

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bufoanidae merupakan salah satu famili Amphibia yang tersebar dari India, Indocina sampai ke Indonesia yaitu Sumatra dan Kalimantan. Di Sumatra, spesies Bufoanidae ditemukan pada ketinggian 384-1500 mdpl (Mistar, 2003). Di dunia terdapat 51 genus Bufoanidae (Amphibia Web, 2016), delapan genus diantaranya terdapat di Indonesia, tujuh genus di Sumatra serta enam genus di Sumatra Barat yang diantaranya yaitu genus *Duttaphrynus*, *Ingerophrynus*, dan *Phrynooidis* (Inger and Iskandar, 2005; Kusriani, 2007; Kurniati, 2009; Endri, Nopiansyah, Gusman, 2010; Teynie, 2010; Wanger *et al.*, 2001; Putra, Rizaldi, Tjong, 2012; Wanda, Novarino, Tjong, 2012; Ariza, Dewi, Darmawan, 2014; Novia *et al.*, 2015).

Salah satu spesies dari *Duttaphrynus* adalah *Duttaphrynus melanostictus*. Spesies ini memiliki ciri kepala dengan tulang yang menonjol, moncong pendek dan tumpul, selaput timpanum kecil berukuran kurang dari setengah diameter mata. Selain itu, sebagian jari kakinya dilengkapi selaput web dengan tuberkel tunggal. Bagian atas tubuh hewan ini berwarna coklat dan dilengkapi bintil yang letaknya tak beraturan, sedangkan bagian bawahnya berwarna oranye kecoklatan. Pada hewan jantan dilengkapi pula dengan kantung suara subgular (Boulenger *et al.*, 1890). Genus *Duttaphrynus* sebelumnya termasuk dalam kelompok *Bufo*. Frost *et al.* (2006) menyatakan bahwa genus *Duttaphrynus* hanya terdapat di Asia. Akibatnya genus tersebut dipisahkan dari Bufoanidae pada tahun 2006. Spesies ini endemik di Barat Laut dan selatan China (termasuk Taiwan dan Hainan) serta sepanjang Asia Tenggara, mulai dari utara Pakistan dan Nepal, India, Sri Lanka, Pulau Andaman, Sumatra, Jawa, Borneo, dan Bali.

Genus *Phrynoidis* di Sumatra Barat terdiri dari dua spesies yaitu *Phrynoidis aspera* dan *Phrynoidis juxtaspera*. Keduanya sebelumnya termasuk ke dalam genus *Bufo* sebelum dipisahkan pada 2006 (Frost *et al.*, 2006). Kodok *P. aspera* memiliki kepala yang lebar dan tumpul, tulang yang tidak menonjol, serta selaput timpanum. Pada kodok ini terdapat kalenjar paratoid yang terhubung dengan punggung supraorbital oleh sebuah punggung supratimpanik. Seluruh jari kaki kecuali jari kaki keempat dilengkapi selaput web. Kodok ini biasanya berwarna coklat gelap, abu-abu atau hitam, dengan bintik hitam yang memanjang di bagian perut. Pada hewan jantan terdapat warna kehitaman pada bagian kerongkongan. Kodok jantan dapat mengeluarkan suara serak (*raspy*) yang terkadang berulang untuk memanggil kodok betina dalam jarak jauh sepanjang pinggir sungai pada malam hari, terutama pada bulan penuh (Inger and Bacon, 1968). Spesies ini dapat ditemukan di Indonesia, Malaysia, Thailand, Myanmar, dan Borneo (Iskandar, 1998; Inger, Voris, and Voris, 1974). Spesies ini dilaporkan juga terdapat di Vietnam (Nguyen *et al.*, 2005).

Spesies *P. juxtaspera* tersebar di Sumatra dan Borneo. Namun, keberadaannya di Sumatra tergolong langka dibandingkan di Borneo. Kemungkinan spesies ini juga terdapat di daerah lain diantara kedua wilayah tersebut, terutama pada ketinggian lebih dari 1600 mdpl (Inger and Bacon, 1968). Identifikasi kedua spesies *Phrynoidis* agak sulit dibedakan secara morfologi sehingga membutuhkan studi lebih lanjut.

Identifikasi spesies Bufonidae selain menggunakan karakter morfologi dan biokimia, juga dapat menggunakan karakter molekular. Teknik molekular telah dikembangkan pada penelitian kodok, salah satunya adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan penanda mitokondria (Palo and Merila, 2003). Penanda ini dipilih karena mudah untuk diisolasi serta memiliki struktur genetik yang sederhana yakni tidak memiliki stuktur DNA repetitif, pseudogen dan intron (Cespedes *et al.*,

2000). Selain itu, transmisi genetik pada DNA mitokondria berlangsung secara maternal tanpa rekombinasi genetik (Morin, 2004).

Kombinasi PCR dan sekuensing gen mitokondria merupakan metode yang cukup akurat untuk identifikasi spesies (Vignal *et al.*, 2002). Namun, proses sekuensing relatif mahal dan membutuhkan banyak waktu sehingga dikembangkanlah metode PCR-RFLP (Ota *et al.*, 2009). Metode PCR-RFLP merupakan kombinasi antara RFLP dan PCR. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) merupakan variasi panjang pada molekul DNA yang dipotong oleh enzim restriksi, sedangkan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan metode untuk amplifikasi dan perbanyakan daerah sekuen DNA target. Kombinasi keduanya menghasilkan PCR-RFLP (Butler and Reeder, 2001). Metode PCR-RFLP ini menggunakan hasil PCR untuk mengetahui pola pita spesifik suatu spesies berdasarkan perbedaan ukuran fragmen restriksi (Liu and Cordes, 2004; Ota *et al.*, 2009). Metode ini telah dikembangkan pada berbagai taksa seperti ikan (Teletchea, 2009) dan amfibi yaitu pada famili Bufonidae dan Ranidae (Cunha *et al.*, 2013; Igawa *et al.*, 2015).

Penggunaan metode ini membutuhkan enzim DNA restriksi yang dapat mengenali sekuen spesifik pada DNA mitokondria (Nathans and Smith, 1975) antara lain yaitu sekuen gen 16S rRNA dengan enzim restriksi *HphI* (Igawa *et al.*, 2015) dan *MseI* (*TruII*). Dalam penelitian yang diusulkan ini akan digunakan metode PCR-RFLP untuk mendeteksi variasi tiga jenis kodok (Bufonidae) menggunakan gen 16S rRNA dan dua jenis enzim restriksi.

### 1.1 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang penelitian maka dapat dikemukakan permasalahan yaitu apakah metode PCR-RFLP pada gen 16S rRNA menggunakan enzim restriksi *MseI* dan *HphI* dapat digunakan untuk mendeteksi variasi tiga jenis kodok (Bufonidae).

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah yang telah disebutkan maka tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi variasi tiga jenis kodok (Bufonidae) menggunakan metode PCR-RFLP gen 16S rRNA dan enzim restriksi *MseI* dan *HphI*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai variasi tiga jenis kodok (Bufonidae) menggunakan metode PCR-RFLP gen 16S rRNA dan enzim restriksi *MseI* dan *HphI*.

