori kumpulan data yang dianalisis dalam bioinformatika yaitu sekuens genom, struktur makromolekul, dan studi genomik fungsional. Bioinformatika menawarkan alternatif untuk menemukan rangkaian enzim baru menggunakan analisis filogenetik (kekerabatan), yang mencari spesies terdekat berdasarkan data genom dari *Gene Bank*. Situs web yang menyediakan fitur ini adalah *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yang secara online (Narita *et al.*, 2012).

Pengelolaan data biologi molekuler, khususnya sekuens DNA dan data genetik, merupakan aspek penting dalam bioinformatika. Software adalah instrumen utama yang digunakan dalam bioinformatika, dan hal ini dimungkinkan dengan adanya akses internet. Karena bioinformatika berhubungan dengan begitu banyak bidang ilmiah lainnya, bioinformatika memiliki potensi pertumbuhan yang sangat besar.

Berikut merupakan contoh-contoh penggunaan bioinformatika:

- 1) Bioinformatika dalam Bidang Klinis
- 2) Bioinformatika untuk Identifikasi Agent Penyakit Baru
- 3) Bioinformatika untuk Diagnosa Penyakit Baru
- 4) Bioinformatika untuk Penemuan Obat (Amiroch *et al.*, 2018)

2.8.2 Pohon Filogenetik

Tujuan dari analisis filogenetik adalah untuk mengumpulkan hubungan filogenetik, yang biasanya direpresentasikan berupa garis yang bercabang-cabang seperti pohon dan dikenal sebagai pohon filogenetik. Pohon filogenetik adalah cara untuk menggambarkan garis keturunan organisme yang bercabang-cabang seperti pohon, termasuk tanaman dan hewan. Informasi molekuler, seperti DNA atau protein, dapat digunakan dalam analisis filogenetik untuk menggambarkan hubungan evolusi antar spesies (Subari *et al.*, 2021).

Pohon filogenetik dapat dibangun dengan berbagai metode. Berikut adalah metode-metode pembuatan pohon filogenetik:

- 1) Metode berdasarkan jarak (seperti *Neighbor Joining*). Hal ini dapat dilakukan dengan menentukan matriks jarak antar sekuen menggunakan setiap hasil pensejajaran. Pohon filogenetik yang serupa dapat dihasilkan dengan menggunakan matriks jarak. Teknik yang paling banyak digunakan adalah *Neighbor Joining* dan UPGMA. Perbedaan utama antara UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) dan metode *clustering* adalah rumus yang digunakan untuk menentukan jarak kelas, yaitu bagaimana pohon filogenetik dibangun. Jarak *cluster* baru ke semua cluster yang ada harus ditentukan sebagai rata-rata bobot dari jarak komponen-komponennya jika jumlah sekuen dalam dua kelas berbeda.
- 2) Metode berdasarkan fitur (seperti metode *Maximum Parsimony*). Pendekatan semacam ini membangun pohon filogenetik dengan menggunakan fitur (karakteristik) dari hasil pensejajaran.

- 3) Teknik berdasarkan probabilitas (seperti metode Bayes dan *Maximum Likelihood*). Membangun model probabilitas untuk mutasi sekuen merupakan langkah pertama dalam membuat pohon filogenetik menggunakan metode ini. Pohon filogenetik kemudian dibuat dengan menggunakan output dan model probabilitas (Amiroch et *al.*, 2018).