

**ANALISIS FILOGENETIK DAN ESTIMASI WAKTU DIVERGENSI
Amolops Cope, 1865 SENSU LATO PAPARAN SUNDA SECARA
INSILICO**

SKRIPSI

Oleh :
LUHUR SEPTIADI
NIM. 15620102



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**ANALISIS FILOGENETIK DAN ESTIMASI WAKTU DIVERGENSI
Amolops Cope, 1865 SENSU LATO PAPARAN SUNDA SECARA
INSILICO**

SKRIPSI

Oleh :
LUHUR SEPTIADI
NIM. 15620102

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**ANALISIS FILOGENETIK DAN ESTIMASI WAKTU DIVERGENSI
Amolops Cope, 1865 SENSU LATO PAPARAN SUNDA SECARA
INSILICO**

SKRIPSI

Oleh :
LUHUR SEPTIADI
NIM. 15620102

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal : 13 Juni 2019

Pembimbing I



Berry Fakhry Hanifa, M.Sc
NIDT. 19871217 20160801 1 066

Pembimbing II



Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
NIDT. 19890113 20180201 1 244

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



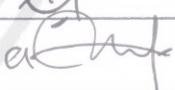
Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

**ANALISIS FILOGENETIK DAN ESTIMASI WAKTU DIVERGENSI
Amolops Cope, 1865 SENSU LATO PAPARAN SUNDA SECARA
INSILICO**

SKRIPSI

Oleh :
LUHUR SEPTIADI
NIM. 15620102

telah dipertahankan
Di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 13 Juni 2019

Penguji Utama	<u>Kholifah Holil, M.Si</u> NIP. 19751106 200912 2 002	
Ketua Penguji	<u>Fitriyah, M.Si</u> NIP. 19860725 201903 2 013	
Sekretaris Penguji	<u>Berry Fakhry Hanifa, M.Sc</u> NIDT. 19871217 20160801 1 066	
Anggota Penguji	<u>Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I</u> NIDT. 19890113 20180201 1 244	



Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah

Sujud syukur kupersembahkan kepada Allah SWT atas karunianya saya dijadikan manusia yang senantiasa berpikir, berilmu, sabar, ikhlas dalam melaksanakan segala kewajiban-Nya. Semoga dengan selesainya tugas akhir ini menjadi batu pijakan dalam meraih tujuan-tujuan baik dan cita-cita kedepannya.

Kupersembahkan karya yang jauh dari kata sempurna kepada orang-orang hebat yang telah memberikan motivasi dan dukungannya, khususnya kepada:

1. Kedua orangtua yang saya sayangi Bapak Suwarno dan Ibu Najmah.
2. Kakak perempuan yang saya sayangi, Mbak Sofi.
3. Teman-teman Ranger dari *Maliki Herpetology Society (MHS)* UIN Malang.
4. Teman-teman LP2B Malang.
5. Teman-teman BIONIK Indonesia.
6. Teman-teman seperjuangan Biologi GENETIST 2015, khususnya Gen D Biologi 2015.
7. Sahabat-sahabat saya *Dulur Barakallah* diantaranya Mas Noval, Mas Zaka, Mas Real, Mbak Nuri, Mbak Ambar, Mbak Tria, & Mbak Rhesma.
8. Teman-teman peminatan Herpetologi Universitas Brawijaya, Mas Fathoni, Mbak Tika beserta kawan-kawan.
9. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Karena dukungan, motivasi, canda tawa, nasihatnya, semoga Allah membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Semoga karya ini dapat bermanfaat khususnya bagi saya sendiri, dan bagi orang lain

Amiin

MOTTO

Mulailah dari tempatmu berada.

Gunakan yang kau punya.

Lakukan yang kau bisa.

(Arthur Ashe)

Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi orang lain

(HR. Ahmad)



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ni:

Nama : Luhur Septiadi
NIM : 15620102
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Analisis Filogenetik dan Estimasi Waktu
Divergensi *Amolops Cope*, 1865 Sensu Lato
Paparannya Secara Insilico

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang,
Yang membuat pernyataan,



Luhur Septiadi
NIM. 15620102

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



ABSTRAK

Septiadi, Luhur. 2018. ANALISIS FILOGENETIK DAN ESTIMASI WAKTU DIVERGENSI *Amolops Cope*, 1865 SENSU LATO PAPARAN SUNDA SECARA INSILICO. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Berry Fakhry Hanifa, M.Sc.; Pembimbing Agama: Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I.

Kata Kunci: divergensi genetik, *Amolops*, gen mitokondria, pohon filogenetik, evolusi

Proses geologi Paparan Sunda membentuk pola biogeografi Genus *Amolops Cope*, 1865 Sensu lato yang tersebar di pulau Sumatra, Jawa, & Kalimantan. Penelitian sistematika, hubungan kekerabatan, dan evolusi dari genus ini telah banyak dilakukan, namun masih sedikit referensi terkait resolusi pohon filogenetik dan studi estimasi waktu divergensi genetik di Paparan Sunda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui filogenetik, dan estimasi waktu divergensi Genus *Amolops* Sensu lato di Paparan Sunda. Metode yang digunakan merupakan metode insilico yaitu analisis filogenetik *Maximum Likelihood*, *Maximum Parsimony*, *Bayesian Inference* dan estimasi waktu divergensi secara insilico menggunakan beberapa gen dari genom mtDNA yaitu 12S rRNA, tRNA^{Val}, & 16S rRNA dari *Amolops* Sensu lato sebanyak 13 *Ingroup* taksa dari Genus *Huia* dan *Meristogenys* beserta 2 *Outgroup* taksa. Parameter analisis yang digunakan yaitu sifat monofiletik dan parafiletik dari topologi yang dihasilkan, serta skor *bootstrap* (MLBP, MPBP, dan BPP) pada setiap percabangan pohon filogenetik berupa filogram, dan estimasi waktu divergensi genetik dengan parameter analisis *Effective Sampling Size* dan konvergensi distribusi *prior* dan *posterior* dari kronogram yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan filogenetik Genus *Amolops* Sensu lato tergolong grup monofiletik, Genus *Huia* tergolong grup parafiletik, dan Genus *Meristogenys* tergolong grup monofiletik. Estimasi waktu divergensi menunjukkan waktu pemisahan *Amolops* Sensu lato terjadi pada zaman *Oligocene-Miocene epoch* (~34.8 Mya), *Huia sumatrana*, *Huia group*, dan *Meristogenys group* terjadi pada zaman *early Miocene-Pliocene epoch* (~27.37 Mya), *Huia group* dan *Meristogenys group* terjadi pada zaman *early Miocene-Pliocene epoch* (~14-4 Mya).

ABSTRACT

Septiadi, Luhur. 2018. PHYLOGENETIC ANALYSIS AND DIVERGENCE TIME ESTIMATION OF *Amolops Cope, 1865* SENSU LATO ON SUNDA SHELF INSILICO. Thesis. Biology Department Science and Technology Faculty State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Biology Advisor: Berry Fakhry Hanifa, M.Sc. ; Religious Advisor: Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I.

Key words: genetic divergence, *Amolops*, mitochondrion genes, phylogenetic tree, evolution

The geology process of the Sunda Shelf forms the biogeographic pattern of Genus *Amolops Cope, 1865* Sensu lato which distributed in Sumatra, Java, and Kalimantan region. Research on systematic, relationship and evolutionary history of this genus have been studied before, however, producing a few phylogenetic trees resolution and divergence time estimation on Sunda shelf. This study aims to determine the phylogenetic and divergence time estimation of Genus *Amolops* Sensu lato in Sunda Shelf. The insilico methods are used is phylogenetic analysis by Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian Inference, and divergence time estimation based on mtDNA of 12S rRNA, tRNA^{Val} & 16S rRNA genes of *Amolops* Sensu lato including 13 Ingroup taxa along with 2 Outgroup taxa. Analysis parameter that are used is monophyly dan paraphyly character of group based on the result of branch of every phylogenetic trees, also bootstrap score (MLBP, MPBP, BPP) on every branch of phylogenetic trees resulting on phylograms, and divergence time estimation parameter analysis including Effective Sampling Size and convergency of prior and posterior distribution resulting on chronogram. The results showed that the relationship between *Amolops* Sensu lato are monophyletic group, Genus *Huia* are paraphyletic group and Genus *Meristogenys* are monophyletic group. The time divergence estimation shows the separation of *Amolops* Sensu lato occurred at Oligocene to Miocene epoch (~ 34.8 Mya), *Huia sumatrana*, *Huia* group, and *Meristogenys* group occurred at early Miocene to Pliocene epoch (~ 27.37 Mya), and *Huia* group and *Meristogenys* group occurred at early Miocene to Pliocene epoch (~ 14-4 Mya).

ملخص البحث

سفتيادي، لوهور. 2018. تحليل النشوء التطور وتقدير الوقت الخلافات (*Amolops Cope, 1865 SENSU LATO*) (PAPARAN SUNDA SECARA INSILICO). البحث العلمي. قسم علم الحياة كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف علم الحياة: بيري فحري حنيفا الماجستير، المشرف الدين: اوكي باغاس فراستيو الماجستير.

الكلمات الرئيسية: الخلافات الوراثية، *Amolops*، جين الميتوكوندريا، الشجر النشوء التطور، تطوّر.

طريقة الجيولوجي (PAPARAN SUNDA) تشكّل تخطيط الجغرافيا البيولوجيا بجنس (*Amolops Cope, 1865 SENSU LATO*) الذي ينتشر في جزيرة سومترا، جاوى، وكليمانتان. البحث المنتظمي، العلاقة القرابة، والتطوّر من هذا الجنس فُعلون كثيرا. بل، قليل المصادر عن مقرّر الشجر النشوء التطور ودراسة تقدير الوقت الخلافات الوراثية في (*PAPARAN SUNDA*). يهدف هذا البحث للتعريف النشوء التطور وتقدير الوقت الخلافات (*Amalops Sensu Lato di*) (*Paparan Sunda Maximum*). الطريقة التي تستخدم في هذا البحث هي الطريقة (*Insilico*) هي تحليل النشوء التطور (*Insilico*) يستخدم (*Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian Inference*) وتقدير الوقت الخلافات (*Insilico*) يستخدم جينات من جينوم (*mtDNA yaitu 12S rRNA, tRNA^{Val}, & 16S rRNA dari Amolops Sensu lato*) (sebanyak 13 *Ingroup* taksa dari Genus *Huia* dan *Meristogenys* beserta 2 *Outgroup* taksa. معلمة التحليل التي تستخدم هي الصفة أحادي النمط الخلوي وجمع النمط الخلوي من طوبولوجيا الذي يُحصل، والقيمة (*bootstrap*) ((MLBP, MPBP, dan BPP)) في كل البضعة الشجرة نشوء التطور مثل فيلوجرام وتقدير الوقت الخلافات بمعلمة التحليل (*Effective Sampling Size*) وتقارب التوزيع (*prior dan posterior*) من (*Kronogram*) الذي يحصل. يدلّ حاصل البحث النشوء التطور الجنس (*Amolops Sensu lato*) يتضمّن على الفرقة أحادي النمط الخلوي، والجنس (*Huia*) يتضمّن على الفرقة جمع النمط الخلوي، والجنس (*Meristogenys*) يتضمّن على الفرقة أحادي النمط الخلوي. تقدير الوقت الخلافات تدلّ الوقت المنفصلة (*Amolops Sensu lato*) التي تحدث في عصر (*early Miocene-Pliocene epoch*) (*Huia group dan Meristogenys group*)، ((~27.37 Mya))، تحدث في عصر (*early Miocene-Pliocene epoch*) (~14-4 Mya).

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan pada kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan Skripsi ini dengan baik.

Selanjutnya penulis ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Berry Fakhry Hanifa, M.Sc dan Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I selaku pembimbing skripsi dan pembimbing agama, yang telah banyak memberikan bimbingan selama melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi.
4. Kholifah Holil, M.Si dan Fitriyah, M.Si selaku penguji yang telah memberikan banyak masukan dan saran membangun.
5. Ayahanda dan Ibunda tercinta yang senantiasa memberikan doa dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu dan kakak yang selalu memberikan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
6. Teman-teman dari Kelompok Studi LP2B, BIONIK, dan Maliki Herpetology Society, serta teman-teman dari Kelompok Studi KSB Universitas Brawijaya, yang telah memberikan wawasan dan wadah menuangkan ide.
7. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, Maret 2019

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
ملخص البحث	x
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian.....	10
1.4 Manfaat Penelitian.....	10
1.5 Batasan Masalah.....	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	12
2.1 Sejarah Biogeografi Paparan Sunda	12
2.2 Evolusi dan Spesiasi di Paparan Sunda	14
2.3 Hubungan Kekerabatan	20
2.4 Estimasi Waktu Divergensi Genetik	32
2.5 Hubungan antara Biogeografi dan Kekerabatan	37
2.6 Sistematika <i>Amolops</i> Cope, 1865 Sensus lato	39
BAB III METODE PENELITIAN	45
3.1 Rancangan Penelitian	45
3.2 Waktu dan Tempat	45
3.3 Alat dan Bahan	45
3.4 Langkah Kerja	47
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	54
4.1 Filogenetik antar taksa dari Genus <i>Amolops</i> Cope, 1865 Sensus lato di Paparan Sunda	54

4.2 Estimasi waktu divergensi genetik Genus <i>Amolops</i> Cope, 1865 Sensus lato di Paparan Sunda	64
BAB V PENUTUP	77
5.1 Kesimpulan.....	77
5.2 Saran.....	77
DAFTAR PUSTAKA	77
LAMPIRAN	86



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Rangkuman dari kelebihan dan kelemahan beberapa metode rekonstruksi pohon filogenetik	27
Tabel 3.1. Data Sekuen mtDNA (12S rRNA, tRNA ^{val} , dan 16S rRNA dari <i>Amolops</i> Cope, 1865.....	46
Tabel 4.1. Estimasi waktu divergensi genetik <i>Amolops</i> Cope, 1865 Sensus lato di Paparan Sunda berdasarkan gen 12S rRNA, tRNA ^{Val} , dan 16S rRNA ..	66



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Rekonstruksi dataran dan laut pada Kepulauan Indo-Australian pada beberapa periode Kenozoikum	14
Gambar 2.2. Pohon kekerabatan dan polarisasi karakter dalam analisis filogenetika	21
Gambar 2.3. Istilah dalam mengevaluasi pohon filogenetik.....	22
Gambar 2.4. Algoritma <i>Neighbour Joining</i> (klusterisasi <i>divisive</i>)	24
Gambar 2.5. Teorema Bayes	26
Gambar 2.6. Markov models dari substitusi nukleotida.....	26
Gambar 2.7. Peta genomik mitokondria secara umum pada golongan katak dari Famili Ranidae.....	29
Gambar 2.8. Parameter distribusi yang digunakan sebagai <i>priors</i> ketika melakukan kalibrasi.....	34
Gambar 2.9. Larvae dengan tipe berudu <i>gastromyzophorous</i>	40
Gambar 2.10. Dokumentasi Katak dari Genus <i>Huia</i>	43
Gambar 2.11. Dokumentasi Katak dari Genus <i>Meristogenys</i>	44
Gambar 3.1. Peta distribusi dan spesimen yang diteliti	47
Gambar 3.2. <i>Flow Chart</i> seleksi data sekuen.....	48
Gambar 3.3. <i>Flow Chart</i> dari <i>Aligning</i> Data Sekuen	49
Gambar 3.4. <i>Flow Chart</i> penentuan model evolusi untuk analisis <i>Maximum likelihood</i> dan <i>Bayesian Inference</i>	50
Gambar 3.5. <i>Flow Chart</i> analisis filogenetik <i>Maximum likelihood</i> , <i>Maximum Parsimony</i> & <i>Bayesian Inference</i>	51
Gambar 3.6. <i>Flow Chart</i> estimasi waktu divergensi genetik.....	53

Gambar 4.1. Filogram dari analisis filogenetik <i>Maximum Likelihood</i> , <i>Maximum Parsimony</i> , dan <i>Bayesian Inference</i> dari 12S rRNA, tRNA ^{Val} , dan 16S rRNA.....	55
Gambar 4.2. Kronogram dari <i>Amolops</i> Cope, 1865 <i>Sensu lato</i> di Paparan Sunda berdasarkan gen 12S rRNA, tRNA ^{Val} , dan 16S rRNA	65
Gambar 4.3. Ilustrasi kronologis dari pemisahan Famili Ranidae dan Dicroglossidae (<i>L. sisikdagu</i>) berdasarkan waktu pembentukan Paparan Sunda	67
Gambar 4.4. Ilustrasi kronologis dari pemisahan Famili Ranidae, Genus <i>Rana</i> dan <i>Amolops</i> <i>Sensu lato</i> berdasarkan waktu pembentukan Paparan Sunda	68
Gambar 4.5. Ilustrasi kronologis dari pemisahan <i>Amolops</i> <i>Sensu lato</i> berdasarkan waktu pembentukan Paparan Sunda	70
Gambar 4.6. Ilustrasi kronologis dari pemisahan <i>Huia group</i> & <i>Meristogenys group</i> berdasarkan waktu pembentukan Paparan Sunda.....	72

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Proses Seleksi Data Sekuen.....	86
Lampiran 2. Proses <i>Aligning</i> Data Sekuen.....	87
Lampiran 3. Proses Penentuan Model Evolusi.	90
Lampiran 4. Proses Analisis Filogenetik ML, MP, BI.....	96
Lampiran 5. Proses Estimasi Waktu Divergensi.....	99
Lampiran 6. Hasil parameter <i>gBlock</i> yang diterapkan.....	106
Lampiran 7. Hasil penentuan model evolusi Jmodeltest untuk analisis <i>Maximum Likelihood</i>	107
Lampiran 8. Hasil Penentuan Model evolusi <i>Kakusan 4</i> untuk analisis filogenetik <i>Bayesian Inference</i>	108
Lampiran 9. <i>Character state</i> dari sekuen yang didapatkan dari <i>software</i> PAUP	109
Lampiran 10. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan analisis ML ...	110
Lampiran 11. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan analisis MP ...	111
Lampiran 12. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan analisis BI	112
Lampiran 13. Keseluruhan Sekuen yang digunakan dalam analisis	113

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki keanekaragaman dan biodiversitas yang tinggi (Natus, 2005). Keanekaragaman ini dikarenakan adanya proses geologi yang kompleks serta letaknya yang berada pada kawasan tropis (Mittermieier dkk., 1998; Myers dkk., 2000). Berdasarkan penyebaran flora dan faunanya, Indonesia dibatasi oleh garis imajiner dengan pembagian wilayah, yang meliputi Wallacea (Sulawesi, Nusa Tenggara), Paparan Sahul (Papua-Australia), dan Paparan Sunda (Sumatera, Jawa, Borneo) (Wallace, 1876).

Paparan Sunda termasuk ke dalam salah satu dari 34 wilayah biodiversitas terrestrial dan 11 wilayah biodiversitas laut tertinggi di dunia (Turner dkk., 2007). Lebih dari 800 spesies amfibi (>10% dari seluruh spesies amfibi di dunia) ditemukan di Paparan Sunda, dan jumlahnya terus meningkat seiring dilakukannya eksplorasi pada wilayah kepulauan yang terisolir (Nishikawa dkk., 2012). Keragaman yang tinggi dari tingkatan genetik sampai ekosistem menempatkan Indonesia sebagai negara dengan kekayaan biodiversitas tertinggi kedua di dunia setelah negara Brazil (Ministry of Environment, 2009). Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS. Fatir ayat 28 yang berbunyi:

وَمِنَ النَّاسِ وَالْذَوَابِّ وَالْأَنْعَامِ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ كَذَلِكَ إِنَّمَا يَخْشَى اللَّهَ مِنْ عِبَادِهِ الْعُلَمَاءُ
 إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ غَفُورٌ

Artinya : “Dan demikian (pula) di antara manusia, binatang-binatang melata dan binatang-binatang ternak ada yang bermacam-macam warnanya (dan jenisnya). Sesungguhnya yang takut kepada Allah di antara hamba-hamba-Nya, hanyalah ulama. Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi Maha Pengampun”.

Penggalan ayat *ad-dawaaabbi* menjelaskan bahwasanya Allah SWT menciptakan berbagai macam jenis hewan di bumi yang berjalan menggunakan kaki, kemudian penggalan ayat sesudahnya dengan lafaz *an'aami* yang dihubungkan dengan *addawab* memiliki makna bahwa Allah telah menciptakan berbagai macam wujud makhluk hidup beraneka ragam bentuk, corak, kulit dan ukuran (Shihab, 2002). Penggalan ayat ini mengisyaratkan bahwa keanekaragaman yang unik dapat dipengaruhi oleh faktor habitat, sampai faktor genetik.

Surat tersebut menjelaskan pembagian beberapa hewan yaitu hewan yang berjalan dengan empat kaki, melata, dan juga ternak yang diciptakan bervariasi (Shihab, 2002) dan tidak terlepas dari faktor perbedaan genetik. Hewan-hewan yang memiliki karakter morfologi berbeda memiliki karakter genetik yang berbeda walaupun berasal dari satu nenek moyang yang sama sehingga terbentuk organisme dengan wujud yang berbeda melalui mekanisme spesiasi akibat dari proses divergensi genetik. Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS Al Anbiya ayat 30 yang berbunyi:

أَوْ لَمْ يَرَ الَّذِينَ كَفَرُوا أَنَّ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ كَانَتَا رَتْقًا فَفَتَقْنَاهُمَا^ط وَجَعَلْنَا مِنَ الْمَاءِ
كُلَّ شَيْءٍ حَيٍّ أَفَلَا يُؤْمِنُونَ

Artinya : “Dan apakah orang-orang yang kafir tidak mengetahui bahwasanya langit dan bumi itu keduanya dahulu adalah suatu yang padu, kemudian Kami pisahkan antara keduanya. Dan dari air Kami jadikan segala sesuatu yang hidup. Maka mengapakah mereka tiada juga beriman”.

Ayat ini menegaskan tentang konsep penciptaan alam semesta yang merupakan satu kesatuan lalu dipisahkan oleh Allah SWT. Peristiwa ini menjadi awal kemunculan kehidupan pertama kali dari organisme yang komposisi tubuhnya terdiri dari zat berupa air (Shihab, 2002). Keberagaman seluruh organisme dapat dirunut waktu dan asalnya karena adanya keterkaitan satu sama lain, yang kemudian berpisah (divergensi) menjadi organisme dalam bentuk berbeda melalui mekanisme spesiasi, namun masih memiliki unsur terpenting pada tubuhnya berupa air.

Proses terjadinya divergensi dan pemisahan suatu spesies tidak terlepas dari sejarah geologi pembentukan Paparan Sunda yang telah melalui proses yang panjang dan kompleks. Dalam proses geologinya, telah terjadi peristiwa penyatuan dan pemisahan kontinen yang terjadi pada zaman *early Eocene epoch* (~50 Mya) sampai *Pleistocene epoch* (~250.000 ya) (Lohman dkk., 2011). Hal ini disebabkan oleh adanya pergeseran dan tumbukan lempeng tektonik antara lempeng India-Australia, Eurasia, Pasifik dan Filipina, serta adanya peningkatan permukaan air laut (glasiasi) (Lohman dkk., 2011). Proses tersebut memicu adanya diversifikasi karena adanya proses isolasi berupa batasan geografis dan seleksi reproduktif sehingga terjadi hanyutan genetik (*genetic drift*) yang merubah susunan dari

kongkang genetik (*gene pool*) membentuk spesies yang baru (*speciation*) (Kotaki dkk., 2010).

Salah satu kelompok fauna yang berdiversifikasi tinggi dan menarik untuk dipelajari adalah fauna dari Kelas Amfibi, Ordo Anura, Famili Ranidae. Katak Sejati (Ranidae) tersebar luas di Paparan Sunda (Sumatra, Jawa, Borneo) dan terbagi menjadi beberapa spesies yang telah beradaptasi pada habitat yang bervariasi (Frost dkk., 2006). Bentang alam Indonesia yang kompleks menghasilkan kontur serta sungai dengan aliran-aliran air dari hulu yang umumnya beraliran cukup deras. Salah satu golongan katak sejati yang spesifik menempati relung habitat (*niche*) di sungai dengan aliran yang deras adalah katak dari Genus *Amolops*.

Amolops Cope, 1865 atau yang biasa disebut dengan katak arus deras (*Cascade Frog*) merupakan golongan katak dari Famili Ranidae yang terdistribusi di wilayah Benua Asia. Katak ini memiliki salah satu adaptasi morfologi yang unik dengan adanya bentukan *abdominal sucker* pada fase *larvae*/ berudu/ *tadpole*-nya sehingga mampu bertahan hidup di daerah sungai beraliran deras (*torrent*) (Inger, 1966). Secara spesifik, Genus *Amolops* Sensu lato dibagi menjadi beberapa genera yang tersebar di wilayah Indonesia (Sumatra, Jawa, Borneo), diantaranya dari Genus *Meristogenys* dan *Huia*. Namun status sistematiknya saat ini masih memunculkan sebuah permasalahan dimana terjadi penyimpangan taksonomi, adanya *paraphyly*, dan ketidakstabilan taksonomi pada Famili Ranidae berdasarkan beberapa pengamatan morfologi dan anatomi, serta beberapa hasil analisis filogenetik yang telah dilakukan sebelumnya (Cai dkk., 2007; Stuart, 2008; Arifin

dkk., 2018). Hal tersebut dapat terjadi karena dataset sekuen, karakter morfologi, maupun metode yang digunakan masih belum mampu memisahkan taksa. Permasalahan taksonomi ini perlu untuk diresolusi dan dievaluasi melalui pendekatan yang lebih mendalam dengan pengembangan teknik dengan validitas yang baik, salah satunya analisis filogenetik dengan metode dan penggunaan dataset yang lebih komprehensif (Hidayat & Pancoro, 2008). Upaya ini diharapkan mampu menyajikan referensi data yang lebih akurat, sistematika yang kredibel, serta perkiraan estimasi waktu divergensi dari *Amolops* Sensus lato yang terdistribusi di Paparan Sunda khususnya wilayah Indonesia, berdasarkan pohon filogenetik dan kronogram yang telah diolah dari data molekuler berupa sekuen DNA (Arifin dkk., 2018).

Penggunaan sekuen DNA, secara luas digunakan dalam penelitian sistematika, estimasi waktu divergensi, dan biogeografi berdasarkan variasi dari susunan basa nukleotida (Brown dkk., 1979; Moore, 1995). Sumber data bisa didapatkan dari genom DNA Inti (nuDNA) pada kromosom tertentu dan DNA mitokondria (mtDNA) yang sering digunakan karena karakteristik penting yang tak didapatkan pada nuDNA meliputi: jumlahnya yang banyak di sel, ukuran genom yang kecil (~16,569 bp, *double stranded*), haploid (*one linkage group*), diwariskan dari maternal (*lineage sorting*), banyak wilayah yang *conserved*, dan mutasi independen yang tidak didapatkan pada nuDNA (rekombinasi nuDNA oleh parental dan maternal) (Gupta dkk., 2015). Sekuen mtDNA menghasilkan pohon filogenetik berdasarkan gen (*gene trees*) yang kongruen dengan pohon filogenetik spesies (*species trees*), sehingga menggambarkan pohon yang sebenarnya (*true trees*)

(Brown dkk., 1979; Moore, 1995). Secara spesifik, mtDNA-*haplotype gene trees* lebih kongruen terhadap *species trees* dibuktikan melalui nilai probabilitas 0.95, lebih besar dibandingkan nuDNA-*gene trees* dengan nilai probabilitas 0.62 (Moore, 1995). Keunggulan lainnya yaitu ukuran populasi efektif (*effective sampling size*) pada mtDNA. DNA mitokondria memiliki ukuran populasi efektif yang lebih sedikit (dikarenakan fenomena *lineage sorting*) dibandingkan nuDNA, sehingga mempengaruhi validitas bifurkasi (separasi/ divergensi/ percabangan) yang terjadi saat replikasi DNA dan mutasi pada populasi akibat isolasi geografis maupun seleksi reproduktif (Moore, 1995). Dibalik seluruh keunggulannya, tidak seluruh wilayah dari genom mtDNA dapat digunakan dalam merekonstruksi *gene trees* (Gupta dkk., 2015).

Wilayah dari genom mtDNA meliputi *D-Loop Region*, gen pengkode protein, dan beberapa wilayah yang berfokus dalam studi divergensi genetik yaitu rRNA dan tRNA (Moraes dkk., 2002). Wilayah ini merupakan bagian *functional* dalam proses replikasi yang biasa disebut "*coding region*" (Gupta dkk., 2015). Wilayah rRNA dan tRNA memiliki peranan fungsional yang penting, dimana semakin penting fungsi dari gen tersebut semakin lambat pula gen tersebut mengalami perubahan akibat proses evolusi pada struktur primernya (*structural maintain*) (Gupta dkk., 2015). Dalam hal tersebut, wilayah ini tergolong bagian yang *conserved* sehingga mampu mempertahankan struktur dan fungsinya. Wilayah ini memiliki susunan basa nukleotida yang bervariasi akibat mutasi yang independen, sehingga lebih signifikan dari *region* lainnya untuk dibandingkan (Gupta dkk., 2015). Beberapa diantara gen yang tersedia dan sering digunakan

dalam mengidentifikasi pemisahan taksa sampai tingkat spesies yaitu gen 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA. Gen-gen ini mampu meresolusikan pohon filogenetik sehingga disebut sebagai gen penanda (*primary barcoding genes*) (Kres dkk., 2015). Namun, resolusi pohon filogenetik saat ini masih dilakukan dalam skala parsial dan independen pada studi kasus divergensi Genus *Amolops* Sensu lato, sehingga diperlukan analisis yang lebih komprehensif melalui metode dan dataset sekuen DNA yang lain (Arifin dkk., 2018; Cai dkk., 2007; Stuart, 2008; Matsui dkk., 2010).

Penggunaan gen untuk menyimpulkan hubungan kekerabatan dapat dicapai menggunakan 2 cara fundamental, yaitu *concatenated alignment* dan *partition alignment* dari *multiple genes* (Gadagkar, 2005). Penggunaan *multiple genes* terbukti mampu meresolusikan *gene trees* yang lebih valid dibandingkan *single genes* dalam beberapa kondisi (Gadagkar, 2005). Salah satu metode analisis dengan menggabungkan beberapa gen mitokondria, yaitu identifikasi pada beberapa spesies burung sampai ke tingkatan subspecies, beberapa diantaranya menggunakan gabungan (*concatenated*) dari gen rRNA, dan tRNA (Herbert dkk., 2004). Analisis filogenetik dan estimasi waktu divergensi menggunakan metode *concatenated alignment* dengan gen 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA pernah dilakukan oleh Fahmi & Kurniawan (2015), & Emerson dkk., (2000) pada penelitian katak bertaring dari Famili Ranidae dan mampu meresolusikan pohon yang menyerupai *species tree*-nya.

Pohon filogenetik yang teresolusi dengan baik, secara tidak langsung menyimpan informasi mengenai waktu pemisahan secara genetik dari taksa yang

berkerabat (Gupta dkk., 2015). Hal ini didasarkan pada gen dari genom mtDNA yang bisa diketahui asal-usul dan perkiraan divergensi karena faktor laju substitusi (*substitution rates*) yang berbeda-beda pada setiap taksa (Kres dkk., 2014). Adanya substitusi yang merubah struktur genetik serta kaitannya dengan faktor laju substitusi yang berbeda-beda pada setiap taksa, menjadikan estimasi waktu divergensi genetik sering digunakan untuk mengetahui informasi mengenai proses taksa tersebut memisah, prakiraan waktu taksa tersebut berdivergensi, serta proses evolusi yang terjadi. Taksa dikatakan berdivergensi apabila struktur dan komposisi urutan DNANYa telah berbeda secara genetik dengan *common ancestor*-nya (~ 5-8 % nilai *p-distance* pada tingkatan spesies - subspecies, bervariasi tergantung tingkatan taksanya, dengan laju substitusi 0.2 per 1 Mya untuk hewan-hewan vertebrata yang berpisah pada ~10 Mya *before present*) (Brown & Yang, 2011). Adanya estimasi waktu divergensi genetik yang terjadi pada rentangan waktu tertentu dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seleksi reproduktif, dan isolasi geografis (Fahmi & Kurniawan, 2015).

Upaya dalam menguraikan hubungan kekerabatan akan berkontribusi dalam mengevaluasi diversitas fauna terhadap sejarah geologi paparan Sunda di Indonesia melalui estimasi waktu divergensi genetik (Nishikawa dkk., 2012). Proses evolusi, biogeografi, serta estimasi waktu divergensi sangatlah penting mengingat Indonesia sebagai salah satu negara kepulauan terbesar memiliki pola penyebaran fauna yang kompleks, proses geologi yang unik, dalam kaitannya terhadap proses divergensi genetik fauna. Estimasi waktu divergensi yang berkorelasi terhadap proses diversifikasi fauna di Indonesia bisa digunakan sebagai referensi pendukung,

dimana Indonesia berperan sebagai salah satu pusat *reservoir* diversitas fauna dunia, yang kedepannya mampu meningkatkan upaya konservasi amfibi di Indonesia (Fahmi & Kurniawan, 2015).

Penelitian sistematika dan divergensi genetik Genus *Amolops* Cope, 1865 *Sensu lato* di Paparan Sunda telah beberapa kali diulas dan masih perlu dilakukan analisis dengan metode yang komprehensif melalui beberapa dataset sekuen DNA. Begitu pula penelitian mengenai estimasi waktu divergensi genetik yang merupakan penelitian lanjutan dari analisis filogenetik dapat memberikan informasi mengenai biogeografi dan mengevaluasi sejarah geologinya. Oleh karena itu, penelitian dengan judul "Analisis Filogenetik dan Estimasi Waktu Divergensi *Amolops* Cope, 1865 *Sensu Lato* Paparan Sunda secara *Insilico*", penting dilakukan dalam menguraikan hubungan kekerabatan serta mengevaluasi sejarah geologi dari Paparan Sunda yang juga berkorelasi dalam memaparkan biogeografi dan proses evolusinya.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah filogenetik antar taksa pada Genus *Amolops* Cope, 1865 *Sensu lato* di Paparan Sunda?
2. Berapakah estimasi waktu divergensi genetik antar taksa pada Genus *Amolops* Cope, 1865 *Sensu lato* di Paparan Sunda?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendeskripsikan filogenetik antar taksa pada Genus *Amolops* Cope, 1865 Sensu lato di Paparan Sunda.
2. Mengetahui estimasi waktu divergensi genetik antar taksa pada Genus *Amolops* Cope, 1865 Sensu lato di Paparan Sunda.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sebagai salah satu acuan dalam mengevaluasi sejarah geologi Paparan Sunda khususnya di wilayah Indonesia.
2. Sebagai salah satu acuan estimasi waktu divergensi genetik Genus *Amolops* Cope, 1865 Sensu lato berdasarkan persebarannya di Paparan Sunda khususnya di wilayah Indonesia.
3. Sebagai dasar bagi bidang penelitian lainnya, seperti studi evolusi dan biosistematika, bioinformatika, secara molekuler pada amfibi.
4. Sebagai referensi diversifikasi dan evolusi amfibi di wilayah tropis Indonesia dalam mengembangkan strategi yang efisien untuk mencegah ancaman penurunan populasi.
5. Sebagai referensi dalam upaya konservasi amfibi di Indonesia.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sekelompok taksa yang dikaji dari Genus *Amolops* Cope, 1865 Sensu lato adalah taksa dari Genus *Huia* dan *Meristogenys* yang spesifik tersebar di

Paparan Sunda (Sumatra, Jawa, Borneo). Taksa yang dikaji didasarkan pada gen mitokondria (mtDNA) meliputi: 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA yang didapatkan dari *GenBank Database*.

2. Metode analisis filogenetik yang digunakan adalah analisis *character based* yang meliputi: *Maximum Likelihood*, *Maximum Parsimony*, dan *Bayesian Inference*
3. Parameter yang digunakan dalam analisis filogenetik yaitu sifat kelompok yang monofiletik dan parafiletik dari topologi yang dihasilkan, serta skor *bootstrap* (MLBP: ≥ 70 ; MPBP: ≥ 70 ; BPP: ≥ 95), estimasi waktu divergensi genetik dengan parameter analisis *Effective Sampling Size* dan konvergensi distribusi prior dan posterior dari kronogram yang dihasilkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

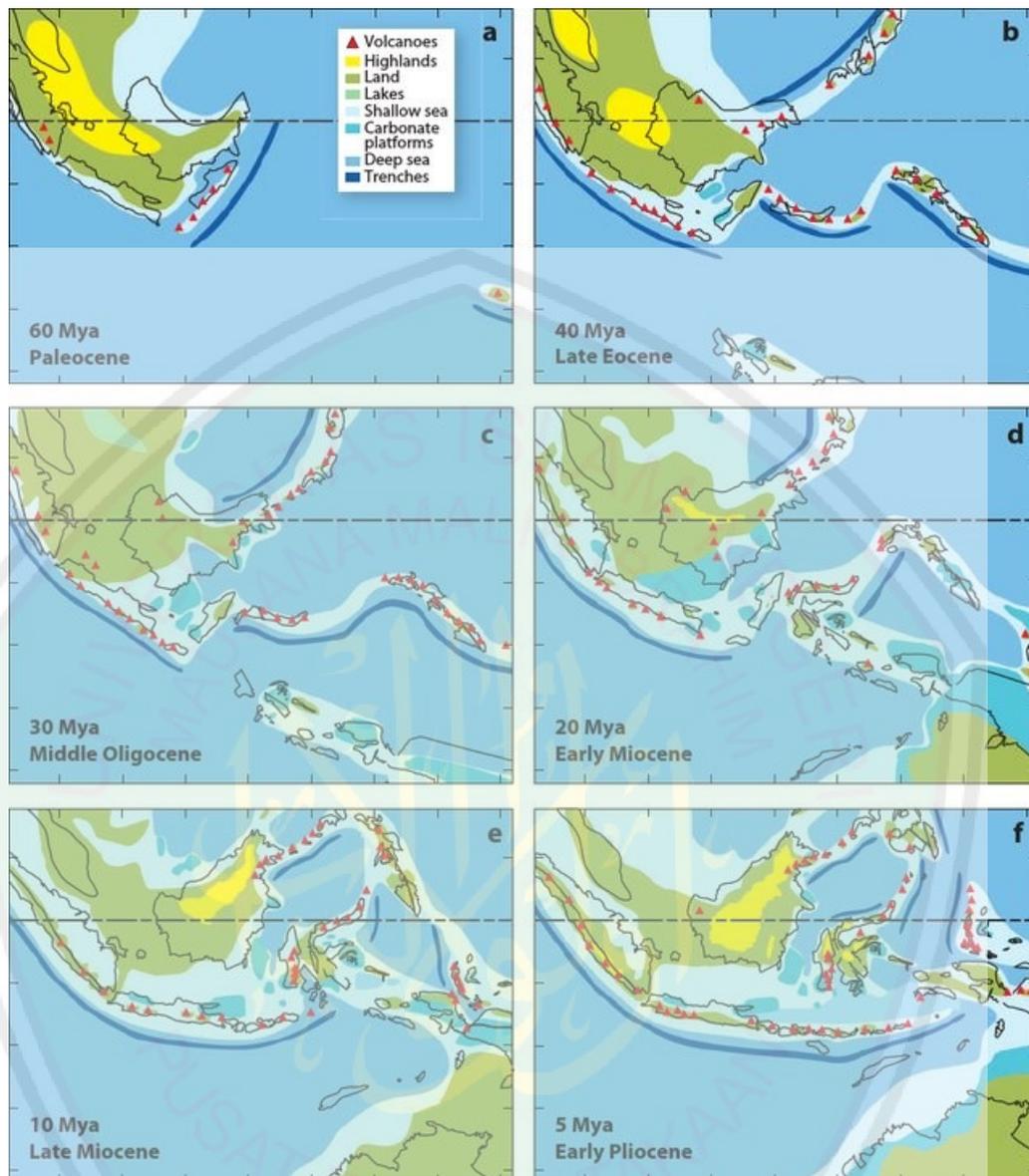
2.1 Sejarah Biogeografi Paparan Sunda

Indonesia merupakan salah satu negara kepulauan di dunia yang memiliki keanekaragaman dan biodiversitas yang tinggi (Natus, 2005). Proses yang kompleks dan letaknya yang berada di kawasan tropis, mengakibatkan keanekaragaman yang tinggi (Mittermieier dkk., 1998; Myers dkk., 2000). Keanekaragaman yang tinggi terjadi karena kompleksitas pembentukan kepulauan yang ada di Indonesia, akibat adanya aktivitas geologi berupa gesekan lempeng tektonik yang membentuk permukaan bumi (van Bemellen, 1949). Berdasarkan distribusi flora dan faunanya, Indonesia dibagi oleh garis imajiner diantaranya wilayah *Wallacea* (Sulawesi, Nusa Tenggara), Paparan Sahul (Papua-Australia), dan Paparan Sunda (Sumatera, Jawa, Borneo) (Wallace, 1876).

Paparan Sunda merupakan kontinen utama dari Asia Tenggara yang asal mulanya terbentuk pada zaman *late-Paleozoikum* sampai *early-Mesozoikum*, hasil fragmentasi atau pecahan dari benua besar *Gondwana*. Munculnya pecahan-pecahan kepulauan tersebut, dimulai dari bagian barat Australia pada zaman *Mesozoikum* yang menentukan batas tepi (*margin*) dari terbentuknya Benua Australia (Lohman dkk., 2011). Pergeseran lempeng tektonik di permukaan bumi yang menghubungkan Kepulauan di Indonesia, terjadi pada zaman *Paleocene epoch* dan *Eocene epoch* (~60 Mya) lalu berakhir sekitar 5 juta tahun yang lalu, membentuk kepulauan Indo-Australia saat ini (Gambar 2.1) (Hall, 1996; Lohman dkk., 2011).

Berdasarkan sejarah oseanogeografinya, telah terjadi penurunan permukaan air laut yang besar pada zaman *Pleistocene epoch/ glacial maximum* (~250.000 ya) (Hall, 1996). Pada waktu itu, terjadi penggabungan kembali Semenanjung Malaya, Borneo, Sumatera, dan Jawa menjadi satu kontinen Paparan Sunda yang luas. Dataran rendah yang luas dengan relief topografi dan sungai yang besar dan panjang, bermuara ke arah Laut Cina Selatan dan Laut Jawa memungkinkan adanya distribusi biota ketika kepulauan di Indonesia masih tergabung menjadi satu kontinen besar. Kemudian terjadi pemisahan kembali semenanjung Malaya, Borneo, Sumatera, dan Jawa dengan berakhirnya zaman *Pleistocene epoch/ glacial maximum*, (~10.000–17.000 ya) (Hall, 1996; Kotaki dkk., 2010). Pada masa itu, dataran rendah kembali tenggelam akibat naiknya permukaan air laut dengan peningkatan ketinggian permukaan air laut ± 120 meter, yang disebabkan oleh mencairnya es di kutub bumi (Voris, 2000).

Pergerakan berbagai spesies terbatas karena pulau-pulau yang dulunya terhubung, dibanjiri oleh permukaan air laut yang naik (Voris, 2000; Woodruff, 2010). Naiknya ketinggian permukaan laut, menjadikan beberapa populasi dari suatu spesies terisolir, menyebabkan adanya proses spesiasi akibat dari aliran gen (*gene flow*) yang berubah oleh adanya penghalang geografis. Proses ini memunculkan adanya potensi endemisitas fauna dari suatu wilayah seiring dengan berjalannya proses evolusi yang berlangsung sangat lama (Myers, 2000).



Gambar 2.1. Rekonstruksi dataran dan laut pada Kepulauan Indo-Australian pada beberapa periode Kenozoikum (Lohman dkk., 2011)

2.2 Evolusi dan Spesiasi di Paparan Sunda

Spesiasi merupakan proses terbentuknya spesies baru dari nenek moyang (*ancestor*) sebelumnya, akibat adanya proses evolusi. Seleksi alam (*Natural Selection*), isolasi reproduksi (*reproductive isolation*), dan hanyutan genetik (*genetic drift*) merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya spesiasi.

Spesiasi bisa dibagi menjadi dua berdasarkan batasannya, yaitu batasan genetik (*sympatric speciation*) dan batasan fisik (*allopatric speciation*). Jika proses spesiasi mengacu pada isolasi reproduksi, maka konsep spesiasi yang digunakan mengacu pada batasan genetik (*sympatric speciation*), dimana suatu spesies masih dimungkinkan hidup berdampingan pada suatu wilayah yang sama tanpa adanya barrier geografis. Jika konsep spesiasi mengacu pada adanya barrier geografis, maka konsep yang digunakan adalah batasan fisik (*allopatric speciation*), dimana suatu spesies hidup pada wilayah yang terpisah dalam jangka waktu yang lama karena adanya penghalang fisik (permukaan air laut, bentang alam, fragmentasi populasi) (Coyne, 1992).

Spesiasi yang terjadi di Paparan Sunda dimungkinkan terjadi karena adanya batasan fisik (*allopatric speciation*) yang terjadi pada zaman *Eocene* sampai *Pleistocene epoch*. Batasan fisik atau barrier geografis ini timbul karena pemisahan Paparan Sunda menjadi beberapa kepulauan terpisah seiring meningkatnya permukaan air, dan proses geologi dari paparan Sunda sendiri. Proses ini menjadikan beberapa wilayah menjadi terisolir dan terjadi spesiasi karena organisme yang tidak dapat bertukar gen (Coyne, 1992).

Futuyma (1988) berpendapat bahwa seleksi alam (*Natural Selection*) dan penyimpangan genetik (*genetic drift*) menyebabkan suatu populasi mengalami penyimpangan pada lungkang gennya (*gene pool*), sehingga tak dapat dihindari kemunculan adanya spesies baru. Seleksi seksual (*Sexual selection*) merupakan salah satu model spesiasi simpatrik yang turut berperan pada spesiasi yang terjadi di Paparan Sunda. Model seleksi seksual bisa berupa pemilihan pejantan oleh

betina, fenotip, *mating call*, maupun isolasi reproduksi (Turelli dkk., 2001; Porniankowski & Iwasa, 1998; Lande, 1981).

Mekanisme isolasi reproduksi juga dapat dilihat dari isolasi setelah perkawinan yang berdampak pada viabilitas organisme. Isolasi ini meliputi peristiwa mortalitas gametik (jika sperma atau telur mati pada perkawinan antar spesies yang berbeda karena perbedaan struktur gamet), mortalitas zigotik (apabila telah terjadi proses fertilisasi, namun zigot tidak dapat berkembang dengan baik), inviabilitas *hybrid* (apabila zigot berkembang menjadi organisme namun viabilitasnya menurun) dan sterilitas *hybrid* (yaitu organisme hibrida yang memiliki viabilitas normal tetapi steril secara reproduktif) (Porniankowski & Iwasa, 1998; Lande, 1981).

Bukti dari adanya spesiasi dapat dilihat dari adanya vokalisasi katak yang diteliti dari studi bioakustik secara spesifik pada panggilan kawinnya. Katak yang terdistribusi luas dan terbagi menjadi fragmen-fragmen populasi/ subpopulasi dalam waktu yang cukup lama, menghasilkan variasi dari *advertisement calls* yang berbeda. *Mating call* (panggilan kawin) berguna dalam menjelaskan proses evolusi dari amfibi karena berhubungan pada fungsinya untuk menarik betina katak (Kurniati & Hamidy, 2016). Spesiasi simpatrik berdampak pada mekanisme isolasi reproduksi yang dapat dilihat dari adanya variasi dari *mating call*. Frekuensi dan repetisi dari *mating call* akan cenderung meningkat seiring meningkatnya suhu lingkungan dan akan cenderung menurun seiring meningkatnya ukuran tubuh (Blair, 1958). Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS. Al Baqarah ayat 164 yang berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ وَالْفَلَكَ الَّتِي تَجْرِي فِي الْبَحْرِ
بِمَا يَنْفَعُ النَّاسَ وَمَا أَنْزَلَ اللَّهُ مِنَ السَّمَاءِ مِنْ مَّاءٍ فَأَحْيَا بِهِ الْأَرْضَ بَعْدَ مَوْتِهَا وَبَثَّ
فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَتَصْرِيفِ الرِّيْحِ وَالسَّحَابِ الْمُسَخَّرِ بَيْنَ السَّمَاءِ وَالْأَرْضِ لَآيَاتٍ
لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Artinya : “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, silih bergantinya malam dan siang, bahtera yang berlayar di laut membawa apa yang berguna bagi manusia, dan apa yang Allah turunkan dari langit berupa air, lalu dengan air itu Dia hidupan bumi sesudah mati (kering)-nya dan Dia sebarkan di bumi itu segala jenis hewan, dan pengisaran angin dan awan yang dikendalikan antara langit dan bumi; sungguh (terdapat) tanda-tanda (keesaan dan kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkan*”.

Ayat tersebut memberikan tanda awal adanya fakta ilmiah yang saat ini baru diketahui oleh ilmu pengetahuan modern, yaitu adanya benda-benda langit yang berada ada di angkasa. Allah SWT telah memberikan perintah untuk mempelajari fakta-fakta ilmiah yang ada di seluruh alam semesta beserta proses penciptaan dan hukum Allah yang mengatur semuanya (Shihab, 2002). Begitu juga dengan adanya fenomena variasi pada spesies amfibi yang ada di muka bumi, adanya hubungan kekerabatan, dan adanya proses pemisahan yang terjadi selayaknya wajib untuk dipelajari. Penjelasan tersebut harusnya membuat orang yang benar-benar dan serius dalam mengamati ciptaan-Nya, dapat meraba kekuasaan Allah SWT. Di balik itu semua, wajib bagi manusia yang beriman untuk berfikir dalam mempelajarinya. Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS. Al Imran ayat 190 yang berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ

Artinya : “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*”.

Shihab (2002) menafsirkan bahwa sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, perbedaan rentang waktu siang dan malam adalah sebagai tanda-tanda kekuasaan Tuhan bagi para Ulu al-Albab (orang-orang yang berpengetahuan mendalam). Ayat tersebut memberi isyarat kepada fakta-fakta kosmis yang menunjuk pada keagungan Sang Pencipta. Jalaluddin al-Mahalli & Jalaluddin as-Suyuthi (2007) menafsirkan ayat tersebut, bahwa sesungguhnya pada penciptaan (langit dan bumi) dan keajaiban-keajaiban yang terdapat pada keduanya (serta pergantian malam dan siang) dengan datang dan pergi serta bertambah dan berkurang (menjadi tanda-tanda) atau bukti-bukti atas kekuasaan Allah SWT (bagi orang-orang yang berakal) artinya yang mempergunakan pikiran mereka. Salah satu tanda-tanda kekuasaan Allah SWT yaitu dengan adanya variasi dari spesies, serta proses terbentuknya kepulauan yang berpengaruh kepada distribusi organismenya. Para Ulu al-Albab sebagai orang yang memiliki pengetahuan khusus, harusnya dapat mengamalkan ilmunya dalam mengelola dunia sebagai pemimpin di bumi (Khalifah fil-Ardh), serta memberikan kebaikan bagi alam dan tidak memberikan kerusakan di muka bumi. Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS. Al A'raaf ayat 56 yang berbunyi:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

Artinya : “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik”.

Shihab (2002) menafsirkan bahwa manusia janganlah membuat kerusakan dengan menebar kemaksiatan, kezaliman dan permusuhan. Amal sholeh ini diwujudkan dengan tidak merusak kekayaan yang sudah ada di muka bumi ini, seperti halnya perusakan alam, habitat, perburuan satwa liar yang marak terjadi. Semestinya manusia sebagai pemimpin bumi, mengelola dengan baik serta mempelajari proses evolusi, geologi, distribusi, dan divergensi untuk dapat meraba tanda-tanda kekuasaan Allah SWT.

Seiring berjalannya proses geologi yang berlangsung dalam waktu yang lama, proses evolusi terjadi. Tidak hanya terjadi pada tingkat *macroevolution*, namun juga sampai ke tingkat *microevolution*. Mikroevolusi yang terjadi pada tingkat DNA, RNA, dan protein, tengah diteliti untuk menguak hubungan kekerabatan, proses yang terjadi pada kisaran waktu tertentu dengan analisis waktu divergensi dari asam nukleat (*molecular clock*), studi mengenai fungsi DNA sampah yang juga masih belum diketahui, serta kajian-kajian lainnya seperti biogeografi yang juga berkaitan dengan proses spesiasi dari suatu spesies (Sodhi dkk., 2010).

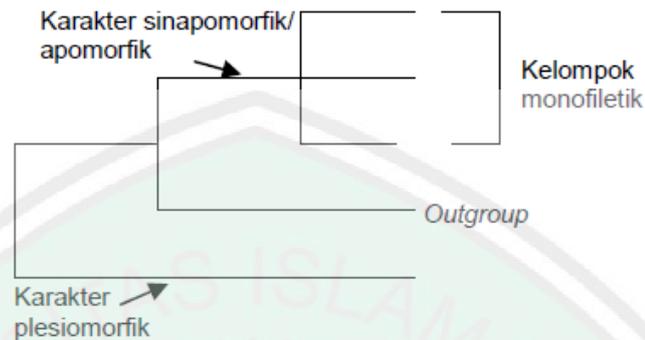
2.3 Hubungan Kekerbatan

2.3.1 Analisis Filogenetika

Analisis hubungan kekerabatan merupakan metode yang digunakan dalam mengevaluasi sistematika yang diharapkan mampu menjelaskan keanekaragaman organisme serta hubungan kekerabatannya yang digambarkan dalam sebuah klad atau filogram (Hidayat dan Pancoro, 2008). Metode ini mengkombinasikan teknik biologi molekuler (data genetik) dan karakter morfologi (data fenetik). Filogenetik memiliki konsep bahwa seluruh organisme yang saat ini ada memiliki hubungan kekerabatan satu sama lain dan diturunkan dari satu nenek moyang yang sama (*common ancestor*) dengan jumlah variasi yang bersifat tidak terbatas. Sekelompok organisme yang memiliki banyak kesamaan sifat atau karakter (*character state*) dianggap memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat (Hidayat & Pancoro, 2008).

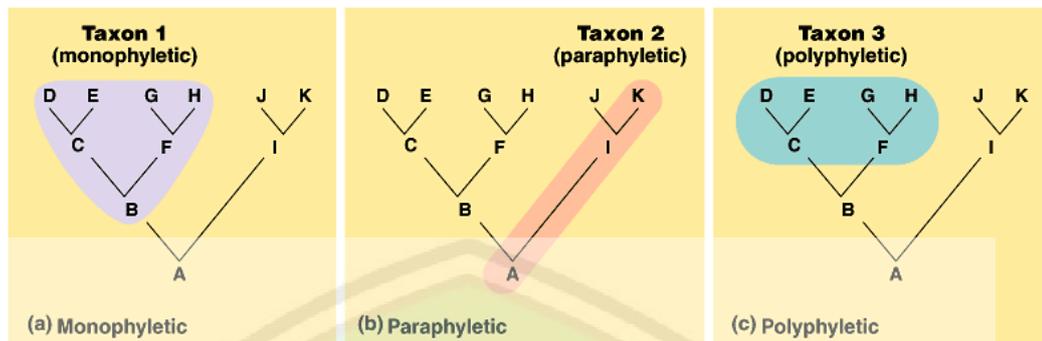
Terminologi dasar dalam mendefinisikan sebuah karakter yang membedakan spesies (*character state*) dibagi menjadi 3 diantaranya: *synapomorphy*, *apomorphy*, dan *plesiomorphy* (Hidayat dkk., 2009). Seluruh anggota yang memiliki kesamaan karakter akan membentuk sebuah klad yang sama (*synapomorphy*). Sedangkan karakter *apomorphy* merupakan karakter yang berubah secara independen dan terdapat pada kelompok/ klad *ingroup*. Karakter *plesiomorphy* merupakan karakter primitif yang terdapat pada kelompok/ klad *outgroup*. Dalam rekonstruksi pohon filogenetik, diperlukan taksa *outgroup* yang memunculkan adanya polarisasi karakter (*apomorphy* dan *plesiomorphy*) yang dikenal dengan istilah metode *outgrouping*, menghasilkan pohon yang memiliki

akar (*rooted tree*) sebagai batasan yang jelas (Gambar 2.2) (Hidayat dan Pancoro, 2008).



Gambar 2.2. Pohon kekerabatan dan polarisasi karakter dalam analisis filogenetika (Hidayat, dan Pancoro, 2008)

Rekonstruksi pohon filogenetik bertujuan untuk menyusun hubungan kekerabatan diantara organisme dengan tepat dengan memperkirakan perbedaan yang ada dari *common ancestor* terhadap *descendant*-nya. Dalam mengevaluasi pohon filogenetik, beberapa istilah yang dikenal diantaranya adalah: monofiletik (jika *common ancestor*/ nenek moyang tunggal, menghasilkan semua taksa yang diturunkan/ *descendant* dalam satu kelompok taksa sama, tidak pada kelompok taksa maupun garis keturunan yang lain, pengelompokan yang monofiletik merupakan bentuk yang ideal dalam taksonomi), polifiletik (jika *descendant* memiliki garis keturunan dua atau lebih pada *common ancestor* yang berbeda), dan parafiletik (taksa tidak termasuk ke dalam spesies yang mempunyai *common ancestor* yang sama, tetapi menurunkan spesies yang termasuk kedalam kelompok taksa tersebut) (Gambar 2.3) (Lemey dkk., 2009).



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Gambar 2.3. Istilah dalam mengevaluasi pohon filogenetik. (a) monofiletik, (b) parafiletik, (c) polifiletik (Hershkovitz & Leipe, 1998)

Karakter morfologi telah lama digunakan dalam banyak penelitian analisis hubungan kekerabatan, namun sering kali didapatkan hasil yang kurang akurat karena karakter pembeda spesies yang sulit diamati. Faktor lain yang dapat mempengaruhi adalah sifat kuantitatif yang kemudian dikendalikan oleh beberapa gen yang dipengaruhi oleh lingkungan (Hershkovitz & Leipe, 1998). Oleh karena itu, dilakukanlah analisis filogenetika molekuler dengan menggunakan sumber data dari urutan asam deoksiribonukleat (DNA), asam ribonukleat (RNA), atau protein (Hills dkk., 1996).

Sekuen DNA digunakan karena urutan DNA merupakan pengkode sifat spesifik yang sangat penting pada suatu organisme, mudah diisolasi, diekstrak, dianalisis model evolusinya secara komparatif, dan memuat banyak informasi beragam lainnya (Hills dkk., 1996). Sekuens DNA dapat memberikan informasi yang akurat terhadap karakter yang ada melalui pengujian homologi (*Alignment*) (Castrestana, 2000). DNA juga mengkode banyak sifat karakter (*character states*) yang muncul karena adanya laju perubahan dari basa nukleotida yang berbeda-beda (Hills dkk., 1996). Persyaratan yang harus dipenuhi dalam analisis filogenetik

diantaranya (HersHKovitz dan Leipe, 1998): (a) Urutan DNA memiliki sumber yang jelas dan spesifik, yaitu dari inti sel (nuDNA), kloroplas (cpDNA) atau mitokondria (mtDNA); (b) Urutan DNA bersifat homolog yang berarti diturunkan dari satu nenek moyang yang sama; (c) Urutan DNA mempunyai model substitusi yang sama (bukan campuran antara nuDNA dan mtDNA atau genom yang lainnya).

Analisis filogenetik pada umumnya melalui tiga tahapan umum, yaitu (Cavalli-Sforza & Balfourier, 1997):

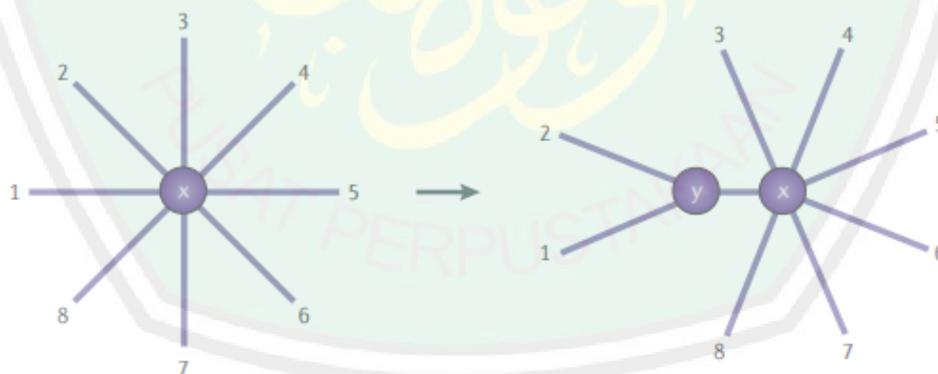
1. *Alignment*, bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya sifat homolog antara satu set sekuen DNA/protein dengan sekuen DNA/protein lainnya. *Alignment* sekuen menjadikan setiap basa nukleotida dari purin dan pirimidin (A, C, T, G) menjadi situs yang *equivalen*. Umumnya terdapat gap yang dihasilkan pada proses *alignment* karena adanya data yang hilang dan adanya proses insersi maupun delesi karena mutasi. Tahap ini sangat menentukan keberhasilan dari analisis filogenetik.
2. Rekonstruksi pohon filogenetik, dibuat berdasarkan parameter pada karakter yang ditentukan. Penggunaan karakter ini dibagi menjadi 2 metode analisis utama, yaitu *distance based method* dan *character based method*.
3. Evaluasi pohon filogenetik menggunakan uji statistik. Evaluasi ini melibatkan uji reliabilitas (*bootstrap value* dan *posterior probability*) serta uji topologi antara dua atau lebih pohon dengan metode yang berbeda.

Rekonstruksi pohon filogenetik dapat dikategorikan menjadi dua metode dasar, yaitu *distance based method* dan *character based method*. *Distance based method* adalah metode yang didasarkan pada nilai indeks *p-distance* (jarak

perbedaan antara dua/ banyak sekuen. Beberapa metode yang termasuk ke dalam *distance based model* yaitu salah satunya *Neighbor-Joining* (NJ). *character based method* adalah metode yang mengacu langsung pada urutan basa nukleotida/asam amino dalam rekonstruksi pohon filogenetik. Metode *character based model* mencakup *Maximum-Parsimony* (MP), *Maximum-Likelihood* (ML), dan *Bayesian Inference* (BI) (Lemey, 2009).

A. *Neighbor joining*

Neighbor joining (NJ) merupakan metode analisis filogenetik yang mengacu pada nilai jarak evolusioner (*p-distance*) dari *operational taxonomy unit* (OTU), yang mengasumsikan bahwa setiap percabangan berevolusi dengan laju yang berbeda (Hills, 1996). Metode ini mengkalkulasikan secara langsung jarak ke nodus internal tanpa membangun *cluster* terlebih dahulu (Hall, 1942). Algoritma dari metode ini dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Algoritma *Neighbour Joining* (klusterisasi *divisive*) (Yang & Rannala, 2012)

B. *Maximum parsimony*

Maximum parsimony merupakan metode analisis yang mengasumsikan penentuan pohon didasarkan pada jumlah substitusi minimum antar *character state* pada setiap situs dari set sekuen. Perhitungannya relatif lebih cepat dibandingkan metode *character based* yang lain, serta terbebas dari asumsi model substitusi nukleotida. Analisis ini dianggap mampu menggambarkan hubungan kekerabatan sebenarnya ketika tingkat divergensi sekuen DNA cukup rendah (Holder dan Lewis, 2003).

C. *Maximum likelihood*

Maximum likelihood merupakan metode analisis yang mengasumsikan bahwa perubahan yang terjadi pada seluruh basa nukleotida dianggap memiliki laju yang sama/ sebanding. Analisis *Maximum likelihood* membutuhkan waktu yang agak lama dalam mengkalkulasi dan mengestimasi filogramnya (Felsenstein, 1981).

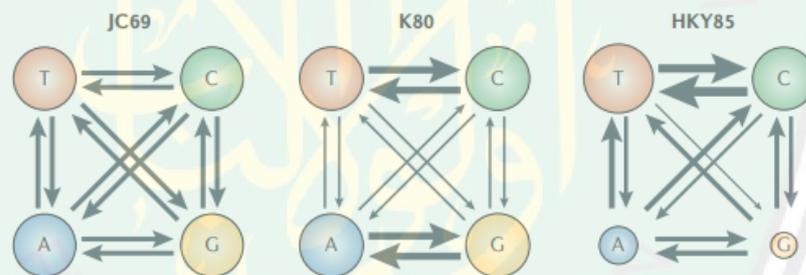
D. *Bayesian Inference*

Metode *Bayesian Inference* merupakan metode analisis terbaru yang menggunakan parameter probabilitas prior dan probabilitas posterior dalam menentukan kesimpulan statistiknya. Metode *Bayesian* dikombinasikan dengan algoritma *numerical* Monte Carlo Markov Chain (MCMC) (Yang & Rannala, 2012). Algoritma yang digunakan pada metode ini dapat dilihat pada Gambar 2.5.

$$P(T, \theta | D) = \frac{P(T, \theta) P(D | T, \theta)}{P(D)}$$

Gambar 2.5. Teorema Bayes, dimana $P(T, \theta)$ merupakan probabilitas Prior untuk pohon dengan parameter θ , $P(D | T, \theta)$ merupakan likelihood atau probabilitas dari data yang ada, dan $P(T, \theta | D)$ merupakan probabilitas posterior, dan $P(D)$ sebagai denominator (Yang & Rannala, 2012)

Dalam rekonstruksi pohon filogenetik terdapat beberapa model substitusi nukleotida. Model-model tersebut diantaranya adalah JC69 (Jukes-Cantor, 1969), K80 (Kimura, 1980), HKY85 (Hasegawa-Kimino Yane, 1985). Model ini didasarkan pada proporsi laju dan frekuensi substitusi dari nukleotida yang selanjutnya berkembang menjadi beberapa model yang lebih kompleks menyesuaikan *dataset* yang ada (Yang & Ranala, 2012) (Gambar 2.6).



Gambar 2.6. Markov models dari substitusi nukleotida, Ketebalan arah menandakan laju substitusi nukleotida, ukuran lingkaran menandakan frekuensi nukleotida untuk mencapai proses substitusi yang *equilibrium* (Yang & Rannala, 2012).

Setiap metode memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing.

Kelebihan dan kekurangan dari setiap analisis filogenetik terangkum pada Tabel

2.1.

Tabel 2.1. Rangkuman dari kelebihan dan kekurangan beberapa metode rekonstruksi pohon filogenetik.

Kelebihan	Kekurangan
<i>Parsimony methods</i>	
Simpel dan lebih intuitif	Asumsi tidak secara jelas dijabarkan, dan sulit dipahami
Hanya bekerja pada beberapa data saja (misalnya SINES dan LINES)	Kurangnya model yang digunakan, tidak bergunanya ilmu evolusi sekuen
	<i>Branch lengths</i> secara substansial diabaikan apabila laju substitusi tinggi
	Metode ini kemungkinan dapat mengalami <i>long-branch attraction</i> yang tidak merefleksikan proses evolusi
<i>Distance methods</i>	
Waktu komputasi yang sangat cepat	Kebanyakan <i>distance methods</i> (contohnya <i>Neighbour-Joining</i>), mengabaikan variasi dari estimasi jarak
Dapat diaplikasikan terhadap berbagai macam data ketika jarak genetik diketahui	Kalkulasi jarak menjadi masalah apabila sekuen divergen dan memiliki banyak gap pada <i>alignment</i>
Model untuk kalkulasi <i>distance</i> dapat dipilih menyesuaikan dengan data	<i>Negative branch length</i> tidak berarti apa-apa pada pohon
<i>Likelihood methods</i>	
Bisa menggunakan model substitusi yang kompleks, mendekati realitas biologi	Proses komputasi yang berat
Program yang kuat dalam mengestimasi parameter dan menguji hipotesa	Topologi pohon bukan merupakan parameter, sehingga sulit melakukan estimasi, proporsi dari <i>bootstrap value</i> sulit untuk diinterpretasikan
<i>Bayesian methods</i>	
Bisa menggunakan model substitusi yang realistik, seperti halnya metode <i>maximum likelihood</i>	Markov Chain Monte Carlo (MCMC) meliputi komputasi yang berat
Probabilitas Prior bisa diinterpretasikan dengan informasi lainnya	Pada dataset yang besar, Konvergensi dari MCMC dan <i>mixing problems</i> sulit untuk diketahui dan dievaluasi
Probabilitas Posterior untuk pohon dan klad mudah untuk diinterpretasikan	Probabilitas Posterior biasanya terlalu tinggi
	Seleksi model meliputi komputasi yang agak sulit

Sumber: Yang & Rannala, 2012.

2.3.2 DNA Mitokondria sebagai gen penanda: gen 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA

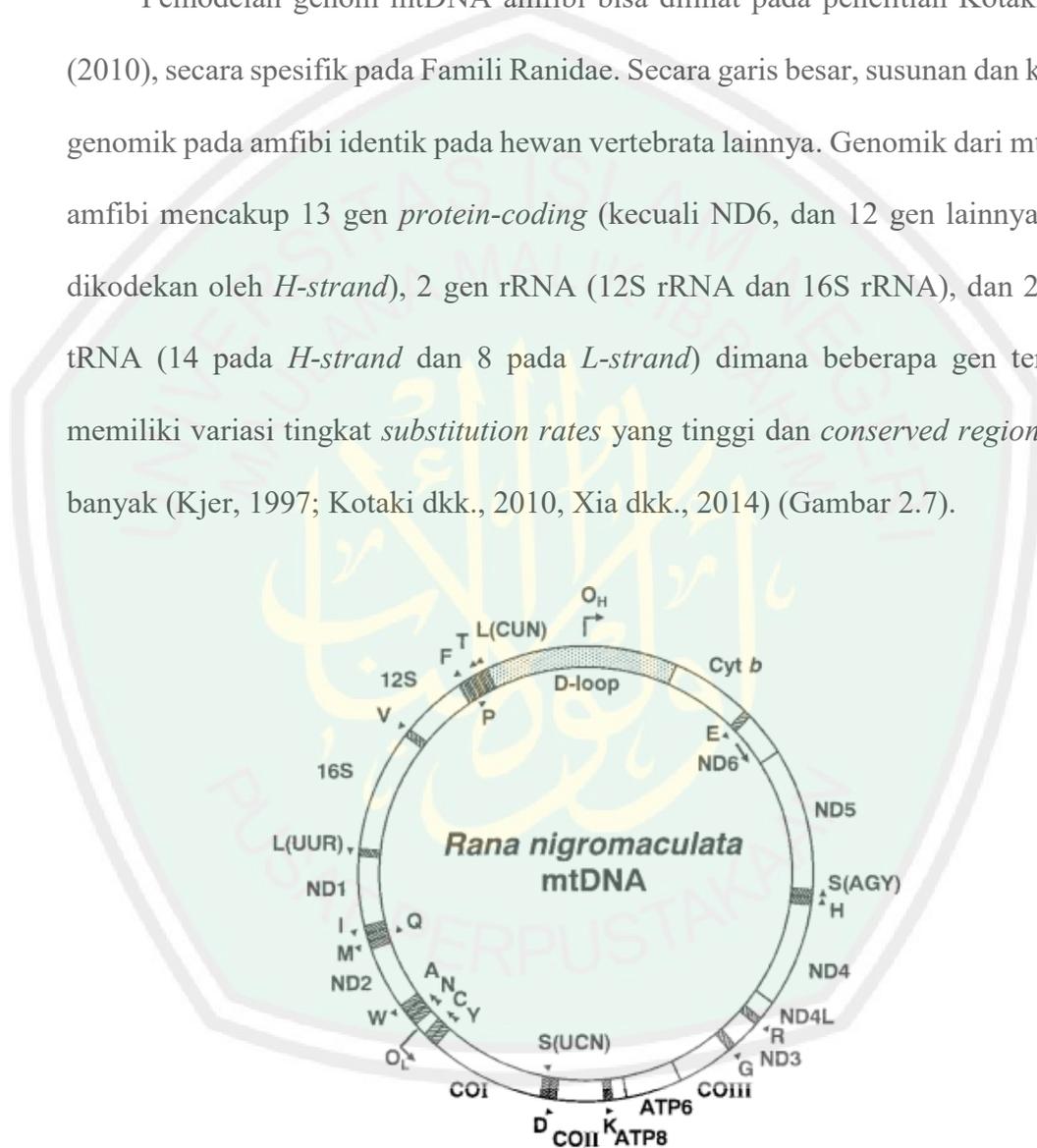
Penggunaan sekuen DNA dalam merekonstruksi pohon filogenetik dari taksa telah yang berevolusi, dapat dilakukan berdasarkan genom DNA Inti (nuDNA), genom DNA mitokondria (mtDNA), maupun genom dari klorofil dan plastida pada tumbuhan. Beberapa bagian gen dari genom tersebut memiliki material genetik yang mampu menggambarkan sejarah evolusi dan hubungan kekerabatannya. Genom mtDNA kerap digunakan dalam memodelkan sebuah pohon filogenetik dari setiap taksa (Brown dkk., 1979; Moore, 1995).

DNA mitokondria merupakan DNA sirkuler yang terdapat pada organela mitokondria di dalam sel. Mitokondria memiliki genom yang berbeda dibandingkan genom nuDNA maupun kloroplas, mengandung kurang lebih ~16 -20 kbp dan memiliki 22tRNAs, 2rRNAs, dan 13 protein dengan hanya satu *non-coding region* pada pengorganisasian genomiknya. Diperkirakan bahwa mtDNA berevolusi secara terpisah dari genom lainnya, serta memiliki kemiripan dengan genom dari bakteri dalam bermutasi (Wolstenhome, 1992; Moraes dkk., 2002).

Materi genetik mtDNA kerap digunakan dalam menyimpulkan hubungan kekerabatan maupun evolusi dikarenakan beberapa faktor. Faktor yang pertama yaitu laju evolusinya (*substitution rate*) yang tinggi dibandingkan *conserved region* yang lain. Secara spesifik, laju evolusi pada jenis hewan vertebrata diperkirakan berlangsung 5-10 kali lebih cepat dari penyalinan satu buah *copy* DNA inti pada 10 *Mya before present* (Brown dkk., 1982). Faktor kedua yaitu sifatnya langsung diturunkan dari maternal (*single linkage group/ haplotype*) sehingga merepresentasikan gambaran estimasi hubungan kekerabatan yang independen

(Moore, 1995). Faktor lainnya yaitu karakter yang kompleks, dan tersedia untuk dibandingkan meliputi: *RNA processing*, protein, tRNA, rRNA, variasi kode genetik, dan susunannya yang bervariasi (Garesse dkk., 1997).

Pemodelan genom mtDNA amfibi bisa dilihat pada penelitian Kotaki dkk. (2010), secara spesifik pada Famili Ranidae. Secara garis besar, susunan dan konten genomik pada amfibi identik pada hewan vertebrata lainnya. Genomik dari mtDNA amfibi mencakup 13 gen *protein-coding* (kecuali ND6, dan 12 gen lainnya yang dikodekan oleh *H-strand*), 2 gen rRNA (12S rRNA dan 16S rRNA), dan 22 gen tRNA (14 pada *H-strand* dan 8 pada *L-strand*) dimana beberapa gen tersebut memiliki variasi tingkat *substitution rates* yang tinggi dan *conserved region* yang banyak (Kjer, 1997; Kotaki dkk., 2010, Xia dkk., 2014) (Gambar 2.7).



Gambar 2.7. Peta genomik mitokondria secara umum pada golongan katak dari Famili Ranidae (Kotaki dkk., 2010)

Penggunaan gen dalam menyimpulkan hubungan kekerabatan dapat diraih menggunakan 2 cara fundamental yaitu *concatenated alignment* (beberapa gen

dianalisis tanpa di partisi dengan asumsi model dan laju evolusi yang sama), dan *partition alignment* (beberapa gen dianalisis dengan asumsi model dan laju evolusi yang berbeda) yang kemudian membentuk *species tree*. Penggunaan *multiple genes* terbukti mampu meresolusikan *gene trees* yang lebih valid dibandingkan *single genes* dalam beberapa kondisi (Gadagkar, 2005). Namun, hanya beberapa gen yang *conserved* yang bisa digunakan untuk analisis bahkan pada tingkatan spesies maupun populasi (Matsui dkk., 2010; Kres dkk., 2014; Meganathan dkk., 2010).

Beberapa gabungan gen mitokondria lainnya ternyata mampu mengidentifikasi spesies burung bahkan sampai ke tingkatan subspecies (Herbert dkk., 2004). Penggunaan gen 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA dalam meresolusikan pohon filogenetik pernah dilakukan sebelumnya, namun dilakukan secara independen dan belum menghasilkan pohon yang komprehensif. (Arifin dkk., 2018; Cai dkk., 2007; Stuart, 2008; Matsui dkk., 2010). Pemodelan *concatenated alignment* dengan gen 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA, juga pernah dilakukan oleh Fahmi & Kurniawan (2015), Emerson dkk., (2000) pada penelitian katak bertaring Famili Ranidae dan mampu meresolusikan pohon yang menyerupai *species tree* dan dapat digunakan sebagai *primary barcoding gene* (Kres dkk., 2014).

2.3.3 Software Analisis Filogenetika Molekuler

Beberapa software yang digunakan dalam analisis filogenetika molekuler diantaranya adalah sebagai berikut :

- a. MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), merupakan *software* analisis berisikan banyak fitur dan metode dalam analisis *phylogenomic*,

- phylomedicine*, sejarah evolusi, pohon filogenetik, *multiple sequence alignment* (MSA) dan masih banyak fitur yang lain. *Software* ini telah beberapa kali mengalami *update* dengan tampilan GUI (*graphical user interface*) yang mudah dioperasikan (Kumar dkk., 2018).
- b. gBlock merupakan *software* yang dapat mengeliminasi situs *alignment* yang buruk karena adanya *missing gap*, *ambiguous site*, maupun *missing data* secara otomatis setelah dilakukan proses *alignment*, sehingga dapat menghasilkan hasil yang lebih akurat. *Software* ini menyediakan layanan analisis secara *online server* maupun *portable offline* dengan memasukkan file berformat *.fasta* maupun *.nbrf/pir* (Castresana., 2000).
 - c. Jmodeltest, merupakan *software tools* yang berfungsi untuk mengevaluasi model evolusi dari sekuens nukleotida. *Software* ini merupakan pengembangan dari model sebelumnya yaitu ModelTest (Darriba, 2012).
 - d. PAUP* (*Phylogenetics Analysis Using Parsimony *and other methods*), merupakan *software* filogenetik komputasional yang mampu menyimpulkan pohon filogenetik dan evolusinya. *Software* ini mendukung analisis *distance matrix*, *likelihood methods*, dan *parsimony*. Program ini menggunakan data dengan format *.nexus* dalam analisisnya (Swofford, 2002).
 - e. Kakusan 4 merupakan *software* untuk menyeleksi model substitusi nukleotida dan konfigurasi secara otomatis pada setiap gen untuk setiap model yang digunakan (*mixed model*). Keleluasannya menjadi kelebihan daripada *software* yang lain (Tanabe, 2007)

- f. MrBayes merupakan *software* untuk melakukan analisis *Bayesian Inference* dengan pilihan model yang bervariasi dalam menentukan pohon filogenetik dan model evolusinya. Program ini menggunakan metode algoritma *numerical* Markov Chain Monte Carlo (MCMC) untuk mengestimasi distribusi posterior dari parameter modelnya (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).
- g. FigTree merupakan *software* yang didesain untuk memvisualisasikan pohon filogenetik dan kronogram yang siap untuk dipublikasikan. Program ini didesain khusus untuk menampilkan *summarized* dan *annotated trees* yang diproduksi oleh *software* analisis BEAST. (Drummond & Rambaut, 2007).

2.4 Estimasi Waktu Divergensi Genetik

2.4.1 Konsep Molecular Clock

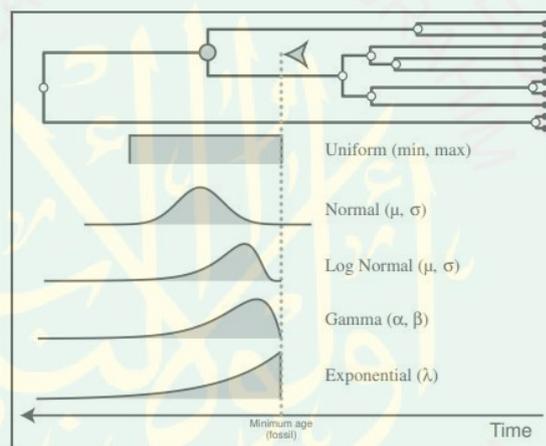
Perubahan genetik mengarah pada proses evolusi yang terjadi ketika terdapat suatu populasi yang terisolir karena barrier geografis maupun isolasi reproduktif. Batasan tersebut mengubah aliran gen (*gene flow*) dan menyebabkan peristiwa hanyutan genetik (*genetic drift*). Seiring berjalannya waktu dan proses yang sangat lama, terjadi mutasi alami dari sebuah populasi menjadi subpopulasi yang baru akibat dari aliran gen (*gene flow*) yang berbeda (Ho, 2008). Proses tersebut dapat dikalkulasi dan diestimasi menggunakan sebuah hipotesis yaitu *molecular clocks*, sebuah teknik yang menggunakan laju mutasi untuk menentukan waktu divergensi saat dua organisme saling berpisah/ berdivergensi, menggunakan data sekuen DNA, asam amino, fosil maupun data arkeologi lainnya (Kumar, 2005).

Hipotesis *molecular clocks* pertama kali diperkenalkan oleh Zuckerkandl dan Pauling (Fahmi & Kurniawan, 2015) melalui observasi empiris dari jumlah asam amino dari hemoglobin antar garis keturunan berbeda yang berubah linear dengan waktu sesuai estimasi dari data fosil. Hipotesis ini kemudian diperkuat lagi oleh Kimura (1968), tentang laju evolusi di tingkat molekuler. Penggunaan *molecular clocks* dapat menghasilkan gambaran rekonstruksi dari sejarah evolusi yang lebih jelas berdasarkan organisme yang berdivergensi sesuai dengan waktu seperti halnya evolusi manusia, sejarah migrasinya (Ke dkk.,2001), terjadinya proses spesiasi pada zaman tertentu (Klicka dan Zin, 1997), serta terjadinya radiasi pada kelompok organisme besar seperti hewan dan tumbuhan (Wang dkk., 1999).

Implementasi *molecular clocks* dikalibrasikan dengan kejadian *independent*. Kejadian *independent* merupakan jangka estimasi dari penelitian sebelumnya, fosil, maupun data geologi lainnya (Hills dkk., 1996). Kalibrasi ini dikonversikan kedalam beberapa bentuk distribusi diantaranya: *uniform distribution*, *gamma distribution*, *exponential distribution*, *lognormal distribution*, dan *normal distribution*.

Uniform distribution digunakan ketika data kalibrasi memiliki batas maksimum yang didapatkan melalui sumber eksternal (*bracketting*) dan batas minimum yang didapatkan dari data fosil (Gambar 2.8). Sedangkan *normal distribution* tidak cocok digunakan untuk data yang bersumber dari data fosil, namun berfungsi optimal ketika digunakan oleh data yang bersumber dari kalibrasi utama waktu biogeografi dan kalibrasi sekunder. *Gamma distribution* merupakan distribusi yang digunakan sebagai prior dalam menskalasi penyimpulan metode

Bayesian (*Bayesian Inference*) yang didasarkan pada dua parameter yaitu parameter skalar (α) dan parameter rata-rata (λ) (Gambar 2.8). *Exponential distribution* merupakan distribusi yang mirip dengan *gamma distribution*, dengan distribusi yang lebih dispesifikasikan oleh parameter rata-rata (λ) (Gambar 2.8). Distribusi ini fungsional untuk data kalibrasi fosil yang dekat dengan titik *ancestral*. Sedangkan *Log-normal distribution* merupakan distribusi yang digunakan untuk data kalibrasi yang lebih tua jika dibandingkan dengan fosil, dengan probabilitas *non-zero* - ∞ (Ho, 2007).



Gambar 2.8. Parameter distribusi yang digunakan sebagai *priors* ketika melakukan kalibrasi (Ho dan Phillips, 2009).

Molecular clocks memiliki parameter *tree prior* dalam perhitungan statistik dan penentuan pohonnya. *Tree prior* adalah komponen dalam analisis Bayesian untuk penentuan waktu divergensi. Dalam hal ini, estimasi waktu divergensi yang digunakan untuk membandingkan sekuen adalah *the Birth-Death model* dan *yule model*. *Tree prior* yang didasarkan pada proses *Birth-Death* mengasumsikan bahwa *descendant* yang teradiasi/ terspesiasi maupun punah sangat bergantung pada parameter rata-rata tunggal untuk spesiasi ($birth = \lambda$), dan rata-rata tunggal untuk

punah ($death = \mu$). Sedangkan *yule model* mengasumsikan bentuk prior khusus terspesifikasi pada proses spesiasi (*Birth*) dengan proses kepunahan tidak dipertimbangkan ($\mu=0$) (Stadler, 2010).

Parameter lain dalam *molecular clocks* yang digunakan yaitu *model clocks*, yaitu model yang menspesifikasikan garis keturunan berdasarkan laju substitusi (*lineage-specific rate variation*). Model yang paling sederhana adalah *global molecular clocks* yang menggunakan parameter tunggal untuk menskalasi waktu evolusi yang bekerja dengan mengestimasi substitusi genetik tiap situs DNA per tahun maupun persatu juta tahun dengan laju substitusi yang konstan pada waktu. Model ini hanya digunakan untuk menganalisis data sampel khusus pada sekuen intraspesifik (Brown & Yang, 2011). Model lain yang bisa digunakan yaitu *Autocorrelated rates*, dimana laju substitusi meningkat bertahap pada pohon yang diestimasi (Thorne dan Kishino, 2002).

2.4.2 Software Estimasi Waktu Divergensi

Beberapa software yang digunakan untuk mengestimasi waktu divergensi genetik terangkum dalam sebuah paket software yaitu *BEAST v2.4.1 package* (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (Drummond & Rambaut, 2007) yang berisikan software antara lain :

1. BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*)

BEAST merupakan *software open source* dalam analisis model *Bayesian Inference* berdasarkan data sekuen menggunakan penghitungan algoritma *numerical MCMC* (*Monte Carlo Marcov Chain*). *Software* ini digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik dengan model variasi substitusi tertentu, estimasi

waktu divergensi dan kalibrasi fosil, serta partisi model untuk data yang heterogen. Beberapa *clock model* yang dapat dijalankan dalam BEAST antara lain: *global molecular clocks*, *local molecular clocks*, *compound poisson process*, *autocorrelated rates substitution rates evolve gradually over the tree* dan *uncorrelated rate* (Drummond & Rambaut, 2007). Penentuan kalibrasi merupakan faktor penting mengingat data independen merupakan satu-satunya informasi absolut yang digunakan untuk mendukung data, serta menjadi referensi waktu penentuan data molekuler. Kalibrasi yang digunakan dalam *clock model* adalah informasi data fosil atau kejadian biogeografi (Woods, 2012).

2. BEAUti (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*)

BEAUti merupakan *software utility* dalam menghasilkan *BEAST *input files* yang biasanya dibuat dalam bahasa pemrograman berformat .xml (*Extensible Markup Language*) (Drummond & Rambaut, 2007). Aplikasi ini mempermudah *setting* parameter semisal *specify priors*, *partition data*, *calibrate internal nodes*, dan parameter lainnya secara otomatis dengan GUI yang mudah, dibandingkan dengan meng-*coding* secara manual dalam bahasa pemrograman .XML (*Extensible Markup Language*) (Woods, 2012).

3. LogCombiner

LogCombiner merupakan *software* yang dapat mengkombinasikan *output file* berupa *log files* atau *tree files* dari data hasil analisis (*output*) ganda yang diperoleh dari BEAST (Drummond & Rambaut, 2007). Hasil dari kombinasi tersebut kemudian dapat diolah dalam *software Tracer (log files)* dan *software TreeAnnotator (tree files)* (Woods, 2012).

4. TreeAnnotator

TreeAnnotator yaitu *software* yang digunakan untuk meringkas (*summary*) *posterior sample* dari *tree files* (Drummond & Rambaut, 2007). *Software* ini mampu merekonstruksi pohon dengan *maximum clade credibility* yang dapat dipercaya, dengan men-*discard* beberapa pohon yang dihasilkan sehingga dapat memvisualisasikan satu *true tree* (pohon sebenarnya) (Woods, 2012).

5. Tracer

Tracer digunakan untuk menaksir, menginspeksi dan melihat konvergensi serta kestasioneran dari estimasi probabilitas posterior dan estimasi prior dari beberapa parameter yang dihasilkan setelah proses MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) (Drummond & Rambaut, 2007). *Software* ini juga digunakan untuk mengkalkulasi interval densitas posterior tertinggi (*High Probability Density*) 95% dan nilai efektifitas ukuran sampel (*Effective Sampling Size*) dari beberapa parameter (Woods, 2012).

2.5 Hubungan antara Biogeografi dan Kekerabatan

Biogeografi merupakan ilmu yang menggabungkan antara Biologi dan Geografi. Ilmu ini membahas khusus tentang proses persebaran flora maupun fauna yang berhubungan dengan faktor-faktor lingkungan dan geologi (Inger & Voris, 2001; Cox & Moore, 2010). Secara spesifik, bidang biogeografi dibagi kedalam dua cabang yaitu fitogeografi yang khusus membahas tentang flora, dan zoogeografi yang khusus membahas tentang fauna. Zoogeografi merupakan disiplin ilmu biogeografi yang khusus mempelajari penyebaran spesies hewan di permukaan bumi sejak masa lalu sampai zaman sekarang. Banyak bukti diketahui bahwasanya

jenis binatang spesifik dapat berdistribusi ke penjuru bumi, sedangkan hewan yang lain hanya hidup pada kondisi dan karakteristik khusus (Darlington, 1957). Biogeografi berguna dalam memahami pola, proses, dan faktor yang mempengaruhi distribusi flora maupun fauna yang tentunya akan berkorelasi dengan hubungan kekerabatan serta sejarah evolusi dari organisme tertentu (Rotramel, 1973). Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS. An-Nuur ayat 45 yang berbunyi :

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى بَطْنِهِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى
بَطْنِهِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى أَرْبَعٍ إِنَّ اللَّهَ عَلَى كُلِّ شَيْءٍ
قَدِيرٌ

Artinya : *“Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu”.*

Potongan ayat tersebut menjelaskan Allah SWT dalam melakukan proses penciptaan semua makhluk hidup yang berasal dari air (Abdullah, 2004).. Allah SWT menghidupkan berbagai organisme di bumi dengan berbagai pola pergerakan, penampakan, golongan dan genetik (DNA) yang berbeda. Seperti adanya hewan yang mampu berjalan di atas perutnya yang bisa dicontohkan dari golongan ular (*Ophidia*), dan hewan yang berjalan menggunakan kedua kakinya seperti manusia, dan hewan yang berjalan menggunakan keempat kakinya seperti kambing dan sapi. Ayat ini mengisyaratkan adanya pengklasifikasian dari kelompok dan golongan hewan tertentu yang telah diciptakan oleh Allah SWT karena memiliki kemiripan satu sama lain pada setiap golongan, salah satu contohnya dari caranya bergerak.

Proses terjadinya kemiripan atau kekerabatan ini terjadi melalui proses yang sangat lama, dan karena-Nya Allah berkuasa atas segala sesuatu yang diciptakan-Nya.

2.6 Sistematika *Amolops* Cope, 1865 Sensus lato

2.6.1 Sensus lato dan Sensus stricto

Sensus merupakan bahasa latin yang berarti “sesuai dengan” dan sering kali digunakan pada bidang biologi khususnya taksonomi dan sistematika. Penggunaan terminologi ini didasarkan pada kebutuhannya dalam mengartikan sebuah konsep. Dalam taksonomi, dikenal *sensus stricto*; *sensus strictiore*; *sensus stricissimo* atau dalam arti yang lebih sempit “*in the strict sense*”. Sedangkan terminologi lainnya, dikenal istilah *Sensus lato*; *sensus latiore*; *sensus latissimo* atau yang berarti dalam arti luas “*in the broader meaning*”. Penggunaan terminologi ini didasarkan pada kebutuhan dalam memisahkan dan mengkategorikan sebuah taksa (Fishbase, 2017).

2.6.2 Amfibi & Sejarah Taksonomi, Klasifikasi, Morfologi dari *Amolops* Cope, 1865 Sensus lato

Sistematika dari Kelas Amphibia kedalam tiga Ordo yang tersebar di seluruh dunia. Kelas Amphibia dibagi menjadi Ordo Caudata (Salamander), Ordo Anura (Katak dan kodok), dan Ordo Gymnophiona (Caecillia) (Zug & Caldwell, 2001). Anura merupakan satu dari tiga Ordo yang memiliki jumlah taksa terbesar dan beragam (6.582 spesies katak dan kodok), dan akan terus bertambah melihat daerah-daerah terisolir yang masih belum diteliti saat ini (Nishikawa dkk., 2012).

Sejumlah 436 spesies berasal dari Indonesia telah mewakili 15% spesies di dunia. Beberapa Famili Katak yang terdapat di Indonesia diantaranya : Bombinatoridae, Bufonidae, Dicroglossidae, Microhylidae, Rhacoporidae, Megophryidae, & golongan katak yang berdiversifikasi tinggi yaitu Famili Ranidae

(Iskandar, 1998). Ranidae merupakan golongan Katak Sejati yang berdistribusi luas di seluruh wilayah Indonesia, dan memiliki sejarah tata nama yang kompleks. Beberapa genus yang termasuk ke dalam Famili Ranidae diantaranya yaitu: *Hyalarana*, *Chalcorana*, *Odorrana*, *Staurois*, *Sumatrana*, *Lithobates*, *Papurana*, *Pulchrana*, dan *Meristogenys* & *Huia* yang dulu pernah menjadi satu genera kompleks dalam sekelompok taksa *Amolops* (Frost dkk., 2006).

Amolops Cope, 1865 (*Cascade Frog*) merupakan katak dari Famili Ranidae yang berdistribusi di Asia Tenggara. Katak ini memiliki kemampuan bertahan hidup di daerah sungai yang beraliran deras (*torrent*) karena adanya bentukan *abdominal sucker* pada fase berudu (*gastromyzophorous tadpole type*) (Gambar 2.9) sehingga mampu menempel pada bebatuan di sungai (Inger, 1966). Yang (1991) membagi genus ini menjadi tiga kelompok genus dalam *Amolops* sensu Inger (1966) berdasarkan analisis filogenetik dan karakter morfologi, yaitu genera *Amolops* sensu stricto, dan genera baru yaitu *Meristogenys* dan *Huia*.



Gambar 2.9. Larvae dengan tipe berudu *gastromyzophorous*, dengan karakter morfologi khusus berupa *abdominal sucker*, dimiliki oleh seluruh katak dari *Amolops* Cope, 1865 Sensu lato; kiri: jantan, kanan: betina, skala: 1 mm (Arifin dkk., 2018)

Adapun klasifikasi dari *Amolops* Cope, 1865 Sensu lato yaitu (Shimada dkk., 2015):

Kerajaan: Animalia

Filum: Chordata

Kelas: Amphibia

Ordo: Anura

Famili: Ranidae

Genus : *Amolops* Cope, 1865

Huia Yang, 1991

Meristogenys Yang, 1991

Pengelompokkan *Amolops* didasarkan pada beberapa kesamaan karakteristik (*synapomorphy*) dengan adanya *abdominal sucker* dan kelenjar racun pada sisi dorsal dan ventral. Penamaan genera *Meristogenys* didasarkan pada satu kesamaan karakter (*synapomorphy*) dengan larvae memiliki bentuk paruh atas yang terbagi dan berusuk di permukaan luarnya. Sedangkan genera *Huia* didasarkan pada satu karakter *synapomorphy* dengan larvae yang memiliki “kelenjar yang acak pada punggung” (Yang, 1991). Namun karakter pada *Huia* yang dievaluasi oleh Yang (1991), tidak ditemukan pada *Huia cavitympanum* (Inger, 1985). Penelitian selanjutnya menyebutkan bahwa ternyata karakter *synapomorphy* dari genus *Amolops* juga ditemukan pada genera yang lain. Kemudian Yang (1991) menyatukan kembali ketiga genera ini dalam sebuah subfamili Amolopinae pada Famili Ranidae. Namun Dubois (1992) tidak setuju dengan revisi taksonomi ini, dan menempatkan tiga genus yang dimaksudkan Yang (1991) ke dalam subgenera dari *Amolops*. Dalam hal ini, Yang (1991) gagal dalam mengidentifikasi kesamaan karakter morfologi ketika mendeskripsikan *Huia*, sehingga menimbulkan kerancuan/ kebingungan, dan dapat diperkirakan bahwa *Huia* tidak

merepresentasikan kelompok yang alami (*natural group*). Doria dkk. (1999) juga merekomendasikan tingkatan taksa dari *Huia* sebagai subgenus dari *Amolops* Cope, 1865, namun sebagian besar peneliti sekarang mengkategorikan *Huia* pada tingkatan taksa Genus (Inger dkk., 1966).

Analisis filogenetik telah dilakukan oleh beberapa peneliti untuk membuktikan kejelasan sistematika dari *Amolops* Cope, 1865 Sensus lato. *Amolops tormotus* China terbukti *paraphyly* dan bahkan bersarang (*nested*) pada kelompok dari klad *Odorrana* berdasarkan analisis mtDNA (Cai dkk., 2007). Masalah filogenetik juga ditemukan pada *Huia* dan ditemukan bahwa *type species* dari Genus *Huia* ditemukan di empat *lineages* berbeda berdasarkan analisis DNA inti dari gen RAG-1 dan gen tyrosinase (Stuart, 2007). Penelitian terbaru menyatakan bahwa katak ini tergolong tidak stabil secara taksonomi, dan diperlukan pengamatan morfologi dan anatomi secara mendetail untuk menemukan kesamaan karakter *synapomoprhy*, serta dataset sekuen DNA yang lebih banyak dan kuat untuk dikomparasikan (Arifin dkk., 2018).

Amolops sensu Inger, 1966 mengategorikan beberapa spesies yang saat ini telah teridentifikasi. *Amolops* Sensus stricto Yang, 1991 memiliki total 55 taksa, dengan *Huia* sensu Frost, 2006 memiliki 5 taksa, dan *Meristogenys* sensu Yang, 1991 memiliki 13 taksa yang tersebar di Asia. Paparan Sunda sendiri memiliki beberapa spesies yang masuk ke dalam *Amolops* Sensus lato khususnya di Indonesia, diantaranya dari genera *Huia* dan *Meristogenys* (Frost dkk., 2006).

Spesies dari Genus *Huia* yang diakui saat ini memiliki 4 taksa yaitu *Huia cavitympanum* (Boulenger, 1893) dari Borneo, *Huia masonii* (Boulenger, 1884)

endemik Jawa, *Huia modiglianii* (Doria, Salvidio, dan Tavano, 1999) endemik danau Toba, dan *Huia sumatrana* Yang, 1991 yang berasal dari Sumatra (Frost dkk., 2006) (Gambar 2.10). Validitas dari *H. modiglianii* masih diragukan oleh beberapa peneliti (Stuart, 2007; Yang, 1991) karena kurangnya data dan deskripsi yang lengkap. Salah satu *type species* dari *Huia* yang bisa dijadikan anggota tambahan (*putative member*) karena kemiripan karakternya hidup di sungai dengan aliran deras yaitu *Odorrana hossii* (Boulenger, 1891).



Gambar 2.10. Dokumentasi Katak dari dari Genus *Huia*: (a) *Huia masonii*, (b) *Huia sumatrana*, (c) *Huia cavitympanum* (IUCN, 2018)

Genus *Meristogenys* terdiri dari 13 taksa yang seluruhnya berdistribusi di Borneo diantaranya adalah *Meristogenys amoropalamus* (Matsui, 1986), *Meristogenys dyscritus* (Shimada, Matsui, Yambun Imbun, & Sudin, 2011), *Meristogenys kinabaluensis* (Inger, 1966), *Meristogenys macrophthalmus* Yang, 1991, *Meristogenys maryatiae* (Matsui, Shimada, & Sudin, 2010), *Meristogenys orphnocnemis* (Matsui, 1986), *Meristogenys penrissenensis* (Shimada, Matsui, Nishikawa, & Eto, 2015) *Meristogenys phaeomerus* (Inger dan Gritis, 1983), *Meristogenys poecilus* (Inger dan Gritis, 1983), *Meristogenys stenocephalus* (Shimada, Matsui, Yambun Imbun, & Sudin, 2011), *Meristogenys stigmachilus* (Shimada, Matsui, Yambun Imbun, & Sudin, 2011), dan *Meristogenys whiteheadi* (Boulenger, 1887) (Gambar 2.11).



Gambar 2.11. Dokumentasi Katak dari Genus *Meristogenys*: (a) *M. amoropalamus*, (b) *M. dyscritus*, (c) *M. jerboa*, (d) *M. kinabaluensis*, (e) *M. macrophthalmus*, (f) *M. maryatiaae*, (g) *M. orphnocnemis*, (h) *M. penrissenensis*, (i) *M. phaeomerus*, (j) *M. poecilus*, (k) *M. stenocephalus*, (l) *M. stigmachilus*, (m) *M. whiteheadi* (IUCN, 2018)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif statistik. Objek penelitiannya yaitu *dataset* sekuen *Ingroup* dari beberapa gen dari genom mitokondria (mtDNA) yaitu 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA dari *Amolops Cope*, 1865 Sensus lato yang terdiri dari Genus *Huia*, *Meristogenys* dan anggota *putatif* lainnya yaitu *Odorrana* beserta *outgroup*-nya (Tabel 3.1). Sekuen dari spesies *M. macrophthalmus*, *M. penrissenensis*, *M. phaemorus*, dan *H. modiglianii* tidak digunakan dalam analisis karena kurangnya data sekuen dari database. Hasil analisis filogenetik yang didapatkan, dibandingkan dengan literatur dan penelitian sebelumnya. Validitas dibuktikan dengan topologi dan nilai kredibilitas yang mendukung sehingga analisis estimasi waktu divergensi dapat dilakukan.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2019 – Maret 2019, bertempat di Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

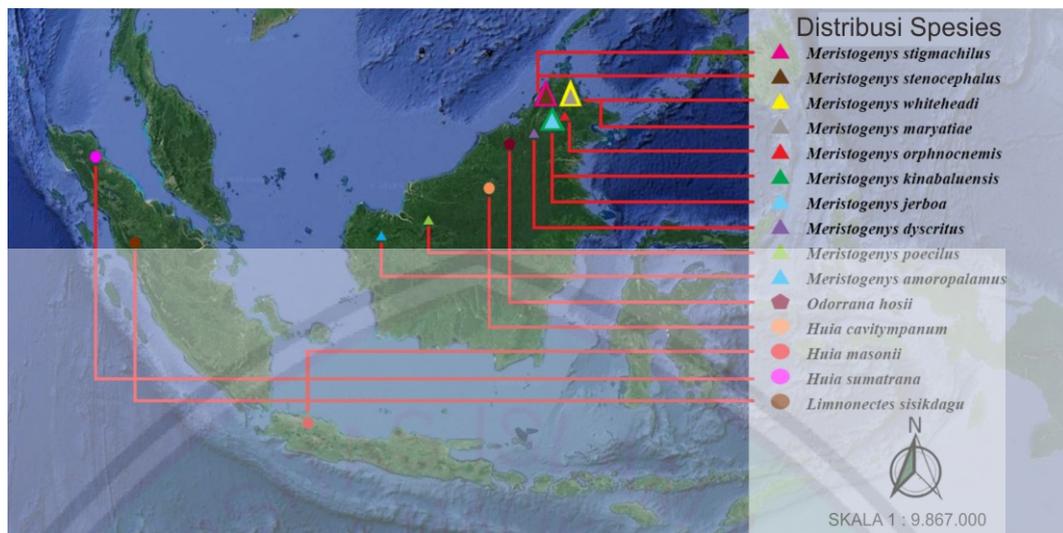
3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah Laptop ASUS X550DP AMD A10-5750M APU ~2.5 GHz dengan Memory 8192MB RAM. Sedangkan aplikasi yang digunakan diantaranya: MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetic Analyses*), gblock v0.91b, Jmodeltest v2.1.10, PAUP* v4.0b1, Kakusan4 v4.0.2010.09.28, MrBayes v3.0b4, FigTree v1.4.3, dan BEAST v2.4.1 (Bayesian Evolutionary

Analysis Sampling Tree) *package* berisikan BEAST, BEAUti, LogCombiner, TreeAnnotator, dan Tracer. Bahan yang digunakan untuk analisis adalah data sekuen *Ingroup* dan *Outgroup* (Tabel 3.1 dan Gambar 3.1).

Tabel 3.1. Data sekuen mtDNA (12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA dari *Amolops* Cope, 1865.

Spesies	Sumber	Nomor Aksesori <i>GenBank</i>			Lokalitas
		12S rRNA	tRNA ^{val}	16S rRNA	
<i>Huia masonii</i>	Brown dkk., (2015)	KP298037.1	KP298037.1	KP298037.1	West Java Province Java
<i>Huia cavitympanum</i>	Arifin dkk., (2018)	MG909681.1	MG909602.1	MG909602.1	Sabah, Borneo
<i>Huia sumatrana</i>	Arifin dkk., (2018)	MG909677.1	MG909600.1	MG909600.1	Langkat, North Sumatera
<i>Meristogenys amoropalamus</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526619.1	AB526619.1	AB526619.1	Mahua Waterfall, Sabah, Borneo
<i>Meristogenys dyscritus</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526616.1	AB526616.1	AB526616.1	Crocker Range National Park, Kimanus Sabah Borneo
<i>Meristogenys jerboa</i>	Matsui dkk., (2010)	LC055963.1	LC055963.1	LC055963.1	Sarawak, Serian, Ranchan: Malaysia
<i>Meristogenys kinabaluensis</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526618.1	AB526618.1	AB526618.1	Mahua Waterfall, Sabah Borneo
<i>Meristogenys maryatiae</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526611.1	AB526611.1	AB526611.1	Crocker Range National Park, Kimanus Sabah Borneo
<i>Meristogenys orphnocnemis</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526613.1	AB526613.1	AB526613.1	Mahua Waterfall, Sabah Borneo
<i>Meristogenys poecilus</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526610.1	AB526610.1	AB526610.1	Lanjak Entimau, Sarawak
<i>Meristogenys stenocephalus</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526612.1	AB526612.1	AB526612.1	Crocker Range National Park, Kimanus, Sabah Borneo
<i>Meristogenys stigmachillus</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526614.1	AB526614.1	AB526614.1	Crocker Range National Park, Mahua, Sabah Borneo
<i>Meristogenys whiteheadi</i>	Shimada dkk., (2011)	AB526617.1	AB526617.1	AB526617.1	Wario Kinabalu Park, Sabah Borneo
<i>Odorrana hosii</i>	Arifin dkk., (2018)	MG909647.1	MG909605.1	MG909605.1	Palungan Gunung Marad, Sarawak Borneo
<i>Limnonectes sisikdagu</i>	McLeod dkk., (2011)	JF836880.1	JF836880.1	JF836880.1	Sumatra Barat, Indonesia

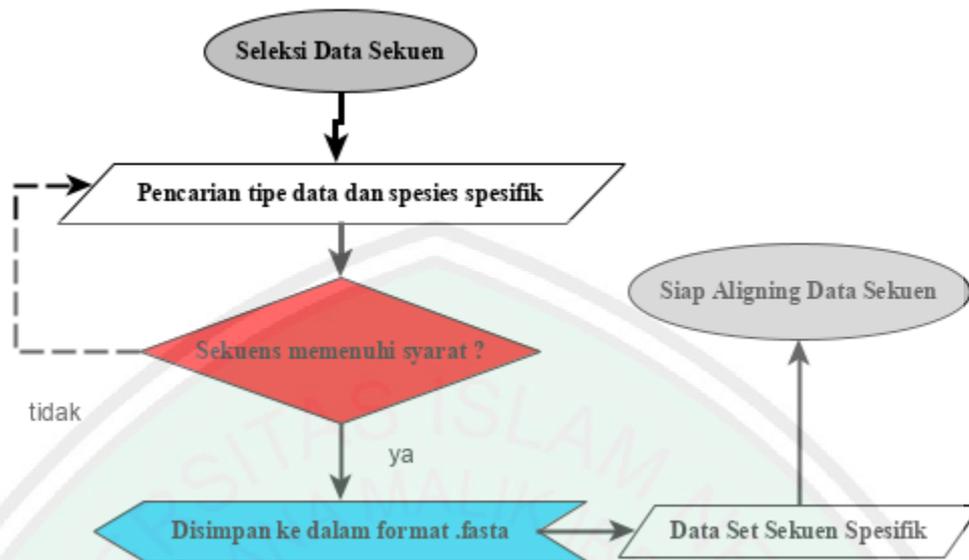


Gambar 3.1. Peta distribusi dan spesimen yang diteliti, (peta diproyeksikan menggunakan QGIS 2.18 berdasarkan data lokalitas sebenarnya)

3.4 Langkah Kerja

3.4.1 Seleksi Data Sekuen

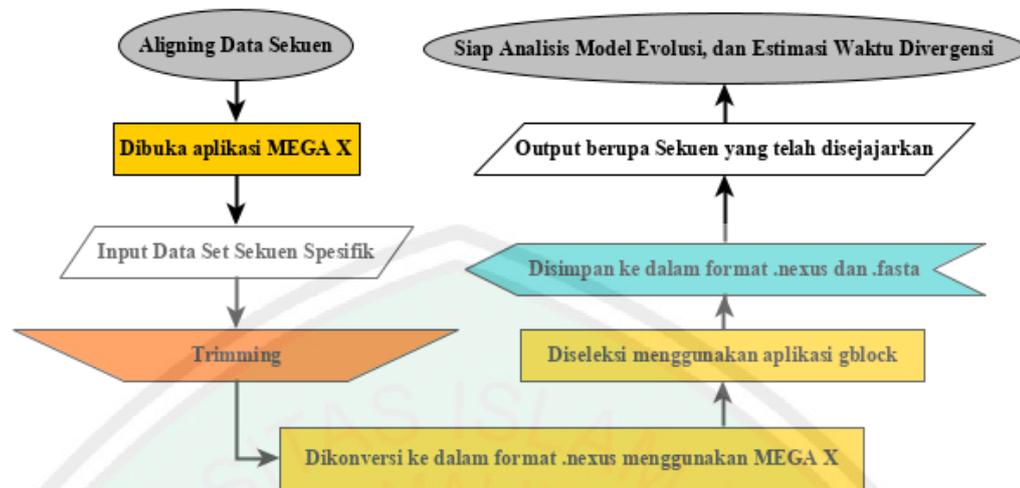
Seleksi sekuen DNA mitokondria 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA dari *Amolops* Cope, 1865 Sensu lato yang terdiri dari Genus *Huia*, *Meristogenys*, dan *Odorrana* (Frost dkk., 2006) dilakukan untuk menseleksi sekuen *dataset* spesifik. Sekuen diambil dari database GenBank NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*). Pengambilan sekuen didasarkan pada data asal geografi dan persebaran yang jelas, dengan panjang sekuen setiap sampel ~1900 bp, yang disimpan dalam format FASTA, kemudian dilakukan pensejajaran (*Aligning*) (Gambar 3.2, Lampiran 1).



Gambar 3.2. *Flow Chart* seleksi data sekuen

3.4.2 *Aligning* Data Sekuen

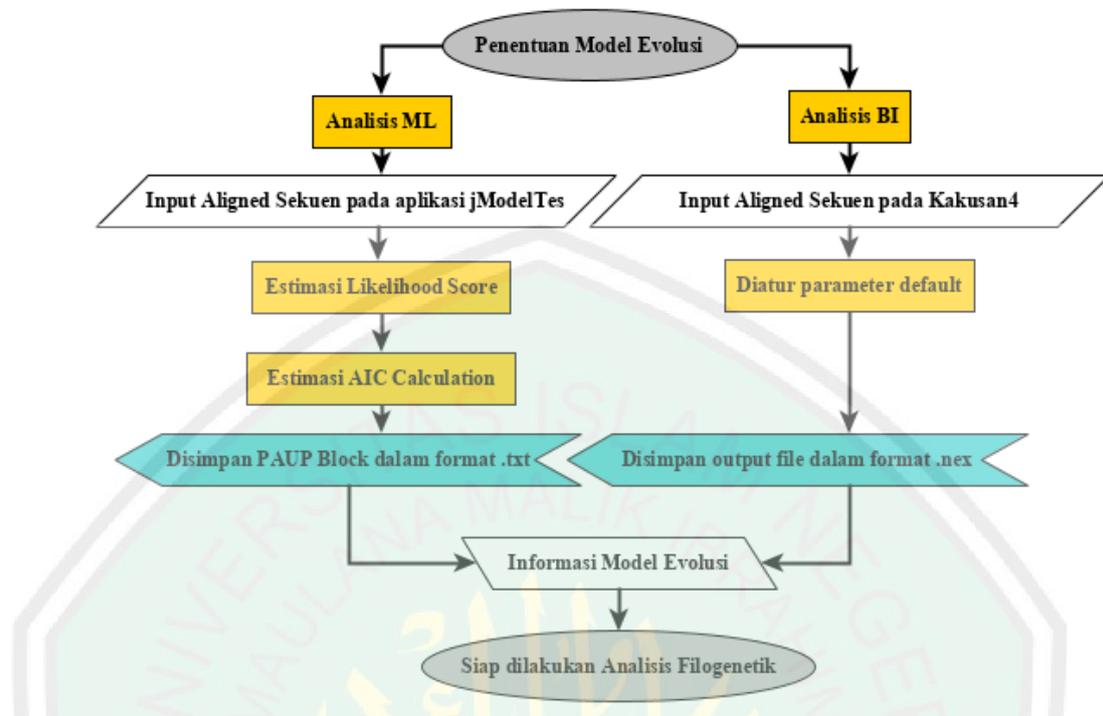
Sekuen yang telah disimpan ke dalam format FASTA dianalisis menggunakan *software* MEGA X (Kumar dkk., 2018). Setelah file tersebut di-*input*-kan, dilakukan proses *Alignment* (penyejajaran). Proses penyejajaran dilakukan menggunakan menu *Clustal W*. Setelah semua sekuens disejajarkan dan *ekuivalen*, dilakukan pengecekan adanya data yang ganjil dan proses pemotongan (*Trimming*), gap dihapus menggunakan Gblocks 0.91b (Castresana, 2000) berdasarkan pensejajaran sekuens dari *Outgroup* taksa dan parameter *default* dari program (Lampiran 6). Selanjutnya hasil dari *Alignment* di-*export* lalu dikonversi dalam format *.nexus* dan *.fasta*, untuk analisis lebih lanjut (Gambar 3.3, Lampiran 2).



Gambar 3.3. Flow Chart dari *Aligning Data Sekuen*

3.4.3. Penentuan Model Evolusi untuk Analisis Filogenetik dan Estimasi Waktu Divergensi

Modeltest atau tes model adalah analisis dalam mengevaluasi model evolusi sekuen nukleotida (*substitution model*) yang optimum dan sesuai dengan data *alignment query* yang ada untuk digunakan dalam analisis filogenetik maupun estimasi waktu divergensi (Tanabe, 2007). Analisis model evolusi untuk analisis *Maximum likelihood* dilakukan melalui *software jModeltest* (Darriba, 2012) berdasarkan AIC (*Akaike Information Criterion*) (Tanabe, 2007) (Gambar 3.4), sedangkan analisis model evolusi untuk analisis *Bayesian Inference* dilakukan melalui *software Kakusan 4* (Tanabe, 2007) (Gambar 3.4). Hasil dari estimasi diaplikasikan dalam analisis filogenetik *Maximum Likelihood* dan *Bayesian Inference* (Lampiran 3).

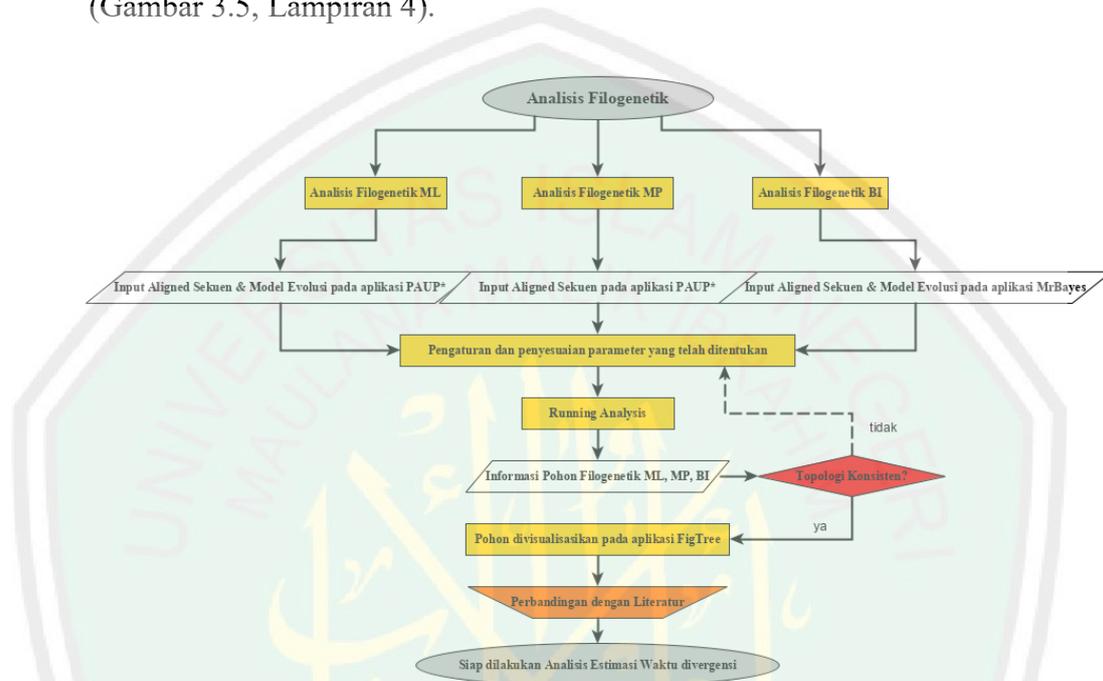


Gambar 3.4. *Flow Chart* penentuan model evolusi untuk analisis *Maximum likelihood* dan *Bayesian Inference*

3.4.4. Analisis Filogenetik *Maximum Likelihood*, *Maximum Parsimony* dan *Bayesian Inference*

Maximum parsimony dan *Maximum likelihood* dianalisis menggunakan software PAUP* (Swofford, 2002). *Heuristic search option* dari analisis *Maximum Parsimony* menggunakan TBR (*tree bisection recognition*) *branch swapping*, dengan replikasi pencarian 10 kali, dan replikasi *bootstrap* 1000 kali. Berdasarkan data evaluasi model substitusi menggunakan jModeltest (Darriba, 2012) didapatkan model substitusi GTR (General Time Reversible), parameter G (Gamma), I (Invariant Sites) dari *commandline PAUP* Block* yang dikalkulasi sebelumnya (Lampiran 7). *Heuristic search option* dari analisis *Maximum likelihood* dianalisis dengan TBR (*Tree Bisection Recognition*) *branch swapping*,

dengan replikasi pencarian 10 kali, dan replikasi bootstrap 500 kali. Setiap *output file* yang dihasilkan divisualisasikan melalui *FigTree v1.4.3* (Drummond & Rambaut, 2007) dan dibandingkan dengan analisis dan literatur pendukung (Gambar 3.5, Lampiran 4).



Gambar 3.5. *Flow Chart* analisis filogenetik *Maximum likelihood, Maximum Parsimony & Bayesian Inference*

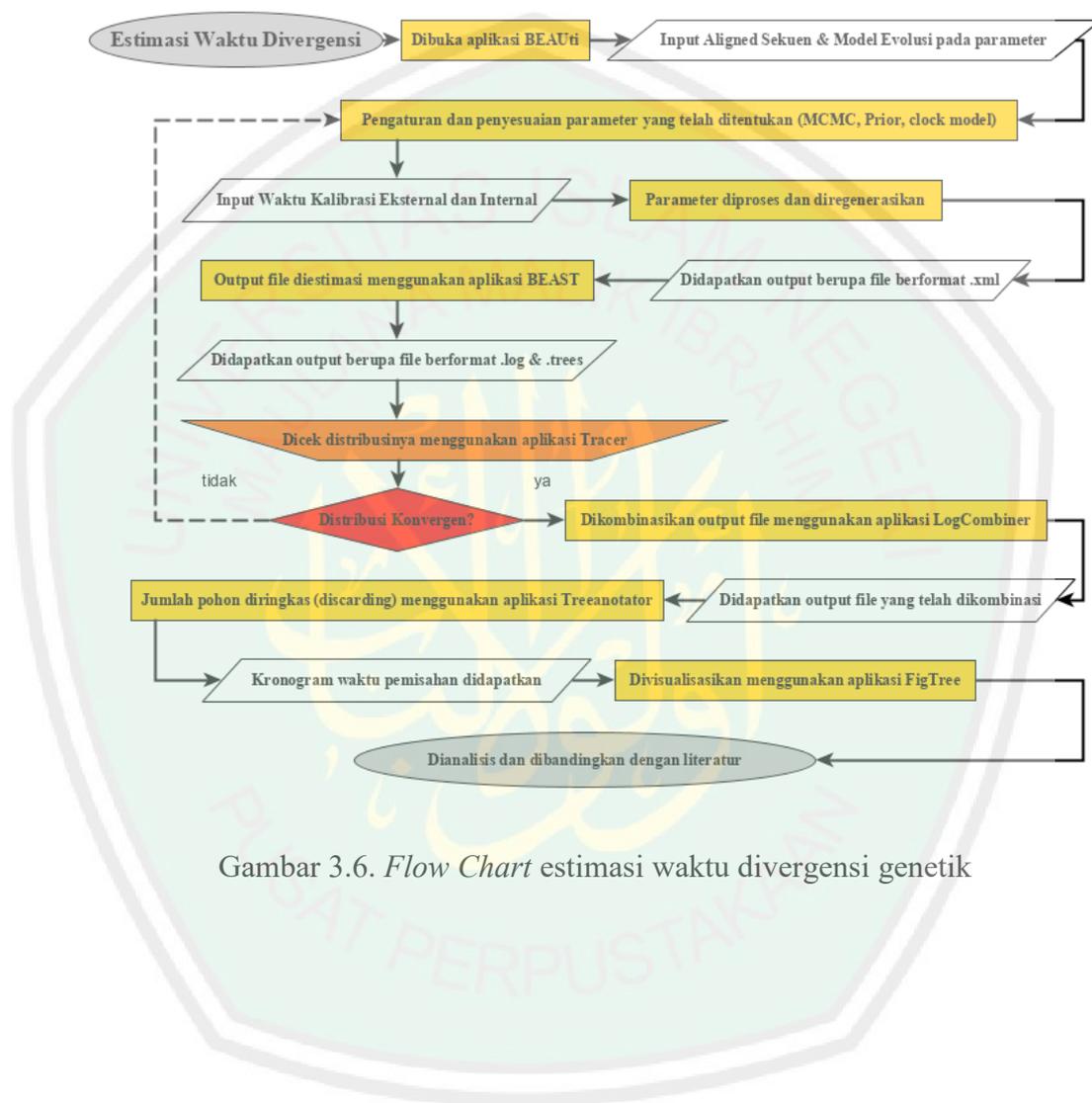
Analisis BI (*Bayesian Inference*) dilakukan menggunakan *software MrBayes 3.0b4* (Huelsenbeck dan Ronquist, 2001). Berdasarkan data evaluasi model substitusi dari *software Kakusan 4* (Tanabe, 2007), yaitu dengan model substitusi GTR (*General Time Reversible*) dan parameter G (*Gamma*), yang teridentifikasi sebagai model terbaik (Lampiran 8). Perhitungan MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) berjumlah 1000.000 generasi, perhitungan frekuensi sampel tiap 1000 generasi, pohon dibentuk melalui konsensus topologi 50% (*burnin=500*) (Gambar 3.7). *Output file* divisualisasikan menggunakan *FigTree v1.4.3* (Drummond & Rambaut, 2007) dan dibandingkan dengan analisis dan literatur pendukung

(Gambar 3.5, Lampiran 4). Sebuah pohon filogeni memiliki nodus yang mendukung jika memiliki nilai *bootstrap* ≥ 70 untuk MLBP dan MPBP, serta ≥ 95 untuk nilai BPP (Huelsenback & Hilis, 1993).

3.4.3 Analisis Estimasi Waktu Divergensi Genetik

Analisis estimasi waktu divergensi genetik dilakukan apabila topologi pohon dianggap kredibel dalam menjelaskan pemisahan antar taksa. Analisis dilakukan menggunakan *software BEAST v2.4.1 package (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees)* (Drummond & Rambaut, 2007) dengan *software BEAUti v2.4.1* untuk mengkonstruksi *execute file*, berupa bahasa pemrograman berformat *.xml*. Analisis dilakukan menggunakan model substitusi berdasarkan analisis dari *software Kakusan 4* (Tanabe, 2007) (Lampiran 8), serta menggunakan *clock model uncorrelated log-normal "relaxed" clock* (Drummond dkk., 2006). Perhitungan MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) dilakukan setiap 1000 generasi dengan total 10 juta generasi. Kalibrasi eksternal diperoleh dari Roelants dkk. (2007) yaitu waktu divergensi genetik antara Genus *Limnonectes sisikdagu* dengan Genus *Meristogenys* dan Genus *Rana* pada 70.3 Ma (CI 59.7-81.3), dan waktu divergensi genetik antara Genus *Meristogenys* dengan Genus *Rana* pada 32.6 Ma (CI 28.6-40.5). Konvergensi distribusi yang stasioner dari prior dan posterior diamati melalui *the likelihood and parameter sample plots* dalam *software Tracer ver1.4* (Drummond & Rambaut, 2007). Hasil *output* berupa *log* dan *tree file* dikombinasikan dalam *software Logcombiner v2.4.1* (Drummond & Rambaut, 2007). Hasil pohon berjumlah 100001 diabaikan sampai hanya terdapat satu pohon (*burnin* = 1000000) melalui *software TreeAnnotator v2.4.1* (Drummond &

Rambaut, 2007). Hasil rekonstruksi kronogram divisualisasikan dalam *software Figtree v.1.4.3* (Drummond & Rambaut, 2007) (Gambar 3.6, Lampiran 5) dan dibandingkan dengan literatur pendukung.



Gambar 3.6. *Flow Chart* estimasi waktu divergensi genetik

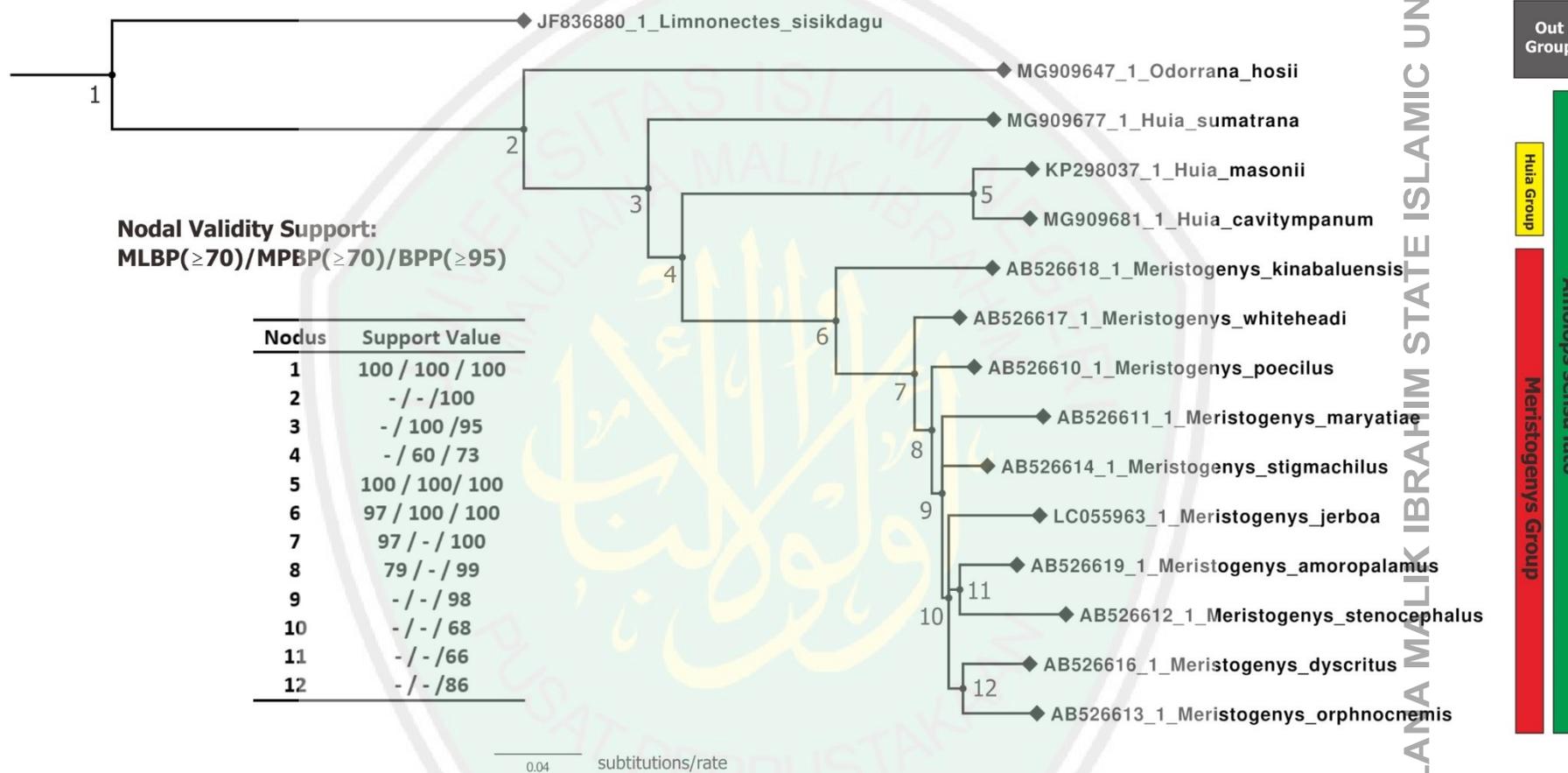
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Filogenetik antar taksa dari Genus *Amolops* Cope, 1865 Sensus lato di Paparan Sunda

Hasil *concatenated alignment* dari 13 sekuen *Ingroup* 12S rRNA, tRNA^{Val}, dan 16S rRNA dari Genus *Amolops* Cope, 1865 Sensus lato di Paparan Sunda, dan 2 taksa *Outgroup* yang telah diseleksi, menghasilkan sekuen dengan panjang 1668 bp yang dapat dianalisis. Sekuen blok ini memiliki *character state* meliputi: 1041 *constant character*, 235 *variable character* yang *parsimony-informative*, dan *parsimony-informative characters* berjumlah 392 (Lampiran 9). Spesifikasi karakter tersebut akan mempengaruhi hasil analisis filogenetik *Maximum Likelihood*, *Maximum Parsimony*, maupun *Bayesian Inference* karena algoritma dan penggunaan karakter yang berbeda di setiap analisisnya.

Hasil analisis filogenetik *Maximum Likelihood* (ML), *Maximum Parsimony* (MP), dan *Bayesian Inference* (BI) dapat ditinjau pada sebuah filogram yang telah diringkaskan menjadi satu (Gambar 4.1). Nilai di setiap *branch point*/ nodus merupakan hasil dari nilai dukungan *bootstrap* dalam mendukung kredibilitas topologi. Nilai dukungan *bootstrap* dari analisis filogenetik *Maximum Likelihood* dinotasikan dengan MLBP (*Maximum Likelihood Bootstrap Point*), *Maximum Parsimony* dinotasikan dengan MPBP (*Maximum Parsimony Bootstrap Point*), dan *Bayesian Inference* dinotasikan dengan BPP (*Bayesian Posterior Probability*). Hasil rekonstruksi filogram (Gambar 4.1) menunjukkan hasil filogram dari analisis filogenetik ML (Lampiran 10), MP (Lampiran 11), dan BI (Lampiran 12), menghasilkan topologi yang sama. Beberapa hasil dukungan *bootstrap* pada bebe-



Gambar 4.1. Filogram hasil analisis filogenetik *Maximum Likelihood*, *Maximum Parsimony*, dan *Bayesian Inference* Genus *Amolops Sensu lato* dari 12S rRNA, tRNA^{Val}, dan 16S rRNA

rapa nodus/ *branch point* memiliki nilai yang tidak didukung dengan cabang yang tidak bisa dibedakan (*polytomy*) sehingga posisi *external nodes* atau taksa mungkin saja keliru.

Hasil analisis filogenetik *Maximum Likelihood* (ML) (Lampiran 10) menunjukkan bahwa sekelompok taksa dari Famili Ranidae merupakan kelompok monofiletik, dibuktikan dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (MLBP: 100), memisahkan seluruh kelompok taksa dari Famili Ranidae (Genus *Odorrana*, *Huia* & *Meristogenys*) dengan Famili Dicroglossidae (*L. sisikdagu*). Hasil filogram dari analisis filogenetik ML menghasilkan 4 percabangan *polytomy* yaitu *lineages* *H. sumatrana*, *O. hossi*, klad *Huia group* (*H. masonii* & *H. cavitympanum*), dan klad *Meristogenys group*. Kegagalan proses bifurkasi dari dataset sekuen yang dianalisis bisa diakibatkan karena kurangnya variasi genetik atau *character state* (Lampiran 13) yang mampu merepresentasikan divergensi taksa pada Genus *Amolops* *Sensu lato* yang diteliti.

Genus *Huia* merupakan kelompok parafiletik, dimana tidak keseluruhan spesies dari Genus *Huia* tergolong ke dalam satu klad yang alami (*natural group*). Taksa *H. masonii* merupakan *sister species* dari *H. cavitympanum* dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (MLBP: 100). Genus *Meristogenys* juga tergolong kelompok monofiletik, dimana sekelompok taksa ini memiliki *common ancestor* dan *lineages* yang sama. Walaupun tergolong dalam keturunan yang sama, pengelompokkan *M. amoropalamus*, *M. dyscritus*, *M. jerboa*, *M. maryatiae*, *M. orphnocnemis*, *M. stenocephalus*, *M. stigmachilus* menunjukkan percabangan yang *polytomy*. Adanya *polytomy* akibat ketidakmampuan dalam membedakan

kelompok yang alami (*natural group*) bisa dikarenakan oleh kurangnya *character state* pada *alignment* (Hidayat & Pancoro, 2008), sehingga diperlukan referensi dataset sekuen DNA yang lebih komprehensif lagi untuk dianalisis.

Hasil analisis filogenetik *Maximum Parsimony* (MP) (Lampiran 11) menunjukkan bahwa sekelompok taksa dari Famili Ranidae merupakan kelompok monofiletik, dibuktikan dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (MPBP: 100), memisahkan seluruh kelompok taksa dari Famili Ranidae (Genus *Odorrana*, *Huia* & *Meristogenys*) dengan Famili Dicroglossidae (*L. sisikdagu*). Hasil filogram dari analisis filogenetik MP mampu menghasilkan percabangan yang memisahkan taksa *O. hosii* dengan sekelompok taksa dari *Amolops* *Sensu lato* (Genus *Huia* & *Meristogenys*). Hal ini membuktikan dataset sekuen yang digunakan tergolong mampu menggambarkan divergensi taksa dalam hal pemisahan pada tingkatan Genus (*O. Hosii* dan kelompok *Amolops* *Sensu lato*).

Genus *Huia* menunjukkan kelompok parafiletik seperti halnya pada hasil filogram ML. Taksa *H. sumatrana* merupakan *sister lineages* dari klad *Huia group* dan klad *Meristogenys group*. Taksa *H. masonii* merupakan *sister species* dari *H. cavitypanum* dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (MPBP: 100). *Sister species* (kekerabatan yang dekat) pada klad *Huia group* kemungkinan karena identiknya situs yang homolog pada *concatenated alignment*, dengan ditemukannya perbedaan susunan basa nukleotida pada situs-situs tertentu (Lampiran 13). Klad *Huia group* (*H. masonii* & *H. cavitypanum*) merupakan *sister lineages* dari klad *Meristogenys group* dengan nilai dukungan *bootstrap* yang tidak begitu valid (MPBP: 60). Sedangkan Genus *Meristogenys* tergolong

kelompok yang monofiletik dengan *common ancestor* dan *lineages* yang sama, walaupun masih terdapat *polytomy* pada percabangan *M. amoropalamus*, *M. dyscritus*, *M. jerboa*, *M. maryatiae*, *M. orphnocnemis*, *M. stenocephalus*, *M. stigmachilus*, dan *M. whiteheadi*. Hal ini bisa diakibatkan karena tidak adanya model substitusi yang digunakan pada analisis MP, atau *character state* yang kurang, sehingga belum merepresentasikan filogram MP yang baik (Yang & Rannala, 2012).

Hasil analisis filogenetik *Bayesian Inference* (BI) (Lampiran 12) menghasilkan filogram yang tidak jauh berbeda dalam hal divergensi taksa pada Famili Ranidae. Taksa *O. hosii* berpisah dengan *Amolops* *Sensu lato* dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (BPP: 100). Genus *Huia* masih merepresentasikan kelompok parafiletik, dan Genus *Meristogenys* merepresentasikan kelompok monofiletik, sama dengan filogram dua analisis sebelumnya. Taksa *H. sumatrana* merupakan *sister lineages* dari seluruh taksa dari *Huia group* dan *Meristogenys group* dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (BPP: 95). Percabangan atau divergensi setiap taksa dari *Meristogenys group* nampaknya menunjukkan resolusi dan gambaran topologi yang lebih baik dari analisis sebelumnya, walaupun masih belum didukung nilai *bootstrap* yang begitu valid pada beberapa nodus. Topologi yang teresolusi lebih baik walaupun masih belum menghasilkan nilai dukungan *bootstrap* yang valid pada analisis BI, bisa dikarenakan oleh *effective population size* yang dianalisis secara *heuristic* sehingga meminimalisir adanya *polytomy* bahkan bifurkasi yang gagal. Kelebihan analisis BI dalam meresolusikan filogram yang lebih baik, bisa dikarenakan parameter yang lebih kompleks, penggunaan

algoritma numerical Monte Carlo Markov Chain, dan distribusi prior dan posterior yang tidak terdapat pada dua analisis sebelumnya. Hasil rekonstruksi filogram dari semua hasil analisis filogenetik *Maximum likelihood* (ML) (Lampiran 5), *Maximum Parsimony* (MP) (Lampiran 6), dan *Bayesian Inference* (Lampiran 7) dengan nilai dukungan *bootstrap* dan topologi pohon dapat ditinjau pada Gambar 4.1.

Gabungan dari 3 filogram menunjukkan pemisahan Famili Dicroglossidae dengan Famili Ranidae dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (Nodus 1, MLBP: 100, MPBP: 100, BPP: 100) (Gambar 4.1). Famili Dicroglossidae merupakan subfamili (Dicroglossinae) dari Famili Ranidae (Frost dkk., 2006). Namun penelitian lebih lanjut menjelaskan Dicroglossinae naik satu tingkatan taksa membentuk Famili baru. Hal ini didukung dengan adanya karakter morfologis berupa keberadaan taring pada maksilar dan mandibular, dan dimorfisme jantan dan betina dengan ukuran SVL (*Snout Vent Length*) jantan yang lebih besar dari betina (Iskandar, 1998).

Taksa *O. hossi* ditemukan berpisah dengan sekelompok taksa *Ingroup* yaitu *Amolops* Sensu lato (Genus *Huia* & *Meristogenys*) dengan nilai dukungan *bootstrap* didukung oleh analisis filogenetik BI (Nodus 2; MLBP: -, MPBP: -, BPP: 100) (Gambar 4.1). Penentuan karakter *synapomorphy* atau *derived characters* (karakter yang diwariskan) dalam mengelompokkan Genus *Odorrana* dari Famili Ranidae lainnya, secara morfologi maupun anatomi masih belum terpecahkan (Frost dkk., 2006). Namun secara genetik, pengelompokkan Genus *Odorrana* terdapat pada letak translokasi DNA (Kurabayashi dkk., 2010).

Hubungan kekerabatan *Amolops* Sensu lato ditunjukkan dengan divergensi lebih awal taksa *H. sumatrana* dengan klad *Huia* group dan klad *Meristogenys* group yang didukung dengan nilai *bootstrap* yang valid (Nodus 3; MLBP: -, MPBP: 100, BPP: 95) (Gambar 4.1). Hasil analisis filogenetik ini menunjukkan gambaran topologi yang berbeda dalam hal pengelompokan Katak Arus Deras, *Amolops* Sensu lato. Riwayat taksonomi awalnya menyatukan *Amolops* Sensu lato menjadi satu genera berdasarkan karakter morfologi berupa jumlah gigi keratodon yang tinggi pada fase larvae (Inger, 1966). Selanjutnya Yang (1991) membagi *Amolops* Sensu lato menjadi 3 genera yaitu *Amolops* Sensu stricto (berdasarkan *metacarpal* pertama yang pendek, lalu ditemukan juga pada Genus *Huia*) dan 3 karakter pada berudu (*lateral glands* di fase larvae, gigi keratodon yang berjajar tidak terputus pada fase larvae, *hind limbs* yang lebih panjang) yang memisahkan *Amolops* Sensu stricto dengan Genus *Huia* & *Meristogenys* (Frost dkk., 2006). Namun, penentuan karakter *synapomorphy* dari ketiga genus tersebut masih dipertahankan menjadi Genus *Huia* & *Meristogenys* dan belum mengalami revisi taksonomi sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Hasil filogram menunjukkan bahwa taksa *H. sumatrana* merupakan *sister lineages* dari klad *Huia* group dan klad *Meristogenys* group. Taksa *H. masonii* merupakan *sister species* dari taksa *H. cavitympanum* dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (Nodus 5, MLBP: 100, MPBP: 100, BPP: 100) (Gambar 4.1). Hal ini menunjukkan bahwa Genus *Huia* merepresentasikan kelompok parafiletik dan tidak membentuk *natural group*. Sesuai dengan penelitian Stuart (2008), genus ini merupakan kelompok taksa yang tidak stabil secara taksonomi, dengan

ditemukannya taksa *H. cavitympanum* bersarang (*nested*) pada *lineages* dari Genus *Odorrana* (mengindikasikan kekerabatan yang jauh dengan Genus *Huia* karena *lineages* yang berbeda, bersifat parafiletik) dan taksa *H. sumatrana* yang berkerabat lebih dekat dengan *H. masonii* berdasarkan analisis dari beberapa gen DNA inti (nuDNA).

Sekelompok taksa dari *Meristogenys group* merepresentasikan kelompok monofiletik dengan *common ancestor* dan *lineages* yang sama dan membentuk *natural group*, dengan *M. kinabaluensis* sebagai *sister lineages* dari seluruh taksa dari *Meristogenys group* dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (Nodus 6, MLBP: 97, MPBP: 100, BPP: 100) (Gambar 4.1). Hal ini didukung dengan bukti morfologis bahwa *M. kinabaluensis* dapat dibedakan dengan *Meristogenys spp.* lainnya berdasarkan pola warna hijau terang dengan noktah hitam pada bagian punggung dan *lateral* yang tidak terdapat pada spesies *Meristogenys* lainnya. Perbedaan mendasar antar spesies dari *Meristogenys spp.*, terdapat pada pola geligi larvae yang hanya bisa diamati menggunakan mikroskop (Inger, 1966).

Taksa *M. whiteheadi* merupakan *sister lineages* dari sekelompok taksa dari *Meristogenys group* yang tersisa (*M. poecillus*, *M. maryatiae*, *M. stigmachillus*, *M. amoropalamus*, *M. stenocephalus*, *M. jerboa*, *M. dyscritus*, dan *M. orphnocnemis*) dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (Nodus 7, MLBP: 97, MPBP: -, BPP: 100). Taksa *M. poecillus* menjadi *sister lineages* sekelompok taksa dari *Meristogenys group* yang tersisa (*M. maryatiae*, *M. stigmachillus*, *M. amoropalamus*, *M. stenocephalus*, *M. jerboa*, *M. dyscritus*, dan *M. orphnocnemis*) dengan nilai dukungan *bootstrap* yang valid (Nodus 8, MLBP: 79, MPBP: -, BPP:

99). Taksa yang tersisa selanjutnya, tidak memiliki nilai dukungan *bootstrap* yang valid, kecuali kekerabatan yang dekat (*sister species*) antara taksa *M. dyscritus* dan *M. orphnocnemis* (Nodus 12, MLBP: -, MPBP: -, BPP: 86), dan taksa *M. stenocephalus* dengan *M. amoropalamus* (Nodus 11, MLBP: -, MPBP: -, BPP: 66).

Hasil filogram dalam setiap analisis sesuai dengan penelitian Shimada dkk. (2015) dalam hal pemisahan klad *Huia group* dan klad *Meristogenys group*, namun berbeda pada letak bersarangnya (*nested*) taksa *M. whiteheadi* pada *lineages* dari sekelompok taksa *M. stigmachilus* dan *M. whiteheadi*. Filogram menunjukkan bahwasanya *M. poecillus* memiliki kekerabatan yang lebih dekat dengan seluruh taksa dari *Meristogenys group* yang tersisa (*M. maryatiae*, *M. stigmachillus*, *M. amoropalamus*, *M. stenocephalus*, *M. jerboa*, *M. dyscritus*, dan *M. orphnocnemis*) dibandingkan taksa *M. whiteheadi*. Padahal, kedua spesies tersebut (*M. poecillus* & *M. whiteheadi*) memiliki kemiripan morfologis dalam ukuran tubuh yang relatif besar (SVL \geq 41 mm pada Jantan, \geq 66 mm pada betina) dibandingkan dengan *M. maryatiae* yang lebih kecil (SVL \leq 38 mm pada Jantan dan \leq 66 mm pada Betina). Selanjutnya, keseluruhan perbedaan dari *Meristogenys* spp. hanya dibedakan dari fase larvae dan sulit dibedakan pada fase dewasa karena kemiripannya yang sangat tinggi (Shimada dkk., 2015). Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS. Fatir ayat 28 yang berbunyi:

وَمِنَ النَّاسِ وَالْذَوَابِّ وَالْأَنْعَامِ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ كَذَلِكَ إِنَّمَا يَخْشَى اللَّهَ مِنْ عِبَادِهِ الْعُلَمَاءُ
 إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ غَفُورٌ

Artinya : “Dan demikian (pula) di antara manusia, binatang-binatang melata dan binatang-binatang ternak ada yang bermacam-macam warnanya (dan jenisnya). Sesungguhnya yang takut kepada Allah di antara hamba-hamba-Nya, hanyalah ulama. Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi Maha Pengampun”.

Ayat ini memiliki makna bahwa Allah telah menciptakan berbagai macam wujud makhluk hidup beraneka ragam bentuk dan coraknya. Bahkan Allah SWT juga menciptakan hewan yang memiliki warna kulit dan ukuran yang beraneka ragam walaupun berasal dari satu jenis. Penggalan kalimat *mukhtalifun* dipahami ulama sebagai bukti bahwa keragaman terdapat pada seluruh makhluk hidup (Shihab, 2002). Begitu juga yang terjadi pada jenis-jenis hewan katak dan kodok (hewan-hewan melata), yang memiliki keragaman mulai dari tingkatan genetik, sampai diekspresikan dalam bentuk fenetik berupa warna, jenis & ukuran.

Ayat ini sekaligus menegaskan bahwa keragaman berasal dari satu sumber materi (Shihab, 2002), yang diibaratkan pada perbedaan karakter morfologi dan genetik pada setiap organismenya. Karakter-karakter tersebut muncul akibat faktor genetik yang bervariasi sehingga dapat dikelompokkan berdasarkan kesamaan ciri serta hubungan kekerabatan dari setiap individu yang bisa dirunut asal-usulnya. Sebagaimana juga yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS Al Anbiya ayat 30 yang berbunyi:

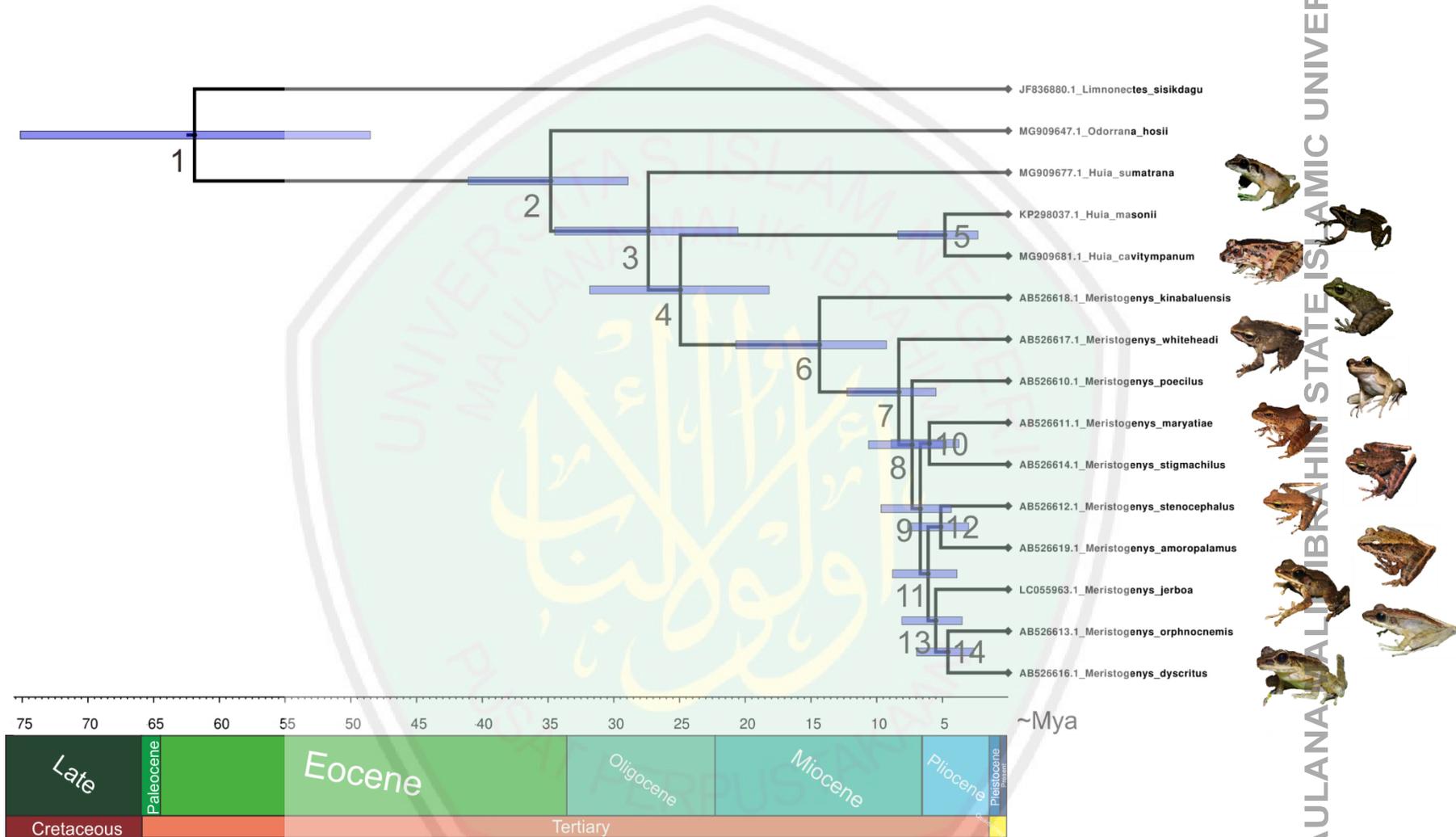
أَوْ لَمْ يَرَ الَّذِينَ كَفَرُوا أَنَّ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ كَانَتَا رَتْقًا فَفَتَقْنَاهُمَا^ط وَجَعَلْنَا مِنَ الْمَاءِ
كُلَّ شَيْءٍ حَيٍّ أَفَلَا يُؤْمِنُونَ

Artinya : “Dan apakah orang-orang yang kafir tidak mengetahui bahwasanya langit dan bumi itu keduanya dahulu adalah suatu yang padu, kemudian Kami pisahkan antara keduanya. Dan dari air Kami jadikan segala sesuatu yang hidup. Maka mengapakah mereka tiada juga beriman”.

Ayat ini menegaskan tentang konsep penciptaan alam semesta yang merupakan satu kesatuan yang terpisahkan, lalu yang dengan kekuasaan Allah masing-masing dipisahkan dan dari-Nya lah kemudian muncul kehidupan pertama kali dari zat berupa air, dan telah dibuktikan oleh perkembangan ilmu pengetahuan saat ini (Shihab, 2002). Asal-usul keberagaman organisme di bumi saat ini dapat dirunut asal-usulnya, dimana tidak hanya katak dan kodok melainkan keseluruhan organisme yang ada memiliki keterkaitan satu sama lain, kemudian berpisah (berdivergensi) menjadi organisme dalam bentuk yang berbeda dan memiliki unsur terpenting berupa air pada komposisi tubuhnya.

4.2 Estimasi Waktu Divergensi Genetik Genus *Amolops* Cope, 1865 Sensus lato di Paparan Sunda

Hasil rekonstruksi kronogram menunjukkan waktu divergensi antara Famili Ranidae dan Famili Dicroglossidae pada ~61.89 (CI 48.58 – 75.11) Mya (Nodus 1, Tabel 4.1, Gambar 4.2) pada *early Paleocene epoch*. Hasil estimasi ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa Famili Ranidae dan Famili Dicroglossidae terbentuk pada periode *Paleogene*, lebih tepatnya antara periode *late Cretaceous* sampai *Paleocene epoch* (Roelant dkk., 2007; Lohman dkk., 2011).



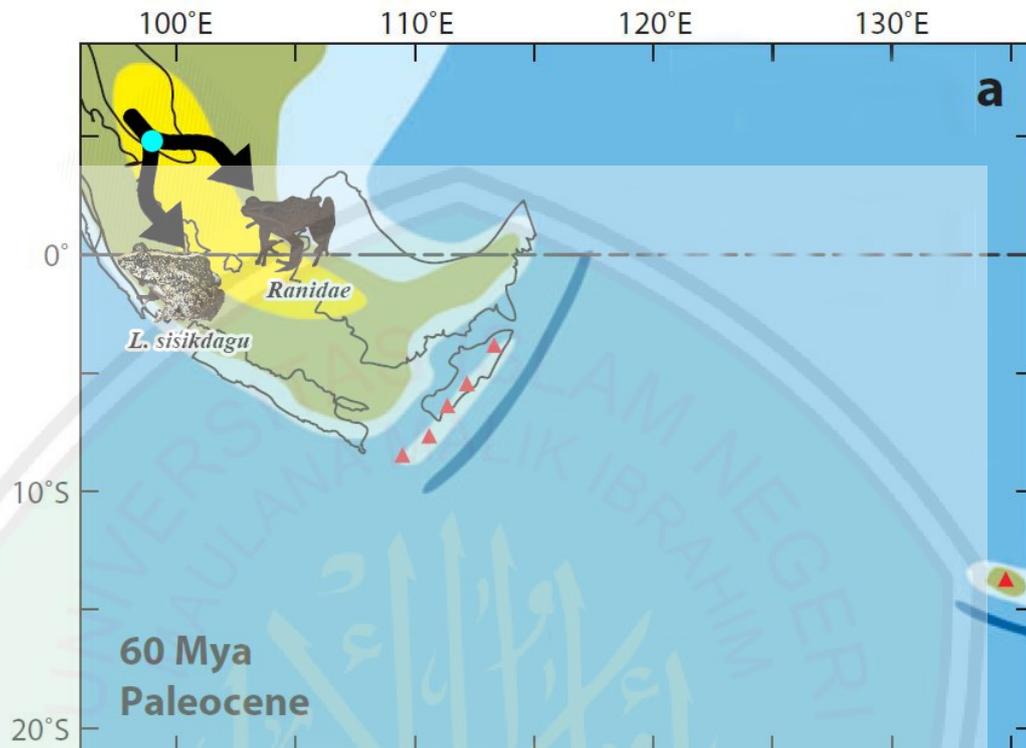
Gambar 4.2. Kronogram dari *Amolops* Cope, 1865 Sensus lato di Paparan Sunda berdasarkan gen 12S rRNA, tRNA^{Val}, dan 16S rRNA

Tabel 4.1. Estimasi waktu divergensi genetik *Amolops* Cope, 1865 Sensu lato di Paparan Sunda berdasarkan gen 12S rRNA, tRNA^{Val}, dan 16S rRNA.

Nodus	Waktu divergensi (Mya = <i>Millian Years Ago</i> ; <i>CI: Credible Interval</i>)	Keterangan (// = <i>lineages</i> yang berdivergensi; + = <i>lineages</i> yang sama)
1	61.89 (CI 48.58 – 75.11)	<i>L. sisikdagu</i> // Famili <i>Ranidae</i>
2	34.8 (CI 28.92 - 41.19)	<i>O. hossi</i> // <i>Amolops</i> Sensu lato
3	27.37 (CI 20.62 - 34.53)	<i>H. sumatrana</i> // <i>Huia group</i> + <i>Meristogenys group</i>
4	24.93 (CI 18.21 - 32.87)	<i>Huia Group</i> // <i>Meristogenys group</i>
5	4.81 (CI 2.27 - 8.48)	<i>H. masonii</i> // <i>H. cavitympanum</i>
6	14.35 (CI 9.31 - 20.72)	<i>M. kinabaluensis</i> // <i>M whiteheadi</i> , <i>M. poecillus</i> , <i>M. maryatiae</i> , dan lainnya
7	8.32 (CI 5.49 - 12.44)	<i>M whiteheadi</i> // <i>M. poecillus</i> , <i>M. maryatiae</i> , <i>M. stigmachilus</i> , dan lainnya
8	7.3 (4.75 - 10.58)	<i>M. poecillus</i> // <i>M. maryatiae</i> , <i>M. stigmachilus</i> , <i>M. stenocephalus</i> , dan lainnya
9	6.68 (CI 4.39 - 9.63)	<i>M. maryatiae</i> + <i>M. stigmachillus</i> // <i>M. stenocephalus</i> , <i>amoropalamus</i> , dan lainnya
10	5.99 (CI 3.71 - 8.87)	<i>M. maryatiae</i> // <i>M. stigmachilus</i>
11	6.08 (CI 3.97 - 8.71)	<i>M. stenocephalus</i> + <i>M. amoropalamus</i> // <i>M. jerboa</i> , <i>M. orphnocnemis</i> , dan lainnya
12	5.12 (CI 2.98 - 8.58)	<i>M. stenocephalus</i> // <i>M. amoropalamus</i>
13	5.51 (CI 3.52 - 8.01)	<i>M. jerboa</i> // <i>M. orphnocnemis</i> + <i>M. dyscritus</i>
14	4.58 (CI 2.58 - 6.59)	<i>M. orphnocnemis</i> // <i>M. dyscritus</i>

Pada periode tersebut, terjadi diversifikasi berupa *adaptive radiation* dari serangga, mamalia dan vertebrata setelah terjadinya *mass extinction event* akibat presipitasi asteroid yang memusnahkan dinosaurus dan banyak organisme laut (Starr dkk., 2015). Ilustrasi kronologis pemisahan Famili *Ranidae* dan *Dicroglossidae* dapat

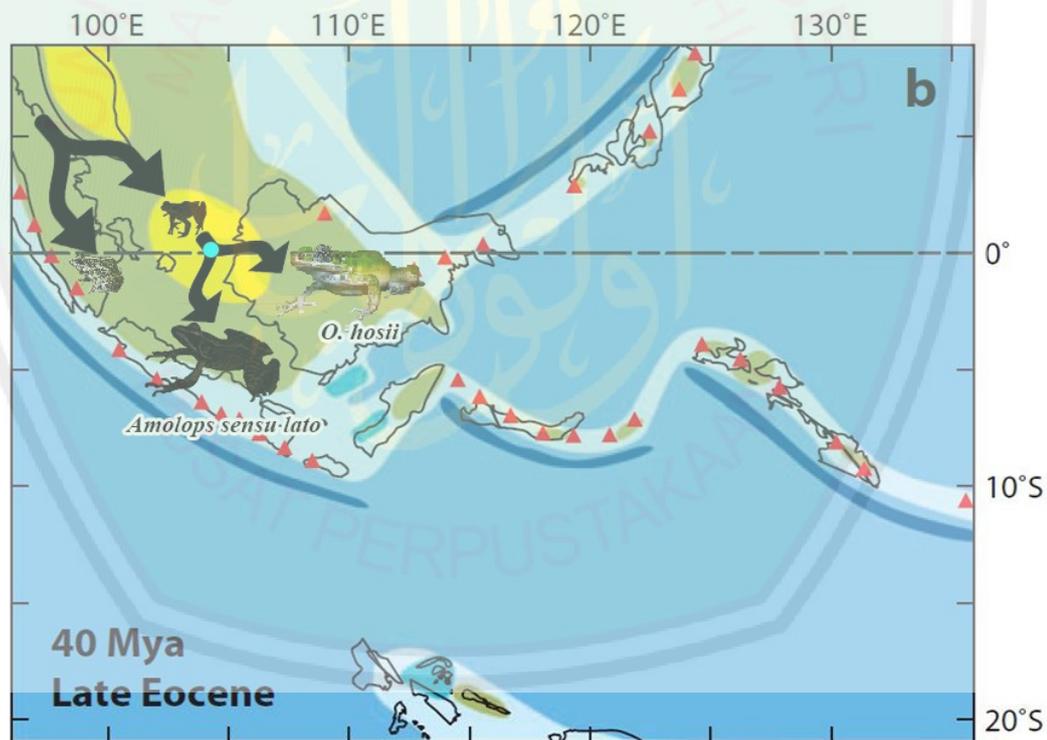
dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Ilustrasi kronologis dari pemisahan Famili Ranidae dan Dicroglossidae (*L. sisikdagu*) berdasarkan waktu pembentukan Paparan Sunda (Peta berdasarkan Lohman dkk., 2011)

Estimasi waktu yang didapatkan, mendukung teori terjadinya diversifikasi episodik dari kelompok Ordo Anura yang telah sampai pada tahapan ke-3 (Bossuyt & Roelants, 2009). Pada periode *late Cretaceous* sampai periode *early Paleogene* (~70-50 Mya), muncul golongan hewan dari kelompok katak modern (Neobatrachia) mencakup Famili Ranidae dan Famili Dicroglossidae (Bossuyt & Roelants, 2009). Diversifikasi ini diduga terjadi karena hasil fragmentasi/ pecahan dari kontinen *Gondwana*, terbentuknya hutan stepa dan padang rumput yang luas, serta iklim yang mendukung daerah tropis dan subtropis, sampai terbentuk Paparan Sunda yang luas (Lohman dkk., 2011).

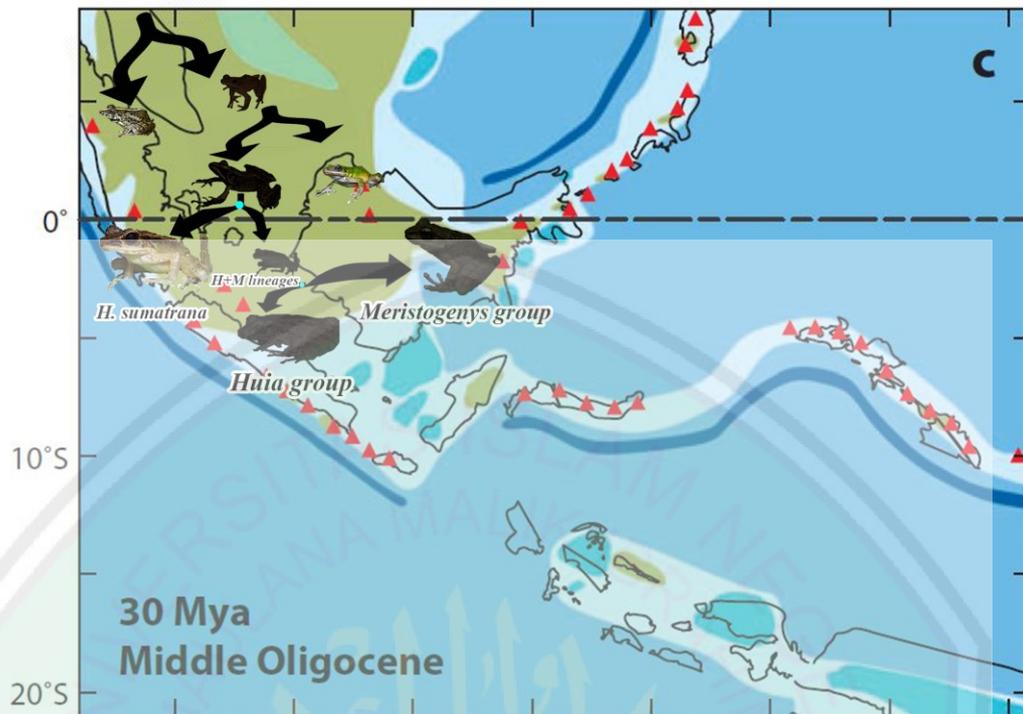
Hasil estimasi waktu divergensi memisahkan Genus *Odorrana* dengan Genus *Amolops* *Sensu lato* yang terjadi pada ~ 34.8 (CI 48.58 – 75.11) Mya (Nodus 2, Tabel 4.1, Gambar 4.2). pada *late Eocene epoch*. Estimasi waktu divergensi selaras dengan penelitian Roelants dkk. (2007) yang menyatakan bahwa pemisahan Genus *Rana*, *Meristogenys*, & *Huia* terjadi pada *late Eocene epoch* sampai *early Oligocene epoch* ($\sim 28-40$ Mya). Pada masa ini, masih terbentuk Semenanjung Malaya, Indochina, namun belum terbentuk mikrokontinen dari Paparan Sunda (Lohman dkk., 2011). Ilustrasi kronologis pemisahan genus dari Famili Ranidae dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Ilustrasi kronologis dari pemisahan Famili Ranidae, Genus *Rana* dan *Amolops* *Sensu lato* berdasarkan waktu pembentukan Paparan Sunda (Peta berdasarkan Lohman dkk., 2011)

Estimasi divergensi genetik taksa *H. sumatrana* dengan klad *Huia group* dan *Meristogenys group* terjadi pada ~ 27.37 (CI 20.62 – 34.53) Mya (Nodus 3,

Tabel 4.1, Gambar 4.2) pada *late Eocene epoch* sampai *early Miocene epoch*. Estimasi waktu divergensi dari *Huia group* dan *Meristogenys group* terjadi pada ~24.93 (CI 18.21 – 32.87) Mya (Nodus 4, Tabel 4.1, Gambar 4.2) pada *early Oligocene epoch* *early Miocene epoch*, dimana waktu pemisahan antara *H. sumatrana* dengan *Huia group* dan *Meristogenys group* terjadi pada waktu hampir bersamaan. Hasil estimasi waktu pemisahan sesuai dengan teori rekonstruksi Paparan Sunda akibat tumbukan lempeng Eurasia dan lempeng Australia yang terjadi pada *Eocene epoch* sampai *Oligocene epoch* (~30-40 Mya) (Lohman dkk., 2011). Ketika *early Miocene epoch* (~20 Mya) telah terbentuk bakal pulau dari wilayah Sumatra yang akan memisah dari Semenanjung Malaya dan Pulau Jawa yang sudah terpisah dengan Sumatra pada ~15 Mya (Hall, 1966). Hal ini memungkinkan terjadinya pemisahan lebih awal taksa *H. sumatra* dari klad *Huia group* dan *Meristogenys group*, diakibatkan pemisahan awal mikrokontinen Sumatra dari Paparan Sunda. Ilustrasi kronologis pemisahan *Amolops* *Sensu lato* dapat dilihat pada Gambar 4.5.

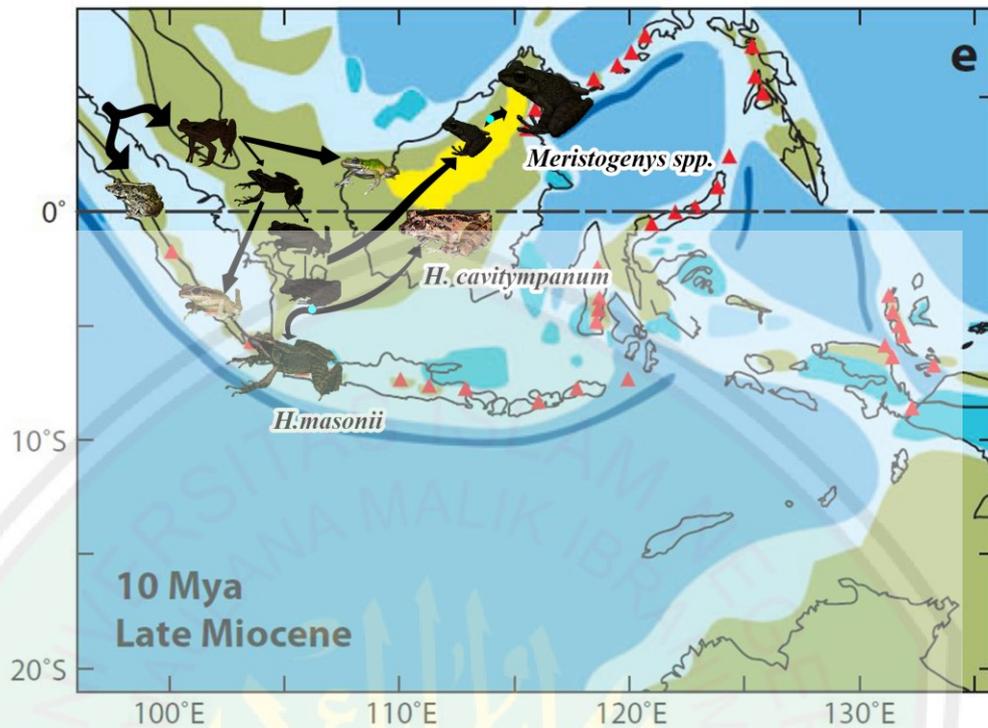


Gambar 4.5. Ilustrasi kronologis dari pemisahan *Amolops* Sensu lato berdasarkan waktu pembentukan Paparan Sunda (Peta berdasarkan Lohman dkk., 2011)

Pemisahan tersebut tidak berlangsung lama, karena terjadi penggabungan kembali seluruh kontinen Paparan Sunda pada *last glacial maximum/ Pleistocene epoch* (~250.000 ya), terjadi penurunan permukaan air laut (glasiasi) yang sangat tinggi (Clark dkk., 2009), membentuk dataran rawa dan savana yang sangat luas. Adanya paparan ini membentuk sistem sungai purba (*Paleo-river*)/ sistem sungai *Molengraaf* yang memiliki dua aliran utama yaitu sungai Sunda Timur yang bermuara di sebelah timur Pulau Madura, dan sungai Sunda Utara yang bermuara di sebelah barat laut Pulau Kalimantan (Whitten, 1996; Tjia, 1980). Aliran ini diduga menjadi jalur distribusi fauna di Paparan Sunda, sehingga terdapat kemiripan dan keterkaitan satu sama lain disetiap kontinennya. Setelah itu, terjadi peningkatan permukaan air laut (deglasiasi) kembali dalam waktu yang singkat,

menenggelamkan sistem sungai yang ada serta mengakhiri masa *last glacial maximum/ Pleistocene epoch* (~10000 - 17000 ya) (Whitten, 1996; Tjia, 1980). Proses berpisah, menyatu, dan berpisah kembali kontinen di Paparan Sunda diduga menimbulkan kompleksitas pola distribusi dan divergensi organisme di dalamnya.

Estimasi waktu divergensi dari divergensi taksa *H. masonii* dan taksa *H. cavitympanum* terjadi pada ~4.81 (CI 2.27-8.48) Mya (Nodus 5, Tabel 4.1, Gambar 4.2) pada *late Miocene epoch* hingga *Pliocene epoch*. Pola distribusi *vicariance* (tidak berpindah/ pasif) sesuai dibanding pola distribusi *dispersal* (berpindah aktif) dalam menggambarkan biogeografi dari Genus *Huia*. Sifat katak yang *salt-intolerant* membatasi katak dan kodok untuk bermigrasi sehingga tidak mampu berpindah secara aktif (kemungkinan kecil karena *material drifting*) melintasi laut untuk sampai ke wilayah lainnya. Dengan batasan tersebut, *common ancestor* dari suatu spesies yang sekarang ada (*extant taxa*) telah menempati wilayah yang dulunya menjadi satu lalu terpisah oleh barrier geografis sehingga proses spesiasi terjadi (van Boxclaeer dkk., 2006). Namun, divergensi dari Genus *Huia* yang berkorelasi pada proses terpisah kepulauan di Paparan Sunda tidak dapat dipastikan dengan waktu yang presisi karena kejadiannya yang berlangsung hampir bersamaan, mengingat masih terhubungnya setiap wilayah oleh koridor yang sempit (Lohman dkk., 2011). Ilustrasi kronologis pemisahan *Huia group* dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6. Ilustrasi kronologis dari pemisahan *Huia group* & *Meristogenys group* berdasarkan waktu pembentukan Paparan Sunda (Peta berdasarkan Lohman dkk., 2011)

Hasil kronogram menunjukkan bahwa dari kelompok *Meristogenys group*, terjadi pemisahan *M. kinabaluensis* dengan seluruh taksa dari *Meristogenys group* yang tersisa pada ~14.35 (CI 9.31 – 20.72) Mya (Nodus 6, Tabel 4.1, Gambar 4.2) pada *early Miocene epoch* sampai *late Miocene epoch*. Sedangkan estimasi waktu divergensi taksa dari *Meristogenys group* lainnya diperkirakan terjadi pada waktu yang hampir bersamaan pada (~12.44 - 2.58 Mya) (Nodus 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14; Tabel 4.1; Gambar 4.2) pada *late Miocene epoch* sampai *last glacial maximum/ pleistocene epoch* dimana daratan mulai terpisah oleh naiknya permukaan laut yang berlangsung singkat, membanjiri sistem Sungai Sunda Utara dan Sungai Sunda Timur (Whitten, 1996; Tjia, 1980). Ilustrasi kronologis pemisahan *Meristogenys group* dapat dilihat pada Gambar 4.6.

Persebaran *Amolops* *Sensu lato* diperkirakan terjadi pada *Oligocene* sampai *Miocene epoch* ketika wilayah Indochina, Semenanjung Malaya, dan Borneo masih menjadi satu daratan luas dengan iklim musiman, berbeda dibandingkan musim yang ada sekarang ini. Padang rumput yang lembap terbentuk sehingga memudahkan migrasi hewan-hewan yang ada di wilayah Asia Tenggara (Emerson dkk., 2000; Fahmi & Kurniawan., 2015). Terjadinya migrasi hewan-hewan di Asia Tenggara, Borneo, Sumatra dan kepulauan sekitarnya kemungkinan terjadi pada *late Oligocene epoch* (Heaney, 1986). Berdasarkan hal tersebut, Emerson dkk. (2000) mengusulkan bahwa persebaran spesies berasal dari Indochina, Semenanjung Malaya, dan berakhir pada wilayah Sumatra, Jawa dan Borneo.

Kronogram menunjukkan bahwasanya *Amolops* *Sensu lato* terbagi menjadi 2 *lineages* berbeda yaitu *lineages H. sumatrana* dengan *lineages Huia* dan *Meristogenys group* dengan estimasi waktu divergensi terjadi pada masa *Oligocene epoch* (~34.9 Mya) (Roelants dkk., 2006). Berdasarkan penjabaran biogeografi yang dikorelasikan dengan estimasi waktu divergensinya, terdapat dua teori yang mampu menjelaskan proses spesiasi fauna di Paparan Sunda yaitu spesiasi simpatrik (berdasarkan batasan reproduktif) dan spesiasi alopatrik (berdasarkan batasan fisik) (Coyne 1992).

Spesiasi yang terjadi di Paparan Sunda akibat adanya batasan fisik (spesiasi alopatrik), terjadi sejak zaman *Eocene* sampai *Pleistocene epoch*. Batasan fisik meliputi topografi perairan, lautan dan daratan menyebabkan terjadinya *genetic drifting*, mengurangi variasi genetik yang ada pada suatu subpopulasi (Coyne, 1992). Penyimpangan genetik yang tidak dapat dihindari pada suatu wilayah yang

telah berpisah dalam rentang waktu yang lama (secara geografi), menimbulkan proses spesiasi (Coyne, 1992). Hal ini terlihat pada waktu pemisahan dan biogeografi dari *H. sumatrana* (Sumatra) dengan *H. cavitympanum* (Borneo) dan *H. masonii* (Jawa) (Gambar 4.1).

Spesiasi yang terjadi di Paparan Sunda juga bisa dijelaskan oleh adanya batasan reproduktif (spesiasi simpatrik) berupa seleksi seksual (Coyne, 1992). Salah satu contoh dari seleksi seksual yaitu pemilihan jantan oleh betina yang didasarkan pada *mating call* yang turut berperan pada spesiasi (Turelli dkk., 2001; Porniankowski & Iwasa, 1998; Lande, 1981). Hal ini dibuktikan dengan adanya isolasi reproduktif dari Genus *Meristogenys* yang hanya terdistribusi di wilayah yang sama (Borneo), namun memiliki diversifikasi yang tinggi dengan 13 jumlah spesies yang terdata saat ini, kebanyakan pada lokasi yang sama (tidak adanya batasan geografi spesifik) (Frost dkk., 2006).

Diversifikasi dari *Amolops* Sensu lato bisa dipengaruhi oleh letak, dan wilayah distribusi. Populasi Genus *Meristogenys* yang terdistribusi di lajur Kalimantan Tengah, tidak terancam oleh adanya letusan vulkanik ataupun pergerakan lempeng tektonik (van Bemmelen, 1949). Kondisi tersebut tidak menghambat proses spesiasi karena minimnya gangguan maupun ancaman berupa *genetic loss* (Coyne, 1992). Berbeda dengan Genus *Huia* yang memiliki kecenderungan terdistribusi di tepian lempeng Paparan Sunda pada jalur antiklinorium pulau Jawa dan Sumatra (kecuali *H. cavitympanum* yang hanya ditemukan di Borneo) (van Bemmelen, 1949; IUCN, 2018). Wilayah ini merupakan lempeng tektonik aktif yang termasuk pada “*Ring of Fire*” yang meliputi cekungan

Samudra Pasifik (Blair, 2012). Daerah ini sering mengalami gempa dan letusan gunung berapi yang secara tidak langsung dapat mengakibatkan *genetic loss* dan menjadi salah satu faktor dari diversifikasi yang rendah (Coyne, 1992). Bukti tersebut ditemukan pada spesies *H. sumatrana* yang berdistribusi terbatas di wilayah Sumatra dan *H. masonii* yang berdistribusi terbatas di wilayah Jawa. Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT QS. An-Nur ayat 45 yang berbunyi :

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِنْ مَاءٍ ۖ فَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَىٰ بَطْنِهِ وَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَىٰ رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَىٰ أَرْبَعٍ ۗ يَخْلُقُ اللَّهُ مَا يَشَاءُ ۗ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ ٤٥

Artinya : “Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu”.

Ayat tersebut menegaskan tentang proses penciptaan makhluk hidup dan kelompok-kelompoknya, dimana keseluruhan hewan berasal dari zat berupa air. Sebagian hewan itu ada yang mampu berjalan di atas perutnya, semisal dari golongan ular (*Ophidia*), dan sebagian hewan ada yang berjalan menggunakan kedua kakinya seperti manusia, dan sebagian hewan ada yang berjalan menggunakan keempat kakinya seperti kambing dan sapi (Abdullah, 2004).

Ayat ini mengisyaratkan adanya proses pengklasifikasian dari kelompok dan golongan hewan tertentu yang diciptakan oleh Allah SWT, karena kemiripannya satu sama lain. Proses terbentuknya variasi ini terjadi melalui proses yang sangat lama, dan Allah berkuasa atas segala sesuatu yang diciptakan-Nya

(Abdullah, 2003). Sesuai dengan teori kemunculan organisme bumi, bahwa proses adanya amfibi yang bermacam-macam jenisnya selaras terhadap skala waktu geologi yang bisa dibagi dalam 3 babakan besar (Bossuyt & Roelants, 2009). Zaman *Archaean* (~2500 Mya) yaitu awal munculnya organisme prokariota, zaman *Proterozoic* (~2500-544 Mya) yaitu terjadinya akumulasi oksigen di atmosfer bumi sehingga memunculkan sel eukariotik saat bumi masih berbentuk bola es, lalu *Eon Phanerozoic* dimana bumi menghangat sehingga *glacier* mencair. Pada periode tersebut, terjadi ledakan diversitas hewan dengan dominasi kelompok hewan yang muncul pertama kali saat itu dari wilayah lautan. Seiring berjalannya babakan, era, periode, dan epoch tersebut, terjadi proses pembentukan geologi yang dinamis yang membentuk pola distribusi yang khas di setiap kontinennya. Pola itu dapat dibuktikan melalui variasi genetik maupun fenetiknya (Starr dkk., 2010).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini yaitu:

1. Genus *Amolops* Sensu lato tergolong grup monofiletik, Genus *Huia* tergolong grup parafiletik, dan Genus *Meristogenys* tergolong grup monofiletik.
2. Estimasi waktu divergensi terbentuknya *Amolops* Sensu lato terjadi pada zaman *Oligocene* sampai *Miocene epoch* (~34.8 Mya), *H. sumatrana* dengan *Huia group* dan *Meristogenys group* terjadi pada zaman *Oligocene epoch* (~27.37 Mya), dan *Huia group* dan *Meristogenys group* terjadi pada waktu yang hampir bersamaan yaitu pada zaman *early Miocene epoch* sampai *Pliocene epoch* (~14.35 - 4.58 Mya).

5.2 Saran

Beberapa saran untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Analisis filogenetik Genus *Huia* berdasarkan gen penanda lainnya untuk mengetahui variasi pengelompokkan taksa yang lain.
2. Analisis estimasi waktu divergensi *Amolops* Sensu lato berdasarkan gen dan metode lainnya untuk mengetahui waktu divergensi yang lebih spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2003. **Tafsir Ibnu Katsir**. Bogor: Pustaka Imam Asy-syafi'i.
- Aidh, A. 2007. **Tafsir Muyassar**. Jakarta: Qisthi Press.
- Arifin, U., Smart, U., Hertwig, S. T., Smith, E. N., Iskandar, D. T., & Haas, A. 2018. Molecular phylogenetic analysis of a taxonomically unstable ranid from Sumatra, Indonesia, reveals a new genus with gastromyzophorous tadpoles and two new species. *Zoosystematics and Evolution*. 94: 163.
- Blair, L. 2012. **Ring of fire : Indonesia dalam lingkaran api**. Jakarta: Ufuk Press.
- Blair, W. F. 1958. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *The American Naturalist*. 92(862): 27-51.
- Bossuyt, F., & Roelants, K. 2009. **Frogs and toads (Anura), the timetree of life**. New York: Oxford University Press. 357-364.
- Boulenger, G. A. 1891. A synopsis of the tadpoles of the European batrachians. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 59(4): 593-678.
- Brown, R. M., Siler, C. D., Richards, S. J., Diesmos, A. C., & Cannatella, D. C. 2015. Multilocus phylogeny and a new classification for Southeast Asian and Melanesian forest frogs (family Ceratobatrachidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 174(1): 130–168.
- Brown, R. P., & Yang, Z. 2011. Rate variation and estimation of divergence times using strict and relaxed clocks. *BMC Evolutionary Biology*. 11: 271.
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76(4): 1967-1971.
- Brown, W., Ellen, M. P., Alice, W., & Allan, C. W. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 18: 225-239.
- Cai, H. X., Che, J., Pang, J. F., Zhao, E. M., & Zhang, Y. P. 2007. Paraphyly of Chinese *Amolops* (Anura, Ranidae) and phylogenetic position of the rare Chinese frog, *Amolops tormotus*. *Zootaxa*. 1531(1): 49-55.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 540-552.
- Cavalli, S. L. L., & Balfourier. 1997. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Human. Genet.* 19: 122-257.

- Clark, P. U., Dyke, A. S., Shakun, J. D., Carlson, A. E., Clark, J., Wohlfarth, B., Mitrovica, J. X., Hostetler, S. W., & McCabe, A. M. 2009. The last glacial maximum. *Science*. 325 (5941): 710–4.
- Cox, C. B. & Moore, P. D. 2010. **Biogeography: an ecological and evolutionary approach**. Hoboken: John Wiley & Sons.
- Coyne, J.A. 1992. Genetics and speciation. *Nature*. 355: 511-515.
- Darlington P. J. Jr. 1957. **Zoogeografi: sebaran geografis hewan**. New York: Wiley Publishing.
- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9(8): 772.
- Doria, G., S. Salvidio, & Tavano, M. L. 1999. Description of *Amolops (Huia) modiglianii*, new species from Sumatra. *Genova*. 7(317): 1–9.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 214.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLOS Biol*. 4: 669-710.
- Dubois, A., 1992. Notes sur la classification des Ranidae (Amphibiens: Anoures). *Bull. mens. Soc. linn. Lyon*. 61: 305–352.
- Emerson, S. B., Inger, R. F., & Iskandar, D. T. 2000. Molecular systematics and biogeography of the fanged frogs of Southeast Asia. *Molecular phylogenetics and evolution*. 16(1): 131-142.
- Fahmi, M., Kurniawan, N. 2015. Studi divergensi genetik *Limnonectes Fitzinger*, 1843 di paparan Sunda menggunakan 12S rRNA, tRNA^{val}, dan 16S rRNA. **Skripsi**. Universitas Brawijaya.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*. 17(6): 368-376.
- FishBase. 2017. **Definition of Term**. www.fishbase.org. Diakses pada 1 Maret 2019.
- Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F., & Raxworthy, C. J. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of natural History*. 1-291.
- Futuyma, D. J., & Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual review of Ecology and Systematics*. 19(1): 207-233.
- Gadagkar, S. R., Rosenberg, M. S., & Kumar, S. 2005. Inferring Species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 304(1): 64-74.

- Garesse, R., Carrodegua, J. A., Santiago, J., Pérez, M. L., Marco, R., & Vallejo, C. G. 1997. *Artemia* mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 117(3): 357-366.
- Gupta, A., Bhardwaj, A., Sharma, P., & Pal, Y. 2015. Mitochondrial DNA-a tool for phylogenetic and biodiversity search in equines. *Journal of Biodiversity & Endangered Species*, S1:006. doi:10.4172/2332-2543.S1-006
- Hall, B. G. 1942. **Phylogenetic trees made easy: a how-to manual for molecular biologist**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Association Inc.
- Hall, R. 1996. Reconstructing Cenozoic SE Asia. *Geological Society, London, Special Publications*. 106(1): 153-184.
- Heaney, L. R. 1986. Biogeography of mammals in SE Asia: estimates of rates of colonization, extinction and speciation. *Biological journal of the Linnean Society*. 28(1-2): 127-165.
- Herbert P. D., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:14812-14817.
- Herskovitz, M. A., & Leipe D. D. 1998. **Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins**. New York: John Wiley and Sons.
- Hidayat, T., & Pancoro, A. 2016. Ulasan Kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek. *Jurnal AgroBiogen*. 4(1): 35-40.
- Hidayat, T., Kusumawaty, D., Kusdianti, K., Yati, D. D., Muchtar, A. A., & Mariana, D. 2009. Analisis filogenetik molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) menggunakan urutan basa DNA daerah Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Matematika & Sains*. 13(1): 16-21.
- Hills, D. M., C. Moritz, dan Mable, B. K. 1996. **Molecular systematic**. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Ho, S. Y. W. 2007. Calibrating molecular estimates of substitution rates and divergence times in birds. *Journal of Avian Biology*. 38: 409-414.
- Ho, S. Y. W. 2008. The molecular clocks and estimating species divergence. *Nature Education*. 1:168.
- Ho, S. Y., & Phillips, M. J. 2009. Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology*. 58(3): 367-380.
- Holder, M., & Lewis, P. O. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature reviews genetics*. 4(4): 275.

- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist F. R. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17: 754-755.
- Huelsenbeck, J. P., & Hillis, D. M. 1993. Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Systematic Biology*. 42(3): 247-264.
- Inger, R. F. & Voris H. K. 2001. The biogeographical relations of the frogs and snakes of Sundaland. *Journal of Biogeography*. 28: 863-891.
- Inger, R. F. 1966. The systematics and zoogeography of the amphibia of Borneo. *Fieldiana Zool*. 52: 1-402.
- Inger, R. F. 1985. Tadpoles of the forested regions of Borneo. *Fieldiana Zool New Ser*. 26: 1.
- Iskandar, D. T. 1998. **Amfibi Jawa dan Bali**. Bogor: Puslitbang Biologi LIPI.
- Ke, Y. B., Su, X., Song, L. D., & Chen, L. 2001. African origin of modern humans in East Asia: a tale of 12,000 Y chromosomes. *Science*. 292: 1151–1153.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217(5129): 624-626.
- Kjer, K. M. 1997. Conserved primary and secondary structural motifs of amphibian 12S rRNA, domain III. *Journal of Herpetology*. 31(4): 599-604.
- Klicka, J. & Zin, R.M. 1997. The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science*. 277: 1666–1669.
- Kotaki, M., Kurabayashi, A., Matsui, M., Kuramoto, M., Djong, T. H., & Sumida, M. 2010. Molecular phylogeny of the diversified frogs of Genus *Fejervarya* (Anura: Dicroglossidae). *Zoological Science*. 27(5): 386-395.
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. 2015. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in ecology & evolution*. 30(1): 25-35.
- Kumar, S. 2005. Molecular clocks: four decades of evolution. *Nature Reviews Genetics*. 6(8): 654.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C, & Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 1547-1549
- Kurabayashi, A., Yoshikawa, N., Sato, N., Hayashi, Y., Oumi, S., Fujii, T., & Sumida, M. 2010. Complete mitochondrial DNA sequence of the endangered frog *Odorrana ishikawae* (family Ranidae) and unexpected diversity of mt gene arrangements in ranids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56: 543–553.

- Kurniati, H., & Hamidy, A. 2017. Variasi suara panggilan kodok *Hylarana nicobariensis* (Stoliczka, 1870) dari lima populasi berbeda di Indonesia (Anura: Ranidae). *Jurnal Biologi Indonesia*. 12(2).
- Lande, R. 1981. Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78(14-16): 3721-3725.
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A. M. 2009. **The phylogenetic handbook: practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lohman, D. J., de Bruyn, M., Page, T., von-Rintelen, K., Hall, R., Ng, P. K., & von-Rintelen, T. 2011. Biogeography of the Indo-Australian archipelago. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 42.
- Matsui, M., Hamidy, A., Murphy, R. M., Khonsue, W., Yambun, P., Shimada, T., Norhayati, A., Daicus, M. B., Jiang J. P. 2010. Phylogenetic relationships of Megophryid frogs of the Genus *Leptobrachium* (Amphibian, Anura) as revealed by mtDNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56: 259–272.
- Matsui, M., Shimada, T., & Sudin, A. 2010. A new species of *Meristogenys* (Amphibia, Anura, Ranidae) from Sabah, Borneo. *Zoological science*. 27(1): 61-66.
- McLeod, D. S., Horner, S. J., Husted, C., Barley, A., & Iskandar, D. T. 2011. Same-same, but different: an unusual new species of the *Limnonectes kuhlii* complex from West Sumatra (Anura: Dicroglossidae). *Zootaxa*. 2883(1): 52-64.
- Meganathan, P. R., Dubey, B., Batzer, M. A., Ray, D. A., & Haque, I. 2010. Molecular phylogenetic analysis of Genus *Crocodylus* (Eusuchia, Crocodylia, Crocodylidae) and the taxonomic position of *Crocodylus porosus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57: 393-402.
- Ministry of Environment. 2009. **Fourth national report: the convention on biological diversity**. <http://www.cbd.int/doc/world/id/id-nr-04en.pdf>. Diakses pada 8 Januari 2019.
- Mittermeier, R. A., Myers, N., Thomsen, J. B., Da-Fonseca, G. A., & Olivieri, S. 1998. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conservation biology*. 12(3): 516-520.
- Moore, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*. 49(4): 718-726.
- Moraes, C. T., Srivastava, S., Kirkinezos, I., Oca-Cossio, J., Woischnick, M., & Diaz, F. 2002. Mitochondrial DNA structure and function. *International review of neurobiology*. 53: 3-23.

- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da-Fonseca, G. A., & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403(6772): 853.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 1988. **Bethesda (MD): national library of medicine (US), national center for biotechnology information**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Diakses pada 5 Januari 2019.
- Natus, I. R. 2005. **Biodiversity and endemic centre of Indonesian terrestrial vertebrates**. German: Biogeography Institute of Trier University.
- Nishikawa, K., Matsui, M., Yong, H. S., Ahmad, N., Yambun, P., Belabut, D. M., & Yoshikawa, N. 2012. Molecular phylogeny and biogeography of Caecilians from Southeast Asia (Amphibia, Gymnophiona, Ichthyophiidae), with special reference to high cryptic species diversity in Sundaland. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 63(3): 714-723.
- Porniankowski, A. dan Y. Iwasa. 1998. The Evolution of female male preferences for male genetic quality. *Oxford Surv. Evol. Biol.* 5(14): 136-184.
- QGIS Development Team. 2019. **QGIS geographic information system**. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
- Roelants, K., Gower, D. J., Wilkinson, M., Loader, S. P., Biju, S. D., Guillaume, K., & Bossuyt, F. 2007. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3): 887-892.
- Rotramel, G. L. 1973. The development and application of the area concept in biogeography. *Systematic Biology*. 22(3): 227-232.
- Shihab, M. Quraish. 2002. **Tafsīr al-Mishbah (pesan, kesan dan keserasian al-Qur'ān)**. Jakarta: Lentera Hati.
- Shimada, T., Matsui, M., Yambun, P., & Sudin, A. 2011. A taxonomic study of Whitehead's torrent frog, *Meristogenys whiteheadi*, with descriptions of two new species (Amphibia: Ranidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 161(1), 157-183.
- Sodhi, N. S., Koh, L. P., Clements, R., Wanger, T. C., Hill, J. K., Hamer, K. C., & Lee, T. M. 2010. Conserving Southeast Asian forest biodiversity in human-modified landscapes. *Biological Conservation*. 143(10): 2375-2384.
- Stadler, T. 2010. Sampling-through-time in birth-death trees. *Journal of Theoretical Biology*. 267: 396-404.
- Starr, C., Evers, C., & Starr, L. 2010. **Biology: concepts and applications without physiology**. Boston: Cengage Learning.
- Stuart, B. L. 2008. The phylogenetic problem of *Huia* (Amphibia: Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46(1): 49-60.

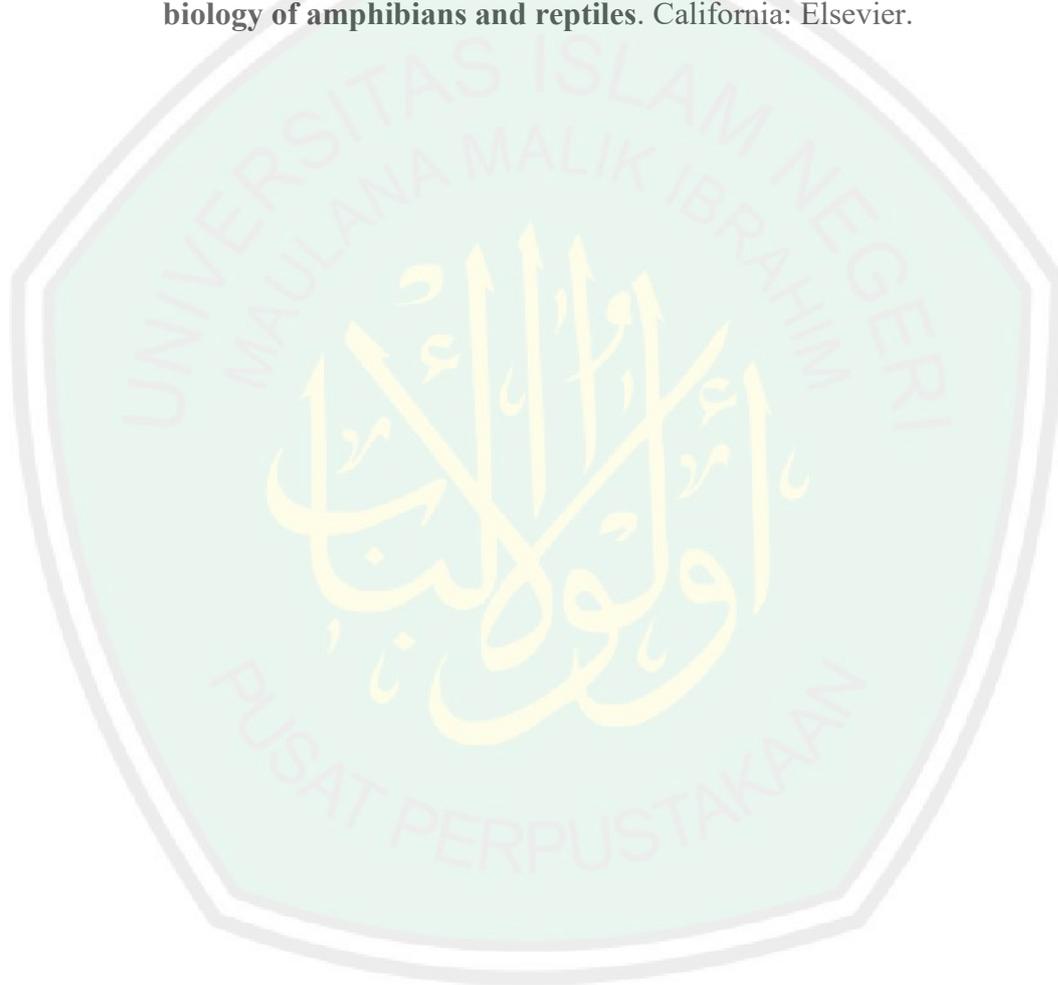
- Swofford, D. L. 2002. **PAUP*. phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tanabe, A. S. 2007. Kakusan: A computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Mole. Ecol. Notes*. 7: 962-964.
- Thorne, J. L., & Kishino, H. 2002. Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. *Systematic biology*, 51(5), 689-702.
- Tjia, H. D. 1980. The Sunda shelf, Southeast Asia. *Z. Geomorph.* 24: 405-427.
- Turelli, M., Barton, N. H., & Coyne, J.A. 2001. Theory and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16(16): 330-343.
- Turner, W. R., Brandon, K., Brooks, T. M., Costanza, R., Da-Fonseca, G. A., & Portela, R. 2007. Global conservation of biodiversity and ecosystem services. *AIBS Bulletin*. 57(10): 868-873.
- van Bemmelen, R. W. 1949. **The geology of Indonesia**. Amsterdam: The Hague, Government Printing Offices.
- van Boxclaer, I., Roelants, K., Biju, S. D., Nagaraju, J., & Bossuyt, F. 2006. Late Cretaceous vicariance in Gondwanan amphibians. *PloS one*. 1(1): e74.
- Voris, H. K. 2000. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of Biogeography*. 27(5): 1153-1167.
- Wallace, A.R. 1876. **The geographical distribution of animals**. New York: Harper & Bro.
- Wang, D. Y. C., Kumar, S., & Hedges, S. B. 1999. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 266(1415): 163-171.
- Whitten, T. 1996. **The Ecology of Java and Bali**. Hong Kong: Periplus Editions.
- Wolstenholme, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution.. *International review of cytology*. 141: 173-216.
- Woodruff, D. S. 2010. Biogeography and conservation in Southeast Asia: how 2.7 million years of repeated environmental fluctuations affect today's patterns and the future of the remaining refugial-phase biodiversity. *Biodiversity and Conservation*. 19(4): 919-941.
- Woods, H. 2012. **Divergence time estimation using BEAST v1.7.2**. Massachusetts: Workshop on Molecular Evolution.
- Xia, Y., Zheng, Y., Miura, I., Wong, P. B., Murphy, R. W., & Zeng, X. 2014. The evolution of mitochondrial genomes in modern frogs (Neobatrachia):

nonadaptive evolution of mitochondrial genome reorganization. *BMC genomics*. 15(1): 691

Yang, D. T. 1991. **Phylogenetic systematics of the *Amolops* group of ranid frogs of Southeastern Asia and the greater Sunda islands**. USA: Fieldiana. Zoology.

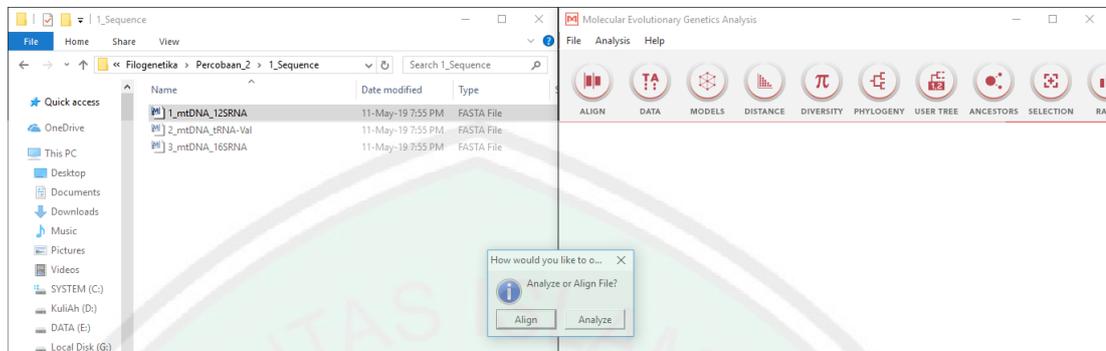
Yang, Z., & Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature reviews genetics*, 13(5): 303.

Zug, G. R., Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. 2001. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. California: Elsevier.



Lampiran 2. Proses *Aligning* Data Sekuen.

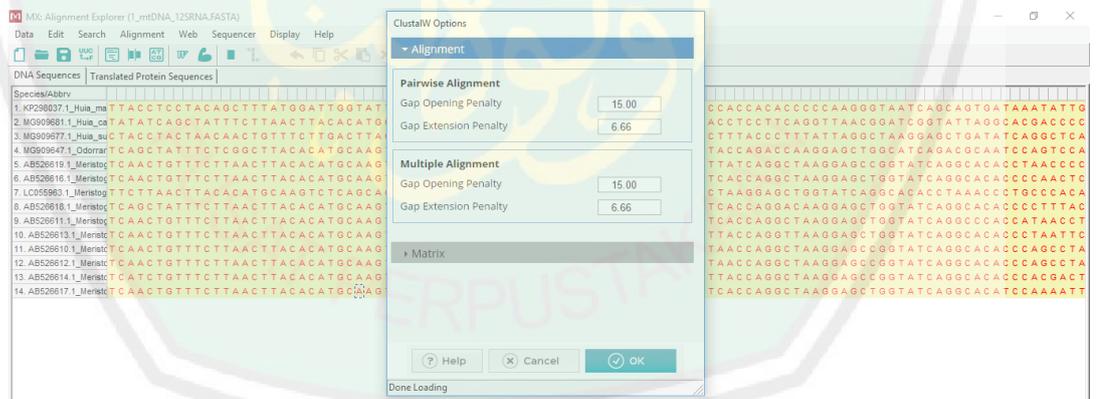
a. Input Data Sekuen setiap Gen, dan klik *Align file*



b. Klik Opsi *Align by Clustal W*



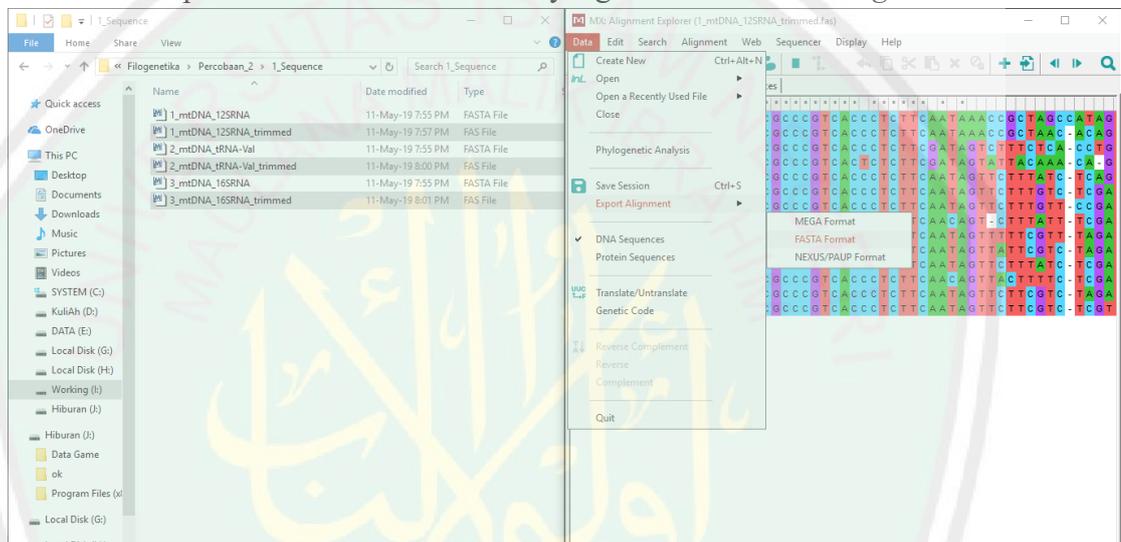
c. *Aligning* dengan Opsi *Default*



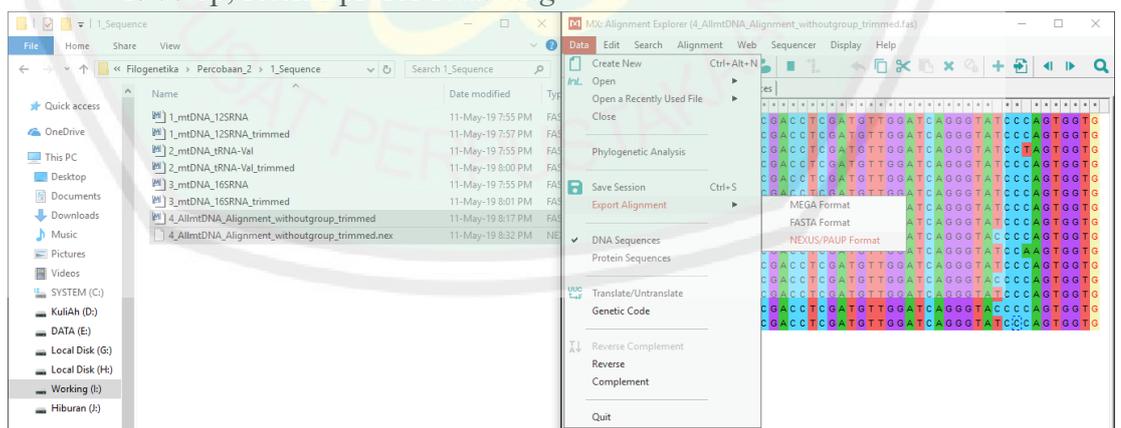
- d. Proses *Trimming* berdasarkan adanya gap/missing data di termina (situs yang di blok)



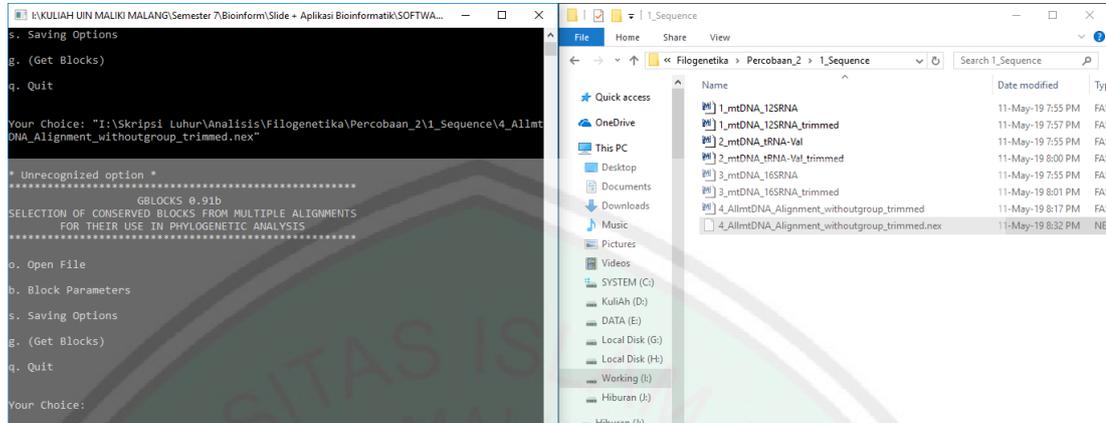
- e. Disimpan keseluruhan dataset file yang berhasil di *Trimming*.



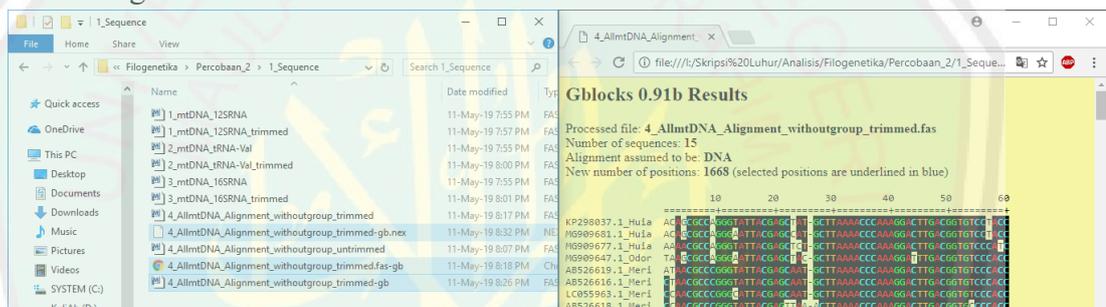
- f. Digabungkan (*concatenated*) seluruh alignment dataset, menghasilkan ~1900 bp, setelah proses *Trimming*



- g. Diseleksi dataset menggunakan gblock, klik open file, dengan block parameter default, dan pilih get block



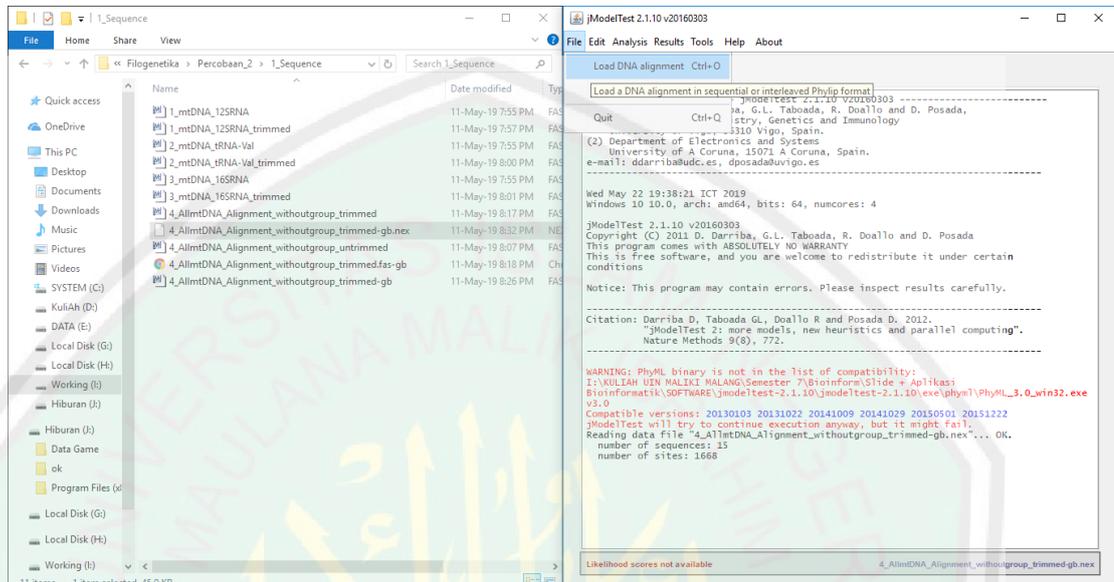
- h. Didapatkan 3 file output berupa sekuen blok, dan informasi parameter yang digunakan



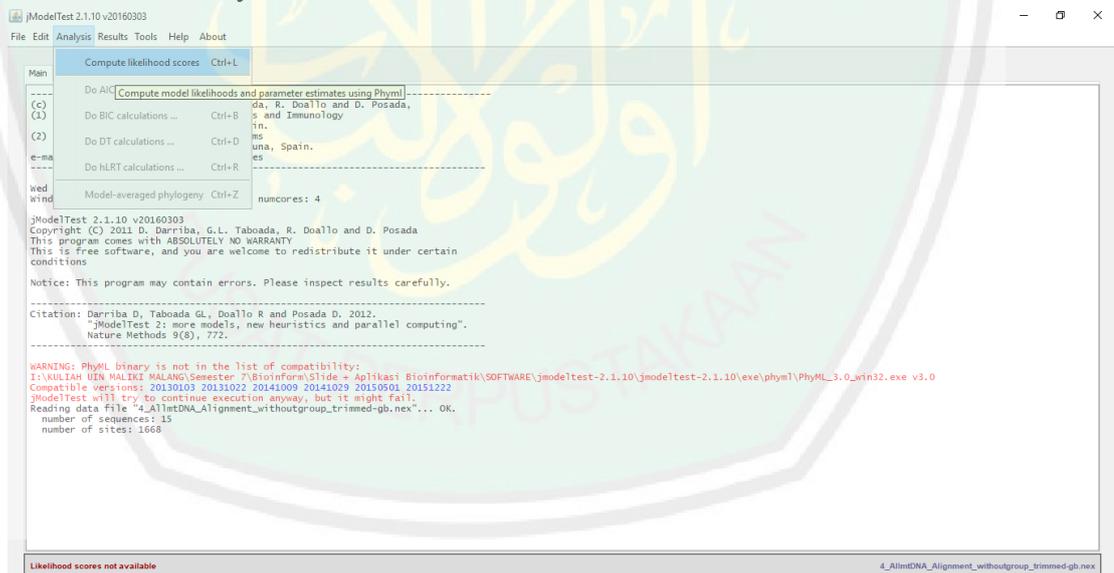
Lampiran 3. Proses Penentuan Model Evolusi.

1. Model Evolusi untuk Analisis ML (Jmodeltest)

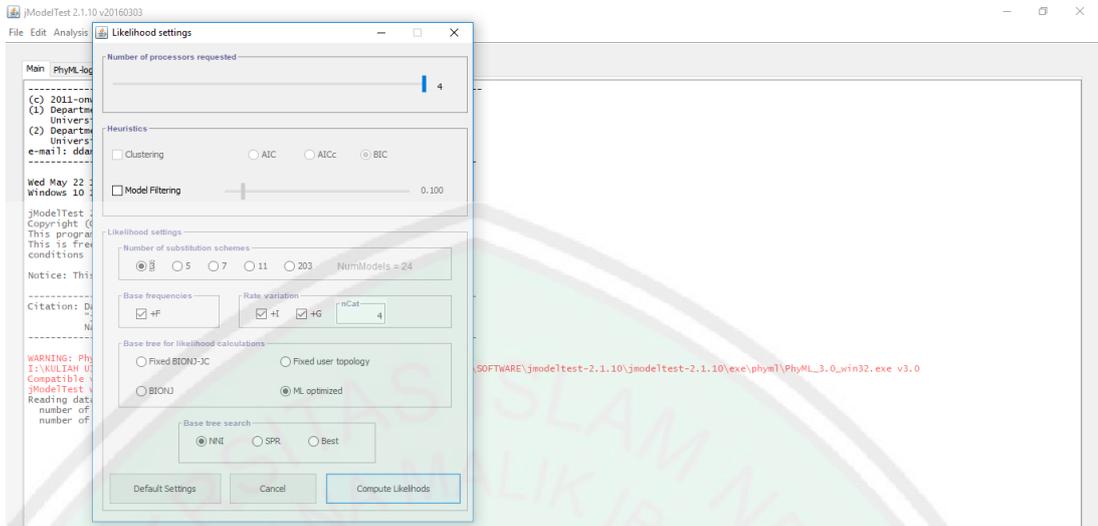
- a. Dibuka software Jmodeltest, Klik File, Pilih *Load DNA Alignment*, dipilih File berformat *.nexus*



- b. Pilih Analysis, kemudian *Estimate Likelihood Score*



c. Di setting *default* kemudian klik Compute



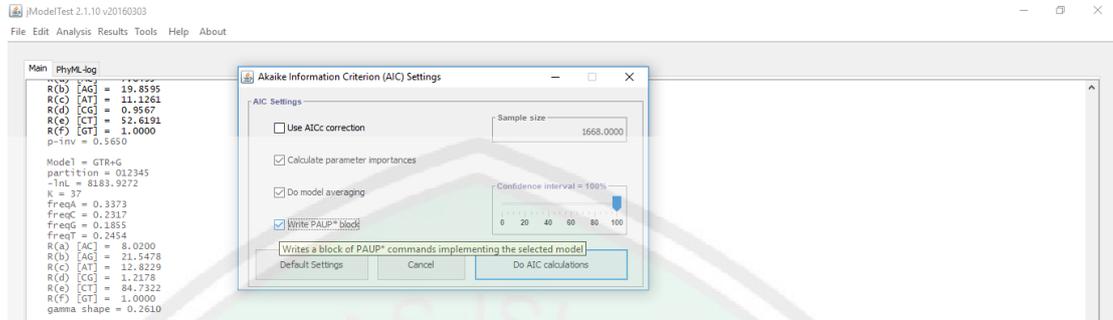
d. Proses estimasi sedang berlangsung



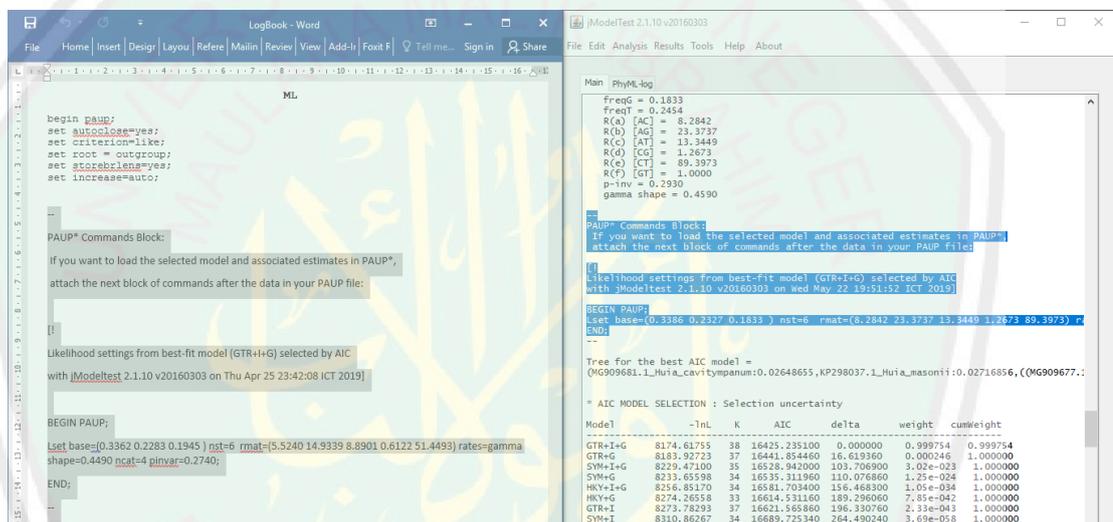
e. Didapatkan estimasi, analisis selanjutnya, diestimasi berdasarkan *AIC Calculation*



f. Diklik *Enable PAUP Block*, sebagai informasi model penentuan evolusi, Klik *Do AIC calculations*

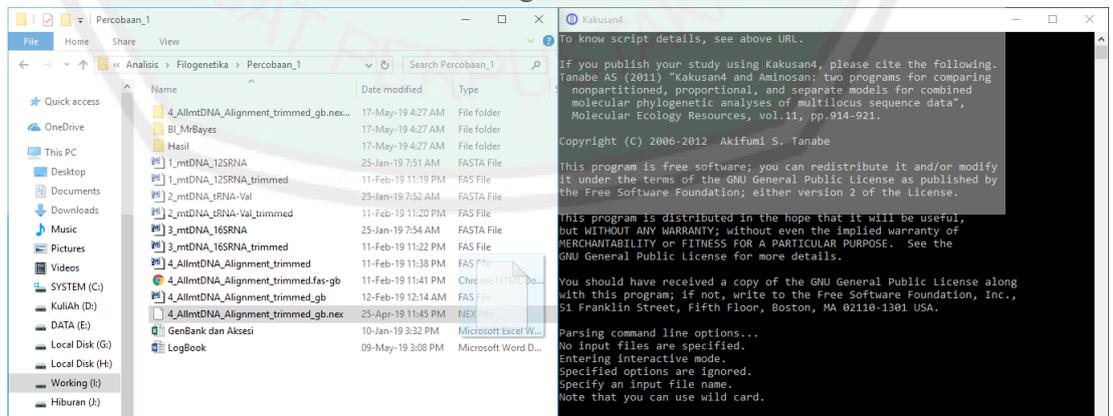


g. Didapatkan PAUP Block *text*, disimpan untuk analisis ML

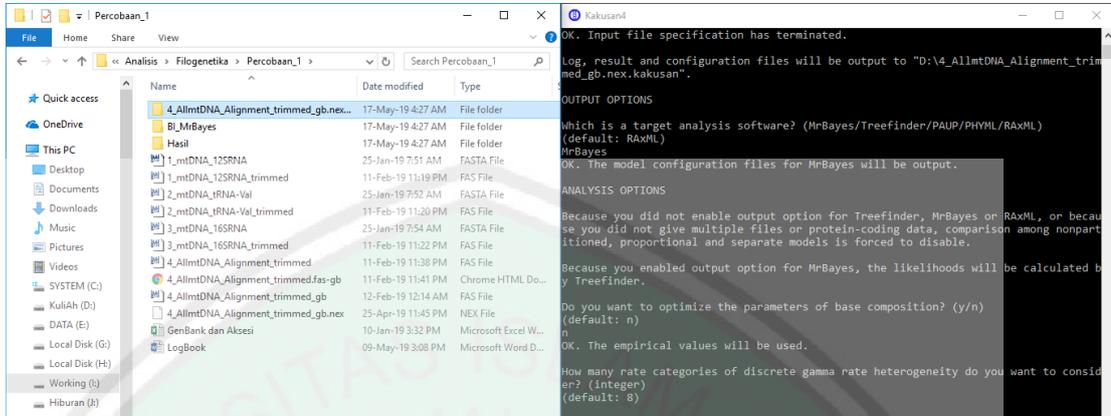


2. Model Evolusi untuk Analisis BI (Kakusan 4)

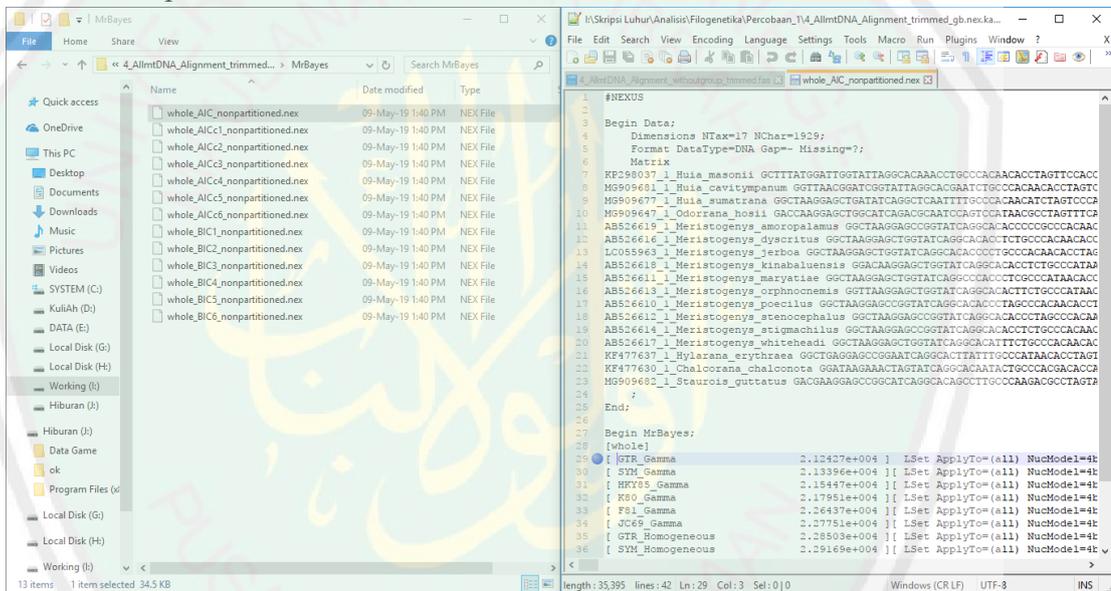
a. Dibuka software Kakusan4, Drag file berformatm *.nexus*



b. Disetting berdasarkan format default, keperluan untuk aplikasi MrBayes, didapatkan output folder dari analisis evolusi.



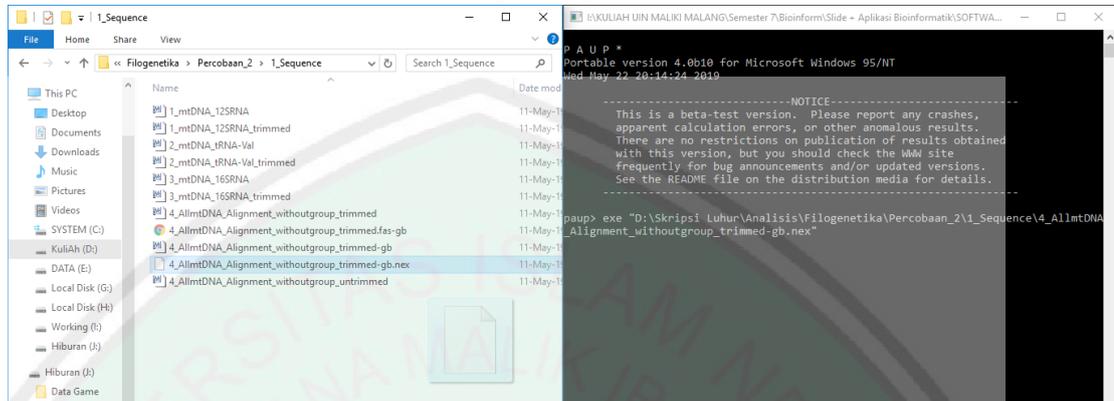
c. Didapatkan hasil model evolusi terbaik untuk analisis BI



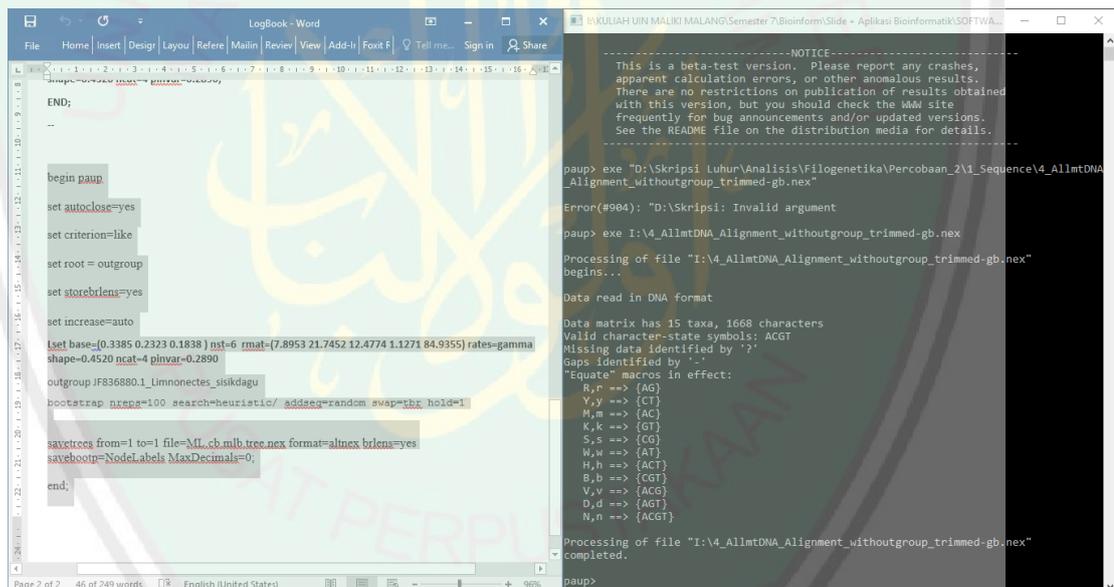
Lampiran 4. Proses Analisis Filogenetik ML, MP, BI.

1. Analisis ML (PAUP)

a. Dibuka software PAUP, input alignment berformat *.nexus*



b. Disetting berdasarkan model evolusi (PAUP Block), dalam sebuah *commandline*, diatur parameter yang telah ditetapkan



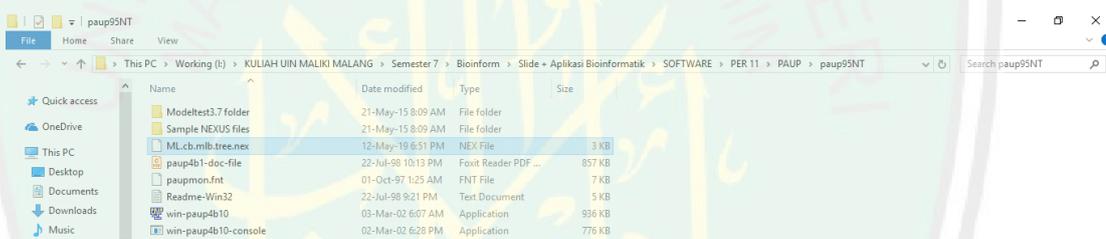
c. Proses estimasi dan rekonstruksi berlangsung

```

KULIAH UIN MALIKI MALANG\Semester 7\Bioinform\Slide - Aplikasi Bioinformatik\SOFTWARE\PER 11\PAUP\paup95NT\win-paup4b10-console.exe
7.895300      7.895300      21.745200      12.477400
21.745200      1.127100      -      1.000000
12.477400      84.935500      1.000000      -
Assumed nucleotide frequencies (set by user):
A=0.33850  C=0.22220  G=0.18300  T=0.24540
Among-site rate variation:
Assumed proportion of invariable sites = 0.289
Distribution of rates at variable sites = gamma (discrete approximation)
Shape parameter (alpha) = 0.452
Number of rate categories = 4
Representation of average rate for each category = mean
These settings correspond to the GTR+G+I model
Number of distinct data patterns under this model = 442
Molecular clock not enforced
Starting branch lengths obtained using Rogers-Swofford approximation method
Trees with approximate likelihoods 5% or further from the target score are rejected without additional iteration
Branch-length optimization = one-dimensional Newton-Raphson with pass limit=20, delta=1e-080
-ln L (unconstrained) = 6160.74849
Starting tree(s) obtained via stepwise addition
Addition sequence: random
Number of replicates = 10
Starting seed = 820421027
Number of trees held at each step during stepwise addition = 1
Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)
Steepest descent option not in effect
Initial 'MaxTrees' setting = 100 (will be auto-increased by 100)
Branches collapsed (creating polytomies) if branch length is less than or equal to 1e-080
'Multrees' option in effect
Topological constraints not enforced
Trees are unrooted

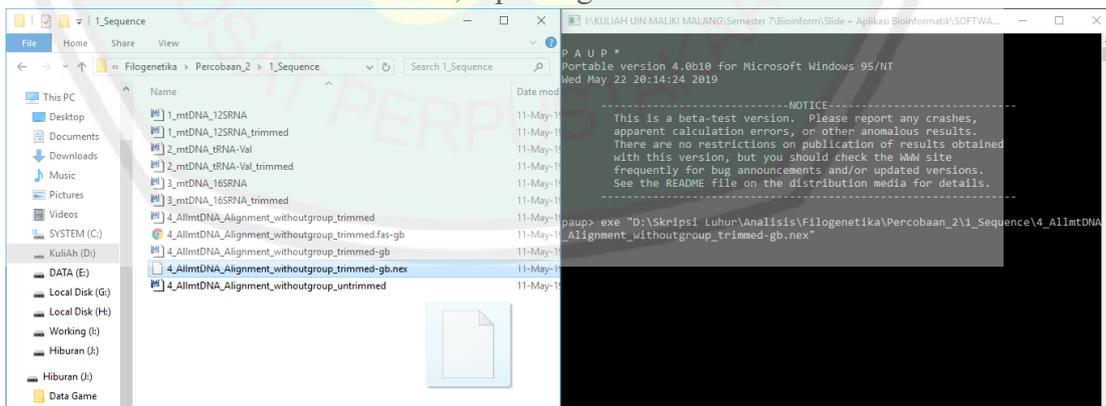
Elapsed Random  Taxa  Rearp.  -- No. of trees --  -- Best trees --
time  rep  added  tried  saved left-to-swap  this rep  overall
-----
0:01:00  Bootstrap replicate 1...
0:01:00      2      14      1574      -      -      -      8085.0589
    
```

d. Didapatkan file output rekonstruksi pohon filogenetik berformat .nex



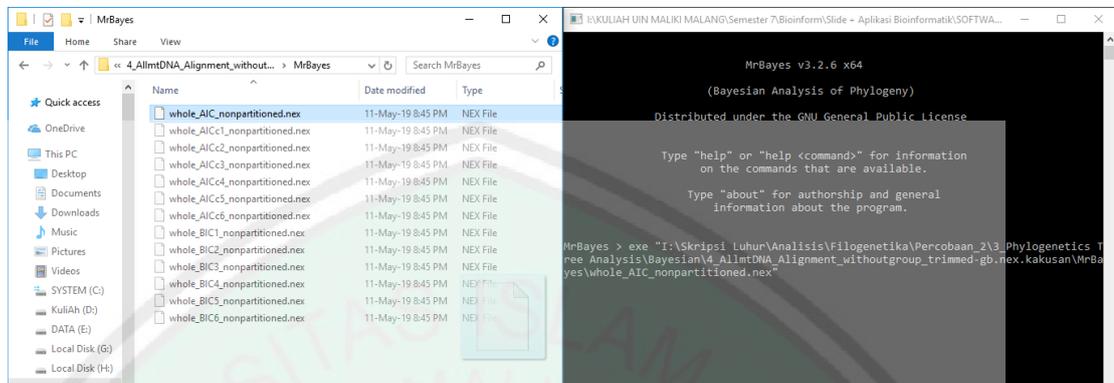
2. Analisis MP (PAUP)

a. Dibuka software PAUP, input alignment berformat .nexus

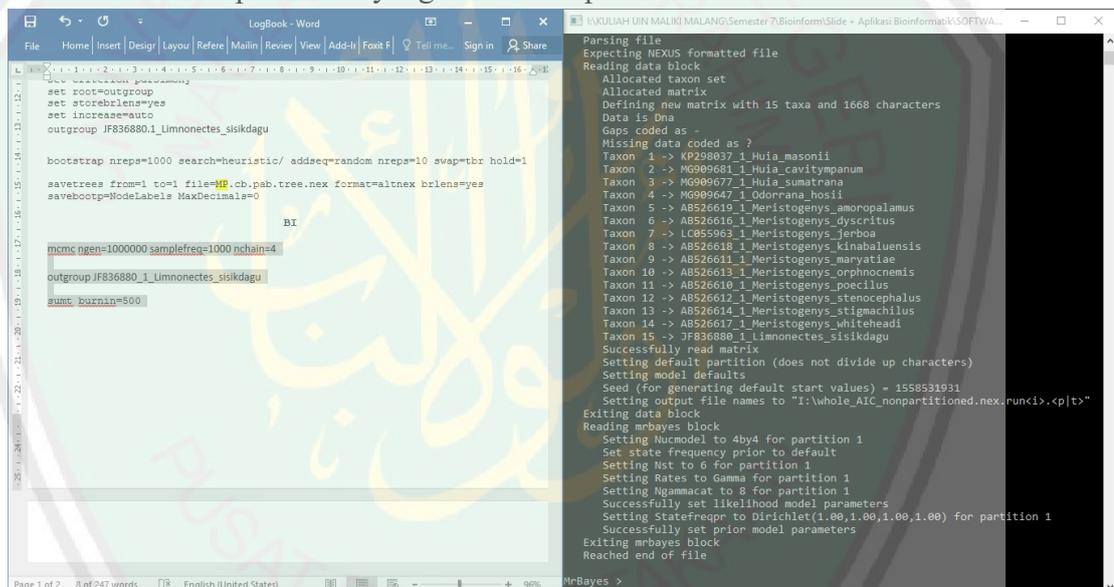


3. Analisis BI (MrBayes)

- a. Dibuka software MrBayes, input *output file* berdasarkan penentuan model evolusi Kakusan berformat *nexus*



- b. Disetting berdasarkan model evolusi, dalam sebuah *commandline*, diatur parameter yang telah ditetapkan



c. Proses estimasi dan rekonstruksi sedang berlangsung

```

KULIAH UIN MALIKI MALANG\Semester 7\Bioinform\Slide - Aplikasi Bioinformatik\SOFTWARE\MrBayes\mrBayes_x64.exe

The MCMC sampler will use the following moves:
With prob. Chain will use move
0.94 % Dirichlet(Revmat)
0.94 % Slider(Revmat)
0.94 % Dirichlet(Pi)
0.94 % Slider(Pi)
1.89 % Multiplier(Alpha)
9.43 % ExtSPR(Tau,V)
9.43 % ExtTBR(Tau,V)
9.43 % NNI(Tau,V)
9.43 % ParsSPR(Tau,V)
37.74 % Multiplier(V)
13.21 % Nodeslider(V)
5.66 % TUMultiplier(V)

Division 1 has 442 unique site patterns
Initializing conditional likelihoods
Using standard SSE likelihood calculator for division 1 (single-precision)

Initial log likelihoods and log prior probs for run 1:
Chain 1 -- -11186.583436 -- 50.806583
Chain 2 -- -11265.095761 -- 50.806583
Chain 3 -- -11038.578232 -- 50.806583
Chain 4 -- -11253.368161 -- 50.806583

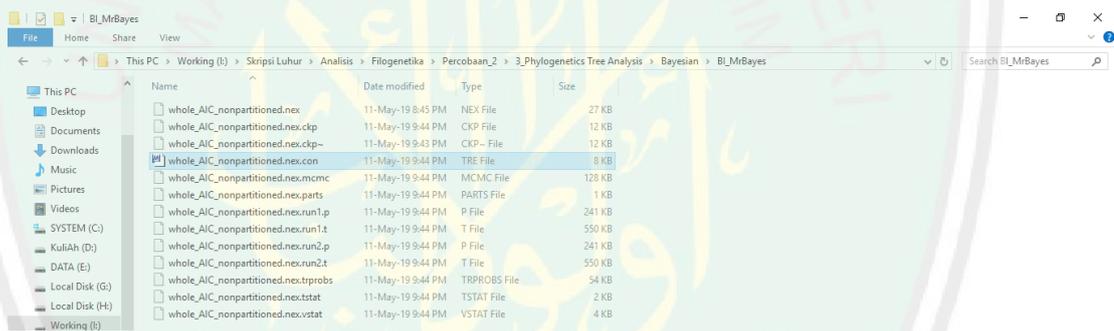
Initial log likelihoods and log prior probs for run 2:
Chain 1 -- -11424.534043 -- 50.806583
Chain 2 -- -10961.022149 -- 50.806583
Chain 3 -- -11361.034372 -- 50.806583
Chain 4 -- -11204.353335 -- 50.806583

Using a relative burnin of 25.0 % for diagnostics

Chain results (100000 generations requested):
0 -- [-11186.583] (-11265.096) (-11038.578) (-11253.368) * [-11424.534] (-10961.022) (-11361.034) (-11204.353)
1000 -- (-8593.157) [-8476.579] (-8586.854) (-8553.898) * (-8638.472) (-8584.889) [-8488.495] (-8625.437) -- 0:49:57
2000 -- (-8372.337) [-8308.381] (-8461.545) (-8462.914) * (-8485.549) [-8369.051] (-8389.618) (-8504.791) -- 0:41:35
3000 -- (-8264.253) [-8227.876] (-8363.238) (-8369.247) * (-8419.306) [-8229.169] (-8321.358) (-8434.928) -- 0:38:46

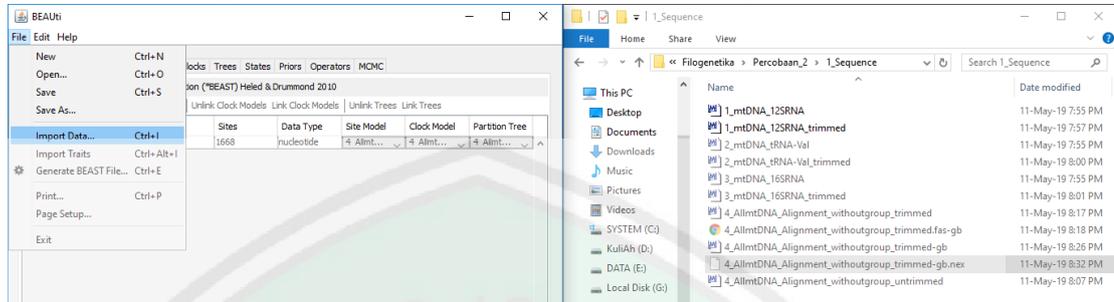
```

d. Didapatkan file output rekonstruksi pohon filogenetik berformat .tre

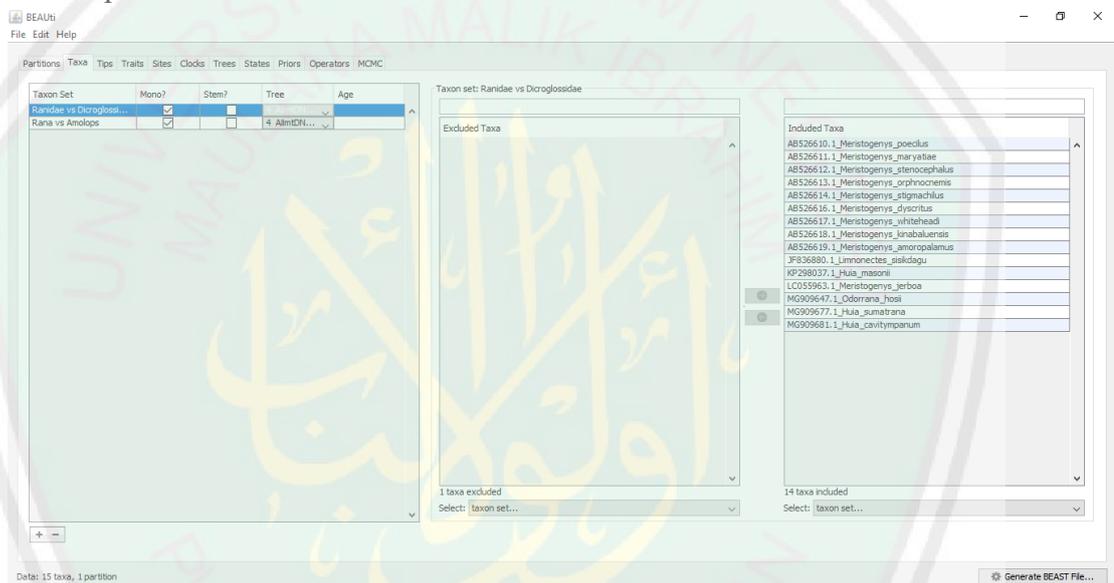


Lampiran 5. Proses Estimasi Waktu Divergensi.

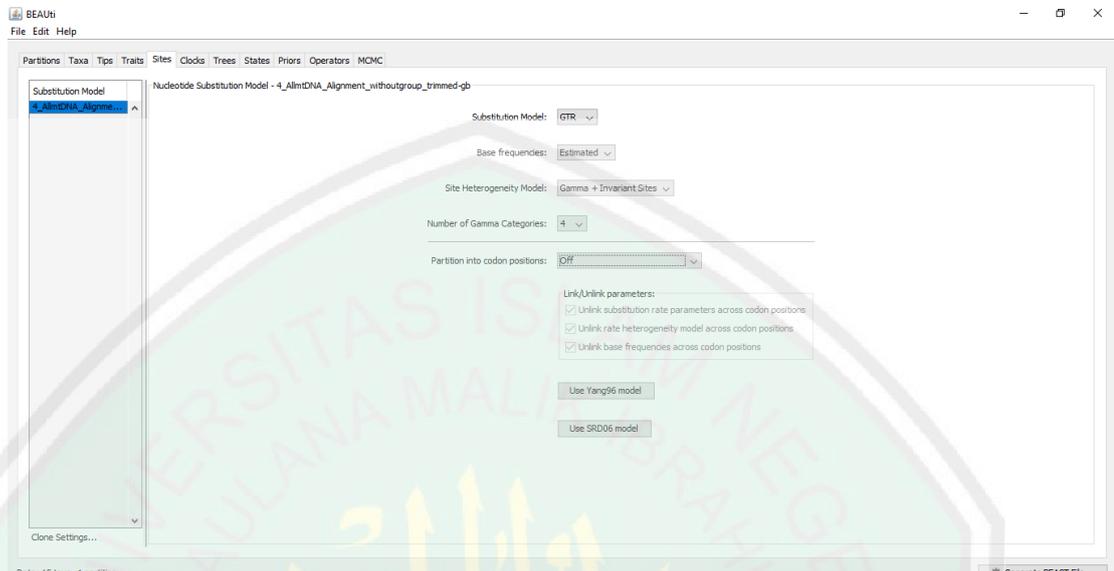
a. Dibuka aplikasi BEAUti, Klik File dan *Import alignment* berformat *.nexus*



b. Diatur pemisahan taksa pada *tab Taxa*, untuk kemudian diatur waktu pemisahan.



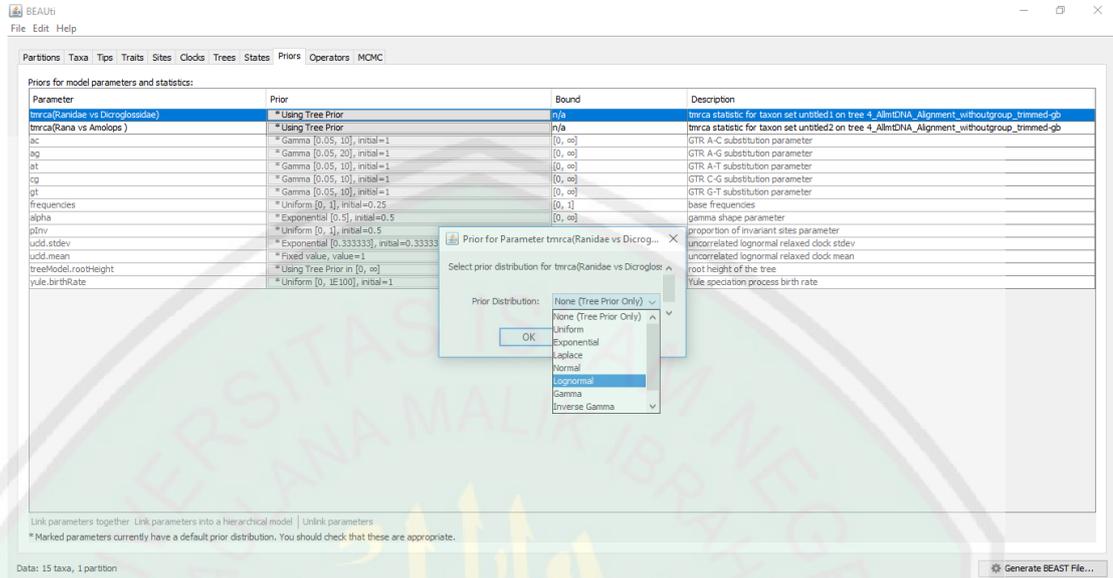
- c. Diatur model evolusi pada *tab Sites*, dipilih model evolusi yang telah diestimasi sebelumnya



- d. Diatur model clocking pada *tab Clock*, dipilih sesuai model yang ditetapkan



- e. Diatur kalibrasi waktu pemisahan sesuai taksa yang telah ditentukan pada *tab Prior*, pilih Log Normal



BEAST
File Edit Help

Partitions Taxa Tips Traits Sites Clocks Trees States Priors Operators MCMC

Priors for model parameters and statistics:

Parameter	Prior	Bound	Description
tmrca(Ranidae vs Dicroglossidae)	* Using Tree Prior	n/a	tmrca statistic for taxon set untrimmed1 on tree 4_AlmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb
tmrca(Rana vs Amolops)	* Using Tree Prior	n/a	tmrca statistic for taxon set untrimmed2 on tree 4_AlmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb
ac	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞)	GTR A-C substitution parameter
ag	* Gamma [0.05, 20], initial=1	[0, ∞)	GTR A-G substitution parameter
at	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞)	GTR A-T substitution parameter
cg	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞)	GTR C-G substitution parameter
gt	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞)	GTR G-T substitution parameter
frequencies	* Uniform [0, 1], initial=0.25	[0, 1]	base frequencies
alpha	* Exponential [0.5], initial=0.5	[0, ∞)	gamma shape parameter
pinv	* Uniform [0, 1], initial=0.5	[0, 1]	proportion of invariant sites parameter
ucld.stdev	* Exponential [0.333333], initial=0.333333	[0, ∞)	uncorrelated lognormal relaxed clock stdev
ucld.mean	* Fixed value, value=1	[0, ∞)	uncorrelated lognormal relaxed clock mean
treeModel.rootHeight	* Using Tree Prior in [0, ∞)	[0, ∞)	root height of the tree
rate.birthRate	* Uniform [0, 1E100], initial=1	[0, ∞)	Yule speciation process birth rate

Prior for Parameter tmrca(Ranidae vs Dicroglossidae):

Select prior distribution for tmrca(Ranidae vs Dicroglossidae):

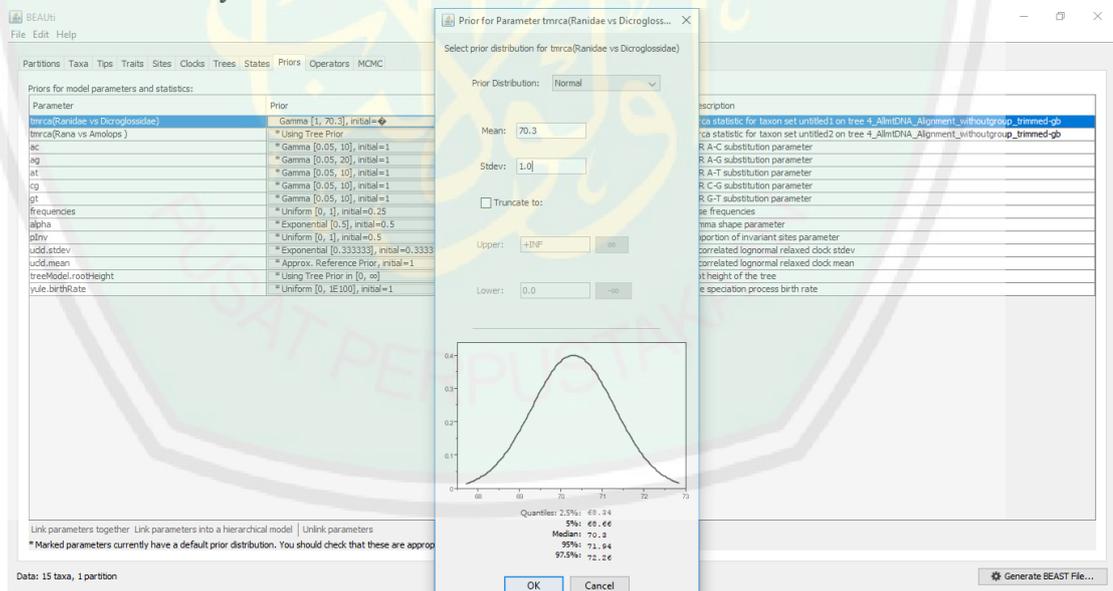
Prior Distributions: None (Tree Prior Only) | None (Tree Prior Only) | Uniform | Exponential | Laplace | Normal | **Log Normal** | Gamma | Inverse Gamma

Link parameters together | Link parameters into a hierarchical model | Unlink parameters
* Marked parameters currently have a default prior distribution. You should check that these are appropriate.

Data: 15 taxa, 1 partition

Generate BEAST File...

- f. Diatur kalibrasi waktu taksa yang berdivergensi, dengan mengatur parameter *Mean* dan *Stdev* membentuk distribusi yang sesuai dengan intervalnya.



BEAST
File Edit Help

Partitions Taxa Tips Traits Sites Clocks Trees States Priors Operators MCMC

Priors for model parameters and statistics:

Parameter	Prior	Bound	Description
tmrca(Ranidae vs Dicroglossidae)	Gamma [1, 70.3], initial=	[0, ∞)	tmrca statistic for taxon set untrimmed1 on tree 4_AlmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb
tmrca(Rana vs Amolops)	* Using Tree Prior	n/a	tmrca statistic for taxon set untrimmed2 on tree 4_AlmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb
ac	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞)	GTR A-C substitution parameter
ag	* Gamma [0.05, 20], initial=1	[0, ∞)	GTR A-G substitution parameter
at	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞)	GTR A-T substitution parameter
cg	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞)	GTR C-G substitution parameter
gt	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞)	GTR G-T substitution parameter
frequencies	* Uniform [0, 1], initial=0.25	[0, 1]	base frequencies
alpha	* Exponential [0.5], initial=0.5	[0, ∞)	gamma shape parameter
pinv	* Uniform [0, 1], initial=0.5	[0, 1]	proportion of invariant sites parameter
ucld.stdev	* Exponential [0.333333], initial=0.333333	[0, ∞)	uncorrelated lognormal relaxed clock stdev
ucld.mean	* Approx. Reference Prior, initial=1	[0, ∞)	uncorrelated lognormal relaxed clock mean
treeModel.rootHeight	* Using Tree Prior in [0, ∞)	[0, ∞)	root height of the tree
rate.birthRate	* Uniform [0, 1E100], initial=1	[0, ∞)	Yule speciation process birth rate

Prior for Parameter tmrca(Ranidae vs Dicroglossidae):

Select prior distribution for tmrca(Ranidae vs Dicroglossidae):

Prior Distributions: Normal

Mean: 70.3

Stdev: 1.0

Truncate to:

Upper: +INF

Lower: 0.0

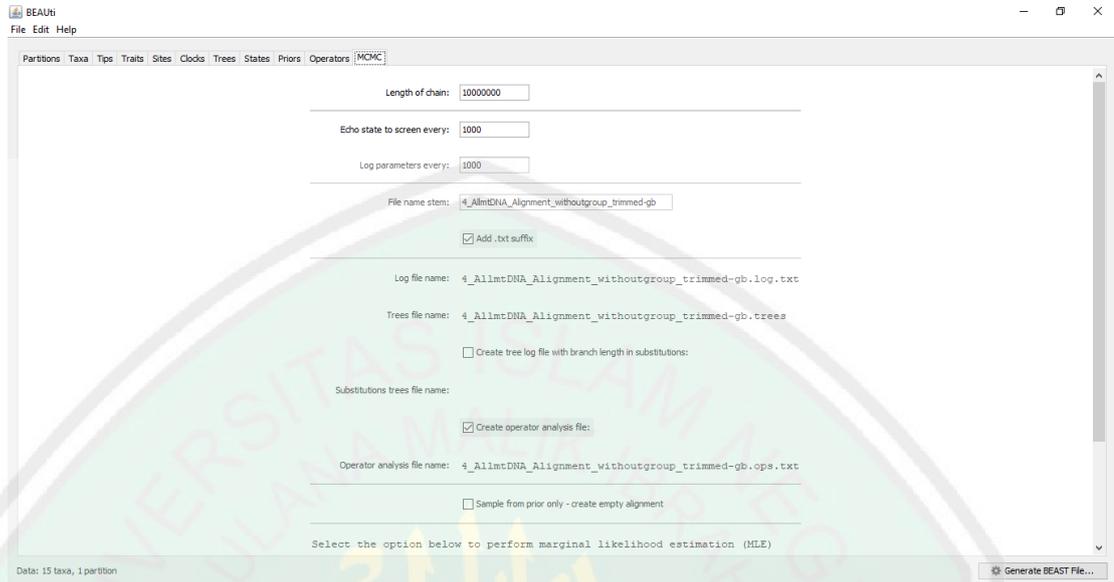
Quantiles: 2.5%: 69.24
5%: 69.66
Median: 70.3
95%: 71.94
97.5%: 72.16

Link parameters together | Link parameters into a hierarchical model | Unlink parameters
* Marked parameters currently have a default prior distribution. You should check that these are appropriate.

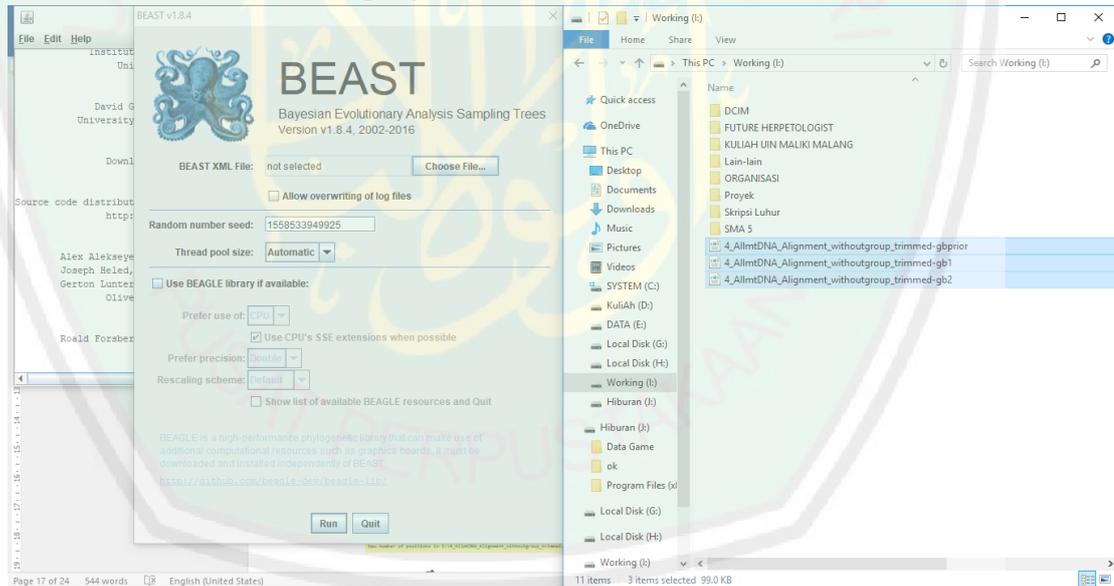
Data: 15 taxa, 1 partition

Generate BEAST File...

- g. Diatur parameter analisis lainnya pada *tab MCMC* berdasarkan parameter yang telah ditentukan, Klik *Generate BEAST File*,



- h. Didapatkan file berformat *.xml*, *output file* di *running* menggunakan BEAST, Choose *output file*, kemudian *Run*



i. Dilakukan *running* pada setiap *output file* yang dihasilkan

```

4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb1.xml
File Edit Help
TreeLikelihood(treeModel) using Java nucleotide likelihood core
Ignoring ambiguities in tree likelihood.
With 442 unique site patterns.
Branch rate model used: discretizedBranchRates
Creating swap operator for parameter branchRates.categories (weight=10.0)
Optimization Schedule: default
Likelihood computation is using an auto sizing thread pool.
Creating the MCMC chain:
chainLength=1000000
autoOptimize=true
autoOptimize delayed for 100000 steps

Citations for this analysis:

FRAMEWORK
BEAST primary citation:
  Drummond AJ, Suchard MA, Xie Dong, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol Biol Evol. 29, 1969-1973. DOI:10.1093/molbev/mss075

TREE DENSITY MODELS
Gernhard 2008 Birth Death Tree Model:
  Gernhard T (2008) The conditioned reconstructed process. Journal of Theoretical Biology. 253, 769-778. DOI:10.1016/j.jtbi.2008.04.005

MOLECULAR CLOCK MODELS
Uncorrelated relaxed clock:
  Drummond AJ, Ho SW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. PLoS Biology. 4: e88. DOI:10.1371/journal.pbio.0040088

SUBSTITUTION MODELS
GTR nucleotide substitution model:
  Tavaré S (1985) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: Miura R. M., editor. Lectures on mathematics in the life sciences.. 17, 57-86

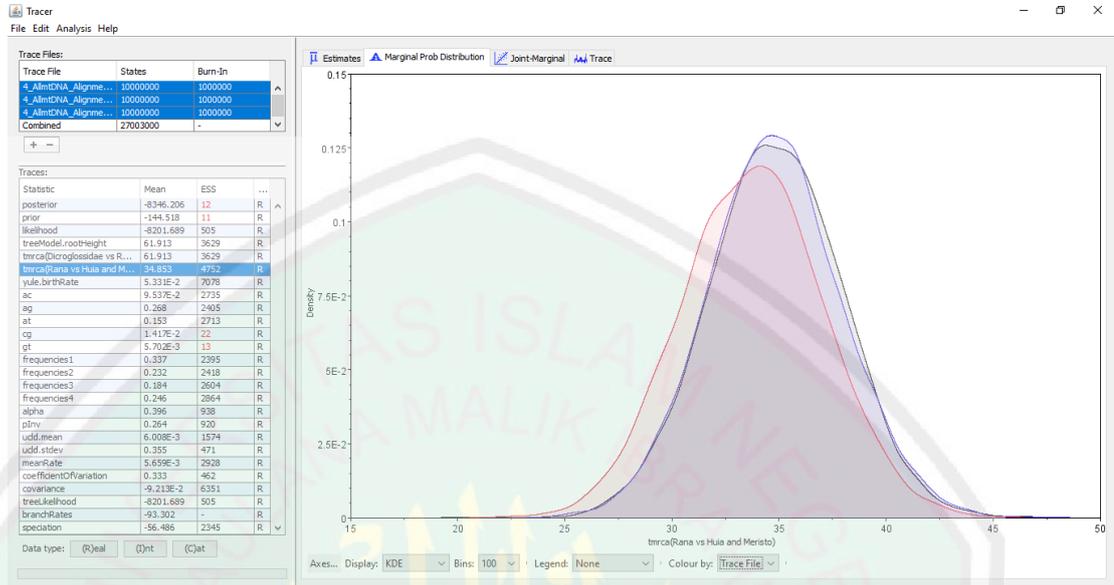
# BEAST v1.8.4
# Generated Wed May 22 21:07:01 ICT 2019 [seed=1558533949925]
# -window -working -options
state Posterior Prior Likelihood rootHeight ucl.d.mean
0 -15778.9043 -1616.0972 -14162.8070 189.476 1.00000 -
1000 -9868.9281 -194.0703 -9674.8578 68.9116 1.32557 -

```

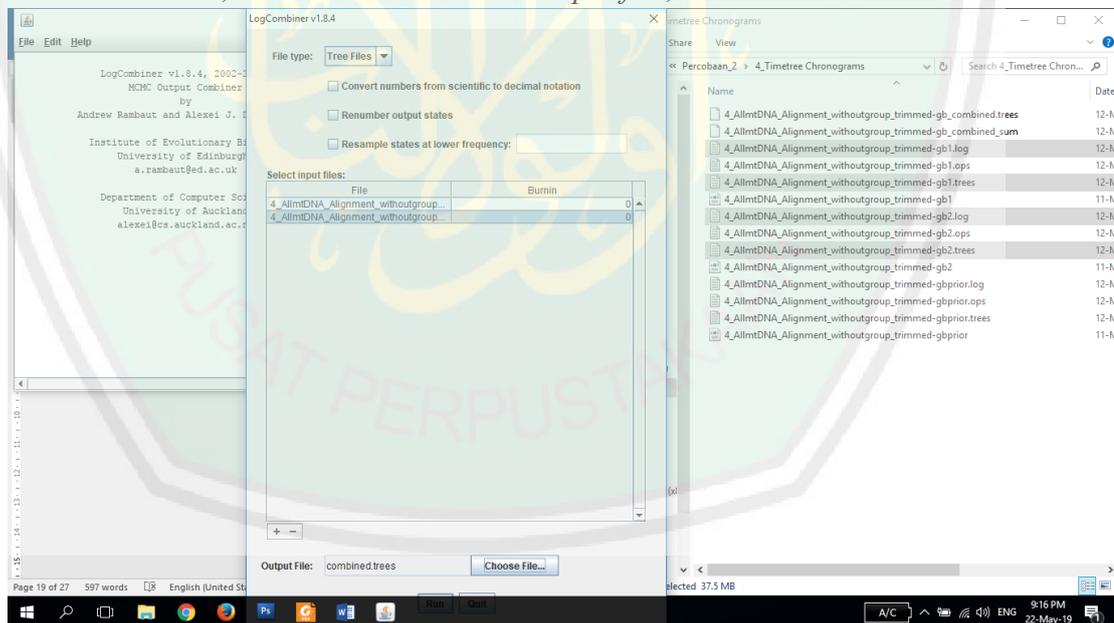
j. Didapatkan 3 *output file*, berformat *.log* (*statistical information*), *.trees* (*raw trees*), dan *.ops* (*running information*).

Name	Date modified	Type	Size
DCIM	29-Apr-19 8:36 PM	File folder	
FUTURE HERPETOLOGIST	21-Jan-19 1:38 PM	File folder	
KULIAH UIN MALIKI MALANG	20-May-19 4:52 AM	File folder	
Lain-lain	29-Apr-19 8:36 PM	File folder	
ORGANISASI	21-Jan-19 1:06 PM	File folder	
Proyek	11-May-19 4:17 PM	File folder	
Skripsi Luhur	20-May-19 4:50 AM	File folder	
SMA 5	21-Jan-19 1:36 PM	File folder	
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb1.log	12-May-19 12:06 ...	Text Document	5,058 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb1.ops	12-May-19 12:06 ...	Text Document	3 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb1.trees	12-May-19 12:06 ...	Text Document	14,161 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb1	11-May-19 11:09 P...	XML Document	42 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb2.log	12-May-19 4:42 AM	Text Document	5,054 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb2.ops	12-May-19 4:42 AM	Text Document	3 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb2.trees	12-May-19 4:42 AM	Text Document	14,162 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb2	11-May-19 11:09 P...	XML Document	42 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gbprior.log	12-May-19 5:12 AM	Text Document	5,138 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gbprior.ops	12-May-19 5:12 AM	Text Document	3 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gbprior.trees	12-May-19 5:12 AM	Text Document	13,658 KB
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gbprior	11-May-19 11:10 P...	XML Document	17 KB

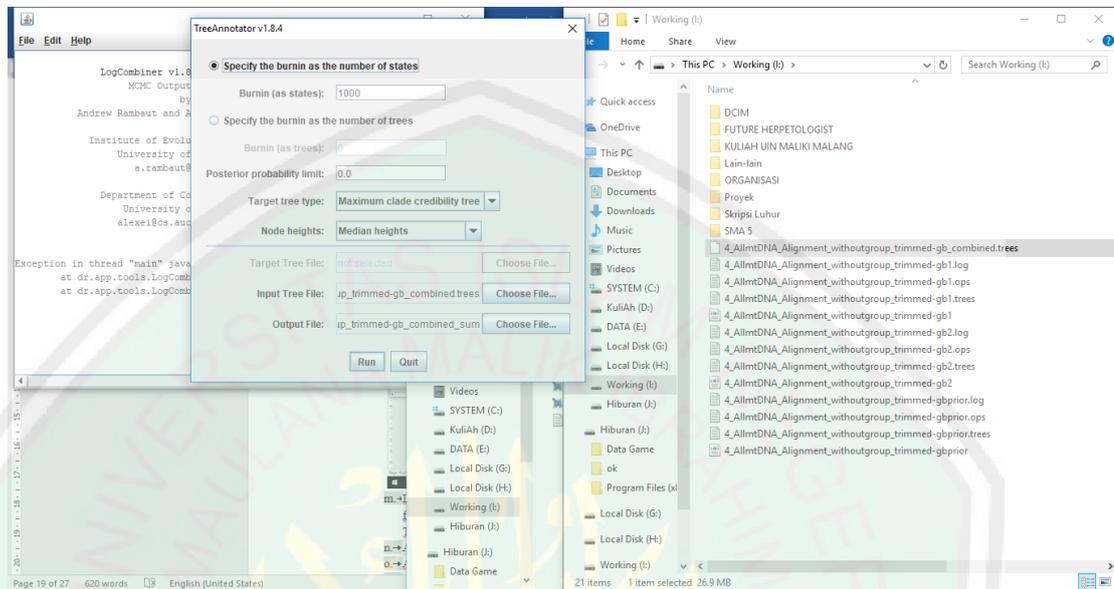
- k. Dibuka *software* Tracer, diinspeksi konvergenitas, ESS, dan distribusi dengan klik ikon +



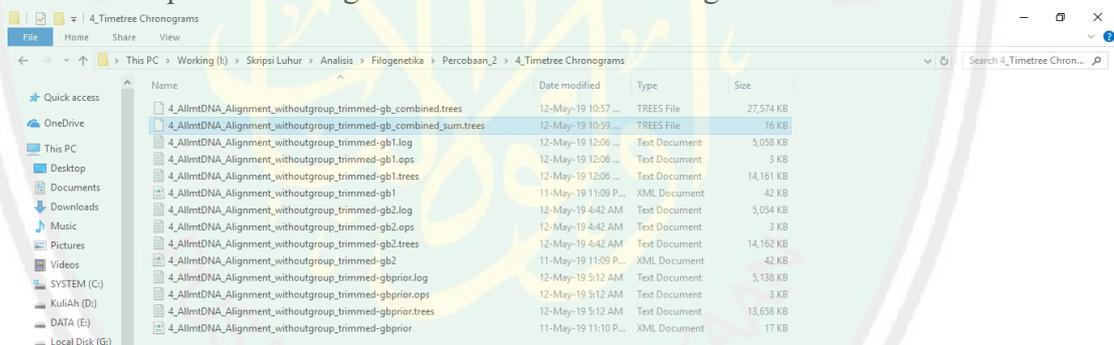
1. Dikombinasikan *output file* menggunakan *Logcombiner*, untuk distribusi Posterior, dan diatur nama untuk *output file*, Klik Run.



- m. Didapatkan estimasi dan rekonstruksi pohon yang dikombinasikan dalam format *.trees*. Kemudian diringkas (*discarding=burnin*) melalui aplikasi TreeAnnotator, diatur input, output file, dan jumlah *discarding trees*. Klik Run



- n. Didapatkan Kronogram Estimasi Waktu Divergensi berformat *.trees*



Lampiran 6. Hasil parameter gBlock yang diterapkan.

```

file:///C:/Users/Windows%2010/Desktop/Luhur/Skripsi/Analisis/Filogenetika/Percobaan_2/1_Sequence/4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed.fas-gb.htm
KP298037.1_Huiza GTATCCCAAGTGGTG
MG909681.1_Huiza GTATCCCAAGTGGTG
MG909677.1_Huiza GTATCCCAAGTGGTG
MG909647.1_Odor GTATCCCAAGTGGTG
AB526619.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
AB526616.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
LC055963.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
AB526618.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
AB526611.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
AB526613.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
AB526610.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
AB526612.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
AB526614.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
AB526617.1_Meri GTATCCCAAGTGGTG
JF836800.1_Limn GTATCCCAAGTGGTG

Parameters used
Minimum Number Of Sequences For A Conserved Position: 8
Minimum Number Of Sequences For A Flanking Position: 12
Maximum Number Of Contiguous Nonconserved Positions: 8
Minimum Length Of A Block: 10
Allowed Gap Positions: None

Flank positions of the 35 selected block(s)
Flanks: [3 25] [27 119] [123 185] [192 282] [288 338] [340 382] [428 440] [476 536] [538 561] [566 579] [593 615] [617 641] [643 682]

New number of positions in I:\4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed.fas-gb: 1668 (86% of the original 1934 positions)

```

Lampiran 7. Hasil penentuan model evolusi Jmodeltest untuk analisis *Maximum Likelihood*.

```

jModelTest 2.1.10 v20160303
File Edit Analysis Results Tools Help About

Main PhyML-log
Tree = 0.2433
R(a) [AC] = 8.0912
R(b) [AG] = 22.7816
R(c) [AT] = 13.0282
R(d) [CG] = 1.2083
R(e) [CT] = 87.0672
R(f) [GT] = 1.0000
p-inv = 0.2880
gamma shape = 0.4530

--
PAUP* Commands Block:
If you want to load the selected model and associated estimates in PAUP*,
attach the next block of commands after the data in your PAUP file:

[!]
Likelihood settings from best-fit model (GTR+I+G) selected by AIC
with jModeltest 2.1.10 v20160303 on Tue May 14 12:15:19 ICT 2019]

BEGIN PAUP;
Lset base=(0.3386 0.2327 0.1834 ) nst=6 rmat=(8.0912 22.7816 13.0282 1.2083 87.0672) rates=gamma shape=0.4530 n
END;
--

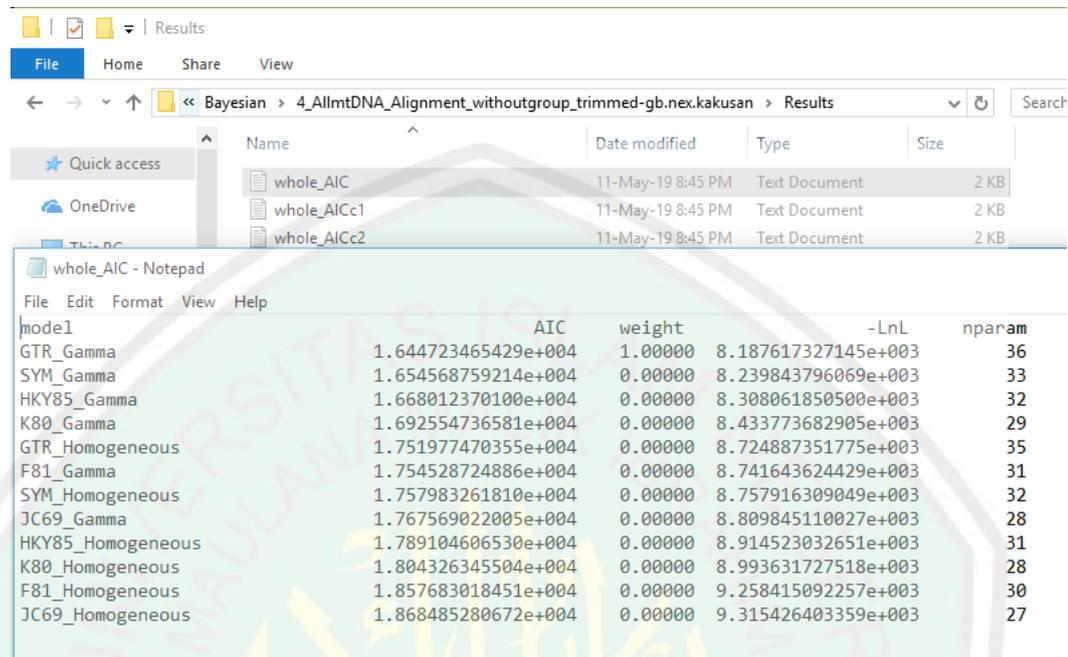
Tree for the best AIC model =
(MG909681.1_Huia_cavitypanum:0.02678063,KP298037.1_Huia_masonii:0.02667091,(MG909677.1_Huia_sumatrana:0.161978

* AIC MODEL SELECTION : Selection uncertainty

Model      -lnL      K      AIC      delta      weight      cumWeight
<----->

Likelihood scores loaded for 24 models (optimized trees)
4_AllmtDNA_Alignment_withoutgroup_trimmed-gb.nex
  
```

Lampiran 8. Hasil Penentuan Model evolusi Kakusan 4 untuk analisis filogenetik
Bayesian Inference

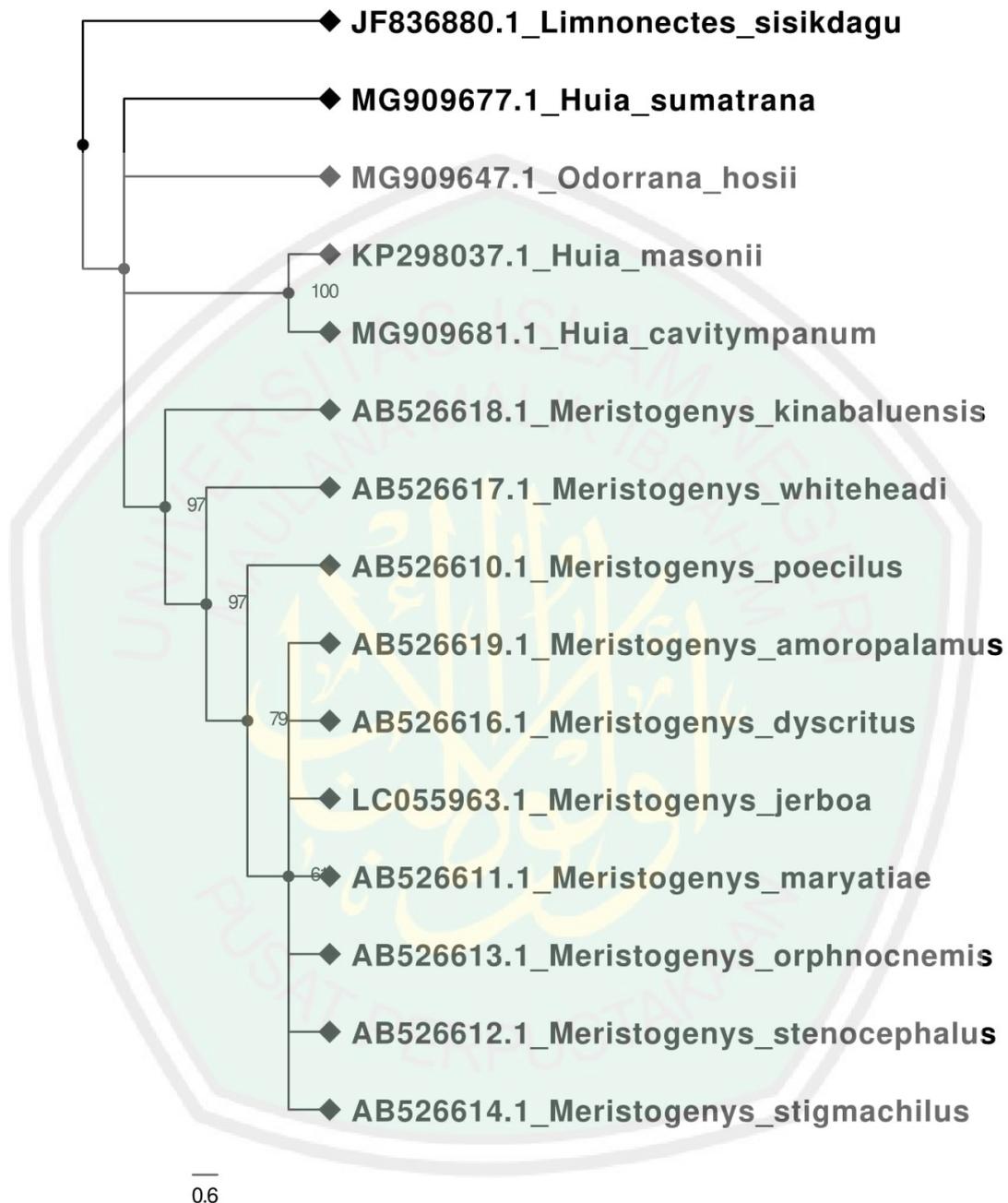


model	AIC	weight	-LnL	nparam
GTR_Gamma	1.644723465429e+004	1.00000	8.187617327145e+003	36
SYM_Gamma	1.654568759214e+004	0.00000	8.239843796069e+003	33
HKY85_Gamma	1.668012370100e+004	0.00000	8.308061850500e+003	32
K80_Gamma	1.692554736581e+004	0.00000	8.433773682905e+003	29
GTR_Homogeneous	1.751977470355e+004	0.00000	8.724887351775e+003	35
F81_Gamma	1.754528724886e+004	0.00000	8.741643624429e+003	31
SYM_Homogeneous	1.757983261810e+004	0.00000	8.757916309049e+003	32
JC69_Gamma	1.767569022005e+004	0.00000	8.809845110027e+003	28
HKY85_Homogeneous	1.789104606530e+004	0.00000	8.914523032651e+003	31
K80_Homogeneous	1.804326345504e+004	0.00000	8.993631727518e+003	28
F81_Homogeneous	1.857683018451e+004	0.00000	9.258415092257e+003	30
JC69_Homogeneous	1.868485280672e+004	0.00000	9.315426403359e+003	27

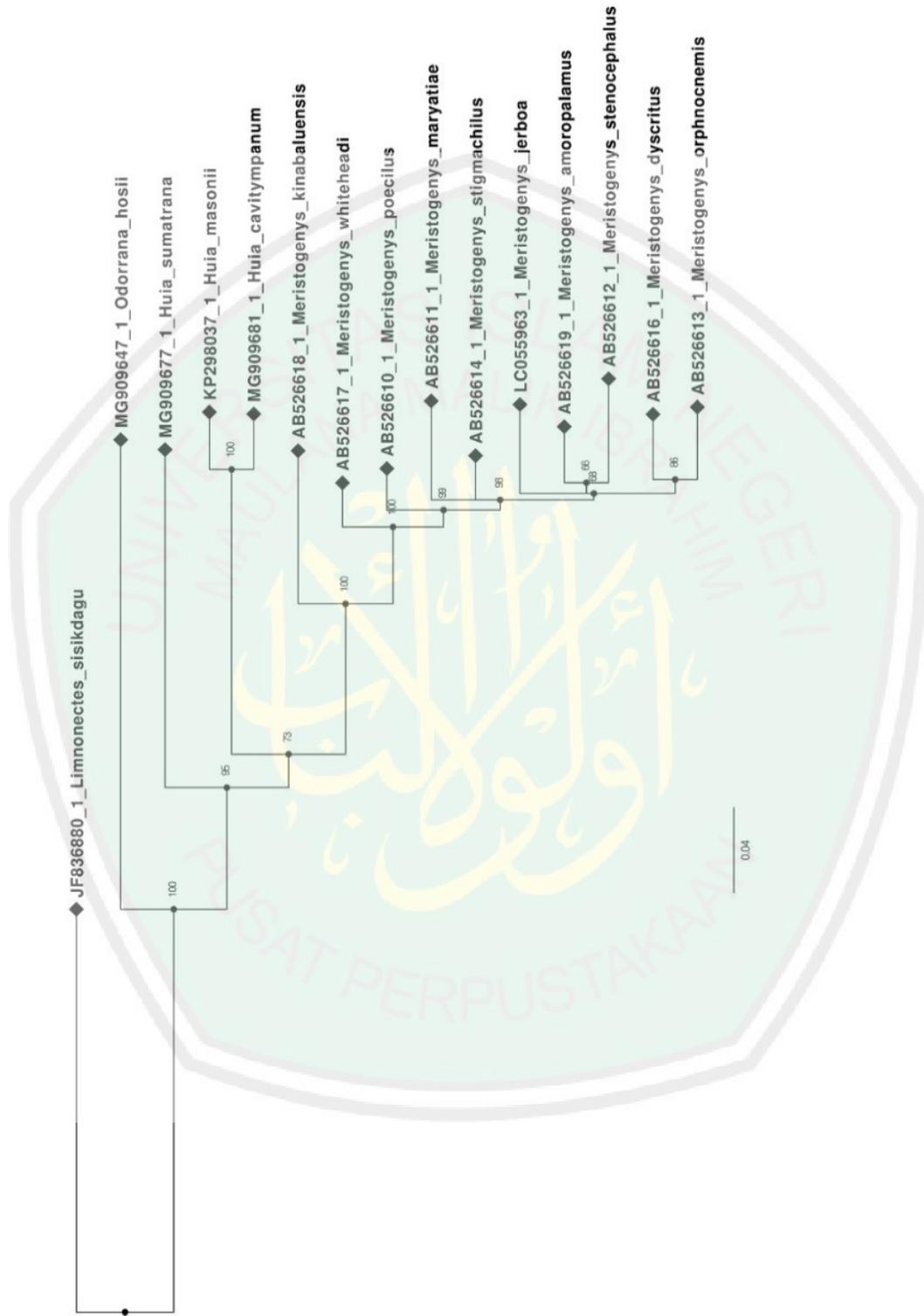
Lampiran 9. Character state dari sekuen yang didapatkan dari *software* PAUP

```
paup>
paup> bootstrap nreps=1000 search=heuristic/ addseq=random nreps=10 swap=tbr hold=1
Bootstrap method with heuristic search:
Number of bootstrap replicates = 1000
Starting seed = 621378485
Optimality criterion = parsimony
Character-status summary:
Of 1668 total characters:
  All characters are of type 'unord'
  All characters have equal weight
  1041 characters are constant
  235 variable characters are parsimony-uninformative
  Number of parsimony-informative characters = 392
Gaps are treated as "missing"
Starting tree(s) obtained via stepwise addition
Addition sequence: random
Number of replicates = 10
Starting seed = 1415786673
Number of trees held at each step during stepwise addition = 1
Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)
Steepest descent option not in effect
Initial 'MaxTrees' setting = 100 (will be auto-increased by 100)
Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero
'MulTrees' option in effect
Topological constraints not enforced
Trees are unrooted
```

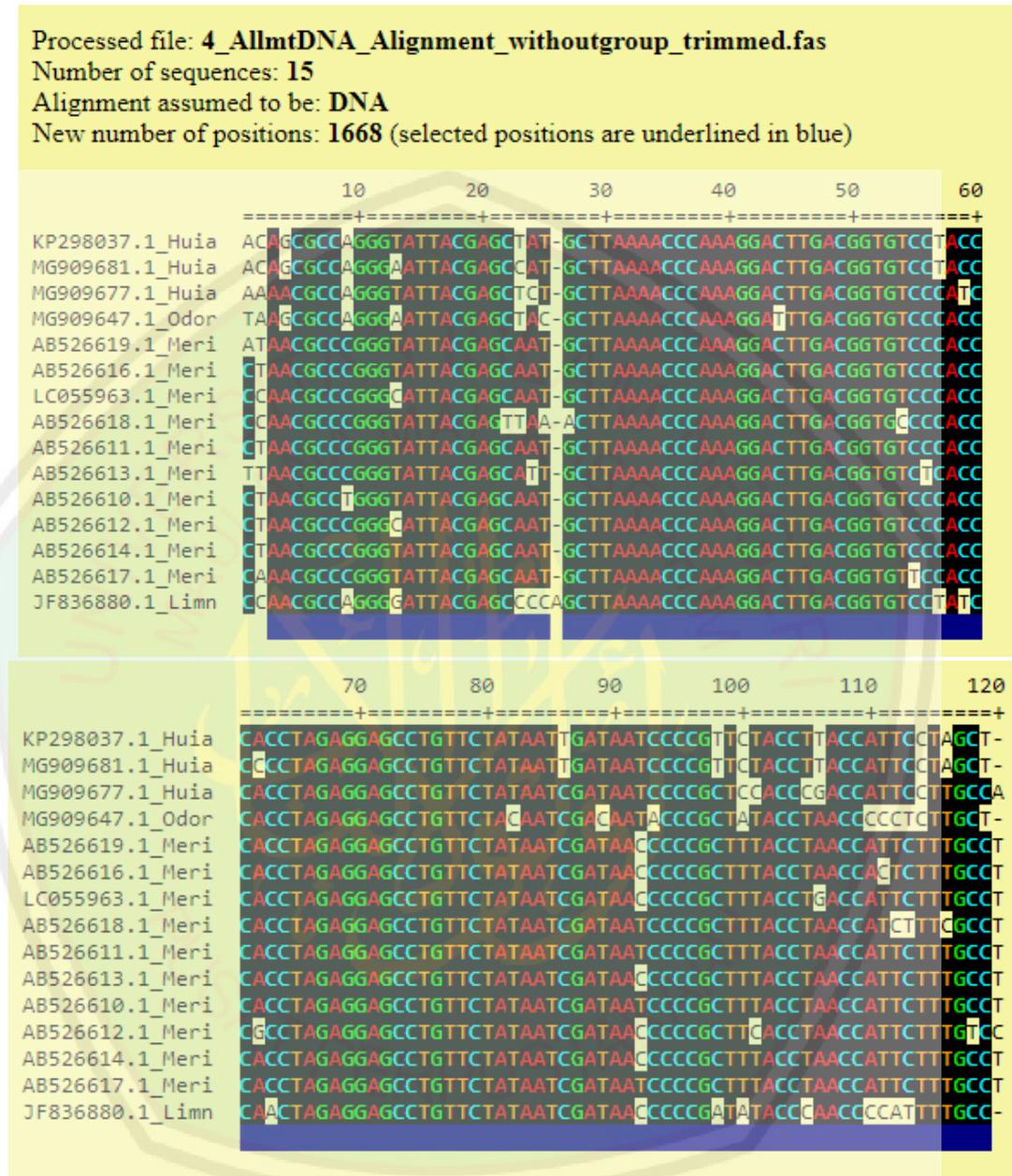
Lampiran 10. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan analisis ML

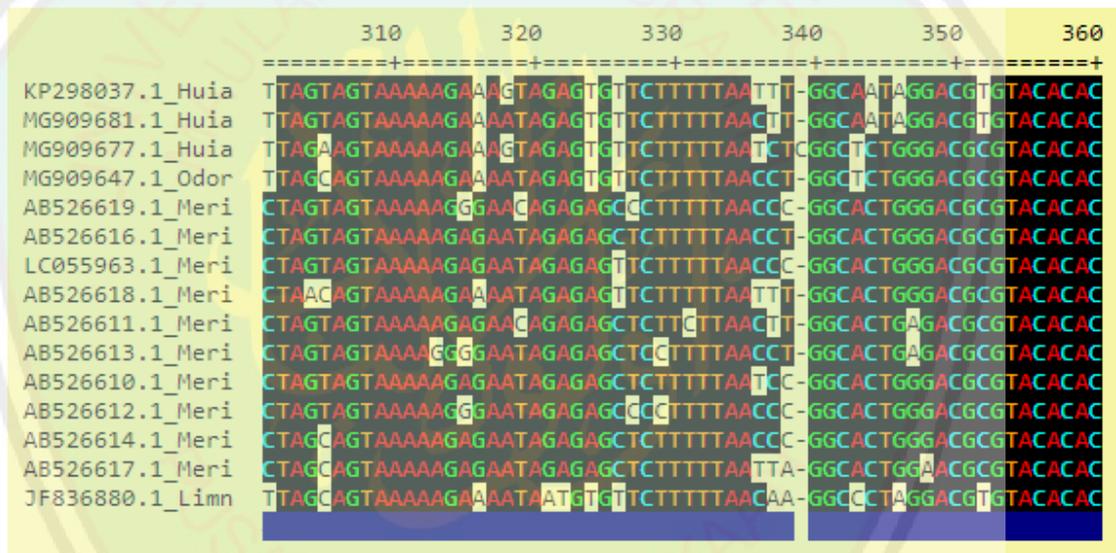
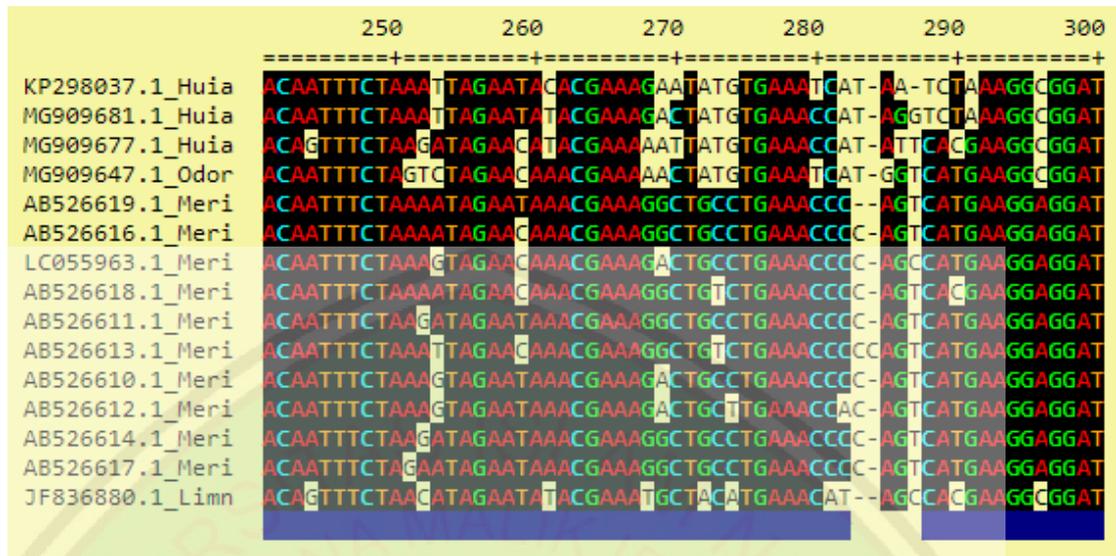


Lampiran 12. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan analisis BI



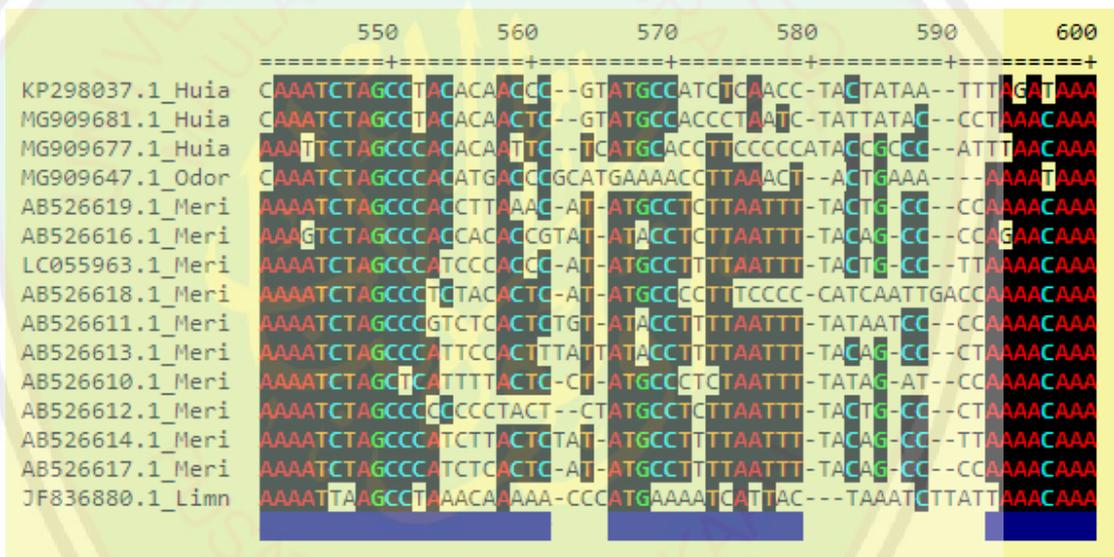
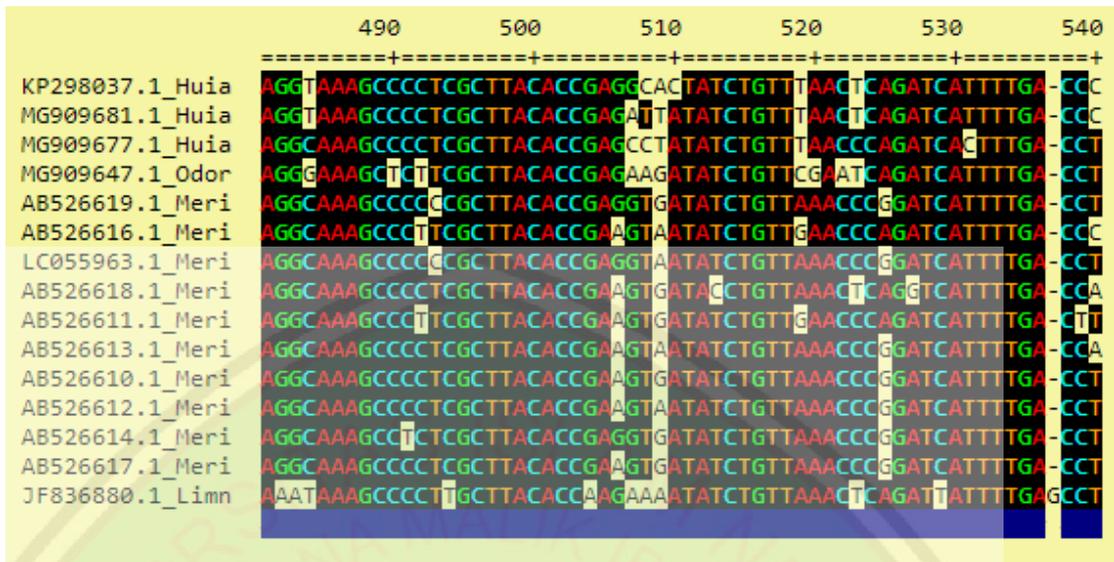
Lampiran 13. Keseluruhan Sekuen yang digunakan dalam analisis





	370	380	390	400	410	420
KP298037.1_Huia	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAAAC	-----	-----	GC	TAGC	CATAGT
MG909681.1_Huia	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAAAC	-----	-----	GC	TAA	ACAGT
MG909677.1_Huia	CGCCCGTCACCCCTTTGATAG-TC	-----	-----	TTT	CT	ACCTGT
MG909647.1_Odor	CGCCCGTCACCTCTCTTCGATAGTAT	-----	-----	TACAAA	---	CAGT
AB526619.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAGTTC	-----	-----	TTT	ATC	TCAGT
AB526616.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAGTTC	-----	-----	TTT	GTC	TCGAT
LC055963.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAGTTC	-----	-----	TTT	GTT	CCGAT
AB526618.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAACAGT-C	-----	-----	TTT	ATT	TCGAT
AB526611.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAGTTC	-----	-----	TT	CGTT	TAGAT
AB526613.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAGTTC	-----	-----	TT	CGTC	TAGAT
AB526610.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAGTTC	-----	-----	TTT	ATC	TCGAT
AB526612.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAACAGTTC	-----	-----	CTT	TTC	TCGAT
AB526614.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAGTTC	-----	-----	TT	CGTC	TAGAT
AB526617.1_Meri	CGCCCGTCACCCCTTTCAATAGTTC	-----	-----	TT	CGTC	TCGAT
JF836880.1_Limn	CGCCCGTCACCCCTTTCAACAGTTC	CATAAAAGTTC	TTT	AAC	CAT	CAACCTACGCCTTAGAAG

	430	440	450	460	470	480
KP298037.1_Huia	TTCTAACCAATTAT	-----	-----	TGC	CA	CCCCCG
MG909681.1_Huia	TTCTAACTAGTCAT	-----	-----	CG	CA	CCCCAAG
MG909677.1_Huia	TCATAACCTATCAC	-----	-----	CAC	AC	CTT
MG909647.1_Odor	CCATAACCAATCTA	-----	-----	C	AC	TTTT
AB526619.1_Meri	TATTAACAAATTAA	-----	-----	AC	AC	GCCCT
AB526616.1_Meri	TATTAACAAATTAA	-----	-----	CC	AC	GCCCT
LC055963.1_Meri	TATTAACAAATTAA	-----	-----	CC	AC	GTCCT
AB526618.1_Meri	AATTAACAAATCAA	-----	-----	CTT	CAT	CCT
AB526611.1_Meri	TATTAACAAATTAG	-----	-----	CT	AC	GCCCT
AB526613.1_Meri	TATTAACAAATTAA	-----	-----	CC	AC	GCCCT
AB526610.1_Meri	TATTAACAAATTAA	-----	-----	CC	AC	GCCCT
AB526612.1_Meri	TACTAACAAATTAT	-----	-----	CC	AC	GTCCT
AB526614.1_Meri	TATTAACAAATTAA	-----	-----	CC	AC	GCCCT
AB526617.1_Meri	TACTAACAAATTAA	-----	-----	CC	AC	GCCCT
JF836880.1_Limn	AGGCAAGTCGTAACATGGTAA	GTTACCGGAAGGTGTA	CTT	G	TTT	CAAAATATAGCTT




```

              730       740       750       760       770       780
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
KP298037.1_Huia CCCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAACAAGCTAAC-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
MG909681.1_Huia TCCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAACAAGCTAAC-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
MG909677.1_Huia ACTCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGCTAGTCCACC-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
MG909647.1_Odor CACCTTGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGCTAGTCCACC-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526619.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGTTAGTTACT-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526616.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGTTAGTCTACC-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
LC055963.1_Meri TACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGTTAGTCTACT-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526618.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGCTAGTCTACC-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526611.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGTTAGTCTACT-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526613.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGTCAAGTCTATC-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526610.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGTTAGTCTACT-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526612.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGTCAAGTCTGCC-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526614.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGTTAGTCTACT-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
AB526617.1_Meri AACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTAGCTAGTCTTCT-CAAGCAAAAAGAAAATTTAA
JF836880.1_Limn ACACTCGTACCTTTTGCATCATGGTTAGCTAGTCCCTTACAAGCAAAAGCGAAAATTC-A
  
```

```

              790       800       810       820       830       840
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
KP298037.1_Huia GTTTGACCTCCCGAAACTAAGCGAGCTACTTCAAAACAACCCCTTGGGGGATAAACCCGTCT
MG909681.1_Huia GTTTGACCTCCCGAAACTAAGCGAGCTACTTCAAAACAACCCCTTGGGG-ATAACCCGTCT
MG909677.1_Huia GTTTGACCTCCCGAAACTAAGCGAGCTACTTCAAAACAAGCCCAAGGGGCTAAACCCGTCT
MG909647.1_Odor GTCTGACCTCCCGAAACTAAGCGAGCTACTTCAAAACAAGCTTTTAGAG-CAACCCGTCT
AB526619.1_Meri GTTTGACTTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
AB526616.1_Meri GTTTGACTTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
LC055963.1_Meri GTTTGACTTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
AB526618.1_Meri GTTTGACTTCCCGAAACTAAGCGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
AB526611.1_Meri GTTTGACCTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
AB526613.1_Meri GTTTGACCTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
AB526610.1_Meri GTTTGACCTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
AB526612.1_Meri GTTTGACTTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
AB526614.1_Meri GTTTGACTTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
AB526617.1_Meri GTTTGACCTCCCGAAACTATGTGAGCTACTTCAAAACAAGTCCCTAAGGGGACTAAACCCGTCT
JF836880.1_Limn GTCTGCTCCCGAAACTAAGCGAGCTACTTCAAAACAAGTTATAGAA-CTAAACCCGTCT
  
```


	1090	1100	1110	1120	1130	1140
KP298037.1_Huia	CAT-----AAAAGCGTTAAAGCTTA----TAC--ACTACCCAGATAC--TTAATTTAT					
MG909681.1_Huia	CACCTTATAAAAAGCGTTAAAGCTTAACCT--TAT--ATTACCCCCAATACCTTTAATTATT					
MG909677.1_Huia	CACCTTCCAAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATAA--ATTACCTCAAAATTTCTCTATTCCCC					
MG909647.1_Odor	CATCTTTAAAAGCGTTAAAGCTTGGTTATTG---CAACCCCAAAATTAATAAAACACCC					
AB526619.1_Meri	CATCTTTCAAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATTTT-ATCACCTATAATTCCTCACACTACT					
AB526616.1_Meri	CATCTTCTAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATTT-CGTCAATGATAATTCCTTACACTATT					
LC055963.1_Meri	CACCTTCCGAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATTTTCATCACCTTTTAATTCCTTGCACGATC					
AB526618.1_Meri	CATCTTCCAAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATTTA-AAATCACCTATAATTCCTTACACCAACC					
AB526611.1_Meri	CATCTTTTAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATTTACCTCACATAAATTCCTCGCCCTATT					
AB526613.1_Meri	CATCTTTCAAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATTT-CATCACATAAATTCCTCACACTATT					
AB526610.1_Meri	CATCTTCTAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATTT-CATCATATAAATTCCTTACACTATC					
AB526612.1_Meri	CATCTTTCAAAAAGCGTTAAAGCTTAGTTATTT-TATCACATAAATTCCTCACACTTCT					
AB526614.1_Meri	CATCTTTCAAAAAGCGTTAAAGCTTAGTTATTT-TACCATATAAATTCCTTACACTATT					
AB526617.1_Meri	CATCTTCCAAAAAGCGTTAAAGCTTAATTATTT-CATCATAGTAATTCCTTACACTATT					
JF836880.1_Limn	CATCTTCAAGAAAAGCGTTACAGCTCCATTTTTCCCTTTTAACAATAACCCATAAACACC					

	1150	1160	1170	1180	1190	1200
KP298037.1_Huia	TTTAAACC-TTCACACTACTGGAATTATTTTATAATTACTATAAAAAGATATTATGTTAGAA					
MG909681.1_Huia	TTTAAACCCTTCACTACTACTGGAATTATTTTATAATTACTATAAAAAGCATTATGTTAGAA					
MG909677.1_Huia	CTGAACCCCTTCTGACTACTGGAATTTTTTATAAAC-TTATAAAAACAATTATGCTAGAA					
MG909647.1_Odor	ACTAACCCTTCTTCTACTACTGGAACCACTTTATAT-TATTATAAAACGATGATGCTAGAA					
AB526619.1_Meri	ATTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-CACTATAAAAAGATACTATGCTAGAA					
AB526616.1_Meri	ATTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-CATTATAAAAAGATACCATGCTAGAA					
LC055963.1_Meri	ACTAACCCTTCTTTTACTGGAATTATTTTATAA-TACTATAAAAAGATATTATGCTAGAA					
AB526618.1_Meri	TCTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-AAATATAAAAATAATTATGCTAGAA					
AB526611.1_Meri	ATTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-TATTATAGGAGACTATGCTAGAA					
AB526613.1_Meri	ATTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-CACTATAAAAAGATACTATGCTAGAA					
AB526610.1_Meri	ATTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-CATTATAAAAAGATACCATGCTAGAA					
AB526612.1_Meri	ATTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-TATTATAAAAAGACTATGCTAGAA					
AB526614.1_Meri	ATTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-TATTATAAAAAGATACTATGCTAGAA					
AB526617.1_Meri	ATTAACCCTTTCATTACTACTGGAATTATTTTATAA-CACTATAAAAAGATATCATGCTAGAA					
JF836880.1_Limn	CTGAACCCCTTATTACTACTGGAATGATCCATATAC-CTTTATAGGAGCCCCAATGCTAGAA					

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
KP298037.1_Huia	CTAGTAACAAGAA	---ATT	TTTCTCCT	AAATGTAA	ACATAAAC	CCAGGAC- GGACCTCC
MG909681.1_Huia	CTAGTAACAAGAA	---AA	TTTCTCCT	AAATGTAA	ACATAAAC	CAAGAACT GGACCTCC
MG909677.1_Huia	CTAGTAACAAGAA	ATTT	GCTTTCTCCT	AAATGTAA	GATAAAC	CCAAAAT- GGACACCC
MG909647.1_Odor	CTAGTAACAAGAA	CTC-	GCGTTCTCCA	AAATGTAA	ACATAAC	CCAAAAC- GGACTCTCC
AB526619.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GGATTTCTCCA	AAAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACCAACC
AB526616.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GATTTTCTCCT	AAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACTTAGCC
LC055963.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GACGTTCTCCT	GAAATGTAA	ACATAAG	TCAAAAAT- GGACCAACC
AB526618.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GATTTTCTCCA	AAAATGTAA	GTAAAG	CCAAAAT- GGACTTAACC
AB526611.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GACTTTCTCCA	AAAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACTTAACC
AB526613.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GACTTTCTCCA	AAAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACTTAACC
AB526610.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GACTTTCTCCA	AAAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACCAACC
AB526612.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GACTTTCTCCA	AAAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACCAACC
AB526614.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GACTTTCTCCA	AAAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACCAACC
AB526617.1_Meri	CTAGTAACAAGAA	AATT-	GATTTTCTCCA	AAAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACCAACC
JF836880.1_Limn	CTAGTAACAAGAA	AATA-	GATTTTCTCCA	AAAATGTAA	GATAAG	CCAAAAT- GGACCAACC

	1270	1280	1290	1300	1310	1320
KP298037.1_Huia	ACTGGTAATTAA	CGTAAATG	ATAAAATT	ATAGTAAC	ACCCATCA	AGAATACCC
MG909681.1_Huia	ACTGGTAATTAA	CGTATATG	ATAAAATT	ATAGTAAC	ACTAAA	CAAGAATACCC
MG909677.1_Huia	ATTGGTCTTTAA	CGCAAAAT	GCTAAAAATT	ATAGTAAC	-CTAAGCC	AGAATAATCTATAAT
MG909647.1_Odor	ATTGGTGATTA	ACGTAATG	CA-AAAGTT	ATAATAACA	CAAAA	CCAGAAAACCTTATGACT
AB526619.1_Meri	ATTGACAATTA	ACCAATG	AATAAATT	ATAGCAAC	ATAAAA	CCAGAACACCC
AB526616.1_Meri	ATTGACAATTA	ACCGCAAT	GAAAGAA	CTATAGCAAC	ATAAAA	CCAGAAATACCC
LC055963.1_Meri	ATTGCAATTA	ACCGCAAT	GAAATAAATT	ATAGTAAC	ATAAG	CCAGAAATATCTATAAT
AB526618.1_Meri	ATTGACAATTA	ACGTCATG	ACCAAATT	ATAGTATC	-CATGACC	AGAATACCC
AB526611.1_Meri	ACTGACAATTA	ACCGCAAT	GAAATAAATT	ATAGCAAC	ATAAAA	CCAGAACATCTATAAT
AB526613.1_Meri	ATTGACAATTA	ACCGCAAT	GAAATAAATT	ATAGTAAC	ATAAA	-CTAGAGCACCC
AB526610.1_Meri	ATTGACAATTA	ACGCTAAT	GAAATAAATT	ATAGCAAC	ATAAAA	CTAGAAATATCTATAACC
AB526612.1_Meri	ATTGACAATTA	ACCGCAAT	GAAATAA	CTATAGCAAC	ATAAAA	CCAGAAATACCC
AB526614.1_Meri	GTTGACAATTA	ACCGCAAT	GAAATAAATT	ATAGCAAC	ATAAG	CCAGAAATACCC
AB526617.1_Meri	ATTGACAATTA	ACCGCAAT	GAAATAGATT	ATAGCAAC	ATAAAA	CTAGAAACCC
JF836880.1_Limn	ATTGCAACTAA	CGTCACTG	AACCTTAATA	ATAACT	CCC--	CAAGAAAACACTATAACT

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
KP298037.1_Huia	T--ACTAACGTTAACCTAACACTAGAACATTACAG- AAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
MG909681.1_Huia	T--CTAACGTTAACCTAACACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
MG909677.1_Huia	T---TTAACGTTAATCTAACACAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAGAGAGGAA					
MG909647.1_Odor	C---TTACGTTCCCTAACACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAGAGAGGAA					
AB526619.1_Meri	C-TACAAACGTTAACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
AB526616.1_Meri	C-TATAAGCGTTAACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
LC055963.1_Meri	C-TTATAACGTTAATCTTACACAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
AB526618.1_Meri	C--TCAAACGTTAACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
AB526611.1_Meri	C-TATTAACGTTAACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
AB526613.1_Meri	CATAAAGCGTTAACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
AB526610.1_Meri	CTA-TAAACGTTAACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
AB526612.1_Meri	C---TAAACGTTGACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
AB526614.1_Meri	CCA-TAAACGTTAACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
AB526617.1_Meri	CCAA-TAAACGTTAACCTTAACTAGAACATTACAGGAAAGATTAAAAGAGAAAAGAGGAA					
JF836880.1_Limn	T---CTAACGTTAATCTTACACAGAAATTATTCTGAAAGATTAAAAGAGAGGAAAGGAA					

	1390	1400	1410	1420	1430	1440
KP298037.1_Huia	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACTGAAGATAAGA					
MG909681.1_Huia	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACTCAAGATAAGA					
MG909677.1_Huia	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGCTCAAACATAAGA					
MG909647.1_Odor	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGATTAAACATAAGA					
AB526619.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGATAAATATAAGA					
AB526616.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACAAATATAAGA					
LC055963.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGATAAATATAAGA					
AB526618.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGATAAATATAAGA					
AB526611.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACAAACTATAAGA					
AB526613.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACAAATATAAGA					
AB526610.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACAAACTATAAGA					
AB526612.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGATTAAATATAAGA					
AB526614.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACAAACTATAAGA					
AB526617.1_Meri	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACAAACTATAAGA					
JF836880.1_Limn	CTCGGCAAACTTTAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACAAACTATAAGA					

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
KP298037.1_Huia	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAATTAAACGGCTGT	GGTACTCTGACCAACA	CAAGGTAG		
MG909681.1_Huia	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAATTAAACGGCTGT	GGTACTCTGACCAACA	CAAGGTAG		
MG909677.1_Huia	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
MG909647.1_Odor	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAATTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526619.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526616.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
LC055963.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526618.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526611.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526613.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526610.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526612.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526614.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
AB526617.1_Meri	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		
JF836880.1_Limn	GGTCCAGCCTGCCAGTGA	CTAAAGTTCAACGGCCGCGG	TACCCCTAACCGTGC	GAAAGGTAG		

	1510	1520	1530	1540	1550	1560
KP298037.1_Huia	CGTAATCACTTGTTCCATAAAT	GGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
MG909681.1_Huia	CGTAATCACTTGTTCCATAAAT	GGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
MG909677.1_Huia	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
MG909647.1_Odor	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526619.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526616.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
LC055963.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526618.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526611.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526613.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526610.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526612.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526614.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
AB526617.1_Meri	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			
JF836880.1_Limn	CATAATCACTTGTTCTTTAAAT	AGGGACTTGTATCAACGGC	ATCACGAGGGCTGTACTGT			

	1570	1580	1590	1600	1610	1620
KP298037.1_Huia	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
MG909681.1_Huia	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
MG909677.1_Huia	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
MG909647.1_Odor	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526619.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526616.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
LC055963.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526618.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526611.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526613.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526610.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526612.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526614.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
AB526617.1_Meri	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG
JF836880.1_Limn	CTCCTTTCTCCAATCAGTGA	AACTGATCTTCCC	GTGAAGGAGCGGGA	ATTA	ACTA	ATAAG

	1630	1640	1650	1660	1670	1680
KP298037.1_Huia	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAT	---	ACC-	
MG909681.1_Huia	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
MG909677.1_Huia	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
MG909647.1_Odor	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526619.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526616.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
LC055963.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526618.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526611.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526613.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526610.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526612.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526614.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
AB526617.1_Meri	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	
JF836880.1_Limn	ACGAGAAGACCCCATGGAG	CTTTAAACTCACTATG	CACCTCTGCCGACCTAC	---	ATCA	

```

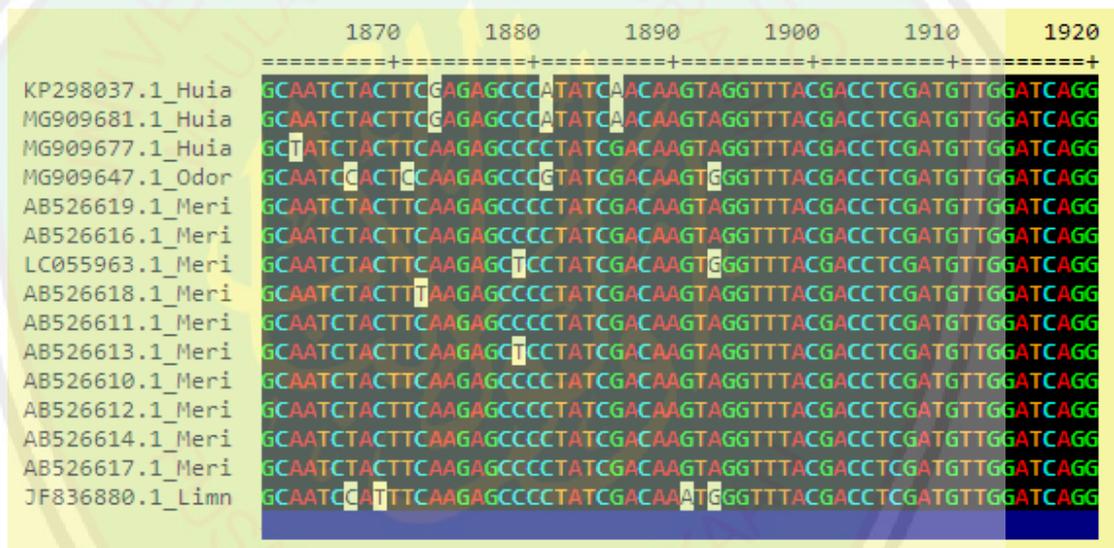
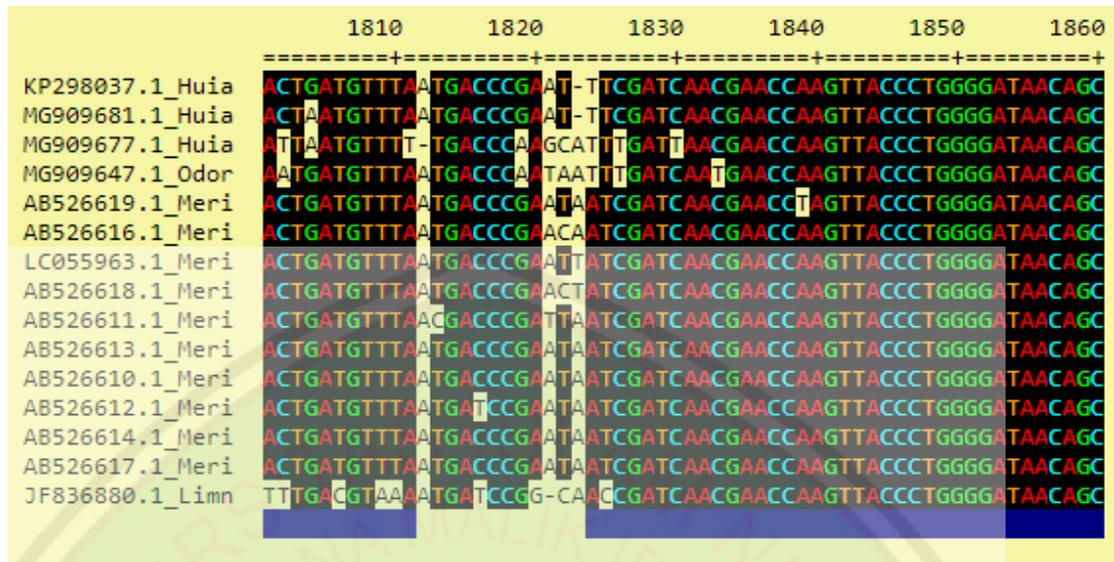
1690      1700      1710      1720      1730      1740
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
KP298037.1_Huia ---CAGCCTATGAGACCTGCAT-ATAGCTTTAGGTTGGGGCGACCAACGGAGTAAAAATTA
MG909681.1_Huia TTTTAGCCCATGAGAAGTGGATTATAGCTTTAGGTTGGGGCGACCAACGGAGTAAAAATTA
MG909677.1_Huia CCTTATGCCA-AAATCCTGGATGCTCGCTTTAGGTTGGGGAGCCATGGAGAAAACTTA
MG909647.1_Odor ACTAAACCTCAGGGCCCTGTACATTGGTTTTAGGCTGGGGGGACCAACGGAGAAAAATAA
AB526619.1_Meri CTATATCCTAAAGATTGGTATGCTAGTTTTAGGTTGGGGGGACCGCGGAGTAAAAATCA
AB526616.1_Meri TTATAGCCTAAAGATTGGTATGCTGTTTTAGGTTGGGGGGACCGCGGAGTAAAAACTA
LC055963.1_Meri TTATATCCTAAAGACTTGTATGCTAGTTTTAGGTTGGGGGGACCGCGGAGTAAAAATTA
AB526618.1_Meri TGATAACCTAAAGACTTGTATGCTGTTTTAGGTTGGGGGGACCAACGGAGTAACTTA
AB526611.1_Meri CTAGATCCTAAAGGCTCGTGTGCTAGTTTTAGGTTGGGGGGACCAACGGAGTAAAAACA
AB526613.1_Meri TAAATATCCTAAAGATTGGTATGCTAGTTTTGGTTGGGGGGACCGCGGAGTAAAAACTA
AB526610.1_Meri CCAATATCCTAAAGACTTGTATGCTAGTTTTAGGTTGGGGGGACCGCGGAGTAAAAATTA
AB526612.1_Meri CTCTACCTTTAAGGCTTGTATGTAGTTTTAGGTTGGGGGGACCGCGGAGTAAAAATTA
AB526614.1_Meri CTATATCCTAAAGACTTGTATGCTGTTTTAGGTTGGGGGGACCGCGGAGTAAAAATTA
AB526617.1_Meri CTAGATCCTAAAGACTTGTATGTAGTTTTAGGTTGGGGGGACCGCGGAGTAAAAATTA
JF836880.1_Limn TAAAATTATGGGGATCTGTTTATTGTTTTAGGTTGGGGTGAACCAACGGAGTAAAACTAA

```

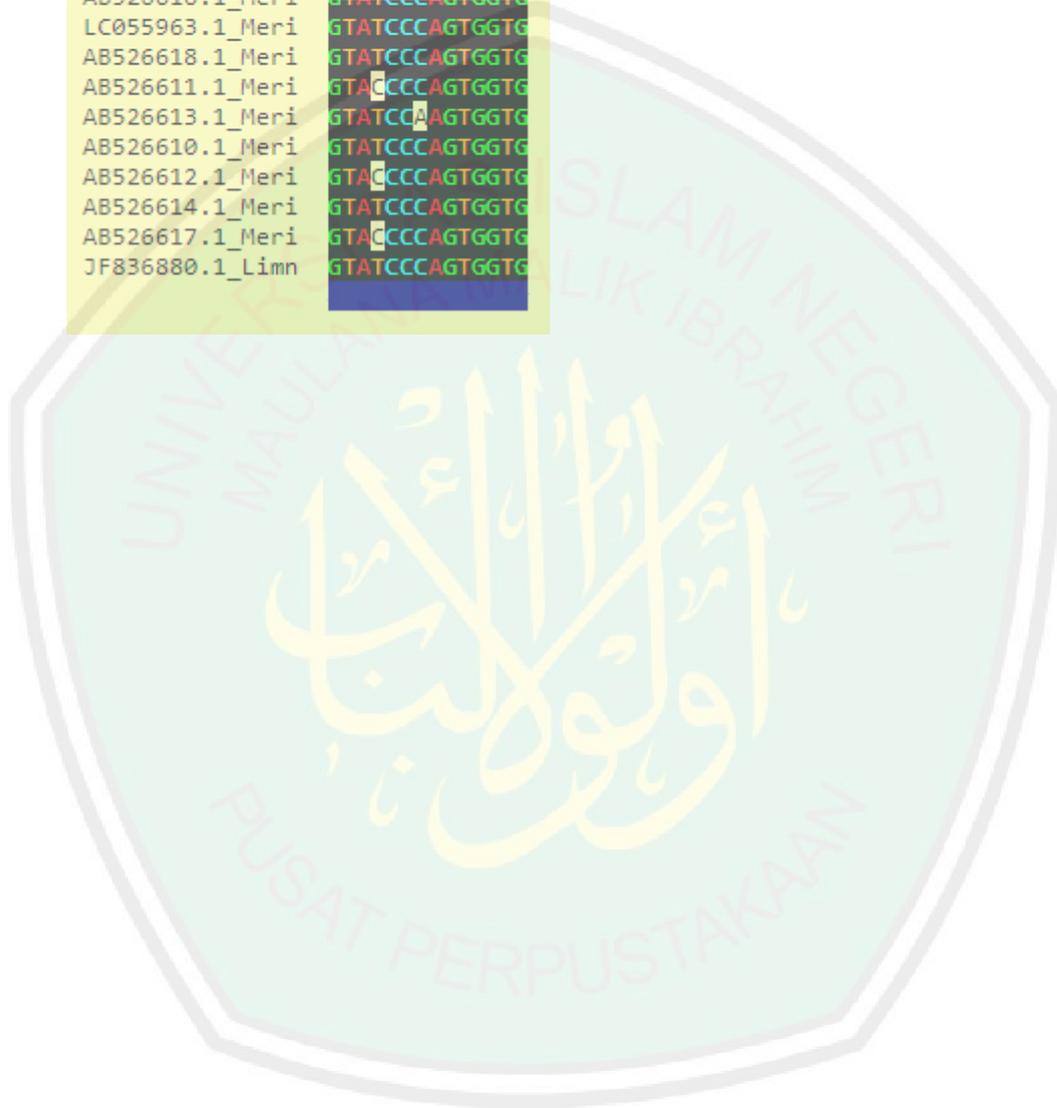
```

1750      1760      1770      1780      1790      1800
-----+-----+-----+-----+-----+
KP298037.1_Huia ACCTCCACGACGAAAGGGCTA-CGCCCTTATCAAGAACAACAACTTCTAAGAATCAACAG
MG909681.1_Huia ACCTCCACGACGAAAGGGCTA-AGCCCTTATCTAAGAGCAACAACACTTCTAAGAATTAATAA
MG909677.1_Huia ACCTCCATGACAAACGGACTA-AACCCTTATCTGCGAACGACATTCTAAGAATTAATAA
MG909647.1_Odor ACCTCCATAACAAATGGGCTAGCACCCCTTATCAAGATTACAAATCAAGAATCAATTA
AB526619.1_Meri ACCTCCACGACAAATGGGCTA-TGCCCTTATCTAAGAACTACAGTTCTAAGAATCAACAA
AB526616.1_Meri ACCTCCACGACAAATGGGCTA-TGCCCTTATCTGAGAACTACAATTCTAAATCAATAA
LC055963.1_Meri ACCTCCGCAACAAATGGGCTA-CGCCCTTATCTAAGAACTACAGTTCTAAGAATCAATAA
AB526618.1_Meri ACCTCCACGACAAATGGGCTA-AGCCCTTATTTGAGAACCACAACTTCTAGAAATCAATAA
AB526611.1_Meri ACCTCCATGACAAATGGGCTA-CGCCCTTATCTCAGAACTACAGTTCTAAGAATCAACAA
AB526613.1_Meri ACCTCCACGACAAATGGGCTA-TGCCCTTATCTAAGAACTACAGTTCTAAGAATCAATAA
AB526610.1_Meri ACCTCCACGACAAATGGGCTA-CGCCCTTATCTAAGAAGGACAGTTCTAAGAATCAACAA
AB526612.1_Meri ACCTCCACGACAAATGGGCTA-TGCCCTTATCTAAGAACTACAGTTCTAAGAATCAATAA
AB526614.1_Meri ACCTCCACGACAAATGGGCTA-TGCCCTTATCTAAGAACTACAACCTTCTAAGAATCAACAA
AB526617.1_Meri ACCTCCACGACAAATGGGCTA-CGCCCTTATCTAAGGACTACAGTTCTAAGAATCAACAA
JF836880.1_Limn ACCTCCAAGACGAACGGTTCT--ATCCTAATCAAGAGCTACCGCTCAAGAATCAAAA

```



1930
=====+=====
KP298037.1_Huia GTATCCCAGTGGTG
MG909681.1_Huia GTATCCCAGTGGTG
MG909677.1_Huia GTATCCAGTGGTG
MG909647.1_Odor GTATCCCAGTGGTG
AB526619.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
AB526616.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
LC055963.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
AB526618.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
AB526611.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
AB526613.1_Meri GTATCCAGTGGTG
AB526610.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
AB526612.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
AB526614.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
AB526617.1_Meri GTATCCCAGTGGTG
JF836880.1_Limn GTATCCCAGTGGTG





KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Luhur Septiadi
NIM : 15620102
Program Studi : Biologi
Semester : Genap T.A 2019
Pembimbing : Berry Fakhry Hanifa, M.Sc
Judul Skripsi : Analisis Filogenetik dan Estimasi Waktu Divergensi *Amolops Cope*, 1865 Senu Lato Paparan Sunda secara Insilico

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	24 Oktober 2018	Konsultasi Judul Penelitian	1.
2.	30 Oktober 2018	Konsultasi Kerangka Penelitian	2.
3.	7 November 2018	Konsultasi BAB I	3.
4.	20 November 2018	Konsultasi BAB II	4.
5.	2 Januari 2019	Konsultasi BAB III	5.
6.	15 Januari 2019	ACC Proposal	6.
7.	5 Februari 2019	Pengecekan Plagiasi Naskah	7.
8.	15 April 2019	Kosultasi Hasil Penelitian	8.
9.	18 April 2019	Kosultasi Hasil Penelitian	9.
10.	22 April 2019	Konsultasi BAB IV	10.
11.	28 April 2019	Konsultasi BAB V	11.
12.	6 Mei 2019	Konsultasi BAB IV, V, dan Daftar Pustaka	12.
13.	20 Mei 2019	Pengecekan Plagiasi Naskah	13.
14.	22 Mei 2019	ACC Skripsi	14.

Malang, 20 Juni 2019

Pembimbing Skripsi,

Berry Fakhry Hanifa, M.Sc
NIDT. 19871217 20160801 1 066



Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : Luhur Septiadi
NIM : 15620102
Program Studi : Biologi
Semester : Genap T.A 2019
Pembimbing : Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
Judul Skripsi : Analisis Filogenetik dan Estimasi Waktu Divergensi *Amolops Cope*, 1865
Sensu Lato Paparan Sunda secara Insilico

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	15 Januari 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB I	1.
2.	25 Januari 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB II	2.
3.	1 Februari 2019	ACC Integrasi BAB I dan II	3.
4.	13 Mei 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB IV	4.
5.	16 Mei 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB IV	5.
6.	20 Mei 2019	ACC Integrasi BAB IV	6.

Malang, 20 Juni 2019

Pembimbing Skripsi,

Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I

NIDT. 19890113 20180201 1 244

Ketua Jurusan,



Romadi, M.Si., D.Sc

NIP. 19810201 200901 1 019