

**FILOGENETIK BUFONIDAE (AMFIBI : ANURA)  
DARI SUMATERA DAN KAWASAN ASIA BERDASARKAN  
GEN SITOKROM b**

Oleh : Silvia Indra

(di bawah bimbingan Djong Hon Tjong dan Dewi Imelda Roesma)

**RINGKASAN**

Bufonidae merupakan salah satu famili dari kelompok Anura yang kosmopolit, terdapat di seluruh daerah, mulai dari beriklim sedang, subtropis dan tropis dengan ketinggian 150-4000 mdpl serta memiliki sekitar 33 genus dan 400 spesies. Distribusi Bufonidae yang terbesar di Indonesia adalah Sumatera yang merupakan bagian dari Asia yang telah mengalami pemisahan. Pemisahan tersebut akibat adanya kenaikan permukaan air laut pada zaman interglasial yang menyebabkan flora dan fauna juga terpisah, sehingga dapat mempengaruhi penyebaran flora dan fauna. Pulau ini memiliki karakteristik yang berbeda dengan pulau lainnya yaitu memiliki pegunungan Bukit Barisan. Akibatnya, ada sungai yang bermuara ke arah barat dan timur yang dapat menjadi barrier bagi amfibi yang ada di Sumatera Barat. Filogenetik merupakan studi mengenai hubungan kekerabatan suatu organisme berdasarkan evolusinya. Salah satu gen yang sering digunakan untuk studi filogenetik pada tingkat spesies adalah gen sitokrom b yang terdapat di dalam genom mitokondria dan diturunkan melalui garis induk (maternal). Penelitian mengenai hubungan filogenetik spesies-spesies dari Bufonidae yang ada di Sumatera dan Asia belum banyak dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan filogenetik Bufonidae di Sumatera Barat dan mengetahui adanya hubungan filogenetik Bufonidae antara Sumatera dengan Asia.

Penelitian ini telah dilakukan dari bulan Maret 2013 sampai Mei 2014. Pengoleksian sampel dilakukan di sembilan daerah di Sumatera Barat yaitu Solok, Payakumbuh, Sijunjung, Malampah, Palupuah Agam, kecuali Rimbopanti, Marapi, Siberut, Padang Panjang. Pengerjaan isolasi dan amplifikasi DNA dilakukan di Laboratorium Genetika dan Sitologi, Jurusan Biologi serta analisis sekuensing DNA dikirim ke Laboratorium MacroGen USA DNA. Pengambilan

sampel dilakukan menggunakan metode eksplorasi dengan teknik *visual night ecounter*. Isolasi DNA berupa jaringan hati di isolasi berdasarkan protocol kit QIAGEN DNAeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue Kit. Amplifikasi DNA berdasarkan protocol PCR GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix dari Promega. Hasil sekuensing DNA dianalisis secara deskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel Bufonidae yang ditemukan di Sumatera Barat terdiri atas enam spesies yaitu *Phrynoidis aspera*, *Phrynoidis juxtasper*, *Ingerophrynus quadriporcatus*, *Duttaphrynus melanostictus*, *Ansonia* sp dan *Leptophryne barbonica* dengan jumlah 14 individu. Hasil elektroforesis isolasi DNA ditunjukkan oleh tampilan pita yang nampak jelas dan terang tanpa adanya *smear*. Amplifikasi gen sitokrom b dengan menggunakan primer 150 Fow dan Rev-1 memperlihatkan ukuran fragmen DNA diperkirakan 700 bp dan hasil sekuensing sebagian gen sitokrom b dari DNA mitokondria diperoleh berukuran sekitar 675 – 764 bp.

Hasil Alignment (penjajaran) sekuen DNA Bufonidae di Sumatera Barat diperoleh jumlah basa nukleotida sebesar 551 bp dengan sebanyak 299 (54,26%) *conserved site*, 252 (45,73%) *variable site*. Rata-rata komposisi basa nukleotida DNA mitokondria yaitu T : 29,7%, C : 30,5%, A : 25,4%, dan G : 14,4%.

Hasil analisis filogenetik memperlihatkan bahwa Bufonidae di Sumatera Barat terpisah menjadi dua klaster utama. Klaster pertama terdiri dari lima subklaster yang meliputi genus *Phrynoidis*, *Leptophryne* dan *Ingerophrynus*. Subklaster pertama yaitu spesies *Phrynoidis aspera* berasal dari Rimbopanti, Palupuh agam, Malampah, Solok dan Sijunjung. Subklaster kedua terdiri dari spesies *Phrynoidis juxtasper* Solok 1 dan Solok 2. Subklaster ketiga yaitu spesies *Leptophryne barbonica* dari Padang Panjang. Subklaster keempat yaitu *Ingerophrynus quadriporcatus* dari Payakumbuh. Subklaster kelima terdiri dari spesies *Duttaphrynus melanostictus* berasal dari Malampah, Merapi dan Siberut. Klaster kedua yaitu *Ansonia* sp. berasal dari Sijunjung. Spesies *P. aspera* terbagi atas dua kelompok yang bersesuaian dengan arah sungai yang mengalir ke arah pantai barat (Rimbopanti, Malampah, Palupuh Agam) dan timur Sumatera (Solok dan Sijunjung) dengan perbedaan sekuen 2,1%-2,9%. Nilai ini mengindikasikan terjadi variasi genetik dan perbedaan pada tingkat populasi pada spesies *P. aspera*

yang berkemungkinan merupakan satu populasi dan telah mendiami pulau Sumatera sebelum pembentukan pegunungan Bukit Barisan selesai. *P. juxtasper* dalam konstruksi pohon filogenetik terpisah dari *P. aspera* dengan perbedaan sekuen sebesar 15,8%-17,1% dan didukung dengan nilai bootstrap 96/81/79/80 (ML/NJ/ME/MP). Spesies *D. melanostictus* dari Malampah, Marapi dan Siberut memiliki perbedaan sekuen sebesar 0,2% dengan nilai bootstrap (100/100/100/100) dan merupakan kelompok monofiletik. *D. melanostictus* merupakan spesies invasif yang mampu beradaptasi dengan perubahan lingkungan.

Hasil alignment sekuen DNA Bufonidae di Sumatera dan sekuen DNA Bufonidae di Asia diperoleh 381 bp, diketahui bahwa 200 bp (52,49%) *conserved site* dan 181 bp (47,50%) *variable site*. Secara keseluruhan sampel Bufonidae di Sumatera dan Asia dapat dibedakan menjadi tiga kluster utama. Kluster pertama terdiri dari spesies *D. melanostictus*, *Bufo japonicas* dan *I. quadriporcatus*. Kluster kedua terdiri dari spesies *L. barbonica*, *P. juxtasper*, *P. aspera*. Kluster ketiga yaitu *Ansonia* sp. Perbedaan sekuen dari dua pengelompokan *D. melanostictus* yaitu 15,7%-18,5% yang didukung dengan bootstrap 96/86/86/77. *D. melanostictus* yang ada di Sumatera lebih dekat dengan India yang memiliki perbedaan sekuen yang rendah yaitu 0,3-0,5% dan merupakan kelompok parafiletik dengan *D. melanostictus* Vietnam, Taiwan dan Cina. *D. melanostictus* merupakan spesies asli dari India. *D. melanostictus* tersebar ke Sumatera diduga melalui kegiatan aktifitas manusia melewati jalur laut dari India. *D. melanostictus* dari Sumatera dan India diduga merupakan spesies yang berbeda dengan *D. melanostictus* Vietnam, *D. melanostictus* Taiwan dan *D. melanostictus* Cina. Spesies *L. barbonica* yang berasal dari Padang Panjang (sebelah timur Bukit Barisan) dan Bengkulu (sebelah barat Bukit Barisan) menunjukkan perbedaan genetik yang tinggi (perbedaan sekuen 26,1%) dan mengarahkan terjadinya proses spesiasi. Adanya barrier berupa pegunungan Bukit Barisan dapat menghalangi migrasi *L. barbonica* antara sebelah barat dan timur Bukit Barisan yang dapat menyebabkan terjadinya hambatan aliran gen pada *L. barbonica* akibat terjadinya isolasi reproduksi.