

**STUDI FILOGENETIK ULAR PUCUK (*Ahaetulla* sp. Link, 1802)
(SERPENTES: COLUBRIDAE) BERDASARKAN URUTAN GEN
CYTOCHROME B (Cyt-B) DAN 12S-rDNA DI PAPARAN SUNDA
DAN SUNDA KECIL**

TESIS

oleh

LILIN IKA NUR INDAH SARI

176090100111012



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

**STUDI FILOGENETIK ULAR PUCUK (*Ahaetulla* sp. Link, 1802)
(SERPENTES: COLUBRIDAE) BERDASARKAN URUTAN GEN
CYTOCHROME B (Cyt-B) DAN 12S-rDNA DI PAPARAN SUNDA
DAN SUNDA KECIL**

TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

oleh

Lilin Ika Nur Indahsari

176090100111012



PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

**STUDI FILOGENETIK ULAR PUCUK (*Ahaetulla* sp. Link, 1802) (SERPENTES:
COLUBRIDAE) BERDASARKAN URUTAN GEN CYTOCHROME B (Cyt-B)
DAN 12S-rDNA DI PAPARAN SUNDA DAN SUNDA KECIL**

LILIN IKA NUR INDAHSAARI

176090100111012

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 24 Juni 2019

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II

Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc

NIP. 19781025 200312 1 002

Prof. Fatchiyah, M. Kes., Ph.D

NIP. 19631127198903 2 001

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Biologi

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc

NIP. 19781025 200312 1 002

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis : Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

STUDI FILOGENETIK ULAR PUCUK (*Ahaetulla* sp. Link, 1802) (SERPENTES: COLUBRIDAE) BERDASARKAN URUTAN GEN CYTOCHROME B (Cyt-B) DAN 12S-rDNA DI PAPARAN SUNDA DAN SUNDA KECIL

Nama : Lilin Ika Nur Indahsari

NIM : 176090100111012

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc

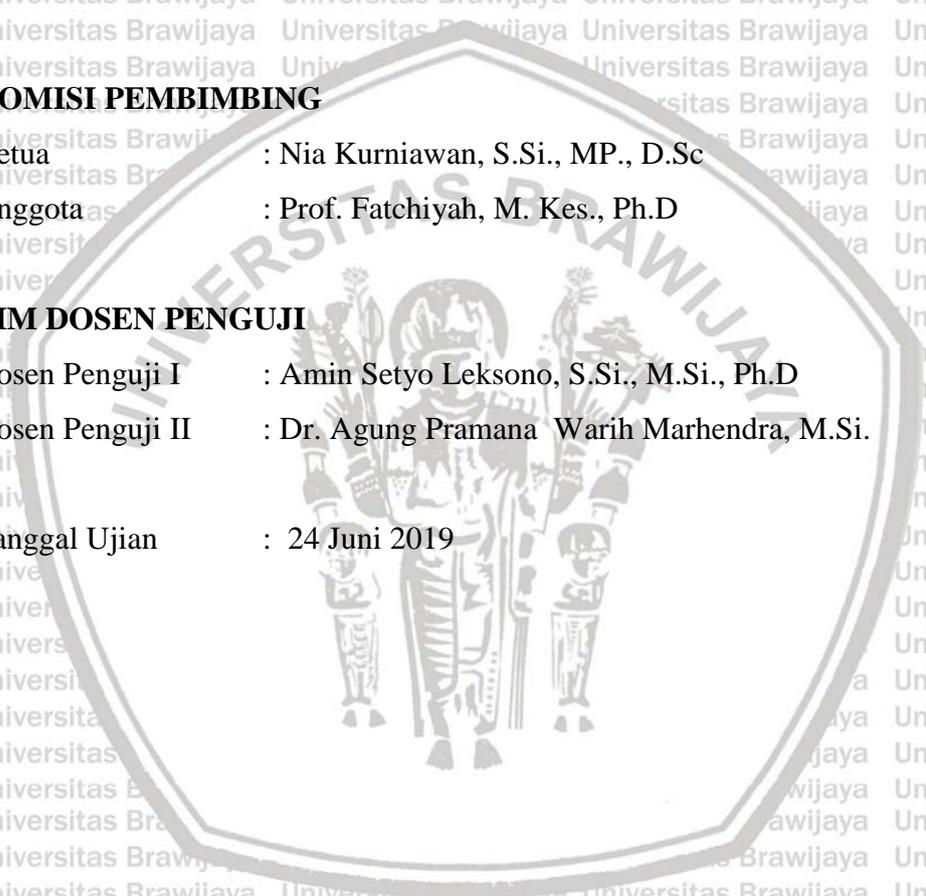
Anggota : Prof. Fatchiyah, M. Kes., Ph.D

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji I : Amin Setyo Leksono, S.Si., M.Si., Ph.D

Dosen Penguji II : Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si.

Tanggal Ujian : 24 Juni 2019



PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, dalam naskah tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Tesis (MAGISTER) ini dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, 6 Mei 2019

Nama : Lilin Ika Nur Indahsari

NIM : 176090100111012



RIWAYAT HIDUP

Lilin Ika Nur Indahsari, kelahiran Bojonegoro, 18 Juni 1994 adalah anak dari Ibu Zumaroh dan Bapak Gunanto, menempuh pendidikan SD hingga SMA di Bojonegoro,

lulus SMA pada 2011 dan melanjutkan studi jenjang S-1 di Universitas Negeri Surabaya pada Prodi Pendidikan Biologi dengan tugas akhir berjudul “Pengembangan

Instrumen Penilaian Keterampilan pada Materi Biologi Kelas X Semester I”. Pengalaman kerja sebagai asisten peneliti di NK research group Universitas Brawijaya dan asisten dosen di Universitas Negeri Surabaya.

Malang, Mei 2019

Penulis



PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



RINGKASAN

Studi Filogenetik Ular Pucuk (*Ahaetulla* sp. Link, 1802) (Serpentes: Colubridae) Berdasarkan Urutan Gen Cytochrome B (Cyt B) dan 12S rDNA di Paparan Sunda dan Sunda Kecil

Lilin Ika Nur Indahsari, Nia Kurniawan, Fatchiyah

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan

Alam, Universitas Brawijaya

2019

Sejarah Geologi wilayah Indonesia pada masa lalu yang berasal dari Paparan Sunda dan Paparan Sahul mempengaruhi pola distribusi fauna yang ada hingga saat ini. Selain itu, sejarah geologi juga mempengaruhi pola spesiasi organisme dikarenakan adanya proses adaptasi dan isolasi geografis. Salah satu fauna yang memiliki persebaran luas di Indonesia adalah ular pucuk (*Ahaetulla* sp.). Ular *Ahaetulla* terdistribusi luas dari Pulau Sumatra, Jawa, Kalimantan, Jawa, Bali, Nusa Tenggara, Sulawesi, dan pulau-pulau kecil di sekitarnya (Das, 2015). Meski telah terdistribusi secara luas di beberapa Pulau Indonesia, penelitian tentang filogenetik ular *Ahaetulla* masih berdasarkan data morfologi. Penelitian berdasarkan data morfologi menunjukkan tidak ada perbedaan karakter yang signifikan dari ular *A. prasina* dari beberapa pulau di Indonesia (Leo dkk, 2015). Oleh karena itu penelitian ini akan menentukan filogenetik *Ahaetulla* berdasarkan data molekuler yaitu gen Cyt B dan 12S rDNA yang merupakan bagian dari mtDNA. MtDNA banyak digunakan sebagai *barcode* untuk mengidentifikasi spesies karena mtDNA memiliki sifat maternal inheritance, conserve, dan polimorfisme (Figuroa dkk, 2016).

Berdasarkan urutan gen Cyt B dan 12S rDNA akan ditentukan pohon filogeni untuk ular *Ahaetulla* yang berasal dari Paparan Sunda dan Sunda Kecil. Isolasi DNA pada 16 sampel ular *Ahaetulla*, uji kualitatif DNA, amplifikasi dan sekuensing dilakukan untuk mendapatkan urutan gen Cyt B dan 12S rDNA. Analisis sekuens dan alignment dilakukan menggunakan *software* MEGA7.0, pembentukan pohon filogenetik menggunakan *software* PAUP dan Mr.Bayes, penentuan estimasi waktu divergensi menggunakan *software* BEAST, dan konstruksi *haplotype network* menggunakan *software* DNAsp dan Network5.0.

Hasil analisis jarak genetik pada Genus *Ahaetulla* menunjukkan adanya dua grup yang memiliki jarak genetik cukup besar, yaitu $>3\%$ untuk gen 12S-rDNA dan $>5\%$ untuk gen Cyt-B. Merujuk pada Jeong (2013), maka berdasarkan perbedaan jarak genetik teridentifikasi ada 2 spesies *Ahaetulla* yang berbeda. Berdasarkan hasil analisis morfologi ditentukan bahwa kedua spesies tersebut yaitu *A. prasina* dan *A. mycterizans* yang terdeteksi melalui perbandingan karakter diagnostik. Pohon filogenetik Genus *Ahaetulla* menunjukkan dua grup yang terpisah yaitu, yaitu grup *A. prasina* dan *A. mycterizans*. Hasil analisis filogenetik ini juga memunculkan temuan baru keberadaan *A. mycterizans* di Lombok. *Haplotype network* Genus *Ahaetulla* menggambarkan perbedaan antara kelompok *A. prasina* dan *A. mycterizans*. Perbedaan terdekat antara dua spesies tersebut diindikasikan adanya perbedaan 37 titik basa nukleotida pada gen 12S-rDNA, tepatnya *A. prasina* dari Malang dan *A. mycterizans* dari Banten. Perbedaan basa nukleotida antara *A. prasina* dari Malang dan *A. mycterizans* dari Lombok sejumlah 37 titik terjadi pada sekuens ke- 11-17, 64, 72, 111, 119, 126, 139, 175-178, 209, 219, 222-223, 232, 282-284, 306, 402, 508, 533, 554-555, 561-562, 554-555. Dari data tersebut bisa dianalisis bahwa perbedaan basa nukleotida pada gen 12S rDNA dari dua spesies ini banyak terjadi pada basa antara 11 sampai 284, sedangkan untuk sekuens antara 300-500 sedikit sekali terjadi mutasi. Berikutnya perbedaan banyak terjadi lagi untuk sekuens ke-508 sampai 555. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada sekuens 12S rDNA terdapat daerah yang mempunyai laju mutasi lebih tinggi dan ada daerah yang bersifat lebih conserve. Adanya daerah yang mengalami banyak titik mutasi tersebut mendorong adanya spesiasi yang membedakan karakter *A. prasina* dan *A. mycterizans*.

Estimasi waktu divergensi Genus *Ahaetulla* menunjukkan spesiasi Genus *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil terjadi pada akhir oligosen sekitar 24,9 Ma dimana pada masa itu terjadi proses spesiasi yang tinggi di kawasan Asia. Penemuan baru keberadaan *A. mycterizans* di Lombok dapat menambah daftar temuan spesies ular yang mendiami Pulau Sunda Kecil yang sebelumnya dilakukan De Lang (2011) sebanyak 29 spesies. Penemuan ini juga menambah area distribusi *A. mycterizans*, yang sebelumnya hanya tercatat di Jawa, Sumatra, Malaysia dan Thailand (wilayah Paparan Sunda).

Kata Kunci: *Ahaetulla mycterizans*, *Ahaetulla prasina* filogenetik, gen Cyt B, gen 16S rDNA.

SUMMARY

Study on Phylogenetic of Asian Vine Snake (*Ahaetulla* sp. Link, 1802) (Serpentes: Colubridae) Based on Sequences of Cytochrome B (Cyt-B) and 12S-rDNA Genes in Sundaland and Lesser Sunda

Lilin Ika Nur Indahsari, Nia Kurniawan, Fatchiyah

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan

Alam, Universitas Brawijaya

2019

The geological history of the Indonesia territory in the past that originated from the Sunda Exposure and Sahul Exposure influenced the pattern of fauna distribution that exists today (Hall, 2009). In addition, geological history also affects the pattern of organism speciation due to the process of adaptation and geographical isolation. One of the fauna that has widespread distribution in Indonesia is *Ahaetulla* snake. *Ahaetulla* snakes are widely distributed from Sumatra, Java, Kalimantan, Java, Bali, Nusa Tenggara, Sulawesi, and surrounding small islands (Das, 2015). Although it has been widely distributed on several Indonesian islands, research on phylogenetic analyses is still based on morphological data. Research based on morphological data shows that there is no significant difference characters in *A. prasina* from several islands in Indonesia (Leo et al, 2015). Therefore this study will determine the *Ahaetulla* phylogenetic profil based on molecular data, specifically Cyt B and 12S rDNA genes which are part of mtDNA. MtDNA is widely used as a barcode to identify species because mtDNA has the properties of maternal inheritance, conserve, and polymorphism (Figueroa et al., 2016).

Based on the Cyt B and 12S rDNA gene sequences, phylogeny trees for *Ahaetulla* snakes will be determined from the Sundaland and Lesser Sunda Islands. DNA isolation in 16 samples of *Ahaetulla* snake, DNA qualitative test, amplification and sequencing was carried out to obtain Cyt B and 12S rDNA gene sequences. Sequence and alignment analyses was performed using MEGA7.0 software, phylogenetic tree formation using PAUP and Mr.Bayes software, determination of divergence time estimation using BEAST software, and network haplotype construction using DNAsp and Network5.0 software.

The results of the genetic distance analysis in Genus *Ahaetulla* show that there are two groups that have quite large genetic distances, there are >3% for the 12S-rDNA gene

and >5% for the Cyt-B gene. Referring to Jeong (2013) then, based on differences in genetic distance identified there are two different *Ahaetulla* species. Based on the results of the morphological analysis it was determined that the two species were *A. prasina* and *A. mycterizans* detected by some diagnostic characters. The phylogenetic tree of Genus *Ahaetulla* shows two separate groups, the group of *A. prasina* and *A. mycterizans*. The results of this phylogenetic analysis also give evidence to new findings about the existence of *A. mycterizans* in Lombok. Haplotype network of Genus *Ahaetulla* describes the difference between *A. prasina* and *A. mycterizans* groups. The closest difference between the two species is indicated by the difference of 33 nucleotide sites in the 12S-rDNA gene, precisely *A. prasina* from Malang and *A. mycterizans* from Banten. The difference in nucleotide bases between *A. prasina* from Malang and *A. mycterizans* from Lombok in 37 points occurred in the 11-17, 64, 72, 111, 119, 126, 139, 175-178, 209, 219, 222-223, 232, 282-284, 306, 402, 508, 533, 554-555, 561-562, 554-555 sites. From these data, it can be analyzed that the differences in nucleotide bases in the 12S rDNA gene from these two species occurred mostly in bases between 11 and 284, whereas for the sequence between 300-500 there is very little mutation. Then, there are many more differences between 508-555 sites. This shows that in the 12S rDNA sequence there are regions that have a higher mutation rate and the regions that are more conserve. The existence of areas that has many points of mutation encourages speciation that distinguishes the characters of *A. prasina* and *A. mycterizans*.

The estimated time of divergence shows the speciation of Genus *Ahaetulla* on Sundaland and Lesser Sunda occurred at the end of the oligocene around 24.9 Ma, a time when there was a high speciation process in the Asian region. The new discovery of the existence of *A. mycterizans* in Lombok can add to the list of findings of snake species that inhabit the Lesser Sunda Island, which was previously carried out by De Lang (2011) of 29 species. This discovery also added to the distribution area of *A. mycterizans*, which had previously only been recorded in Java, Sumatra, Malaysia and Thailand (the Sunda Shelf region).

Keywords: *Ahaetulla mycterizans*, *A. prasina*, Cyt B gene, 12S rDNA gene, Phylogenetics.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT, atas segala limpahan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga dapat menyelesaikan naskah Tesis yang berjudul “Studi Filogenetik Ular Pucuk (*Ahaetulla* sp. Link, 1802) (Serpentes: Colubridae) Berdasarkan Urutan Gen Cytochrome B (Cyt B) Dan 12S rDNA Di Paparan Sunda Dan Sunda Kecil”. Penelitian ini didanai oleh PEER Science USAID PROJECT “Diversification and Inventory of the Lowland Herpetofauna of Java and Sumatra”. Hormat dan ucapan terima kasih ditunjukkan kepada:

1. **Jhelang Annovasho, M. Si, dan Nawalintang Tsaqifulilmi** sebagai motivasi tersebar bagi penulis untuk menyelesaikan tugas belajar dengan baik
2. **Ibu Zumaroh, Bapak Gunanto, Ibu Siyam Praptining, S. Pd. SD., Bapak Suyitno, dan Adik Dewi Ratnasari** yang selalu mendukung, memberikan doa dan semangat dari awal sampai akhir masa perkuliahan penulis.
3. **Bapak Nia Kurniawan D. Sc. dan Ibu Prof. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D** selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan bimbingan, gagasan, dan motivasinya kepada penulis.
4. **Bapak Amin Setyo Leksono M.Si., Ph.D dan Bapak Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si** selaku Dosen Penguji, yang telah memberikan masukan dan saran dalam penulisan naskah tesis penulis.
5. **Bapak/Ibu Dosen Biologi FMIPA UB**, yang telah memberikan ilmu selama penulis dalam masa perkuliahan.
6. **Ahmad Muammar Khadafi, M.Si, Fitra Arya D. N, M.Si., M. Fahmi, M Si. dan seluruh anggota Grup peneliti herpetofauna NK Research** yang telah meluangkan waktu untuk membantu penelitian tesis penulis.
7. **Dewi Ratih Tirto Sari, S.Si, dan seluruh anggota Pusat Studi Smonaganes dan TADICOBIO** yang telah meluangkan waktu membantu penulis melakukan penelitian.
8. **Rekan-rekan S2 Biologi UB, serta seluruh civitas akademik Jurusan Biologi dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya.**

Penulisan tesis ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran pembaca sebagai penyempurnaan penulisan dan penelitian selanjutnya.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	v
RIWAYAT HIDUP	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Sejarah Geologi Paparan Sunda dan Sunda Kecil	5
2.2 Konsep Spesies dan Spesiasi.....	9
2.3 Analisis Filogenetik.....	13
2.4 Estimasi Waktu Divergensi.....	15
2.5 DNA Barcoding.....	17
2.6 Gen Cyt B dan Gen 12S rDNA.....	18
2.6 Genus <i>Ahaetulla</i>	19
2.7 Kerangka Konsep Penelitian.....	21



BAB III. METODE PENELITIAN	23
3.1 Waktu dan Tempat	23
3.2 Kerangka Operasional	25
3.3 Koleksi Sampel	25
3.4 Isolasi DNA	26
3.5 Uji Kualitatif DNA	26
3.6 Amplifikasi dan Sequencing Gen Cyt B dan 12S rDNA	27
3.7 Konstruksi Pohon Filogenetik	27
3.7.1 Analisis Sekuens dan Analisis p-distance	27
3.7.2 Analisis Maximum Likelihood dan Maximum Parcimony	28
3.7.3 Analisis Bayesian Inference	28
3.8 Estimasi Waktu Divergensi	28
3.9 Konstruksi Haplotype Network	29
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Jarak Genetis Genus <i>Ahaetulla</i>	31
4.2 Morfologi Genus <i>Ahaetulla</i>	34
4.3 Hubungan Filogenetik Genus <i>Ahaetulla</i>	36
4.4 Haplotype Network Genus <i>Ahaetulla</i>	37
4.5 Estimasi Waktu Divergensi Genus <i>Ahaetulla</i>	40
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN	45
5.1 Simpulan	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Daftar sampel ular <i>Ahaetulla</i> yang digunakan dalam penelitian.....	25
2	Jarak genetik antar Genus <i>Ahaetulla</i> di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen 12S-rDNA.....	32
3	Jarak genetik antar Genus <i>Ahaetulla</i> di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen Cyt-B.....	33
4	Perbandingan morfologi Genus <i>Ahaetulla</i> berdasarkan identifikasi morfometri dan meristik.....	35
5	Waktu divergensi Genus <i>Ahaetulla</i> dengan nilai 95% Credible Interval (CI) dari <i>relaxed molecular clock</i> Bayesian menggunakan gen 12S-rDNA.....	41



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Rekonstruksi sejarah geologi Paparan Sunda	6
2	Kepulaun Nusa Tenggara atau Sunda Kecil	7
3	Proses rekonstruksi tektonik dan pembentukan busur Banda, Kepulauan Nusa Tenggara	9
4	Koleksi sampel Ular <i>Ahaetulla</i> sp. dari Lombok, Nusa Tenggara Barat.....	20
5	Kerangka Konsep Penelitian.....	22
6	Kerangka Operasional Penelitian.....	24
9	Perbandingan morfologi kepala antara <i>A. mycterizans</i> dan <i>A. prasina</i> pada penelitian	35
7	Pohon filogenetik Genus <i>Ahaetulla</i> di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen 12S-rDNA dan Cyt-B dengan analisis ML dan BI ...	37
8	Haplotype Network Genus <i>Ahaetulla</i> di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen 12S-rDNA.	39
10	Kronogram waktu divergensi ular Genus <i>Ahaetulla</i> di Indonesia yang dikonstruksi menggunakan relaxed normal clock Bayesian dengan 95% credible interval (CI) berdasarkan urutan gen 12S-rDNA	41
11	Rekonstruksi penyatuan daratan Paparan Sunda dan Sunda Kecil pada zaman es (Pleistosen)	43

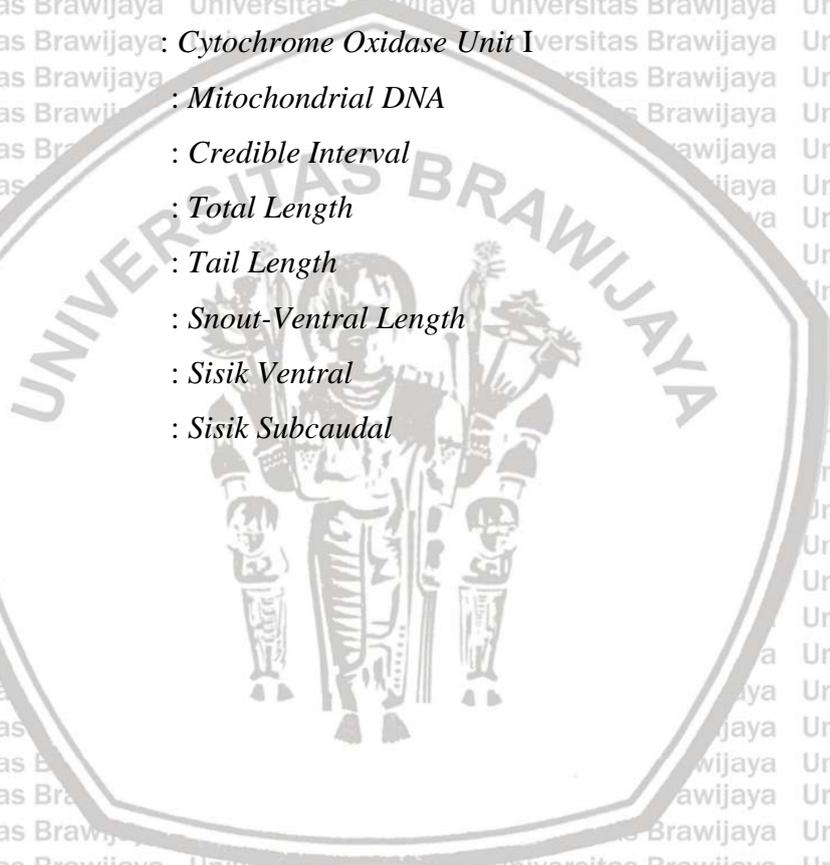
DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Sertifikat Keterangan Kelaikan Etik Penelitian	51
2	Hasil Elektroforesis Gen 12S-rDNA setelah diamplifikasi.....	52
3	Hasil <i>alignment</i> gen 12S-rDNA pada Genus <i>Ahaetulla</i>	53
4	Bukti <i>LoA</i> dari Jurnal.....	54



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
mya	: <i>million years ago</i>
DNA	: <i>Dioxyribo Nucleotida Acid</i>
rDNA	: <i>Ribosomal DNA</i>
IUCN	: <i>International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>
Cyt B	: <i>Cytochrome B</i>
COI	: <i>Cytochrome Oxidase Unit I</i>
mtDNA	: <i>Mitochondrial DNA</i>
CI	: <i>Credible Interval</i>
TL	: <i>Total Length</i>
TaL	: <i>Tail Length</i>
SVL	: <i>Snout-Ventral Length</i>
VEN	: <i>Sisik Ventral</i>
SC	: <i>Sisik Subcaudal</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kepulauan Indo-Australia merupakan wilayah geografi tropis paling kompleks di bumi dan juga mengalami perubahan geologi yang kompleks. Wilayah ini meliputi Paparan Sunda dan Paparan Sahul. Indonesia merupakan negara yang secara geografis terbentuk oleh Paparan Sunda di sisi barat dan Paparan Sahul di sisi timur (Hall, 2009).

Paparan Sunda mengalami proses penyatuan dan pemisahan kepulauan, sejak awal zaman tersier Eosen (~50 juta tahun yang lalu) hingga zaman Pleistosen (~250.000 tahun yang lalu). Peristiwa tersebut diakibatkan oleh proses pergeseran dan tumbukan lempeng antara India-Australia, Eurasia, Pasifik dan Filipina, serta proses fluktuasi air laut (Lohman dkk., 2011). Paparan Sunda di wilayah Indonesia saat ini memisah menjadi beberapa pulau yaitu Sumatra, Kalimantan, Jawa serta pulau-pulau kecil di sekitarnya. Proses tersebut memicu proses isolasi populasi dan pembentukan pola persebaran spesies yang unik sehingga membentuk diversitas spesies yang tinggi di Paparan Sunda (Tjong dkk, 2010).

Kepulauan Sunda Kecil merupakan wilayah kepulauan yang terbentuk antara Paparan Sunda dan Paparan Sahul. Berdasarkan sejarah geologi tersebut, Sunda Kecil bisa dikatakan sebagai daerah peralihan untuk organisme yang tersebar di antara Paparan Sunda dan Sahul serta sebagai filter dua arah untuk organisme yang tersebar di antara dua paparan besar tersebut (Hall, 2012). Wilayah ini terletak di bagian tenggara Indonesia dan membentang antara Bali di bagian barat dan Papua Nugini di bagian timur. Kepulauan Sunda Kecil ini sangat berbeda dengan daerah lain di Indonesia. Iklim yang lebih kering menghasilkan flora dan fauna yang berbeda. Secara biogeografis, kawasan ini sangat menarik karena fauna di Sunda Kecil merupakan campuran unsur barat dan timur wilayah Indonesia. Banyak spesies endemik dan langka menghuni Kepulauan Sunda Kecil, termasuk spesies ular (Reilly, 2016). Meskipun Sunda Kecil memiliki peran penting dalam pengembangan biodiversitas di Indonesia, kawasan ini masih mendapat sedikit perhatian dari peneliti di bidang biogeografi.

Proses geologis Paparan Sunda dan Sunda kecil menyebabkan beberapa jenis spesies mengalami pemisahan atau persebaran, sehingga spesies tersebut harus

beradaptasi dengan kondisi lingkungan, suhu, dan habitat yang baru (Wheeler & Meyer, 2000). Akibat dari peristiwa tersebut dapat memunculkan karakter morfologi, anatomi, dan molekuler baru yang sangat berbeda dengan spesies sebelumnya dalam satu populasi. Peristiwa ini disebabkan oleh adanya mekanisme isolasi yang terjadi antara populasi dan interaksi antara populasi dengan lingkungannya sebagai bentuk adaptasi untuk dapat mempertahankan siklus kehidupan dan keturunannya. Di sisi lain, peristiwa tersebut juga memunculkan diferensiasi karakter suatu spesies sebagai bentuk adanya interaksi antara kedua faktor tersebut (Morley, 2000).

Salah satu jenis hewan yang mengalami dampak dari adanya peristiwa tersebut dan telah tersebar merata hampir di seluruh wilayah Paparan Sunda dan Sunda Kecil adalah Ular Pucuk (*Ahaetulla* sp.) Ular pucuk adalah salah satu ular yang termasuk dalam Famili Colubridae dan spesiesnya cukup sering ditemukan di Indonesia. Menurut Das (2010), ada tiga jenis *Ahaetulla* yang ditemukan di Indonesia, yaitu *A. prasina* (Boie, 1827) di Bali, Jawa, Sumatra, dan Kalimantan, *A. mycterizan* (Linneaus, 1758) di Jawa dan Sumatra, serta *A. fasciolata* (Fischer, 1885) di Sumatra, Kepulauan Riau, dan Kalimantan. Penelitian oleh De Lang (2011) menemukan bahwa *A. prasina* juga ditemukan di daerah Nusa Tenggara Barat. Meski telah terdistribusi secara luas di Indonesia, belum diteliti status filogenetik ular *Ahaetulla* tersebut baik secara molekuler maupun morfologis mengingat sejarah geologi pulau-pulau tersebut banyak memunculkan isolasi spesies dan diferensiasi karakter.

Filogenetik merupakan kajian mengenai hubungan evolusioner kelompok makhluk hidup berdasarkan persamaan dan perbedaan morfologi, anatomi, dan molekuler. (Nei & Kumar, 2000). Berbagai jenis data dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dan sejarah evolusi organisme atau kelompok tertentu. Cara klasik untuk memperkirakan hubungan kekerabatan antar organisme adalah dengan membandingkan karakter morfologinya. Penelitian oleh Leo dkk (2015) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan pada karakter morfologi *A. prasina* di beberapa daerah di Pulau Jawa dan Sulawesi. Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa *A. prasina* memiliki daya adaptasi yang tinggi pada lingkungan sehingga tidak ada variasi morfologi yang ditunjukkan secara signifikan. Akan tetapi, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai status filogenetik ular *Ahaetulla* dengan analisis yang lebih akurat dari analisis morfologis.

Cara yang lebih modern dan akurat untuk mengetahui profil filogenetik yaitu menggunakan data molekuler berupa DNA, protein atau fragment tertentu. DNA

barcode adalah suatu urutan basa DNA yang berbeda-beda antar spesies, namun hampir sama di setiap spesies sehingga bisa dijadikan penanda spesifik suatu spesies (Nei & Kumar, 2000). DNA *barcoding* adalah proses penggunaan sekuens pendek DNA dari DNA kromosomal maupun ekstra kromosomal sebagai alat identifikasi spesies (Pieterse dkk. 2010). Selain itu, data DNA *barcode* juga bisa digunakan untuk mengstimasi waktu divergensi genetik suatu spesies. Estimasi waktu divergensi genetik merupakan tahapan lanjutan dari penelitian mengenai penguraian hubungan filogenetik yang dapat memberikan informasi biogeografi dan mengevaluasi sejarah spesiasi dari Ular *Ahaetulla* di Indonesia (Simon dkk., 2005). DNA barcode juga bisa digunakan untuk mengonstruksi *Haplotype Network* pada spesies yang memiliki populasi berbeda. *Haplotype network* adalah sekuens DNA tertentu pada suatu spesies yang memiliki urutan yang sama yang berasal dari populasi yang berbeda yang ditampilkan dalam bentuk skematis (Ferrerri dkk, 2011). Konstruksi *haplotype network* adalah pendekatan yang banyak digunakan untuk menganalisis dan memvisualisasikan hubungan antara urutan DNA dalam populasi atau spesies.

Data molekuler yang sering digunakan dalam penelitian filogenetik *Ahaetulla* adalah gen *Cytochrome B* (Cyt B) dan 12S rDNA. Figueroa dkk. (2016) menggunakan gen Cyt-B dan 12S-rDNA sebagai *barcode* untuk menentukan profil filogenetik 1592 ular pada Famili Colubridae. Belum adanya profil filogenetik Genus *Ahaetulla* di Indonesia berdasarkan data molekuler menyebabkan biosistematika Genus *Ahaetulla* di Indonesia juga belum teridentifikasi lebih dalam. Selain itu, kemiripan morfologi antara *A. prasina* dan *A. mycterizans* juga bisa memunculkan misidentifikasi pada dua spesies tersebut sehingga diperlukan data molekuler. Dengan belum adanya penelitian Genus *Ahaetulla* berdasarkan data molekuler menyebabkan estimasi waktu divergensi genetik dan *haplotype network* juga belum diketahui. Sejauh ini penelitian pada Genus *Ahaetulla* baru dilakukan pada tahap morfologi oleh Leo dkk (2015) pada populasi di Jawa dan Miralles & David (2010) di Sumatra. Belum ada penelitian yang menggabungkan spesies *Ahaetulla* dari kedua pulau tersebut secara molekuler. Penemuan spesies baru dan penguraian hubungan kekerabatan dari suatu spesies tidak hanya berkontribusi dalam mengevaluasi diversitas fauna, melainkan juga dapat digunakan untuk mengevaluasi sejarah geologi melalui studi estimasi waktu divergensi genetik (Nishikawa dkk., 2012).

Berikutnya, Ular *Ahaetulla* ini memiliki peran ekologis sebagai pengendali populasi cicak, kadal, dan tikus karena ular ini merupakan predator bagi hewan-hewan

tersebut. Selain itu, karena *Ahaetulla* bukan merupakan ular berbisa, maka ular ini juga berperan sebagai mangsa bagi ular berbisa lain dan biawak. Berdasarkan penjelasan di atas, status filogenetik ular *Ahaetulla* berdasarkan data molekuler, estimasi waktu divergensi, dan *haplotype network* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil belum diteliti. Oleh karena itu, penelitian mengenai status filogenetik ular *Ahaetulla* berdasarkan analisis molekuler gen Cyt-B dan 12S-rDNA penting untuk dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana profil filogenetik ular *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen Cyt-B dan 12S-rDNA?
2. Bagaimana *haplotype network* yang terbentuk pada ular *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen Cyt-B dan 12S-rDNA?
3. Kapan estimasi waktu divergensi ular *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen Cyt-B dan 12S-rDNA?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mendeskripsikan profil filogenetik ular *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen Cyt-B dan 12S-rDNA
2. Menganalisis *haplotype network* yang terbentuk pada ular *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen Cyt-B dan 12S-rDNA
3. Menganalisis waktu divergensi ular *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen Cyt-B dan 12S-rDNA.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diambil dari penelitian ini yaitu:

1. Memberikan data filogenetik berdasarkan data molekuler untuk ular *Ahaetulla*.
2. Memberikan informasi mengenai evolusi dan sejarah persebaran dari ular *Ahaetulla*.
3. Memberikan data untuk sistem taksonomi ular *Ahaetulla*
4. Memberikan informasi dasar untuk melestarikan keragaman ular *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil.

BAB II

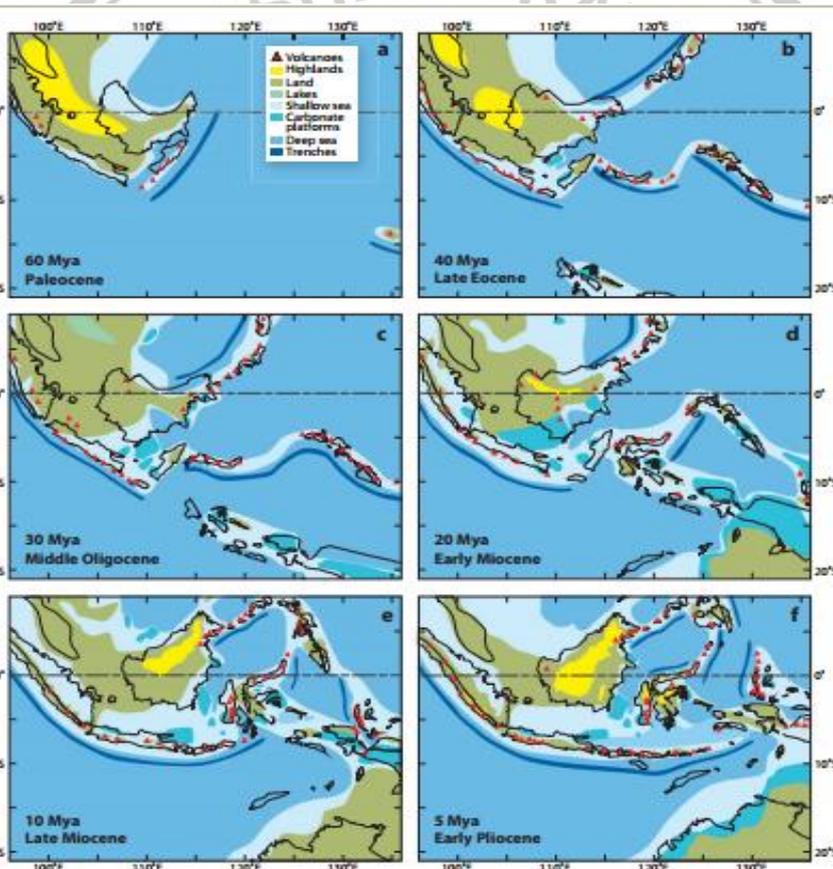
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sejarah Geologi Paparan Sunda dan Sunda Kecil

Paparan Sunda merupakan benua yang terdapat di ujung selatan Eurasia pada permulaan era Kenozoikum, diperkirakan sekitar 65 Mya. Proses perubahan Paparan Sunda diperkirakan terjadi sekitar 60 Mya pada masa Paleosen hingga masa awal Pliosen sekitar 5 Mya (Gower dkk., 2012). Sedangkan menurut Hall (2011), proses perubahan Paparan Sunda diperkirakan telah terjadi pada masa Paleosen sekitar 60 Mya, masa akhir Eosen (~40 Mya), masa pertengahan Oligosen (~30 Mya), masa awal Miosen (~20 Mya), masa akhir Miosen (~10 Mya), dan masa awal Pliosen (~5 Mya) (Gambar 2.1).

Berdasarkan sejarah perubahan permukaan air laut, terjadi penurunan permukaan air laut yang besar pada zaman Pleistosen atau glasial maksimum (~250.000 ya). Akibatnya adalah penggabungan kembali Semenanjung Malaysia, Kalimantan, Sumatera, dan Jawa menjadi satu kontinen Dataran Sunda yang luas. Dataran rendah luas dengan relief topografi besar dan juga sungai besar serta panjang yang mengalir ke arah Laut Cina Selatan dan Laut Jawa terdapat pada zaman tersebut. Pemisahan Semenanjung Malaysia, Kalimantan, Sumatera, dan Jawa kembali terjadi dengan berakhirnya zaman glasial maksimum, ~10.000–17.000 ya (Tjong dkk., 2010). Keunikan Paparan Sunda telah diketahui sejak awal tahun 1869 oleh Alfred Russel Wallace yang menyatakan bahwa Jawa, Sumatra, Kalimantan, dan Semenanjung Malaysia pernah bersatu membentuk benua, namun kemudian terpisah secara geologis. Selain itu, Sumatra, Kalimantan, Jawa, dan Semenanjung Malaysia pernah bersatu membentuk daratan luas yang disebut Paparan Sunda pada masa Pliosen dan Pleistosen, hingga 10.000 tahun lalu. Pola distribusi hewan pada kawasan Wallace dapat dilihat sebagai hasil dari perpindahan fauna Pleistosen melalui Paparan Sunda. Pola unik tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh iklim kering dan basah pada Paparan Sunda yang menyebabkan berkurangnya luas kawasan hutan tropis dan spesies yang hidup di dalamnya. Paparan Sunda pada dasarnya merupakan suatu dataran yang membentang sangat luas yang kemudian karena adanya fluktuasi atau naik turunnya air laut dan bencana alam, yaitu erupsi vulkanik dari toba serta pergeseran lempeng, menyebabkan dataran tersebut terpisah menjadi empat Pulau besar yaitu Kalimantan, Sumatra, Jawa dan Semenanjung Malaysia (Lohman dkk., 2011).

Berdasarkan bukti sejarah yang telah ditemukan, diketahui bahwa pada zaman Paleosen *sundaland* merupakan suatu daratan yang sangat luas, sehingga dapat diperkirakan bahwa spesies yang ada di daerah tersebut sangatlah banyak dengan berbagai karakter yang sama bahkan berbeda. Kemudian karena adanya beberapa faktor yang menyebabkan Paparan Sunda mengalami perpecahan menjadi empat Pulau besar yaitu Kalimantan, Sumatra, Jawa dan Semenanjung Malaysia. Hal tersebut berdampak terhadap filogeografi genetik dari suatu spesies makhluk hidup, dimana ketika terjadi kenaikan air laut spesies yang terdapat di daerah Kalimantan, Jawa, Sumatra, dan Semenanjung Malaysia akan mulai terisolasi dan menyesuaikan dengan keadaan (Hall, 2011). Ketika air laut surut, maka spesies yang terdapat di daerah Sumatra akan mampu berpindah ke daerah Kalimantan, Jawa atau bahkan Semenanjung Malaysia, sehingga dengan sangat mudah masing-masing spesies tersebut akan menyebar ke seluruh daerah dan melakukan perkawinan dengan spesies yang terdapat di daerah yang berbeda.



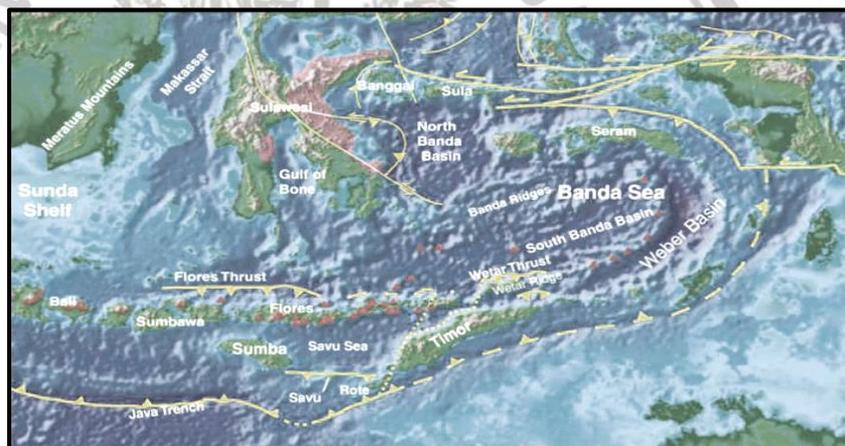
(Lohman dkk., 2011)

Gambar 2.1. Rekonstruksi sejarah geologi Paparan Sunda

Perluasan dan pemisahan geografi yang disebabkan oleh adanya fluktuasi air laut dan fenomena alam selama periode Pleistosen akan menyebabkan adanya perubahan distribusi

fauna yang terdapat di *Sundaland*, mulai dari fauna yang terdapat di daratan utama hingga Pulau-Pulau kecil yang berada di sekitarnya. Adanya perubahan habitat yang disebabkan oleh iklim dan proses evolusi tersebut memberikan dampak yang sangat signifikan pula terhadap tingkat perubahan variasi dan karakter pada individu suatu spesies akibat adaptasi dengan kondisi lingkungannya (Wheeler & Meyer, 2000)

Kepulauan Nusa Tenggara atau Lesser Sunda merupakan salah satu deretan kepulauan terbesar di Indonesia. Kepulauan tersebut terletak di sisi timur pulau Jawa dan tepat di utara Australia Barat. Kepulauan ini terdiri dari banyak sekali fragmentasi pulau-pulau kecil dengan enam pulau terbesarnya yaitu Bali, Lombok, Sumbawa, Flores, Sumba, dan Timor. Kepulauan ini merupakan kepulauan unik, baik dari segi vegetasi dan kekhasan fauna. Salah satunya yang paling terkenal adalah pulau Flores sebagai habitat asli dari Komodo. Hal tersebut diduga berasal dari proses pembentukan kepulauan ini di masa lampau. Teori pembentukan Lesser Sunda merupakan perbincangan hangat dan menarik di kalangan peneliti. Sejumlah besar teori mendeskripsikan proses pembentukan kepulauan ini, yang sejarah geologinya dapat dilihat dari gerakan lempeng tektonik.



(Minarwan, 2012)

Gambar 2.2. Kepulauan Nusa Tenggara atau Sunda Kecil. Titik-titik merah merupakan persebaran gunung berapi di kepulauan tersebut.

Deretan pegunungan berapi terbentang dari ujung barat hingga timur, membentuk busur magmatik yang dikenal sebagai busur Banda (Minarwan, 2012). Busur Banda dimulai dari pulau Flores yang terletak diujung timur Sumbawa. Busur Banda terbagi menjadi pegunungan berapi dalam yang terdiri dari pulau Flores, Alor, Wetar dan pulau kecil disekitarnya. Sementara itu, pulau Sumba, Timor, Babar, Tanimbar dan Kai termasuk ke dalam lingkaran busur luar yang tidak dilewati oleh jalur magmatik. Pembentukan busur Banda ini sangat erat kaitannya dengan pergerakan lempeng tektonik di masa lampau.

Teori pembentukan kepulauan Lesser Sunda banyak disampaikan berdasarkan pandangan terbentuknya busur Banda. Michaux (2010) memberikan gambaran mengenai topografi dan seismisitas dari keseluruhan sistem busur berdasarkan aktivitas yang dikendalikan oleh gravitasi sehingga menghasilkan suatu bentuk kepulauan yang unik. Gagasan tersebut merupakan gagasan paling awal dan dijadikan sebagai dasar dari peneliti di masa selanjutnya untuk mulai tertarik dalam usaha eksplorasi kepulauan Lesser Sunda.

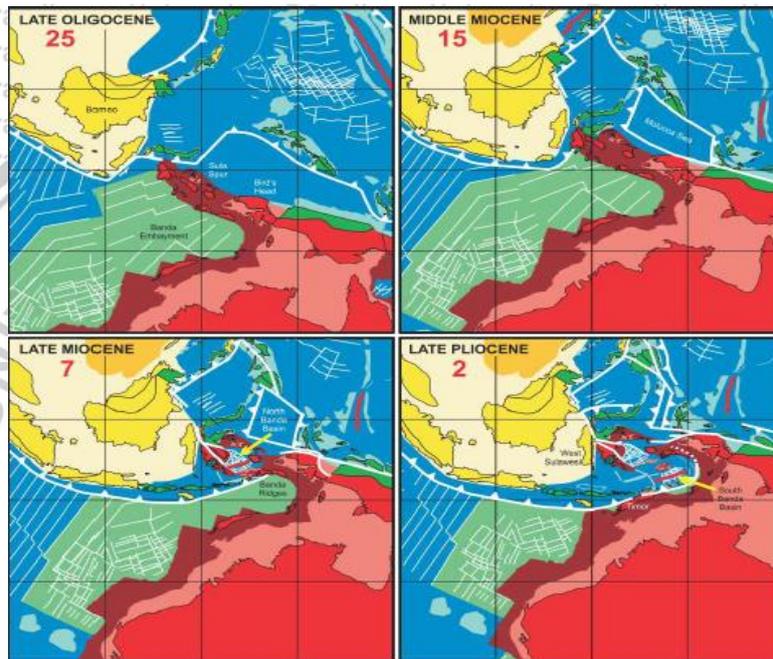
Indonesia diketahui sebagai salah satu negara yang berdiri diatas tiga lempeng besar bumi, yaitu Indo-Australia, Eurasia, dan Pasifik. Lempeng Indo-Australia mengalami subduksi terus menerus membentuk laut dalam sepanjang pantai Sumatra barat hingga selatan Pulau Jawa. Pergerakan lempeng Indo-Australia yang secara terus menerus tersebut secara tidak langsung berpengaruh terhadap garis terluar dari benua Australia (Minarwan, 2012). Tepi luar benua yang terus terdesak membentuk lipatan ke dalam, yaitu yang saat ini disebut sebagai Busur Banda. Pelipatan dari tepi luar benua Australia ini menyebabkan deformasi pada bagian utara dari pulau Papua, membentuk kepulauan tapal kuda (*horse-shoe shaped island*), yaitu pulau-pulau yang berada di timur busur Banda.

Rekonstruksi tektonik dari Lesser Sunda, menurut Michaux (2010) dapat diperkirakan dari konfigurasi sederhana kolisi dari lempeng-lempeng sejak tahun 35 Ma hingga saat ini. Rekonstruksi yang dilakukan oleh Charlton dikembangkan berdasarkan pengamatan terhadap kompleksitas kepulauan di Indonesia yang dibentuk melalui kolisi, identifikasi dan pemisahan *post*-kolisi. Rekonstruksi ini dimulai pada tahun 35 Ma, pada saat itu pulau Sumba merupakan bagian dari Sunda Land dan lokasinya berdekatan dengan Bali, Lombok, Sumbawa, dan Flores. Namun, berdasarkan teori ini, belum diketahui formasi vulkanik dari pembentukan Lesser Sunda. Lempeng Australia pada tahun 35 Ma, juga termasuk dari *Greater Sula Spur* yang memisahkan Lesser Sunda berdasarkan subduksi dalam ke arah utara. Zona subduksi ini terorientasi ke arah barat daya, membentuk lekukan lempeng yang memisahkan Sunda Land dan perairan Filipina ke utara dan lempeng Australia ke arah selatan. Proses rekonstruksi dari permodelan tersebut telah memberikan banyak sekali pendekatan baru untuk menginterpretasikan kawasan Lesser Sunda.

Rekonstruksi tektonik dari Lesser Sunda, menurut Charlton (2000) dapat diperkirakan dari konfigurasi sederhana kolisi dari lempeng-lempeng sejak tahun 35 Ma hingga saat ini.

Rekonstruksi yang dilakukan oleh Charlton dikembangkan berdasarkan pengamatan terhadap kompleksitas kepulauan di Indonesia yang dibentuk melalui kolisi, identifikasi dan

pemisahan *post*-kolisi. Rekonstruksi ini dimulai pada tahun 35 Ma, pada saat itu pulau Sumba merupakan bagian dari Sunda Land dan lokasinya berdekatan dengan Bali, Lombok, Sumbawa, dan Flores. Namun, berdasarkan teori ini, belum diketahui formasi vulkanik dari pembentukan Lesser Sunda. Lempeng Australia pada tahun 35 Ma, juga termasuk dari *Greater Sula Spur* yang memisahkan Lesser Sunda berdasarkan subduksi dalam ke arah utara. Zona subduksi ini terorientasi ke arah barat daya, membentuk lekukan lempeng yang memisahkan Sunda Land dan perairan Filipina ke utara dan lempeng Australia ke arah selatan. Proses rekonstruksi dari permodelan tersebut telah memberikan banyak sekali pendekatan baru untuk menginterpretasikan kawasan Lesser Sunda.



Gambar 2.3 Proses rekonstruksi tektonik dan pembentukan busur Banda, Kepulauan Nusa Tenggara (Hall, 2012)

2.2 Konsep Spesies dan Spesiasi

Munculnya keanekaragaman konsep spesies dilatarbelakangi oleh dua alasan mendasar. Alasan pertama adanya perbedaan pemahaman tentang spesiasi yang merupakan proses munculnya suatu spesies baru. Karena spesiasi bukan hanya menarik perhatian para ahli evolusi, tetapi juga telah memikat perhatian dari berbagai disiplin bidang biologi lainnya seperti morfologi, genetika, ekologi, fisiologi, paleontologi, biologi reproduksi, dan biologi tingkah laku. Alasan kedua adalah karena spesies merupakan hasil dari proses evolusi yang terus berjalan. Artinya bahwa konsep spesies yang dibuat berdasarkan proses

spesiasi yang masih sebagian berjalan akan berbeda dengan konsep spesies yang dibuat ketika spesies itu benar-benar sudah sampai pada akhirnya.

Campbell (2003) mengemukakan ada beberapa konsep spesies antara lain:

a) Konsep spesies Biologis mendefinisikan suatu spesies sebagai suatu populasi atau kelompok populasi yang anggota-anggotanya memiliki kemampuan untuk saling mengawini satu sama lain di alam dan menghasilkan keturunan yang dapat hidup dan fertil jika kawin dengan spesies lain. Dengan kata lain suatu spesies biologi adalah unit populasi terbesar dimana pertukaran genetik mungkin terjadi dan terisolasi secara genetik dari populasi lain semacamnya. Anggota suatu spesies biologis dipersatukan oleh ciri kesesuaian ciri reproduksi. Semua manusia termasuk ke dalam spesies biologis yang sama. Sebaliknya manusia dan simpanse tetap merupakan spesies biologis yang sangat jelas berbeda meskipun hidup di wilayah yang sama karena kedua spesies itu tidak dapat saling mengawini.

b) Konsep spesies pengenalan menekankan pada adaptasi perkawinan yang telah tetap dalam suatu populasi. Menurut konsep ini suatu spesies didefinisikan oleh suatu kumpulan sikap dan ciri unik yang memaksimalkan keberhasilan perkawinan ciri molekuler morfologis perilaku yang memungkinkan individu untuk mengenali pasangan kawinnya. Konsep ini cenderung berfokus pada sifat dan ciri yang dipengaruhi oleh seleksi alam dan terbatas hanya pada spesies yang bereproduksi secara seksual.

c) Konsep spesies kohesi berfokus pada mekanisme yang mempertahankan spesiesnya sebagai bentuk fenotip tersendiri. Konsep ini dapat diterapkan pada organisme yang bereproduksi secara aseksual. Konsep ini juga mengakui bahwa perkawinan silang diantara beberapa spesies menghasilkan keturunan hibrida yang fertil dan terkadang hibrida itu berhasil kawin dengan salah satu spesies induknya. Konsep ini menekankan pada adaptasi yang mempertahankan spesies tetua tetap utuh meskipun ada sedikit aliran gen diantara mereka. Konsep ini dapat digunakan pada setiap kasus yang melibatkan hibridisasi.

d) Konsep spesies ekologis mendefinisikan spesies pada tempat dimana mereka hidup dan apa yang mereka lakukan dan bukan dari penampakan mereka. Suatu spesies ekologis didefinisikan oleh peranan unik yang dimainkannya atau posisi dan fungsi spesifiknya dalam lingkungan. Contohnya dua populasi hewan yang tampak identik dapat dikatakan merupakan dua spesies ekologis yang berbeda jika masing-masing hanya ditemukan dalam jenis lingkungan spesifik (misalnya kolam air tawar dengan kumpulan keadaan kimia, biologi, dan fisik yang khas).

e) Konsep spesies evolusioner mendefinisikan suatu spesies sebagai suatu urutan populasi tetua dan keturunannya yang berkembang secara bebas dari kelompok lain. Masing-masing spesies evolusioner memiliki peranan yang unik dan terpisah dalam lingkungan, setiap peran tertentu melibatkan sekumpulan kekuatan seleksi alam yang spesifik (tekanan selektif). Dengan demikian populasi yang membentuk suatu spesies dipengaruhi dan disatukan oleh sekumpulan tekanan selektif yang uni.

f) Konsep spesies genetik mirip dengan konsep morfologi kecuali bahwa metode yang digunakan untuk menentukan species adalah ukuran perbedaan genetik, diduga untuk merefleksikan isolasi reproduksi dan kebebasan evolusi. Sebagai konsep fenetik, jarak dan kemiripan genetic digunakan untuk mengidentifikasi species yang berbeda. Kebebasan genetic diuji menggunakan metode yang beragam mulai dari kromatografi, elektroforesis sampai sekuensing.

g) Konsep spesies filogenetik dianggap sebagai konsep spesies yang lebih baik dibandingkan dengan konsep spesies sebelumnya karena kemampuannya mengaitkan suatu spesies dengan pola evolusinya. Konsep spesies filogenetik mendefinisikan spesies sebagai organisme terkecil yang mempunyai paling sedikit satu karakter diagnostik berupa karakter morfologi, biokimia, atau molekuler yang tidak berubah. Selain itu, konsep ini mensyaratkan bahwa dalam satu spesies harus memiliki nenek moyang yang sama dan anggota dalam satu spesies memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dibandingkan dengan yang bukan anggota spesies.

Spesiasi merupakan sebuah proses evolusi yang menyebabkan munculnya spesies berbeda atau baru. Spesiasi disebabkan karena suatu spesies mengalami isolasi akibat dari adanya beberapa faktor internal maupun eksternal. Namun secara umum spesiasi disebabkan oleh faktor lingkungan dan kondisi geografis yang kurang mendukung suatu spesies, sehingga spesies tersebut dituntut mampu untuk menyesuaikan dirinya dengan kondisi lingkungan yang ada dengan tujuan utama yaitu mempertahankan keturunannya. Secara umum, terdapat empat jenis spesiasi alami, tergantung pada sejauh mana populasi yang berspesiasi terisolasi secara geografis dari satu populasi ke populasi yang lainnya. Spesiasi juga dapat dilakukan secara buatan, melalui domestikasi ataupun eksperimen laboratorium (Hall, 2012).

Konsep spesiasi pada dasarnya dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain adanya *barier* yang memiliki kemampuan untuk mengisolasi gen dari suatu spesies dalam populasi. Konsep spesiasi tersebut tergantung dari kemampuan suatu individu dalam

kelompok atau populasi untuk melakukan perkawinan dan menghasilkan keturunan yang bersifat fertil dengan tujuan mempertahankan populasinya agar tidak mengalami suatu kepunahan. Spesies baru terbentuk dalam kurun waktu yang sangat panjang karena proses evolusi akan menghasilkan model spesiasi yang sangat beraneka ragam pula, sehingga pada dasarnya proses spesiasi disebabkan oleh adanya adaptasi suatu kelompok organisme pada lingkungan yang berbeda dari lingkungan yang ada sebelumnya (Wheeler & Meyer, 2000).

Menurut White (1978), proses pembentukan spesiasi itu sendiri terjadi jika aliran gen pada suatu populasi terbentuk secara efektif dan disebabkan oleh mekanisme peristiwa isolasi. Salah satu jenis spesiasi adalah spesiasi alopatrik yang terjadi jika aliran gen satu populasi dipisahkan oleh faktor geografis, sehingga menjadi sub-populasi yang lebih kecil dan akan mengalami proses isolasi. Spesiasi simpatrik terjadi apabila satu populasi organisme berada pada daerah yang sama dan proses pembentukannya dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain adalah diferensiasi habitat, poliploidi, dan seleksi alam (Mallet, 2010).

Spesiasi merupakan proses terbentuknya spesies baru dari nenek moyang sebelumnya sebagai akibat dari proses evolusi. Menurut Turelli dkk. (2001) evolusi dari isolasi reproduksi merupakan evolusi dari spesiasi. Hal tersebut menjelaskan adanya batas genetik dari reproduksi. Spesiasi di Paparan Sunda terjadi akibat adanya batasan fisik/spesiasi alopatrik, yang terjadi pada periode Eosen hingga Pleistosen. Batasan fisik tersebut meliputi topografi perairan dan daratan yang menyebabkan timbulnya batas reproduksi genetik. Futuyama (2005) juga menyatakan, bahwa seleksi alam dan *genetic drift* menyebabkan suatu populasi mengalami penyimpangan pada komposisi genetik, sehingga tidak dapat dihindari jika suatu daerah terpisah dalam waktu yang lama (populasi yang terpisah secara geografi), maka akan memunculkan spesies baru. Hal tersebut merupakan pengaruh dari spesiasi alopatrik. Seleksi seksual juga menjadi penyebab spesiasi di Paparan Sunda. Model seleksi seksual berupa pemilihan jantan oleh betina, dilihat dari segi fenotip dan mating call turut berperan pada populasi yang berbeda dari nenek moyang berbeda, serta menghasilkan spesiasi. Akibat dari hal tersebut adalah diversitas pada sifat pejantan dan keturunannya. Penemuan spesies-spesies amfibi baru diperkirakan merupakan efek dari spesiasi yang terjadi pada pulau-pulau di Paparan Sunda (Turelli dkk., 2001).

2.3 Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik suatu famili dari sekuen nukleotida atau protein merupakan suatu determinasi atau penentuan bagaimana suatu famili memiliki kemungkinan terbentuk akibat dari suatu proses evolusi. Analisis filogenetik berkaitan erat dengan hasil penyejajaran sekuen secara lokal maupun global. Tujuan dari analisis filogenetik yaitu untuk menemukan hubungan antar cabang di dalam suatu pohon filogenetik dan panjang antar cabang tersebut. Hubungan evolusioner antar sekuen digambarkan dengan meletakkan sekuen pada cabang terluar pada suatu pohon filogenetik. Hubungan percabangan pada bagian yang lebih dalam pada pohon menunjukkan derajat perbedaan antar sekuen. Dua sekuen yang mirip diposisikan berdekatan pada cabang terluar dan diletakkan pada suatu cabang umum di bawah kedua sekuen tersebut (Mount, 2004).

Informasi terkait hubungan filogenetik antar organisme dapat diperoleh pada beberapa situs web. Beberapa situs web tersebut antara lain yaitu Entrez yang secara taksonomi menghubungkan struktur antar kelompok organisme, RDP (*Ribosomal Database Project*) yang menyusun pohon filogenetik berdasarkan data ribosomal RNA dan *Tree of Life* yang menyediakan informasi terkait filogeni dan biodiversitas. Penyejajaran berhubungan erat dengan analisis filogenetik. Apabila sekuen dua asam nukleat atau protein dari dua organisme memiliki kesamaan, maka dapat diprediksikan bahwa sekuen kedua organisme tersebut berasal dari sekuen nenek moyang (*common ancestor*). Penyejajaran sekuen menunjukkan posisi sekuen yang dipertahankan (*conserved*) dan berasal dari sekuen nenek moyang sebagaimana tampak pada gambar 5, dimana jika dua sekuen memiliki hubungan evolusioner maka sekuen-sekuen tersebut dapat dikatakan homolog satu sama lain (Mount, 2004).

Filogenetik merupakan terobosan baru bagi ilmu pengetahuan, ilmu ini mengkombinasikan teknik biologi molekuler dengan karakter morfologi dan statistik dalam mengetahui hubungan kekerabatan suatu spesies. Filogenetik digolongkan menjadi dua, yaitu filogenetik berdasarkan morfologi dan berdasarkan molekuler. Filogenetik molekuler menggunakan data dari sekuens asam deoksiribonukleat (DNA), asam ribonukleat (RNA), dan protein. Beberapa alasan digunakannya sekuens DNA sebagai penanda filogenetik adalah sekuens DNA merupakan struktur yang sangat penting sebagai pengkode genetik organisme, mudah diekstrak, mudah untuk dilakukan penggabungan, mudah dibuat model, dan mengandung informasi yang banyak serta beragam (Brown, 2002).

Sekuens DNA memberikan data yang akurat untuk pengujian homologi pada karakter tertentu. Selain itu, sekuens DNA juga menyediakan banyak *character states* akibat dari perbedaan laju perubahan basa-basa nukleotida. Sekuens DNA dapat diperoleh dari inti (nDNA), kloroplas (cpDNA), dan mitokondria (mtDNA). Beberapa persyaratan yang harus diperhatikan dalam menggunakan sekuens DNA adalah: (1) sekuens berasal dari sumber spesifik (inti, kloroplas, atau mitokondria); (2) bersifat homolog (diturunkan dari satu nenek moyang); (3) bukan merupakan campuran dari DNA inti dan mitokondria; dan (4) sekuens berkembang bebas (Brown, 2002).

Menurut Hall (2013), tiga tahap penting dalam analisis filogenetik molekuler adalah :

1. *Alignment* sekuen

Tahapan ini digunakan untuk mengetahui ada tidaknya sifat homolog antara satu sekuen DNA atau protein dengan yang lain. Proses *alignment* sangat menentukan keberhasilan analisis filogenetik. *Alignment* sekuen membuat setiap basa nukleotida (A, C, T, G) menjadi *site* yang *equivalen* dengan karakter tertentu. Umumnya terdapat *gap* yang dihasilkan pada proses *alignment* karena adanya data yang hilang.

2. Rekonstruksi Pohon Filogenetik

Pohon filogenetik dapat dibuat menggunakan karakter yang dibagi menjadi 4 kelompok utama, yaitu *distance method* (DM), *likelihood method* (LM), *bayesian method* (BM), dan *parsimony method* (PM). BM merupakan salah satu metode yang menggunakan MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*).

3. Evaluasi Pohon Filogenetik dengan Uji Statistik

Evaluasi melibatkan uji reliabilitas (*Bootstrap* dan *Posterior Probability*) dan uji topologi antara dua atau lebih pohon dengan metode yang berbeda.

Biogeografi dan filogenetik dapat mendukung upaya konservasi dengan menggunakan data genetika melalui identifikasi spesies dan wilayah geografis yang menyimpan keragaman genetik tinggi atau unik. Spesies dengan persebaran yang tinggi umumnya memiliki prioritas konservasi yang rendah. Tingkat diversitas dapat diketahui melalui penelitian biodiversitas menggunakan data sekuens DNA. Sejarah biogeografi suatu spesies dapat didapatkan dengan menganalisis data persebaran spesies dan data estimasi waktu divergensi genetik suatu spesies yang dihubungkan dengan sejarah geologi suatu wilayah (Bickford dkk., 2007).

2.4 Estimasi Waktu Divergensi Genetik

Divergensi genetik merupakan akumulasi mutasi suatu materi genetik dari suatu spesies yang mengarah pada pembentukan spesies baru atau spesiasi. Waktu divergensi genetik dapat diestimasi melalui *molecular clocks*. Estimasi waktu divergensi genetik dapat ditentukan melalui 5 langkah, antara lain penyusunan data, penentuan kalibrasi, pemilihan *clock model*, analisis, dan interpretasi data (Sauquet, 2013). Data molekuler yang digunakan untuk mengestimasi waktu evolusi yaitu sekuen protein atau DNA. Namun, pada beberapa tahun terakhir, peneliti lebih banyak menggunakan *single gene* DNA, terutama dari mitokondria atau genome kloroplas (dos Reis & Yang, 2011). Gen mitokondria yang dapat digunakan untuk estimasi waktu divergensi genetik yaitu Cyt B dan 12S rDNA. Pemahaman akan jangka waktu evolusi dapat memberikan pandangan yang sangat berguna dalam bidang biologi evolusi, filogenetik, dan biogeografi. Sampai beberapa dekade terakhir, pendekatan ilmu penentuan waktu evolusi didasarkan pada fosil, hingga ditemukannya metode *molecular clocks* menggunakan materi genetik (dos Reis & Yang, 2011).

2.4.1 Molecular Clocks

Hipotesis *molecular clocks* pertama kali diperkenalkan oleh Emile Zuckerkandl dan Linus Pauling melalui observasi secara empiris melalui *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Implikasi dari adanya hipotesis ini sangat berpengaruh pada bidang evolusi. Perubahan genetik yang mengarah pada proses evolusi suatu spesies terjadi ketika suatu populasi terisolasi, sehingga mengubah *gene flow* suatu populasi yang berakibat pada terjadinya *genetic drift*. Seiring dengan berkembangnya zaman, maka akan terjadi suatu mutasi alami akibat dari *gene flow* yang berbeda dalam suatu populasi yang baru (Ho, 2008). Penggunaan *molecular clocks* secara menyeluruh akan menghasilkan rekonstruksi sejarah evolusi dalam setiap diversitas organisme berdasarkan waktu, termasuk hubungannya dengan evolusi manusia dan migrasinya (Ke dkk., 2001), spesiasi pada zaman Pleistosen serta sejarah radiasi pada kelompok besar tumbuhan dan hewan (Futuyama, 2005).

Molecular clocks memiliki berbagai jenis model. Model yang paling sederhana yaitu *global molecular clocks*. Model tersebut hanya menggunakan parameter tunggal yang memaparkan jangka waktu evolusi. *global molecular clocks* bekerja dengan cara menginterpretasikan substitusi genetik tiap *site* DNA per tahun atau per satu juta tahun.

global molecular clocks hanya digunakan untuk menganalisis data sampel pada level intraspesifik (Brown dan Yang, 2011). Model ini diimplementasikan dalam beberapa cara yang berbeda dalam rentang yang luas dalam beberapa *software* filogenetik. Selain *global molecular clocks*, terdapat *multi-rate molecular clocks*, yaitu model yang dapat diaplikasikan untuk variasi data lokal maupun non-lokal. *Software* yang digunakan untuk model ini antara lain PAML dan r8s (Yang, 2007). Sedangkan model *random local clock* diaplikasikan melalui *software BEAST* (Drummond dkk., 2012).

2.4.2 Software Estimasi Waktu Divergensi Genetik

Beberapa *software* yang dapat digunakan untuk mengestimasi waktu divergensi genetik antara lain:

1. BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*)

BEAST merupakan *software open source* yang berfungsi untuk analisis evolusi Bayesian dari sekuens molekuler dengan menggunakan penghitungan MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*). Cakupan penggunaan *software* ini sangat luas. *Software* ini dapat digunakan untuk menyusun pohon filogeni dengan model variasi substitusi, mengestimasi waktu divergensi spesies dan kalibrasi fosil, menganalisis sekuens *non-contemporary*, model substitusi heterogen dari partisi data, analisis genetika populasi, dan lain-lain. Penggunaan *software* ini biasanya dikombinasikan dengan beberapa *software* lainnya seperti BEAUti, LogCombiner, dan TreeAnnotator. Beberapa *clock model* yang dapat dijalankan dalam BEAST antara lain *global molecular clocks*, *local molecular clocks*, *compound poisson process*, *autocorrelated rates substitution rates evolve gradually over the tree* dan *uncorrelated rate* (Drummond dan Rambaut, 2007). Pemilihan model tersebut didasarkan atas bentuk data yang akan dianalisis. Penentuan kalibrasi juga merupakan hal yang sangat penting untuk diperhatikan. Kalibrasi merupakan satu-satunya informasi absolut yang digunakan untuk mendukung data, serta menjadi acuan waktu untuk data molekuler. Kalibrasi yang digunakan dalam *clock model* adalah fosil atau kejadian biogeografi (Woods, 2012).

2. BEAUti (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*)

BEAUti (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*) merupakan *software utility* untuk membuat BEAST atau **BEAST input files* yang biasanya dibuat dalam bahasa pemrograman XML (*Extensible Markup Language*). Aplikasi ini memberikan jalan yang mudah dalam membuat *specify priors*, *partition data*, *calibrate internal nodes*, dan lain-

lain, secara otomatis dalam *software*, tanpa harus membuat secara manual dalam bahasa pemrograman XML (*Extensible Markup Language*) (Woods, 2012).

2.5 DNA *Barcoding*

DNA *barcoding* memiliki prinsip dasar yaitu identifikasi menggunakan sekuen DNA pendek “barcode” dari bagian standar genom dari spesimen yang sedang diteliti. Urutan barcode yang tidak diketahui akan dibandingkan dengan pustaka sekuen barcode yang telah diketahui identitasnya. Apabila hasil perbandingan antara sekuen yang diteliti sesuai dengan pustaka, maka spesimen tersebut diidentifikasi sebagai spesimen dari pustaka. Namun jika tidak sesuai, maka dapat mengarah kepada sekuen baru untuk spesies baru (Hajibabaei dkk, 2007). Identifikasi spesies berbasis DNA merupakan metode yang cepat dan konsisten sehingga dapat dipertanggungjawabkan (Irawan dkk, 2016). Hal tersebut dikarenakan karakter DNA yang relative lebih konstan dibandingkan karakter morfologi (Hidayat dkk, 2008). Sekuen DNA yang diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari suatu spesies dengan cara mengkonstruksi pohon filogenetik.

Filogenetik mengkombinasikan teknik biologi molekuler dengan statistik untuk merekonstruksi hubungan filogenetik. Penggunaan sekuen DNA sangat penting karena dapat mengetahui perubahan basa nukleotida menurut waktu dan dapat memperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi. Hal tersebut dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu spesies dengan spesies lainnya (Hidayat & Pancoro, 2008). DNA yang digunakan sebagai *barcode* harus memiliki sekuens yang pendek tapi memiliki variasi yang tinggi antar spesies agar bisa digunakan sebagai metode identifikasi yang akurat. DNA mitokondria banyak digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara spesies ular. mtDNA mulai diketahui efektifitasnya dalam identifikasi molekuler pada akhir 1970-an dan 1980-an. Hebert (Hebert, Cywinska, Ball, & deWaard, 2003) mengungkapkan bahwa gen Cytochrome oxidase sub unit I (COI) pada mtDNA yang merupakan gen penyandi protein yang berperan dalam respirasi sel adalah gen yang sangat efektif digunakan dalam identifikasi hewan. Beberapa kelebihan yang mendasari pernyataan tersebut diantaranya mtDNA diwariskan secara maternal (Susmiarsih, 2012), tingkat mutasi tinggi (Hubert dkk, 2008), sedikit intron, diwariskan dalam bentuk haploid (Hebert dkk, 2003), dan replikasi yang berlangsung terus menerus (Kamarudin dkk, 2011).

2.6 Gen Cyt-B dan Gen 12S rDNA

Stuart (2009) menjelaskan bahwa mitokondria merupakan salah satu organel yang tersusun atas DNA untai ganda atau double strain (ds-) dengan panjang kurang lebih 16 kb dan tersusun 1-2% dari total DNA pada sel mamalia. Genom dari organel tersebut tersusun atas 13 subunit protein atau polipeptida yang dikenal sebagai gen, antara lain kompleks I (ND1-6 dan ND4L), kompleks III (Cyt-B), tiga unit kompleks IV (COI-III), dan dua subunit dari kompleks V (ATPase 6 dan 8). Gen lainnya yaitu dua rDNAs (12S dan 16S rDNA) dan 22 tRNA yang diperlukan oleh mitokondria dalam proses sintesis protein karena mitokondria mampu melakukan replikasi, transkripsi, dan translasi yang mandiri.

Materi genetik yang terdapat di dalam sel makhluk hidup sangat rawan mengalami mutasi, terutama pada daerah yang merupakan daerah pengkode penghasil protein.

Akselerasi laju mutasi ini menunjukkan bahwa setiap generasi telah mengalami evolusi.

Kekerabatan dapat diketahui dengan menggunakan DNA mitokondria dengan prinsip bahwa sebagian dari gen akan mengalami variasi, sebagian merupakan *conserved gene* (Girish, 2004). Pemilihan DNA mitokondria untuk menganalisis hubungan kekerabatan dapat pula disebabkan oleh penurunan mitokondria secara langsung dari ibu, sehingga diharapkan akan dapat diamati gen-gen yang lebih *conserved* dan merujuk pada variasi untuk spesies yang berlainan. Salah satu gen yang dapat digunakan dalam analisis kekerabatan adalah gen 16S rDNA. Gen ini dapat dipergunakan sebagai penunjuk adanya spesiasi berdasarkan hanya perbedaan atau variasi pada satu basa nukleotida (Jeong, dkk, 2013).

Genom mitokondria banyak digunakan sebagai penanda dalam analisis variasi genetik (Pieterse, dkk, 2010). Pada mtDNA tidak terjadi rekombinasi gen karena pola pewarisan diturunkan secara maternal (Simon, dkk, 2006). Laju mutasi DNA mitokondria lebih tinggi sekitar 10-17 kali dibandingkan DNA inti. Karena mtDNA tidak memiliki mekanisme reparasi yang efisien (Bogehagen, 1999). DNA polimerase yang dimiliki oleh mitokondria adalah DNA polimerase γ yang tidak mempunyai aktivitas *proofreading* (suatu proses perbaikan dan pengakuratan dalam replikasi DNA). Tidak adanya aktivitas ini menyebabkan mtDNA tidak memiliki sistem perbaikan yang dapat menghilangkan kesalahan replikasi. Replikasi mtDNA yang tidak akurat ini akan menyebabkan mutasi mudah terjadi.

DNA mitokondria tidak memiliki intron dan semua gen pengkode terletak berdampingan. Gen Cyt-B merupakan salah satu gen pada mtDNA yang mengkode pembentukan protein Cytochrome B. Protein Cyt-B merupakan bagian dari protein

kompleks III pada mitokondria yang berperan saat proses fosforilasi oksidatif. Gen Cyt-B memiliki panjang sekitar 1140 bp. Adanya variasi urutan pada Cyt-B menyebabkan gen ini banyak digunakan untuk membandingkan spesies dalam genus atau famili yang sama. Keunikan sekuen gen Cyt-B yaitu terdapat bagian yang bersifat kekal di dalam tingkat spesies, sehingga dapat digunakan untuk pengelompokan berdasarkan jenis hewan atau untuk penentuan hubungan kekerabatan antar jenis hewan (Widayanti, 2006). Hasil penelitian oleh Laopichienpong dkk. (2016) menunjukkan bahawa penggunaan gen Cyt-B lebih efektif untuk identifikasi ular *Ahaetulla* dibandingkan gen COI karena dapat menunjukkan perbedaan titik mutasi pada nukleotida gen Cyt-B yang tidak ditemukan perbedaan tersebut pada gen COI.

Tiger dkk. (2002) menggunakan gen dan 12S rDNA untuk meneliti filogenetik dari kelompok Elaphe. Sampel yang digunakan sebanyak 93 individu yang termasuk ke dalam 52 spesies. Pyron & Burbrink (2009) melakukan penelitian filogenetik pada 31 spesies ular dari kelompok lampropeltini menggunakan beberapa gen (cyt b, c-mos, NDI, ND2, ND4, 12S dan COI). Nagy dkk. (2012) melakukan barcoding reptil Madagaskar dalam skala luas. Sampel yang digunakan sebanyak 268 spesimen yang terdiri dari 251 spesies. Hasilnya menunjukkan DNA barcoding dapat menandai sebagian sampel sesuai nama spesies dengan tingkat kepercayaan yang tinggi. Carranza dkk. (2006) meneliti filogeografi dari 26 Malpolon monspessulanus menggunakan gen 12S rDNA dan Cyt-B. Hasilnya menunjukkan bahwa spesies Malpolon monspessulanus dari barat daya Ereopa berasal dari daerah baral laut Afrika.

2.6 Genus *Ahaetulla*

Semua spesies ular pada Genus *Ahaetulla* dicirikan oleh tubuh langsing dan memanjang, dengan ekor yang sangat panjang dan kepala berbentuk segitiga tajam. Warna sisik bervariasi mulai hijau, kuning, abu-abu, dan coklat. Ada sisik yang memiliki pola hitam dan / atau putih, atau bisa berwarna solid. Keunikan dari ular ini adalah memiliki penglihatan binokular yang tajam dan pupil berbentuk horizontal seperti lubang kunci. Ular *Ahaetulla* ini hidup secara diurnal dan arboreal. Makanan mereka terutama terdiri dari kadal, tapi terkadang kodok dan tikus juga dikonsumsi. Bisa ular *Ahaetulla* dianggap tidak berbahaya bagi manusia, namun berfungsi menyebabkan kelumpuhan pada pilihan mangsa yang cepat. Ular ini berreproduksi secara ovovivipar. Ular ini mendiami hutan dataran rendah dan dataran rendah dataran rendah, hutan sekunder, hutan kering dan terbuka,

semak belukar, perkebunan, kebun, lahan pertanian, pinggir jalan, dan taman kota (McKay, 2006).

Di wilayah Indonesia, persebaran ular *Ahaetulla* ini tergolong luas. Menurut Das (2010), ada 3 spesies *Ahaetulla* yang tersebar di Indonesia, yaitu *A. fronticineta* yang hanya tercatat ada di Pulau Sumatra, *A. mycterizans* yang tercatat ada di Pulau Sumatra dan Jawa, serta *A. prasina* yang terdistribusi paling luas yakni di Pulau Sumatra, Jawa, Bali, dan Kalimantan. Penelitian oleh De Lang (2011) juga menunjukkan keberadaan *A. prasina* di wilayah Sunda Kecil dan penelitian oleh Leo dkk (2015) juga menunjukkan keberadaan *A. prasina* di Pulau Sulawesi. Akan tetapi, meski terdistribusi secara luas di berbagai Pulau di Indonesia, belum ada penelitian tentang status filogenetik ular *Ahaetulla* berdasarkan data molekuler. Penelitian menggunakan data molekuler pada ular *Ahaetulla* ini telah beberapa kali dilakukan di Negara Thailand menggunakan *A. prasina* oleh Laopichienpong dkk (2016) dengan menggunakan DNA *barcode* gen Cyt B dan COI yang menunjukkan gen Cyt B lebih efektif digunakan untuk identifikasi ular *A. prasina*. Sri Lanka pada spesies *A. nasuta* dan *A. pulverulenta* (Pyron dkk, 2013) yang menunjukkan *Ahaetulla* memiliki kekerabatan dekat dengan genus *Dendrelaphis* dan *Chrysopelea* yang tergabung dalam subfamily Ahaetullinae. Hal ini bisa dijadikan pedoman dalam menentukan *out-group* untuk proses analisis filogenetik genus *Ahaetulla*.



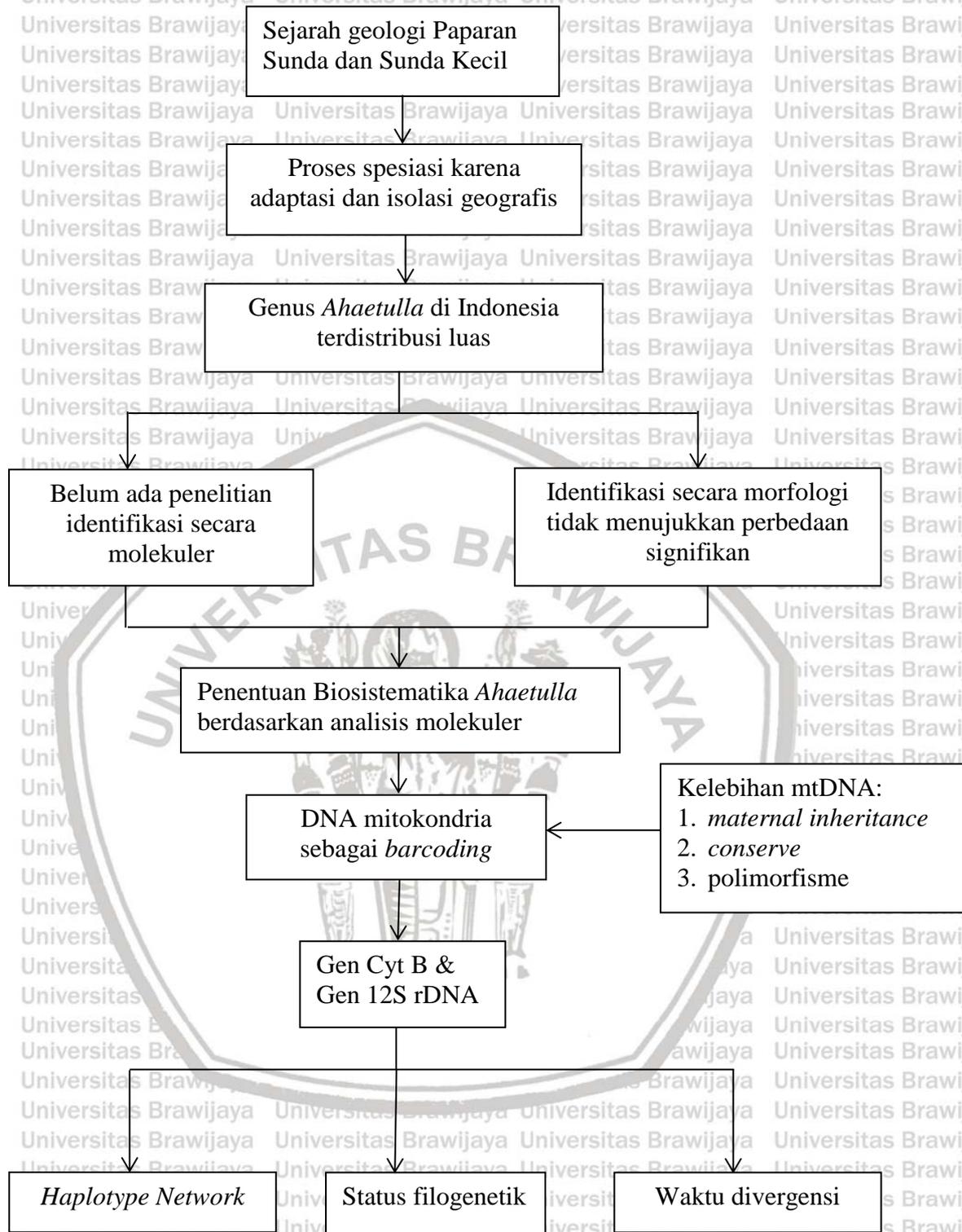
(Dokumentasi Pribadi)

Gambar 2.4. koleksi sampel Ular *Ahaetulla* sp. dari Lombok, Nusa Tenggara Barat

2.7 Kerangka Konsep Penelitian

Sejarah Geologi wilayah Indonesia pada masa lalu yang berasal dari Paparan Sunda dan Paparan Sahul mempengaruhi pola distribusi fauna yang ada hingga saat ini. Selain itu, sejarah geologi juga mempengaruhi pola spesiasi organisme dikarenakan adanya proses adaptasi dan isolasi geografis. Salah satu fauna yang memiliki persebaran luas di Indonesia adalah ular pucuk (*Ahaetulla* sp.). Ular *Ahaetulla* terdistribusi luas dari Pulau Sumatra, Jawa, Kalimantan, Jawa, Bali, Nusa Tenggara, Sulawesi, dan pulau-pulau kecil di sekitarnya. Meski telah terdistribusi secara luas di beberapa Pulau Indonesia, penelitian tentang filogenetik ular *Ahaetulla* masih berdasarkan data morfologi. Penelitian berdasarkan data morfologi menunjukkan tidak ada perbedaan karakter yang signifikan dari ular *Ahaetulla prasina* dari beberapa pulau di Indonesia. Oleh karena itu penelitian ini akan menentukan filogenetik *Ahaetulla* berdasarkan data molekuler yaitu gen Cyt B dan 12S rDNA yang merupakan bagian dari mtDNA. MtDNA banyak digunakan sebagai *barcode* untuk mengidentifikasi spesies karena mtDNA memiliki sifat *maternal inheritance*, *conserve*, dan polimorfisme. Berdasarkan urutan gen Cyt B dan 12S rDNA akan ditentukan pohon filogeni untuk ular *Ahaetulla* yang berasal dari Paparan Sunda dan Sunda Kecil.

Selain digunakan untuk menentukan status filogenetik, data molekuler gen Cyt-B dan 12S-rDNA juga bisa dijadikan dasar untuk menentukan waktu divergensi ular *Ahaetulla* di Indonesia. Waktu divergensi merupakan akumulasi mutasi suatu materi genetik dari suatu spesies yang mengarah pada pembentukan spesies baru atau spesiasi. Berdasarkan data urutan gen Cyt B dan 12S rDNA juga dapat diketahui *haplotype network*. Data haplotype network dapat digunakan untuk menganalisis perbedaan antar ular *Ahaetulla* berdasarkan populasi yang berbeda dan melihat pengelompokannya pada lokasi yang memiliki kesamaan urutan gen Cyt B dan 16S rDNA. Dengan adanya data filogenetik, estimasi waktu divergensi, dan haplotype network ular *Ahaetulla*, maka bisa menjadi dasar taksonomi yang lebih akurat dan informasi mengenai evolusi dan sejarah persebaran dari ular *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil.



Gambar 2.6. Kerangka konsep penelitian.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

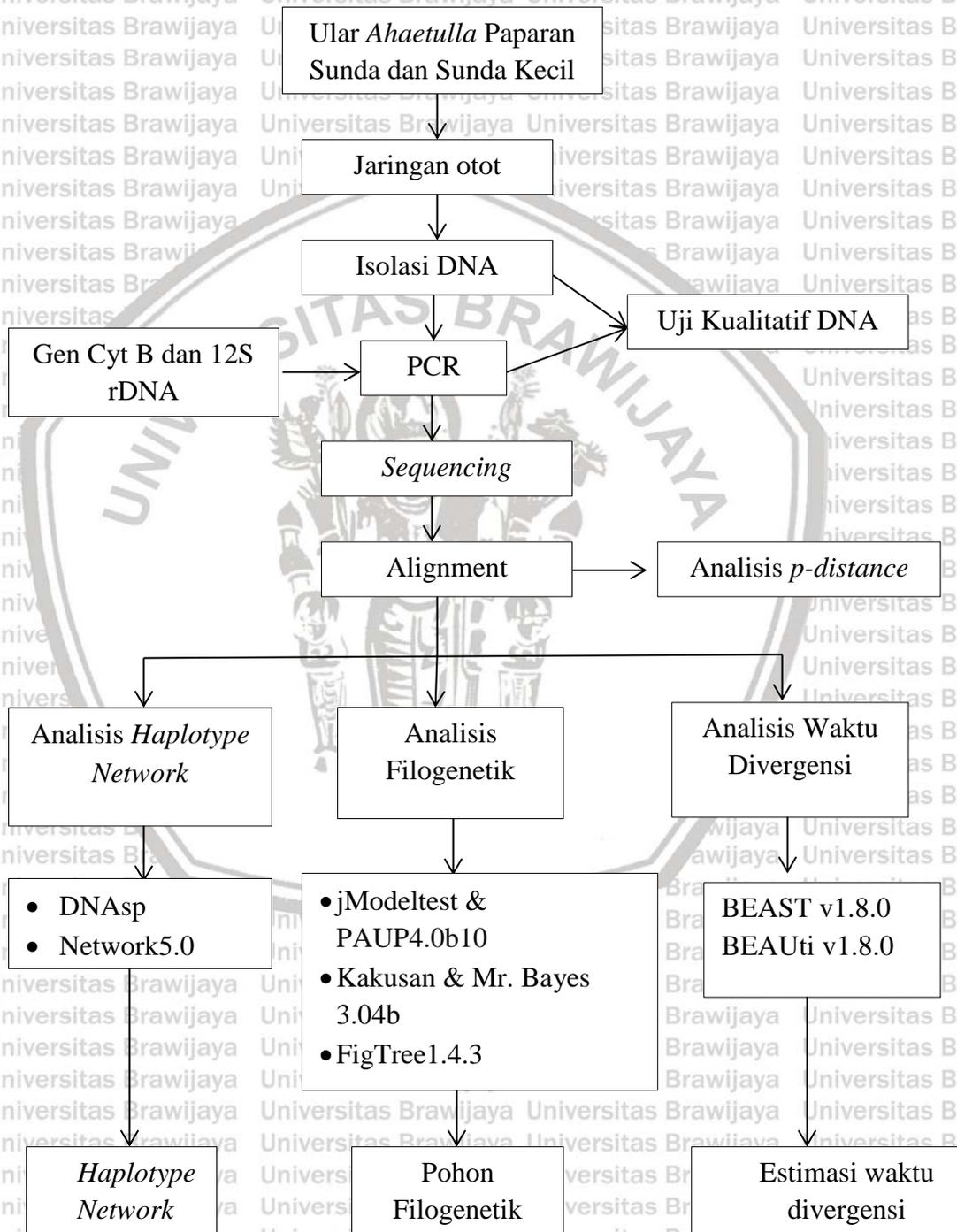
Penelitian ini akan dilakukan pada April – Desember 2018. Sampel ular *Ahaetulla* dikoleksi dari beberapa wilayah antara lain: Pulau Nusa Tenggara Barat, Bali, Jawa dan Sumatera. Isolasi DNA, analisis filogenetik, waktu divergensi dan konstruksi *Haplotype Network* dilakukan di Laboratorium Diversitas Hewan, Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya. Proses *sequencing* DNA dilakukan oleh IndoseqGATC Institut Biosains, Universitas Brawijaya.

3.2 Kerangka Operasional

Sampel ular *Ahaetulla* yang dikoleksi dari Pulau Nusa Tenggara Barat, Bali, Jawa dan Sumatera mulai tahun 2013 hingga 2016 telah disimpan oleh Laboratorium Diversitas Hewan, Universitas Brawijaya dalam bentuk spesimen awetan dan jaringan otot. Isolasi DNA dilakukan pada sampel jaringan otot dengan menggunakan kit isolasi kemudian dilanjutkan dengan uji kualitatif. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR dengan primer untuk gen Cyt-B dan 16S-rDNA. Hasil amplifikasi kemudian di-*sequencing* dan hasilnya dianalisis menggunakan beberapa *software*. Hasil *sequencing* awal di-contig menggunakan *software* Sequencer dengan output berformat txt.

Hasil contig kemudian di-*alignment* menggunakan *software* MEGA7 dengan pengoreksian terhadap gap serta situs ambigu dilakukan secara manual. Hasil *alignment* kemudian di-*save* dalam format mega, fasta, dan nexus. Hasil *alignment* kemudian digunakan untuk menentukan *p-distance* dengan menggunakan MEGA7. Pembuatan pohon filogenetik dengan analisis Maximum Likelihood (ML) menggunakan *software* MEGA7 dengan bootstrap 1000, sedangkan pohon dengan analisis Maximum Parsimony (MP) menggunakan *software* PAUP dengan replikasi bootstrap yang sama. Untuk pohon filogenetik dengan analisis *Bayesian Inference* (BI) di-konstruksi menggunakan *software* MrBayes3.04b. Untuk membuka hasil konstruksi pohon filogenetik MP dan BI digunakan *software* FigTree v1.4.3. Nilai *p-distance*, pohon filogenetik MP, ML, dan BI yang dihasilkan kemudian dianalisis untuk menentukan hubungan kekerabatan serta jarak genetik ular *Ahaetulla*. Pohon filogenetik yang

dihasilkan dijadikan acuan untuk mengestimasi waktu divergensi menggunakan *software* BEAST. *Haplotype network* dikonstruks menggunakan *software* DNAsp dan Network5.0. *Haplotype network* yang terbentuk kemudian disederhanakan tampilannya melalui *software* Adobe Illustrator.



Gambar 3.1. Kerangka Operasional Penelitian

3.3 Koleksi Sampel

Sampel ular *Ahaetulla* merupakan sampel yang telah dikoleksi oleh Laboratorium Diversitas Hewan Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Sampel yang digunakan berasal dari Lombok sebanyak 1 sampel, Bali 2 sampel, Jawa 7 sampel, dan Sumatera 6 sampel (Tabel. 3.1). Semua sampel yang akan dianalisis merupakan anggota Genus *Ahaetulla* berperan sebagai *in group*. *Outgroup* yang akan digunakan dalam penelitian ini merupakan anggota Famili Colubridae lain yang memiliki kekerabatan paling dekta dengan Genus *Ahaetulla* dan lebih primitif, yaitu *Chrysopelea ornate*, *Dendrelaphis pictus* dan *Ptyas mucosa* (Laopichienpong, dkk. 2016). Sekuens Cyt B dan 12S rDNA dari *outgroup* tersebut diperoleh dari GenBank. Total 20 sampel yang akan dianalisis untuk pembuatan pohon filogenetik, waktu divergensi, dan *haplotype network* (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Daftar sampel ular *Ahaetulla* yang digunakan dalam penelitian

No	Spesimen	Lokasi (Simbol)	Nomor Akses Genbank	Referensi
1.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Medan, Sumatra Utara (NS1)	MK691461	Penelitian ini
2.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Rau, Sumatra Utara (NS2)	MK691470	Penelitian ini
3.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Bukittinggi, Sumatra Barat (WS1)	MK691464	Penelitian ini
4.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Andalas, Sumatra Barat (WS2)	MK691460	Penelitian ini
5.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Rajabasa, Lampung (LP1)	MK691469	Penelitian ini
6.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Tanggamus, Lampung (LP2)	MK691474	Penelitian ini
7.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Bandung, Jawa Barat (WJ1)	MK691462	Penelitian ini
8.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Banyuwangi, Jawa Timur (EJ1)	MK691466	Penelitian ini
9.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Malang, Jawa Timur (EJ2)	MK691468	Penelitian ini
10.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Sukawati, Bali (BA1)	MK691472	Penelitian ini
11.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Tanah Lot, Bali (BA2)	MK691473	Penelitian ini
12.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Pandeglang, Banten (BN)	MK691463	Penelitian ini
13.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Sukabumi, Jawa Barat (WJ2)	MK691471	Penelitian ini
14.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Nusakambangan, Jawa Tengah (CJ1)	MK691465	Penelitian ini
15.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Tanjungharjo, Jawa Tengah (CJ2)	MK691475	Penelitian ini
16.	<i>Ahaetulla</i> sp.	Lombok, Nusa Tenggara Barat (LO)	MK691467	Penelitian ini
17.	<i>C. ornate</i>	-	KX694558	(Alencar dkk., 2016)
18.	<i>D. pictus</i>	Malang, Jawa Timur	KY700863	(Nugraha dkk., 2018)
19.	<i>P. mucosa</i>	Malang, Jawa Timur	KY700867	(Nugraha dkk., 2018)

3.4 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan kit QIAGEN (Dneasy Blood & Tissue Kit) sesuai dengan instruksi dari pabrik QIAGEN. Langkah pertama dimulai dengan

mengambil jaringan yang telah dikoleksi sebanyak 25 mg lalu dimasukkan ke dalam tabung 2 ml. Kemudian ditambahkan dengan 180 μ l buffer ATL dan divortex. Lalu ditambahkan 20 μ l proteinase K dan dihomogenkan, selanjutnya sampel diinkubasi dalam waterbath dengan suhu 56°C selama 1 – 3 jam. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 15 detik kemudian ditambahkan 200 μ l buffer AL dan divortex, selanjutnya diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, sampel dicampurkan dengan 200 μ l etanol absolute, dihomogenkan dengan membolak-balikkan tabung. Lalu sampel dipindahkan ke dalam Dneasy minispin column (tanpa membasahi dinding tube), dipasang pada collection tube 2 ml dan disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Sentrifugasi akan menyaring DNA pada membran minispin column dan kontaminan akan melewati membran dan terkumpul pada *collection tube*.

Supernatan dan *collection tube* dibuang dan minispin dipindahkan ke collection tube 2 ml yang baru. Selanjutnya, ditambahkan 500 μ l buffer AW1 ke tengah minispin. Disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Supernatan dan collection tube dibuang dan minispin dipindahkan ke collection tube 2 ml yang baru. Ditambahkan 500 μ l buffer AW2 dan disentrifugasi pada 14000 rpm selama 3 menit. Supernatan dan collection tube dibuang dan minispin dipindahkan ke collection tube 2 ml yang baru. Disentrifugasi kembali untuk menghilangkan buffer AW2 yang mungkin masih tersisa. Minispin dipindahkan ke collection tube 2 ml yang baru dan ditambahkan 200 μ l buffer AE lalu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. DNA yang telah didapatkan dapat disimpan pada suhu -20°C.

3.5 Uji Kualitatif DNA

Metode yang dipakai untuk uji kualitatif adalah elektroforesis. Metode elektroforesis dilakukan dengan membuat gel agarose (TBE 1x dan agarose). Gel agarose

0,8% untuk 35 ml terdiri dari 0,28 gr agarose dan 35 ml TBE 1X pH 8. Campuran tersebut dipanaskan diatas *hot plate and stirer* hingga mendidih. Ditunggu beberapa saat hingga menjadi hangat dan ditambahkan 1 μ l ethidium bromide dan dihomogenkan.

Kemudian dituangkan dalam cetakan elektroforesis, dipasang sisir dan diletakkan kedalam chamber elektroforesis. Selanjutnya, isi *chamber* elektroforesis dengan 1X TBE

buffer sampai tanda batas atau sampai gel agarose terendam. Gel agarose yang digunakan untuk DNA hasil isolasi adalah gel agarose konsentrasi 0,8%, sedangkan untuk DNA

hasil amplifikasi menggunakan konsentrasi 1,5%. Dicampurkan 1 μ l DNA dan 1 μ l *loading dye* diatas parafilm. Lalu dimasukkan dalam tiap sumur gel agarose. Marker

yang dimasukkan sebanyak 1 µl. Elektroforesis dihubungkan dengan power supply dan dirunning selama 30 menit dengan besar voltase 90 V untuk hasil isolasi DNA dan 60 menit dengan voltase 50 V untuk hasil PCR.

Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan GelDoc. Gel agarose dimasukkan ke dalam alat GelDoc. Kemudian Geldoc ditutup, dinyalakan tombol power untuk Geldoc dan kamera. Tangkapan kamera diatur pada posisi paling jelas kemudian difoto. Gambar hasil tangkapan kamera disimpan pada komputer untuk dianalisis.

3.6 Amplifikasi dan Sequencing Gen Cyt-B dan Gen 12S-rDNA

Primer yang digunakan mengamplifikasi gen 12S rDNA adalah adalah 12S268 (5'- GTGCCAGCGACCGCGGTTACACG-3') dan 12S916 (5'- GTACGCTTACCATGTTACGACTTGCCCTG-3') (Jeong dkk., 2013). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen Cyt B Forward – L14910 (5' -GAC CTG TGA TMT GAA AAC CAY CGT TGT -3') dan Reverse – H16064 (5' - CTT TGG TTT ACA AGA ACA ATG CTT TA -3') (Burbrink, dkk., 2000). Satu tabung PCR berisi 40 µl yang terdiri dari 14,4 µl ddH₂O, 20 µl PCR mix *go taq green*, 0,8 µl primer forward, 0,8 µl primer reverse dan 4 µl sampel DNA (Fatchiyah, dkk. 2012).

Reaksi amplifikasi pada mesin PCR untuk gen Cyt B mengikuti metode Burbrink, dkk., (2000) terdiri dari 1 siklus 94° C selama 7 menit lalu 40 siklus denaturasi pada suhu 94° C selama 30 detik, 40 siklus annealing pada suhu 46° C 30 detik, elongasi pada suhu 72° C selama 1 menit dan elongasi akhir pada suhu 72° C selama 7 menit, kemudian didinginkan pada suhu 4°C sampai siklus berhenti. Reaksi amplifikasi pada mesin PCR mengikuti metode Jeong dkk (2013) terdiri dari 1 siklus 94° C selama 5 menit lalu 35 siklus denaturasi pada suhu 94° C selama 30 detik, annealing pada suhu 56,5° C 60 detik, elongasi pada suhu 72° C selama 60 detik dan elongasi akhir pada suhu 72° C selama 10 menit. Hasil amplifikasi PCR dipurifikasi dan *disequencing* oleh IndoseqGATC Institut Biosains, Universitas Brawijaya.

3.7 Konstruksi Pohon Filogenetik

3.7.1 Alignment Sekuens dan Analisis *p-distance*

Urutan basa gen Cyt B dan 16S rDNA dijadikan satu menggunakan software *notepad* masing-masing gen kemudian diubah ke dalam format fasta dan dilakukan *alignment* menggunakan software MEGA7 dengan Clustal W (Kumar dkk., 2016). Untuk mengurangi kesalahan dalam konstruksi pohon filogenetik maka gap yang

terdapat di awal dan akhir hasil alignment dihapus secara manual hingga bagian kanan dan kiri hasil *alignment* menjadi rata. Hasil *alignment* disimpan dalam format fasta. *Uncorrected p-distance* sebagai gambaran jarak genetik antara sekuen yang dibandingkan dijadikan dalam bentuk persen. Ambang batas nilai *p-distance* reptil intra-spesies gen 16S adalah 3%, sedangkan ambang batas nilai *p-distance* reptil intra-spesies gen Cyt B adalah 2% (Jeong dkk., 2013). Nilai *p-distance* dirata-ratakan per spesies, per genus dan antar genus dan ditentukan nilai tertinggi di dalamnya untuk menentukan nilai ambang batas jarak genetik gen 12S rDNA dan Cyt B.

3.7.2 Analisis *Maximum Likelihood* dan *Maximum Parsimony*

Pohon filogenetik ML dikonstruksi menggunakan software MEGA7 dengan model Kimura 2-parameter (Kumar dkk., 2016). *Heuristic search* dicari dengan menerapkan algoritma NJ dan BioNJ yang diestimasi menggunakan *maximum composite likelihood* dengan bootstrap 1000 kali. Untuk pohon filogenetik MP dikonstruksi menggunakan software PAUP4.0b10 (Swofford, 2002), *heuristic search* dicari menggunakan *tree bisection recognition*, dengan bootstrap 1000 kali. Data input untuk MEGA7 adalah berformat fasta sedangkan untuk PAUP menggunakan format nexus. Hasil analisis ML dan MP dengan nilai bootstrap 70% atau lebih dianggap valid (Hall, 2013).

3.7.3 Analisis *Bayesian Inference*

Data input yang digunakan dalam analisis bayesian adalah data yang dihasilkan dari *software* Kakusan 4. Kakusan 4 akan melakukan pemilihan model evolusi yang terbaik yang dapat digunakan dalam analisis BI. Bayesian Inference dianalisis menggunakan software MrBayes 3.04b (Huelsenbeck dan Ronquist, 2001). Model perhitungan yang digunakan adalah MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) untuk 1.000.000 generasi. Perhitungan setiap 1000 generasi dengan konsensus topologi 25%. Hasil analisis BI dengan nilai bootstrap 95% atau lebih dianggap valid (Leace & Reader, 2002).

3.8 Estimasi Waktu Divergensi

Estimasi waktu divergensi genetik dilakukan melalui software BEAST v1.8.0 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (Drummond dan Rambaut, 2007) dengan bantuan software BEAUti v1.8.0 untuk membuat bahasa pemrograman dengan

format XML. Analisis dilakukan melalui model substitusi GTR+G+I dan clock model uncorrelated log-normal “relaxed” clock (Drummond, dkk., 2006). Waktu kalibrasi eksternal menggunakan waktu divergensi antara spesies *Ptyas mucosus* dengan *Ptyas mucosa* pada 1.4 juta tahun lalu (Nugraha, dkk., 2018). Model perhitungan MCMC digunakan untuk 10 juta generasi dimana perhitungan setiap 1000 generasi dengan konsensus topologi 25% (Rambaut dkk., 2014). Konvergensi distribusi stationer diamati melalui *the likelihood and parameter sample plots* dalam *software Tracer ver1.4*. Hasil analisis berupa *log* dan *tree file* dikombinasikan dalam *software Logcombiner v1.8.0*. Hasil pohon berjumlah 100001 diabaikan hingga hanya terdapat satu pohon (*burnin* = 1000000) melalui *TreeAnnotator v1.8.0*. Hasil pohon kronogram diamati dalam *Figtree v.1.4.2* (Drummond dan Rambaut, 2007).

3.9 Konstruksi Haplotype Network

Pemetaan *haplotype network* dilakukan menggunakan *software* DNAsp v5 (Librado & Rozas, 2009), dan Network5.0 (Fluxus-engineering). Data sekuen yang telah di-*alignment* dalam format fasta dimasukkan dalam *software* DNAsp v5. Lalu, nilai *haplotype* dikalkulasi dan diekspor dalam format *roehl data file* (rdf). Setelah itu, data tersebut dimasukkan dalam *software* Network5.0. Lalu, nilai *median-joining network* dikalkulasi dan peta *haplotype* divisualisasi. Hasil visualisasi *haplotype network* kemudian disederhanakan menggunakan *software* Adobe Illustrator.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Jarak Genetis Genus *Ahaetulla*

Jarak genetik pada ular Genus *Ahaetulla* dihitung dan ditunjukkan sebagai *p-distance*, yaitu jumlah proporsi perbedaan nukleotida setiap titik (Lemey, 2009). Hasil perhitungan *p-distance* berdasarkan gen 12S-rDNA menunjukkan bahwa Genus *Ahaetulla* memiliki 2 kelompok yang memiliki jarak genetik cukup jauh seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.1. Kelompok pertama terdiri dari spesimen WS1 (Andalas, Sumatra Barat) hingga BA2 (Tanah Lot, Bali) yang memiliki jarak genetik antara 0,00% - 2,11%. Sedangkan pada kelompok kedua, spesimen terdiri dari BN (Banten) hingga WJ2 (Sukabumi, Jawa Barat) yang memiliki jarak genetik sekitar 4,69% - 6,82% dibandingkan dengan kelompok pertama. Spesimen yang memiliki jarak genetik 0,00% seperti dua spesimen yang berasal dari Sumatra Barat dan dua spesimen yang berasal dari Lampung menunjukkan bahwa dua spesimen tersebut memiliki nilai similaritas 100% yang artinya urutan gen 12S-rDNA yang dimiliki sama persis. Hal tersebut bisa dikarenakan karena dua spesimen tersebut berasal dari daerah yang sama sehingga memiliki kondisi biogeografis yang sama sehingga memunculkan pola adaptasi yang sama dan berpengaruh pada urutan gen.

Berdasarkan urutan gen Cyt-B, hasil analisis *p-distance* menunjukkan bahwa Genus *Ahaetulla* juga memiliki 2 kelompok seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.2. Kelompok pertama mulai dari sampel WS1 (Andalas, Sumatera Barat) hingga BA1 (Sukawati, Bali) memiliki jarak genetik sekitar 0,4% - 3,25%. Sedangkan pada kelompok kedua, sampel berkisar dari CJ1 (Nusakambangan, Jawa Timur) hingga LO (Lombok) yang memiliki jarak genetik sekitar 6,07% - 8,32% dibandingkan dengan kelompok pertama.

Hasil perhitungan jarak genetik mengindikasikan adanya 2 spesies Genus *Ahaetulla* yang ditemukan pada penelitian ini. Penemuan kedua spesies ini diidentifikasi melalui nilai jarak genetik pada semua sampel *Ahaetulla*. Jeong (2013) menyebutkan bahwa gen 12S-rDNA pada reptil yang memiliki jarak genetik lebih dari 3% dianggap sebagai spesies yang berbeda. Dalam penelitian ini, *A. mycterizans* dari Lombok, Banten, Jawa Tengah, dan Sukabumi memiliki jarak genetik di atas 3% berdasarkan urutan gen 12S-rDNA (Tabel 4.1). Pada gen Cyt-B, Jeong (2013) mengestimasi sekitar 5% jarak genetik pada reptil dianggap sebagai spesies yang berbeda. Untuk menentukan apakah nama spesies untuk dua jenis ular *Ahaetulla* yang ditentukan, maka dilakukanlah analisis morfologi.

Tabel 4.1. Jarak genetik antar Genus *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen 12S-rDNA

No	Spesimen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	WS1																		
2	WS2	0.00																	
3	NS1	0.34	0.34																
4	NS2	0.52	0.52	0.17															
5	LP1	1.04	1.04	0.69	0.87														
6	LP2	1.04	1.04	0.69	0.87	0.00													
7	WJ1	1.22	1.22	0.87	1.04	0.17	0.17												
8	EJ1	1.39	1.39	1.04	1.21	1.39	1.39	1.57											
9	EJ2	1.39	1.39	1.57	1.74	1.92	1.92	2.10	0.87										
10	BA1	1.57	1.57	1.75	1.93	2.11	2.11	2.29	1.39	0.87									
11	BA2	1.93	1.93	1.57	1.75	1.93	1.93	2.11	1.22	1.75	0.87								
12	BN	4.90	4.90	4.70	4.89	4.90	4.90	5.08	4.69	4.69	4.89	5.28							
13	LO	5.07	5.07	4.88	5.07	5.07	5.07	5.26	4.87	4.87	5.07	5.46	0.52						
14	CJ1	5.26	5.26	5.26	5.26	5.45	5.45	5.64	5.24	4.69	5.26	5.84	1.04	0.87					
15	CJ2	5.47	5.47	5.28	5.28	5.47	5.47	5.66	5.64	6.04	6.25	6.24	1.22	1.40	1.75				
16	WJ2	6.42	6.42	6.03	6.22	6.23	6.23	6.42	6.02	6.23	6.82	6.62	3.21	2.66	2.66	3.20			
17	<i>D. pictus</i>	9.41	9.41	9.62	9.82	9.41	9.41	9.41	10.21	10.01	10.64	10.86	9.81	10.00	10.23	10.44	11.49		
18	<i>C. ornata</i>	10.73	10.73	10.94	11.15	10.73	10.73	10.73	11.34	11.31	11.96	12.42	11.68	11.86	11.69	12.56	13.00	9.03	
19	<i>P. mucosa</i>	12.54	12.54	12.35	12.56	12.16	12.16	12.36	12.13	12.13	12.58	12.81	13.18	13.36	12.95	13.41	13.38	11.26	9.44

Tabel 4.2. Jarak genetik antar Genus *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen Cyt-B

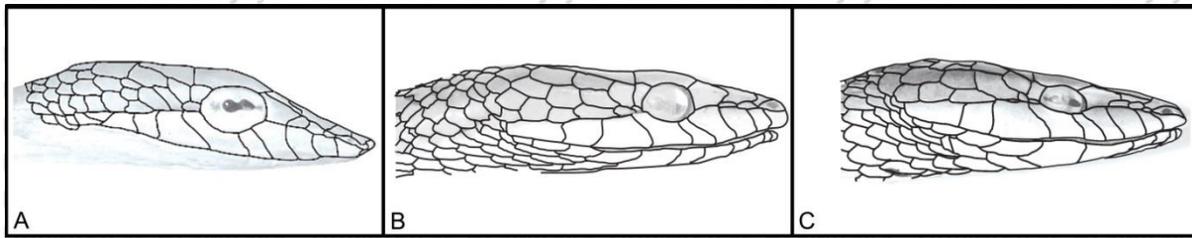
No	Spesimen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	WS1												
2	WS2	0.40											
3	NS1	1.11	1.55										
4	WJ1	1.63	2.11	2.14									
5	EJ1	2.14	2.40	2.40	2.15								
6	EJ2	2.22	2.65	2.48	2.23	0.73							
7	BA1	2.81	3.25	2.82	2.40	1.39	1.63						
8	CJ1	6.21	6.22	6.35	6.42	6.24	6.19	6.07					
9	BN	7.81	8.12	7.93	7.45	7.75	7.66	7.56	1.15				
10	LO	8.01	8.32	8.12	7.64	7.95	7.86	7.76	1.26	0.65			
11	<i>D. pictus</i>	13.5	13.8	13.6	13.6	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5	13.7		
12	<i>C. ornata</i>	13.7	14.2	14.2	13.9	14.2	14.2	14.2	13.3	13.8	14.0	14.0	
13	<i>P. mucosa</i>	15.0	16.1	15.8	15.6	15.7	15.7	15.7	15.5	16.1	15.8	16.6	16.4

4.4. Morfologi Genus *Ahaetulla*

Untuk mengkonfirmasi data hasil analisis molekuler, dilakukan identifikasi morfologi berdasarkan pohon filogenetik *Ahaetulla*. Spesimen yang diidentifikasi berasal dari masing-masing *clade A. prasina* dan *clade A. mycterizans* untuk membedakan karakter morfologi dua spesies *Ahaetulla* tersebut. Identifikasi karakter morfologi spesimen *Ahaetulla* dari Lombok juga dilakukan untuk memperkuat adanya penemuan baru *A. mycterizans* di Lombok. Identifikasi morfologi dilakukan pada karakter morfometri yaitu pengukuran panjang dan lebar bagian tubuh ular dan karakter meristik yaitu perhitungan jumlah sisik ular.

Seperti yang diilustrasikan pada Gambar 4.1, pada morfologi kepala ada kesamaan antara *Ahaetulla* dari Jawa Tengah dan Lombok dan berbeda dengan *Ahaetulla* dari Jawa Timur. *Ahaetulla* dari Jawa Tengah dan Lombok memiliki karakter: 1) permukaan atas moncong berbentuk cembung 2) panjang moncong kurang dari dua kali diameter mata (1,8 kali untuk *Ahaetulla* dari Jawa Tengah, 1,9 kali untuk *Ahaetulla* dari Lombok). Sedangkan *Ahaetulla* dari Jawa Timur memiliki karakter: 1) permukaan atas moncong datar atau tertekan 2) panjang moncong lebih dari dua kali diameter mata

Berdasarkan hasil pengukuran skala pada Tabel 4.3: 1) *Ahaetulla* dari Jawa Tengah dan Lombok memiliki jumlah sisik ventral kurang dari 200 (196 dan 181) sedangkan *Ahaetulla* Jawa Timur memiliki sisik ventral lebih dari 200 (206), 2) sisik loreal *Ahaetulla* dari Jawa Tengah dan Lombok melekat dengan sisik internasal, sedangkan *Ahaetulla* dari Jawa Timur tidak. Untuk jumlah sisik subcaudal, *Ahaetulla* dari Lombok memiliki 163 sisik, *Ahaetulla* dari Jawa Tengah 135, dan *Ahaetulla* dari Jawa Timur 159. Karakter morfologis yang tidak diilustrasikan pada Gambar 4.1 dan tidak disebutkan dalam Tabel 4.3 adalah: 1) bentuk anal masuk untuk *Ahaetulla* dari Jawa Tengah dan Lombok, sedangkan untuk *Ahaetulla* dari Jawa Timur bentuk anal terbagi. 2) *Ahaetulla* dari Jawa Tengah dan Lombok memiliki garis putih di sepanjang pinggiran luar ventral, sedangkan *Ahaetulla* di Jawa Timur tidak memiliki



Gambar 4.1. Perbandingan morfologi kepala antara *A. mycterizans* dan *A. prasina* pada penelitian. A: *A. prasina* dari Malang (EJ2), B: *A. mycterizans* dari Nusakambangan (CJ1), C: *A. mycterizans* dari Lombok (LO)

Tabel 4.3. Perbandingan morfologi Genus *Ahaetulla* berdasarkan identifikasi morfometri dan meristik

Spesimen	Lokasi	Sex	SVL	TaL	TL	TaL/TL	VEN	DSR	SC
<i>A. mycterizans</i>	Lombok	F	64,8	55	119,8	0,327	181	15:15:13	163
<i>A. mycterizans</i>	Jawa Tengah	F	75	35	107	0,459	196	15:16:13	135
<i>A. prasina</i>	Jawa Timur	F	43,2	22,5	65,7	0,342	206	16:16:13	159

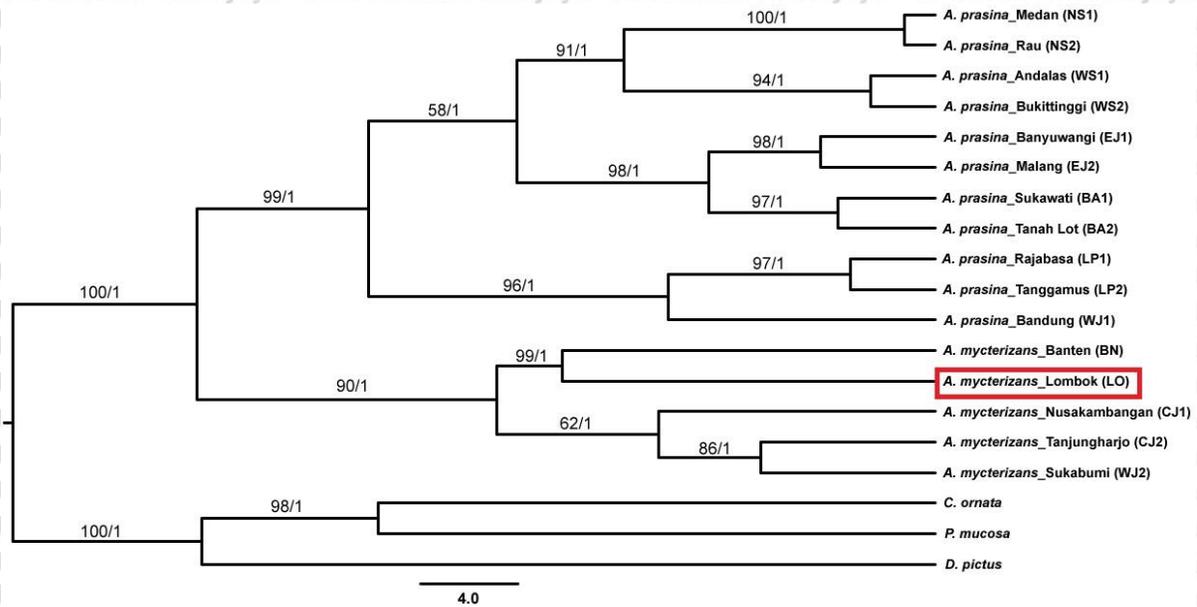
Keterangan: SVL:Snouth-Vent Length (Panjang moncong-ventral); TaL: Tail Length (Panjang ekor); TL: Total Body Length (SVL + TL) (Total panjang tubuh); DSR: Sisik Dorsal; VEN:Sisik Ventral; SC: Sisik Subcaudal

Hasil identifikasi morfologi kemudian dibandingkan dengan karakter ular *Ahaetulla* yang diberikan oleh Smith (1943) dan De Rooij (1917) untuk menentukan nama spesies. *Ahaetulla* dari Lombok dan Jawa Tengah memenuhi empat kriteria karakter diagnostik *A. mycterizans* yang diberikan oleh Smith (1943) dan De Rooij (1917) (yang disebut sebagai *Dryophis mycterizans* dan *D. xanthozona*): 1. jumlah sisik ventral (186-195)), 2. bentuk anal masuk, 3. panjang moncong kurang dari dua kali diameter mata (1,8 dan 1,9) 4. garis putih di sepanjang batas luar ventral. Sementara karakter morfologis *Ahaetulla* dari Jawa Timur memenuhi empat kriteria karakter diagnostik dengan karakter *A. prasina* yang diberikan oleh Smith (1943) dan De Rooij (1917) (yang disebut sebagai *Dryophis prasinus*): 1. jumlah sisik ventral 194-235 (206), 2 bentuk anal terbagi, 3. panjang moncong lebih dari dua kali diameter mata, 4. sisik subcaudal berjumlah antara 151-207 (159).

Berikutnya, Miralles dan David (2010) juga menambahkan karakter diagnostic untuk membedakan *A. mycterizans* dan *A. prasina*. Permukaan moncong bagian atas berbentuk cembung pada *A. mycterizans* tetapi datar atau tertekan pada *A. prasina*. Karakter diagnostik tersebut memperkuat hasil identifikasi sebelumnya bahwa *Ahaetulla* dari Jawa Tengah dan Lombok adalah *A. mycterizans* dan *Ahaetulla* dari Jawa Timur adalah *A. prasina*. Sedangkan untuk jumlah sisik subcaudal, *Ahaetulla* dari Jawa Tengah sesuai dengan karakter diagnostik Smith (1943) sekitar 132-156 (135) untuk *A. mycterizans*, sedangkan *Ahaetulla* dari Lombok memiliki jumlah sisik subcaudal lebih dari kisaran yang diberikan, yaitu 163. Namun, Hasil ini tidak jauh berbeda dengan pengukuran Miralles dan David (2010) yang menemukan *A. mycterizans* di Sumatra dengan jumlah sisik subcaudal 168. Karena banyaknya persamaan dalam karakter morfologis yang sesuai dengan karakter *A. mycterizans* dan *A. Prasina* oleh Smith (1943), De Rooij (1917) dan Miralles dan David (2010), dapat diambil keputusan bahwa *Ahaetulla* dari Jawa Tengah dan Lombok sebagai *A. mycterizans*, sedangkan *Ahaetulla* dari Jawa Timur sebagai *A. prasina*.

4.3 Hubungan filogenetik Genus *Ahaetulla*

Hubungan filogenetik dengan analisis ML dan BI menunjukkan topologi pohon yang identik terhadap pengelompokan Ular *Ahaetulla* baik berdasarkan urutan gen 12S-RDNA maupun Cyt-B pada Gambar 4.2. Sesuai dengan perhitungan jarak genetik, ada 2 *clade* utama yang memisahkan dua spesies *Ahaetulla* dengan nilai yang valid (ML / BPP = 100/1). Pada *clade* pertama terdapat *A. prasina* dari Sumatra, Jawa Timur, Bandung (Jawa Barat), Bali, dan *clade* kedua terdapat *A. mycterizans* Jawa Tengah, Sukabumi (Jawa Barat), Banten, dan Lombok. Pada *clade A. prasina*, ada 2 *subclades* yang terbentuk (ML / BPP = 99/1) terdiri dari *Clade Sumatera*, Jawa Timur dan Bali, dan *clade Jawa Barat dan Lampung*. Dalam *clade A. mycterizans*, terdapat 2 *subclade* terbentuk (ML / BPP = 90/1) yang terdiri dari *clade Jawa Tengah dan Sukabumi* (Jawa Barat) kemudian *clade Lombok dan Banten*. *A. mycterizans* dari Lombok dan Banten berada dalam satu *clade* dengan bootstrap yang signifikan (ML / BPP = 99/1) meskipun Lombok terletak di Sunda Kecil dan Banten di Paparan Sunda.



Gambar 4.2. Pohon filogenetik Genus *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen 12S-rDNA dan Cyt-B dengan analisis ML dan BI. Keterangan pada cabang menunjukkan nilai reliabilitas pohon. BPP/Bootstrap.

A. mycterizans dari Lombok, sebagai bagian dari Sunda Kecil, yang berada dalam satu *clade* dengan *A. mycterizans* dari Banten dan terpisah dari Jawa Tengah dan Sukabumi memerlukan pembahasan lebih jauh. Secara statistik, hal ini disebabkan oleh jarak genetik yang kecil antara *A. mycterizans* dari Lombok dan Banten, yaitu 12S-rDNA: 0,52%, Cyt-B: 0,65%,. Ini menunjukkan bahwa *A. mycterizans* dari Lombok memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan *A. mycterizans* dari Banten dibandingkan dari daerah lain. Analisis filogenetik memberikan asumsi bahwa *A. mycterizans* dari Lombok berasal dari Paparan Sunda. Hal tersebut didasarkan pada pendapat Inger (2005) yang mengemukakan bahwa fauna di garis Wallace, termasuk wilayah Sunda Kecil, berasal dari wilayah Paparan Sunda.

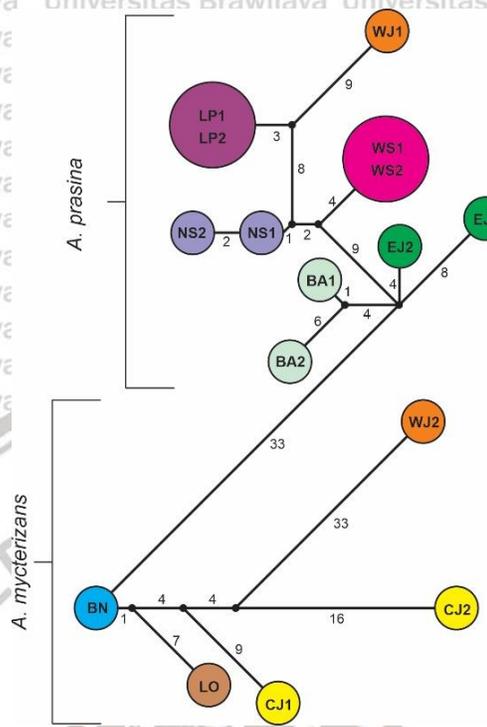
4.4. Haplotype Network Genus *Ahaetulla*

Haplotype network dikonstruksi berdasarkan urutan gen 12S-rDNA. *Haplotype network* sesuai dengan jarak genetik dan pohon filogenetik. Ada 2 kelompok utama yang terdiri dari spesies *A. prasina* dari Sumatra, Jawa Timur, dan Bali dan spesies *A. mycterizans* dari Banten, Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Lombok seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.3. Jumlah perbedaan pada basa nukleotida antara sampel ditulis pada masing-masing cabang *haplotype*

network. Perbedaan terkecil antara populasi *A. prasina* dan *A. mycterizans* di Indonesia adalah sekitar 37 titik basa nukleotida, tepatnya antara *A. mycterizans* dari Banten dan *A. prasina* dari Malang, Jawa Timur. Penghitungan ini sesuai dengan p-distance pada Tabel 4.1 yang menunjukkan jarak genetik antara *A. mycterizans* dari Banten (BN) dan *A. prasina* dari Malang (EJ2) adalah sekitar 4,69%. Itu adalah jarak genetik terkecil antara *A. prasina* dan *A. mycterizans* di Indonesia.

Lingkaran yang lebih besar pada *haplotype network* menunjukkan jumlah spesimen yang lebih banyak yang memiliki urutan gen 12S-rDNA yang 100% sama. Hal ini terjadi pada dua *A. prasina* dari Lampung dan dua *A. prasina* dari Sumatra Barat yang mengelompok menjadi satu lingkaran besar karena memiliki jarak genetik 0,00% seperti pada Tabel 4.1

Perbedaan basa nukleotida antara *A. prasina* dari Malang dan *A. mycterizans* dari Lombok sejumlah 37 titik terjadi pada sekuens ke- 11-17, 64, 72, 111, 119, 126, 139, 175-178, 209, 219, 222-223, 232, 282-284, 306, 402, 508, 533, 554-555, 561-562, 554-555. Dari data tersebut bisa dianalisis bahwa perbedaan basa nukleotida pada gen 12S rDNA dari dua spesies ini banyak terjadi pada basa antara 11 sampai 284, sedangkan untuk sekuens antara 300-500 sedikit sekali terjadi mutasi. Berikutnya perbedaan banyak terjadi lagi untuk sekuens di atas 500. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada sekuens 12S rDNA terdapat daerah yang mempunyai laju mutasi lebih tinggi dan ada daerah yang bersifat lebih conserve. Adanya daerah yang mengalami banyak titik mutase tersebut mendorong adanya spesiasi yang membedakan karakter *A. prasina* dan *A. mycterizans*. Di bagian lain, ada titik basa yang menunjukkan yang hanya terdapat pada *A. prasina* dari Malang dan *A. mycterizans* dari Lombok yaitu pada sekuens ke- 293 dan 461. Pada sekuens ke-293 terdapat mutase dari A → G, sedangkan pada sekuens ke- 461 terdapat mutase dari C → T.



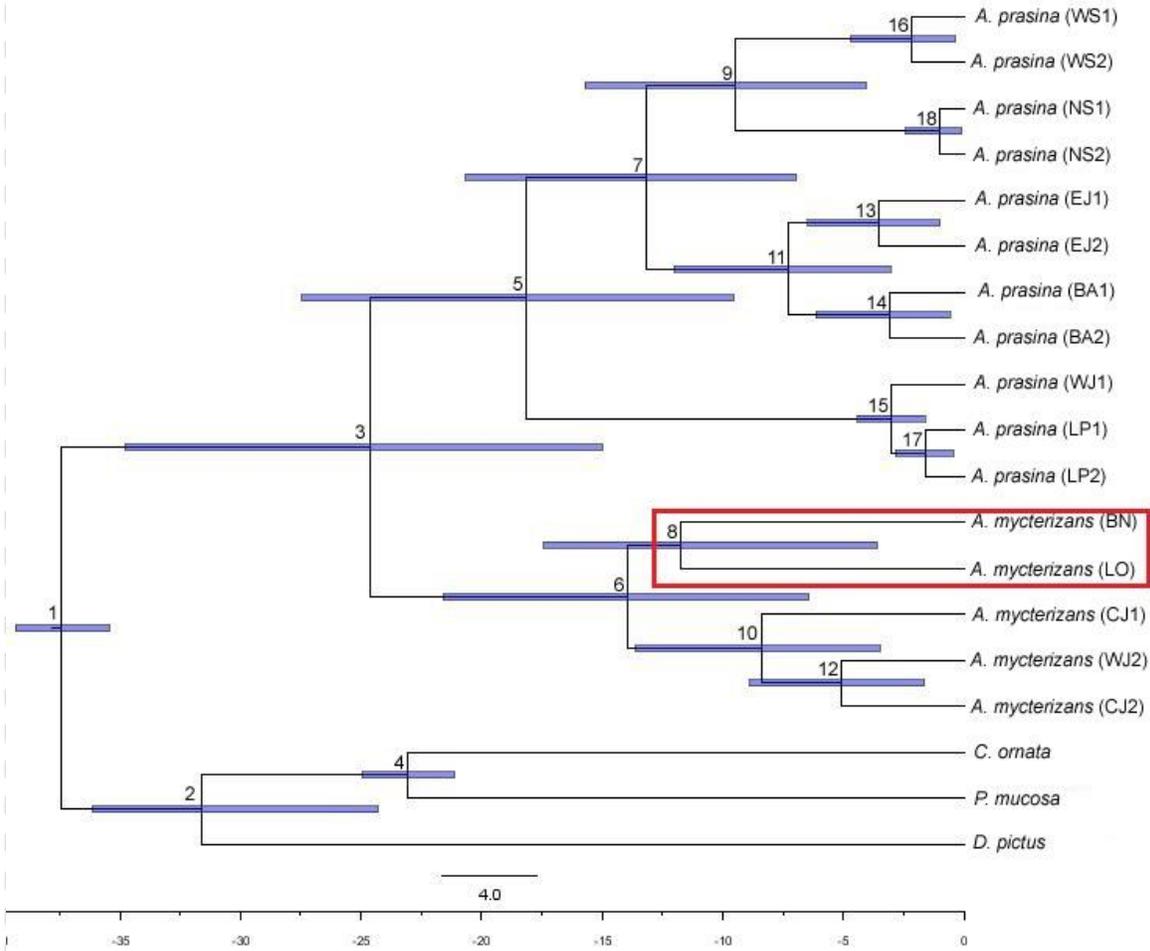
Gambar 4.3. *Haplotype Network* Genus *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil berdasarkan urutan gen 12S-rDNA. Angka pada cabang *haplotype* menunjukkan perbedaan titik basa nitrogen antar spesimen *Ahaetulla*.

Konsep spesies yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsep spesies genetik, morfologis, dan filogenetik. Konsep spesies genetik diterapkan ketika penentuan spesies ini mengacu pada Jeong (2013) yang membedakan spesies reptile berdasarkan perbedaan jarak genetiknya. Berikutnya, konsep spesies filogenetik digunakan dalam pembahasan ini dikarenakan adanya hasil analisis filogenetik yang menunjukkan posisi *A. mycterizans* dan *A. prasina* pada clade yang berbeda dg nilai reliabilitas tinggi (ML/BPP=100/1) sehingga diprediksikan ular *Ahaetulla* dalam penelitian ini sebagai spesies yang berbeda. Sementara konsep spesies morfologis diterapkan ketika membandingkan karakter morfologi ular dalam penelitian ini dengan karakter morfologi dari *A. mycterizans* dan *A. prasina* yang diberikan oleh Smith (1943) dan De Rooij (1917). Hasilnya menunjukkan bahwa perbedaan morfologi pada kedua spesies tersebut merupakan karakter pembeda antara *A. prasina* dan *A. mycterizans*. Berdasarkan tiga konsep spesies tersebut, maka secara genetic, morfologis, dan

filogenetik, ditemukan 2 spesies *Ahaetulla* dalam penelitian ini, yaitu *A. prasina* dan *A. mycterizans*.

4.5. Estimasi Waktu Divergensi *Ahaetulla* Genus

Hasil analisis waktu divergensi yang ditunjukkan pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.4, memperkirakan bahwa waktu divergensi Genus *Ahaetulla* ketika mulai terdiversifikasi dari kelompok genus lain pada Famili Colubridae di Eosen (sekitar 37,7 Ma). Genus *Ahaetulla* sendiri mulai mengalami spesiasi menjadi *A. prasina* dan *A. mycterizans* pada akhir Oligosen akhir hingga pertengahan Meiosen (24, 9 - 14,2 Ma). Hasil tersebut sesuai dengan Nugraha dkk. (2018) bahwa Subfamili Ahaetullinae mengalami diverifikasi di akhir Oligosen sekitar 24 Ma. Pada akhir Oligosen, itu adalah periode di mana ular pada Famili Colubridae melakukan migrasi ke daratan baru akibat turunnya permukaan air laut yang menyebabkan adanya proses spesiasi secara alopatrik (Hall 2013). Alencar dkk. (2016) juga memiliki analisis yang sama bahwa selama Oligosen hingga Miosen, terjadi tingkat spesiasi yang tinggi. Periode waktu ini ditandai oleh beberapa peristiwa geografis yang terjadi di Asia dan pada kenyataannya, ular Colubridae diperkirakan berasal dari benua Asia berdasarkan catatan fosil yang ditemukan di Thailand (Nugraha dkk, 2018). Analisis berikutnya menunjukkan bahwa diversifikasi *A. prasina* di wilayah Paparan Sunda sebagian besar terjadi pada masa Pleistosen (<10 Ma). Periode ini dikenal sebagai zaman es yang menyebabkan permukaan laut turun sehingga daratan yang semula terpisah oleh laut bisa saling terkoneksi sehingga menyebabkan mudahnya suatu spesies berpindah ke daratan baru dan memiliki habitat yang baru (Supsup dkk., 2016)



Gambar 4.4. Kronogram waktu divergensi ular Genus *Ahaetulla* di Indonesia yang dikonstruksi menggunakan relaxed normal clock Bayesian dengan 95% credible interval (CI) berdasarkan urutan gen 12S-rDNA

Tabel 4.4. Waktu divergensi Genus *Ahaetulla* berdasarkan kronogram pada Gambar 4.4 dengan nilai 95% Credible Interval (CI) dari *relaxed molecular clock* Bayesian menggunakan gen 12S-rDNA

Clade	Waktu Divergensi (jt. Thn. lalu)	95% CI (Ma)
1	37,7	35,43-39,3048
2	32,0	24,2904-36,141
3	24,9	14,9858-34,7936
4	22,8	21,1138-24,9582

Clade	Waktu Divergensi (jt. Thn. lalu)	95% CI (Ma)
5	18,4	9,5434-27,4696
6	14,2	6,4204-21,6003
7	13,8	6,9508-20,6729
8	12,1	3,5962-17,435
9	9,4	4,052-15,7216
10	8,7	3,4716-13,6195
11	7,3	3,0397-12,032
12	5,5	1,6292-8,8856
13	4,2	0,9979-6,4754
14	3,1	0,5814-6,1188
15	2,9	1,6145-4,4118
16	2,3	0,3498-4,6983
17	1,8	0,4383-2,834
18	1,1	0,0806-2,4333

Selama Meiosen hingga awal Pliosen (sekitar 18,4 - 1,2 Ma), spesies *A. prasina* dan *A. mycterizans* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil mulai melakukan diversifikasi. *A. mycterizans* di Lombok mulai melakukan diversifikasi selama Miocene (sekitar 12,1 Ma). Hal ini terkait dengan sejarah geografis Pulau Sunda Kecil di masa lalu. Sebagian besar pulau di Kepulauan Sunda Kecil sangat muda secara geologis (1–15 Ma) dan tidak pernah terhubung dengan daratan. Fakta ini mungkin menunjukkan bahwa fauna yang ada di dalamnya mulai berkembang secara mandiri (De Lang, 2011). Akan tetapi, jika melihat jarak genetik antara *A. mycterizans* Lombok dan Banten yang relatif kecil (12S-rDNA: 0,52%; Cyt-B: 0,65%), dapat diasumsikan bahwa *A. mycterizans* di Lombok berasal dari wilayah Paparan Sunda. Kami menduga bahwa ada penyebaran *A. mycterizans* dari Banten menuju Lombok di masa lalu. Diversifikasi ular dari satu daerah ke daerah lain disebabkan oleh beberapa faktor: 1) migrasi spesies 2) introduksi yang dimediasi oleh manusia 3) aliran material (Longrich dkk., 2015; Reilly dkk., 2019).

Pertama, faktor migrasi spesies tidak dimungkinkan menjadi faktor yang mendasari keberadaan *A. mycterizans* di Lombok karena antara Lombok dan daratan Sunda ada barrier geografis yang signifikan. Bagian dalam Selat Lombok membuat Lombok dan pulau-pulau Sunda Kecil terisolasi dari daratan Paparan Sunda seperti pada peta Gambar 4.5. Ahli biologi percaya bahwa kedalaman Selat Lombok yang mengisolasi hewan di kedua sisi daratan tersebut sehingga tidak memungkinkan adanya migrasi pada masa itu (Lohman dkk., 2011).

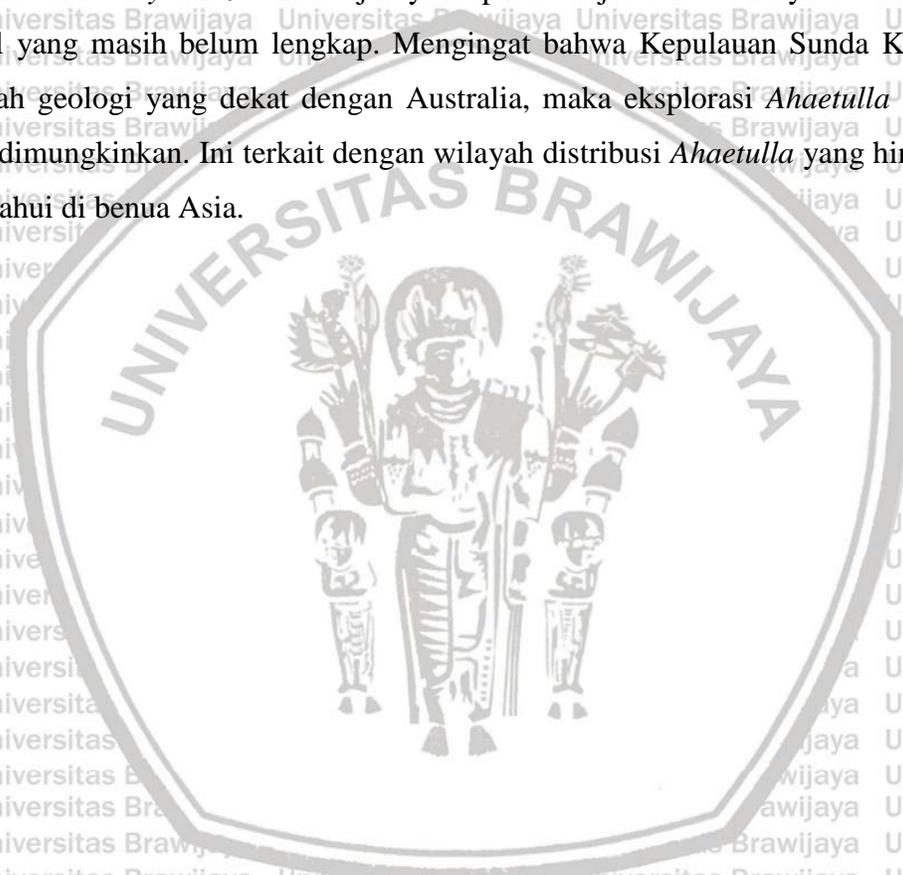


Gambar 4.5. Rekonstruksi penyatuan daratan Paparan Sunda dan Sunda Kecil pada zaman es (Pleistosen). Sumber peta: www.natureearthdata.com

Kedua, faktor introduksi oleh manusia juga bukan merupakan faktor yang sesuai karena penyeberangan laut paling awal oleh pelaut terjadi pada masa Awal Pleistosen (Bednarik, 2007). Oleh karena itu, diperkirakan bahwa keberadaan *A. mycterizans* di Lombok disebabkan oleh aliran material. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Longrich dkk. (2015) yang menyimpulkan bahwa distribusi reptil yang terhalang oleh barrier geografis dapat terjadi melalui mekanisme aliran material. Inger (2005) menunjukkan bahwa katak yang berada di area Wallace terutama yang berasal dari daratan utama Paparan Sunda melalui berpindah melalui mekanisme aliran material. Hasil ini juga sesuai dengan penelitian oleh terbaru Reilly dkk. (2019) yang membandingkan struktur genetik antara reptil dari Paparan Sunda dan Sunda Kecil. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan dalam jarak genetik pada reptil dari kepulauan itu. Dengan demikian, kehadiran

reptil di Sunda Kecil dapat disebabkan oleh introduksi yang dimediasi manusia atau reptil tersebut memasuki Kepulauan Sunda Kecil pada waktu yang relatif baru.

Penemuan baru keberadaan *A. mycterizans* di Lombok dapat menambah daftar temuan spesies ular yang mendiami Pulau Sunda Kecil yang sebelumnya dilakukan De Lang (2011) sebanyak 29 spesies. Penemuan ini juga menambah area distribusi *A. mycterizans*, yang sebelumnya hanya tercatat di Jawa, Sumatra, Malaysia dan Thailand (wilayah Paparan Sunda). Eksplorasi *A. mycterizans* selanjutnya dapat dilanjutkan di wilayah lain di wilayah Sunda Kecil yang masih belum lengkap. Mengingat bahwa Kepulauan Sunda Kecil juga memiliki sejarah geologi yang dekat dengan Australia, maka eksplorasi *Ahaetulla* di benua Australia juga dimungkinkan. Ini terkait dengan wilayah distribusi *Ahaetulla* yang hingga saat ini hanya diketahui di benua Asia.



BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pohon filogenetik Genus *Ahaetulla* menunjukkan dua grup yang terpisah, yaitu grup *A. prasina* dan *A. mycterizans* dengan perbedaan genetik lebih dari 3% pada 12S-rDNA dan lebih dari 5% pada gen Cyt-B. Hasil analisis filogenetik ini juga memunculkan temuan baru keberadaan *A. mycterizans* di Lombok.
2. *Haplotype network* Genus *Ahaetulla* menggambarkan perbedaan antara kelompok *A. prasina* dan *A. mycterizans*. Perbedaan antara dua spesies tersebut diindikasikan adanya perbedaan 33 titik basa nukleotida pada gen 12S-rDNA.
3. Estimasi waktu divergensi Genus *Ahaetulla* menunjukkan spesiasi Genus *Ahaetulla* di Paparan Sunda dan Sunda Kecil terjadi pada akhir oligosen sekitar 24,9 Ma dimana pada masa ini terjadi proses spesiasi yang tinggi di kawasan Asia.

5.2 Saran

Dengan adanya penemuan *A. mycterizans* di Lombok bisa menjadi tambahan daerah distribusi *A. mycterizans* yang sebelumnya hanya terdapat di Paparan Sunda. Penemuan ini juga mendorong eksplorasi lebih jauh terhadap distribusi *A. mycterizans* ke beberapa daerah lain di Kawasan Sunda Kecil maupun di Benua Australia. Kemiripan morfologi antara *A. prasina* dan *A. mycterizans* yang sering menyebabkan kesalahan identifikasi memerlukan analisis molekuler agar hasil identifikasi lebih akurat.



Halaman ini sengaja dikosongkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alencar LRV, Quental TB, Graziotin FG, Alfaro ML, Martins M (2016). Diversification in vipers: phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 105:50-62. doi: 10.1016/j.ympev.2016.07.029
- Alfaro, M. E., Karns, D. R., Voris H. K., Brock, C. D., Stuart, B. L. 2008. Phylogeny, evolutionary history, and biogeography of orienttal-Autralian rear-fanged water snakes (Colubroidea: Homalopsidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phy. Evol.* 46: 576-593.
- Baker N (2019). Some snake records from Gunung Arong Forest Reserve, Johor, Peninsular Malaysia. *Southeast Asia Vertebrate Records* (2019): 001-006
- Bednarik RG (2007). Experimental crossing from Sumbawa to Komodo by bamboo raft. *INA Quarterly* 34(2): 13-17
- Bickford, D., D.J. Lohman, N.S. Sodhi, P.K.L. Ng, R. Meier. 2007. Cryptic species: A new window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22: 148-55.
- Brown R.P. dan Z. Yang. 2011. Rate variation and estimation of divergence times using strict and relaxed clocks. *BMC Evolutionary Biology.* 11: 271.
- Brown, T. A. 2002. *Genomes*. 2nd Edition. London: Oxford: Wiley-Liss.
- Das, Indraneil. 2010. *A field Guide to The Reptiles of South-East Asia*. London; New Holland (UK) Ltd.
- De Lang, R. 2011. The Snakes of the Lesser Sunda Islands (Nusa Tenggara), Indonesia. *Asian Herpetological Research.* 2(1): 46-54
- De Rooij N (1917). *The Reptiles of the Indo-Australian Archipelago*. Leiden: E.J. Brill
- Dos Reis, M., Donoghue, P. C. J., Yang, Z. 2016. Bayesian Molecular Clock Dating of Species Divergences in The Genomic Era. *Nature Review Genetics.* 17: 71-80.
- Dos Reis, M., Yang, Z. 2011. Approximately Likelihood Calculation on a Phylogeny for Bayesian Estimation of Divergences Times. *Molecular Biology and Evolution.* 28(7): 2162-2172
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. J. 2007. BEAST v1.8.4. Available at <https://github.com/beast-dev/beast-mcmc/releases/tag/v1.8.4> (Diakses 17 Februari, 2018).
- Drummond, A. J., Ho, S. Y., Phillips, M. J., Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4: e88.
- Ekarini, D. F. 2014. Karakter Morfologis, Morfometris, dan Meristik Ular Pucuk Hijau (*Ahaetulla prasina* (Boie, 1827)) dan Ular Pucuk Malaya (*Ahaetulla mycterizans*)

(Linnaeus, 1758)) di Sungai Opak, Daerah Istimewa Yogyakarta. Skripsi. Universitas Gadjah Mada.

Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Wisyarti, S., Rahayu, S.: 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta

Ferreri, M, Qu, W, Han, Bo. 2011. Phylogenetic networks: A tool to display character conflict and demographic history. *African Journal of Biotechnology* . 10(60): 12799-12803

Figueroa, A., Mckelvy, A. D., Grismer, L. L., Bell, C. D., Lailvaux, S. P. 2016. A Species Level Phylogeny of Extant Snakes with Description of a New Colubrid Subfamily and Genus. *PLoS ONE*. 11: 9.

Futuyama, D.J. 2005. *Evolution*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.

Gower, D.J., J.E. Richardson, B.R. Rosen, L. Rüber, dan S.T. Williams. 2012. *Biotic evolution and environmental change in Southeast Asia*. Cambridge University Press. Cambridge.

Hall, B. G. 2013. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*. 20(5): 1229-1235

Hall, R. 2009. Southeast Asia's Changing Palaeogeography. *Blumea – Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*. 54(1-3): 148-161

Hall, R. 2012. Sundaland And Wallacea: Geology, Plate Tectonics and Palaeogeography Biotic Evolution and Environmental Change in Southeast Asia , eds D. J. Gower et al. London: Cambridge University Press.

Ho, S.Y.W. dan M.J. Phillips. 2009. Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology* 58: 367–380.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 17: 754–755.

Inger R. F (2005) The frog fauna of the Indo-Malayan region as it applies to Wallace's line. In: *Proceedings of an International Conference on Biogeography and Biodiversity*. Institute of Biodiversity and Environmental Conservation 2005; Samrahan, Sarawak, Malaysia. p.82

Jeong, T.A., Jun, J., Han, S., Kim, H., Oh, K., Kwak, M. 2013. DNA barcode reference data for korean herpetofauna and their applications. *Molecular Ecology Reseources*. doi: 10.1111/1755-0998.12055

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.

Leache, A.D. & Reeder, T.W. 2002. Molecular Systematics of the eastern fence Lizard (Sceloporus undulates): A comparison of parsimony, likelihood and bayesian approaches. *Syst. Biol.* 51:44-68.

- Laopichienpong N., Muangmai, N., Supikamol, A., Twilprawat, P., Chanhome, L., Suntrarachun, S., Peyachoknagul, S., Srikulnath, K. 2016. Assessment of snake DNA barcodes based on mitochondrial COI and Cytb genes revealed multiple putative cryptic species in Thailand. *594*(2): 238-247
- Leo, S., Amarasinghe, T., Supriatna, J. 2015. Morphological variation of *Ahaetulla prasina* (Boie, 1827) (Squamata: Colubridae) in Java, Indonesia. *Online*. Retrieved from: https://www.researchgate.net/publication/303457249_Morphological_variation_of_Ahaetulla_prasina_Boie_1827_Squamata_Colubridae_in_Java_Indonesia.
- Lohman DJ, Bruyn M, Page T, Rintelen K, Hall R, Ng PKL, Shih HT, Carvalho GR, Rintelen T. 2011. Biogeography of the Indo-Australian Archipelago. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42: 205-226.
- Longrich NR, Vinther J, Pyron A, Pisani D, Gauthier A (2015). Biogeography of worm lizards (Amphisbaenia) driven by end-Cretaceous mass extinction. *Proceedings of The Royal Society B* 282: 20143034. doi: 10.1098/rspb.2014.3034
- Matsui, M., A. Hamidy, R.M. Murphy, W. Khonsue, P. Yambun, T. Shimada, A. Norhayati, M.B. Daicus, J.P. Jiang. 2010. Phylogenetic relationships of Megophryid frogs of the genus *Leptobrachium* (Amphibian, Anura) as revealed by mtDNA Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 259-272.
- Mallet, J. 2007. *Species, Concepts of biodiversity*. Elsevier. Oxford.
- Michaux, B. 2010. Biogeology of Wallacea: Geotectonic Models, Areas of Endemism, and Natural Biogeographical Units. *Biological Journal of the Linnean Society*. 101: 193-212.
- Minarwan. 2012. Tectonic Models of The Lesser Sunda Island. *Indonesian Journal of Sedimentary Geology*. 25: 8-15
- Miralles, A. and P. David. 2010. First record of *Ahaetulla mycterizans* (Linnaeus, 1758) (Reptilia, Squamata, Colubridae) from Sumatra, Indonesia, with an expanded definition. *Zoosystema* 32 (3): 449-456.
- Morley R. J. 2000. Origin and evolution of tropical rain forests. John Wiley & Sons. 362. Chichester.
- Nagy, Z. T., Lawson, R., Joger, U., Wink, M. 2004. Molecular systematics of racers, whipsnakes and relatives (Reptilia: Colubridae) using mitochondrial and nuclear markers. *J. Zool. Syst. Evol. Research*. 42: 223-233.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. New York.
- Nugraha, F. A. D., Fatchiyah, F., Smith, E. N., Kurniawan, N. 2018. Phylogenetic analysis of colubrid snakes based on 12S rDNA reveals distinct lineages of *Dendrelaphis pictus* (Gmelin, 1789) populations in Sumatra and Java. *Biodiversitas*. 19(1). 303 – 310.

- Pyron, R. A., Kandambi, H. K. D., Hendry, C. R., Pushpama, V., Burbrink, F. T., Somaweera, R. 2013. Genus-level phylogeny of snakes reveals the origins of species richness in Sri Lanka. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 66: 969–978
- Reilly SB, Stubbs AL, Karin BR, Arida E, Iskandar DT (2019). Recent and rapid colonization of the Lesser Sundas Archipelago from adjacent Sundaland by seven amphibian and reptile species. *Biorxiv The Preprint Server for Biology*. doi: 10.1101/571471
- Reilly, SB. 2016. *Historical Biogeography of Reptiles and Amphibians from the Lesser Sunda Islands of Indonesia*. United States; ProQuest LLC.
- Sauquet, H. 2013. A practical Guide to Molecular Dating. *Comptes Rendus Palevol* 12: 355- 367.
- Simon, Y. W., Philips, M. J., Cooper, A., Drummond, A. J. 2005. Time Dependency of Molecular Rate Estimates and Systematic Overestimation of Recent Divergences Time. *Molecular Biology and Evolution*, 22(7): 1561-1568
- Smith MA (1943) The Fauna of British India, Ceylon and Burma, including the Whole of the Indo-chinese Subregion. Reptilia and Amphibia. Vol. III, Serpentes. London: Taylor & Francis
- Stadler, T. 2010. Sampling-through-time in birth-death trees. *Journal of Theoretical Biology* 267: 396–404.
- Stuart. J. A. 2009. *Mitochondrial DNA Methods and Protocol*. 2nd Edition. Canada: Humana Press.
- Supsup C, Diesmos AC, Rico ELB, Brown RM (2016). Amphibian and reptiles of Cebu, Philippines: The poorly understood herpetofauna of an island with very little remaining natural habitat. *Asian Herpetologica Research* 7(3): 151-179. doi: 10.16373/j.cnki.ahr.150049
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), Beta Version 4.0b10. Sinauer. Sunderland.
- Tjong, D.H., D.T. Iskandar, dan D. Gusman. 2010. Phylogentic relationship among *Limnonectes* (Ranidae: Amphibia) found in West Sumatra with other species from South East Asia based on the based on the 16S rRNA Gen. *Makara Sains* 14: 79-87.
- Turelli, M., N.H. Barton, dan J.A. Coyne. 2001. Theory and Speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16(16): 330-343.
- Woods, H. 2012. Divergence time estimation using BEAST v1.7.2. Workshop on Molecular Evolution. Massachusetts.
- Yang, Z., Dos Reis, M. 2011. Statistical Properties of The Branch-site Test of Positive Selection. *Molecular Biology and Evolution*. 28(3): 1217-1228

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Keterangan Kelaikan Etik Penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1081-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : STUDI FILOGENETIK ULAR PUCUK (*Ahaetulla sp.* Link, 1802) (SERPENTS: COLUBRIDAE) BERDASARKAN URUTAN GEN CYTHOCHROME B (CYT B) DAN 12S rDNA DI PAPARAN SUNDA DAN SUNDA KECIL

PENELITI : LILIN IKA NUR INDAHSARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

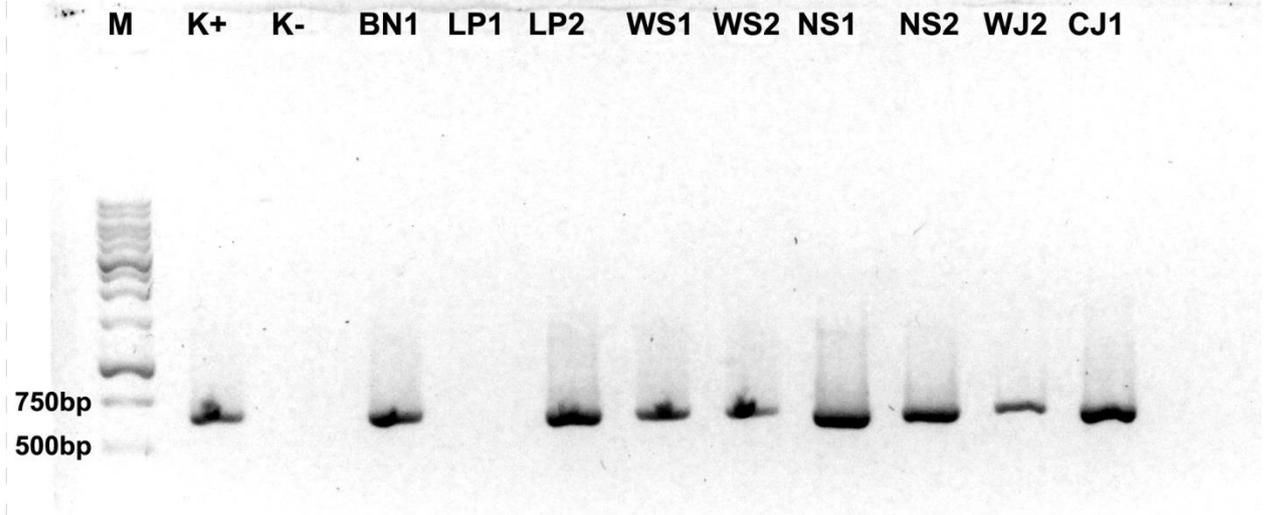
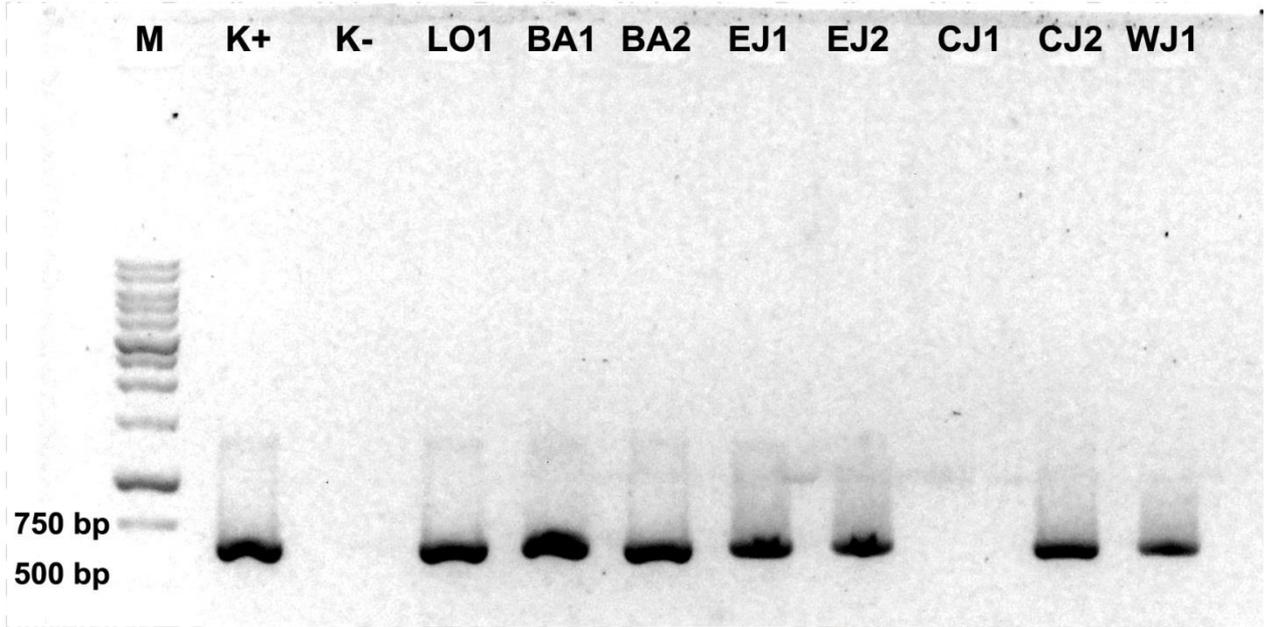
Malang, 17 Februari 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Hasil Elektroforesis Gen 12S-rDNA Ular Genus *Ahaetulla*



Lampiran 4. Keterangan LoA dari Jurnal



1st International Seminar on Smart Molecule of Natural Resources (ISSMART) 2019
Faculty of Science, 2nd Floor Building, Brawijaya University,
Jl. Veteran, Malang 65145
Email: jssmart@ub.ac.id; smonagenes@ub.ac.id; smonagenes@gmail.com

LETTER OF ACCEPTANCE

Malang, June 17th 2019

Dear Lilin Ika Nur Indahsari
Universitas Brawijaya

Congratulation. On behalf of the committee, we are pleased to inform you that your submitted full-paper entitled

“DNA barcoding as a method for species identification: case study in *Ahaetulla* snake.” Paper ID: IOP-15

is accepted to be published in the Journal of Physics: Conference Series IOP Publishing.

Should you need further assistance, please feel free to contact the secretariat by sending your email to jssmart@ub.ac.id.

Sincerely yours,
Head of Committee 1st ISSMART 2019

Eko Suyanto, M.Sc.
Smart Molecule of Natural Genetics Resource





Current Status Manuscript is currently being evaluated by the referees

Manuscript Information

Corresponding Author	Dr. NIA KURNIAWAN	wawan@ub.ac.id
Manuscript Code	ZOO-1904-1	
Manuscript Type	Research Article	
English Title	A new record of <i>Ahaetulla mycterizans</i> (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae) from Lesser Sunda region, Indonesia, based on molecular and morphological identifications	
Authors	1. LILIN IKA NUR INDAHSAARI lilin.annovasho@gmail.com 2. Prof. FATCHIYAH FATCHIYAH fatchiya@ub.ac.id 3. Assoc. Prof. ERIC NELSON SMITH e.smith@uta.edu 4. Dr. NIA KURNIAWAN wawan@ub.ac.id	
English Abstract	<p>Previous studies of the distribution of <i>Ahaetulla</i> snake in Indonesia only focused on morphological characters without any molecular data. This study aimed to analyse phylogenetic relationships among the genus <i>Ahaetulla</i> in Indonesia based on mitochondrial DNA. Cyt-B and 12S-rDNA genes were isolated, amplified, and sequenced to analyse phylogenetic relationships and estimate the divergence time of 16 specimens of <i>Ahaetulla</i> in Sundaland and Lesser Sunda regions. Morphological characters of <i>Ahaetulla</i> also have been identified to confirm data of the phylogenetic tree. Phylogenetic analyses and morphological characters showed that both <i>A. mycterizans</i> and <i>A. prasina</i> occur in the Sundaland also in Lesser Sunda Region. The occurrence of <i>A. mycterizans</i> in this latter region is reported here for the first time; previously, <i>A. mycterizans</i> was only known from Sundaland. The analysis of divergence time estimated that the presence of <i>A. mycterizans</i> in Lesser Sunda occurred during Miocene, around 12,1 Ma, and suggests the reason of the existence of <i>A. mycterizans</i> in Lesser Sunda. This species is added to the list of snakes that inhabit Lesser Sunda and initiate an opportunity to survey in more details the presence of <i>A. mycterizans</i> in other regions on South-east Asia.</p>	
English Key Words	Ahaetulla mycterizans, Ahaetulla prasina, Lesser Sunda, Phylogenetic, Sundaland	
Uploaded Documents	1. ZOO-1904-1_1_Figure_3_-_Phylogenetic_Tree.jpg	Figure
	2. ZOO-1904-1_copyright_form_1.pdf	Copyright Form
	3. ZOO-1904-1_1_Figure_2_-_Morphological_Comparison.jpg	Figure
	4. ZOO-1904-1_1_Figure_4_-_Haplotype_Network.jpg	Figure
	5. ZOO-1904-1_manuscript_1.docx	Main Manuscript Document
	6. ZOO-1904-1_manuscript_1.pdf	Main Manuscript Document
	7. ZOO-1904-1_0_Figure_5_-_The_Divergence_Time.jpg	Figure
	8. ZOO-1904-1_0_Figure_1_-_Distribution_area.jpg	Figure

