

## Keragaman Genetik Amfibia Kodok (*Rana nicobariensis*) di *Ecology Park*, Cibinong Berdasarkan Sekuen DNA dari Mitokondria *d-loop*

Dwi Astuti & Hellen Kurniati

Bidang Zoologi, Puslit Biologi-LIPI, Cibinong Science Centre, Jl. Raya Jakarta-Bogor KM 46, Cibinong. **Email:** wiek002@yahoo.com

### ABSTRACT

**Genetic Diversity of Amphibia (*Rana nicobariensis*) at Ecology Park, Cibinong Based on DNA Sequences of Mitochondrial d-Loop.** The 397- base pairs from ten nucleotide sequences of mitochondrial d-loop region were determined and analyzed in object to study the genetic diversity of frog *Rana nicobariensis* at Ecology Park, Cibinong, West Java. There were six haplotypes from 10 individuals collected from Ecology Park. Haplotype and nucleotide or amino acid diversities in Ecology Park were 0.964 and 0.0064 respectively.

**Key words:** Genetic diversity, *Rana nicobariensis*, Ecology Park Cibinong, DNA sequences, mitochondrial-d-loop

### PENDAHULUAN

*R. nicobariensis* adalah jenis kodok yang distribusinya sangat luas di Asia Tenggara yaitu mulai dari Thailand bagian selatan, Semenanjung Malaysia, Kepulauan Nicobar, Filipina, Sumatra, Kalimantan dan Jawa (IUCN 2009). Jenis kodok ini termasuk dalam kelompok jenis non-hutan, yang banyak dijumpai pada hasil modifikasi manusia (Inger & Lian 1996; Inger & Stuebing 1996).

Areal *Ecology Park* di Cibinong merupakan suatu ekosistem lahan basah yang dibuat pada tahun 2000. Habitat ini telah dihuni 11 jenis kodok yang termasuk dalam kelompok non-hutan (Kurniati & Astuti 2009). Melihat ekosistem lahan basah di areal *Ecology Park* yang masih relatif baru, maka ada kemungkinan bahwa fauna amfibia yang ada di area ini berasal dari berbagai

populasi di sekitarnya atau dari lokasi lain. Dari 11 jenis kodok yang dijumpai di *Ecology Park*, salah satunya, yaitu *R. nicobariensis* mempunyai distribusi vertikal yang luas, mulai dari 0 meter sampai 1500 meter dari permukaan laut (dpl) (Kurniati *et al.* 2000; Kurniati 2006), dan merupakan satu dari jenis kodok yang mendominasi di area tersebut dan belum pernah dikaji keragamannya. Kajian keragaman genetik sudah banyak dilakukan dengan menggunakan penanda dari DNA mitokondria. Maka, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik di antara individu-individu *R. nicobariensis* pada Ecology Park berdasarkan penanda molekuler genom mitokondria ruas d-loop. Dalam penelitian ini juga dianalisis individu-individu *R. nicobariensis* dari Halimun dan Sibolga sebagai pembanding.

DNA mitokondria (mtDNA) memiliki nilai penting dalam berbagai kajian keragaman genetik. Total panjang dari mtDNA telah dideterminasi pada 56 jenis hewan vertebrata (Boore 1999) dan berukuran mulai dari 16 hingga 20 kbp (kilo base pairs), tetapi kadang-kadang berukuran 15 hingga 21 kbp (Sano *et al.* 2005). mtDNA ini berbentuk lingkaran dan terdiri dari 37 gen 2 rRNAs, 13 gen pengkode protein, 22 tRNAs, dan daerah *non-coding* yang biasa disebut *Control Region* atau *d-loop* yang mengandung sinyal untuk replikasi dan transkripsi DNA (Wolstenholme 1992).

Pada kelompok hewan amfibia, telah dipublikasikan sekuen utuh dari mtDNA pada jenis-jenis *Xenopus laevis* (Roe *et al.* 1985), *Typhlonectes natans* (Zardoya & Meyer 2000), dan enam jenis ranoid (Ranoidae): *R. Nigromacu-lata* (Sumida *et al.* 2001), *Fejervarya limnochairs* (Liu *et al.* 2005), *Buergeria buergeri* (Sano *et al.* 2004), *Rhacophorus schegelii* (Sano *et al.* 2005) dan *Polypedates megacephalus* (Zhang *et al.* 2005). Sedangkan secara parsial, fragmen DNA *d-loop* pada beberapa jenis dari amfibia dari Ranoidae (*e.g.* Feller & Hedges 1998; Sumida *et al.* 2000; Macey *et al.* 2001) juga telah dipublikasikan. *D-loop* sangat potensi digunakan untuk mengkaji variasi, keragaman dan struktur genetik populasi pada satu jenis hewan. *D-loop* di dalam mtDNA merupakan bagian yang memiliki kecepatan evolusi tinggi (Brown 1985), juga memiliki fragmen pendek yang konservatif (Clayton 1992). Pada beberapa kelompok hewan, daerah *noncoding* dari mitokondrial DNA juga

disebut sebagai suatu *control region* atau *displacement loop (d-loop) region* dan dapat menjadi suatu marka genetik di dalam pengungkapan struktur genetika populasi dan filogeni intraspecies (Hoelzel 1993; Pollock *et al.* 2000; Bruford *et al.* 2003; Ross *et al.* 2003)

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Koleksi material sumber DNA

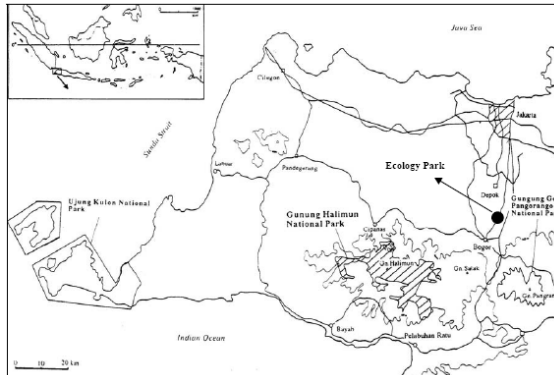
Sepuluh material DNA dikoleksi dari 10 individu *R. nicobariensis* dilakukan di areal *Ecology Park* Cibinong (Gambar 1) selama lima kali survei. Sebagai pembandingan dianalisis juga material DNA yang dikoleksi dari Halimun Jawa Barat dan Sibolga, Sumatra Utara sebanyak 7 sampel.

### Analisis DNA mitokondria *d-loop*

Material DNA diekstraksi dari koleksi jaringan dan daging yang dipreservasi dalam *ethanol absolute*, dengan menggunakan “DNA Mini QIAGEN KIT”. Metode ekstraksi yang dipakai mengikuti standar protokol yang dianjurkan QIAGEN KIT dengan sedikit modifikasi pada tahap inkubasi-2 yaitu dengan suhu 56° C, dan tahap pencucian dengan larutan AW2. Molekul DNA yang diperoleh disimpan dalam freezer atau refrigerator dan selanjutnya digunakan sebagai *template* dalam proses amplifikasi fragmen *d-loop* melalui PCR.

Amplifikasi fragmen DNA pada daerah *d-loop* dilakukan dengan menggunakan sepasang primer DNA, yaitu 327-L dan 885-H (Jing Zhong *et al.*, 2008), pada kondisi PCR 96 °C-4

## Keragaman Genetik Amfibia Kodok (*Rana nicobariensis*)



**Gambar 1.** Lokasi pengambilan sampel material sumber DNA *R. nicobariensis*

menit, 30 siklus dari (94 °C-1 menit, 50 °C- 1 menit, 72 °C- 1, 5 menit), dan 72 °C-7 menit. Larutan reaksi PCR dibuat dalam 30µL dengan komponen dan konsentrasi akhir terdiri dari 1 µL DNA, 10X Taq Buffer, 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 U Taq DNA Polimerase (ApliTaqGold/Takara), primer 327-L dan 885-H masing-masing 0,25 mM, dan air *nanopure*.

Fragmen *d-loop* yang berhasil diamplifikasi, kemudian dimurnikan dan disekuensi runutan basa nukleotidanya. Sekuensing dilakukan dua arah (*Forward* dan *Reverse*), masing-masing dengan menggunakan primer 327-L dan 885-H.

Urutan basa pada daerah *d-loop* hasil dari proses sekuensing, kemudian dianalisis *alignment* (saling disejajarkan) dengan bantuan perangkat lunak ProSequen. Oleh karena proses sekuensing tidak berhasil mensekuensi semua basa nukleotida dengan jelas, maka bagian data sekuen DNA yang tidak jelas tidak digunakan dalam analisis berikutnya. Sehingga jumlah basa

nukleotida yang dianalisis untuk mengetahui keragaman genetik diantara individu-individu *R. nicobariensis* hanya sepanjang 395 pasang basa.

Analisis data sekuen juga dilakukan untuk mengetahui beberapa karakter urutan basa nukleotida pada *d-loop Rana* yang dianalisis, diantaranya adalah menghitung komposisi basa. Data dan hasil analisis jarak genetik dan sekuen divergensi, variasi sekuen, dan nilai diversitas nucleotida atau asam amino ( $\pi$ ) berdasarkan *Tajima's Neutrality Test* diantara individu-individu *R. nicobariensis* baik di dalam maupun diantara populasi diperoleh dengan bantuan perangkat lunak MEGA 3. Tipe, jumlah, nilai diversitas haplotipe (Hd) dihitung dengan bantuan perangkat lunak DNAsp. Untuk mengetahui pengelompokan dan kedekatan diantara individu-individu *R. nicobariensis*, maka dikonstruksi pohon *neighborn-joining* (NJ) dengan bantuan perangkat lunak MEGA-3, dan 2 individu *Rana nigromaculata* (GenBank AY612275

dan AY612276) digunakan sebagai spesies outgroup.

## HASIL

Amplifikasi fragmen *d-loop* dengan menggunakan sepasang primer 327-L dan 885-H tidak mudah dilakukan pada *R. nicobariensis*. Namun demikian pada 17 individu, *d-loop* dapat diamplifikasi dan menghasilkan fragmen DNA diatas atau sekitar 500 bp. Pada awalnya, primer ini dipilih karena pada publikasi sebelumnya ( Zhong Jing *et al.* 2008) fragmen *d-loop* yang dihasilkan menunjukkan adanya variasi sekuen DNA yang tinggi diantara individu-individu maupun populasi pada marga *Fejervarian*.

Pada penelitian ini data sekuen DNA *d-loop* dari spesies *ingroup* yang akan dianalisis adalah sepanjang 395-bp, sedangkan data sekuen dari spesies *outgroup* pada posisi yang sama hanya ada sepanjang 377-bp. Semua data sekuen dari spesies *ingroup* ketika disejajarkan dengan data sekuen spesies *outgroup*, terdapat 2 basa yang mengalami *delesi* sehingga panjang situs spesies *ingroup* menjadi 397-bp. Jadi panjang situs sekuen dari spesies *ingroup* lebih panjang 20 situs dari spesies *outgroup*. Oleh karena itu untuk mengkonstruksi pohon filogeni dengan analisis NJ, maka data sekuen yang digunakan hanya sepanjang 375-bp (377 situs). Sedangkan untuk analisis variasi genetik diantara *R. nicobariensis* digunakan data sekuen sepanjang 395-bp (397 situs).

Hasil analisis data sekuen *d-loop* sepanjang 395-bp pada semua individu *R. nicobariensis* yang diteliti, menunjukkan bahwa presentase basa timin (T) = 27,7 %, sitosin (C) = 26,2 %, adenin (A) = 33,9 %, dan guanin (G) = 12 %. Jadi timin + adenin (AT) sebesar 61, 6 % dan sitosin + guanin (GC) = 38,4 %. Dari komposisi tersebut menunjukkan bahwa komposisi AT jauh lebih banyak dari GC, dengan kata lain sekuen *d-loop* pada *Rana* ini adalah AT-rich. Substitusi basa yang bersifat transvers (ts = 6) terjadi lebih banyak dibandingkan yang bersifat transisi (ti =4), sehingga rasio ti/tv adalah 0,7.

Rata-rata jarak genetik berdasarkan Kimura 2-parameter diantara individu pada populasi *Ecology Park* adalah  $0.0065 \pm 0.0025$ , sedangkan pada analisis lain yang diambil dari Halimun  $0.0106 \pm 0.0036$  dan  $0.0068 \pm 0.0031$  pada Sibolga. Sementara rata-rata jarak genetik antara populasi *Ecology Park* –Halimun adalah  $0.0170 \pm 0.0064$ , *Ecology Park*-Sibolga adalah  $0.0212 \pm 0.0065$ , dan Halimun-Sibolga adalah  $0.0241 \pm 0.0066$ . Jadi, divergensi sekuen berdasarkan pada *Ecology Park* adalah 0.65 %, dan secara berturut-turut pada Halimun dan Sibolga adalah 1,06 % dan 164. 0,68 %.

### Haplotipe dalam populasi *R. nicobariensis*.

Sekuen DNA sepanjang 395-bp (397 situs) dari tiap individu *R. nicobariensis* pada *Ecology Park* Cibinong dan juga dari Kawasan Gn. Halimun, dan Sibolga yang dianalisis memperlihatkan adanya sejumlah haplotipe. Dari 17 individu yang dianalisis terdapat 13 haplotipe, 6

haplotipe diantaranya dijumpai pada 10 individu yang terdapat pada *Ecology Park*. Enam tipe haplotipe pada *Ecology Park* terdiri dari Hap-1 (1 individu), Hap-2R (2 individu), Hap-3R (3 individu), Hap-4R (1 individu), Hap-5R (1 individu), dan Hap-6R (2 individu). Sedangkan tipe haplotipe lainnya terdapat pada sampel yang berasal dari Halimun dan Sibolga. Jumlah dan tipe haplotipe dari *R. nicobariensis* digambarkan pada Tabel 1.

Dari analisis data sekuen DNA yang diperlihatkan pada Tabel 1 terlihat bahwa, di dalam sekuen DNA d-loop sepanjang 395-bp (397 situs) pada *R. nicobariensis* dari populasi *Ecology Park*, terjadi substitusi basa pada 6 situs sekuen, yaitu berturut-turut situs nomer 51, 58, 225, 244, 359, dan 379.

Nilai diversitas haplotipe *R. nicobariensis* pada *Ecology Park* adalah 0,889 sedangkan pada Halimun dan Sibolga secara berturut-turut adalah 1,000, dan 1,000, dan semua 3 populasi adalah 0,971. Nilai diversitas nucleotida atau asam amino ( $\pi$  ( $\delta$ )) pada populasi di *Ecology Park* berdasarkan *Tajima's Neutrality Test* sebesar 0,0058, sedangkan di Halimun dan Sibolga adalah 0.0093 dan 0.0067, dan pada 3 populasi adalah 0.0144. *Homogeneity test* diantara individu-individu pada *Ecology Park* menghasilkan nilai yang bervariasi dari 0,1010 hingga 1,0000, dimana nilai 1,000 berjumlah 26 dari 45 pasangan data sekuen yang ada, sedangkan pada Halimun 0,3200-1,0000, dan 1,000 pada Sibolga.

**Table 1.** Haplotipe dari 17 individu *R. nicobariensis* pada 3 lokasi berbeda, yaitu *Ecology Park*(EPn), Taman Nasional Gunung Halimun (Hal) dan Sibolga (Sib).

No.	Kode sampel jaringan	Posisi basa nukleotida																Kode haplotipe (Hap)
		2	34	51	5	10	1	1	1	2	2	2	3	33	3	3		
1	EPn1	A	A	G	C	A	T	T	C	T	A	A	C	A	G	C	C	Hap-1R
2	EPn2	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	Hap-2R
3	EPn3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	Hap-3R
4	EPn4	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	Hap-2R
5	EPn5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	Hap-3R
6	EPn7	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	Hap-4R
7	EPn8	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	A	T	Hap-5R
8	EPn11	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	T	Hap-6R
9	EPn12	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	T	Hap-6R
10	EPn6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	Hap-3R
11	Hal5	G	.	.	T	C	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	T	Hap-7R
12	Hal2	G	.	.	T	.	.	C	G	.	.	T	.	G	A	.	T	Hap-8R
13	Hal3	G	C	.	T	.	.	C	G	.	.	T	.	G	.	.	T	Hap-9R
14	Hal7	G	C	.	T	.	.	C	.	.	.	T	T	G	.	.	T	Hap-10R
15	Sib2	G	.	C	T	C	A	.	.	C	T	T	T	.	.	A	.	Hap-11R
16	Sib4	G	C	C	T	.	A	.	.	C	T	T	T	.	.	A	T	Hap-12R
17	Sib6	G	C	C	T	.	A	.	.	C	T	T	T	.	.	.	T	Hap-13R

**Analisis neighbor-joining (NJ)**

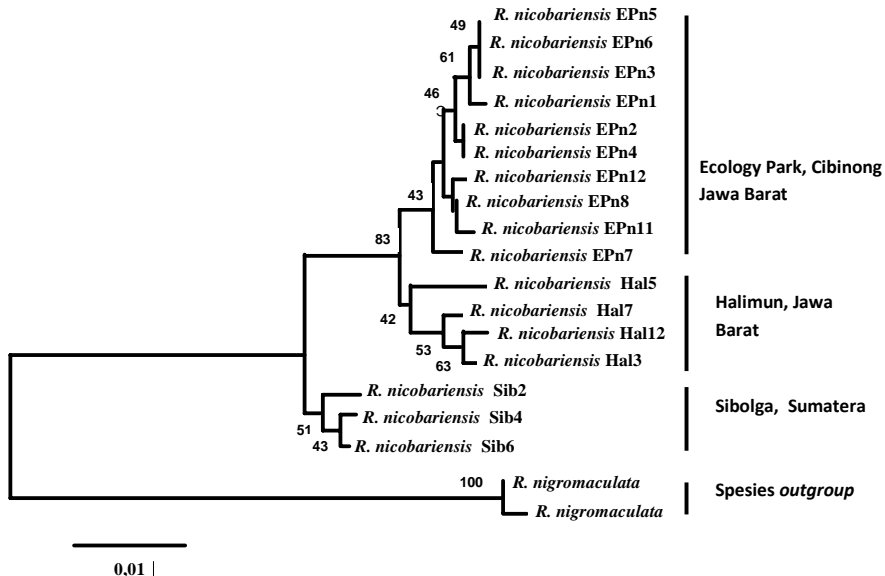
Analisis NJ dilakukan untuk mengetahui pengelompokan dari individu-individu *R. nicobariensis* yang diteliti. Pohon NJ dikonstruksi berdasarkan analisis seluruh jumlah substitusi basa yang terjadi baik yang bersifat transisi dan transversi, dan menggunakan *R. nigromaculata* sebagai spesies *outgroup* (Gambar 2). Pada pohon NJ terlihat bahwa semua individu dari *Ecology Park* membentuk kluster tersendiri, memisah dari individu-individu yang dari Halimun maupun Sibolga.

nukleotida yang terjadi di dalam populasi *R. nicobariensis* pada *Ecology Park* Cibinong menunjukkan bahwa terdapat keragaman genetik diantara individu-individu yang diteliti. Hal ini dikarenakan oleh sifat sekuen DNA pada daerah mitokondria *d-loop* yang sudah diketahui memiliki kecepatan substitusi basa DNA yang sangat cepat, sehingga sangat mungkin terjadi variasi genetik di antara individu-individu *R. nicobariensis*. Seperti yang telah dikatakan oleh Brown (1985) bahwa *d-loop* di dalam mtDNA merupakan bagian yang memiliki kecepatan evolusi tinggi.

**PEMBAHASAN**

Haplotipe sebanyak 6 tipe dengan nilai diversitas haplotipe dan diversitas

Gambaran keragaman genetik ini juga dapat diasumsikan bahwa individu-individu pada populasi *Ecology Park*



**Gambar 2.** Pohon neighbor-joining (NJ) dari individu-individu *R. nicobariensis* berdasarkan analisis 375-bp (377 situs) pada DNA mitokondria *d-loop*. Angka-angka yang tertera di atas menunjukkan nilai bootstrap diatas 40 % .

tersebut kemungkinan berasal dari beberapa induk yang berbeda. Individu-individu tersebut mungkin berasal dari induk-induk yang berbeda baik pada populasi yang sama di daerah asalnya, atau berasal dari induk-induk pada populasi yang berbeda pada daerah asal yang sama, ataupun berasal dari induk-induk pada populasi di daerah asal yang berbeda.

Seperti diketahui bahwa *Ecology Park* merupakan ekosistem bentukan baru dimana kemungkinan keragaman jenis fauna termasuk amfibia kodok *R. nicobariensis* jumlah individunya relatif sedikit dibandingkan pada lokasi atau ekosistem lain yang sudah lama terbentuk, bahkan sepanjang survei pengambilan sampel di *Ecology Park* tidak dijumpai kodok betina maupun telur kodok. Maka kemungkinannya, dugaan adanya keragaman genetik maupun adanya haplotipe-haplotipe DNA diantara individu-individu kodok yang diteliti, dikarenakan sebagian atau seluruh individu-individu kodok tersebut awalnya bukan penghuni asli di *Ecology Park*, namun berasal dari lokasi lain baik lokasi atau ekosistem disekitar *Ecology Park* maupun dari lokasi atau ekosistem yang lebih jauh.

Menurut Inger & Voris (1993), penyebaran individu kodok yang biasanya dalam bentuk berudu dipengaruhi oleh koneksi habitat; hutan dengan keragaman jenis yang tinggi akan membagi kekayaan jenis kodok tersebut kepada habitat lain dalam proses pemulihan apabila ada koneksi berupa parit-parit atau sungai-sungai yang menghubungkannya. Berudu-berudu

yang penyebarannya secara pasif karena terbawa oleh air atau banjir akan bertahan hidup pada habitat yang cocok bagi bentukan dewasanya (Cushman 2006). Melihat fenomena ini, kemungkinan besar individu-individu kodok *R. nicobariensis* datang ke *Ecology Park* masih dalam fase berudu dan kemudian tumbuh menjadi kodok dewasa di areal *Ecology Park*. Seperti diketahui bahwa anak kodok yang masih dalam fase berudu hidup di dalam air, sehingga aliran air sungai atau air hujan banjir, sangat memungkinkan membawa berudu kodok menuju *Ecology Park*.

Jika fenomena itu benar, maka ada prospek baik untuk konservasi fauna khususnya amfibia *R. nicobariensis* di *Ecology Park*, karena kemungkinan terjadinya inbreeding masih relatif kecil. Namun diketahui bahwa selama survei lapangan, di *Ecology Park* hanya dijumpai kodok-kodok jantan. Jadi untuk meningkatkan populasi kodok *R. nicobariensis* di *Ecology Park* juga perlu dilakukan “introduce” induk betina sehingga kodok-kodok jantan dan betina dapat melakukan proses perkembang biakan.

Meskipun terjadi haplotipe sebanyak 6 pada 10 individu *R. nicobariensis* yang diteliti, namun nilai diversitas nukleotida atau asam amino ( $\pi$  ( $\delta$ )) pada populasi di *Ecology Park* dan juga pada kesemua 3 populasi (*Ecology Park*, Halimun, dan Sibolga) relatif lebih kecil jika dibandingkan dengan nilai diversitas pada populasi dan spesies kodok lain (*Fejervarya multistriata*). Penelitian sebelumnya dengan menggunakan primer DNA yang sama dan pada posisi



fragmen DNA yang sama, diversitas nucleotida diantara individu pada satu populasi jenis *Fejervarya multistriata* adalah 0,000 – 0,0130 dan 0,017 pada semua populasi (Zhong *et al.* 2008), dan nilai diversitas haplotipenya sebesar 0,969 untuk semua populasi dan bervariasi dari 0,0000 hingga 1,000 di dalam populasi. Ini menunjukkan bahwa keragaman genetik di antara individu-individu *R. nicobariensis* pada *Ecology Park* relatif lebih kecil dibandingkan keragaman genetik pada spesies kodok lain berdasarkan segmen DNA yang sama pada DNA mitokondria *d-loop*.

Jarak genetik atau nilai divergensi sekuen DNA diantara individu *R. nicobariensis* pada ekology park relatif lebih kecil dibandingkan dengan populasi maupun spesies lain. Pada amfibia kodok di China, divergensi sekuen dari kodok Palaeartic adalah berkisar antara 0,24 % - 2, 71 % (Zang *et al.* 2004), 1, 32 % pada Chinese giant salamander *Andrias davadianus* (Tao *et al.* 2005), dan 1,7 % pada Taipeh tree frog, *Rhacophorus taipeianus* (Yang *et al.* 1994).

## KESIMPULAN

Terdapat keragaman genetik di antara individu *R. nicobariensis* di *Ecology Park* Cibinong, meskipun relatif lebih kecil jika dibandingkan dengan individu pada populasi dan spesies kodok lain. *R. nicobariensis* yang ada di *Ecology Park* sebagian atau semuanya kemungkinan bukan asli penghuni kawasan tersebut, melainkan berasal dari kawasan lain. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk memprediksi

dari mana asal usul dari individu-individu kodok di *Ecology Park*, sehingga perlu dilakukan koleksi dan analisis terhadap sampel material DNA dari individu-individu *R. nicobariensis* pada beberapa populasi di Bogor dan daerah sekitarnya.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Program Insentif Dikti Th. 2009. Terima kasih disampaikan kepada sdr. Tri Wahyu Laksono yang telah membantu dalam pengambilan sampel DNA di lapangan, juga kepada sdr. Inda Natali dan Aniek Budi Dharmayanti yang telah membantu dalam proses penelitian DNA di laboratorium genetik, Bidang Zoologi Puslit Biologi-LIPI.

## DAFTAR PUSTAKA

- Boore, JL. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27: 1767-1780.
- Brown, WM. 1985. Evolution of the animal mitochondrial genome. In *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum Press. New York. Pp 95-130.
- Bruford, MW, DG Bradley, & G Luikart. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat. Rev. Genet.* 4:900-910
- Clayton, DA. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705
- Cushman, SA. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospec-tus. *Biol. Conser* 128(2): 231-240.



- Feller G & SB. Hedges. 1998. Molecular evidence for the early history of living amphibians. *Mol. Phylo. Evol.* 9: 509-516.
- Hoelzel AR. 1993. Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Curr Opin Genet Develop* 3:891-895
- Inger, RF & TF. Lian. 1996. *The natural history of amphibians and reptiles in Sabah*. Natural History Publication (Borneo). Kota Kinabalu.
- Inger, RF. & RB. Stuebing. 1997. *A Field Guide to the Frogs of Borneo*. Borneo Natural History Publishers, Kota Kinabalu, Malaysia.
- Inger, RF & HK. Voris. 1993. A Comparison of Amphibian Communities through Time and From Place to Place in Bornean Forests. *J. Trop. Ecol.* 9(4): 409-433.
- IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 20 January 2010.
- Kurniati, H., W. Crampton, A. Goodwin, A. Locket & A. Sinkins. 2000. Herpetofauna diversity of Ujung kulon National Park: An inventory results in 1990. *J. Biol. Res.* 6 (2): 113-128.
- Kurniati, H. 2006. The amphibians species in Gunung Halimun National Park, West Java, Indonesia. *Zoo Indonesia* 15(2): 107-120.
- Kurniati, H & D. Astuti. 2009. Keragaman Jenis dan Genetik Amfibia di Ekosistem Buatan "Ecology Park" Kampus LIPI Cibinong. *Laporan Akhir Program Insentif Bagi Peneliti dan Perekayasa Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia*. Depdiknas dan LIPI, Cibinong, Desember 2009. 33 hal.
- Liu et ZQ, YQ. Wang, & B. Su. 2005. The mitochondrial genome organization of tree frog, *Fejervarya limnocharis* (Amphibia: Anura): a new gene order in the mtDNA. *Gene* 346: 145-151.
- Macey, JR., JL. Strasburg, JA. Brisson, VT. Vredenburg, M. Jennings, & A. Larson. 2001. Molecular phylogenetics of Western North American frog of the *Rana boylei* species group. *Mol. Phyloenet. Evol.* 19: 131-143
- Pollock, DD., JA. Eisen, NA. Doggett, & MP. Cummings. 2000. A case for evolutionary Genomics and the comprehensive examination of sequence biodiversity. *Mol. Biol Evol* 17:1776-1788
- Roe, BA, DP. Ma, RK. Wilson & JFH. Wong. 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* 260: 9759-9774.
- Ross, HA, GM. Lento, ML. Dalebout, M. Good, G. Ewing, & P. McLaren. 2003. DNA surveillance: web-based molecular identification of whale, dolphins, and porpoises. *J. Hered* 94: 111-114
- Sano, N., A. Kurabayashi, T. Fujii, H. Yonekawa, & M. Sumida. 2004.

- Complete nucleotide sequence and gene rearrangement of the mitochondrial genome of the bell-ringing frog, *Buergeria buergeri* (family Rhacophoridae). *Genes and Genet. Syst* 79: 151-163.
- Sano N, A. Kurabayashi, T. Fujii, H. Yonekawa, & M. Sumida. 2005. Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the Schlegel's tree frog *Rhacophorus schlegelii* (family Rhacophoridae). *Genes & Genet. Syst.* 80:213-214.
- Sumida, M., H. Kaneda, Y. Kato, Y. Kanamori, H. Yonekawa & Nishioka M. 2000. Sequence variation and structural conservation in the D-loop region and flanking genes of mitochondrial DNA from Japanese pond frogs. *Genes Genet. Syst.* 75: 79- 92.
- Sumida, M, Y. Kanamori, H. Kaneda, & Y. Kato. 2001. Complete nucleotide sequence and rearrangement of the mitochondrial genome of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. *Genes and Genet. Syst.* 76(5): 311-325.
- Tao, FY., Wang XM, Zheng HX, & Fang SG. 2005. Genetic structure and geographic subdivision of four populations of the Chinese salamander (*Andrias davidianus*). *Zool Res* 26: 162-167.
- Wolstenholme, DR. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Mitochondrial Genomes*. Academi Press. New York. Pp. 1 73-216.
- Yang YJ, YS. Lin YS, JL. Wu & CF. Hui. 1994. Variation in mitochondrial DNA and population structure of the Taipei treefrog *Rhacophorus taipeianus* in Taiwan. *Mol. Ecol* 3: 219-228.
- Zardoya, R., & A. Meyer. 2000. Mitochondrial evidence on the phylogenetic position of caecilians (Amphibian: Gymnophiona). *Genetics* 155: 765-775
- Zhang. XF, KY. Zhou, & Q. Chang. 2004. Population genetic structure of *Pelophylax nigromaculata* in Chinese mainland based on mtDNA control region sequences. *Acta Genet Sin* 31: 1232-1240.
- Zhang, P., H. Zhou, D. Liang, YF. Liu YQ. Chen, & LH. Qu. 2005. The complete mitochondrial genome of a tree frog, *Polypedates megacephalus* (Amphibia: Rhacophoridae), and a novel gene organization in living amphibians. *Gene* 346: 133-143
- Zhong. J., ZQ. Liu & YQ. Wang. 2008. Phylogeography of Rice Frog, *Fejervarya multistriata* (Anura: Ranidae), from China based on mtDNA d-loop sequences. *Zoo. Sci.* 25: 811-820.

**Memasukkan:** Januari 2010

**Diterima:** Juni 2010