

**STUDI FILOGENETIK GENUS *Kalophrynus* DI SUMATERA
BARAT BERDASARKAN GEN 16S rRNA**



**AISYAH FADILLAH PUTRI
NIM/TM. 19032110/2019**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2024**

**STUDI FILOGENETIK GENUS *Kalophrynus* DI SUMATERA
BARAT BERDASARKAN GEN 16S rRNA**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan guna memperoleh gelar
Sarjana Sains*



**Oleh:
AISYAH FADILLAH PUTRI
NIM/TM. 19032110/2019**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2024**

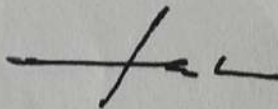
PERSETUJUAN SKRIPSI

STUDI FILOGENETIK GENUS *Kalophrynus* DI SUMATERA BARAT BERDASARKAN GEN 16S rRNA

Nama : Aisyah Fadillah Putri
NIM/TM : 19032110/2019
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

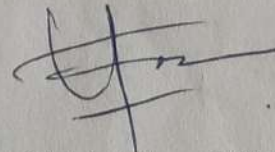
Padang, 15 Februari 2024

Mengetahui:
Kepala Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 197508152006042001

Disetujui Oleh:
Pembimbing



Afifatul Achyar, S.Si, M.Si
NIDN. 0031058406

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

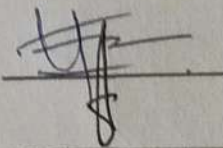
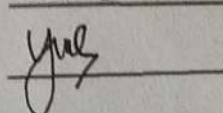
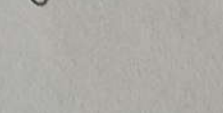
Nama : Aisyah Fadillah Putri
NIM : 19032110
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

STUDI FILOGENETIK GENUS *Kalophrynus* DI SUMATERA BARAT BERDASARKAN GEN 16S rRNA

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, 22 Februari 2024

Tim Penguji

	Nama	Tanda Tangan
1. Ketua	: Afifatul Achyar, S.Si, M.Si	
2. Anggota	: Rijal Satria, Ph.D	
3. Anggota	: Yusni Atifah, S.Si, M.Si	

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Aisyah Fadillah Putri

NIM/TM : 19032110/2019

Program Studi : Biologi

Jurusan : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul "**Studi Filogenetik Genus *Kalophrynus* di Sumatera Barat Berdasarkan Gen 16S rRNA**" adalah benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya, pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

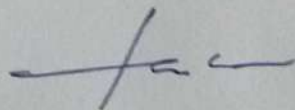
Demikian pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 22 Februari 2024

Mengetahui :

Saya yang menyatakan,

Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed
NIP. 197508152006042001



Aisyah Fadillah Putri
NIM. 19032110

STUDI FILOGENETIK GENUS *Kalophrynus* DI SUMATERA BARAT BERDASARKAN GEN 16S rRNA

Aisyah Fadillah Putri

ABSTRAK

Genus *Kalophrynus* (Anura: *Microhylidae*) telah diperkenalkan dan dideskripsikan. Semua anggota dari genus ini tersebar mulai dari Cina bagian selatan dan timur laut India sampai ke Indo-China dan Indo-Malaya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari spesies *Kalophrynus* di Sumatera Barat dengan menggunakan gen 16S rRNA.

DNA diambil dari jaringan hati spesimen *Kalophrynus* di ekstraksi menggunakan KIT Qiagen DNeasy Blood & tissue dan gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan pasangan primer 16Sc-L(5'GTRGGCCTA AAAGCAGCCAC-3') dan 16Sd-H(5'CTCCGGTCTGAACTCAGATGACGT AG -3'). Hasil sekuens dianalisis menggunakan DNA *Baser Assembler*. Identifikasi sekuens dilakukan dengan metode BLAST (*Basic Local Alignment Tools*). Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan MEGA 11, dengan metode *Maximum Likelihood*. Untuk analisis jarak genetik setiap sekuens dilakukan menggunakan metode *pairwisedistance*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Kalophrynus* yang dikoleksi langsung dari Lembah Anai, Sumatera Barat (UNP 214, 215 dan 240) memiliki kekerabatan yang dekat dengan *K. meizon* dengan nilai jarak genetik 53,1%, 54,1% dan 54,2% .

Kata Kunci: Filogenetik, *Kalophrynus*, Gen 16S rRNA

PHYLOGENETIC STUDY OF THE GENUS *Kalophrynus* IN WEST SUMATRA BASED ON THE 16S rRNA GENE

Aisyah Fadillah Putri

ABSTRACT

The genus *Kalophrynus* (Anura: Microhylidae) has been introduced and described. All members of this genus are distributed from southern China and northeastern India to Indo-China and Indo-Malaya. This study aims to determine the kinship of *Kalophrynus* species in West Sumatra using the 16S rRNA gene.

DNA was extracted from liver tissue of *Kalophrynus* specimens using Qiagen DNeasy Blood & tissue KIT and the 16S rRNA gene was amplified using primer pairs 16Sc-L (5'GTRGGCCTA AAAGCAGCCAC-3') and 16Sd-H (5'CTCCGGTCTGAACTCAGATGACGT AG -3'). Sequence results were analyzed using the DNA Baser Assembler. Sequence identification was performed using the BLAST (Basic Local Alignment Tools) method. Phylogenetic analysis was performed using MEGA 11, with the Maximum Likelihood method. For genetic distance analysis of each sequence was carried out using the pairwise distance method.

The results showed that *Kalophrynus* collected directly from Lembah Anai, West Sumatra (UNP 214, 215 and 240) had a close relationship with *K. meizon* with genetic distance values of 53.1%, 54.1% and 54.2%.

Keywords: Phylogenetics, *Kalophrynus*, 16S rRNA Gene

KATA PENGANTAR



Puji dan syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Studi Filogenetik Genus *Kalophrynus* di Sumatera Barat Berdasarkan Gen 16S rRNA”. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Keberhasilan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Afifatul Achyar, M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing dalam melaksanakan penelitian dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi.
2. Bapak Rijal Satria, Ph.D dan Ibu Yusni Atifah M.Si. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran dan kritikan untuk kesempurnaan penulisan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Irdawati, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan mengarahkan penulis hingga sampai saat ini.
4. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, M. Biomed. selaku Kepala Departemen Biologi dan Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Padang.

5. Bapak dan Ibu Staf Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang yang telah membantu untuk kelancaran penulisan skripsi ini.
6. Ibu dan Ayah (Alm) serta keluarga besar yang senantiasa memberikan doa, dukungan dan motivasi dalam penulisan skripsi ini.
7. Teman-teman bimbingan Pak Bos Generasi Ke-3, kepada Shinta Triana Putri, Ferix Riskierdi, Imam Wahyudi, Rafazen Sumbari, Reza Sapitri, Wulan dan Yogi Saputra, terima kasih telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk berproses bersama.
8. Kepada Sahabat saya Mutiara Anati, Salsabilla Tamara dan Nurdian Rahman terima kasih atas support selama menjalankan penelitian sampai tersusunnya skripsi ini.
9. Kepada Teman seperjuangan saya Rifani dan Talia Oktarina terimakasih telah menemani saya selama berproses, terima kasih telah melengkapi pengalaman dalam memperoleh gelar S.Si.
10. Kepada Bayu atas dukungannya dan terima kasih telah melengkapi pengalaman dalam memperoleh gelar S.Si.
11. Kepada teman-teman Angkatan 2019 dan semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

Semoga bantuan yang telah Bapak/Ibu serta rekan-rekan berikan menjadi amal ibadah dan mendapat imbalan yang setimpal dari Allah SWT. Penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan

dari kritik dan saran yang bersifat membangun, untuk menyempurnakan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi semua orang yang membacanya.

Padang, 16 Februari 2024

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. <i>Kalophrynus</i> di Sumatera.....	5
B. Analisis Filogenetik	8
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	13
A. Jenis Penelitian.....	13
B. Waktu dan Tempat Penelitian	13
C. Alat dan Bahan.....	13
D. Prosedur Penelitian.....	16
E. Analisis Data	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
A. Hasil Penelitian	22
B. Pembahasan.....	25
BAB V PENUTUP	30
A. Kesimpulan	30
B. Saran.....	30

DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Spesies <i>Kalophrynus</i> yang dikoleksi langsung	14
2. Spesies pembanding dengan nomor aseksi dari NCBI	15
3. Komposisi reaksi PCR	18
4. Hasil Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA	22
5. Hasil perhitungan jarak genetik <i>p-distance</i>	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Kalophrynus pleurostigma</i> Tschudi	5
2. <i>Kalophrynus minusculus</i> Iskandar	6
3. Hasil Amplifikasi PCR sampel DNA <i>Kalophrynus</i>	23
4. Hubungan Filogenetik genus <i>Kalophrynus</i> berdasarkan gen 16S rRNA dengan menggunakan kontruksi maximum likelihood.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kegiatan Herping	37
2. Contoh elektroforegram dari hasil sekuensing sebagian fragmen DNA salah satu spesies <i>Kalophrynus</i> di Sumatera Barat.....	37
3. Hasil BLAST dari GenBank	38
4. Proses Alignment	39
5. Analisis Filogenetik menggunakan Mega 11 dengan konstruksi <i>Maximum Likelihood</i>	40

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sumatera Barat merupakan salah satu bagian dari pulau Sumatera yang memiliki kondisi geografis yang bervariasi. Berdasarkan letak geografisnya, Sumatera terdiri dari dua bagian yaitu wilayah dataran tinggi dan wilayah dataran rendah. Dataran tinggi terdiri dari pegunungan dan lembah–lembah yang merupakan bagian dari gugusan Bukit Barisan yang membelah pulau Sumatera. Pegunungan Bukit Barisan menyebabkan terpisahnya antara sungai barat dan timur serta perbukitan yang dapat memunculkan variasi morfologi pada organisme yang ada di Sumatera Barat (Inger dan Voris, 2001). Salah satu contoh jenis yang dideskripsikan berdasarkan spesimen tipe yang berasal dari Sumatera Barat yaitu dari Genus *Kalophrynus*.

Genus *Kalophrynus* (Anura: Microhylidae) telah diperkenalkan dan dideskripsikan. Genus ini terdiri dari 27 spesies yang valid. Pusat keanekaragaman dari genus *Kalophrynus* sebagian besar terletak di Kalimantan dan pulau sekitarnya. Sepuluh spesies dari genus ini merupakan endemik dari daerah tersebut. Semua anggota dari genus ini tersebar mulai dari Cina bagian selatan dan timur laut India sampai ke Indo-China dan Indo-Malaya (Frost, 1985). Akibat penyebaran yang cukup luas tersebut besar kemungkinan telah terjadi variasi dan diferensiasi morfometri pada masing-masing populasi tersebut (Mistar, 2003).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Teynie *et al.*, (2010) menemukan tiga spesies yaitu: *K. pleurostigma*, *K. minisculus*, dan *K. punctatus*. Sedangkan menurut (Frost, 2021) terdapat dua spesies yang menghuni pulau Sumatera yaitu *K. pleurostigma* dan *K. minisculus*. Matsui *et al.*, (2017) menemukan spesies baru pada wilayah Semenanjung Malaysia dan menamainya sebagai *Kalophrynus kiewi*.

Hubungan taksonomi *K. pleurostigma* dari semenanjung dan wilayah lain telah dipertanyakan berdasarkan molekuler dan morfologi (Matsui *et al.*, 2011, 2012; Chan *et al.*, 2011). Dalam studi molekuler famlili Microhylidae Asia Tenggara, Matsui *et al.*, (2011) mencatat bahwa *K. pleurostigma* dari bagian selatan Semenanjung Malaya tidak hanya secara genetik tetapi juga secara morfologi dan akustik sangat berbeda dari populasi di luar semenanjung dan menyarankan status heterospesifik mereka. Selanjutnya, Matsui *et al.*, (2012) mendeskripsikan populasi di semenanjung malaysia bagian selatan sebagai oleh *K. limbooliati*, yang jelas berbeda dengan populasi yang lebih ke utara yaitu *K. pleurostigma*. Matsui *et al.*, (2012) menyatakan bahwa *K. limbooliati* tidak spesifik dengan topotipe *K. pleurostigma* dari Sumatra.

Filogenetik merupakan studi yang mempelajari hubungan antar spesies berdasarkan hubungan kekerabatan, penelusuran hubungan evolusi dan sejarah kehidupan suatu spesies (Brown, 2002). Filogenetik mampu menjelaskan hubungan antara spesies dengan moyang terakhir yang paling dekat dengan spesies yang dibandingkan sehingga dapat diketahui kedekatan

suatu spesies dengan spesies lainnya (Baldauf, 2003). Studi filogenetik bertujuan untuk mempelajari hubungan kekerabatan antara organisme (Law and Sarkar, 1999). Studi filogenetik dapat dilakukan secara molekuler.

Rekonstruksi filogenetik menggunakan penanda 16S rRNA pada amfibi sebelumnya telah dilakukan dengan membandingkan antar jenis pada masing-masing ordo amfibi (Vences *et al.*, 2005). Penelitian ini akan mengungkapkan hubungan filogenetik *Kalophrynus* dari seluruh wilayah Sumatra menggunakan gen 16S rRNA. 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 *et al.*, 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 sequencing (Rinanda, 2011).

Identifikasi secara molekuler melalui studi filogenetik dapat digunakan untuk mengetahui kekerabatan antar spesies *Kalophrynus* yang di koleksi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai filogenetik dari genus *Kalophrynus* yang ada di Sumatera Barat.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan di atas, rumusan masalah pada penelitian ini, yaitu bagaimana hubungan kekerabatan dari spesies *Kalophrynus* di Sumatera Barat dengan menggunakan gen 16S rRNA?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari spesies *Kalophrynus* di Sumatera Barat dengan menggunakan gen 16S rRNA.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, diantaranya:

1. Mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies dalam genus *Kalophrynus*;
2. Dapat dijadikan acuan untuk pengembangan penelitian pada bidang studi filogenetik;
3. Hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai referensi ilmiah bagi peneliti selanjutnya atau menjadi dasar acuan bagi penelitian yang lebih mendalam berkenaan dengan studi filogenetik dari genus *Kalophrynus*;
4. Menambah pengetahuan mengenai studi filogenetik.