

HUBUNGAN FILOGENETIK SPESIES *LIMNONECTES* (RANIDAE: AMPHIBIA) ASAL SUMATERA BARAT DAN ASAL ASIA TENGGARA BERDASARKAN GEN 16S RIBOSOMAL RNA

Djong Hon Tjong^{1*)}, Djoko T. Iskandar², dan David Gusman¹

1. Lab. Genetika dan Sitologi, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Andalas, Padang 25161, Indonesia
2. Jurusan Biologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB, Bandung 40132, Indonesia

^{*)}E-mail: tjong20@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk melihat hubungan filogenetik beberapa spesies *Limnonectes* yang ditemukan di Sumatera Barat dengan beberapa daerah lainnya di Asia Tenggara berdasarkan urutan DNA gen 16S rRNA. Sekuen DNA dialignment dengan program ClustalX version 1.64b, dan hubungan kekerabatannya dengan daerah lain dianalisis dengan menggunakan program PHYLIP version 3.5c. Hasil alignment memperlihatkan dari 805 site terdapat 250 parsimony informative polymorphism sites. Pohon filogenetik memperlihatkan bahwa spesies *Limnonectes* dapat dikelompokkan menjadi 2 kluster *L. kuhlii* complex dan *L. blythii* complex. *L. kuhlii* dan *L. sp1* masuk pada kluster *L. kuhlii* kompleks sedangkan, *L. shomponerum* dan *L. macrodon* masuk pada kluster *L. blythii* complex. Hasil ini memperlihatkan bahwa *L. kuhlii* dan *L. blythii* merupakan spesies kompleks yang sebenarnya terdiri dari beberapa spesies.

Abstract

Phylogentic Relationship among *Limnonectes* (Ranidae: Amphibia) found in West Sumatra with Other Species from South East Asia based on the based on the 16S rRNA Gen. The objective of this research was to study the phylogenetic relationship among *Limnonectes* species found in West Sumatra and with other species from South East Asia based on the partial DNA sequences 16S rRNA sequences. DNA sequences were aligned using ClustalX version 1.64b, and the phylogenetic relationship within samples were analyzed using PHYLIP version 3.5c program. The alignment showed that, from 805 sites, there are 250 parsimony informative polymorphism sites. The phylogenetic tree showed that all of the *Limnonectes* species were divided in two clusters, the *L. blythii* complex and *L. kuhlii* complex. *L. kuhlii* and *L. sp1* clustered into *L. kuhlii* complex and *L. shomponerum* and *L. macrodon* were clustered to *L. blythii* complex. This result showed that *L. kuhlii* and *L. blythii* are species complexes that are actually constituted of several species.

Keywords: 16S rRNA, Limnonectes, West Sumatra

1. Pendahuluan

Genus *Limnonectes* merupakan salah satu genus dari famili Ranidae yang hanya terdapat di Asia Selatan dan Asia Tenggara. Hewan jantan dewasa genus ini mempunyai beberapa ciri khas antara lain mempunyai gigi taring pada rahang bawah, tidak mempunyai kantong suara dan ukurannya lebih besar dari hewan betina. Kebanyakan spesies mempunyai persamaan fenotip yang besar sehingga terdapat kesulitan dalam penentuan spesies [1].

Penentuan spesies dapat dilakukan dengan mempelajari hubungan filogenetik di antara spesies tersebut baik

secara morfologi maupun molekuler. Penelitian mengenai hubungan filogenetik di antara spesies *Limnonectes* berdasarkan data morfologi telah dilakukan oleh Emerson dan Berrigan [1] yang memperlihatkan hasil bahwa kelompok katak tersebut merupakan kelompok monofiletik dan sedikitnya ada dua kelompok dalam pohon filogenetiknya. Kemudian secara molekuler telah dilakukan oleh Emerson [2] dengan menggunakan data sekuen DNA mitokondria ribosomal memperlihatkan adanya batasan dan hubungan di antara 18 taksa dalam satu kelompok besar spesies. Penelitian selanjutnya dengan menggunakan jumlah spesies yang lebih besar dan geografi yang lebih luas di Asia Tenggara telah dilakukan oleh Emerson,

Inger, dan Iskandar [3] didasarkan pada sekuen DNA gen 12S dan 16S ribosomal DNA. Hasilnya memperlihatkan bahwa 39 populasi *Limnonectes* dapat dikelompokkan menjadi 4 kelompok besar, yaitu kelompok *L. kuhlii* dan kerabatnya, kelompok *L. leporinus* yang terdapat di Kalimantan, kelompok yang tersebar di Filipina dan Sulawesi dan kelompok *L. blythii* dan kerabatnya. Hasil penelitian tersebut juga memperlihatkan adanya hubungan filogenetik yang berbeda antara beberapa spesies yang sama pada daerah geografi yang berbeda terutama spesies *L. kuhlii* dan *L. blythii*.

Hubungan filogenetik spesies *Limnonectes* yang terdapat di Asia Tenggara sampai sekarang masih belum dipahami dengan baik. Banyak pertanyaan mengenai hubungan antara spesies dan anggota spesies pada daerah geografi yang berbeda belum terjawab. Untuk lebih memahaminya perlu penelitian lebih lanjut dengan menambah jumlah spesies dan populasi pada daerah-daerah lainnya di Asia Tenggara. Salah satunya adalah dari Sumatera, khususnya Sumatera Barat.

Sampai sekarang masih sedikit informasi mengenai hubungan filogenetik spesies *Limnonectes* yang terdapat di Sumatera. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai (Ranidae: Amphibia) asal Sumatera Barat dengan anggota lainnya di Asia Tenggara.

2. Metode Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan secara langsung di lapangan berdasarkan habitat dan ketinggian dari atas permukaan laut, yaitu Batang Kuranji, Padang, Harau di Lembah Harau, Kabupaten 50 Kota, Payakumbuh, Batang Tarusan di Desa Kayu Jao, Kabupaten Solok. Sampel yang didapatkan dari lapangan terdiri dari tiga spesies *Limnonectes*, yaitu *L. kuhlii*, *L. shompenorum*, *L. spl*, serta menggunakan satu spesies dari Jawa *L. macrodon*. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode (4) yang dimodifikasi. Sampel yang telah diawetkan dalam alkohol 96% dimasukkan dalam buffer lisis [100 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8), 10mM EDTA (pH 8), 0,5% SDS, 0,2 mg Proteinase sebanyak 500 µL dalam tabung eppendorf 1,5 mL sebanyak seperempat dari buffer lisis. Tabung tersebut kemudian dimasukkan ke dalam dalam *water bath* selama semalam pada suhu 55 °C. Keesokan harinya tabung tersebut disentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Supernatan yang terdapat pada bagian atas dipindahkan pada tabung eppendorf yang baru dengan menggunakan mikropipet. Sampel tersebut kemudian dimurnikan dengan menggunakan metode [5] dengan menambahkan 500 µL larutan kloroform:fenol:isoamil alkohol (25 : 24 : 1) dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali selanjutnya dimurnikan dengan larutan kloroform sebanyak 500 µL dan disentrifugasi dengan

kecepatan 13.000 rpm. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan pada tabung eppendorf baru dan dilanjutkan dengan presipitasi. Presipitasi DNA dilakukan dengan larutan dua pertiga bagian alkohol absolut dan 0,1 bagian Natrium asetat 3 M sebanyak 500 µL dan dimalamkan pada suhu -20 °C. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifugasi tersebut berupa DNA yang membentuk pellet putih kemudian dikeringkan dengan menggunakan pompa vakum selama 15-30 menit dan diresuspensi dengan TE (10mM Tris dan 1mM EDTA) sebanyak 100 µL. Selanjutnya isolat DNA ditentukan konsentrasinya dengan spektrometer.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan mesin PCR Perkin Elmer. Primer yang digunakan adalah, 16H1 3056: CTC CGG TCT GAA CTC AGA TCA CGT AGG untuk *reverse* dan 16L2 2579: AGT GAT TAC GCT ACC TTT GCA CGG TCAG untuk *forward* [3]. Komposisi zat PCR berdasarkan PCR *core system* dari Promega 25 mM MgCl₂, 10x buffer PCR, 200 mM campuran nukleotida, 0,5 µm *upstream* dan *downstream* primer, 1,25 unit *Taq* polimerase, 100 µg template DNA dalam deion 50 µl deion H₂O. Amplifikasi dilakukan dengan program suhu 94 °C satu menit, 58 °C satu menit dan 72 °C dua menit dengan jumlah siklus 35 kali dilakukan 35 kali. Hasil PCR selanjutnya dikloning pada *vector plasmid pGEM[®]-T Easy Vector System I* (Promega) dan ditranformasikan pada sel inang *E. coli* JM109 dengan metode *heat shock*. Bakteri kemudian ditanam dalam media TB selama 14-18 jam. Kemudian dilanjutkan dengan isolasi plasmid dengan metode [5]. Untuk membuktikan adanya DNA sisipan yang diinginkan dalam plasmid, dapat dilakukan dengan memotong DNA tersebut dengan enzim restriksi EcoRI. Sekuensing DNA dilakukan di lembaga Eijkman Jakarta.

Analisis urutan sekuen DNA untuk spesies *Limnonectes* lainnya dari Asia Tenggara diakses dari GenBank untuk *L. ingeri* (U55275), *L. malesiana* (U66129), *L. pileata* (AF183124), *L. macrodon* (U66133), *L. paramacrodon* (U55274), *L. laticeps* (AF183126), *L. blythii* strain Sumatera (U66131), *L. blythii* strain Thailand (U66127), *L. blythii* strain Vietnam (U66137), *L. blythii* strain Kuala Lumpur (U66135), *L. leporinus* strain Sabah (U55269), *L. leporinus* strain Kalimantan (U66115), *L. kuhlii* strain Jawa (AF183138), *L. kuhlii* strain Brunei (AF183134), *L. kuhlii* strain Taiwan (AF183132), *L. kuhlii* strain Sabah (AF183136), *L. kuhlii* strain Vietnam (AF206464), *Fejervarya limnocharis* (U55272), *F. cancrivora* (AF206473), dan *Occidozyga laevis* (U66139).

Pensejajaran data sekuen dilakukan dengan program Clustal X versi 1,64b. Kemudian, dilakukan beberapa pensejajaran dengan parameter *gap opening* dan *extension penalties* yang bervariasi. *Gap opening* yang digunakan dari 5 sampai 35 dengan skala 5 dengan

extention penalties 0,05, 2,5, 5, 6,67 (standar dari program) dan 8. Hasil pensejajaran tersebut kemudian dibandingkan dengan hasil pola motif *conserved* semua sekuen DNA yang dihasilkan dari software MAST <http://meme.sdsc.edu>. Hasilnya *gap opening* 20 dan *extension penalties* 6,66 yang mendekati pola motif *conserved*. Pensejajaran tersebut kemudian diedit sesuai dengan *motif conserved*.

Analisis pohon filogenetik dilakukan dengan satu paket program software Philip versi 3,5c [6]. Untuk mengevaluasi pohon filogenetik digunakan bootstrap 1000 kali untuk analisis pohon filogenetik *maximum parsimony* dan *distance tree* (*Neighbor joining*), sedangkan *maximum likelihood* 100 bootstrap. Pohon filogenetik dapat dilihat dengan menggunakan, program TreeView (win32) versi 1.5.2 dari Roderic.

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil penyejajaran dengan ClusltaX dari 26 data memperlihatkan jumlah site 805 dengan *gap alignment* 131, jumlah site tidak termasuk “*missing data*” dan “*gap alignment*” 674, *monomorphic site* 299, *polymorphic site* 375 dengan jumlah total mutasi 565, *polymorphic site* tunggal 125 dan *polymorphic site informative parsimony* 250 (Lampiran 1). Hasil analisis pohon filogenetik jarak genetik (*neighbor joining*) diperlihatkan pada Gambar 1. Angka yang terdapat di setiap cabang pohon memperlihatkan nilai bootstrap untuk analisis *neighbor joining*, *maximum parsimony* dan *maximum likelihood*.

Spesies *L. blythii* dengan kerabatnya mengelompok sendiri dengan nilai bootstrap 72/82/89% (Gambar 1). Demikian juga dengan *L. kuhlii* dan kerabatnya mengelompok sendiri dengan nilai bootstrap 61/71/50%. Pohon filogenetik tersebut juga memperlihatkan bahwa *L. blythii* kompleks dari Sumatera Barat yaitu *L. shomponerum* dan *L. blythii* dari Sumatera mengelompok dengan *L. macrodon* dari Jawa Barat dengan nilai bootstrap 100/100/100% yang terpisah dari *L. blythii* kompleks dari Asia Tenggara lainnya dengan nilai bootstraf 51/-/-%. *L. blythii* kompleks dari Kalimantan, yaitu *L. leporinus* membentuk cluster tersendiri yang terpisah dari *L. blythii* kompleks dari daerah lainnya dengan nilai bootstrap 72/82/89%.

L. kuhlii dari Padang, Sumatera Barat mengelompok dengan *L. kuhlii* dari Indonesia (Jawa) dengan bootsrap 55/95/60%, sedangkan *L. kuhlii* kompleks dari Solok, yaitu *L. sp1* terdiferensiasi dari *L. kuhlii* dari Padang, Sumatera Barat dan *L. kuhlii* dari Indonesia (Jawa) dengan bootsrap 75/-/-%. *L. kuhlii* dari Thailand dan Taiwan terpisah secara parafiletik dengan *L. kuhlii* dari Sumatera, Jawa dan Kalimantan. Hasil penelitian sebelumnya [3] juga memperlihatkan bahwa *L. kuhlii*

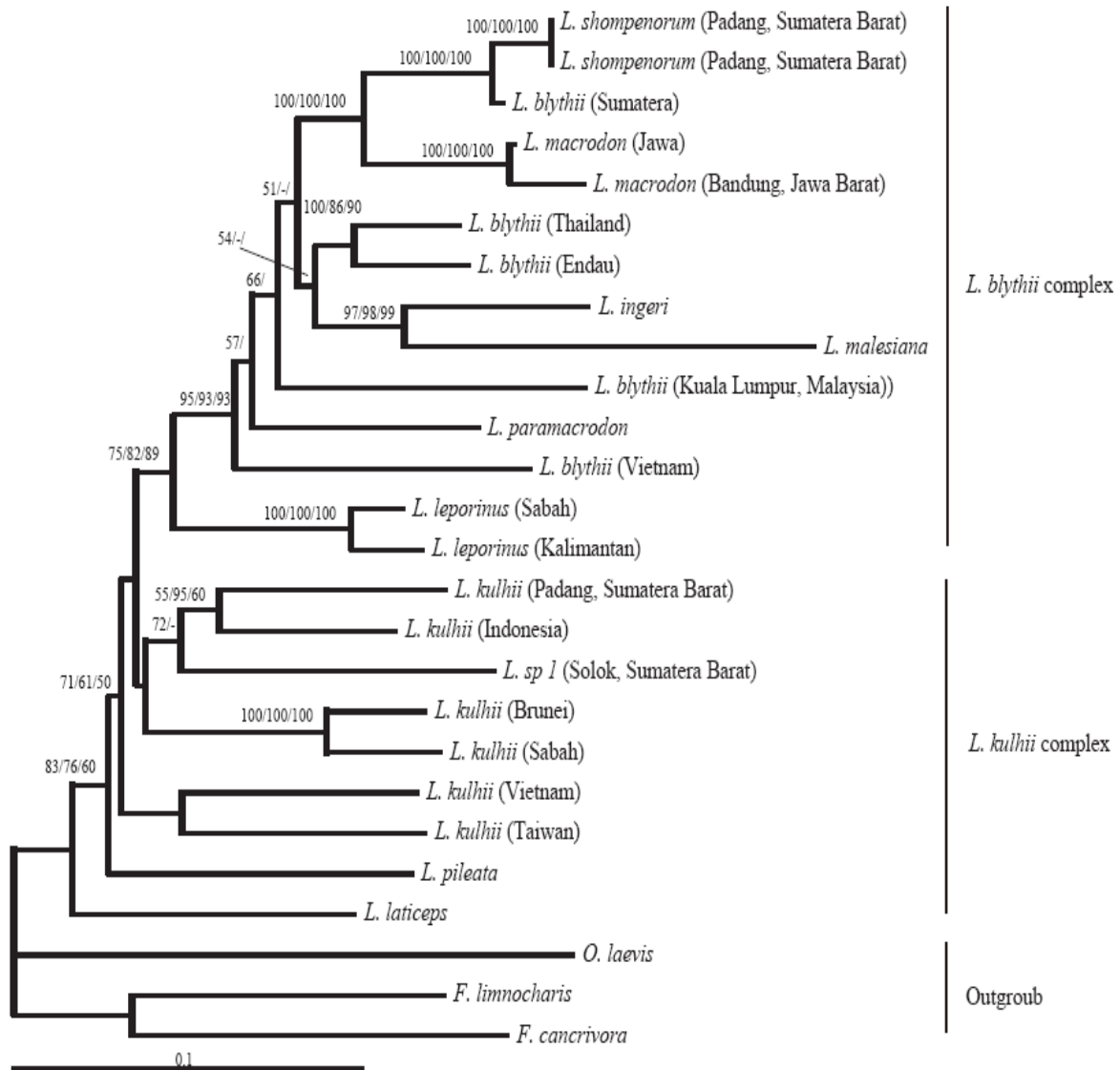
dari Jawa tidak mengelompok dengan *L. kuhlii* dari daerah lainnya. Perbedaan tersebut didukung oleh data kariotip untuk *L. kuhlii* Taiwan jumlah kromosom diploidnya 22 [7], Jawa jumlah kromosomnya [8] dan Sumatera jumlah kromosomnya [9], sedangkan dari Kalimantan belum ada.

Persebaran katak di Asia Tenggara dipengaruhi tingginya permukaan laut [10]. Berdasarkan sejarah geologi terbentuknya Asia Tenggara yang disimpulkan oleh [11], pada awal zaman tersier Eosen (50 juta tahun yang lalu). Indocina, Burma, Semenanjung Malaysia, Jawa, Sumatera, dan Kalimantan masih merupakan satu kontinental dari awal Eosen sampai akhir Oligosen (25 juta tahun lalu). Malaysia dan Kalimantan sampai hingga akhir Oligosen (50-25 juta tahun lalu). Pada zaman awal Miosen (20 juta tahun yang lalu) Sumatera dan Jawa dipisahkan oleh laut yang dangkal. Kemudian pada akhir Miosen (10 juta tahun yang lalu) Indocina, Burma, Semenanjung Malaysia, Kalimantan, Sumatera, dan Jawa bergabung kembali menjadi satu kontinen sampai zaman Pliosen (5 juta tahun yang lalu).

Berdasarkan sejarah perubahan permukaan air laut, terjadi penurunan permukaan air laut yang besar pada zaman Pleistosen atau glasial maksimum (250.000 tahun lalu) sehingga Semenanjung Malaysia, Kalimantan, Sumatera, dan Jawa bergabung kembali menjadi satu kontinen Dataran Sunda yang luas. Pada waktu tersebut terdapat dataran rendah yang luas dengan relief topografi yang besar dan juga sungai-sungai yang besar dan panjang yang mengalir ke arah Laut Cina Selatan dan Laut Jawa. Pemisahan Semenanjung Malaysia, Kalimantan, Sumatera, dan Jawa kembali terjadi dengan berakhirnya zaman glasial maksimum kira 10.000–17.000 tahun yang lalu.

Berdasarkan sejarah geologi dan sejarah perubahan tingginya permukaan air laut di Asia Tenggara, perpindahan katak antara Indocina, Burma, Semenanjung Malaysia, dan Kalimantan diperkirakan terjadi pada zaman Eosen sampai Pliosen, sedangkan perpindahan katak antara Sumatera, Jawa, Kalimantan, dan Semenanjung Malaysia diperkirakan dari zaman Eosen sampai akhir Oligosen kemudian terjadi perpindahan lagi pada akhir Miosen (10 juta tahun lalu) sampai zaman Pliosen. Perpindahan katak kemudian terjadi lagi pada zaman Pleistosen atau glasial maksimum (250.000 tahun lalu) dan berakhir kira-kira 10.000–17.000 tahun yang lalu.

Persebaran *Limnonectes* diperkirakan terjadi lebih awal sebelum zaman Pleistosen. *Genetic distance* antar spesies *Limnonectes* antara 6-20% [3], sedangkan kecepatan evolusi perubahan untuk mtDNA hewan *endothermic* kira-kira 2% divergensi sekuen per juta tahun [12]. Jadi, waktu divergensi *Limnonectes* lebih awal sebelum zaman Pleistosen kira-kira 50 juta tahun



Gambar 1. Pohon Filogenetik NJ Spesies *Limnonectes* dari Sumatera Barat dan beberapa Negara Asia Tenggara dengan Outgroup berdasarkan Sekuen DNA Gene 16S rDNA. Angka yang terdapat pada Cabang Pohon Menunjukkan Nilai Bootstrap dari Analisis NJ/MP/NJ

didasarkan *genetic distance* antara *Limnonectes* dengan outgroupnya kira-kira 20%. Dugaan ini didukung oleh hasil penelitian [13] yang memperlihatkan *L. kuhlii* dan *L. blythii* merupakan spesies kompleks yang mempunyai diferensiasi genetik yang tinggi pada tingkat spesies dalam satu pulau. Berdasarkan *molecular clock* dan pemisahan kepulauan Sunda Besar kedua spesies tersebut memerlukan waktu yang lebih lama untuk diferensiasi sebelum zaman Pleistosen.

L. kuhlii pada Gambar 1 memperlihatkan terjadinya pemisahan antara *L. kuhlii* yang ada di Vietnam, dan Taiwan dengan Kalimantan dan juga Jawa dan Sumatera. Terjadinya pemisahan spesies *L. kuhlii* antara Semenanjung Malaysia dengan Kalimantan, serta

Jawa dan Sumatera ini diperkirakan pada pertengahan zaman Miosen ketika hubungan antara Sunda Besar dan Semenanjung Malaysia terpisah. Dugaan ini didukung oleh hasil penelitian Zainuddin (in press) mengenai variasi mtDNA di antara populasi *L. kuhlii* di Kalimantan memperlihatkan bahwa hamparan dataran rendah merupakan barrier untuk *gene flow* di antara populasi Kalimantan. Ini berarti pemisahan spesies *L. kuhlii* terjadi ketika Sunda besar dan Semenanjung Malaysia masih bersatu dan daerah tersebut dihubungkan oleh topografi relief yang besar. Pemisahan populasi tersebut terjadi pada akhir Miosen ketika hubungan antara Sunda Besar dan Semenanjung Malaysia menyempit.

Terjadinya pemisahan spesies *L. leporinus* dari spesies lainnya diperkirakan terjadi pada zaman Miosen ketika Semenanjung Malaysia dan Kalimantan merupakan hamparan dataran rendah yang merupakan barier *gene flow* [3]. *L. leporinus* merupakan endemik di Kalimantan yang mempunyai divergensi genetik 9,5-11,8% dan mempunyai hubungan yang relatif dekat dengan spesies *L. blythii* di Sumatera dan Semenanjung Malaysia. *Genetic distance* antara populasi yang ada di Kalimantan sangat rendah, 1,2-2,6% [3]. Zainudin (in press) melaporkan bahwa topografi dataran yang rata merupakan pembatasan *gene flow* dan mendukung bahwa spesies ini ada di Kalimantan awal Miosen.

Berdasarkan persebarannya, *L. blythii* tersebar dari Myanmar, Thailand, Semenanjung Malaysia, dan Sumatera bagian utara [15]. Persebarannya di Sumatera terbatas di utara dan juga selama ini sampling yang dilakukan hanya ditemukan pada sungai yang mengalir ke arah timur. Kondisi ini ada hubungannya dengan cara hidup hewan ini yang hidup dan berkembang biak sungai yang alirannya sedang dan juga sejarah sungai purba yang ada di Sumatera bagian utara yang berhubungan dengan sungai yang mengalir dari Semenanjung Malaysia dan bermuara di Laut Cina Selatan dan Laut Andaman. Pada zaman Pleistosen, di Sumatera bagian utara ada dua sistem sungai, yaitu sistem sungai selat Malaka yang bermuara ke Laut Andaman dan sistem sungai Siam yang bermuara ke Laut Cina Selatan. Sistem sungai selat Malaka meliputi sungai yang ada di Propinsi Sumatera Utara dan Riau dan beberapa sungai yang ada di Malaysia sekarang ini, sedangkan sistem sungai Siam meliputi Sungai Kampar di Sumatera di provinsi Riau dan beberapa sungai di Semenanjung Malaysia [10]. Kedua sistem sungai ini tidak berhubungan dengan sistem sungai yang ada di pulau Jawa. Kondisi yang demikian memungkinkan *L. blythii* menyebar dari Semenanjung Malaysia ke Sumatera bagian utara.

L. shompenorum Padang Sumatera Barat mengelompok dengan *L. blythii* Sumatera dan juga mengelompok dengan *L. macrodon* dari Jawa. *L. shompenorum* mengelompok dengan *L. macrodon* juga didukung oleh data jumlah kromosom diploid yang sama-sama [8,9]. Pemisahan spesies *L. shompenorum* dan *L. macrodon* terjadi kira-kira zaman pertengahan Miosen saat terjadi pemisahan pulau Sumatera dan Jawa [14]. Berdasarkan persebarannya *L. shompenorum* tersebar dari Pulau Nicobar di India, Singapura, Sumatera Utara, Semenanjung Malaysia, Nias, Simeulue Siberut, dan

Sumatera Barat [15]. Berdasarkan persebarannya dan hasil sampling selama ini, *L. shompenorum* ditemukan pada bagian barat dan timur Sumatera pada dataran rendah Sumatera bagian utara. Diperkirakan persebarannya hanya di dataran rendah dan bagian utara pulau Sumatera. Namun untuk memastikannya perlu penelitian lebih lanjut.

L. macrodon memiliki persebaran di Jawa dan Sumatera bagian selatan [15]. Sejarah sungai purba di Jawa serta Sumatera dan habitat katak ini yang hidup di sungai memungkinkan hewan tersebut tersebar dari bagian selatan Sumatera terus ke Jawa. Pada zaman Pleistosen terdapat sistem Sungai Sunda Timur yang mengalir ke arah timur Laut Jawa sampai selat Bali. Sungai-sungai tersebut sekarang meliputi yaitu sungai-sungai yang mengalir ke utara Pulau Jawa, sungai-sungai yang mengalir ke arah selatan Kalimantan dan beberapa sungai di Sumatera Selatan yang mengalir ke timur [10]. Kondisi sungai yang demikian memungkinkan *L. macrodon* ditemukan di sepanjang Sumatera bagian selatan sampai ke Jawa.

Hasil penelitian secara keseluruhan masih belum dapat memecahkan pertanyaan bagaimana hubungan filogenetik intra spesies pada daerah geografi yang berbeda dan bagaimana hubungan filogenetik di antara spesies. Namun demikian, hasil penelitian ini setidaknya telah memberikan gambaran bagaimana hubungan filogenetik spesies *Limnnectes* yang ada di Sumatera Barat dengan daerah lainnya di Asia Tenggara. Untuk itu, masih diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menambah jumlah spesies pada daerah geografi yang berbeda dan juga dengan menambah jumlah sekuen DNA mitokondria yang dianalisis.

4. Simpulan

Limnnectes yang terdapat di Sumatera mengelompok menjadi dua kelompok kerabat, yaitu *L. kuhlii* dan *L. blythii*. *L. kuhlii* dan *L. blythii* merupakan spesies kompleks yang sebenarnya terdiri dari beberapa spesies, tetapi sulit dibedakan secara morfologi. Analisis sekitar 835 pasangan basa gen 16s ribosomal RNA belum mampu untuk mengungkapkan hubungan filogenetik *Limnnectes* yang terdapat di Sumatera Barat dan Asia Tenggara dengan baik. Pemisahan anggota spesies *Limnnectes* dari Sumatera dengan anggota spesies lainnya dari daerah lain di Asia Tenggara terjadi sebelum zaman Pleistosen kira-kira awal Miosen.

Lanjutan Lampiran 1

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 L. macrodon (Jawa) TTGAT-AAATATAAG-AGGTCAGCCCTGCCAGTGACTT-ACCTTAAACGGCC-GCGGTAAACATA-ACC-GTGCAAA-GGTAG-CATAAT--C-ATTGCT
 L. macrodon (Bandung, Jawa)C.....G.....C.....CGG..G--A--T.A.CC-C.....C.....
 L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)C.....C.....C.....C.....AT..G...
 L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)C.....C.....C.....C.....AT..G...
 L. blythii (Sumatera)C.....C.....C.....C.....AT..GT...
 F. limnocharis CT--C.....TAC-TA.....C.....A.C..G.....AAC..G...
 F. cancrivoraT.CCC..T.A.....A-GA.....CTC--GA.C..G.....AC..G...
 O. laevisT.CC...A.....T..A.C.....A.TTT--AAC.C..G.....AC..G...
 L. laticepsA.CCC...A.....TA..A.C.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. kulhii (Vietnam)AG...A.....TA..A.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. kulhii (Taiwan)CAT.CC...A.....TA..A.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. pileataAA..C...A.....T.....TAA..A.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. sp1 (Solok, Sumatera Barat)A..C...A.....T.....AA..G.....G.CGCGC..C.C.TGGA.C..G.A.....G.....CAAC..G...
 L. kulhii (Padang, Sumatera Barat)C.C.CC...A.....T.....CAT.G..C.....CG.....C.CCTGGA.C..G.A.....G.....TC.AC..G...
 L. kulhii (Indonesia)T.C.C.C...A.....T.....A..G.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. kulhii (Brunei)A..C...A.....T.....TA..A.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. kulhii (Sabah)CA..C...A.....T.....TA..A.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. leporinus (Sabah)CT..C...A.....T.....GA.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. leporinus (Kalimantan)T..C...A.....T.....GA.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. blythii (Vietnam)CA..C...AA.....T.....AGC.....C.C--GA.C..G.....AT..CG...
 L. paramacrodonT..C...A.....T.....A.....T.....C.C--GA.C..G.....AC..G...
 L. blythii (Kuala Lumpur)C..C..T...TAA..C.....G.....TTC--GA.C..G.....AC..G...
 L. blythii (Thailand)G.....AG.....CA.....T.C..A.....A.....AT..GT...
 L. blythii (Endau)C.....AG.....CA.....T.C..A.....A.....AT..GT...
 L. ingeriT..C...A.....G.....A.....T.....A.C..A.....A.....AT..G...
 L. malesianaT.....A.....A.....A.....A.C..A.....A.....AT..G...

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 L. macrodon (Jawa) T-CTTTAAATAGGG--ACTC--GTATCAACGG-C--ACCACGAG-GG-TTATACTGT--CTCCCCCTTCTAA-TCAGTG-AAACTG--A-CCTCCCCGGTG
 L. macrodon (Bandung, Jawa)TCG.....C.....T.....
 L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)G.....G.C-T..AA.....GTCT.....A.....TGAC.....
 L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)G.....G.C-T..AA.....GTCT.....A.....TGAC.....
 L. blythii (Sumatera)G.....C-T..A.....
 F. limnocharisG.....A..C.G.....CA--T..G.T-CTC.....T..TTT.....A--T...
 F. cancrivoraC.....A.....A..G.....ACA--T..G.C-CT.....T..TTT.....C.....A--T...
 O. laevisC.....A.....A.....CA.....A.C.....T..T..CC.C.....AA--T...T...
 L. laticepsC.....A.....A.....T..CA.....G.A.....T..T.....A.....A--T...
 L. kulhii (Vietnam)C.....A.....A.....CA--T..G.T.....T.....C.....A.....A--T...
 L. kulhii (Taiwan)C.....A.....A.....CA--T..G.T.....T.....A.....A.....A--T...
 L. pileataC.....A.....A.....CA--T..G.T.....C.....A.....T.T.....
 L. sp1 (Solok, Sumatera Barat)A..AC..A.....C--TT..AG.....C.....G-T.....C.....A.....T.T.....CG...
 L. kulhii (Padang, Sumatera Barat)A..GAC..GC.....G.CA.T..AG..G..C.....G-T.....TC.TA..A.....G.....A--A.T.....CG...
 L. kulhii (Indonesia)A.....A.....C.A--T..G.C.....T.....TC.....A.....T.....
 L. kulhii (Brunei)A.....A.....T..CA--T..G.T.....T.....TC.....A.....T.....
 L. kulhii (Sabah)C.....A.....A.....CA--T..G.T.....T.....TC.....A.....T.....
 L. leporinus (Sabah)A.....A.....CA--T..G.T.....T.....TC.....A.....T.....
 L. leporinus (Kalimantan)A.....A.....CA--T..G.T.....T.....TC.....A.....T.....
 L. blythii (Vietnam)A.....A.....T.....CA--T..G.C.....T.....TC.....A.....T.....
 L. paramacrodonC.....A.....T.....CA--T..G.T.....T.....TT..T.....A.....A.....T.....
 L. blythii (Kuala Lumpur)C..C.....A.....T.....CA--T..G.T.....C.....T.....C.....A.....A.....T.....
 L. blythii (Thailand)C.....A.....A.....CA--T..G.T.....T.....TC.....A.....A.....T.....
 L. blythii (Endau)C.....A.....A.....CA--T..G.T.....T.....C.....A.....A.....T.....
 L. ingeriT.C...A.....T.....CA--T..G.T.....T.....AC.....G.A.....A.....A.....T.....
 L. malesianaC.....A.....A.....CA--T..G.T.....T.....C.....A.....A.....A.....T.....

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 L. macrodon (Jawa) AAGAGCGGGGATAAACT--ACAAGACGAGAAGACCCC-ATGGAGCTTTAAACCC-AATAATAATTTTAA-CCTAAACATCCCAATAAA-GCATAAA
 L. macrodon (Bandung, Jawa)C.....
 L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)A.....T.T.....C.....T.....T.C.....ATT.C...
 L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)A.....T.T.....C.....T.....T.C.....ATT.C...
 L. blythii (Sumatera)T.T.....T.....GGG.....T.....T.C.....TT.C...
 F. limnocharisA.....A.A--T.....GAC.CC.C--GA...T.T.A..CA..CACTCTTT..G
 F. cancrivoraA.....CCT..A--T.....C.GGC.A.CC--AA.CCCCTTTC..CCCC..A.TT.TT...
 O. laevisA.A.A.....G..A--T.....A.....A.....C..C.C--AAA..GCAC.AA.CC.C.CAATT..T..GC
 L. laticepsA.....G.ACC--T.C.....C.CCAAC--A..T..GT..A.CC.T..AAT..A.C.G.
 L. kulhii (Vietnam)TT.A.A.....C.CC.C--A.A..C--ATC.T.....AATGA..G.GG
 L. kulhii (Taiwan)A.GCT.A.A.....GTC..CC.CC-AAATA..C.....AA..G.G.GG
 L. pileataA.T.T.T.A.....AGGC..CC...-A-TATTCT--TAC.T.....AATTCTT.GG
 L. sp1 (Solok, Sumatera Barat)TA.N.....CA.....T.A.....C.CC--TTTA.T.AG.AA.CCTT..A.TCAG..GG
 L. kulhii (Padang, Sumatera Barat)C.....TAC.....CA.....C..G..C..CCCCCTATC..CTTCCA.C.T.....AATTA.C.GG
 L. kulhii (Indonesia)G..A.....C.CC.C--TAT.TCITT..AAC.T.....AATCA.G.GG
 L. kulhii (Brunei)T..T.A.....C.CC.C--AACT..AC.CA.CC.CGTAATG..GCG
 L. kulhii (Sabah)T..A.....C.CC.C--AAT..AC.CA.CC.T.TAAACG...G
 L. leporinus (Sabah)A.....C.CCCC--TTTA..A.TAA.....ATT..T.CGG
 L. leporinus (Kalimantan)A.....C.CCCC--TTTA..A.CAT..A..N.CCTCCT.CGG
 L. blythii (Vietnam)TTA.A.....C.CC.C--A.CC...T.TAC.T.....ATT..G.GG
 L. paramacrodonT.....A.....C..C-A.....TGTTT.T.CAATT.GTT.C...G
 L. blythii (Kuala Lumpur)T..A.A.....A.....C.CC-CATA..CACTC..TCC...GTT...G
 L. blythii (Thailand)TTTTA.A--.....T.C.C.C--AA..TGTTT.C.C.C...GTT...GT
 L. blythii (Endau)CCTCA.A--.....T.CCC--CA..C.T.C.T.T.C.T.ATTTA..GT
 L. ingeriT.T.A.A--T.....T.C.CA.CAA.G.CA.....C.....GTACA..GT
 L. malesianaTGTTA.A--T.....T.C.CATCAA.GGCAC--T...C...GTT...G

Lanjutan Lampiran 1

```

610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
L. macrodon (Jawa)      TTCTAT--TTGTTGGTTTTGGGTTGGGCGCACCCAGGAGTAAACAAAACCTCCCT--GACGAACAGG-TTTTATCCTAATCCAAGAGCTACTGCTCTAAG
L. macrodon (Bandung,Jawa)      .C.....C.A.....A.....G.G.....T.....C.....T.....
L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)      .C.....C.A.....A.....G.G.....T.....C.....
L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)      .C.....ATC.A.....A.....G.....T.....C.....
L. blythii (Sumatera)      .G.....C.A.....A.....T.....C.T.T.....A.....T.G.AC.CCCT..T..TT..A.C..ATT.
F. limnocharis      .AG.G.--C..C.....A.C.....T..G.....ATT.T.....A.....T.TG.AC.CCC..C.....C.....
F. cancrivora      CCTGT--C..A.....A.....G.....T.....T.....C.AC--AG.AAC.AA.C..T..A.GA.--C..AT.
O. laevis      GC..G.--A.....A.....T.....T.G.....AC--T.....CA.CT..TC.....CC.....
L. laticeps      CA..G.--A.....A.....T.....G.....TT.....AC-A..C..G.AAC.CT..T..T..A..AT..A.
L. kulhii (Vietnam)      C.A.GA--ACA.....A.....T.....A.....AG.ACC.A.....T.C.....TA..C.
L. kulhii (Taiwan)      .A..GC--C.A.....A.....T.....G.....TT.G.....AC..C..T..ACC..C..T..TC.....C..C.
L. pileata      C..G.--A.....A.....T.....TT.....AC.....T..A.....C.....A.....
L. spl (Solok, Sumatera Barat)      CA..G.--CCAC.....A.....T.....T.....T.....AA--G.--C.....T.....C.....
L. kulhii (Padang, Sumatera Barat)      .A..G.--C.A.....A.....T.....T.....TG.--A.....
L. kulhii (Indonesia)      .AA.G.--ACAG.....A.....T.....C.....A.....G.AAA.C.....T..C.CA.
L. kulhii (Brunei)      .A.G.--A.AG.....A.....T.....A.....A.....T..TG.AAA.C.....T..C.CA.
L. kulhii (Sabah)      .AA.G.--A.....A.....T.....C.....T.....T.....TT.A.....C.....
L. leporinus (Sabah)      .AA.G.--A.....A.....T.....C.....T.....T.....TT.A.....C.....
L. leporinus (Kalimantan)      .AA.G.--A.....A.....T.....C.....T.....T.....TT.A.....C.....
L. blythii (Vietnam)      CC.....C.A.....A.....TTTT.....T.....C.....T.....G.--A.C.....C..C.
L. paramacrodon      .CT.....C.A.....A.....T.....T.....T.....G.T-C.A.....C.....
L. blythii (Kuala Lumpur)      .T.....C.T.....A.....T.....T.....T.....TA.TCTAC.A.CTFA..A.....C.....
L. blythii (Thailand)      .AT.....C.A.....A.....T.....G.....T.....T.....TC.A.....C.....
L. blythii (Endau)      .L.....C.....A.....A.....T.....G.....T.....T.....TC.....C.....
L. ingeri      C.A.....C.A.....A.....T.....T.....T.....TC..-G.....TC..A.....
L. malesiana      .T.....C.T.....A.....T.....C.....T.....CC..-G.....TC..A.....

```

```

710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
L. macrodon (Jawa)      AATGAAAATTTGACGTAACATGATCCGGTAACC-----GATCAACGAACCAAGTTACCCCTGGGGATACAGCGCAATCCATTTTTAGAGCCCTTAT
L. macrodon (Bandung, Jawa)      .C.....C.....T.....CA.....TC.....
L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)      .C.....C.....T.....CA.....TC.....
L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)      .C.....C.....T.....CA.....TC.....
L. blythii (Sumatera)      .C.....C.A.....TTG.....AA..TATT-----G.....C.....A-----C.....
F. limnocharis      .C.TC..A.....AC.A.....AA.CTATT-----C.....CA.....TC.....
F. cancrivora      .C..C..A.....CCT..C..A-CTATC-----T.C..G.A..T.A.
O. laevis      .C..C..C.....C.....A-CTTC-----C.....CA.....C.....
L. laticeps      .T..C.CA..A.....A.....AA..TTTATTTT..T.....CC.....C.....
L. kulhii (Vietnam)      .C.CT.....A.T.....C.....CA.....C.....
L. kulhii (Taiwan)      .C.....C.G.C.....A.TT.TC-----A.....C.....
L. pileata      .C.....GC.....T.....CCCA.....T.C.....
L. spl (Solok, Sumatera Barat)      .C.....T.....C.....CA.....C.....
L. kulhii (Padang, Sumatera Barat)      .C..C..C.....T.....C.G.....CA.....C.....
L. kulhii (Indonesia)      .C.....C.....A.T.....CA.....C.....
L. kulhii (Brunei)      .C.....A..A.....CA.....C.....
L. kulhii (Sabah)      .C.....T.....CA.....C.....
L. leporinus (Sabah)      .C.....AC.C.....A.....C.....
L. leporinus (Kalimantan)      .C.....A.....ACA.TTG-----CA-----C.....
L. blythii (Vietnam)      .C.....T.....C.....CA.....C.....
L. paramacrodon      .C.....T.....C.....NN.....CG.....T.....
L. blythii (Kuala Lumpur)      .C.....CT.....C.....C.....C-----A.....
L. blythii (Thailand)      .C.....A.....G.CAA.G-----G.....CG-----
L. blythii (Endau)      .N.C..G.....A.....CA.G-----CG.....C.....
L. ingeri      .C.....G.....CA.G-----CG.....C.....
L. malesiana      .N.C..G.....A.....CA.G-----CG.....C.....

```

```

810      820      830
L. macrodon (Jawa)      CAACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGA
L. macrodon (Bandung, Jawa)      .G.....A.....
L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)      .G.....A.....
L. shompenorum (Padang, Sumatera Barat)      .G.....A.....
L. blythii (Sumatera)      .GC.....
F. limnocharis      .G.....G.A..C.....
F. cancrivora      .G.....G.A..C.....
O. laevis      .G.....G.A..C.....
L. laticeps      .G.....G.A..C.....
L. kulhii (Vietnam)      .G.....G.A..C.....
L. kulhii (Taiwan)      .G.....G.A..C.....
L. pileata      .G.....G.A..C.....
L. spl (Solok, Sumatera Barat)      .G.....G.A..C.....
L. kulhii (Padang, Sumatera Barat)      .G.....G.A..C.....
L. kulhii (Indonesia)      .G.....G.A..C.....
L. kulhii (Brunei)      .G.....G.A..C.....
L. kulhii (Sabah)      .G.....G.A..C.....
L. leporinus (Sabah)      .G.....G.A..C.....
L. leporinus (Kalimantan)      .G.....G.A..C.....
L. blythii (Vietnam)      .G.....G.A..C.....
L. paramacrodon      .G.....G.A..C.....
L. blythii (Kuala Lumpur)      .G.....G.A..C.....
L. blythii (Thailand)      .G.....G.A..C.....
L. blythii (Endau)      .G.....G.A..C.....
L. ingeri      .G.....G.A..C.....

```

Daftar Acuan

- [1] S.B. Emerson, D. Berrigan, *Herpetologica*, 49 (1993) 22.
- [2] S.B. Emerson, R. Ward, *Zool. J. Linn. Soc.* (1998) 537.
- [3] S.B. Emerson, R.F. Inger, D.T. Iskandar, *Mol. Phyl. Evol.* 16/1 (2000) 131.
- [4] S.P. Fuller, Baverstock, D. King, *Mol. Phyl. Evol.* 9 (1998) 294.
- [5] J. Sambrook, E.F. Frisch, T. Maniatis, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2006, p.215.
- [6] J. Felsenstein, *Evolution* 39 (1985) 783.
- [7] M. Kuramoto, *Bull. Fukuoka Univ. Ed.* 33 (1983) 83.

- [8] D.T. Iskandar, Amfibi Jawa dan Bali, Puslitbang Biologi-LIPI, 1998.
- [9] R.A.F.P. Sari, Skripsi Sarjana, Jurusan Biologi, FMIPA, ITB, Bandung, 1996.
- [10] H.K. Voris, Maps Journal Biogeography 27 (2000) 1153.
- [11] R. Hall, In: R. Hall and J. Holloway, Biogeography and Geological Evolution of SE Asia, Backhuys, Leiden, 1998, p.99.
- [12] J.C. Avise, Molecular Markers, Natural History and Evolution, New York: Chapman and Hall, 1994, p.100.
- [13] J. Kosuch, M. Veith, *uni-halle.de download//04 abstract. Pdf.* 2002.
- [14] R.F Inger, H.K. Voris, J. of Biogeography 28 (2001) 863.
- [15] D.T. Iskandar, E. Colijn, Treubia 31(Supplement), 2001, p.252.