

Karakteristik Parsial Gen Sitokrom-C Oksidase Subunit-I Katak Pohon Suaka Marga Satwa Tanjung Peropa Moramo, Sulawesi Tenggara

(CHARACTERISTICS OF PARTIAL CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT I (COI)
GENE OF TREE FROG (*Polypedates celebensis*) IN TANJUNG PEROPA
WILDLIFE RESERVE MORAMO, SOUTHEAST SULAWESI)

Suriana, Nasaruddin

Laboratorium Zoology, Jurusan Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo,
Jln. Malaka Kendari, 93232, Sulawesi Tenggara, Indonesia.
Tel: 082190854311 E-mail suriana0568@gmail.com.

ABSTRAK

Katak pohon (*Polypedates celebensis*) adalah amfibi endemik di Pulau Sulawesi. Data dasar katak tersebut masih sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi parsial gen sitokrom-C oksidase sub unit I (Cytochrome oxidase Sub Unit I = COI) katak pohon (*P. celebensis*). Koleksi sampel katak diperoleh dari kawasan Suaka Marga Satwa Tanjung Peropa Moramo, Sulawesi Tenggara. DNA genome katak diekstraksi, kemudian gen COI diamplifikasi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR), lalu disequensing. Karakterisasi gen COI katak pohon dilakukan dengan membandingkan dengan data gen COI katak lain yang tersedia di *GenBank*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa panjang parsial (fragmen) gen yang teramplifikasi adalah 665 pasang basa. Fragmen gen tersebut mengandung 99% nukleotida yang bersifat kekal, dan hanya 1% nukleotida yang bervariasi. Nukleotida bervariasi terdapat pada sembilan situs, yaitu situs ke-65, 98, 101, 358, 396, 403, 405, 424, dan 426. Situs-situs bervariasi tersebut dapat dipergunakan sebagai marka genetik bagi katak pohon (*P. celebensis*). Komposisi basa nitrogen fragmen gen COI *P. celebensis* adalah 29.9% timin, 28.9% sitosin, 22.0% adenin, and 19.2% guanin. Simpulan penelitian ini adalah fragmen gen sitokrom-C oksidase katak pohon (*P. celebensis*), memiliki nukleotida dilestarikan jauh lebih banyak dibandingkan nukleotida bervariasi. Meskipun demikian nukleotida bervariasi tersebut dapat dipergunakan sebagai marka genetik bagi katak pohon. Basa nitrogen terbanyak adalah timin, sedangkan yang tersedikit adalah guanin. Filogeni molekuler berdasarkan gen sitokrom-C oksidase bersifat monofiletik.

Kata-kata kunci: gen sitokrom-C oksidase sub unit I, *Polypedates celebensis*, marka genetik.

ABSTRACT

Tree frog (*Polypedates celebensis*) is an endemic amphibi found in Southeast Sulawesi. Database of this species, in particular genetic databases is still very limited. The purpose of this research was to characterize the partial gene cytochrome C oxidase subunit I (COI) of tree frog (*P. celebensis*). Frog samples were collected from Tanjung Peropa Wildlife Reserve, Moramo, Southeast Sulawesi, and extracted their DNA genome, and amplified using the polymerase chain reaction (PCR) method, with specific primers, and then sequenced. Characterization was done by comparing the COI gene with another COI gene from other frog (data available on GenBank). The results showed that the COI gene fragment *P. celebensis* consisted of 665 base pairs. These fragment gene had 99% conserved nucleotides, and only 1% nucleotides that varied. Nine sites of nucleotide varied namely: 65th, 98th, 101th, 358th, 396th, 403th, 405th, 424th, and 426th. These sites of nucleotide varied can be used as genetic markers for *P. celebensis*. Composition of nitrogenous bases *P. celebensis* COI gene fragment were 29.9% thymine, 28.9% cytosine, 22.0% adenine, and 19.2% guanine. Molecular phylogeny of *P. celebensis* based on 665 bp of their COI gene suggests that these species was monophyletic. It is concluded that the gene fragment of cytochrome C oxidase of tree frog (*P. celebensis*) the origin of Wildlife Moramo, Southeast Sulawesi, has conserved nucleotides more than nucleotides that varied. These varied nucleotides can be used as genetic markers especially for the tree frog origin of Wildlife Moramo, Southeast Sulawesi. The most nitrogenous bases is thymine, while the fewest is guanine. Molecular phylogeny based on cytochrome C oxidase gene is monophyletic

Key words: cytochrome C oxidase subunit I gene; *Polypedates celebensis*; genetic markers.

PENDAHULUAN

Sebanyak 270 *Polypedates* (*Amphibia: Anura: Rhacophoridae*) tersebar di India, Thailand, Sri Lanka, dan Indonesia (Biju *et al.*, 2008; Nasaruddin *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2012; Rujirawan *et al.*, 2013). Empat spesies dari genus *Polypedates* dilaporkan dari Thailand yaitu: *P. leucomystax*, *P. mutus*, *P. Macrotis*, dan *P. colletti* (Rujirawan *et al.*, 2013). Lima spesies dari genus *Polypedates* dilaporkan dari Sri langka yaitu: *P. maculatus*, *P. cruciger*, *P. eques*, *P. fastigo*, dan *P. longinasus*. Selain di Sri Langka, *P. maculatus* yang juga ditemukan di bagian subcontinental India, dan empat spesies lainnya adalah endemik di Sri Lanka (Meegaskumbura *et al.*, 2011; Wickramasinghe *et al.*, 2012). Terdapat satu spesies endemik di Sulawesi Tenggara, yaitu *P. celebensis* (Nasaruddin *et al.*, 2009).

Kedudukan taksonomi genera *Polypedates* dan banyak spesies *Rhacophora* (*Anura*) lainnya masih rumit, sebab data tentang genera yang diketahui masih sangat kurang, terutama data morfologi, bahkan genera tersebut menunjukkan tingginya *homoplasy*, sehingga beberapa spesies yang sebelumnya termasuk dalam suatu genera, ternyata menjadi genera atau spesies baru ketika diinvestigasi ulang (Meegaskumbura *et al.*, 2011). Eksplorasi genetik *Polypedates* dan *Anura* lainnya telah dilakukan menggunakan baik gen kromosomal maupun gen mitokondria (Macey *et al.*, 2001; Kotaki *et al.*, 2008; Kurabayashi *et al.*, 2005; Setiadi *et al.*, 2011).

Gen sitokrom-C oxidase subunit I (cytochrome oxidase subunit I=COI) memiliki karakteristik khusus yang sesuai sebagai alat dalam studi evolusi, yaitu: (1) sebagai gen yang mengkode enzim pengkatalisis terakhir dalam rantai pernapasan yang berlangsung di dalam mitokondria, sehingga COI banyak dipelajari tingkat biokimia, dan menunjukkan bahwa struktur dan ukuran gen COI umumnya bersifat lestari (*conserved*) di semua organisme aerobik (Lunt *et al.*, 1996); (2) Asam amino berkorelasi dengan fungsi masing-masing bagian dari gen COI, sehingga menunjukkan karakteristik spesies yang memilikinya (Lunt, 1996; Roe dan Sperling, 2007); (3) Dibandingkan dengan gen penyandi protein lain yang terdapat dalam mtDNA, gen sitokrom-C oxidase subunit I memiliki ukuran relatif besar, sehingga mudah untuk memilih area yang akan digunakan untuk studi genetik; (4) Urutan 658 pasangan basa (bp)

pada ujung 5' diusulkan sebagai *barcode* hewan (Hebert *et al.*, 2003 a, b). Gen COI sebagai *barcode* telah berhasil membuktikan kemampuannya untuk membedakan antara spesies dengan spesies lainnya (Hebert *et al.*, 2003a; Hajibabaei *et al.*, 2005).

Sejauh ini, data molekuler katak pohon (*P. celebensis*) belum tersedia (data *GenBank* 2014). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik urutan parsial gen COI *P. celebensis* asal Suaka Margasatwa Tanjung Peropa dan dari urutan gen tersebut, dibuat/dikonstruksi filogeni molekuler dengan membandingkan data yang tersedia pada *GenBank*.

METODE PENELITIAN

Koleksi Spesimen

Spesimen ditangkap secara manual, kemudian diawetkan dalam larutan formalin 5% selama dua hari. Specimen dipindahkan ke etanol 70% untuk pengawetan selanjutnya sedangkan sampel untuk analisis molekuler diambil dari jaringan hati, diawetkan dengan etanol 100% dan disimpan dalam *freezer* bersuhu -20°C (Buji *et al.*, 2008). Spesimen disimpan di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Universitas Halu Oleo. Identifikasi spesies berdasarkan daftar herpetofauna Indo-Australia, Asia Tenggara, dan New Guinea (Kampen, 1923; Inger dan Steubing, 1999; Iskandar dan Colijn, 2000; Setiadi *et al.*, 2011).

Ekstraksi DNA, Perbanyakan dan Sequensing Gen Sitokrom-C Oksidase

DNA total genom katak diekstraksi menggunakan protokol konvensional (Sambrook *et al.*, 1989), dengan beberapa perubahan, yaitu: jaringan otot dicampur dengan buffer lisis yang mengandung cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), β -mercaptoethanol, polyvinil pyrrolidone (PVP), Tris - HCl, ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) dan double destillation H₂O (ddH₂O), kemudian diinkubasi pada 55°C selama satu malam. Selanjutnya, sampel ditambah 0.5 μ L proteinase-K, dan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama dua jam. Langkah selanjutnya, sampel disentrifugase dengan kecepatan 6.500 rpm selama tiga menit. Supernatan diambil dan kemudian ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan sampel. Sampel disentrifugase lagi selama tiga menit, kemudian supernatan diambil dan

dicampur dengan ethyl alcohol (EtOH) 95% dingin. Langkah selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu -20°C , selama 30 menit, dan kemudian disentrifugase dengan kecepatan 13.000 rpm selama tiga menit. Larutan EtOH dibuang secara perlahan, sedangkan *pellet* dibiarkan di dasar tabung. Langkah selanjutnya, *pellet* dicuci dengan EtOH 70%, kemudian dikeringkan dalam suhu kamar. *Pellet* diresuspensi dengan Tris-EDTA-RNA-ase, dan diinkubasi pada 37°C , selama 15 menit. Langkah selanjutnya, sampel dimigrasikan pada elektroforesis dan divisualisasikan. Pita DNA yang bersih dipakai sebagai *template* untuk memperbanyak gen sitokrom-C oksidase sub unit I.

Fragmen DNA mitokondria yang mengkode bagian dari gen sitokrom-C oksidase sub unit I diamplifikasi/diperbanyak dari hasil ekstraksi DNA genom katak pohon (*P. celebensis*) dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Kondisi PCR adalah: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 45 detik, diikuti 35 kali siklus: denaturasi pada 98°C selama 20 detik, aneling pada suhu 98°C selama dua detik dan pemanjangan pada suhu 72°C selama satu menit. Siklus tersebut diikuti pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama tiga menit. Proses PCR menggunakan primer COI yang spesifik untuk *barcode* (Hebert *et al.*, 2003a). Produk PCR disekuensing dua arah menggunakan Big Dye versi 3 (Perkin Elmer). Proses sekuensing dilakukan oleh perusahaan penyedia jasa sekuensing nukleotida.

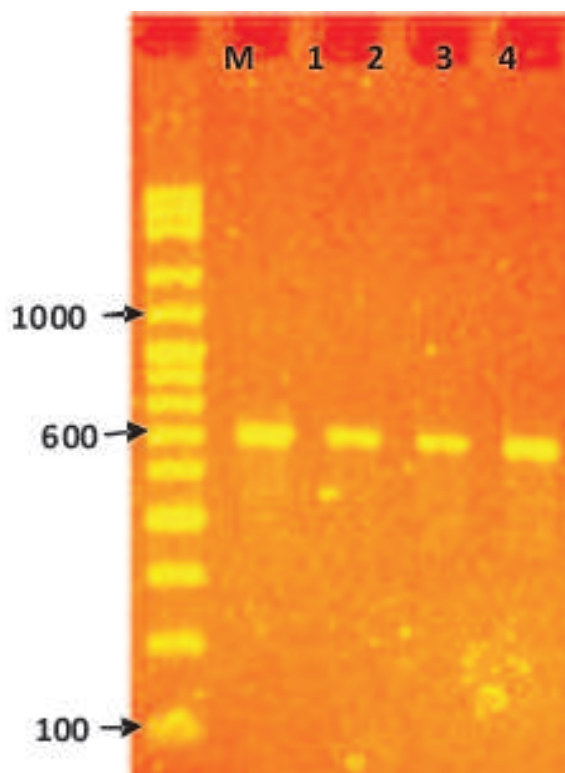
Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan *software* MEGA versi 4.1. Urutan nukleotida gen sitokrom-C oksidase, disejajarkan dengan data gen sitokrom-C oksidase yang terdapat pada *GenBank* (2013), pada situs [Http://nucleotide.ncbi.nlm.nih.gov](http://nucleotide.ncbi.nlm.nih.gov). Data disajikan dalam bentuk tabel, gambar dan dendogram yang menunjukkan filogeni katak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil fragmen gen sitokrom-C oksidase katak pohon (*P. celebensis*) disajikan pada Gambar 1. Fragmen tersebut berukuran sekitar 700 pasangan basa (pb).

Hasil pensejajaran gen tersebut menunjukkan karakteristik, yaitu terdapat 656/665 (99%) nukleotida dilestarikan, dan 9/665 (1%) nukleotida yang bervariasi. Nukleotida tersebut disajikan pada Gambar 2.



Gambar 1. Profil DNA fragmen gen sitokrom oksidase sub unit I *Polypedates celebensis*. M= DNA marker 100 pasang basa, 1,2,3,4, gen sitokrom oksidase sub unit I *P. celebensis* sepanjang 600 pasang basa.

Berdasarkan Gambar 2, ada sembilan situs bervariasi, yaitu: situs ke-65, 98, 101, 358, 396, 403, 405, 424, dan 426, dengan substitusi basa nitrogen (basa-N) berturut-turut yaitu: T-C, T-C, A-C, T-G, A-C, T-G, T-G, A-C, dan T-C. Terdapat beberapa perbedaan antara individu dalam satu spesies. Oleh karena itu, situs-situs tersebut dapat digunakan sebagai penanda genetik (*spesies barcode*) spesies katak pohon (*P. celebensis*) asal Suaka Margasatwa Tanjung Peropa Moramo, Sulawesi Tenggara. Penelitian pada beberapa gen mitokondria juga menunjukkan beberapa variasi intra populasi (Vences *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008; Meenakshi *et al.*, 2010).

Perbedaan komposisi dan urutan basa nitrogen (basa-N) dalam gen disebabkan oleh salah satu dari beberapa mutasi titik antara lain substitusi basa-N atau pengantian suatu basa-N terhadap basa-N lainnya. Gambar 2 menunjukkan, bahwa perubahan urutan basa-N menyebabkan variasi inter dan antar individu.

P.selebensis-1 TAT TGG GAC GAT ATA CCT GAT TTT TGG TGC CTG GGC TGG GAT AAT
CGG GAC TGC CCT CAG [60]
P.selebensis-2 [60]

P.selebensis-1 CCT GTT TAT CCG AGC TGA ACT TAG CCA GCC CGG GTC CTT AAT GGG AGA
CGA CCA GAT TTA [120]
P.selebensis-2C.C. .C. [120]

P.selebensis-1 TAA TGT AAT TGT CAC AGC TCA TGC TTT CGT CAT GAT CTT CTT TAT GGT
GAT ACC TAT TCT [180]
P.selebensis-2 [180]

P.selebensis-1 GAT TGG AGG CTT CGG AAA TTG GCT CGT TCC TCT TAT AAT TGG GGC CCC
TGA CAT AGC CTT [240]
P.selebensis-2 [240]

P.selebensis-1 CCC CCG AAT AAA TAA CAT GAG CTT TTG ACT GCT TCC ACC CTC ATT CCT
TCT CCT CTT AGC [300]
P.selebensis-2 [300]

P.selebensis-1 CTC ATC TAC TGT TGA GGC TGG TGC AGG GAA TGG GTG AAC TGT TTA
TCC CCC CTT AGC TGG [360]
P.selebensis-2 G.. [360]

P.selebensis-1 CAA TCT AGC ACA TGG TGG CCC ATC TGT AGA CCT TGA TAT TTT TTT CCT
TCA CCT GGC CGG [420]
P.selebensis-2C C.C [420]

P.selebensis-1 GGT ATT TTC TAT CCT GGG GGC AAT TAA CTT TAT CAC AAC AAT CAT CAA
CAT AAA ACC CCC [480]
P.selebensis-2 ... C.C [480]

P.selebensis-1 GTC CAC AAC CCA ATA TCA GAC CCC CCT ATT CGT CTG ATC GGT CTT AAT
CAC CGC CGT ACT [540]
P.selebensis-2 [540]

P.selebensis-1 TCT CCT CCT CTC CCT ACC AGT ATT AGC CGC AGG CAT CAC CAT ACT TTT
AAC AGA CCG TAA [600]
#Sequence_S7 [600]

P.selebensis-1 TCT AAA TAC ATC CTT CTT TGA CCC TGC AGG CGG AGG AGA CCC CAT TCT
GTA CCA ACA CTT [660]
P.selebensis-2 [660]

P.selebensis-1 ATT CT [665]
P.selebensis-2 [665]

Gambar 2. Nukleotida berbeda antar *Polypedates celebensis*. Tanda titik menunjukkan nukleotida identik. Nomor dalam kurung menunjukkan jumlah nukleotida dalam satu baris.

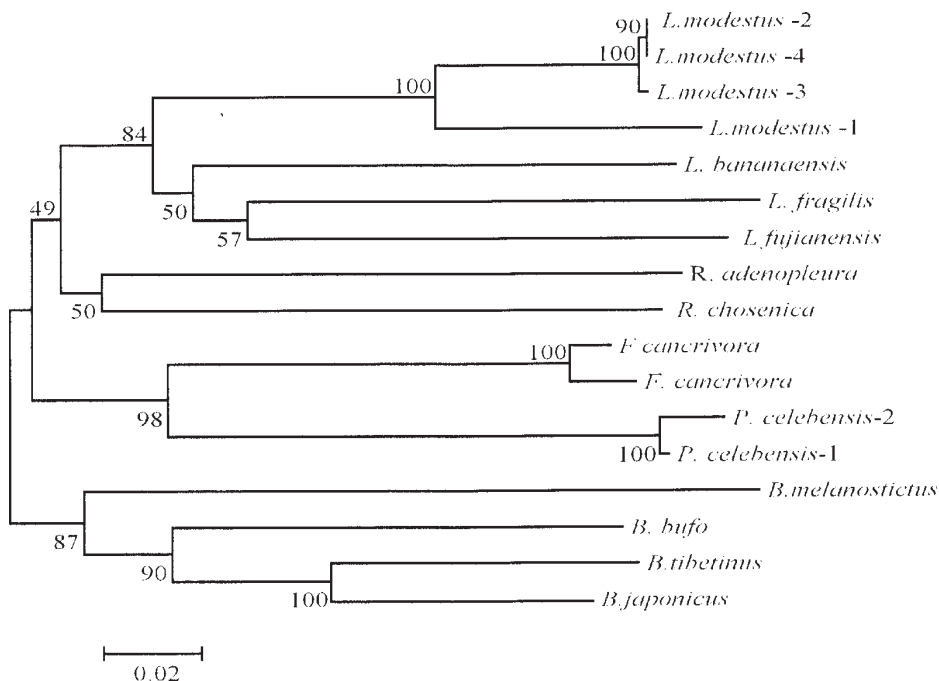
Perbandingan komposisi basa-N antar individu katak pohon disajikan pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 ditunjukkan bahwa perbedaan basa-N antara *P. celebensis*, berkisar 1%. Kandungan basa timin berkisar antara 29,6-30,4%, sitosin berkisar antara 28,3-29,5%, adenin berkisar antara 21,8-22,4%, dan guanin berkisar antara 19,1-19,2%. Selain itu, tampak bahwa kandungan adenin dan timin (AT) relatif lebih banyak dari cytosine dan guanin (CG). Hal

ini sesuai dengan hasil beberapa penelitian pada spesies lain, menunjukkan bahwa gen mitokondria, terutama gen COI kaya adenin dan timin. Komposisi nukleotida dalam fragmen gen berkorelasi dengan komposisi kode genetik yang terkandung pada fragmen gen tersebut. Komposisi ini juga berhubungan dengan komposisi asam amino yang dikodekan oleh gen tersebut, sehingga perubahan komposisi nukleotida menyebabkan perubahan kode

Tabel 1. Komposisi basa nitrogen fragmen gen sitokrom oksidase sub unit I *Polypedates celebensis* sepanjang 665 pasang basa

Spesies	Basa N (%)			
	Timin	Sitosin	Adenin	Guanin
<i>P.celebensis</i> -1	30,4	28,3	22,4	19,1
<i>P.celebensis</i> -2	29,5	29,5	21,8	19,2
Rataan	29,9	28,9	22,5	19,2



Gambar 3. Filogeny molekuler *Polypedates celebensis* dan beberapa katak, data *GenBank* berdasarkan fragmen gen sitokrom oksidase sub unit I, sepanjang 665 pasang basa. Nilai pada percabangan menunjukkan nilai *bootstrap*, berdasar *Neighbor Joining*, dengan model Kimura 2-Parameter.

genetik. Meskipun demikian perubahan tersebut tidak selalu menyebabkan perubahan asam amino yang dikodekan, sebab terdapat asam amino yang dikode lebih dari satu kode genetik.

Gen sitokrom-C oksidase adalah gen yang mengkode asam amino sitokrom fungsional. Sitokrom adalah suatu protein struktural dan fungsional pada membran dalam mitokondria, jadi memiliki dua fungsi yaitu sebagai bagian struktural dan berfungsi sebagai enzim dalam respirasi seluler. Keberadaan protein ini sangat penting dalam rantai pernapasan, sebagai akseptor elektron.

Lunt *et al.* (1996) menjelaskan bahwa gen sitokrom-C oksidase memiliki polimorfisme di beberapa bagian, sehingga masing-masing

spesies memiliki peluang bervariasi dengan spesies lainnya dalam hal komposisi dasar basa-N. Variasi ini juga menyebabkan suatu spesies berpeluang memiliki penciri yang khas bagi spesies tersebut dan merupakan suatu marka genetik.

Filogeni molekuler menggunakan fragmen gen sitokrom-C oksidase sub unit I yang dibangun berdasarkan *Neighbor Joining* (NJ), dan *Maximum Parsimony* (MP) menggunakan model Kimura 2-parameter dengan *bootstrap* (pseudoreplikasi) 1000 kali (Tamura *et al.*, 2007), menunjukkan konsistensi, sehingga hanya salah satu yang disajikan (Gambar 3).

Dengan menggunakan *Bufo* sebagai kelompok keluar (*out group*), tampak bahwa

semua individu berasal dari satu cabang, yang kemudian mengalami percabangan lanjut ke *clade* yang terbentuk selanjutnya. *Limnonectes gruniens* (S2, S4, dan S6) terdapat pada *clade* tersendiri dengan nilai metode *bootstrap* dari 99%, sementara *L. modestus* (S21 dan S22) berada pada *clade* berikutnya, dengan nilai *bootstrap* 100%. Demikian pula *L. modestus* lainnya (dari *GenBank*). Sementara itu, *Bufo* konsisten pada posisi terluar, yaitu sebagai *outgroup*. Ini berarti bahwa kedua spesies *Limnonectes* berkerabat sangat dekat, dan filogeni yang dibangun berdasarkan gen COI bersifat *robust*. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena gen COI dilestarikan lebih banyak dibandingkan dengan 12 gen penyandi protein lainnya dan gen rRNA yang terdapat di mitokondria (Zang *et al.*, 2009).

Pada Gambar 3 ditunjukkan bahwa pohon filogeni adalah monofiletik. Semua spesies berada pada *clade* yang sama. Katak *P. celebensis* terletak di *clade* sama dengan *Fejevarya cancrivora* dengan nilai *hight methode bootrap*, sedangkan *Bufo* sebagai out group yang konsisten pada *clade* yang sama juga. Jarak genetik antar individu sangat kecil. Hal ini disebabkan oleh karena nukleotida bervariasi antar individu juga kecil, yaitu 1%, artinya masih jauh lebih banyak nukleotida yang dipertahankan sama antar individu dalam satu spesies.

SIMPULAN

Parsial gen sitokrom-C oksidase katak pohon (*P. celebensis*) sepanjang 665 pasang basa yang telah dikarakterisasi, dan memiliki sedikit nukleotida yang bervariasi. Meskipun demikian terdapat sembilan situs nukleotida yang dapat dipergunakan sebagai marka genetik bagi katak pohon asal Suaka Margasatwa Tanjung Peropa Moramo, Sulawesi Tenggara. Basa nitrogen terbanyak adalah timin, sedangkan yang tersedikit adalah guanin. Filogeni molekuler berdasarkan gen COI bersifat monofiletik.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik gen sitokrom-C oksidase pada katak pohon dari kawasan lain di Sulawesi Tenggara, sehingga diperoleh marka genetik antar individu dalam satu spesies.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Balai Konservasi Sumber Daya Alam (BKSDA) Kendari atas izin penelitian di Suaka Margasatwa Tanjung Peropa, Moramo, Sulawesi Tenggara dan Biaya Operasional Perguruan Tinggi Negeri (BOPTN) Universitas Halu Oleo tahun 2015 untuk pendanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Biju SD, Roelants K, Bossuyt F. 2008. Phylogenetic position of the montane tree frog *Polypedates variabilis* Jerdon 1853 (*Anura: Rhacophoridae*), and description of a related species. *Organisms, Divers and Evol* 8: 267–276.
- Delorme M, Dubois A, Kosuch J, Vences M. 2004. Molecular phylogenetic relationships of *Lankanectes corrugatus* from Sri Lanka: endemism of South Asian frogs and the concept of monophyly in phylogenetic studies. *Alytes* 22(1-2): 53-64.
- Emerson SB, Inger RF, Iskandar DT. 2000. Molecular systematics and biogeography of the fanged frogs of Southeast Asia. *Mol Phylogenet Evol* 16: 131–142.
- Evans BJ. 2003. Phylogenetics of fanged frogs: testing biogeographical hypotheses at the interface of the Asian and Australian faunal zones. *Syst Biol* 52(6): 794–819.
- GenBank. <http://nucleotida.ncbi.nlm.nih.gov>. Access on November 2013
- GenBank. <http://nucleotida.ncbi.nlm.nih.gov>. Access on April 2014
- Hajibabaei MG, Singer AC, Clare EL, Hebert PDN. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity biomonitoring. *BMC Biology* 5: 24-31.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes *Proc R Soc Lond B* 270: 313-321.
- Hebert PDN, Ratnashingham S, deWaard JR. 2003. Barcoding animal life: Cytochrome C oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B* 270: 02PB0653.1-2PB0653.9.

- Inger RF, Steubing RB. 1999. *Panduan Lapangan Katak-katak Borneo*. Penyunting: Wong A, Mohd Sah SA. Natural History Publications (Borneo). Hlm. 55-58.
- Iskandar DT, Colijn E. 2000. Preliminary Checklist of the Southeast Asian Herpetofauna I. Amphibian. *Treubia* 31: 1-133.
- Kampen VPN. 1923. *The Amphibia of The Indo-Australia Archipelago*. Leiden. E.J Brill. Hlm. 38.
- Kotaki M, Kurabayashi A, Matsui M, Khonsue M, Djong TH, Tandon M, Sumida M. 2008. Genetic Divergences and Phylogenetic Relationships among the *Fejervarya limnocharis* Complex in Thailand and Neighboring Countries Revealed by Mitochondrial and Nuclear Genes. *Zool Sci* 25: 381-390.
- Kurabayashi A, Kuramoto M, Joshy K, Sumida M. 2005. Molecular phylogeny of the ranid frogs from Southwest India based on the mitochondrial ribosomal RNA gene sequences. *Zool Sci* 2: 525-534
- Li J, Che J, Bain RH, Zhao E, Zhang Y. 2008. Molecular phylogeny of Rhacophoridae (Anura): a framework of taxonomic reassignment of species within the genera *Aquixalus*, *Chiromantis*, *Rhacophorus* and *Philautus*. *Mol Phylogenet Evol* 48: 302-312.
- Macey JR, Strasburg JL, Brisson JA, Vredenburg VT, Jennings M, Larson A. 2001. Molecular phylogenetics of Western North American frogs of the *Rana boylei* species group. *Mol Phylogenet Evol* 19: 131-143.
- Meegaskumbura M, Meegaskumbura S, Bowatte G, Manamendra-Arachchi K, Pethiyagoda R, Hanken J, Schneider CJ. 2011. *Taruga* (Anura: Rhacophoridae), A new genus of foam-nesting tree frogs endemic to Sri Lanka. *Ceylon J of Sci (Biol Sci)* 39: 75-94.
- Meegaskumbura M, Manamendra-Arachchi K. 2011. Two new species of shrub frogs (Rhacophoridae: *Pseudophilautus*) from Sri Lanka. *Zootaxa* 2747: 1-18.
- Meenakshi K, Suraj T, Bhagwati SS, Sujith VG, Santhoshkumar K, Sanil G. 2010. Molecular resolution of four Species from Western Ghats (India) with their intrageneric phylogeny based on COI, Cyt B, 12S and 16S rRNA genes. *Asian J Exp Biol Sci* 1(4): 782-786.
- Nasaruddin, Suriana, Adi DA, Salamansyah. 2009. The Karyotype of seven species of Amphibians (Anuran Order) from South-East Sulawesi. *J Vet* 10(2): 77-86.
- Roe AD, Sperling FAH. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding Molecular. *Phylogenet and Evol* 44: 325-345.
- Rujirawan A, Stuart BL, Aowphol A. 2013. A new tree frog in the genus *Polypedates* (Anura: Rhacophoridae) from Southern Thailand. *Zootaxa* 3702: 545-565.
- Sambrook J, Fritch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2^{ed}. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hlm.1076-1082.
- Setiadi MI, Jimmy AM, Rafe MB, Zubairi M, Iskandar DT, Andayani N, Supriatna J, Evans BJ. 2011. Adaptive radiation and ecological opportunity in Sulawesi and Philippine fanged frog (*Limnonectes*) Communities. *American Nat* 178 (2): 221-240.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis. Software Version 4. *Mol Biol Evol* 24(8): 1596-1599.
- Vences M, Chiari Y, Raharivololoniaina L, Meyer A. 2004. High mitochondrial diversity within and among populations of Malagasy poison frogs *Mol Phylogenet and Evol* 30: 295-307.
- Wickramasinghe LJM, Munindradasa DAI, Fernando P. 2012. A new species of *Polypedates* Tschudi (Amphibia, Anura, Rhacophoridae) from Sri Lanka. *Zootaxa* 3498: 63-80.
- Zhang JF, Liu-Wang N, Wang Y, Li-Li H. 2009. The complete mitochondrial genome of the large-headed frog, *Limnonectes bannaensis* (Amphibia: Anura), and a novel gene organization in the vertebrate mtDNA. *Gene* 442: 119-127.