

**ANALISIS FILOGENETIK PERCIL JAWA (*Microhyla achatina* Tscudi,
1838) DI JAWA TENGAH DAN JAWA BARAT SECARA *IN-SILICO*
MENGUNAKAN *SOFTWARE* MEGA6 DAN mrBayes**

SKRIPSI

**Oleh:
FENINA AYU DANİYATI
NIM. 17620062**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**ANALISIS FILOGENETIK PERCIL JAWA (*Microhyla achatina* Tscudi,
1838) DI JAWA TENGAH DAN JAWA BARAT SECARA *IN-SILICO*
MENGUNAKAN *SOFTWARE* MEGA6 DAN mrBayes**

SKRIPSI

**Oleh:
FENINA AYU DANİYATI
NIM. 17620062**

**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)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**ANALISIS FILOGENETIK PERCIL JAWA (*Microhyla achatina*
Tscudi 1838) DI JAWA TENGAH DAN JAWA BARAT SECARA
IN-SILICO MENGGUNAKAN SOFTWARE MEGA6 DAN
*mrBayes***

SKRIPSI

Oleh :
FENINA AYU DANİYATI
NIM. 17620062

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal : 13 Desember 2021

Pembimbing I



Prof. Dr. drh. Bayyinatul M, M.Si
NIP. 19710919 200003 2 001

Pembimbing II



Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIP. 19860512 201903 1 002

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP.19741018 200312 2 002

**ANALISIS FILOGENETIK PERCIL JAWA (*Microhyla achatina*
Tscudi 1838) DI JAWA TENGAH DAN JAWA BARAT SECARA
IN-SILICO MENGGUNAKAN SOFTWARE MEGA6 DAN
*mrBayes***

SKRIPSI

Oleh:
FENINA AYU DANİYATI
NIM. 17620062

Telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan
diterima sebagai salah satu persyaratan untuk
memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal 24 Desember 2021

Ketua Penguji	<u>Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si</u> NIP. 19671113 199402 2 001	
Anggota Penguji 1	<u>Dr. Kiptiyah, M.Si</u> NIP. 19731005 200212 2 003	
Anggota Penguji 2	<u>Prof. Dr. drh. Bayyinatul M, M.Si</u> NIP. 19741018 200312 2 002	
Anggota Penguji 3	<u>Mujahidin Ahmad, M.Sc</u> NIP. 19860512 201903 1 002	

Mengesahkan,
Ketua Program Studi Biologi


Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah rabbil 'alaamiin. Puji syukur kehadirat Allah Subhanahu Wata'ala atas berkat rahmat dan karunia-Nya saya diberikan kemudahan, kesabaran dan keikhlasan dalam menjalankan semua kewajiban saya. Dengan selesainya tugas akhir ini, semoga Allah Subhanahu Wata'ala memberikan manfaat dan barokah terhadap ilmu yang saya dapatkan selama menjalankan studi.

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

1. Kedua orang tua penulis yang penulis sayangi, Bapak Muin dan Ibu Suparlik
2. Kakak penulis yang penulis sayangi, Mbak Veronica Surya Anggraini, S. Si
3. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Mujahidin Ahmad, M.Sc selaku pembimbing yang telah sangat sabar membimbing dan meluangkan waktunya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir
4. Alamsyah Elang Nusa Herlambang S.Si sebagai pembimbing PKL
5. Teman-teman Ranger Maliki Herpetology Society UIN Malang
6. Teman-teman bimbingan Prof. Bayyin
7. Teman-teman seperjuangan Wolves'17, khususnya Squirrel Biologi B 2017
8. Teman-teman IMAPAS UIN Malang
9. Teman-teman Program Studi Biologi, Khususnya Mas Harits, Mas Fika, Mas Affan, Mbak Andita, Mbak Tika, Mbak Muna, Mbak Sandra, Mas Fahmi A., Mbak Nanda
10. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Karena semua dukungan, motivasi, nasihat, dan semangat, semoga Allah membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Semoga karya ini dapat bermanfaat untuk saya dan bagi orang lain.

Aamiin

MOTTO

“Jangan pergi mengikuti kemana jalan akan berujung. Buat jalanmu sendiri dan tinggalkanlah jejak”

Ralph Waldo Emerson

“Ilmu tidak akan dapat diraih kecuali dengan ketabahan”

Imam Syafi'i

HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fenina Ayu Daniyati
NIM : 17620062
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Analisis Filogenetik Percil Jawa (*Microhyla achatina* Tschudi 1838) di Jawa Tengah dan Jawa Barat Secara *In-Silico* Menggunakan Software MEGA6 dan mrBayes

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

Malang, 24 Desember 2021
yang membuat pernyataan,



Fenina Ayu Daniyati
NIM. 17620062

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul “Analisis Filogenetik Percil Jawa (*Microhyla achatina* Tscudi 1838) di Jawa Tengah dan Jawa Barat Secara *In-silico* Menggunakan *Software* MEGA6 dan mrBayes” ini tidak dipublikasikan namun akses terbuka dan dapat digunakan 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.

ANALISIS FILOGENETIK PERCIL JAWA (*Microhyla achatina* Tscudi, 1838) DI JAWA TENGAH DAN JAWA BARAT SECARA IN-SILICO MENGGUNAKAN SOFTWARE MEGA6 DAN mrBayes

Fenina Ayu Daniyati, Bayyinatul Muchtaromah, Mujahidin Ahmad

ABSTRAK

Percil Jawa (*Microhyla achatina* Tscudi 1838) merupakan katak endemik Jawa yang tersebar luas dibanyak seluruh wilayah Jawa Tengah dan Jawa Barat. Percil Jawa memiliki ukuran tubuh relatif kecil dan memiliki corak tubuh yang beragam dalam genusnya, menyebabkan kesalahan dalam hal identifikasi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui hubungan kekerabatan dari Percil Jawa di Jawa Tengah dan Jawa Barat. Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif eksploratif menggunakan analisis *Maximum Parsimony*, *Maximum Likelihood*, *Bayesian Inference* dan Jarak genetik. Data yang diambil berupa data sekunder yang diambil dari database NCBI, dan di-*alignment* pada *software* MEGA6. Gap pada hasil *alignment* dihapus. Hasil disimpan dalam format fasta. Pohon direkonstruksi menggunakan *software* MEGA6 dan mrBayes. Jarak genetik dihitung pada model *uncorrect p-distance* untuk mengetahui jarak genetik antar individu. Hasil analisis filogenetik, populasi *M. achatina* di Jawa Barat (Gede Pangrano, Ujung Kulon) dan berbeda dengan populasi di Jawa Tengah (Pekalongan dan Ungaran), didukung dengan nilai bootstrap 100 pada ketiga analisis dan jarak genetik lebih dari 3%. Individu *M. achatina* yang ditemukan di Gunung Kencana, Bandung kekerabatannya lebih dekat dengan populasi di Jawa Tengah, dibanding dengan populasi di Jawa Barat, didukung dengan mengelompoknya individu Gunung Kencana dengan populasi di Jawa Tengah dan nilai botstrap 1.5%, sedangkan dengan populasi Jawa Barat jarak genetikanya lebih dari 3%. Berbedanya individu di Jawa Tengah dan Jawa Barat disebabkan adanya proses evolusi, berupa spesiasi alopatrik karena adanya barrier yang membatasi antar Jawa Tengah dan Jawa Barat, yaitu Gunung Slamet.

Kata Kunci: *DNA Mitokondria 16S rRNA*, *Filogenetik*, *Microhyla achatina*

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF JAVAN CHORUS-FROG (*Microhyla achatina* Tscudi, 1838) IN CENTRAL JAVA AND WEST JAVA BASED ON 16S rRNA MOTOCHONDRIC GENE

Fenina Ayu Daniyati, Bayyinatul Muchtaromah, Mujahidin Ahmad

ABSTRACT

*The Javan Chorus-Frog (*Microhyla achatina* Tscudi 1838) is a frog endemic to Java that is widely distributed throughout Central Java and West Java. Javanese Percil has a relatively small body size and has a variety of body patterns within its genus, causing errors in identification. This study aimed to determine the kinship of Percil Jawa in Central Java and West Java. This type of research is descriptive exploratory research using analysis of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Bayesian Inference, and Genetic Distance. The data was taken in the form of secondary data taken from the NCBI database, and aligned on MEGA6 software. Gaps in the alignment results are removed. Results are saved in fasta format. The tree was reconstructed using MEGA6 and mrBayes software. The genetic distance was calculated on the uncorrected p-distance model to determine the genetic distance between individuals. The results of the analysis of the population of *M. achatina* in West Java (Gede Pangrango, Ujung Kulon) and different from the population in Central Java (Pekalongan and Ungaran), were supported by a bootstrap value of 100 in the third analysis and a genetic distance of more than 3%. *M. achatina* individuals found in Gunung Kencana, Bandung are more closely related to the population in Central Java, compared to the population in West Java, supported by grouping Gunung Kencana individuals with populations in Central Java and a bootstrap value of 1.5%, while the population of Java The genetic west is more than 3%. Individual differences in Central Java and West Java are due to an evolutionary process, in the form of allopatric speciation due to the barrier that limits Central Java and West Java, namely Mount Slamet.*

*Keywords: *Microhyla achatina*, Mitochondrial DNA 16S rRNA, Phylogenetic*

تحليل فيلوجيني لجافا بيرسيل (*Microhyla achatina* Tschudi, 1838) في وسط جافا وجافا الغربية
داخل سيليكو باستخدام برامج MEGA6 و mrBayes

فينينا أبو دانياتي، بيبة المحترمة، مجاهد أحمد
الملخص البحث

يعتبر جافان بيرسيل (*Microhyla achatina* Tschudi 1838) من الضفادع المتوطنة في جافا والتي يتم توزيعها على نطاق واسع في جميع أنحاء وسط جاوة وجاوة الغربية. الجاوي بيرسيل له حجم جسم صغير نسبيًا ولديه مجموعة متنوعة من أنماط الجسم داخل جنسه ، مما يسبب أخطاء في تحديد الهوية. كان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد قرابة بيرسيل جاوا في وسط جاوة وجاوة الغربية. هذا النوع من البحث هو بحث استكشافي وصفي باستخدام تحليل *Maximum Parsimony*، و *Maximum Likelihood*، و *Bayesian Inference*، والمسافة الجينية. البيانات المأخوذة في شكل بيانات ثانوية مأخوذة من قاعدة بيانات NCBI، والمحاذاة مع برنامج MEGA6. تتم إزالة الفجوات في نتائج المحاذاة. يتم حفظ النتائج في شكل فاستا. أعيد بناء الشجرة باستخدام برنامجي MEGA6 و mrBayes. تم حساب المسافة الجينية على نموذج *uncorrect p-distance* لتحديد المسافة الجينية بين الأفراد. تم دعم نتائج تحليل جمهرة *M. achatina* في جاوة الغربية (Gede Ungaran)، بقيمة تمهيدية قدرها ١٠٠ في جميع التحليلات الثلاثة والمسافة الجينية أكثر من ٣٪. أفراد M. *achatina* الموجودون في جبل كنجانا ، باندونغ هم أكثر ارتباطًا بالسكان في وسط جاوة ، مقارنة بالسكان في جاوة الغربية ، مدعومين بتجميع أفراد جبل كنجان مع السكان في وسط جافا بقيمة وتمهيدية قدرها ١٠،٥٪ ، بينما مع تعداد سكان جاوة الغربية ، فإن المسافة بين علم الوراثة تزيد عن ٣٪. يرجع الاختلاف بين الأفراد في وسط جاوة وجافا الغربية إلى عملية تطورية ، في شكل انتواع تماثل ، أي وجود حاجز بين جاوة الوسطى وجاوة الغربية ، وهو جبل سلاميت.

الكلمة الأساسية: *Microhyla achatina* Tschudi 1838، تحليل فيلوجيني ، جين
Mitochondric الرنا الريباسي 16 ثانية ، عملية تطورية

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada kehadiran Allah Subhanahu Wata'ala atas segala rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Analisis Filogenetik Percil Jawa (*Microhyla achatina*, Tscudi 1838) di JawaTengah dan Jawa Barat Secara In-Silico Menggunakan Software MEGA6 dan mrBayes”**. Sholawat serta salam selalu terpanjatkan kepada Nabi besar Muhammad SAW. yang telah memberikan bimbingan menuju jalan yang rahmatal lil alamin.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tentu tidak mampu terselesaikan jika tidak adanya bimbingan, saran, arahan, dan nasehat serta do'a dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan dan ketulusan hati penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. M. Zainuddin, MA selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah dan Mujahidin Ahmad, M.Sc selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, pengarahan, dan motivasi dalam penyusunan skripsi. Semoga Allah Subhanahu Wata'ala selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau dan keluarga. Amin.
5. Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si dan Dr. Kiptiyah, M.Si selaku penguji yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan penulis sehingga membantu terealisasinya skripsi ini.
6. Ir. Liliek Harianie AR, M.P selaku Dosen Wali yang telah memberikan bimbingan dan memotivasi penulis agar tetap semangat dalam menempuh studi hingga akhir.
7. Seluruh Dosen Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

8. Seluruh Staf Laboratorium dan Staf Administrasi Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
9. Kedua orang tua penulis, ayah Mu'in dan Ibu Supatlik yang selalu memberikan dukungan moril, materiil dan ketulusan do'anya sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
10. Kakak penulis, Veronica Surya Anggraini S.Si yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materil serta do'a kepada penulis
11. Seluruh teman-teman Jurusan Biologi 2017, yang berjuang bersama menyelesaikan studi sampai memperoleh gelas S.Si
12. Kepada sahabat, teman-teman, dan seluruh pihak yang telah membantu dan memotivaasi dalam menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah Subhanahu Wata'ala memberikan balasan atas bantuan dan pemikirannya. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya serta menambah khasanah ilmu pengetahuan. Amin Ya Rabbal 'Alamin.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Malang, 08 Desember 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
MOTTO	v
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
الملخص البحث.....	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.5 Batasan Masalah	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Deskripsi Percil Jawa (<i>Microhyla achatina</i> , Tchudi 1838).....	9
2.2 Biogeografis Jawa Tengah dan Jawa Barat.....	13
2.3 Persebaran Herpetofauna	16
2.4 Analisis Filogenetik	18
2.4.1 Filogenetik.....	18
2.4.2 Metode untuk Merekonstruksi Pohon Filogenetik	20
2.5 Gen Penanda DNA Mitokondria (mtDNA) 16S rRNA	24
2.6 Software Analisis Filogenetik Yang Digunakan.....	27
BAB III METODE PENELITIAN	29
3.1 Jenis Penelitian.....	29

3.2 Waktu dan Tempat.....	29
3.3 Alat dan Bahan.....	29
3.4 Prosedur Penelitian	30
3.5 Analisis Data.....	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1 Hasil Analisis Filogenetik Menggunakan Metode <i>Maximum Parsimony</i>	34
4.2 Hasil Analisis Filogenetik Menggunakan Metode <i>Maximum Likelihood</i>	35
4.3 Hasil Analisis Filogenetik Menggunakan Metode <i>Bayesian Inference</i> .	36
BAB V PENUTUP	44
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	51

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Kelebihan dan kelemahan beberapa metode dalam merekonstruksi pohon filogenetik.....	24
Tabel 3. 1 Data sekuen mtDNA 16S rRNA dari ingroup dan outgroup	30
Tabel 4. 1 Hasil perhitungan jarak genetik	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Individu <i>Microhyla achatina</i>	11
Gambar 2. 2 Karakter morfologi <i>Microhyla achatina</i>	12
Gambar 2. 3 Pengelompokan pulau-pulau di Indonesia	14
Gambar 2. 4 Pohon kekerabatan dan polarisasi dalam analisis filogenetik	20
Gambar 2. 5 Substitusi nukleotida pada Model Markov.....	23
Gambar 2. 6 Struktur genom mitokondria pada <i>Microhyla</i> sp.	26
Gambar 4. 1 Hasil analisis filogenetik <i>Microhyla achatina</i> menggunakan metode Maximum Parsimony pada software MEGA 6	35
Gambar 4. 2 Hasil analisis filogenetik <i>Microhyla achatina</i> menggunakan metode Maximum Likelihood menggunakan software MEGA 6	36
Gambar 4. 3 Hasil analisis filogenetik <i>Microhyla achatina</i> menggunakan metode Bayesian Inference menggunakan software mrBayes.....	37
Gambar 4. 4 Hasil alignment sekuen Ingroup dan Outgroup menggunakan Software MEGA 6.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Pemilihan dataset sekuen DNA Mitokondria 16S rRNA pada <i>ingroup</i> dan <i>outgroup</i>	51
Lampiran 2 Proses <i>alignment</i>	52
Lampiran 3 Penentuan model evolusi terbaik.....	53
Lampiran 4 Analisis pohon filogenetik menggunakan metode <i>Maximum Parsimony</i> , <i>Maximum Likelihood</i> dan <i>Bayesian Inference</i>	54
Lampiran 5 Rekonstruksi pohon filogenetik.....	57
Lampiran 6 Menghitung Jarak Genetik.....	58

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

ATP	: Adenosina trifosfat (ATP)
bp	: Basepare (Panjang sekuen)
km	: Kilometer
mm	: milimeter
NADH CoQ	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) + Hydrogen (H) Coenzyme Q
rRNA	: ribosome-Ribonucleic Acid) atau Asam Ribonukleat ribosomal
SVL	: Snout–vent length
t-RNA	: Transfer RNA (transfer-Ribonucleic acid)

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara “*Mega-biodiversity*”, yaitu negara yang memiliki tingkat keanekaragamannya yang tinggi, dimana perkembangan keanekaragaman sangat dipengaruhi oleh letak dan geografis (Mainaki & Putri, 2020; Sunarmi, 2014). Kondisi geografis tersebut menyebabkan Indonesia memiliki banyak hutan hujan tropis (Qurniawan dkk., 2012), serta menyebabkan evolusi megadiversitas flora dan fauna (Rintelen *et al.*, 2017).

Pulau Jawa merupakan salah satu pulau besar di Indonesia dengan keanekaragaman yang cukup tinggi. Pulau Jawa dibagi menjadi tiga kawasan, yaitu Jawa Barat, Jawa Tengah serta Jawa Timur, dengan bentang lahan, kondisi lingkungan serta iklim yang berbeda (Subeno, 2018). Jawa Tengah dan Jawa Barat memiliki banyak deretan pegunungan sehingga memiliki tipe habitat yang berbeda pada tiap lokasinya, sehingga memungkinkan adanya perbedaan karakter fauna yang terdapat pada kawasan-kawasan tersebut (Ergiana dkk., 2013; Mumpuni, 2014). Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah Subhanahu Wata’ala dalam Q.S Fathir [35]:28

وَمِنَ النَّاسِ وَالْدَّوَابِّ وَالْأَنْعَامِ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ كَذَلِكَ إِنَّمَا يَخْشَى اللَّهَ مِنْ عِبَادِهِ
الْعُلَمَاءُ إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ غَفُورٌ ﴿٣٨﴾

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.*”

Ghoffar & Mu'thi (2003) menjelaskan bahwa *Ad Dawaab* merupakan binatang melata, yaitu setiap binatang melata yang berjalan dengan empat kaki. Kementerian Agama RI (2012) menjelaskan bahwa kata *ad-dawaab* berarti jenis-jenis hewan seperti reptil (ular dan kadal) dan amfibi (katak). Ghoffar & Mu'thi (2003) menjelaskan bahwa ayat tersebut mengisyaratkan pada setiap hewan melata, hewan ternak dan manusia memiliki perbedaan pada setiap jenisnya. Dan diantara cara untuk mengenal perbedaan pada setiap makhluk yang diciptakan Allah Subhanahu wata'ala yaitu dengan cara analisis filogenetik. Menurut Eprilurahman dkk., (2010) hewan yang terdiri atas reptil dan amfibi merupakan kelompok herpetofauna.

Penelitian herpetofauna saat ini masih terbatas dilakukan pada kawasan yang ada di Pulau Jawa, khususnya di Jawa Barat pada daerah konservasi. Herpetofauna merupakan hewan yang terdiri dari amfibi dan reptil, dimana penyebaran alaminya dipengaruhi oleh penghalang, berupa pegunungan tinggi dan laut (Eprilurahman dkk., 2010). Dalam buku *The Geologi of Indonesia vol. I A general geology of Indonesia and Adjacent Archipelagoes* karya Bemmelen (1949) menjelaskan bahwa Pulau Jawa dibagi menjadi tujuh zona, salah satu zona tersebut berupa zona gunungapi kuarter. Zona gunungapi kuarter memanjang longitudinal dengan arah barat-timur, bahkan memanjang dari Jawa Barat hingga Jawa Timur. Gunungapi yang membatasi antara Jawa Tengah dan Jawa Barat yaitu Gunung Slamet.

Herpetofauna memiliki banyak sekali manfaat bagi lingkungan maupun bagi manusia, sehingga perlu untuk dipelajari lebih lanjut, terutama untuk kajian taksonomi, serta ekologi (Sardi dkk., 2013). Herpetofauna sering dimanfaatkan

sebagai makanan, serta sebagai komponen penting yaitu sebagai indikator kerusakan dan menjaga keseimbangan dalam keberlangsungan suatu ekosistem (Yudha dkk., 2015). Pemanfaatan herpetofauna sebagai makanan bagi manusia, diperbolehkan bahkan dianjurkan ketika dalam keadaan darurat atau sudah tidak ada makanan yang bisa dimakan (Hamzah, 2020). Herpetofauna juga berperan dalam menyediakan jasa ekosistem, antara lain sebagai penyusun rantai makanan, baik sebagai mangsa maupun predator (Cahyadi & Arifin, 2019).

Salah satu jenis herpetofauna yang memiliki persebaran yang luas yaitu *genus Microhyla*, dimana *genus* ini memiliki 40 jenis yang terdistribusi mulai dari India, Jepang, Cina, Indo-Cina, Semenanjung Malaya, Sumatera, Jawa, Kalimantan dan Filipina. *Genus Microhyla* memiliki ciri ukuran tubuh yang sangat kecil, dan memiliki corak tubuh yang beragam (Atmaja *et al.*, 2018; Pradana dkk., 2017). Tiga spesies dari *genus Microhyla* yang ditemukan di Pulau Jawa yaitu *Microhyla palmipes* dan *Microhyla achatina*, serta *Microhyla orientalis* yang ditemukan di Suaka Margasatwa Paliyan, Gunungkidul, Yogyakarta (Pradana dkk., 2017; Yudha dkk., 2019).

Banyaknya jenis dan beragamnya corak tubuh pada *genus Microhyla* menyebabkan seringnya kesalahan dalam mengidentifikasi jenis tersebut (Pradana dkk., 2017). Kesalahan dalam mengidentifikasi jenis juga dapat disebabkan karena kurangnya literatur ekologis, taksonomis dan filogenetik (Triandiza & Madduppa, 2018). Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan melakukan analisis hubungan kekerabatan melalui filogenetik (Lestari dkk., 2018).

Analisis filogenetik tidak terlepas dari evolusi biologis. Evolusi merupakan suatu proses gradual suatu spesies, yang memungkinkan spesies sederhana menjadi

lebih kompleks melalui akumulasi perubahan dari generasi ke generasi. Keturunan akan memiliki perbedaan dari nenek moyangnya, karena adanya suatu proses evolusi (Dharmayanti, 2011). Analisis filogenetik dengan menggunakan sumber data molekuler berupa DNA atau protein dapat menggambarkan suatu hubungan evolusi antar spesies (Subari dkk., 2021)

Filogeni adalah pohon berisi node yang dihubungkan oleh cabang yang mewakili keberadaan garis keturunan genetik melalui waktu. Setiap node mewakili kelahiran garis keturunan baru. Filogeni mengkaji hubungan kekerabatan antara suatu kelompok organisme monofiletik atau sebuah hipotesis terhadap kekerabatan organisme, kemudian direpresentasikan sebagai dendogram atau diagram bercabang (Yang & Rannala, 2012).

Pohon filogenetik, atau pohon evolusi, merupakan struktur dasar yang dibangun untuk mencari tahu hubungan evolusioner antar spesies (Horiike, 2016; Kannan & Wheeler, 2012). Metode untuk merekonstruksi pohon filogenetik dapat direkonstruksi berbasis jarak atau berbasis karakter. Metode berbasis karakter mencakup *Maximum Parsimony* (MP), *Maximum Likelihood* (ML) dan *Bayesian inference* (BI). Pendekatan-pendekatan tersebut secara bersamaan membandingkan semua urutan dalam penyelarasan, dengan mempertimbangkan satu karakter (situs dalam penyelarasan) pada satu waktu untuk menghitung skor untuk setiap pohon (Yang & Rannala, 2012).

Analisis Filogenetik dilakukan menggunakan *software* MEGA6 pada metode *Maximum Parsimony* dan *Maximum Likelihood*, sedangkan pada metode *Bayesian Inference* menggunakan *software* mrBayes. *Software* MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) dalam menganalisis filogenetik

digunakan, karena pada versi 6 telah ditambahkan algoritma subtree-pruning-and-regrafting (SPR) untuk mencari pohon secara optimal di bawah kriteria Maximum Parsimony dan Maximum Likelihood (Tamura *et al.*, 2013). *Software* mrBayes versi 3.2 digunakan karena pada versi ini karena pada MrBayes 3.2 mendukung *relaxed clock models and dating* yang berbeda, yaitu: model *Compound Poisson Process* (CPP), *the Thorne-Kishino 2002* (TK02), dan *the Independent Gamma Rate* (IGR) (Ronquist *et al.*, 2012).

Sekuen DNA pada gen, sekuen RNA pada RNA fungsional dan sekuen asam amino pada protein dapat digunakan dalam analisis filogenetik. Dalam analisis filogenetik, terdapat dua poin penting untuk memilih suatu molekul, antara lain gen harus dimiliki oleh semua spesies tertentu, dan gen harus memiliki tingkat evolusi yang tepat (Horiike, 2016). Penggunaan sekuen DNA pada penelitian filogenetik telah meningkat pesat dan telah dilakukan pada semua tingkatan taksonomi. Penelitian filogenetik yang mengkombinasikan teknik biologi molekuler dengan statistik berguna untuk merekonstruksi sebuah hubungan filogenetika (Cahyandari & Nursolihah, 2015). Sumber karakter DNA dapat diperoleh dari inti (nDNA), mitokondria (mtDNA), dan Kloroplas (cpDNA) (Udiarto dkk., 2013).

DNA mitokondria (mtDNA) terdapat didalam organel sel yaitu mitokondria, yang mengandung genom ekstrakromosom yang berbeda dan terpisah dari genom inti. mtDNA dalam penggunaannya sebagai penanda genetik dapat memberikan informasi secara kualitatif dan kuantitatif. Kemampuan mtDNA dalam berevolusi sangat cepat, dapat digunakan untuk melacak sebuah kejadian yang relatif baru (Purnamasari *et al.*, 2016). mtDNA merupakan DNA untai ganda yang

berentuk sirkuler (16.569 bp) dengan 37 gen. Untai ganda tersebut terdiri dari untai *heavy* (H) dan untai *light* (L) (Atmaja *et al.*, 2018).

DNA Mitokondria memiliki beberapa karakteristik yang menguntungkan, termasuk jumlahnya yang besar dalam sel, ukuran genom yang kecil, haploid, diturunkan dari garis ibu, tingkat mutasi lebih tinggi dari DNA inti, dan perubahan melalui mutasi. Fitur tersebut menjadikan mtDNA berguna dalam salah satu penanda yang paling sering digunakan dalam sistematika molekuler, dan banyak digunakan untuk menjawab pertanyaan tentang keanekaragaman genetik, struktur populasi, filogenografi dan evolusi populasi hewan (Gupta *et al.*, 2015).

DNA Mitokondria memiliki gen pengkode yang letaknya berdampingan, dan memiliki daerah yang tidak mengkode. Daerah yang tidak mengkode dimulai dari nukleotida 16024 sampai 576, terletak diantara gen tRNA^{pro} dan tRNA^{phe}. Daerah tersebut memiliki variasi tinggi yang disebut *D-loop* (*displacement loop*). *D-loop* memiliki dua daerah yang sangat bervariasi, yaitu daerah HVS I pada nukleotida 16024-16383 dan HVS II pada nukleotida 57-372 (Ngili dkk., 2012). Pada mtDNA HV I dan II berkembang dengan cepat dengan rerata mutasi lima sampai 10 kali lebih tinggi daripada nDNA (Hidayat, 2017).

Daerah yang tidak mengkode, selain mengandung *D-loop* juga mengandung *origin of replicaion* untuk untai H (O_H) dan promoter untuk untai H dan L (P_L dan P_H), yang disebut daerah pengontrol (*Control region*). Selain mengandung daerah yang memiliki variasi tinggi, daerah yang tidak mengkode juga memiliki daerah yang bersifat lestari (*Conserved Sequences Block*) I, II dan II (Ngili dkk., 2012). Sedangkan 37 gen didalamnya, antara lain 22 gen penyandi t-RNA, dua gen penyandi RNA ribosomal (12S rRNA dan 16S rRNA) dan 13 gen penyandi enzim

yang terlibat dalam rantai transpor elektron fosforilasi oksidatif dan produksi ATP. Salah satu enzim yang disandi gen pada mtDNA yaitu enzim NADH-CoQ reductase pada kompleks I (Helmita dkk., 2015; Saikia *et al.*, 2016; Satiyarti dkk., 2017).

Gen 16S rRNA adalah gen yang sering digunakan sebagai gen penanda pada identifikasi hewan dan dapat menyimpulkan hubungan kekerabatan suatu organisme melalui pohon filogenetik yang memiliki tingkan *cryptic* yang tinggi (Aprilia dkk., 2014). Gen 16S rRNA merupakan gen yang bersifat lestari (*conserved*) dan dapat dijumpai pada semua organisme. Struktur lestari pada gen 16S rRNA menyebabkan gen tersebut dapat digunakan sebagai analisis sekuensing. Adanya sejumlah basa *hypervariable region* pada struktur gen tersebut yang dapat menunjukkan ciri khas yang membedakan pada setiap organisme (Rinanda, 2011).

Saat ini, penelitian sistematika genus *Microhyla* yang sudah dilakukan yaitu pada jenis *Microhyla* di daerah Sumatera, Paparan Sunda dan Bali. Penelitian genus *Microhyla* yang dilakukan Atmaja *et al.*, (2018) dan Pradana dkk., (2017) dengan analisis yang berbeda, menyatakan bahwa genus *Microhyla* di Jawa dengan Sumatera merupakan jenis yang berbeda.

Penelitian pada genus *Microhyla* di wilayah Jawa Barat dan Jawa Tengah belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian dengan judul “Analisis Filogenetik Percil Jawa (*Microhyla achatina* Tscudi, 1838) di Jawa Tengah dan Jawa Barat Berdasarkan Gen Mitokondria 16S rRNA”, penting dilakukan untuk memperjelas kekerabatan dan jarak genetik dari sepsies *Microhyla achatina* di Jawa Tengah dan Jawa Barat.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu bagaimana hubungan kekerabatan spesies *Microhyla achatina* di Jawa Tengah dan Jawa Barat?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini yaitu untuk mengetahui hubungan kekerabatan spesies *Microhyla achatina* di Jawa Tengah dan Jawa Barat.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk menambah pengetahuan mengenai kekerabatan dari spesies *Microhyla achatina*
2. Sebagai referensi bagi bidang penelitian lainnya
3. Sebagai referensi dalam upaya konservasi amfibi di Indonesia

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Spesies *Microhyla achatina* tersebar di beberapa daerah di Jawa Tengah (Ungaran dan Petugkriyono) dan Jawa Barat (Ujung Kulon, Gunung Gede Pangrango dan Gunung Kencana), yang dikaji berdasarkan pada gen mitokondria 16S rRNA yang di dapatkan dari GenBank Database.
2. Metode Analisis Filogenetik menggunakan analisis *Maximum Likelihood*, *Maximum Parsimony* dan *Bayesian Inference* pada *software* MEGA6 dan mrBayes
3. Parameter yang digunakan dalam analisis yaitu sifat pada kelompok monofiletik dan parafiletik dari kladogram yang dihasilkan, skor dari bootstrap (MLBP: ≥ 70 ; MPBP: ≥ 70 ; BPP: ≥ 95), serta nilai dari *p-distance* $\geq 3\%$

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Percil Jawa (*Microhyla achatina*, Tchudi 1838)

Genus *Microhyla*, memiliki 25 spesies, dimana semua spesiesnya merupakan katak kecil dengan panjang tubuh tidak lebih dari 25 mm. Genus *Microhyla* memiliki karakteristik morfologi, antara lain kepala yang sempit, mulut kecil, kulit halus atau berkulit, tidak memiliki gigi vomer, lidah sempit, timpanumnya yang tersembunyi di bawah kulit, jari tangan bebas, jari kaki bebas atau berselaput, metatarsal luar yang bersatu, ujung jari tangan dan kaki melebar, omosternum tidak ada, dan tulang falang terminal berbentuk T (Hasan *et al.*, 2014; Poyarkov *et al.*, 2014).

Allah Subhanahu Wata'ala berfirman dalam Qur'an surat An-Nahl ayat 13 yang berbunyi:

وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ﴿١٣﴾

Artinya: “dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lain macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (Kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran”

Al-Mahalli (1459) menjelaskan bahwa Allah Subhanahu Wata'ala menciptakan makhluk yang telah Allah Subhanahu Wata'ala ciptakan (untuk kalian di bumi ini) berupa hewan-hewan dan tumbuh-tumbuhan serta lain-lainnya (dengan berlain-lainan warnanya) seperti ada yang merah, kuning, hijau dan lain sebagainya.

Asy-Syaukani, (2011) menjelaskan bahwa وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ (dan Dia

[menundukkan pula] apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini) yakni خَلَقَ

yang berarti menciptakan. Dikatakan *دَرَأَ اللهُ الخَلْقَ* yang artinya *خَلَقَهُمْ* (Allah subhanahu Wata'ala menciptakan makhluk-Nya). Makhluk yang diciptakan yaitu semua makhluk baik itu di langit dan di bumi. Kementerian Agama RI (2012) menjelaskan bahwa Allah menciptakan hewan yang memiliki banyak warna. Seperti pada herpetofauna yang memiliki berbagai macam bentuk dan warna pada kulit. Seperti halnya dengan genus *Microhyla* yang memiliki banyak jenis, warna, dan corak.

Katak dijelaskan dalam hadits yang diriwayatkan oleh An-Nasa'I No. 3723:

عَنْ عَبْدِ الرَّحْمَنِ بْنِ عُثْمَانَ رَضِيَ اللهُ عَنْهُ: أَنَّ طَبِيبًا سَأَلَ النَّبِيَّ صَلَّى اللهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ عَنْ ضِفْدَعٍ يَجْعَلُهَا فِي دَوَاءٍ، فَنَهَاهُ النَّبِيُّ صَلَّى اللهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ عَنْ قَتْلِهَا. وَأَخْرَجَهُ النَّسَائِيُّ

Artinya: “*Dari Abdurrahman bin Usman Radhiyallahu ‘Anhu. bahwa seorang dokter pernah bertanya kepada Nabi Shallallahu ‘Alaihi Wasallam tentang katak dibuat obat. Maka Nabi Shallallahu ‘Alaihi Wasallam melarang membunuhnya*” (H.R. An-Nasai’I No. 3723)

Arifin (1992) menjelaskan bahwa katak dihukumi haram untuk dimakan, karena tidak boleh dibunuh. Hewan yang dilarang dibunuh, karena salah satu dari dua hal, yaitu: 1. Karena terhormat seperti halnya manusia, dan 2. Karena haram dagingnya. Apabila katak tidak tergolong terhormat seperti manusia, sudah jelas karena alasan yang kedua itu, yaitu haram dagingnya dimakan. Rasulullah *Shallallahu ‘Alaihi Wasallam* melarang menyembelih hewan, kecuali untuk dimakan. Larangan membunuh katak selain karena haram dagingnya, juga karena upaya dalam melestarikan jenis tersebut.

Genus *Microhyla* menunjukkan persebaran yang sangat luas, mulai dari India, kepulauan Ryuku Jepang, Cina, Indo-Cina, Semenanjung Malaya, Sumatera, Jawa, Kalimantan dan Filipina (Hasan *et al.*, 2014; Poyarkov *et al.*, 2014). Tiga spesies dari genus *Microhyla* ditemukan di Pulau Jawa, yaitu Percil berselaput (*Microhyla palmipes*) ditemukan di Banyuwangi Jawa Timur, Percil Jawa (*Microhyla achatina*) ditemukan di Gunung Slamet Yogyakarta (Iskandar, 1998), dan Percil Bali (*Microhyla orientalis*) ditemukan di Suaka Margasatwa Paliyan, Gunungkidul, Yogyakarta (Yudha dkk., 2019).

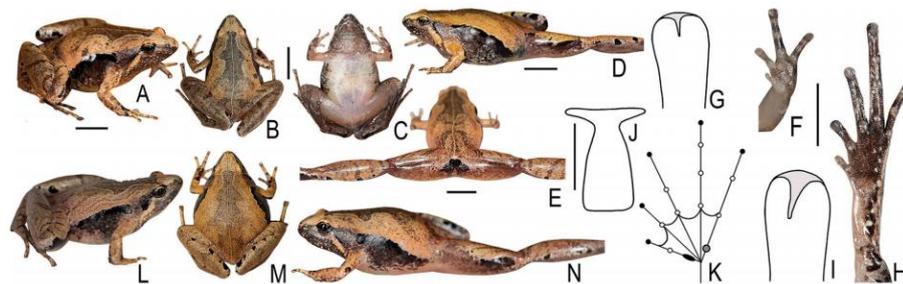


Gambar 2. 1 Individu *Microhyla achatina* (Kurniati et al., 2010)

Percil Jawa pertama kali di deskripsikan oleh Tscudi, 1838. *M. achatina* merupakan katak endemik Jawa yang memiliki tubuh relatif kecil dibandingkan dengan jenis katak lainnya, dengan panjang tubuh (SVL) berkisar antara 12-45 mm (Pradana dkk., 2017). Percil Jawa memiliki ciri umum yaitu kepala dan mulut sempit, mata kecil, sepasang garis gelap pada bagian belakang, tekstur kulit halus tanpa bintil, jari kaki yang berselaput tidak penuh di pangkalan, ujung jari tangan

dan kaki melebar, garis temporal gelap tipis-pendek di atas garis krem yang lebih lebar, memanjang dari area postorbital ke insersi tungkai depan (Atmaja et al., 2018; Yanuarefa et al., 2012). Ciri khusus yang dimiliki Percil Jawa yaitu timpaniumnya yang tersembunyi dan tidak memiliki gigi vomer (sepasang gigi yang terletak pada langit rahang atas katak) (Pradana et al., 2017).

Microhyla berkembang biak di air tenang, seperti kolam, danau, aliran sungai, genangan air dan parit (Vassilieva et al., 2017). Berudu *Microhyla* terdapat karakteristik yang khas, yaitu pada bibir bawah berudu meluas, permukaan, bibir membulat, tanpa ekspansi lateral, ekor lebar dengan filamen sentral (Iskandar, 1998). Berudu Percil Jawa yang dapat ditemukan pada permukaan air (Firdaus et al., 2016).



Gambar 2. 2 Karakter morfologi *Microhyla achatina* A. Dorsolateral B. Dorsal C. Ventral D. Lateral E. Posterior kaki F. Ventral lengan G. Ujung jari ke-3 H. Ventral kaki I. Ujung kaki jari ke-4 J. Terminal phalanx ke-4 kaki K. Ilustrasi skema web pada kaki L. Dorsolateral M. Dorsal N. Lateral (Garg et al., 2019)

Klafisikasi *Microhyla achatina* Tscudi, 1838 menurut (Amin, 2020):

Kingdom : *Animalia*

Phylum : *Chordata*

Subphylum : *Vertebrata*

Class : *Amphibia*

Subclass : *Lissamphibia*

Order : *Anura*

Family : *Microhylidae*

Genus : *Microhyla*

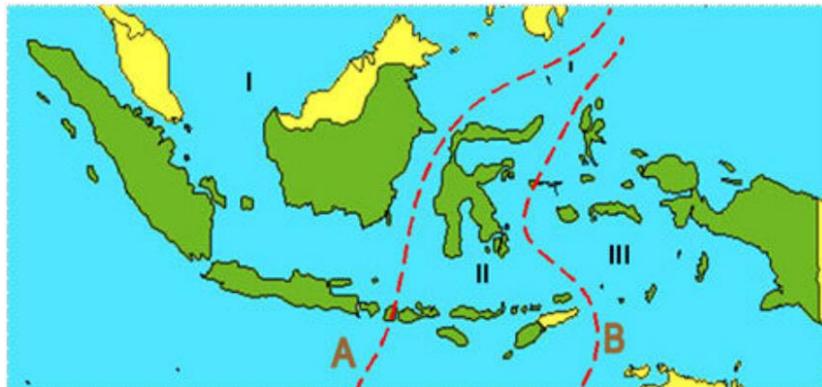
Species : *Microhyla achatina* Tscudi, 1838

Percil Jawa memiliki sebaran yang cukup luas, meliputi Jawa, Bali, dan juga terdapat di ujung selatan Sumatera. Percil Jawa dapat ditemukan di hutan primer dan sekunder (Iskandar, 1998), umumnya ditemukan di habitat yang terganggu atau habitat terbuka yang didominasi oleh tumbuhan-tumbuhan herba, seperti persawahan, kolam ikan atau rawa berumput terbuka. Distribusi vertikal katak cukup luas, mulai dari nol meter hingga 1500 meter di atas permukaan laut (dpl) (Kurniati, 2013)

2.2 Biogeografis Jawa Tengah dan Jawa Barat

Biogeografi merupakan sebuah pola distribusi flora dan fauna pada skala waktu dan ruang yang mencakup komponen biotik, lingkungan, serta kemampuan pergerakan dan perpindahan dari komponen biotik tersebut. Distribusi spesies dalam setiap wilayah biogeografis tidak pernah sepenuhnya homogen. Spesiasi model alopatrik memiliki signifikansi evolusioner karena adanya sifat insular (terpencil) (Alamsyah, 2020).

Indonesia memiliki luas wilayah 5.219.270 km² termasuk negara Timor Timur, menjadikan Indonesia sebagai negara kepulauan terbesar di dunia. Pulau-pulau, laut dan selat pada negara Indonesia seolah tergabung menjadi satu kesatuan, sehingga dianggap sebagai penghubung antara daratan Asia dengan benua Australia. Pulau-pulau di Indonesia tersebut dikelompokkan menjadi tiga kelompok. Kelompok pertama yaitu Paparan sunda yang terdiri dari pulau Sumatera, Jawa, Kalimantan, Madura, Bali, Riau, Bangka dan Belitung. Kelompok kedua yaitu daerah transisi yang terdiri dari pulau Sulawesi, Lombok, Sumba, Sumbawa Flores, Timor, dan Maluku. Sedangkan kelompok ke tiga yaitu Paparan Sahul yang hanya terdiri dari Pulau Irian Jaya/Papua (Golthenboth, 2012).



Gambar 2. 3 Pengelompokan pulau-pulau di Indonesia I. Paparan Sunda II. Daerah Wallace III. Paparan Sahul, A. Garis Wallace B. Garis Weber (Kartamihardja, 2014)

Pulau Jawa merupakan salah satu pulau terbesar di Indonesia dengan keanekaragaman yang cukup tinggi. Pulau Jawa dibagi menjadi tiga kawasan, yaitu Jawa Barat, Jawa Tengah serta Jawa Timur dengan bentang lahan, kondisi lingkungan serta iklim yang berbeda. Perbedaan bentang lahan, kondisi lingkungan serta iklim memungkinkan adanya perbedaan karakter fauna yang terdapat pada

kawasan-kawasan tersebut (Subeno, 2018). Perbedaan karakter fauna tersebut dijelaskan dalam firman Allah Subhanahu Wata'ala, dalam Q.S Al Jathiyah [45]: 4

وَفِي خَلْقِكُمْ وَمَا يَبُتُّ مِنْ دَابَّةٍ آيَاتٌ لِّقَوْمٍ يُوقِنُونَ ﴿٤﴾

Artinya: “Dan pada penciptaan kamu dan pada binatang-binatang yang melata yang bertebaran (di muka bumi) terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) untuk kaum yang meyakini.”

Al-Mahalli (1459) menjelaskan bahwa (Dan pada penciptaan kalian) penciptaan masing-masing di antara kalian, yaitu mulai dari air mani, lalu berupa darah kental, kemudian segumpal daging, lalu menjadi manusia (dan) penciptaan (apa yang bertebaran) di muka bumi (berupa makhluk-makhluk yang melata) arti kata Ad-Daabbah adalah makhluk hidup yang melata di permukaan bumi, yaitu berupa manusia dan lain-lainnya (terdapat tanda-tanda kekuasaan Allah Subhanahu Wata'ala dan keesaan-Nya bagi kaum yang meyakini) adanya hari berbangkit. Tafsir jalalain tersebut menjelaskan bahwa bintang melata terdistribusi di seluruh permukaan bumi, baik di wilayah tropis, panas maupun dingin, di tempat yang kering maupun basah, dan pada setiap tempat di bumi, Allah Subhanahu Wata'ala menciptakan hewan dan menempatkannya pada wilayah yang sesuai. Kementrian Agama RI (2012) juga menjelaskan bahwa ayat tersebut berbicara mengenai salah satu ciptaan Allah Subhanahu Wata'ala, yaitu kelompok reptil dan amfibi.

Pulau Jawa dibagi atas tujuh zona, antara lain zona Jakarta Pantai Utara, Zona Bandung, Zona Pegunungan Selatan, Zona Gunung api Kuarter, dan Zona Depresi Tengah. Di kawasan Jawa Barat terdapat zona gunungapi kuarter. Zona gunung api kuarter meliputi gunung-gunung yang berumur kuarter, yang

menempati bagian tengah fisiografi Jawa Barat yang memanjang longitudinal dari arah barat ke arah timur, bahkan memanjang sampai ke Jawa Tengah hingga Jawa Timur.

Jawa Barat dan Jawa Tengah merupakan provinsi terbesar ke-dua dan ketiga di Pulau Jawa (Cahyadi & Arifin, 2019). Informasi tentang keanekaragaman fauna terutama pada kelompok herpetofauna banyak diungkapkan di Provinsi Jawa Barat, hanya saja pada daerah-daerah tertentu, yakni pada kawasan Gunung Gede-Pangrango dan Halimun-Salak. Sedangkan di Jawa Tengah hanya terbatas pada kawasan Gunung Slamet bagian timur dan selatan (Mumpuni, 2014). Provinsi Jawa Barat dan Jawa Tengah memiliki tingkat keanekaragaman yang cukup tinggi, dan bisa terus meningkat jika pendataan tingkat populasi terus dilanjutkan. Tingkat keanekaragaman di Jawa Tengah dan Jawa Barat didukung dengan adanya hutan alam yang merupakan habitat perlintasan keanekaragaman hayati (Cahyadi & Arifin, 2019; Subeno, 2018)

2.3 Persebaran Herpetofauna

Keberadaan suatu hewan di suatu daerah tidak dimungkinkan jika tidak adanya faktor-faktor tertentu. Faktor-faktor tertentu tersebut antara lain tidak adanya adaptabilitas atau sifat penyesuaian suatu spesies terhadap kondisi lingkungannya. Faktor lainnya yaitu adanya penghalang berupa pegunungan tinggi, sehingga hewan tersebut tidak dapat menghuni daerah tersebut. Selain pegunungan, lautan juga merupakan penghalang bagi tersebarnya suatu spesies, dimana dulunya spesies tersebut memang ada dalam satu daerah, tetapi karena adanya proses geologi, seperti pengembangan benua atau naiknya permukaan laut menjadikan spesies tersebut terspesiasi (Suharini & Abraham, 2014).

Herpetofauna merupakan kelompok fauna yang berjalan menggunakan perutnya (melata), terdiri dari kelompok amfibi dan reptil, dan memiliki lingkup habitat yang sangat luas (Firdaus dkk., 2016). Keanekaragamannya herpetofauna jarang diketahui maupun dikenal oleh masyarakat (Qurniawan & Eprilurahman, 2012). Allah Subhanahu Wata'ala berfirman dalam Q.S An-Nur [24]: 45

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى بَطْنِهِ ۖ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ رِجْلَيْنِ ۖ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ 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.”

Al-Mahalli (1459) menjelaskan bahwa Allah Subhanahu Wata'ala telah menciptakan semua jenis hewan) maksudnya makhluk hidup (dari air) yakni air mani (maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya) seperti ulat dan binatang melata lainnya (dan sebagian berjalan dengan dua kaki) seperti manusia dan burung (sedangkan sebagian yang lain berjalan dengan empat kaki) seperti hewan liar dan hewan ternak. (Allah Subhanahu Wata'ala menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, sesungguhnya Allah Subhanahu Wata'ala Maha Kuasa atas segala sesuatu). Asy-Syaukani (2011) menjelaskan bahwa pada firman Allah

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ بَطْنِهِ ۖ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ رِجْلَيْنِ ۖ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ , Allah Subhanahu Wata'ala merincikan perihal setiap

hewan yang melata atau merangkak, sebagian dari hewan itu ada yang melata di atas perutnya, yaitu ular, cacing, ulat dan serupanya. Kementrian Agama RI (2012)

juga menjelaskan bahwa ayat tersebut berbicara mengenai reptil dan amfibi, seperti ular, kadal, penyu, buaya, tuatara katak dan kodok.

Keberadaan herpetofauna di dunia mencapai 13.000 jenis, dimana 1000 jenisnya terdapat di Indonesia (Broto & Subeno, 2012). Persebaran herpetofauna sangat dipengaruhi oleh penghalang, baik itu berupa pegunungan tinggi maupun lautan (Qurniawan & Eprilurahman, 2012). Herpetofauna banyak dijumpai di hutan-hutan tropis, rawa, maupun sungai (Qurniawan dkk., 2012), dan menghuni pada habitat perairan, daratan hingga pepohonan (Huda, 2017).

Kelompok amfibi terdiri dari tiga ordo, antara lain *Caudata*, *Gymniphiona* dan *Anura*. Ordo Anura memiliki persebaran yang cukup luas. Tersebar pada hutan primer, sekunder, sepanjang aliran air atau sungai, pepohonan, dan pemukiman penduduk. Anura tersebar di seluruh daerah di Indonesia, dari Sumatera, Kalimantan, Jawa sampai dengan Papua, jumlahnya dapat mencapai 450 jenis (Ginting dkk., 2020). Di pulau Jawa sendiri tercatat sebanyak 39 jenis, dan didominasi oleh katak (Subeno, 2018).

2.4 Analisis Filogenetik

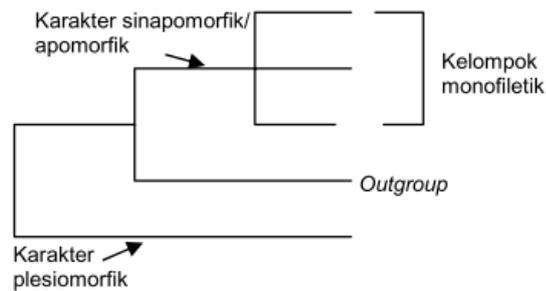
2.4.1 Filogenetik

Filogenetik merupakan kajian studi tentang hubungan kekerabatan antar suatu organisme satu dengan yang lain dan direpresentasikan dalam diagram bercabang atau dendogram (Hasibuan dkk., 2017). Pohon filogenetik, atau pohon evolusi, adalah struktur dasar yang diperlukan untuk memeriksa hubungan antar organisme, yang berisi node dan dihubungkan oleh cabang. Cabang tersebut mewakili keberadaan garis keturunan, sedangkan node mewakili kelahiran garis keturumam baru (Kannan & Wheeler, 2012; Yang & Rannala, 2012).

Sistem taksonomi analisis filogenetika merupakan salah satu contoh pemanfaatan informasi genetika dengan menggambarkan silsilah atau genealogi organisme sebagai pohon filogenetik. Filogenetika merupakan pendekatan yang digunakan untuk merekonstruksi hubungan evolusi dari sebuah kelompok organisme, berupa fenetik dan kladistik. Pada pendekatan filogenetika, sebuah kelompok organisme dimana pada setiap anggota yang memiliki banyak kesamaan karakter maupun ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang. Nenek moyang dan semua turunannya akan membentuk sebuah kelompok monofiletik (Cahyandari & Nursolihah, 2015).

Analisis filogenetik merupakan sebuah analisis yang bertujuan untuk menyusun hubungan filogenetik yang digambarkan dalam suatu garis yang bercabang-cabang seperti pohon (Subari dkk., 2021). Analisis filogenetik tidak terlepas dari evolusi biologis. Evolusi merupakan sebuah proses gradual suatu organisme yang memungkinkan spesies sederhana menjadi lebih kompleks melalui akumulasi perubahan dari beberapa generasi (Dharmayanti, 2011).

Analisis filogenetika didalamnya terdapat kelompok *outgroup* yang sangat dibutuhkan. Kelompok *outgroup* menyebabkan polarisasi karakter atau ciri, yaitu karakter *apomorfik* dan *plesiomorfik*. Karakter apomorfik merupakan karakter *primitive* yang terdapat pada *outgroup* sedangkan sinapomorfik merupakan karakter yang diturunkan dan terdapat pada kelompok *monofiletik* (Cahyandari & Nursolihah, 2015). Terdapat paling sedikit tiga tahap penting dalam analisis filogenetika molekuler, yaitu *sequence alignment*, rekonstruksi pohon filogenetika, dan evaluasi pohon filogenetika dengan uji statistik (Kasi dkk., 2019).



Gambar 2. 4 Pohon kekerabatan dan polarisasi dalam analisis filogenetik (Cahyandari & Nursolihah, 2015)

2.4.2 Metode untuk Merekonstruksi Pohon Filogenetik

Metode untuk merekonstruksi pohon filogenetik dari data molekuler dapat dikategorikan menjadi dua metode, yaitu Metode berbasis jarak metode berbasis karakter. Dalam metode berbasis jarak, jarak antar setiap pasangan urutan dihitung, dan matriks jarak yang dihasilkan digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik. Salah satu metode yang termasuk dalam metode berbasis jarak yaitu metode dengan memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen. Pohon filogenetik diuji secara statistik menggunakan metode bootstrap sebanyak 1000 ulangan (Pangestika dkk., 2015; Yang & Rannala, 2012)

Metode berbasis karakter mencakup *maximum parsimony* (MP), *maximum likelihood* (ML) dan *Bayesian inference* (BI). Pendekatan MP, ML dan BI, secara bersamaan membandingkan semua urutan dalam perataan, dengan mempertimbangkan satu karakter (sebuah situs dalam perataan) pada satu waktu untuk menghitung skor untuk setiap pohon. 'Skor pohon' adalah jumlah minimum perubahan untuk *maximum parsimony*, nilai *log-likelihood* untuk *maximum likelihood* dan probabilitas posterior untuk *Bayesian inference*. Secara teori, pohon

dengan skor terbaik harus diidentifikasi dengan membandingkan semua pohon yang mungkin (Yang & Rannala, 2012).

1. Metode *Maximum parsimony*

Metode *Maximum parsimony* merupakan cara untuk merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan jumlah perubahan (evolusi) terkecil (Retnaningati, 2017). Dasar dari metode *Maximum parsimony* yaitu penggunaan jarak terdekat dan suatu karakter (asam amino atau titik nukleotida) dengan mengacu pada status karakter untuk dijadikan sebagai pohon yang terbaik (Arbi, 2016) dengan meminimalkan jumlah perubahan pada pohon filogenetik dengan menetapkan status karakter ke node interior pada pohon. Panjang karakter (situs) adalah jumlah minimum perubahan yang diperlukan untuk situs tersebut, sedangkan skor pohon adalah jumlah panjang karakter di semua situs. Pohon *Maximum parsimony* adalah pohon yang meminimalkan skor pohon (Yang & Rannala, 2012).

Metode *Maximum parsimony* mengasumsikan bahwa karakter yang sama, berasal dari nenek moyang yang sama (Horiike, 2016). Kelemahan pada metode ini yaitu MP memberikan hasil yang tidak konsisten terhadap model-model evolusi yang digunakan (Arbi, 2016).

2. Metode *Maximum likelihood*

Maximum likelihood dikembangkan oleh R. A. Fisher pada tahun 1920-an sebagai metodologi statistik untuk memperkirakan parameter yang tidak diketahui dalam model. Fungsi *likelihood* didefinisikan sebagai probabilitas data yang diberikan parameter tetapi dipandang sebagai fungsi parameter dengan data yang diamati dan diperbaiki yang mewakili semua informasi dalam data tentang parameter. *Maximum likelihood Estimasi* (MLE) parameter adalah nilai parameter

yang memaksimalkan kemungkinan, ditemukan secara numerik menggunakan algoritma pengoptimalan iteratif. MLE memiliki sifat asimtotik (sampel besar) yang diinginkan: tidak bias, konsisten (mendekati nilai sebenarnya) dan efisien (memiliki varian terkecil di antara perkiraan yang tidak bias) (Yang & Rannala, 2012).

Metode *Maximum Likelihood* merupakan metode statistik (berbasis karakter) untuk menyimpulkan pohon filogenetik. Metode ini membutuhkan model substitusi untuk menilai probabilitas mutasi tertentu, sehingga pencarian model substitusi terbaik harus dilakukan terlebih dahulu. Kekurangan pada metode ini yaitu waktu perhitungan yang lama (Horiike, 2016).

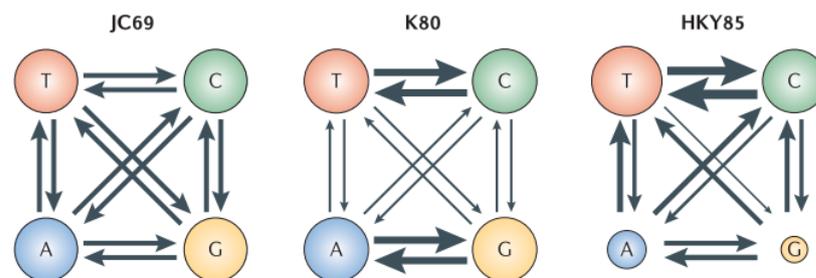
3. Bayesian inference

Bayesian inference adalah metodologi umum inferensi statistik. Ini berbeda dari *Maximum parsimony* karena parameter dalam model dianggap sebagai variabel acak dengan distribusi statistik, sedangkan *Maximum parsimony* merupakan konstanta tetap yang tidak diketahui. Sebelum data dianalisis, parameter diberi distribusi sebelumnya, yang digabungkan dengan data (atau kemungkinan) untuk menghasilkan distribusi posterior (Yang & Rannala, 2012). Metode Bayesian inference membutuhkan informasi distribusi prior pada parameter model, seperti parameter model substitusi, panjang cabang, dan topologi pohon (Horiike, 2016).

Probabilitas posterior diperoleh dengan menjelajahi ruang pohon menggunakan teknik sampling, yang disebut algoritma Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Analisis hubungan kekerabatan dapat dilihat dari jarak genetik antara individu satu dengan individu lainnya. Beberapa model substitusi yang umum digunakan diilustrasikan pada gambar 2.5. Pada model JC69 mengasumsikan

tingkat substitusi yang sama antara dua nukleotida. Model K8027 mengsumsikan tingkat transisi dan transversi yang berbeda untuk transisi dan transversi. Kedua model tersebut memprediksi frekuensi yang sama dari empat nukleotida. Asumsi frekuensi dasar yang sama tidak terbatas pada model HKY85 dan model General Time Reversible (GTR) (Yang & Rannala, 2012).

Variasi dalam tingkat mutasi lokal dan dalam batasan selektif, menyebabkan perbedaan situs urutan DNA atau protein yang sering berkembang pada tingkat yang berbeda. Dalam penghitungan jarak, variasi laju tersebut diakomodasi dengan mengasumsikan distribusi laju gamma (Γ) untuk sebuah situs, yang mengarah ke model seperti JC69 + Γ , HKY85 + Γ atau GTR + Γ . (Yang & Rannala, 2012).



Gambar 2. 5 Substitusi nukleotida pada Model Markov. Ketebalan panah menunjukkan tingkat substitusi, dan ukuran lingkaran mewakili frekuensi nukleotida ketika proses substitusi dalam kesetimbangan (Yang & Rannala, 2012)

Tabel 2. 1 Kelebihan dan kelemahan beberapa metode dalam merekonstruksi pohon filogenetik

Metode	Kelebihan	Kekurangan
1. <i>Parsimony</i>	<ul style="list-style-type: none"> Sederhana dan pembandingan intuitif Hanya bekerja untuk beberapa data (seperti SINES dan LINES) 	<ul style="list-style-type: none"> Asumsi bersifat implisit dan kurang bisa dipahami Kurangnya model, tidak dapat digabungkan pada ilmu evolusi Panjang cabang secara substitusi diabaikan ketika tingkat substitusi tinggi Maximum Parsimony mendapatkan tarikan pada cabangnya
2. <i>Distance</i>	<ul style="list-style-type: none"> Kecepatan komputasi yang cepat Dapat diterapkan pada semua jenis data selama jarak genetik dapat ditentukan Model untuk perhitungan jarak dapat dipilih agar sesuai dengan data 	<ul style="list-style-type: none"> Kebanyakan <i>Distance method</i>, (seperti <i>Neighbor Joining</i>) mengabaikan varians dari estimasi jarak Perhitungan jarak bermasalah ketika urutan divergen dan melibatkan banyak <i>alignment gaps</i> Panjang cabang negatif tidak berarti
3. <i>Likelihood</i>	<ul style="list-style-type: none"> Dapat menggunakan model substitusi kompleks untuk mendekati realitas biologis Kerangka kerja yang kuat untuk memperkirakan parameter dan menguji hipotesis 	<ul style="list-style-type: none"> Perulangan pada <i>Maximum Likelihood</i> melibatkan komputasi yang berat Topologi bukan merupakan parameter sehingga sulit untuk menerapkan teori ML untuk estimasinya. Proporsi bootstrap sulit untuk ditafsirkan
4. <i>Bayesian Inference</i>	<ul style="list-style-type: none"> Dapat menggunakan model substitusi realistis, seperti dalam ml Probabilitas sebelumnya bisa digabungkan dengan informasi lainnya Probabilitas posterior untuk pohon dan clade memiliki interpretasi yang mudah 	<ul style="list-style-type: none"> Markov chain Monte Carlo (MCMC) melibatkan komputasi berat Dalam data besar, konvergensi dan pencampuran MCMC sulit untuk diidentifikasi atau diperbaiki Probabilitas posterior sering tampak terlalu tinggi Pemilihan model melibatkan komputasi yang agak sulit

Sumber: Yang & Rannala, 2012

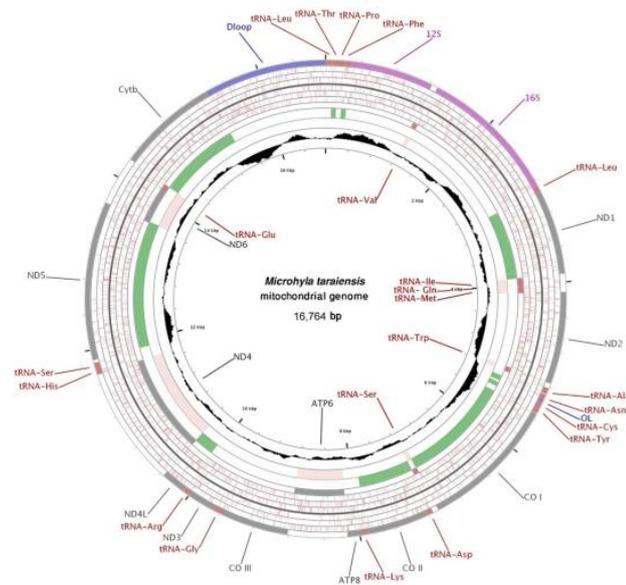
2.5 Gen Penanda DNA Mitokondria (mtDNA) 16S rRNA

Penggunaan sekuens DNA dalam studi filogenetik telah berkembang pesat dan telah dipraktikkan di semua tingkat taksonomi seperti famili, genus, dan spesies. Filogeni molekuler menggabungkan teknik dan statistik biologi molekuler untuk merekonstruksi hubungan filogenetik. Pemikiran dasar penggunaan sekuens DNA dalam studi filogenetik adalah bahwa sekuens nukleotida berubah dari waktu ke waktu, menilai laju evolusi, dan merekonstruksi hubungan antara satu kelompok organisme dan kelompok lain. (Cahyandari & Nursolihah, 2015).

Sumber karakter DNA dapat diperoleh dari nukleus (nDNA), kloroplas (cpDNA), dan mitokondria (mtDNA) (Udiarto dkk., 2013). DNA mitokondria

(mtDNA) merupakan DNA atau materi genetik yang terus menerus akan bereplikasi, bahkan dalam sel yang berdiferensiasi akhir, seperti sel saraf dan kardiomyosit. DNA mitokondria dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk memberikan informasi kualitatif dan kuantitatif. DNA mitokondria juga memiliki kemampuan evolusioner yang sangat cepat, sehingga dapat digunakan untuk melacak peristiwa yang relatif baru. (Purnamasari dkk., 2016). Analisis DNA mitokondria (mtDNA) telah banyak digunakan karena menyediakan sumber data yang kaya untuk menganalisis keanekaragaman genetik dan filogeni (Gupta *et al.*, 2015).

DNA mitokondria (mtDNA) terdapat di dalam organel mitokondria, yaitu organel seluler yang mengandung genom ekstrakromosom yang berbeda dan terpisah dari genom inti. DNA mitokondria berfungsi untuk memproduksi ATP, dan bermanfaat untuk mengidentifikasi suatu spesies dikarenakan laju mutasinya yang lebih tinggi dari DNA pada inti (Amorim *et al.*, 2019; Hidayat, 2017). mtDNA berbentuk lingkaran dan untai ganda (16.569 bp) dengan 37 gen. 37 gen diantaranya yaitu 22 gen menyandikan untuk t-RNA, 2 gen menyandikan RNA ribosom (12S rRNA & 16S rRNA) dan 13 gen menyandi enzim yang terlibat dalam rantai transpor elektron fosforilasi oksidatif dan produksi ATP (Saikia *et al.*, 2016).



Gambar 2. 6 Struktur genom mitokondria pada *Microhyla* sp. (Khatiwada *et al.*, 2018)

Gen 16S rRNA adalah gen yang sering digunakan sebagai gen penanda pada identifikasi hewan dan dapat menyimpulkan hubungan kekerabatan suatu organisme melalui pohon filogenetik yang memiliki tingkat *cryptic* yang tinggi (Aprilia dkk., 2014). Gen 16S rRNA juga merupakan gen yang bersifat lestari (*conserved*) dan dapat dijumpai pada semua organisme. Struktur lestari pada gen 16S rRNA menyebabkan gen tersebut dapat digunakan sebagai analisis sekuensing (Rinanda, 2011).

Pemanfaatannya, gen mitokondria 16S rRNA banyak digunakan dalam berbagai bidang terutama dalam mengidentifikasi suatu organisme. Pada metode deteksi molekuler, pemanfaatan gen 16S rRNA dianggap memiliki tingkat pembelahan yang rendah, dikarenakan DNA 16S rRNA runutannya sebagian besar menunjukkan adanya kesamaan yang tinggi dalam satu spesies. Dimana jika

homologi sekuen pada gen 16S rRNA menunjukkan 97.5%, maka spesies tersebut dapat dikatakan sebagai spesies yang berbeda (Akihary & Kolondam, 2020).

Metode identifikasi dalam penggunaan gen 16S rRNA memiliki kelebihan dan kekurangan. Kelebihan penggunaan gen 16S rRNA yaitu gen 16S rRNA merupakan penanda yang sangat terkonservasi, dan adanya mutasi yang terjadi pada beberapa daerah. Gen 16S rRNA pada amfibi memiliki jumlah mutasi yang cukup, dan cukup bervariasi untuk mengidentifikasi sebagian besar spesies dengan jelas (Vences *et al.*, 2005). Kekurangan dalam penggunaan gen 16S rRNA sebagai penanda yaitu rumitnya pensejajaran pada gen 16S rRNA karena adanya resiko insersi dan delesi.

2.6 Software Analisis Filogenetik Yang Digunakan

Beberapa software yang digunakan dalam analisis filogenetik, antara lain:

1. MEGA6

Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) dikembangkan dengan tujuan menyediakan seperangkat alat terpadu yang berpusat pada ahli biologi untuk analisis statistik data urutan DNA dan protein dari sudut pandang evolusi. MEGA telah berkembang untuk memasukkan alat untuk pensejajaran sekuen, rekonstruksi dan visualisasi pohon filogenetik, menguji serangkaian hipotesis evolusi, memperkirakan divergensi urutan, akuisisi data urutan berbasis web, dan sistem pakar untuk menghasilkan deskripsi bahasa alami dari analisis. metode dan data yang dipilih oleh pengguna (Tamura *et al.*, 2011). MEGA pada versi 6 telah ditambahkan algoritma subtree-pruning-and-regrafting (SPR) untuk

mencari pohon secara optimal di bawah kriteria Maximum Parsimony dan Maximum Likelihood (Tamura *et al.*, 2013).

2. mrBayes

MrBayes adalah program untuk inferensi Bayesian dan pilihan model di berbagai model filogenetik dan evolusioner, yang menggunakan metode Markov Chain Monte Carlo (MCMC) untuk mengestimasi distribusi posterior dari parameter modelnya. *Software* mrBayes versi 3.2 digunakan karena pada versi ini karena pada MrBayes 3.2 mendukung *relaxed clock models and dating* yang berbeda, yaitu: model *Compound Poisson Process* (CPP), *the Thorne-Kishino 2002* (TK02), dan *the Independent Gamma Rate* (IGR) (Ronquist *et al.*, 2012).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif dengan objek penelitiannya yaitu dataset sekuen *ingroup* dari genom mitokondria (mtDNA) 16S rRNA dari spesies *Microhyla achatina* dan sekuen *outgrup* dari *family* yang sama.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Juli-Desember 2021, bertempat di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah Laptop Lenovo Ideapad Z400 APU ~2.2GHz dengan *memory* 8192MB RAM. *Software* yang digunakan untuk analisis data diantaranya: MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analyses*), Kakusan 3, mrBayes 3.2.7, dan Figtree v1.4.3. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu data sekunder berupa sekuen *Ingroup* berjumlah 12 individu dari spesies *Microhyla achatina* yang ditemukan di Jawa Tengah dan Jawa Barat, dan 2 sekuen *Outgroup*, dari penelitian Firdaus *et al.*, (2018), yaitu spesies *Chaperina fusca* dan *Kalophrynus heterochirus* yang ditemukan di Sabah, Malaysia yang disajikan dalam tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Data sekuen mtDNA 16S rRNA dari *ingroup* dan *outgroup*

Spesies	Sumber	Nomer Akses GenBank	Wilayah
<i>Microhyla achatina</i>	Poyarkov & Gorin, 2019 (unpublish)	MN534565.1	Java, Ujung Kulon
<i>Microhyla achatina</i>	Poyarkov & Gorin, 2019 (unpublish)	MN534564.1	Java, Ujung Kulon
<i>Microhyla achatina</i>	Poyarkov & Gorin, 2019 (unpublish)	MN534563.1	Java, Ujung Kulon
<i>Microhyla achatina</i>	Pradana dkk., 2017	LC213129.1	Gunung Kencana, Bandung
<i>Microhyla achatina</i>	Atmaja <i>et al.</i> , 2018	MK034338.1	Petungkriyono, Pekalongan
<i>Microhyla achatina</i>	Atmaja <i>et al.</i> , 2018	MK034337.1	Petungkriyono, Pekalongan
<i>Microhyla achatina</i>	Atmaja <i>et al.</i> , 2018	MK034331.1	Gede Pangrango
<i>Microhyla achatina</i>	Atmaja <i>et al.</i> , 2018	MK034330.1	Gede Pangrango
<i>Microhyla achatina</i>	Matsui, 2011	AB634657.1	Gede Pangrango
<i>Microhyla achatina</i>	Matsui, 2011	AB634656.1	Ungaran
<i>Microhyla achatina</i>	Matsui, 2011	AB598335.1	Ungaran
<i>Microhyla achatina</i>	Peloso, P.L.V.	KM509162.1	Ungaran
<i>Chaperina fusca</i> *	Firdaus dkk., 2018	AB598342	Malaysia: Sabah
<i>Kalophrynus heterochirus</i> *	Firdaus dkk., 2018	AB634697	Malaysia: Sabah

Keterangan: *data sekuen *outgroup*

3.4 Prosedur Penelitian

Seleksi Data Sekuen

Sekuen DNA mitokondria 16S rRNA dari dataset sekuen *ingroup* dan *outgroup* diambil dari database GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), data tersebut diseleksi untuk mendapat sekuen dataset yang spesifik. Dalam analisis filogenetik, sekuen *outgroup* diperlukan untuk mengetahui karakter primitif (plesiomorf) dan karakter derivat (apomorf) dari kelompok *ingroup*, serta

untuk menemukan titik awal pembentukan sebuah pohon filogenetik (Muzzazinah, 2017). Sekuen yang di ambil merupakan sekuen dengan panjang ~800 bp, kemudian disimpan dalam format FASTA, yang selanjutnya sekuen tersebut akan dilakukan pensejajaran (*Aligning*) (Pradana dkk., 2017 modifikasi).

Aligning Data Sekuen

Sekuen yang telah disimpan dalam format FASTA, akan dianalisis menggunakan *software* MEGA 6. Sekuen di input, dilanjutkan dengan proses pensejajaran dengan menggunakan menu *Clustal W*. Setelah sekuen selesai disejajarkan, dilakukan pemotongan sekuen, dengan menghapus gap, untuk mendapatkan hasil yang konservatif. Hasil pensejajaran di-*export* kemudian disimpan dalam format *fasta* (Tamura *et al.*, 2011 modifikasi).

Penentuan Model Evolusi untuk Analisis Filogenetik

Hasil *aligning* yang sudah disimpan dalam format *fasta* kemudian dianalisis model evolusinya untuk mendapatkan model evolusi yang sesuai, menggunakan *software* Kakusan 3 (Pradana dkk., 2017), menghasilkan model evolusi terbaik yaitu menggunakan *General Time-Reversible* (GTR) parameter gamma (G).

3.5 Analisis Data

1. Analisis Filogenetik Menggunakan Metode *Maximum Parsimony*, *Maximum Likelihood* dan *Bayesian Inference*

Analisis Filogenetik pada penelitian ini menggunakan algoritma *Maximum Parsimony*, *Maximum Likelihood* dan *Bayesian Inference* (Matsui, 2011). Pada *Maximum Likelihood* dan *Maximum Parsimony* menggunakan *software* MEGA 6, sedangkan pada algoritma *Bayesian Inference* diestimasi menggunakan *software* MrBayes-3.2.7 (Kim *et al.*, 2018), dengan nilai bootstrap 1000 dan menggunakan

model substitusi GTR_Gamma (*General Time Reversible Parameter Gamma*) dari hasil penentuan model evolusi terbaik.

Nilai bootstrap digunakan untuk menguji seberapa baik set data yang digunakan. Nilai bootstrap yang rendah membuat analisis urutan yang digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik tidak dapat diandalkan. Nilai bootstrap dari 100 hingga 1000 ulangan, digunakan untuk memperkirakan tingkat kepercayaan suatu pohon filogenetik. Semakin besar nilai bootstrap yang digunakan semakin besar reliabilitas dari topologi pohon yang direkonstruksi berdasarkan distribusi karakter dalam data, yang sangat dipengaruhi oleh efek acak. Kategori nilai bootstrap meliputi tinggi (>85%), moderat (70-85%), lemah (50-69%), atau lemah (<50%) (Lestari dkk., 2018; Pangestika dkk., 2015; Subari dkk., 2021).

Output file dari rekonstruksi pohon dengan menggunakan beberapa metode, divisualisasikan menggunakan *software* FigTree v1.4.3 (Suryawan W., 2016 modifikasi). Hasil dari visualisasi pohon filogenetik berupa filogram yang menggambarkan hubungan kekerabatan spesies tersebut berdasarkan cabang dari filogram.

2. Menghitung Jarak Genetik

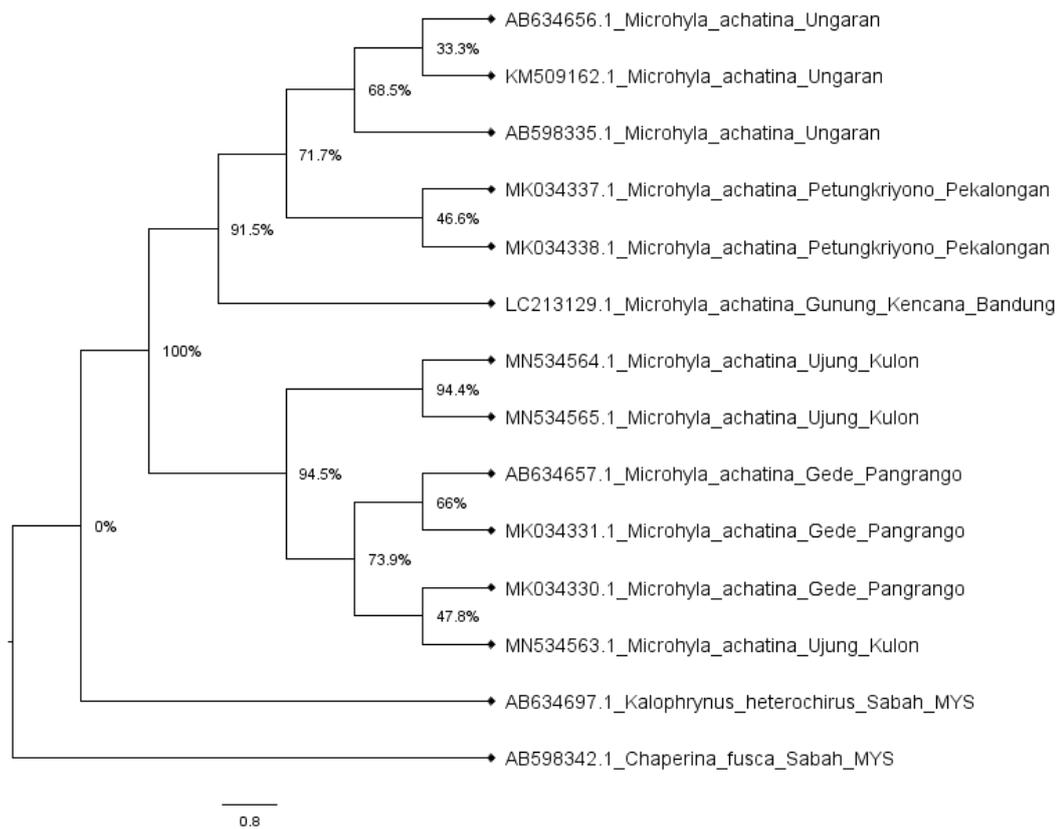
Hasil pensejajaran yang telah di-*export* dan disimpan dalam format *fasta* dihitung jarak genetiknya menggunakan model *uncorrect p-distace* yang di analisis pada *software* MEGA6. Jarak genetik yang dijadikan acuan sebagai pembeda antara spesies yaitu 3% (Akhsani *et al.*, 2017 modifikasi), dimana jika hasil perhitungan jarak genetik melebihi 3%, maka spesies tersebut dinyatakan berbeda dengan spesies lainnya, dan dapat dinyatakan sebagai spesies berbeda, dengan analisis lebih lanjut. Hasil perhitungan jarak genetik yaitu berupa tabel yang menunjukkan jarak genetik antar spesies.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Analisis Filogenetik Menggunakan Metode *Maximum Parsimony*

Hasil analisis filogenetik menggunakan metode *Maximum Parsimony* yang disajikan pada gambar 4.1. Metode *Maximum Parsimony* menurut Juliantari dkk., (2016) merupakan metode untuk membangun sebuah pohon filogenetik berdasarkan jumlah perubahan (evolusi) terkecil. Filogram pada gambar 4.1 menggunakan analisis Maximum Parsimony pada *software* MEGA6 menjelaskan adanya pembagian pohon filogenetik menjadi dua klad besar, yaitu Klad I dan Klad II. Klad I terdiri dari spesies Percil Jawa (*Microhyla achatina*) yang ditemukan di kawasan Gunung Ungaran, Petungkriyono Pekalongan dan Gunung Kencana Bandung. Klad II terdiri dari spesies yang ditemukan di kawasan Ujung Kulon dan Gunung Gede Pangrango.

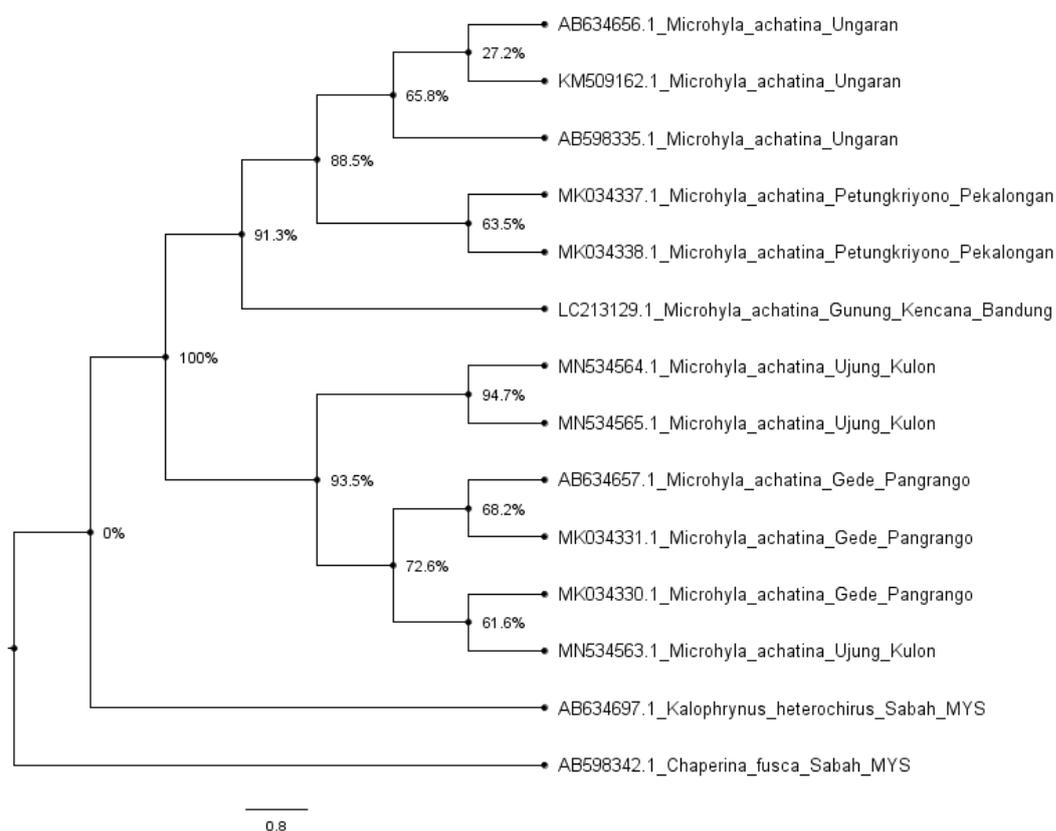
Pembagian dua klad dari pohon filogenetik pada gambar 4.1 didukung dengan nilai bootstrap 100. Menurut Lestari dkk., (2018) nilai bootstrap menentukan tingkat validitas dari sebuah topologi pohon. Ketika nilai bootstrap >85%, maka tingkat validitas dari topologi pohon tinggi. Nilai bootstrap pada gambar 4.1, menunjukkan bahwa populasi klad I dan klad II terpisah sempurna.



Gambar 4. 1 Hasil analisis filogenetik *Microhyla achatina* menggunakan metode Maximum Parsimony pada software MEGA 6

4.2 Hasil Analisis Filogenetik Menggunakan Metode Maximum Likelihood

Hasil analisis filogenetik menggunakan metode *Maximum Likelihood* yang disajikan pada gambar 4.2. Hasil analisis metode *Maximum likelihood* tidak berbeda dengan hasil analisis *Maximum Parsimony*. Filogram pada gambar 4.2 juga didapati pembagian pohon filogenetik menjadi dua klad besar. Klad I terdiri dari spesies Percil Jawa (*Microhyla achatina*) yang ditemukan di kawasan gunung Ungaran, Petungkriyono Pekalongan dan gunung Kencana Bandung. Klad II terdiri dari spesies yang ditemukan di kawasan Ujung Kulon dan Gunung Gede Pangrango. Pembagian dua klad dari pohon filogenetik pada gambar 4.2 didukung dengan nilai bootstrap 100. Nilai bootstrap pada analisis *Maximum Likelihood* dengan hasil lebih dari 70 menandakan bahwa validitas pohon yang terbentuk baik.

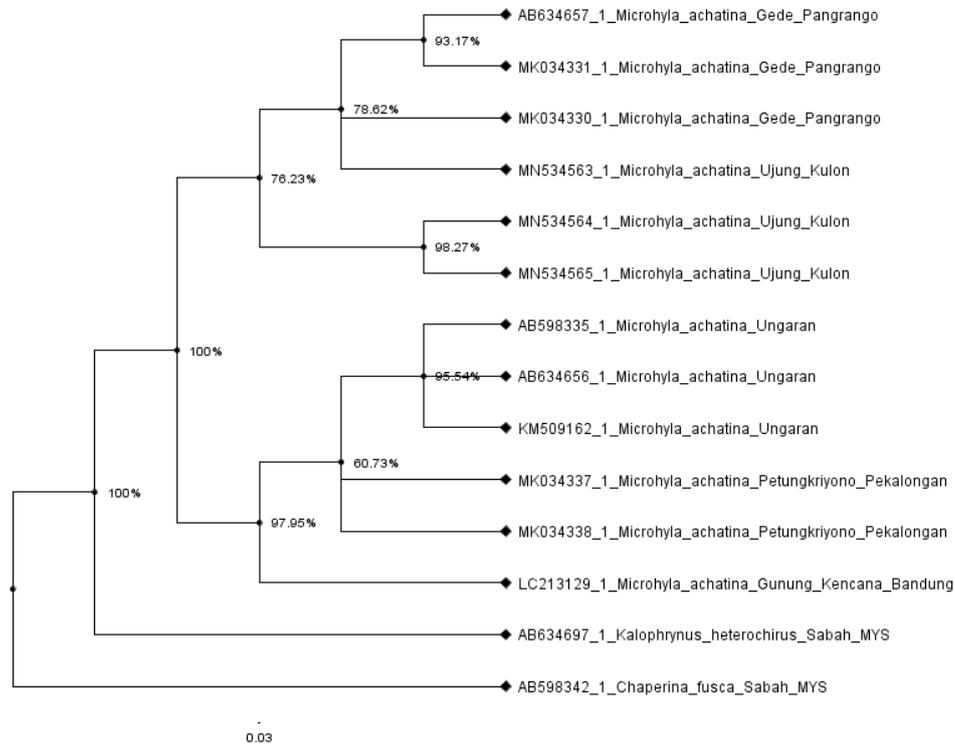


Gambar 4. 2 Hasil analisis filogenetik *Microhyala achatina* menggunakan metode Maximum Likelihood menggunakan software MEGA 6

4.3 Hasil Analisis Filogenetik Menggunakan Metode *Bayesian Inference*

Hasil analisis filogenetik menggunakan metode *Bayesian Inference* yang disajikan pada gambar 4.3. Tidak berbeda dengan hasil analisis *Maximum Parsimony* dan *Maximum Likelihood*. Filogram pada gambar 4.3 juga terdapat pembagian pohon filogenetik menjadi dua klad besar, klad I yang terdiri dari spesies Percil Jawa yang ditemukan di kawasan gunung Ungaran, Petungkriyono Pekalongan dan gunung Kencana Bandung. Klad II terdiri dari spesies yang ditemukan di kawasan Ujung Kulon dan Gunung Gede Pangrango. Kawasan tersebut berlokasi di barat Pulau Jawa. Pembagian dua klad dari pohon filogenetik pada gambar 4.3 didukung dengan tingkat validitas pohon yang tinggi yaitu dengan

nilai bootstrap 100. Tingkat validitas pohon yang dihasilkan dari analisis Bayesian Inference dikatakan baik ketika nilai bootstrap yang dihasilkan lebih dari 90%.



Gambar 4. 3 Hasil analisis filogenetik *Microhyla achatina* menggunakan metode Bayesian Inference menggunakan software mrBayes

Tabel 4. 1 Hasil perhitungan jarak genetik *p-distance* (x 100%)

Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. AB598335.1 <i>Microhyla achatina</i> Ungaran													
2. AB598342.1 <i>Chaperina fusca</i> Sabah_MYS	0,172												
3. AB634656.1 <i>Microhyla achatina</i> Ungaran	0,000	0,172											
4. AB634657.1 <i>Microhyla achatina</i> Gede Pangrango	0,030	0,177	0,030										
5. AB634697.1 <i>Kalophrynus heterochirus</i> Sabah_MYS	0,151	0,172	0,151	0,153									
6. KM509162.1 <i>Microhyla achatina</i> Ungaran	0,000	0,172	0,000	0,030	0,151								
7. LC213129.1 <i>Microhyla achatina</i> Gunung Kencana Bandung	0,015	0,179	0,015	0,037	0,157	0,015							
8. MK034330.1 <i>Microhyla achatina</i> Gede Pangrango	0,026	0,175	0,026	0,006	0,147	0,026	0,032						
9. MK034331.1 <i>Microhyla achatina</i> Gede Pangrango	0,026	0,172	0,026	0,004	0,149	0,026	0,032	0,002					
10. MK034337.1 <i>Microhyla achatina</i> Petungkriyono Pekalongan	0,002	0,172	0,002	0,028	0,151	0,002	0,013	0,024	0,024				
11. MK034338.1 <i>Microhyla achatina</i> Petungkriyono Pekalongan	0,002	0,172	0,002	0,028	0,151	0,002	0,013	0,024	0,024	0,000			
12. MN534563.1 <i>Microhyla achatina</i> Ujung Kulon	0,026	0,175	0,026	0,006	0,147	0,026	0,032	0,000	0,002	0,024	0,024		
13. MN534564.1 <i>Microhyla achatina</i> Ujung Kulon	0,028	0,175	0,028	0,013	0,147	0,028	0,034	0,006	0,009	0,026	0,026	0,006	
14. MN534565.1 <i>Microhyla achatina</i> Ujung Kulon	0,028	0,175	0,028	0,013	0,147	0,028	0,034	0,006	0,009	0,026	0,026	0,006	0,000

Keterangan: jarak genetik dalam tabel disajikan dalam bentuk desimal. Suatu spesies dikatakan berbeda jika jarak genetik antar spesies lebih dari 3% (0.03)

 Jarak genetik lebih dari 3%

 *M. achatina* di Jawa Tengah

 *M. achatina* di Jawa Barat

 *Outgroup*

Hasil alignment dari 12 sekuen *ingroup* dari spesies *Microhyla achatina* di Jawa Tengah dan Jawa Barat, dan dua sekuen *outgroup* dari *family* yang sama (*Microhylidae*), menghasilkan sekuen dengan panjang 467 bp (disajikan dalam gambar 4.4). Hasil alignment kemudian di analisis kekerabatan dan evolusinya menggunakan metode *Maximum Parsimony*, *Maximum Likelihood* dan *Bayesian Inference*. Metode *Maximum Parsimony* dan *Maximum Likelihood* dianalisis kekerabatannya menggunakan *software* MEGA6. Metode *Bayesian Inference* dianalisis kekerabatannya menggunakan *software* mrBayes. Hasil analisis dari ketiga metode menghasilkan topologi pohon yang mempresentasikan hubungan kekerabatan antar individu.

Species/Abbrv	Group Name	Sequence
1. AB598335.1_Microhyla_achatina_Ungaran		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
2. AB598342.1_Chaperina_fusca_Sabah_MYS		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
3. AB634656.1_Microhyla_achatina_Ungaran		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
4. AB634657.1_Microhyla_achatina_Gede_Pangrango		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
5. AB634697.1_Kalophrynus_heterochirus_Sabah_MYS		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGCCAC
6. KM509162.1_Microhyla_achatina_Ungaran		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
7. LC213129.1_Microhyla_achatina_Gunung_Kencana_Bandung		TCTGACCGGTGCAAAGGTAGC-GT
8. MK034330.1_Microhyla_achatina_Gede_Pangrango		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
9. MK034331.1_Microhyla_achatina_Gede_Pangrango		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
10. MK034337.1_Microhyla_achatina_Petungkriyono_Pekalongan		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
11. MK034338.1_Microhyla_achatina_Petungkriyono_Pekalongan		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
12. MN534563.1_Microhyla_achatina_Ujung_Kulon		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
13. MN534564.1_Microhyla_achatina_Ujung_Kulon		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC
14. MN534565.1_Microhyla_achatina_Ujung_Kulon		CCTAACCGGTGCAAAGGTAGC-GC

Gambar 4. 4 Hasil alignment sekuen Ingroup dan Outgroup menggunakan Software MEGA6

Hasil analisis dengan menggunakan metode *Maximum Parsimony*, *Maximum Likelihood* dan *Bayesian Inference* menjelaskan bahwa adanya cabang yang memisahkan antara populasi *M. achatina* yang ditemukan di Gunung Ungaran, Petungkriyono Pekalongan (Jawa Tengah), dan Gunung Kencana Bandung, dengan populasi *M. achatina* yang ditemukan di Ujung Kulon dan Gunung Gede Pangrango (Jawa Barat). Cabang pada topologi pohon filogenetik dari ketiga analisis mengindikasikan bahwa populasi *M. achatina* di Jawa Tengah dengan populasi *M. achatina* di Jawa Barat terpisah, didukung dengan nilai bootstrap 100. Semakin tinggi nilai *bootstrap*, maka semakin akurat dari topologi pohon tersebut.

Topologi pohon dari hasil ketiga metode analisis menjelaskan adanya individu *M. achatina* yang ditemukan di Gunung Kencana Bandung, Jawa Barat berada pada satu klad atau cabang dengan populasi *M. achatina* yang ditemukan di Jawa Tengah. Pengelompokan *M. achatina* Gunung Kencana Bandung menjelaskan bahwa individu tersebut berkerabat dekat dengan populasi di Jawa Tengah. Hasil perhitungan jarak genetik pada tabel 4.1 juga menjelaskan bahwa *M. achatina* Gunung Kencana berkerabat lebih dekat dengan populasi di Jawa Tengah dengan nilai jarak genetik 1,5%, sedangkan jarak genetiknya dengan populasi di Jawa Barat lebih dari 3%. Fatmarischa dkk., (2014) mengatakan bahwa jarak genetik merupakan tingkat perbedaan gen (perbedaan genomik) pada suatu populasi atau spesies yang diukur melalui kuantitas numerik.

Topologi pohon dari ke-tiga analisis yang menjelaskan terpisahnya populasi di Jawa Tengah dengan Jawa Barat didukung dengan nilai bootstrap 100 dan jarak genetik lebih dari 3%. Nilai bootstrap dan jarak genetik yang mendukung

terpisahnya populasi di Jawa Tengah dan Jawa Barat menunjukkan adanya karakter yang berbeda antara individu di wilayah Jawa Barat dengan Jawa Tengah. Perbedaan karakter disebabkan adanya perubahan basa nukleotida dari proses spesiasi alopatrik. Spesiasi sendiri merupakan puncak dari adanya proses evolusi. Arbi (2012) menjelaskan bahwa evolusi merupakan sebuah proses perubahan jangka panjang yang terjadi secara bertahap dan dalam jangka waktu yang relatif lama.

Allah Subhanahu Wata'ala berfirman dalam Q.S Al-Hujurat [49] ayat 13:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ إِنَّا خَلَقْنَاكُمْ مِنْ ذَكَرٍ وَأُنْثَىٰ وَجَعَلْنَاكُمْ شُعُوبًا وَقَبَائِلَ لِتَعَارَفُوا إِنَّ أَكْرَمَكُمْ عِنْدَ اللَّهِ أَتْقَىٰكُمْ إِنَّ اللَّهَ عَلِيمٌ خَبِيرٌ ﴿١٣﴾

Artinya: “Hai manusia, sesungguhnya Kami menciptakanmu dari seorang laki-laki dan seorang perempuan dan menjadikanmu berbangsa-bangsa dan bersuku-suku supaya kamu saling kenal-mengenal. Sesungguhnya orang yang paling mulia diantara kamu di sisi Allah ialah orang yang paling bertakwa di antara kamu. Sesungguhnya Allah Maha mengetahui lagi Maha mengenal”

Ghoffar & Mu'thi, (2003) menjelaskan bahwa Allah Subhanahu Wata'ala berfirman seraya memberitahukan kepada umat manusia bahwa Dia telah menciptakan mereka dari satu jiwa, dan darinya Dia menciptakan pasangannya, yaitu Adam dan Hawa. Dan selanjutnya Dia menjadikan mereka berbangsa-bangsa. Kata شُعُوبًا berarti berbangsa-bangsa, dan ada juga yang menyatakan bahwa yang dimaksud شُعُوبًا adalah penduduk negeri-negeri lain. Kementrian Agama RI (2016) menjelaskan bahwa ayat tersebut menekankan perlunya saling mengenal antar manusia untuk saling mengambil pelajaran dan pengalaman dari pihak lain. Demikian halnya dengan pengenalan terhadap alam semesta. Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah Subhanahu Wata'ala telah menciptakan manusia

berbangsa-bangsa yang memiliki perbedaan diantara mereka untuk saling mengenal. Allah Subhanahu Wata'ala tidak hanya menciptakan manusia berbangsa-bangsa, tetapi semua makhluk di alam semesta yang Allah Subhanahu Wata'ala ciptakan, salah satunya hewan. Setiap bangsa memiliki perbedaan karakter, baik sifat, bahasa, maupun warna kulit.

Perbedaan warna kulit terjadi karena adanya suatu proses evolusi, proses evolusi pada suatu populasi salah satunya dapat disebabkan adanya suatu barrier (penghalang) yang memisahkan antara populasi satu dengan populasi lainnya. Barrier yang memisahkan populasi Percil Jawa di Jawa Tengah dan Jawa Barat berupa deretan pegunungan dari zona gunungapi kuarter yang terbentang dari Jawa Barat sampai Jawa Timur. Gunungapi yang membatasi Jawa Barat dan Jawa Tengah yaitu Gunung Salak.

Barrier geografi berupa pegunungan dan perubahan lingkungan seperti kerusakan hutan, pencemaran sungai, konvensi lahan, dan perubahan iklim menyebabkan suatu populasi terpisah dan terisolasi di satu lokasi (Setiawan dkk., 2019). Sehingga, tidak ada interaksi antar satu populasi dengan populasi lainnya. Hal tersebut menyebabkan adanya proses spesiasi. Spesiasi merupakan sebuah proses kreatif yang mengarah pada penciptaan keanekaragaman hayati, spesies yang baru terbentuk dapat bertukar gen atau melalui perkawinan alami (*interbreeding*) untuk menghasilkan keturunan yang fertil. Anggota suatu spesies berbagi kumpulan gen yang sama dan aliran gen bebas antar organisme, spesiasi juga merupakan puncak dari proses evolusi (Muzayyinah, 2012).

Populasi *M. achatina* di Jawa Tengah dan Jawa Barat membentuk kelompok monofiletik. Spesies yang ditemukan di Sabah Malaysia, *Chaperina fusca* dan *Kalophrynus heterochirus* membentuk kelompok parafiletik. Kelompok monofiletik merupakan satu set taksa yang diturunkan dari takson tunggal (nenek moyang sama). Kelompok Parafiletik merupakan takson yang tidak memiliki anggota yang berasal dari satu nenek moyang yang sama (Retnowari *et al.*, 2019; Slobodian & Pastana, 2020).

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini yaitu dari hasil analisis filogenetik menggunakan metode *Maximum Parsimony*, *Maximum Likelihood* pada *software* MEGA6 dan metode *Bayesian Inference* pada *software* mrBayes menunjukkan bahwa populasi *M. achatina* yang ditemukan di Jawa Tengah (Ungaran dan Petungkriyono) dan Jawa Barat (Ujung Kulon, Gunung Gede Pangrango dan Gunung Kencana Bandung) diindikasikan sebagai populasi yang berbeda, didukung dengan nilai bootstrap 100 pada ketiga metode dan hasil perhitungan jarak genetik dengan persentase lebih dari 3%. Individu *M. achatina* Gunung Kencana Bandung memiliki kekerabatan lebih dekat dengan populasi di Jawa Tengah, dibuktikan dengan mengelompoknya sekuen *M. achatina* di Gunung Kencana dengan populasi *M. achatina* di Jawa Tengah (Ungaran dan Petungkriyono) dan dengan jarak genetik 1,5%.

5.2 Saran

Beberapa saran untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Menambah sekuen individu dari *Microhyla achatina* pada lokasi yang berbeda, khususnya di Jawa Timur.
2. Analisis filogenetik dari *Microhyla achatina* dengan penanda gen yang lain
3. Analisis morfologi, morfometri dan bioakustik pada populasi di Jawa Tengah dan Jawa Barat

DAFTAR PUSTAKA

- Akhsani, F., Hamidy, A., Farajallah, A., & Smith, E. N. (2017). PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *Phrynella pulchra* Boulenger, 1887 BASED ON 16S rRNA GENE. *Zoo Indonesia*, 26(2), 107–115.
- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. (2020). Pemanfaatan Gen 16S Rrna Sebagai Perangkat Identifikasi Bakteri Untuk Penelitian-Penelitian Di Indonesia. *Pharmacon*, 9(1), 16–22.
- Al-Mahalli, Jalaludin dan Jalaludin As-Suyuthi. 1459. Tafsir Jalalain. Pustaka Nurul Huda. Surabaya. Jilid 1, hal 216
- Al-Mahalli, Jalaludin dan Jalaludin As-Suyuthi. 1459. Tafsir Jalalain. Pustaka Nurul Huda. Surabaya. Jilid 2, hal 294
- Al-Mahalli, Jalaludin dan Jalaludin As-Suyuthi. 1459. Tafsir Jalalain. Pustaka Nurul Huda. Surabaya. Jilid 2, hal 408
- Alamsyah, R. (2020). Biogeografi terumbu karang indonesia. *Jurnal Agrominansia*, 5(1), 37–43.
- Amin, B. (2020). Katak Di Jawa Timur. In E. Setyowati (Ed.), *Akademia Pustaka* (pertama). Akademia Pustaka.
- Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7.
- Aprilia, F. E., Soewondo, A., Widodo, & Toha, A. H. A. (2014). Amplifikasi Gen COI dan 16s rRNA dari Invertebrata Laut Plakobranchus ocellatus. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 2(5), 276–278.
- Arbi, U. Y. (2012). Sejarah Danbukti Evolusi Padagastropoda. *Oseana*, 37(2), 41–51.
- Arbi, U. Y. (2016). Analisis Kladistik Berdasar Karakter Morfologi untuk Studi Filogeni: Contoh Kasus pada Conidae (Gastropoda: Molusca). *Oseana*, 61(3), 1689–1699.
- Arifin, B. (1992). *Terjemah Sunan Abi Daud Jilid 4*. Asy Syifa'. hal: 356-357
- Asy-Syaukani. (2011a). *Tafsir Fathul Qadir Jilid 6*. hal: 261
- Asy-Syaukani. (2011b). *Tafsir Fathul Qadir Jilid 7*. In 7. hal: 916
- Atmaja, V. Y., Hamidy, A., Arisuryanti, T., Matsui, M., & Smith, E. N. (2018). A new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Sumatra, Indonesia. *Treubia*, 45, 25–46.
- Broto, B. W., & Subeno. (2012). Keanekaragaman Jenis Herpetofauna Di Seksi Pengelolaan Taman Nasional (Sptn) I , Alas Purwo , Banyuwangi , Jawa Timur. *Widyariset*, 15(3), 519–526.
- Cahyadi, G., & Arifin, U. (2019). Potential and Challenges on Amphibians and Reptiles Research in West Java. *Jurnal Biodjati*, 4(2), 149–162.
- Cahyandari, R., & Nursolihah, R. (2015). Penerapan Model Markov Tersembunyi untuk Mengetahui Persentase Kecocokan dari Deoxyribonucleic Acid pada Pohon Filogenetik Ursidae (Beruang). *STATISTIKA: Journal of Theoretical Statistics and Its Applications*, 15(2), 73–86.
- Dharmayanti, N. L. . I. (2011). Filogenetika Molekular : Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan sejarah Evolusi. *Filogenetika Molekular : Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*, 21(1), 1–10.
- Eprilurahman, R., Qurniawan, T. F., Kusuma, K. I., & Chomsun, H. K. (2010). Studi Awal Keanekaragaman Herpetofauna di Petungkriyono, Kabupaten

- Pekalongan, Provinsi Jawa Tengah. *Zoo Indonesia*, 19(1), 19–30.
- Ergiana, H., Wiryani, E., & Jumari. (2013). Bryoflora Terrestrial Di Zona Tropik Gunung Ungaran, Jawa Tengah. *Jurnal Biologi*, 2(1), 65–71.
- Fatmarischa, N., Sutopo, & Johari, S. (2014). Jarak Genetik dan Faktor Peubah Pembenda Entok Jantan dan Betina Melalui Pendekatan Analisis Morfometrik. *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 16(1),
- Firdaus, A. S., Rahmawati, A. N., Wardani, E. E., Putri, M. M., & Bagyo, Y. (2016). Diversitas, Pemetaan, dan Persepsi Masyarakat terhadap Herpetofauna Diurnal di Wana Wisata Rowo Bayu, Kabupaten Banyuwangi. *Jurnal Biotropika*, 4(2), 56–61.
- Firdaus, A. S., Ratih, N., Karima, I., Kusuma, A. T., & Suastika, N. M. (2018). Phylogenetic Relationship of Genus *Microhyla* (Amphibia, Anura) in Sunda Shelf Including Sumatera, Java, Borneo, and Peninsular Malaysia as Revealed by 16S rRNA mtDNA Gene Sequences. *BIOINFORMATICS AND BIOMEDICAL RESEARCH JOURNAL*, 1(1), 1–6.
- Garg, S., Suyesh, R., Das, A., Jiang, J., Wijayathilaka, N., Amarasinghe, A. A. T., Alhadi, F., Vineeth, K. K., Aravind, N. A., Senevirathne, G., Meegaskumbura, M., & Biju, S. D. (2019). Systematic revision of *Microhyla* (Microhylidae) frogs of South Asia: A molecular, morphological, and acoustic assessment. *Vertebrate Zoology*, 69(1), 1–71
- Ghoffar, M. A., & Mu'thi, A. (2003a). *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 6* (Pertama). Pustaka Imam Asy-Syafi'i. hal:609
- Ghoffar, M. A., & Mu'thi, A. (2003b). *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 7* (Pertama). Pustaka Imam Asy-Syafi'i. hal:495
- Ginting, T. J. B., Kardhinata, E. H., & Amrul, H. M. Z. N. (2020). Jenis-Jenis Anura di Deleng Ketaruman, Desa Bukum, Kecamatan Sibolangit, Kabupaten Deli Serdang Provinsi Sumatera Utara. *Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA)*, 2(1), 32–38.
- Gupta, A., Bhardwaj, A., Supriya, Sharma, P., Pal, Y., Mamta, & Kumar, S. (2015). Mitochondrial DNA- a Tool for Phylogenetic and Biodiversity Search in Equines. *Journal of Biodiversity & Endangered Species*.
- Hamzah, N. A. (2020). Darurat Membolehkan Yang Dilarang. *Jurnal Pilar: Jurnal Kajian Islam Kontemporer*, 11(2), 27–37.
- Hasan, M., Islam, M. M., Kuramoto, M., Kurabayashi, A., & Sumida, M. (2014). Description of two new species of *microhyla* (anura: Microhylidae) from bangladesh. *Zootaxa*, 3755(5), 401–418.
- Helmita, R., Djuwita, I., Purwantara, B., & Winarto, A. (2015). Pola Distribusi Mitokondria Sel-Sel Trofoblas Hatching Dan Implantasi. *Jurnal Sainstek*, 7(1), 16–25.
- Hidayat, T. (2017). DNA MITOKONDRIA (mtDNA) SEBAGAI SALAH SATU PEMERIKSAAN ALTERNATIF UNTUK IDENTIFIKASI BAYI PADA KASUS INFANTISIDA. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(1), 213.
- Horiike, T. (2016). an Introduction To Molecular Phylogenetic Analysis. *Reviews in Agricultural Science*, 4(0). <https://doi.org/10.7831/ras.4.36>
- Huda, S. A. (2017). Jenis Herpetofauna Di Cagar Alam Dan Taman Wisata Alam Pengandaran Jawa Barat. *Scientiae Educatia*, 6(1), 41.
- Iskandar, D. T. (1998). The Amphibians of Java and Bali. In *Research and Development Center for Biologi - LIPI*

- Juliantari, E., Fitmawati, & Sofianti, N. (2016). Analisis Filogenetik Mangifera odorata Sumatera Tengah dan Kerabatnya Menggunakan Gen rbcL. *Jurnal Riau Biologia*, 1(2), 155–159.
- Kannan, L., & Wheeler, W. C. (2012). Maximum Parsimony on Phylogenetic networks. *Algorithms for Molecular Biology*, 7(1), 9.
- Kartamihardja, E. S. (2014). Prospek Pemanfaatan Sumber Daya Ikan Endemik Di Perairan Umum Daratan Zona Wallacea Dalam Mendukung Pembangunan Ekonomi Masyarakat. *Jurnal Kebijakan Perikanan Indonesia*, 6(1), 43.
- Kasi, P. D., Ariandi, & Tenriawaru, E. P. (2019). Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Sagu dengan Gen 16S rRNA. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera*, 36(1), 35–40
- Khawid, J. R., Wang, S., Shu, G., Xie, F., & Jiang, J. (2018). The mitochondrial genome of the *Microhyla taraiensis* (Anura: Microhylidae) and related phylogenetic analyses. *Conservation Genetics Resources*, 10(3), 441–444.
- Kim, I. H., Park, J., Suk, H. Y., Bae, H. G., Min, M. S., Tsai, T. S., & Park, D. (2018). Phylogenetic relationships of three representative sea krait species (genus *Laticauda*; elapidae; serpentes) based on 13 mitochondrial genes. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 29(5), 772–777
- Kurniati, H. (2013). Vocalizations of *Microhyla achatina* Tschudi, 1838 (Anura: Microhylidae) from the foot hills of Mount Salak, West Java. *Jurnal Biologi Indonesia*, 9(2), 301–310.
- Kurniati, H., Sumadijaya, A., Boonman, A., & Laksono, W. T. (2010). *Ecology, Distribution and Bio-acoustic of Amphibians In Degraded Habitat*. November, 1–22.
- Lestari, D. A., Azrianingsih, R., & Hendrian, H. (2018). Filogenetik Jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan Coding dan Non-coding sekuen DNA. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 3(1), 1.
- Mainaki, R., & Putri, A. E. (2020). Paleogeografi: Perkembangan Keanekaragaman Hayati Dalam Ruang Dan Waktu (Biodiversity In Time And Space). *Jurnal Geografi, Edukasi Dan Lingkungan (JGEL)*, 4(1), 17–24.
- Matsui, M. (2011). Taxonomic revision of one of the old world's smallest frogs, with description. *Zootaxa*, 49(2814), 33–49.
- Mumpuni. (2014). KERAGAMAN AMFIBI DAN CATATAN BARU KATAK DI KAWASAN WISATA GUCI, PROVINSI JAWA TENGAH. *Zoo Indonesia*, 23(1).
- Muzayyinah. (2012). Jejak Evolusi dan Spesiasi Marga Indigofera. *Bioedukasi*, 5(2), 1–12.
- Muzzazinah. (2017). Metode filogenetik pada indigofera. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi*.
- Ngili, Y., M.B.Bolly, H., & Ubyaan, R. (2012). Analisis dna mitokondria manusia melalui karakterisasi heteroplasmia pada daerah pengontrol gen. *Prosiding InSINas*, 168–174.
- Pangestika, Y., Budiharjo, A., & Kusumaningrum, H. P. (2015). Analisis Filogenetik Curcuma Zedoaria (Temu Putih) Berdasarkan Gen Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Akademika Biologi*, 4(4), 8–13.
- Poyarkov, N. A., Vassilieva, A. B., Orlov, N. L., Galoyan, E. A., Dao, T. T. A., Le,

- D. T. T., Kretova, V. D., & Geissler, P. (2014). Taxonomy and distribution of narrow-mouth frogs of the genus *Microhyla* Tschudi, 1838 (Anura: Microhylidae) from vietnam with descriptions of five new species. *Russian Journal of Herpetology*, 21(2), 89–148.
- Pradana, T. G., Hamidy, A., Farajallah, A., & Smith, E. N. (2017). IDENTIFIKASI MOLEKULER *Microhyla* , Tschudi 1838 DARI SUMATRA BERDASARKAN GEN 16S rRNA MITOKONDRIA MOLECULAR IDENTIFICATION ON *Microhyla* , Tschudi 1838 FROM SUMATRA BASED ON 16S rRNA MITOCHONDRIAL GENE. *Zoo Indonesia*, 26(2), 70–90.
- Purnamasari, L., Farajallah, A., & Wowor, D. (2016). Application of DNA BARcode in Determination of Shrimp Species of Fresh Water from the Province of Jambi. *BioCONCETTA*, 2(1), 301–316.
- Qurniawan, T. F., Addien, F. U., Eprilurahman, R., & Mada, U. G. (2012). *Eksplorasi Keanekaragaman Herpetofauna di Kecamatan Girimulyo Kabupaten Kulon Progo Yogyakarta*. 1(2), 78–85.
- Qurniawan, T. F., & Eprilurahman, R. (2012). Keanekaragaman Jenis Herpetofauna di Kawasan Ekowisata Goa Kiskendo, Kulonprogo, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta. *Journal of Biota*, 17(2), 78–84.
- Retnaningati, D. (2017). *Hubungan Filogenetik Intraspesies Cucumis melo L . berdasarkan DNA Barcode Gen matK Intraspesies Phylogenetic Relationship of Cucumis melo L . based on DNA Barcode Gen matK Pendahuluan Salah satu tugas penting dari sistematika*. 2(2), 62–67.
- Retnowari, A., Rugayah, & Joeni S, R. (2019). *Status Keanekaragaman Hayati Indonesia Kekayaan Jenis Tumbuhan dan Jamur Indonesia* (A. Retnowari, Rugayah, J. S. Rahajoe, & D. Arifiani (eds.); pertama). LIPI Press.
- RI, K. A. (2012). Tafsir 'Ilmi HEWAN Dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains. In *awan dan angin dalam perspektif Al-Qur'an dan sains* (Pertama). Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an.
- RI, K. A. (2016). *Tafsir ilmi: penciptaan manusia dalam perspektif Al-Qur'an dan sains* (kedua). Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an.
- Rinanda, T. (2011). Analisis Sekuensing 16S Rrna Di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 11(3), 172–177.
- Rintelen, K. von, Arida, E., & Häuser, C. (2017). A review of biodiversity-related issues and challenges in megadiverse Indonesia and other Southeast Asian countries. *Research Ideas and Outcomes*, 3.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542.
- Saikia, D. P., Kalita, D. J., Borah, P., Sarma, S., Dutta, R., & Rajkhowa, D. (2016). Molecular characterization of the mitochondrial 16S rRNA gene of cattle, buffalo and yak. *Veterinarski Arhiv*, 86(6), 777–785.
- Sardi, M., Erianto, & Siahian, S. (2013). Keanekaragaman Herpetofauna Di Resort Lekawai Kawasan Taman Nasional Bukit Baka Bukit Raya Kabupaten Sintang Kalimantan Barat. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Satiyarti, R. B., Nurmilah, N., & Rosahdi, T. D. (2017). Identifikasi Fragmen Dna Mitokondria Pada Satu Garis Keturunan Ibu Dari Sel Epitel Rongga Mulut

- Dan Sel Folikel Akar Rambut. *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*, 8(1), 13–27.
- Setiawan, W., Prihatini, W., & Wiedarti, S. (2019). KERAGAMAN SPESIES DAN PERSEBARAN FAUNA ANURA DI CAGAR ALAM DAN TAMAN WISATA ALAM TELAGA WARNA. *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar Dan Lingkungan Hidup*, 19(2).
- Slobodian, V., & Pastana, M. N. L. (2020). Monophyletic. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*, January
- Subari, A., Razak, A., & Sumarmin, R. (2021). Phylogenetic Analysis of *Rasbora* spp. Based on the Mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Subeno*. (2018). *Jurnal Ilmu Kehutanan*. *Jurnal Ilmu Kehutanan*, 11(1), 29–42.
- Sunarmi, S. (2014). Melestarikan Keanekaragaman Hayati Melalui Pembelajaran Di Luar Kelas Dan Tugas Yang Menantang. *Jurnal Pendidikan Biologi Universitas Negeri Malang*, 6(1), 117974.
- Suryawan W., I. G. A. (2016). Molecular Phylogenetic Analyze of *Fusarium* from Agarwood and other *Fusarium* with Different Type of Nutrition Based on Gen ITS 1. *Jurnal Sangkareang Mataram*, 2(1).
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729
- Triandiza, T., & Madduppa, H. (2018). Aplikasi Analisa Morfologi dan Dna Barcoding pada Penentuan Jenis Kepiting Porcelain (*Pisidia* sp.) yang Berasal dari Pulau Tunda, Banten. *Jurnal Sumberdaya Akuatik Indopasifik*, 2(November), 81–90.
- Udiarto, B. K., Hidayat, P., Rauf, A., Pudjianto, & Hidayat, S. (2013). Kajian Potensi Predator Coccinellidae untuk Pengendalian Bemisia tabaci (Gennadius) pada Cabai Merah. *Jurnal Hortikultura*, 22(1), 77.
- Van Bemmelen, R. W. (1949). The Geology of Indonesia. General Geology of Indonesia and Adjacent Archipelagoes. In *Government Printing Office, The Hague* (pp. 545–547; 561–562).
- Vassilieva, A. B., Trounov, V. L., Poyarkov, N. A., & Galoyan, E. A. (2017). The phytotelm tadpoles of *Microhyla arboricola* (Anura: Microhylidae) from Vietnam, with comments on reproductive biology and development. *Zootaxa*, 4247(4), 413–428.
- Vences, M., Thomas, M., Meijden, A. Van Der, Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005). Comparative Performance of the 16S rRNA gene in DNA Barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 1–12.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>
- Yanuafeva, M. F., Hariyanto, G., & Utami, J. (2012). *Buku Panduan Lapang Herpetofauna TNAP*.
- Yudha, D. S., Eprilurahman, R., Asti, H. A., Azhar, H., Wisudhaningrum, N., Lestari, P., Markhamah, S., & Sujadi, I. (2019). di Suaka Margasatwa Paliyan , Gunungkidul , Yogyakarta Frog and toad diversity (Amphibia : Anura) in Paliyan Wildlife Sanctuary , Gunungkidul , Yogyakarta. *Jurnal Biologi*

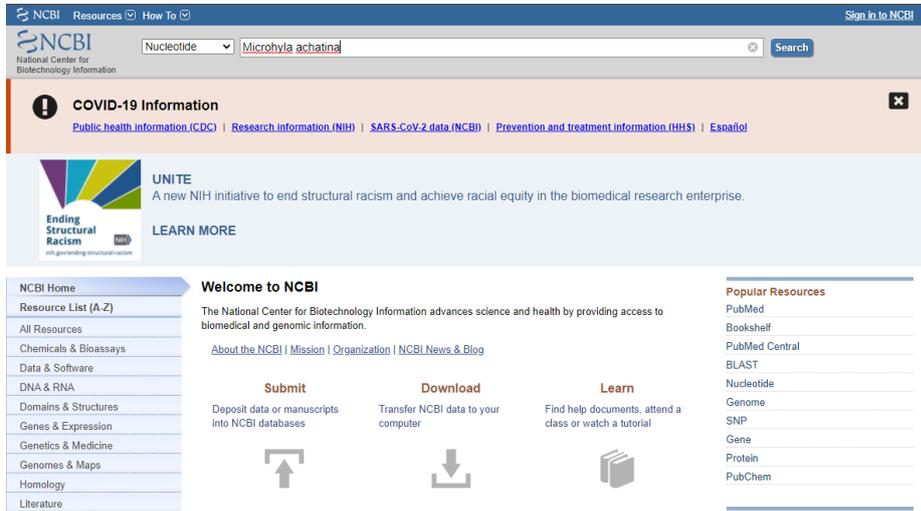
Udayana, 23(2), 59–67.

Yudha, D. S., Eprilurahman, R., Muhtianda, I., Ekarini, D., & Ningsih, O. (2015). KEANEKARAGAMAN SPESIES AMFIBI DAN REPTIL DI KAWASAN SUAKA MARGASATWA SERMODAERAH ISTIMEWA YOGYAKARTA. *Jurnal MIPA*, 38(1), 7–12.

LAMPIRAN

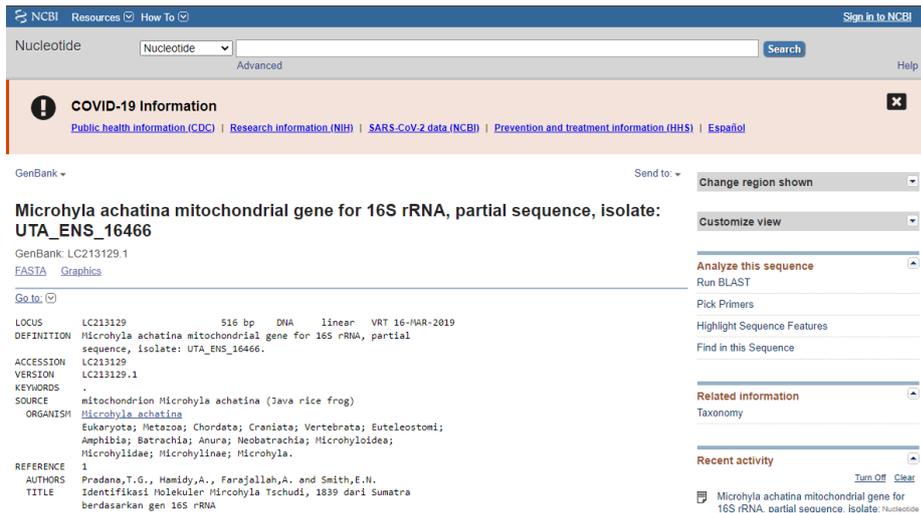
Lampiran 1 Pemilihan dataset sekuen DNA Mitokondria 16S rRNA pada *ingroup* dan *outgroup*

a. Pemilihan data sekuen



The screenshot shows the NCBI homepage. At the top, there is a search bar with a dropdown menu set to 'Nucleotide' and the search term 'Microhylla achatina'. Below the search bar, there is a 'Welcome to NCBI' section with a navigation menu on the left and 'Submit', 'Download', and 'Learn' buttons in the center. On the right, there is a 'Popular Resources' list including PubMed, Bookshelf, and BLAST.

b. Seleksi sekuen dari salah satu data sekuen



The screenshot shows the NCBI GenBank entry for the sequence UTA_ENS_16466. The entry includes the following information:

- GenBank:** LC213129.1
- FASTA** [Graphics](#)
- Go to:** [\(C\)](#)
- LOCUS:** LC213129 516 bp DNA linear VRT 16-MAR-2019
- DEFINITION:** Microhylla achatina mitochondrial gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate: UTA_ENS_16466.
- ACCESSION:** LC213129
- VERSION:** LC213129.1
- KEYWORDS:**
- SOURCE:** mitochondrion Microhylla achatina (Java rice frog)
- ORGANISM:** [Microhylla achatina](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Amphibia; Batrachia; Anura; Neobatrachia; Microhyloidea; Microhyllidae; Microhyllinae; Microhylla.
- REFERENCE:** 1
- AUTHORS:** Pradana, T.G., Hamidy, A., Farajallah, A. and Smith, E.H.
- TITLE:** Identifikasi Molekuler Microhylla Tschudi, 1839 dari Sumatra berdasarkan gen 16S rRNA

On the right side of the entry, there are several interactive options: 'Change region shown', 'Customize view', 'Analyze this sequence' (with sub-options: Run BLAST, Pick Primers, Highlight Sequence Features, Find in this Sequence), 'Related information' (with sub-option: Taxonomy), and 'Recent activity' (with sub-option: Microhylla achatina mitochondrial gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate: Nucleotide).

c. Data sekuen disimpan dalam format fasta

COVID-19 Information
[Public health information \(CDC\)](#) | [Research information \(NIH\)](#) | [SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#) | [Prevention and treatment information \(HHS\)](#) | [Español](#)

FASTA -

Microhylla achatina mitochondrial gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate: UTA_ENS_16466

GenBank: LC213129.1
[GenBank](#) [Graphics](#)

>LC213129.1 Microhylla achatina mitochondrial gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate: UTA_ENS_16466
 TCTGACCGTCAAGAGTACGTAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACAGGGG
 TTATGCTGTCCCTCCGACCATTCAGTGAACCTGATCCCGGTGAAGAAGCGGGGATAAAAATATAAGA
 CGGAGGGCCCATGGAGCTTTAAACTCAGATCACTGACACAAATAAATTAATTCATGCAACC
 CTGATTTCTAGTCTTGGTTGGGTGACCGAGGATAAACTAACTCCACGGCCGAAGGAAATACAA
 CTAACCAAGAGCCACAGCTCTAAGTATTAACAAATTAACAACTGATCCAATTGCTGATCAAGCAAC
 CAAGTACCCG696GATAACAGCGCAATCCATTTCAAGAGCTCATATGCAAAATGGGTTACGACCTCG
 ATGTTGGATCAGGGTATCCCAAGTGGCGACGCCCTACTAACGGTTCGTTGTTCAACGATTAATAACTCTTA
 CGTGATCTGAGTTAGAACCGGAGAAAG

Send to:
 Choose Destination:
 File Clipboard Collections Analysis Tool
 Download 1 item.
 Format: FASTA
 Show GI

Related information:
 Taxonomy

Lampiran 2 Proses alignment

a. seluruh data data sekuen di input, edit – insert sequences from file

MEGA 6.06(6140226) Open

Organize: New folder

Files in 'Sekuen baru':

- LC213129.1_Micr ohyla_achatina_G unung_Kencana_Bandung.fasta
- MK034330.1_Micr ohyla_achatina_G ede_Pangrango.f asta
- MK034331.1_Micr ohyla_achatina_G ede_Pangrango.f asta
- MK034337.1_Micr ohyla_achatina_P etungkr_Kalongan.fas ta
- MK034338.1_Micr ohyla_achatina_P etungkr_Kalongan.fas ta
- MN534563.1_Micr ohyla_achatina_Ujung_Ku
- MN534564.1_Micr ohyla_achatina_Ujung_Ku
- MN534565.1_Micr ohyla_achatina_Ujung_Ku

File name: "12 sekuen ingroup.fasta" "AB598335.1_Microh..." "FASTA (*.fas;*.fst;*.fta;*.fsg;*.fas)"

Buttons: Open, Cancel

b. Sekuen di alignment. Alignment – Align by ClustalW – Oke

MEGA 6.06(6140226) MEGA 6

Align by ClustalW

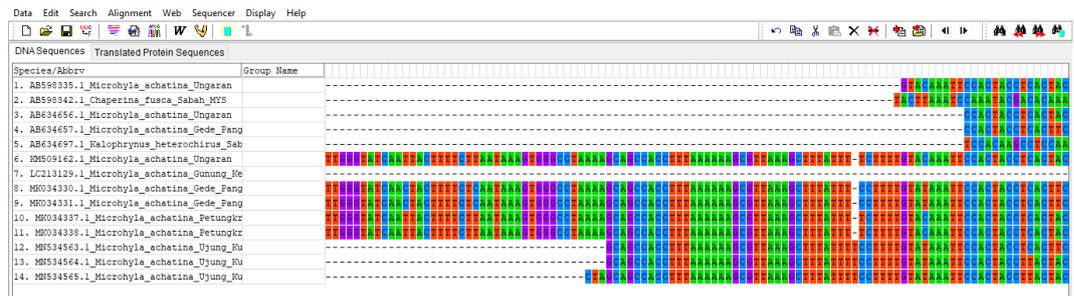
Align by ClustalW (Codons)
 Align by Muscle (Codons)
 Mark/Unmark Site Ctrl+M
 Unmark Marked Sites Ctrl+L
 Unmark All Sites
 Delete Gap-Only Sites
 Auto-Fill Gaps

Species/Abbrev

ID	Sequence
1. AB598335.1_Mi	TGTACAAATTCGACTACCTCAGACGCGGATACCC
2. AB598342.1_Ch	TACTAATTCGAAATAGGCGAAGGCGGCGGCG
3. AB634656.1_Mi	TCCACTACCTCAGACGCGGATACCCGACGCGG
4. AB634657.1_Mi	TCCACTACCTCAGACGCGGATACCCGACGCGG
5. AB634657.1_Mi	CTCCGAAAGGCGCGAAGGCGGATACCCGACGCGG
6. AB634657.1_Mi	GGCAAAAGCTTAAAGGCGGATACCCGACGCGG
7. LC213129.1_Mi	TCTGACCGTCAAGAGTACGTAATCACTTGTCTTT
8. MK034330.1_Mi	TGACCGTCAAGAGTACGTAATCACTTGTCTTT
9. MK034331.1_Mi	TGACCGTCAAGAGTACGTAATCACTTGTCTTT
10. MK034337.1_Mi	TGACCGTCAAGAGTACGTAATCACTTGTCTTT
11. MK034338.1_Mi	TGACCGTCAAGAGTACGTAATCACTTGTCTTT
12. MN534563.1_Mi	AGACGCGGATACCCGAGTGGCGACGCCCTACT
13. MN534564.1_Mi	AGACGCGGATACCCGAGTGGCGACGCCCTACT
14. MN534565.1_Mi	AGACGCGGATACCCGAGTGGCGACGCCCTACT

Site # 867

c. Hapus gap pada awal dan akhir sekuen

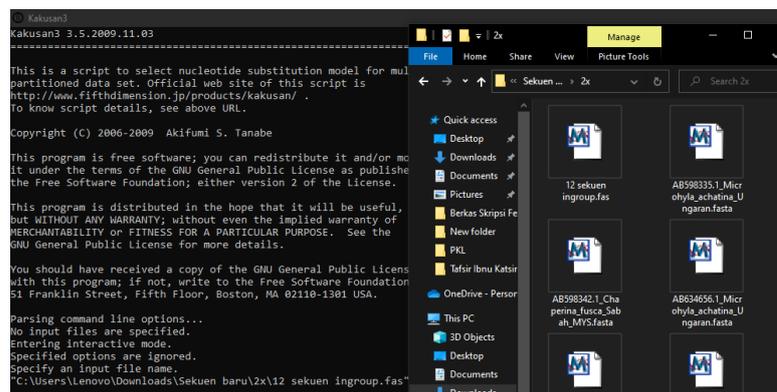


d. Simpan hasil alignment dalam bentuk FASTA



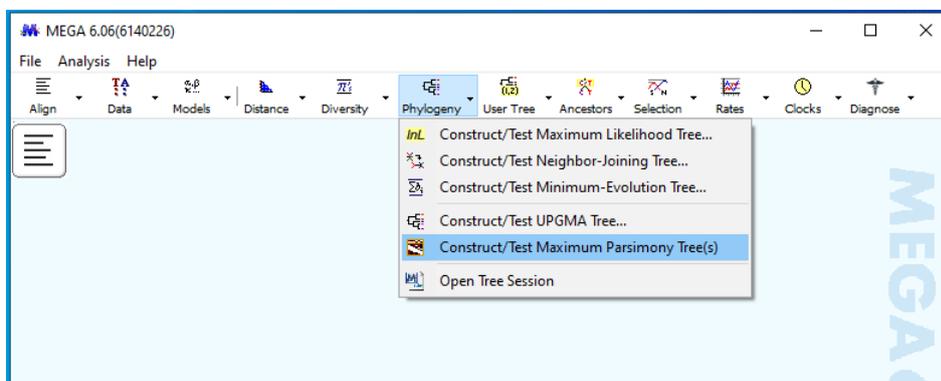
Lampiran 3 Penentuan model evolusi terbaik

a. Input hasil alignment pada *software* Kakusan3 dengan men-drag file kedalam *software*

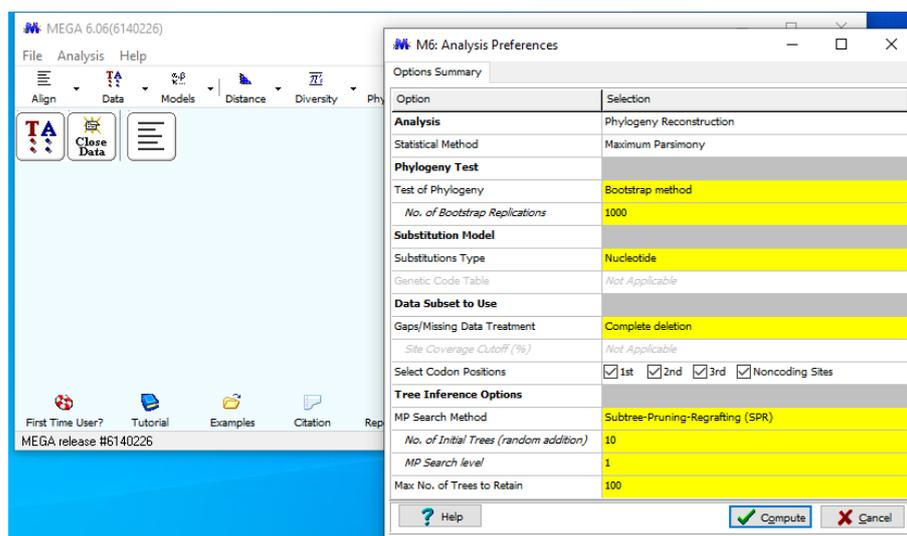


Lampiran 4 Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *Maximum Parsimony*, *Maximum Likelihood* dan *Bayesian Inference*

1. Analisis pohon filogenetik metode MP
 - a. Pilih menu *Phylogeny – Construct/Test Maximum Parsimony Tree* pada MEGA6

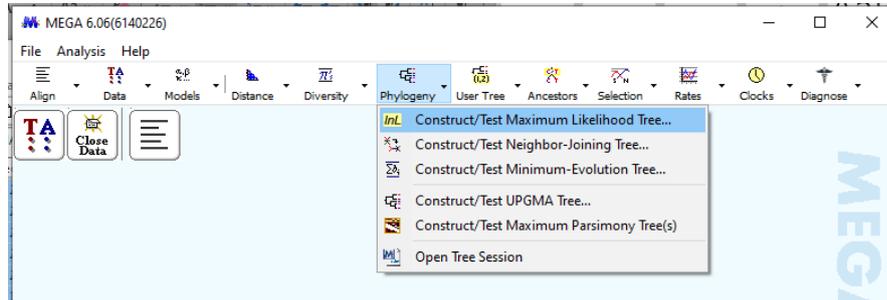


- b. Analisis pohon filogenetik menggunakan *bootstrap 1000 – Compute*

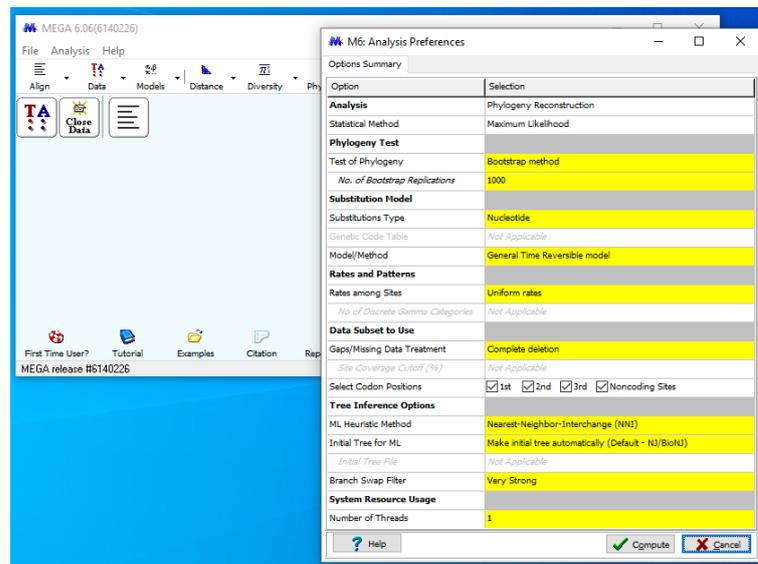


2. Analisis pohon filogenetik metode ML

a. Pilih menu Phylogeny – Construct/Test Maximum Likelihood Tree

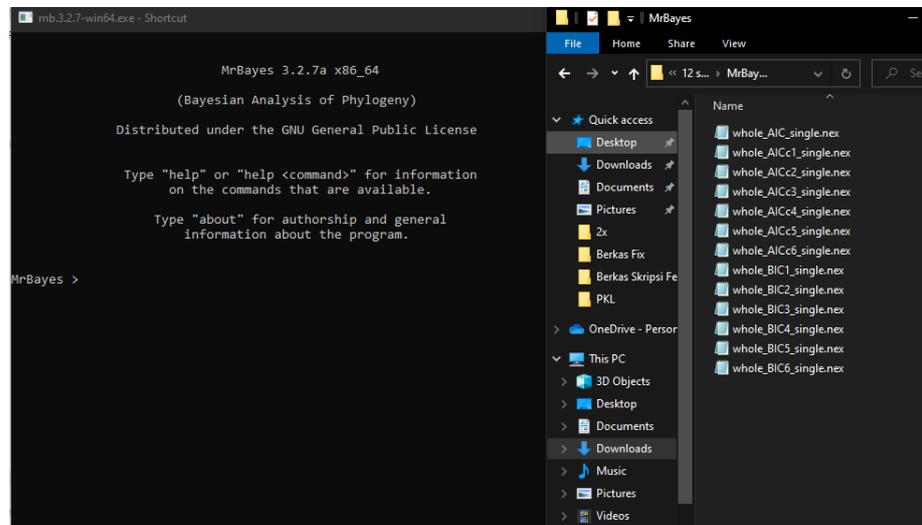


b. Analisis pohon ML menggunakan bootstrap – *Compute*



3. Analisis pohon BI

- Dibuka software MrBayes, input output file berdasarkan penentuan model evolusi Kakusan



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

```

whole_AIC_single.nex - Notepad
File Edit Format View Help
Format DataType=DNA Gap=- Missing=?;
Matrix
AB598335_1_Microhylla_achatina_Ungaran CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCAACCCATTTCAGTGAACCTGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
AB598342_1_Chaperina_fusca_Sabah_MYS CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATGGACACACGAGGGTTACACTGTCTCCCTTTTAATCAGTGAACCTGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
AB634656_1_Microhylla_achatina_Ungaran CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCAACCCATTTCAGTGAACCTGATCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
AB634657_1_Microhylla_achatina_Gede_Pangrango CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
AB634697_1_Kalophrynus_heterochirus_Sabah_MYS CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
KM509162_1_Microhylla_achatina_Ungaran CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
LC213129_1_Microhylla_achatina_Gunung_Kencana_Bandung CTAACCGTCAAAGGTAGC-GTAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
MK034330_1_Microhylla_achatina_Gede_Pangrango CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
MK034331_1_Microhylla_achatina_Gede_Pangrango CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
MK034337_1_Microhylla_achatina_Petungkrilyono_Pekalongan CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
MK034338_1_Microhylla_achatina_Petungkrilyono_Pekalongan CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
MI534563_1_Microhylla_achatina_Ujung_Kulon CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
MI534564_1_Microhylla_achatina_Ujung_Kulon CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
MI534565_1_Microhylla_achatina_Ujung_Kulon CTAACCGTCAAAGGTAGC-GCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCGTGAAGAAGCGGGGATAA
MI534670_1_Microhylla_achatina_Ujung_Kulon CTAACC-----AAATCACTTGAACCCACGACAGCTAGGGTACAACTGGGATTAGGTACCCCACTATGCTTA-GCCGT-----AAATATTTACTTACACCTTAAACGCCCTGGGAATTACGAG
MI534671_1_Microhylla_achatina_Ujung_Kulon CTAACC-----AAATCACTTGAACCCACGACAGCTAGGGTACAACTGGGATTAGGTACCCCACTATGCTTA-GCCGT-----AAATATTTACTTACACCTTAAACGCCCTGGGAATTACGAG
MI534672_1_Microhylla_achatina_Ujung_Kulon CTAACC-----AAATCACTTGAACCCACGACAGCTAGGGTACAACTGGGATTAGGTACCCCACTATGCTTA-GCCGT-----AAATATTTACTTACACCTTAAACGCCCTGGGAATTACGAG
;
End;

Begin MrBayes;
[whole]
[ GTR_Gamma 3.87871e+003 ] LSet ApplyTo=(all) NucModel=4by4 Nst=6 Rates=Gamma NGammaCat=8; PrSet ApplyTo=(all) StateFreqPr=Dirichlet(1,1,1,1);

End;

begin mrbayes;
set autoclose=no;
mcmc ngen=10000000 printfreq=1000 samplefreq=1000
nchain=4 savebrlens=yes filename=M_achatina;
mcmc diagnfreq=1000000;
sumt burnin=2500000;
end;

```

c. Input file pada software MrBayes

```

mb.3.2.7-win64.exe - Shortcut

MrBayes 3.2.7a x86_64
(Bayesian Analysis of Phylogeny)

Distributed under the GNU General Public License

Type "help" or "help <command>" for information
on the commands that are available.

Type "about" for authorship and general
information about the program.

MrBayes > exe "C:\Users\Lenovo\Downloads\Sekuen baru\whole_AIC_single.nex"

```

d. Proses running data

```

mb.3.2.7-win64.exe - Shortcut

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 % EXTBR(Tau,V)
9.43 % NNI(Tau,V)
9.43 % ParsSPR(Tau,V)
37.74 % Multiplier(V)
15.21 % Nodestlider(V)
5.66 % TLMultiplier(V)

Division 1 has 62 unique site patterns
Initializing conditional likelihoods
Using standard non-SSS likelihood calculator for division 1 (single-precision)

Initial log likelihoods and log prior probs for run 1:
Chain 1 -- -1889.464810 -- 48.167179
Chain 2 -- -1839.686346 -- 48.167179
Chain 3 -- -1908.387523 -- 48.167179
Chain 4 -- -1898.527178 -- 48.167179

Initial log likelihoods and log prior probs for run 2:
Chain 1 -- -1923.671463 -- 48.167179
Chain 2 -- -1869.620571 -- 48.167179
Chain 3 -- -1881.312641 -- 48.167179
Chain 4 -- -1898.299498 -- 48.167179

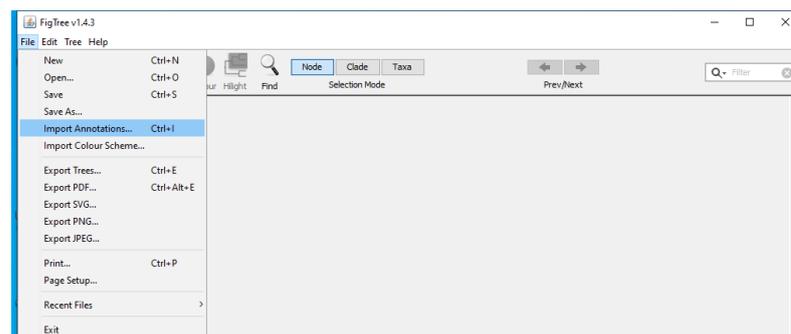
Using a relative burnin of 25.0 % for diagnostics

Chain results (1000000 generations requested):
0 -- [-1889.465] (-1839.686) (-1900.308) (-1898.527) * [-1923.671] (-1869.621) (-1881.313) (-1898.299)
1000 -- [-1328.896] (-1339.074) (-1333.705) [-1322.640] * (-1356.080) (-1335.598) (-1339.716) [-1334.446] -- 2:46:39
2000 -- [-1328.634] (-1333.000) (-1330.909) [-1314.182] * (-1345.237) (-1316.638) (-1311.211) (-1311.450) -- 2:46:38
3000 -- (-1312.836) (-1320.724) (-1317.204) [-1303.150] * (-1315.201) [-1307.598] (-1314.612) (-1321.749) -- 1:51:04
4000 -- [-1316.845] (-1314.133) (-1320.194) [-1311.983] * (-1317.313) [-1303.118] (-1323.918) (-1308.670) -- 2:04:57
5000 -- [-1300.828] (-1320.216) (-1316.457) (-1308.538) * (-1314.474) [-1300.249] (-1331.131) (-1316.066) -- 2:13:16

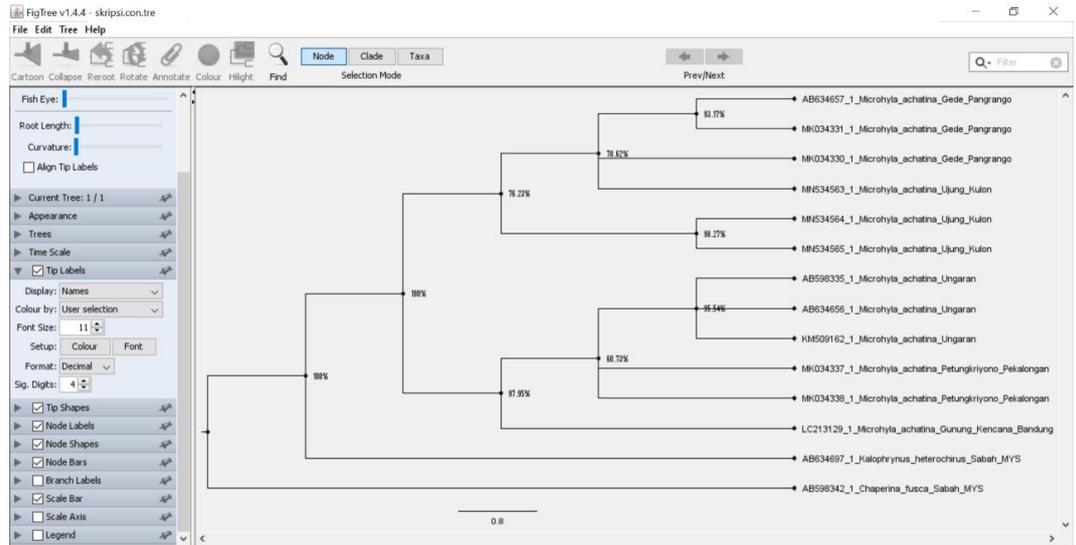
```

Lampiran 5 Rekonstruksi pohon filogenetik

a. Dibuka software Figtree, input file hasil analisis pohon filogenetik

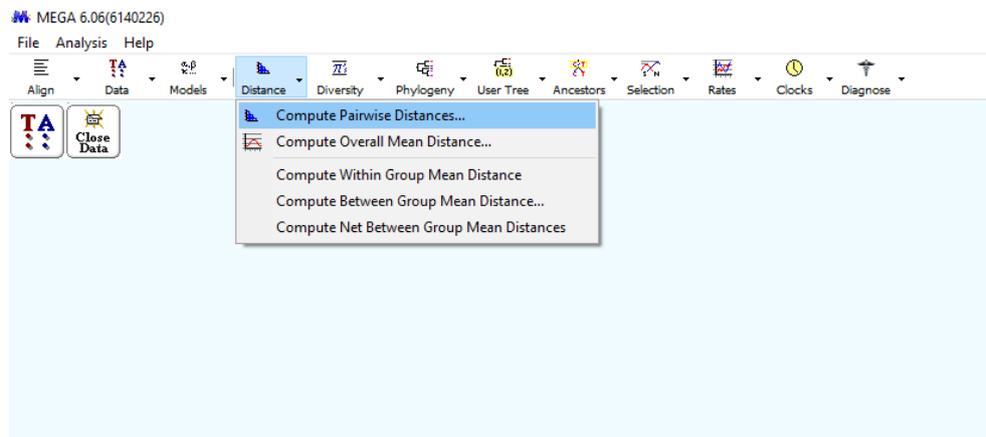


b. Rekonstruksi pohon filogenetik



Lampiran 6 Menghitung Jarak Genetik

a. Dibuka aplikasi MEGA6, pilih menu distances – compute pairwise distances



b. Hasil perhitungan jarak genetik

M6: Pairwise Distances (C:\Users\Lenovo\Downloads\Berkas Fix\sekuen\12 sekuen ingroup.fas)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. AB598335_1_Microhyla_achatina_Ungaran	1													
2. AB598342_1_Chaperina_fusca_Sabah_MYS	0.172	1												
3. AB634656_1_Microhyla_achatina_Ungaran	0.000	0.172	1											
4. AB634657_1_Microhyla_achatina_Gede_Pangrango	0.030	0.177	0.030	1										
5. AB634697_1_Kalophrynus_heterochirus_Sabah_MYS	0.151	0.172	0.151	0.153	1									
6. KM509162_1_Microhyla_achatina_Ungaran	0.000	0.172	0.000	0.030	0.151	1								
7. LC213129_1_Microhyla_achatina_Gunung_Kencana_Bandung	0.015	0.179	0.015	0.037	0.157	0.015	1							
8. MK034330_1_Microhyla_achatina_Gede_Pangrango	0.026	0.175	0.026	0.006	0.147	0.026	0.032	1						
9. MK034331_1_Microhyla_achatina_Gede_Pangrango	0.026	0.172	0.026	0.004	0.149	0.026	0.032	0.002	1					
10. MK034337_1_Microhyla_achatina_Petungkriyono_Pekalongan	0.002	0.172	0.002	0.028	0.151	0.002	0.013	0.024	0.024	1				
11. MK034338_1_Microhyla_achatina_Petungkriyono_Pekalongan	0.002	0.172	0.002	0.028	0.151	0.002	0.013	0.024	0.024	0.000	1			
12. MN534563_1_Microhyla_achatina_Ujung_Kulon	0.026	0.175	0.026	0.006	0.147	0.026	0.032	0.000	0.002	0.024	0.024	1		
13. MN534564_1_Microhyla_achatina_Ujung_Kulon	0.028	0.175	0.028	0.013	0.147	0.028	0.034	0.006	0.009	0.026	0.026	0.006	1	
14. MN534565_1_Microhyla_achatina_Ujung_Kulon	0.028	0.175	0.028	0.013	0.147	0.028	0.034	0.006	0.009	0.026	0.026	0.006	0.000	1