

Identifikasi Spesies Katak *Hylarana* sp. dari Pulau Bangka Menggunakan Penanda Gen 16s rRNA

Wahyu Prihatini^{1*}, Siwi Saputri¹, Rouland Ibnu Darda¹

Program Studi Biologi FMIPA Universitas Pakuan.
Jl. Pakuan No.1. Bogor 16143. Telp/fax: (0251) 8375547.
*Penulis korespondensi: wahyu.prihatini@unpak.ac.id

ABSTRAK

Katak *Hylarana chalconota* tersebar luas di Indonesia, populasinya melimpah, dan memiliki keragaman morfologi tinggi, yang sering menimbulkan kerancuan klasifikasinya. *H. chalconota* merupakan suatu *cryptic species*, yaitu dua atau lebih spesies berbeda yang diklasifikasikan sebagai spesies tunggal karena kemiripan morfologinya. Studi terdahulu dengan menggunakan penanda gen 16S rRNA pada DNA mitokondria dan karakter morfologi, memastikan populasi *H. chalconota* di Indonesia merupakan beberapa spesies berbeda. Populasi di Kalimantan adalah spesies *H. megalonesa* dan *H. raniceps*, di Sulawesi yaitu *H. mocquardii*, di Sumatera adalah *H. parvaccola*, dan *H. rufipes*, sedangkan populasi di Jawa adalah *H. chalconota*. Penelitian ini dilakukan untuk memastikan identitas spesimen katak *Hylarana* sp. dari Pulau Bangka, dengan menggunakan penanda gen 16S rRNA. Pengambilan sampel katak dari hutan Nyato dusun Payak, P. Bangka menggunakan metode *Visual Encounter Survey*, dan sumber DNA diambil dari otot paha. Analisis molekuler dilakukan melalui tahapan ekstraksi DNA dengan metode fenol-kloroform, uji kualitas DNA secara elektroforesis, uji kuantitas DNA dengan spektrofotometer, amplifikasi gen target secara PCR menggunakan primer F-16SRanaIII (GAGTTATTCAAATTAGGACAGC) dan R-16SRanaIII (ATAAGGGTGTTAGCCCATTTG), sekuensing gen target, dan rekonstruksi filogenetik dengan metode *Neighbour Joining*. Hasil PCR menunjukkan gen target berhasil teramplifikasi, dan disekuensing dengan ukuran 289 bp. Hasil analisis BLAST memastikan spesimen *Hylarana* sp. dari Pulau Bangka adalah spesies *Hylarana chalconota*, dan hasil rekonstruksi filogeni menunjukkan spesimen berkerabat dekat dengan *Hylarana chalconota* populasi Jawa.

Kata kunci: *Cryptic species*, DNA mitokondria, filogenetik, *Hylarana chalconota*.

ABSTRACT

Hylarana chalconota frogs is an cryptic species that have abundant, and widespread population in Indonesia. Cryptic species are two or more different species that classified as a single species due to their morphological similarities. High morphological variations of this species often lead to false classification. Previous study reported that *H. chalconota* in Indonesia consist of several different species, based on the 16S rRNA gene of mitochondrial DNA. The Borneo population were the *H. megalonesa* and *H. raniceps*, the Sulawesi population was *H. mocquardii*, the Sumatra population were *H. parvaccola*, and *H. rufipes*, while the Java population was *H. chalconota*. This investigation aimed to confirm the identity of *Hylarana* sp. specimen from Bangka Island, using the 16S rRNA gene. Frogs samples from Nyato forest Bangka island had taken using the Visual Encounter Survey method, and DNA source taken from femur muscles. The DNA extraction was use phenol-chloroform method, followed by DNA quality assay by electrophoresis, and DNA quantity assay by spectrophotometer. The amplification of 16S rRNA target gene was use the primer F-16SRanaIII (GAGTTATTCAAATTAGGACAGC) and R-16SRanaIII (ATAAGGGTGTTAGCCCATTTG), followed by sequencing, and phylogeny reconstruction with Neighbour Joining method. The study results showed that the target gene successfully amplified, and had sequenced 289 bp size. The *Hylarana* sp. sample from Bangka Island was confirmed as *Hylarana chalconota*. The phylogeny reconstruction stated that the specimen from Bangka Island had closer relationship with *Hylarana chalconota* from Java.

Key words: *Cryptic species*, *Hylarana chalconota*, mitochondrial DNA, phylogeny.

PENDAHULUAN

Katak *Hylaran chalconota* adalah katak dataran Sunda yang berkembangbiak di sepanjang aliran sungai pada berbagai hutan dataran rendah, dari hutan hujan primer, hutan hujan sekunder sampai hutan rawa. *Hylarana chalconota* merupakan suatu *cryptic species* kompleks (Stuart *et al.*, 2006), yang memiliki populasi melimpah, dan tersebar luas di Indonesia. Suatu *cryptic species* adalah dua atau lebih spesies berbeda yang diklasifikasikan sebagai spesies tunggal, karena kemiripan morfologinya (Toha, 2014). Pendekatan molekuler dalam studi taksonomi Amfibi terbukti efektif mengungkapkan identitas suatu spesies, yang secara morfologi sulit dibedakan (Stuart *et al.*, 2006).

Studi terdahulu menggunakan karakter morfologi, dan penanda gen 16S rRNA, menyebutkan bahwa *H. chalconota* merupakan beberapa spesies berbeda. Populasi yang hidup di Kalimantan adalah spesies *H. megalonesa* dan *H. raniceps*, di Sulawesi merupakan *H. mocquardii*, di Sumatera merupakan *H. parvaccola*, dan *H. rufipes*, sedangkan yang hidup di Jawa adalah *H. chalconota* (Inger *et al.*, 2009).

Katak *H. chalconota* di Pulau Bangka menunjukkan keragaman morfologi tinggi, diduga sebagai hasil adaptasi terhadap kondisi geografis setempat. Pada awal sejarah geologinya, Pulau Bangka menyatu dengan Pulau Sumatera, Jawa, Kalimantan, dan daratan Asia (Lakip Babel, 2013). Isolasi geografis yang terbentuk kemudian, diduga memengaruhi distribusi satwa ini, dan variasi intra spesies yang dapat menyebabkan kerancuan dalam taksonominya (Bultin *et al.*, 2009).

Analisis kekerabatan menggunakan penanda gen dari DNA mitokondria (mtDNA), seperti sitokrom, dan 16S rRNA banyak dilakukan, karena pewarisan mtDNA bersifat maternal (Tjandra, 2011). Penggunaan gen 16S rRNA telah terbukti merupakan penanda yang sangat bermanfaat untuk penyelesaian masalah taksonomi pada amfibia. Gen 16S rRNA

memiliki sekuen konservatif dengan laju evolusi rendah, sehingga dapat melacak keragaman organisme, dan menelusuri kekerabatan pada kategori famili dan genus (Hasan *et al.*, 2014; Richard, 2013; Xia *et al.*, 2011). Adanya mutasi pada beberapa daerah gen 16S rRNA dapat menunjukkan variasi yang membedakan spesies (Rinanda, 2011). Penggunaan gen ini telah berhasil menunjukkan hubungan kekerabatan, antara lain pada kadal, ikan, dan timun laut (Hadipranta *et al.*, 2015; Tjong *et al.*, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk memastikan identitas spesies dan hubungan kekerabatan sampel katak *Hylarana* sp. dari Pulau Bangka dengan *cryptic species Hylarana chalconota*, berdasarkan gen 16S rRNA.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan dan penanganan sampel

Penelitian berlangsung pada bulan Maret-Mei 2017. Sampel katak diambil dari kawasan hutan Nyato, Pulau Bangka dengan metode VES (Kusrini, 2008). Analisis molekuler bekerjasama dengan Laboratorium Genetika Molekuler Ternak, Fakultas Peternakan IPB.

Ekstraksi, Uji Kualitas, dan Kuantitas DNA

Ekstraksi DNA dari 30 mg otot paha menggunakan metode fenol-kloroform. Uji kuantitas isolat DNA menggunakan UV spektrofotometer Nano Drop, pada panjang gelombang 260 dan 280 nm, sementara uji kualitas DNA menggunakan metode elektroforesis (Sulandari dan Zein, 2003). Setelah didapatkan DNA dengan konsentrasi tinggi dan tidak terkontaminasi RNA ataupun protein, langkah selanjutnya adalah amplifikasi gen target 16S rRNA menggunakan primer acuan.

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer F-16SRanaIII (5'-GAG TTA-TTC AAA TTA GGC ACA GC-3') dan R-16SRanaIII (5'-ATA AGG GTG TTA GCC

CATT TG-3') (Stuart *et al.*, 2006). Total pereaksi PCR sebanyak 30 µl/sampel, dengan komposisi yaitu 3 µl buffer PCR, 0.6 µl dNTP, 4 µl MgCl₂, 1 µl primer L-16SRanaIII, 1 µl primer H-16SRanaIII, 0.5 µl BSA, 0.2 µl Taq Native, 1 µl DNA sampel, dan 18.7 µl H₂O. Amplifikasi dilakukan 35 siklus dengan kondisi pre denaturasi 94°C (5 menit), denaturasi 94°C (30 detik), *annealing* 55°C (30 detik), pemanjangan primer 72°C (1 menit 30 detik), dan pemanjangan akhir 72°C (10 menit) (Sulandari & Zein, 2003).

Sekuensing dan Rekonstruksi Filogenetik

Tahap sekuensing gen target dilakukan di First BASE Laboratories Axil Scientific, Singapura. Hasil sekuensing gen target disejajarkan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Analisis BLAST bertujuan untuk mengetahui kecocokan gen target dengan *Query* yang diperoleh dari GenBank.

Sekuen sampel *Hylarana* sp. dari Pulau Bangka disejajarkan dengan spesies satu genus dari GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) pada MEGA 6. Rekonstruksi filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining*. Evaluasi pohon filogeni menggunakan analisis *bootstrap* sebanyak 1000 kali pengulangan. Perhitungan nilai similaritas yaitu: Persentase similaritas = (1-jarak genetik) x 100% (Sianturi, 2015).

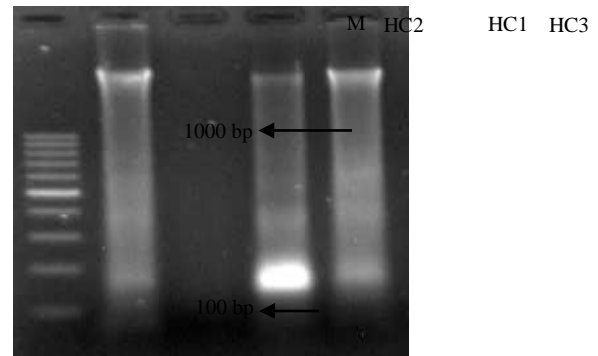
HASIL

Kuantitas dan kualitas isolat DNA sampel

Hasil uji kuantitas isolat DNA sampel katak *Hylarana* sp. dari Pulau Bangka ditampilkan pada Tabel 1, sedangkan hasil uji kualitas DNA tersaji pada Gambar 1. Pita DNA sampel HC1 tampak sangat tipis, sementara pita DNA HC2, dan HC3 terlihat tebal.

Tabel 1. Kuantitas Isolat DNA *Hylarana* sp. Dari Pulau Bangka

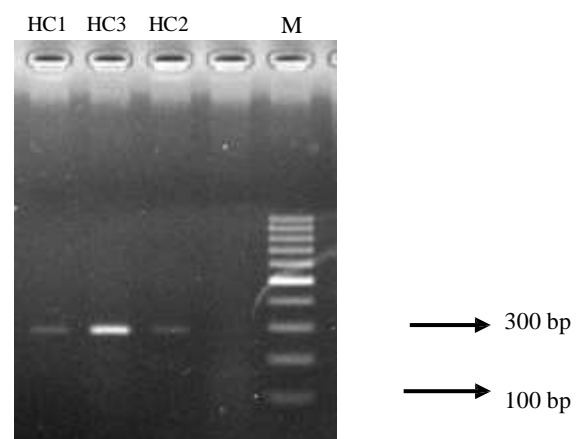
No	Sampel	Kemurnia	Konsentrasi (ng/µl)
1	HC1	1,65	54,5
2	HC2	1,95	304,6
3	HC3	1,92	308,2



Gambar 1. Visualisasi Pita DNA Sampel Hasil Ekstraksi

Kualitas hasil amplifikasi gen target

Visualisasi hasil amplifikasi PCR gen 16S rRNA dari sampel HC1 dan HC2 terlihat berupa pita tipis, sedangkan sampel HC3 berupa pita yang terang dan jelas. Tahap amplifikasi menghasilkan fragmen gen 16S rRNA berukuran sekitar 300 bp (Gambar 2). Untuk tahap analisis selanjutnya, digunakan sampel HC3 ini.

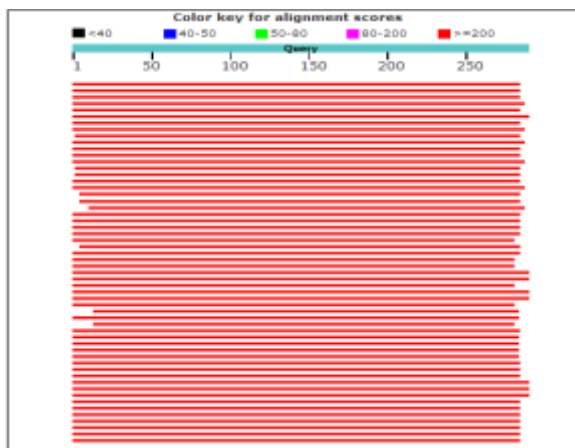


Gambar 2. Hasil Amplifikasi Gen16S rRNA

Hasil rekonstruksi filogenetik *Hylarana*

Hasil analisis BLAST sekuen HC3 menunjukkan tingkat homologi sangat tinggi dengan sekuen *Hylarana* GenBank, berdasarkan

color key yang dihasilkan (Gambar 3). Garis-garis merah pada *color key* menunjukkan tingkat homologi sangat tinggi (≥ 200 nukleotida), garis merah muda menunjukkan homologi tinggi (80-200 nukleotida), garis hijau mengindikasikan homologi sedang (50-80 nukleotida), garis biru menunjukkan homologi rendah (40-50 nukleotida), sedangkan garis hitam mengindikasikan tingkat homologi sangat rendah (<40 nukleotida) (NCBI, 2017).



Gambar 3. *Color Key* Hasil BLAST Sampel HC3 Dengan *Hylarana* GenBank

Hasil analisis BLAST sekuen sampel HC3 menunjukkan homologi tinggi dengan tiga spesies *Hylarana* GenBank, yaitu *H. chalconota*, *H. raniceps*, serta *H. raniceps*, namun tingkat homologi tertinggi adalah dengan *H. chalconota* (Tabel 2). Hasil rekonstruksi filogenetik *H. chalconota* selanjutnya, ditampilkan pada Gambar 4.

Tabel 2. Homologi sekuen HC3 dengan sekuen *Hylarana* GenBank

Accession	Description	Max Score	Max Identity (%)
KF477630.1	<i>H. chalconota</i>	505	99
DQ835331.1	<i>H. raniceps</i>	483	98
KR264085.1	<i>H. megalonesa</i>	481	98

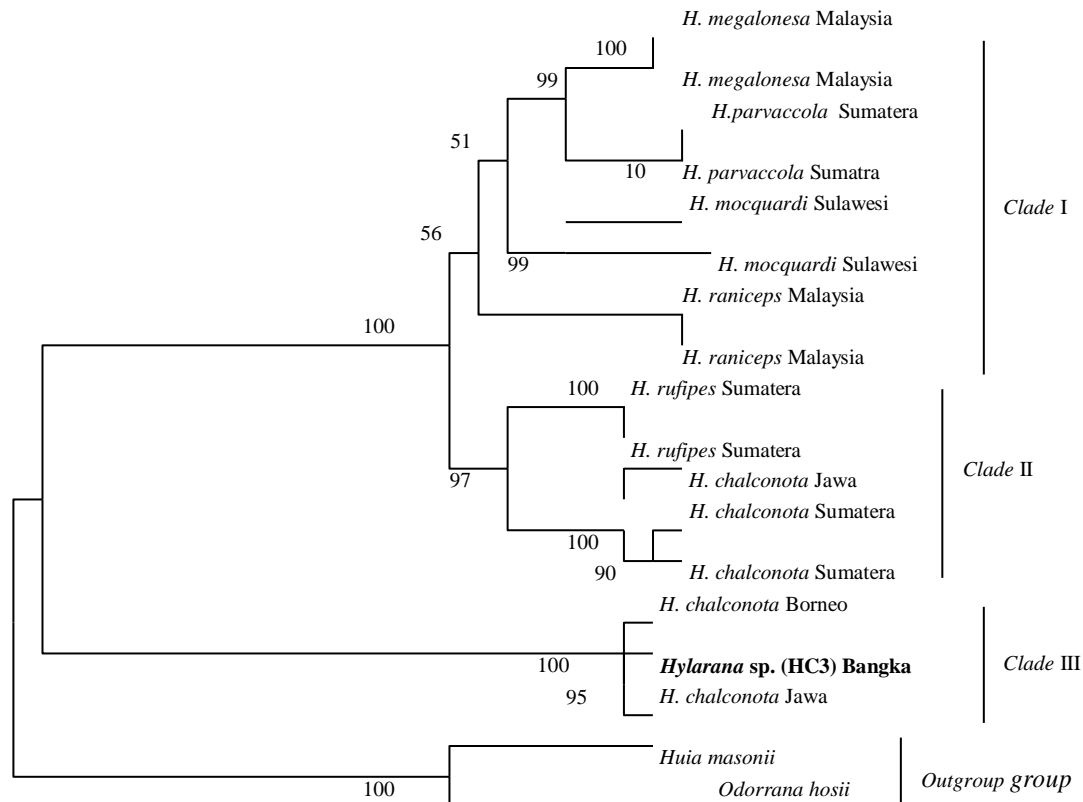
PEMBAHASAN

Penggunaan jaringan otot sebagai sumber DNA terkait dengan tingginya jumlah

mitokondria di jaringan tersebut, sehingga diharapkan diperoleh isolat DNA dengan konsentrasi tinggi. Hasil elektroforesis isolat DNA individu HC1 terlihat sangat tipis, sedangkan pita DNA individu HC2, dan HC3 tampak tebal (Gambar 1). Kualitas isolat DNA sangat terkait dengan konsentrasi DNA dari sampel yang diperoleh. Pita DNA yang tebal menunjukkan konsentrasi DNA yang tinggi, demikian pula sebaliknya (Irmawati, 2003).

Hasil uji kemurnian isolat DNA sampel berkisar antara 1,65-1,95 (Tabel 1). Mengacu pada Sulandari & Zein (2003), nilai kemurnian 1,8-2,0 menunjukkan kualitas DNA tinggi, nilai kemurnian kurang dari 1,8 mengindikasikan adanya kontaminasi kloroform/fenol, sedangkan nilai di atas 2,0 mengindikasikan adanya kontaminasi protein. Berdasarkan acuan tersebut, dipastikan bahwa isolat DNA sampel HC2 dan HC3 memiliki kualitas sangat baik (kemurnian tinggi), sedangkan DNA HC1 kurang baik dan terindikasi kontaminasi kloroform/fenol. Kontaminasi ini dapat disebabkan oleh proses pengeringan yang kurang sempurna, sehingga masih menyisakan larutan purifikasi (alkohol, atau fenol), dan menurunkan kemurnian DNA (Marwayana, 2015).

Konsentrasi DNA ketiga sampel katak menunjukkan kesesuaian dengan tingkat kemurniannya. Isolat DNA dengan kemurnian baik, memiliki konsentrasi DNA tinggi, demikian pula sebaliknya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hendra dkk. (2013), yaitu hasil ekstraksi DNA dengan tingkat kemurnian baik, cenderung memiliki konsentrasi DNA tinggi, dan kadar protein (kontaminan) rendah. Hasil amplifikasi PCR gen 16S rRNA dari sampel HC1 dan HC2 tampak berupa tipis, sedangkan sampel HC3 berupa pita terang dan jelas (Gambar 2). Pita DNA yang tipis menunjukkan bahwa gen target pada HC1 dan HC2 tidak berhasil teramplifikasi. Hal ini dapat disebabkan oleh ketidakcocokan antara *primer* dengan DNA *template* (Triana, 2010).



Gambar 4. Pohon Filogeni Katak *Hylarana chalconota* Dari Pulau Bangka

Pensejajaran sekuen sampel HC3 memperlihatkan homologi tinggi dengan sekuen *H. chalconota*, *H. raniceps*, dan *H. megalonesa*, yaitu berkisar 98-99% (Tabel 2). Interpretasi kemiripan sekuen sampel dan sekuen database dinyatakan sebagai berikut: kemiripan sekuen 97-100% dikatakan signifikan, 92-96% cukup signifikan, adapun kemiripan <91% dikatakan tidak signifikan (Bhattacharjee *et.al.*, 2012 dalam Hadiprata dkk., 2015). Hasil pensejajaran BLAST menunjukkan bahwa spesimen katak *Hylarana* Pulau Bangka memiliki homologi signifikan dengan spesies *H. chalconota* (Tabel 2).

Homologi yang tinggi mengindikasikan, bahwa sebagian besar materi genetik spesimen katak Pulau Bangka mengandung materi genetik katak *Hylarana chalconota* (GenBank). Pewarisan mtDNA bersifat maternal, karenanya spesimen *Hylarana* yang terkait dengan

pewarisan maternal akan memiliki sekuen serupa, sedangkan yang tidak terkait hubungan maternal akan menunjukkan sekuen berbeda. Gen 16S rRNA merupakan daerah yang dipertahankan dalam mtDNA, dan penggunaan gen ini menghasilkan tingkat efisiensi dan konsistensi yang tinggi. Hasil studi ini juga mendukung pernyataan Xia *et al.* (2011), bahwa penggunaan gen 16S rRNA sebagai penanda molekuler, sangat efektif untuk hewan amfibi.

Hasil analisis rekonstruksi filogenetik antara spesimen Pulau Bangka terhadap spesies kompleks *H. chalconota* digambarkan pada pohon filogeni (Gambar 4). Spesimen tersebut menempati cabang yang bertetangga dengan *H. chalconota* Jawa, dan berada pada satu *clade* dengan *H. chalconota* Jawa dan Borneo, dengan nilai kepercayaan 100%. Mazuni dkk. (2014) menyatakan, *clade* yang memiliki nilai *bootstrap* (kepercayaan) 95% atau lebih, dapat dikatakan

sebagai clade yang stabil. Hasil rekonstruksi filogenetik menunjukkan bahwa spesimen *H. chalconota* Pulau Bangka lebih berkerabat dekat dengan *H. chalconota* Jawa dan Borneo, dibandingkan *H. chalconota* Sumatera.

Adanya variasi ekologis, dan barrier geografis dapat memunculkan karakter berbeda pada individu dalam satu spesies, dan akan meningkatkan diferensiasi genetik. Asal muasal katak *H. chalconota* diduga berasal dari Jawa, namun kemudian tersebar luas di Asia Tenggara. Dilaporkan spesies ini dijumpai di Jawa, Sumatera, Kalimantan, hingga Thailand Selatan, namun Van Dijk *et al.* (2004) menyatakan bahwa *H. chalconota* hanya tersebar di Sumatera, Jawa, dan Bali.

Pola pengelompokan spesimen *H. chalconota* Pulau Bangka diduga terkait dengan sejarah geologi pulau ini. Pada awal sejarah geologinya, Pulau Bangka menyatu dengan Pulau Sumatera, Jawa, Kalimantan, dan daratan Asia. Pada awal zaman Eosen (sekitar 50 juta tahun lalu), Indocina, Burma, Semenanjung Malaysia, Jawa, Sumatera, dan Kalimantan masih merupakan satu kontinental, kemudian wilayah tersebut terpisah saat permukaan air laut meningkat.

Pada zaman Pleistosen terjadi penurunan permukaan air laut yang drastis, sehingga wilayah tersebut bergabung kembali menjadi satu kontinen Dataran Sunda yang luas.

Adanya koneksi berupa daratan memungkinkan persebaran *H. chalconota* pada daerah tersebut, dan menyebabkan populasi *H. chalconota* memasuki kawasan hutan. Terjadinya kenaikan permukaan air laut menyebabkan timbulnya *barrier* geografi berupa lautan, yang akhirnya mengisolasi populasi tersebut. Walaupun ada koneksi daratan selama perubahan permukaan air laut secara berkala, namun persebaran *H. chalconota* di wilayah Sumatera, Jawa, dan Kalimantan tetap dipertahankan (Inger *et al.*, 2009). Pemisahan Semenanjung Malaysia, Kalimantan, Sumatera, dan Jawa kemudian kembali terjadi, dengan berakhirnya zaman Pleistosen (Tjong *dkk.*, 2010).

KESIMPULAN

Spesimen katak *Hylarana* sp. dari Pulau Bangka dipastikan adalah spesies *Hylarana chalconota*. Analisis pohon filogeni berdasarkan gen 16S rRNA, menunjukkan spesimen ini berkerabat lebih dekat dengan *H. chalconota* Jawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Bultin, R.K., J.R. Bridle., D. Schluter. 2009. Speciation and Patterns of Diversity. Chapter 1. Cambridge University Press. New York. 1-10.
- Hadiprta, N.L.M.I.Y.S., I.M.B.A.P.A. Putra., I.G.N.K. Mahardika., I.N. Wandita., T.S. Nindhia. 2015. Identifikasi Spesies Ikan Kerapu di Pasar Ikan Karangasem dan Kedonganan Bali Menggunakan DNA Mitokondria Gen 16s rRNA. *Jurnal Veteriner* 16(3):423-431.
- Hasan, M., M.M. Islam, M.M.R. Khan, T. Igawa, M.S. Alam, H.T. Djong, N. Kurniawan, H. Joshy, Y.H. Sen, D.M. Belabut, A. Kurabayashi, M. Kuramoto, M. Sumida. 2014. Genetic Divergences of South and South East Asian Frogs: A Case Study of Several Taxa Based on 16S Ribosomal RNA Gene Data with Notes on The Generic Name *Fejervarya*. *Turk. J. Zool* 38: 389-411.
- Hendra., N.W.Y. Suryaningtyas., C. Riyanto., A.F. Heryanto. 2013. Ekstraksi DNA *Collocalia fuchiphaga* dengan Metode Phenol Chloroform Extraction dari Berbagai Material Sumber Genetik. <http://artikel.dikti.go.id/index.php/PKM-P/article/download/41/41>. Diakses tanggal 14 Mei 2016 pk 09:23 WIB.
- Inger, R.F., B.L. Stuart., D.T. Iskandar. 2009. Systematics of A Widespread Southeast Asian Frog, *Rana chalconota* (Amphibia: Anura: Ranidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 155: 123-147.
- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Generasi Pertama pada Stok Hatchery. Tesis. Institut Pertanian Bogor. 34-37.
- Kusrini, M.D. 2008. Pedoman dan Survei Amfibi di Alam. Institut Pertanian Bogor. 73-74.

- Laporan Akuntabilitas Kinerja Instansi Pemerintahan Bangka Belitung (Lakip Babel). 2013. http://www.babelprov.go.id/sites/default/files/dokumen/bank_data/05.%20BA-B-01-Pendahuluan.doc. Diakses tanggal 12 Desember 2016 pukul 12:39 WIB.
- Marwayana, O.N. 2015. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) dari Sampel Jaringan Otot. *Jurnal Oseana* 11(2): 1-9.
- Mazuni, D.A. Adi., S. Syarif. 2014. Karakterisasi Fragmen gen 18S rRNA Pokea (*Batissa violacea celebensis* Martens, 1897) di Sungai Pohara Kecamatan Sampara Kabupaten Konawe. *Biowallacea* 1(1):25-38.
- National Center for Biotechnology Information. 2017. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Diakses tanggal 12 Mei 2017 pk 14.50 WIB.
- Richard, C. A. A. 2013. Evolution of Breeding Mode In Bornean Frogs. Thesis. Department of Zoology Faculty of Resource Science and Technology University Malaysia Sarawak. 5-7.
- Rinanda, T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala* 11 (3) : 172-177.
- Sianturi, S., 2015. Hubungan Filogenetik *Hylarana mocquardii* (Anura : Ranidae) di Sulawesi Berdasarkan Pengukuran Morfologi dan Molekuler Gen 12S rRNA dan 16S rRNA. Tesis. Institut Pertanian Bogor. 8-9.
- Stuart, B. L., R. F. Inger., H. K. Voris. 2006. High Levels of Cryptic Species Diversity Revealed by Sympatric Lineages of Southeast Asian Forest Frogs. *Biology Letters London* 2: 470-474.
- Sulandari, S., M. S. A. Zein. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI. 43-97.
- Tjandra, L. 2011. Analisis Filogenetik *Bufo melanostictus*, Schneider, 1799 dan *Bufo asper*, Gravenhorst, 1829 (Bufonidae) Sumatera Barat dan Kawasan Asia dengan Gen 16S rRNA dan Sitokrom b. Tesis. UNAND. Padang. 2-16.
- Tjong, D.H., D.T. Iskandar., D. Gusman. 2010. Hubungan Filogenetik Spesies *Limnonectes* (Ranidae: Amphibia) Asal Sumatera Barat dan Asal Asia Tenggara Berdasarkan Gen 16S ribosomal RNA. *Makara Sains* 14(1): 79-87.
- Toha, A. H. A. 2014. Biota Kriptik Raja Ampat. *Buletin Konservasi Biodiversitas Raja Ampat* 7(3): 6.
- Triana, S.H. 2010. Analisis Fragmen DNA Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang Tahan dan Rentan terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Ilmu Dasar* 11(1): 8-16.
- Van Dijk, P.P., D.T. Iskandar., R.F. Inger., M.D. Kusri. 2004. *Chalcorana chalconota*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T58568A89366516. <http://www.iucnredlist.org/details/58568/0>. Diakses pada tanggal 13 November 2016 pk 10:12 WIB.
- Xia Y, Gu HF, Peng R, Chen Q, Zheng YC, Murphy RW, & Zeng XM. 2011. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). *Molecular Ecology Resources* 12:48-56.