

IDENTIFIKASI MOLEKULER *Microhyla*, Tschudi 1838 DARI SUMATRA BERDASARKAN GEN 16S rRNA MITOKONDRIA

MOLECULAR IDENTIFICATION ON *Microhyla*, Tschudi 1838 FROM SUMATRA BASED ON 16S rRNA MITOCHONDRIAL GENE

Tengku Gilang Pradana¹, Amir Hamidy², Achmad Farajallah¹, Eric N. Smith³

¹ Biosains Hewan, Departemen Biology, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor, Kampus Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

² Museum Zoologicum Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi LIPI,
Gedung Widyasatwaloka, Jl. Jakarta Bogor Km. 46, Cibinong, Jawa Barat

³ Amphibian and Reptile Diversity Research Center, Department of Biology,
The University of Texas at Arlington, Arlington, Texas 76019, USA

e-mail: hamidyamir@gmail.com

(diterima Januari 2017, direvisi Oktober 2017, disetujui November 2017)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi posisi jenis *Microhyla* dari Sumatra berdasarkan sekuen data dari gen 16S rRNA di dalam pohon filogeni *Microhyla* secara umum. Pohon filogeni dihasilkan dengan menggunakan analisis *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means* (UPGMA), *Neighbor Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML) dan *Bayesian Inference* (BI). Kami menggunakan *Phrynella pulchra*, *Kaloula pulchra*, *Kalophrynus pleurostigma*, *Chalcorana chalconota*, dan *Leptobrachium waysepuntiense* sebagai anggota outgroup. Hasil pohon filogeni menunjukkan bahwa *Microhyla* terdiri dari sembilan kelompok utama, enam diantaranya merupakan *Microhyla* dari Sumatra. *Microhyla* dari Sumatra mengelompok dengan *M. achatina*, kelompok *M. heymonsi*, kelompok *M. fissipes*, kelompok *M. palmipes*, kelompok *M. bermorei* dan kelompok *M. superciliaris*. Beberapa kelompok memiliki jarak genetik yang besar seperti pada *M. achatina* (3,1–3,4%), *M. heymonsi* (3,3–7,1%) dan *M. palmipes* (2,5–3,4%). *Microhyla fissipes* membentuk parafiletik dengan *M. mukhlesuri*, kemungkinan termasuk kedalam *complex* atau *cryptic species*. Hal ini membutuhkan kajian lebih lanjut secara morfologi dan suara guna menentukan status taksonomi dari masing masing populasi di dalam jenis-jenis tersebut.

Kata kunci: jenis, kelompok, populasi, status, taksonomi

ABSTRACT

This study evaluates the position of Sumatran Microhylids based on the 16S rRNA gene, in the phylogenetic tree of Microhylid frogs. Phylogenetic trees were constructed using Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA), Neighbour Joining (NJ), Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI). We used as outgroup members: *Kaloula pulchra*, *Phrynella pulchra*, *Kalophrynus pleurostigma*, *Chalcorana chalconota* and *Leptobrachium waysepuntiense*. The phylogenetic results show that *Microhyla* consist of nine main clades, six of them occurring in Sumatra. *Microhyla* from Sumatra nested into the *M. achatina* group, *M. heymonsi* group, *M. fissipes* group, *M. bermorei* group, *M. palmipes* group and *M. superciliaris*. Several species showed large genetic distance such as *M. achatina* group (3.1–3.4%), *M. heymonsi* group (3.3–7.1%) and *M. palmipes* group (2.5–3.4%). *Microhyla fissipes* is rendered paraphyletic by *M. mukhlesuri*, probably forming a complex of cryptic species. Further studies using morphology and acoustic data are needed to determine the taxonomic status of several of species here in studied.

Keywords: species, group, population, status, taxonomy

PENDAHULUAN

Microhyla merupakan salah satu genus dari famili Microhylidae yang terdiri dari 40 jenis (Frost 2016). *Microhyla* pertama kali dideskripsikan sebagai genus baru oleh

Tschudi tahun 1838 dengan tipe jenis *M. achatina* yang berasal dari Jawa. Genus ini berukuran relatif kecil jika dibandingkan dengan jenis katak (anura) lainnya, dengan panjang tubuh berkisar 12-45 mm dan

memiliki ciri khusus timpanum tersembunyi dan tidak memiliki gigi vomer. Distribusi genus ini tersebar mulai dari Jepang, Cina Selatan sampai India, Srilanka, Asia Tenggara sampai Sumatra, Borneo, Jawa dan Bali (Frost 2016). Sampai saat ini, tercatat ada 5 jenis yang telah dilaporkan di Sumatra, yaitu *M. achatina*, *M. berdmorei*, *M. heymonsi*, *M. palmipes* dan *M. superciliaris* (Frost 2016; Matsui 2011). Ukuran tubuh yang relatif kecil serta beragamnya corak pada genus *Microhyla* menyebabkan sering terjadinya kesalahan identifikasi terutama pada jenis-jenis yang termasuk ke dalam *cryptic species*.

Cryptic species merupakan istilah untuk dua atau lebih jenis yang memiliki kemiripan secara morfologi. Hal ini merupakan permasalahan yang umum terjadi pada amfibi, seperti pada jenis *Fejervarya limnocharis* (Veith *et al.* 2001), *Chalcorana chalconota* (Stuart *et al.* 2006; Inger *et al.* 2009), *Limnonectes kuhlii* dan *Leptobrachium nigrops* (Hamidy *et al.* 2012). Permasalahan *cryptic species* pada *Microhyla* terlihat pada jenis *M. ornata* (*narrow-mouth toad*) asal India yang memiliki distribusi sangat luas mencakup kepulauan Ryukyu (Jepang), Cina selatan, Asia tenggara termasuk semenanjung Malaysia, Bangladesh, Nepal, India, Srilanka sampai Pakistan bagian utara (Frost *et al.* 1985; Duelman 1993; Inger 1999; Zhao 1999; Khan 2000; Matsui *et al.* 2005). Pendekatan molekular pada jenis *M. ornata* memperlihatkan perbandingan jarak genetik antara populasi kepulauan Ryukyu (Jepang) dengan populasi India, Bangladesh, Cina daratan dan Thailand berkisar 6,1%–8,6% (Matsui *et al.* 2005). Perbedaan jarak genetik

yang besar antar jenis *M. ornata* memberikan hipotesis jika jenis tersebut telah terpisah menjadi beberapa jenis lain. Oleh karena itu, pendekatan molekular diperlukan untuk menguji keabsahan suatu taksa.

Rekonstruksi filogenetik menggunakan penanda 16S rRNA pada amfibi sebelumnya telah dilakukan dengan membandingkan antar jenis pada masing-masing ordo amfibi (Vences *et al.* 2005). Penelitian terbaru mengenai analisis filogenetik menggunakan penanda 16S rRNA pada *Microhyla* di kawasan Asia menunjukkan genus *Microhyla* berada pada posisi yang parafiletik terhadap genus lain (Matsui *et al.* 2011) tetapi sampel hanya menyertakan jenis yang berasal dari Sumatra bagian selatan. Oleh karena itu, penelitian ini akan mengungkapkan hubungan filogenetik *Microhyla* dari seluruh wilayah Sumatra menggunakan gen 16S rRNA.

Jumlah jenis yang ditemukan di Sumatra masih dapat terus bertambah seiring dengan dilakukannya penelitian. Penemuan jenis baru pada genus ini, seperti *M. mantheyi* (Das *et al.* 2007), *M. malang* (Matsui 2011), *M. orientalis* (Matsui *et al.* 2013), *M. mukhlesuri* dan *M. mymenshingensis* (Hassan *et al.* 2014) dan *M. nilphamariensis* (Howlander *et al.* 2015) memberikan hipotesis bahwa genus *Microhyla* masih belum banyak dipelajari.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan merupakan koleksi spesimen MZB yang terdiri dari lima jenis yang telah teridentifikasi, yaitu *M. achatina*, *M. berdmorei*, *M. heymonsi*, *M. palmipes*, *M. superciliaris* dan satu jenis yang



Gambar 1. Peta Asia timur sampai selatan (dimodifikasi dari d-maps.com). Angka menunjukkan lokalitas sampel yang terdapat pada Tabel. 1.

belum teridentifikasi yaitu *Microhyla* sp. Jumlah total sekuen gen 16S rRNA mitokondria yang diuji adalah 67 sekuen data (17 spesimen MZB dan 50 sekuen Genbank) yang berasal dari Sumatra, Jawa, Bali, Kalimantan, Malaysia, Singapura, Thailand, Cina, Jepang, Bangladesh, India dan Taiwan, termasuk lima *outgroup* (Gambar 1). *Outgroup* yang digunakan adalah *Kaloula pulchra*, *Phrynella pulchra* dan *Kalophrynus plerostigma* dari suku Microhylidae, *Chalcorana chaconota* dari suku Ranidae dan *Leptobrachium waysepuntiense* dari suku Megophryidae (Tabel. 1).

Deoxyribose Nucleic Acid (DNA) diekstraksi dari jaringan hati atau otot yang sebelumnya telah diawetkan dalam ethanol 99% menggunakan metode fenol-kloroform (Hillis *et al.* 1996). Jaringan hati atau otot dihomogenkan dengan *buffer* STE 0,6 ml (100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl dan 1mM EDTA pH 8,0), kemudian ditambahkan Proteinase K (0,1 mg/ml) dan diinkubasi pada suhu 56⁰C sampai homogen. Larutan ditambahkan dengan fenol dan CIAA (kloroform isoamil alkohol dengan perbandingan 24:1) dan diendapkan dengan 1ml etanol 70%. Endapan DNA

divakum dan disimpan dalam 0,6 ml TE (10mM Trish-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). Proses di dalam Polymerase Chain Reaction (PCR) diawali dengan denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94⁰C kemudian dilanjutkan 30 putaran yang terdiri dari denaturasi selama 30 detik pada suhu 94⁰C, *annealing* selama 30 detik pada suhu 55⁰C, dan elongasi selama 1 menit 30 detik pada suhu 72⁰C (Matsui *et al.* 2011). Primer yang digunakan adalah primer *forward* 16L1: 5'CTG ACC GTG CAA AGG TAG CGT AAT CAC T-3' dan primer *reverse* 16H1: 5' CTC CGG TCT GAA CTC AGA TCA CGT AGG-3' (Hedges *et al.* 1993) kemudian produk PCR dielektroforesis pada gel *polyacrylamid* 6% dan disekuensing di *First BASE Laboratories Sdn Bhd* (Singapura) dari perusahaan *Axil Scientific Pte Ltd First BASE Laboratories Sdn Bhd*.

Sekuen data yang diperoleh kemudian diedit dengan menggunakan program Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd., Tewntin, Australia) dan disejajarkan dengan sekuen genbank menggunakan Clustal X dalam program MEGA 5 (Tamura 2011). Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan analisis *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means* (UPGMA), *Neighbor Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML) dan *Bayesian Inference* (BI). Analisis UPGMA dan NJ menggunakan program MEGA 5 (Tamura 2011) dengan 1000 replikasi, model kimura 2 parameter dengan substitusi transvers-transisi dan *gaps pairwise deletion*. Model evolusi DNA untuk ML dan BI menggunakan *General Time-Reversible* (GTR) dengan parameter

gamma (G) yang merupakan percobaan terbaik pada program Kakusan 3 (Tanabe 2007) berdasarkan AIC (*Akaike Information Cruterion*). Analisis ML dan menggunakan program Tree finder (Jobb *et al.* 2004) dengan evaluasi percabangan 1000 replikasi bootstrap. Analisis BI diestimasi dengan menggunakan program MrBayes v3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) dengan empat simultan *Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) untuk 6.000.000 generasi, dengan mengambil satu pohon setiap 1000 generasi dan menghitung satu topologi yang konsensus untuk 3001 pohon setelah membuang 3000 pohon pertama (burn in = 3.000.000). Jarak genetik menggunakan model *uncorrected p-distance* dan acuan jarak genetik yang digunakan sebagai pembeda jenis adalah 3% (Fouquet *et al.* 2007). Nilai bootstrap pada cabang pohon yang diyakini valid adalah 70% atau lebih untuk analisis NJ, UPGMA dan ML (Huelsenbeck & Hillis 1993). Pada analisis BI, nilai yang diyakini adalah 95% atau lebih (Leache & Reeder 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekuen dan Statistik

Sekuen statistik dari analisis gen 16S rRNA memperlihatkan jumlah data set terdiri dari 525 situs dengan 283 *invariable site*, 233 *variable site* dan 169 situs *parsimony informative*. Frekuensi komposisi nukleotida untuk analisis NJ dan UPGMA adalah T = 24,6%, C = 22,9%, A = 32,1% dan G = 20,4%. Analisis ML dibangun dengan satu

topologi dengan lnI -5.153.347149 (parameter gamma = 0.22578; frekuensi nukleotida: T = 28,25%, C = 20,182%, A = 35,605% dan G = 15,962%). Analisis BI dikalkulasi dengan estimasi rata-rata dari frekuensi nukleotida T = 27,998%, C = 20,418%, A = 35,671% dan G = 15,914% dan parameter gamma 0.22579.

Hubungan Filogenetik dan Jarak Genetik *Microhyla* Sumatra

Hasil dari keempat analisis menunjukkan topologi pohon yang sama. Perbedaan hanya terletak pada nilai *bootstrap* cabang pohon. Pohon filogeni menunjukkan famili Microhylidae berada pada posisi monofiletik yang hanya didukung oleh analisis UPGMA dengan *bootstrap* 100% dan NJ dengan *bootstrap* 97% terhadap *Chalcorana chalconota* dan *Leptobrachium wayseputiense*. *Microhyla* berada pada posisi monofiletik dengan nilai *bootstrap* 77% pada analisis UPGMA tetapi tidak didukung oleh tiga analisis lainnya.

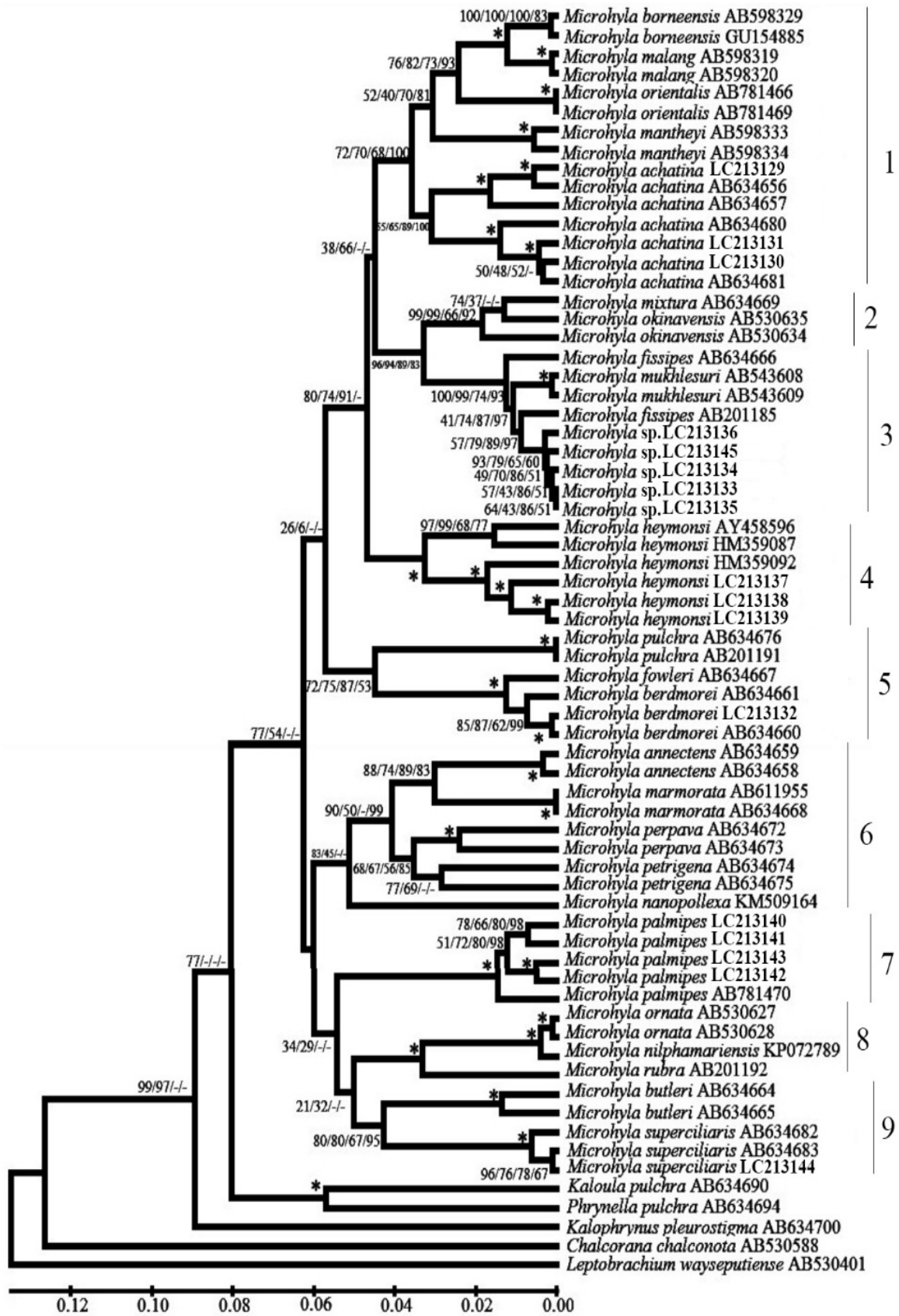
Microhyla dari Sumatra terdiri dari enam kelompok (Gambar 2) :

1. Kelompok *M. achatina*

Microhyla achatina terdapat pada kelompok 1 dan terdiri dari 2 subkelompok, yaitu subkelompok Jawa dan subkelompok Sumatra. Subkelompok Jawa beranggotakan populasi dari Bandung, Gede-Pangrango dan Ungaran dengan nilai *bootstrap* (UPGMABS = 99%, NJBS = 97%, MLBS = 98% dan BPP = 99%) dan kelompok Sumatra beranggotakan populasi asal Palembang, Bengkulu dan Lampung dengan nilai *bootstrap* (UPGMABS

= 99%, NJBS = 100%, MLBS = 95% dan BPP = 100%) (Gambar 2). Topotipe *M. achatina* berasal dari Jawa sehingga jenis yang tergabung pada kelompok Jawa merupakan *M. achatina* sesungguhnya. Hal ini dapat memberikan asumsi jika jenis yang berasal dari Sumatra adalah jenis yang berbeda. Hal tersebut didukung dengan perbandingan nilai jarak genetik antara kelompok Jawa dan Sumatra yang berkisar 5,4–6,9% (Tabel 2). Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang telah dilaksanakan oleh Matsui *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa nilai jarak genetik antara *M. achatina* Jawa dan Sumatra adalah 5,6–6,6% yang mengindikasikan adanya *cryptic species* di dalam kelompok *M. achatina*. Kajian mengenai penentuan status taksonomi dari populasi Sumatra akan diuji lebih lanjut.

Hal menarik lainnya adalah adanya pemisahan subkelompok pada kelompok Jawa, dimana populasi yang berasal dari Bandung dan Gede-Pangrango memisah jarak genetik cukup besar yang berkisar 3,1–3,4% (Tabel 2), sedangkan populasi asal Ungaran mengelompok dengan populasi Bandung dengan nilai jarak genetik yang lebih rendah. Jika kita melihat letak geografis dari ketiga tempat ini, maka seharusnya populasi Bandung dan Gede-Pangrango yang mengelompok menjadi satu karena kedekatan kedua wilayah ini. Hal ini memberikan asumsi jika tingginya variasi genetik pada jenis ini bukan hanya ditentukan jarak letak geografis yang jauh ataupun adanya barrier tetapi juga dapat terjadi pada lingkup daerah yang



Gambar 2. Filogenetik UPGMA dari 16S rRNA untuk *Microhyla* beserta out group. Angka pada cabang merepresentasikan secara berurutan nilai bootstrap untuk UPGMA, NJ, ML dan Bayesian Inference. Tanda bintang mengindikasikan nilai bootstrap yang signifikan untuk UPGMA, NJ dan ML ($\geq 70\%$) dan Bayesian Probabilitas

berdekatan.

2. Kelompok *M. berdmorei*

Microhyla berdmorei tergabung pada kelompok 5 bersama dengan *M. fowleri* dan *M. pulchra* didukung dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 72%, NJBS = 75%, MLBS = 87% dan BPP = 53%) (Gambar 2). *Microhyla berdmorei* beranggotakan populasi asal Palembang, Bengkulu dan Kalimantan dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 85%, NJBS = 87%, MLBS = 62% dan BPP = 99%) (Gambar 2). Perbandingan jarak genetik antar populasi Sumatra dan Kalimantan adalah 1,3–1,5% (Tabel 2). Nilai jarak genetik ini masih dibawah level jarak genetik antar jenis (Fouquet *et al.* 2007), sehingga populasi yang berasal dari Sumatra dan Kalimantan masih tergabung dalam jenis yang sama. Topotipe jenis ini berasal dari Pegu, Myanmar. Tidak adanya sampel yang berasal dari Myanmar menjadikan jenis ini belum dapat dievaluasi. Kerabat dekat dari jenis ini adalah *M. fowleri* dan *M. pulchra* yang berasal dari Thailand dengan jarak genetik masing-masing berkisar 2,2–2,7% dan 8,7–9,1% (Tabel 3). Hal ini sejalan dengan penelitian Matsui *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa nilai jarak genetik antara *M. berdmorei* dan *M. fowleri* besar berkisar 3,9–4,4% sedangkan jarak antar kedua jenis dengan *M. pulchra* sangat besar berkisar 9,7–10,8%.

3. Kelompok *M. fissipes*

Microhyla fissipes terdapat pada kelompok 3 dan menunjukkan hubungan yang

parafiletik dengan *M. mukhlesuri* (UPGMABS = 96%, NJBS = 94%, MLBS = 89% dan BPP = 83%) (Gambar 2). *M. fissipes* terdiri dari subkelompok Sumatra, subkelompok Cina dan subkelompok Thailand. Subkelompok Sumatra merupakan *Microhyla* sp. beranggotakan populasi asal Aceh, Medan dan Riau (Sumatra) dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 93%, NJBS = 79%, MLBS = 65% dan BPP = 60%) (Gambar 2) dan jarak genetik 0,2–0,8% (Tabel 2) sedangkan subkelompok Cina dan Thailand masing-masing beranggotakan populasi Cina dan Thailand (Gambar 2). Perbandingan jarak genetik antara subkelompok Sumatra dan Cina berkisar 1,7–1,9% sedangkan antara subkelompok Sumatra dan Thailand adalah 1,8–3,4% (Tabel 2).

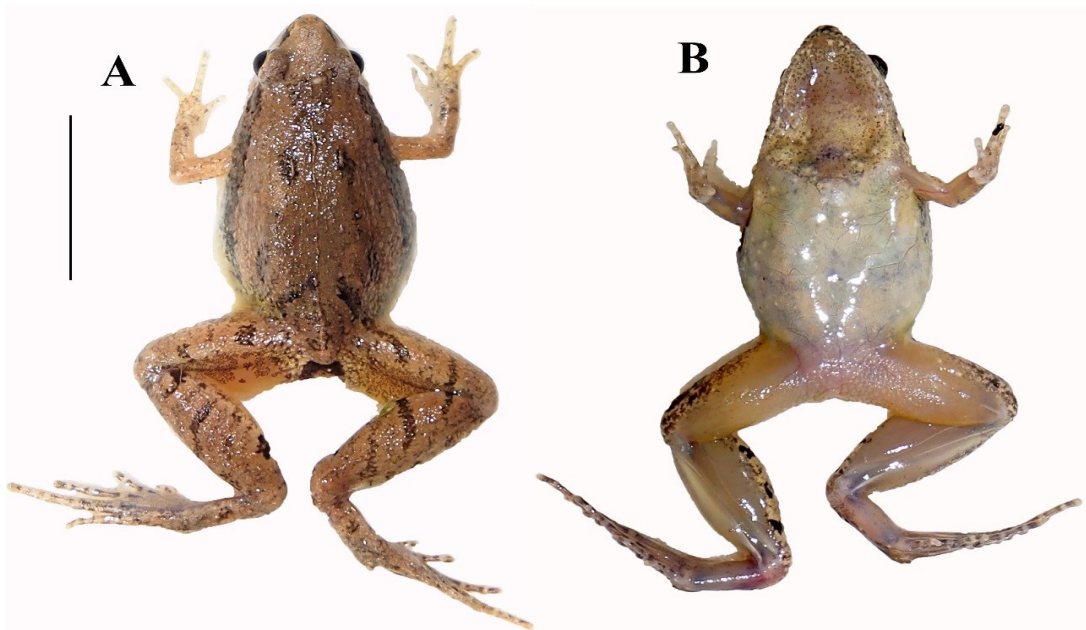
Microhyla mukhlesuri tergabung dengan populasi *M. fissipes* Thailand dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 100%, NJBS = 99%, MLBS = 74% dan BPP = 93%) dan jarak genetik berkisar 2,3–2,5%. Hal ini sejalan dengan penelitian Howlander *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa jarak genetik antara *M. fissipes* dan *M. mukhlesuri* adalah rendah yaitu 1,4%. Rendahnya jarak genetik memberikan asumsi kemungkinan kedua jenis ini secara molekuler masih tergolong dalam jenis yang sama.

Topotipe *M. fissipes* berasal dari Tainan, Taiwan (Cina). Sayangnya data populasi Taiwan belum tersedia, sehingga populasi dari Cina yang secara geografis paling dekat dengan topotipe kemungkinan akan membentuk satu kelompok dengan Taiwan.

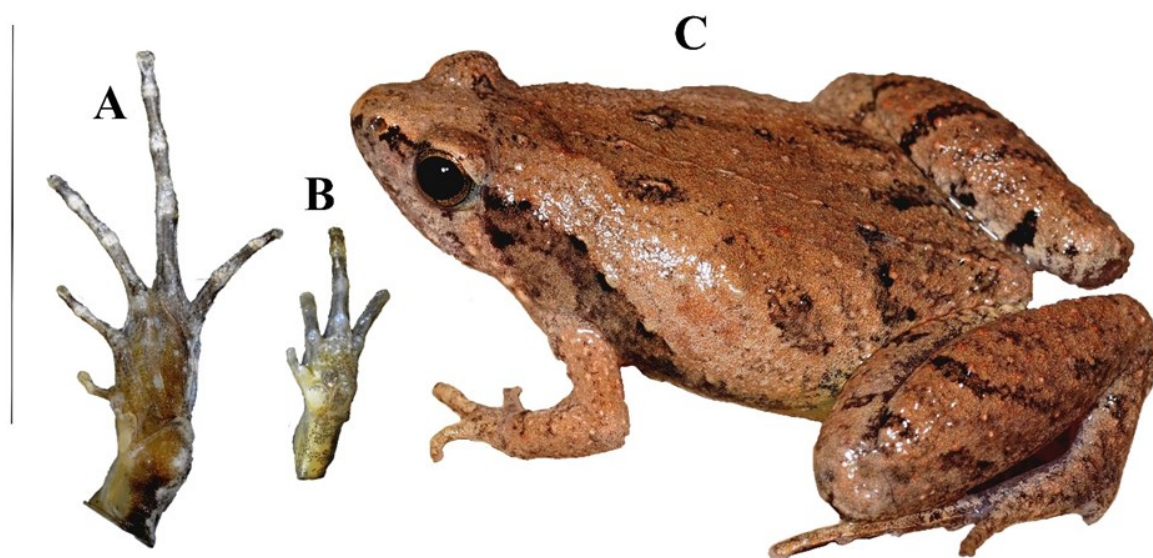
Tergabungnya populasi asal Sumatra ke dalam kelompok *M. fissipes* memberi asumsi bahwa *Microhyla* sp. jenis ini adalah *M. fissipes*. Sampai saat ini, belum ada laporan mengenai kehadiran dari *M. fissipes* di Sumatra. Informasi ini adalah catatan baru keberadaan *M. fissipes* di Sumatra (Gambar 3 dan 4).

4. Kelompok *M. heymonsi*

Microhyla heymonsi terdapat pada kelompok 4 dan terdiri dari 3 subkelompok, yaitu subkelompok Cina, subkelompok Singapura dan subkelompok Sumatra dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 83%, NJBS = 94%, MLBS = 93% dan BPP = 100%)



Gambar 3. Foto spesimen *Microhyla fissipes* (MZB Amph 28443): A. Foto bagian dorsal dan B. Foto bagian ventral (skala 10mm).



Gambar 4. Bagian ventral kaki (A), bagian ventral tangan (B), dan spesimen hidup *Microhyla fissipes* (C) dari Sumatra.

(Gambar 2). Subkelompok Cina beranggotakan populasi asal Cina dan Thailand dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 97%, NJBS = 99%, MLBS = 68% dan BPP = 77%), subkelompok Singapura beranggotakan populasi asal Singapura dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 97%, NJBS = 99%, MLBS = 97% dan BPP = 100%) dan subkelompok Sumatra beranggotakan populasi asal Medan dan Aceh (Sumatra) dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 86%, NJBS = 94%, MLBS = 90% dan BPP = 98%) (Gambar 2). Perbandingan Jarak genetik antar subkelompok Sumatra dan Singapura berkisar 3,3–3,5% sedangkan subkelompok Sumatra dan Cina berkisar 4,8–7,1% (Tabel 2).

Topotipe *M. heymonsi* berasal dari Formosa (Taiwan), sehingga populasi yang berasal dari Cina kemungkinan merupakan populasi paling dekat dengan *M. heymonsi* yang sesungguhnya yang berasal dari Taiwan. Populasi asal Cina daratan, Singapura, dan Sumatra merupakan populasi yang terpisah oleh lautan yang memungkinkan jika ketiga kelompok tersebut telah terisolasi secara reproduksi sehingga memunculkan asumsi terjadinya pembentukan jenis di wilayah tersebut.

5. Kelompok *M. palmipes*

Microhyla palmipes terdapat pada kelompok 7 dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 100%, NJBS = 100%, MLBS = 99% dan BPP = 100%) dan terdiri dari 2 subkelompok yaitu subkelompok Jawa dan subkelompok Bali. Subkelompok Jawa

beranggotakan populasi asal Bandung (Jawa) dan Bengkulu (Sumatra) dengan bootstrap (UPGMABS = 51%, NJBS = 72%, MLBS = 80% dan BPP = 98%) sedangkan subkelompok Bali hanya beranggotakan populasi asal Bali (Gambar 2). Perbandingan jarak genetik dalam subkelompok Jawa (populasi Bandung) dan populasi Bengkulu berkisar 1,8–2,8% sedangkan nilai jarak genetik antara subkelompok Jawa dan Bali berkisar 2,5–3,4% (Tabel 2).

Topotipe *M. palmipes* berasal dari Pangalengan (Bandung) sehingga populasi yang berasal dari Bandung diasumsikan sebagai *M. palmipes* yang sesungguhnya. Tergabungnya populasi Bengkulu dan Bandung mengindikasikan jika kedua populasi ini berkerabat dekat walaupun kedua populasi ini dipisahkan oleh selat Sunda. Kemungkinan terjadinya penyatuan kedua kelompok ini berkaitan dengan teori pemisahan dan penyatuan antara pulau Jawa dan Sumatra pada masa lalu yang memungkinkan satu jenis mengalami *multiple invasion*. Terpisahnya populasi Bali dengan nilai jarak genetik yang cukup besar dan adanya perbedaan morfologi memunculkan asumsi jika populasi ini berbeda jenis dengan populasi lainnya.

6. Kelompok *M. superciliaris*

Microhyla superciliaris dan *M. butleri* terdapat pada kelompok 9 dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 80%, NJBS = 80%, MLBS = 67% dan BPP = 95%) (Gambar 2). Nilai jarak genetik antara *M. superciliaris* dan *M. butleri* cukup besar berkisar 7,4–9,3%

(Tabel 3). Hal ini sesuai dengan penelitian Matsui *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa *M. superciliaris* dan *M. butleri* tergabung dalam satu kelompok dengan nilai jarak genetik yang besar berkisar 11,6–12%.

Subkelompok *M. superciliaris* beranggotakan populasi asal Malaysia (Pahang dan Negeri sembilan) dan Hutaimbaru (Sumatra) dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 100%, NJBS = 100%, MLBS = 100% dan BPP = 100%). Topotipe *M. superciliaris* berasal dari Kuala Lumpur, Malaysia sehingga populasi Malaysia diasumsikan sebagai *M. superciliaris* yang sesungguhnya. Jarak genetik antar kedua populasi Sumatra dan Malaysia tergolong rendah (1,1–1,3%) (Tabel 2), sehingga kedua populasi tersebut merupakan jenis yang sama.

Hubungan Filogenetik dan Jarak Genetik *Microhyla* Asia

Microhyla borneensis, *M. malang*, *M. orientalis*, *M. mantheyi* dan *M. achatina* tergabung dalam kelompok 1 dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 72%, NJBS = 70%, MLBS = 68% dan BPP = 100%) (Gambar 2). *Microhyla borneensis* dan *M. malang* tergabung menjadi subkelompok monofiletik dengan nilai bootstrap yang signifikan pada semua analisis dan memiliki nilai jarak genetik 2,4% (Tabel 3). Nilai ini berbeda dengan hasil penelitian Das & Haas (2010) (sinonim: *M. nepenthicola*) dan Matsui (2011) yaitu 5,1%. Perbedaan nilai jarak genetik ini disebabkan oleh panjang situs basa nitrogen yang digunakan pada penelitian adalah 525

base pair (bp) sedangkan pada penelitian lainnya berkisar 800–850 bp. Dua jenis lainnya menjadi *sister taxa* dari subkelompok ini yaitu *M. orientalis* dan *M. mantheyi* dengan nilai jarak genetik 5,8% (Tabel 3).

Microhyla mixtura dan *M. okinavensis* tergabung dalam kelompok 2 dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 99%, NJBS = 99%, MLBS = 66% dan BPP = 92%) (Gambar 2) dengan nilai jarak genetik 2,9% (Tabel 3). Nilai ini berbeda dengan penelitian Matsui *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa jarak genetik kedua jenis ini adalah 6,4%.

Kelompok 6 terdiri dari *M. annectens* dan *M. marmorata* dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 88%, NJBS = 74%, MLBS = 89% dan BPP = 83%), *M. perpava* dan *M. petrigena* dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 68%, NJBS = 67%, MLBS = 56% dan BPP = 85%) (Gambar 2) dan *M. nanopollexa* sebagai *sister taxa*. *M. annectens* dan *M. marmorata* memiliki nilai jarak genetik 6% sedangkan *M. perpava* dan *M. petrigena* memiliki nilai jarak genetik 7% (Tabel 3). Hal ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Matsui *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa *M. annectens*, *M. marmorata*, *M. perpava* dan *M. petrigena* tergabung dalam satu kelompok dan jarak genetiknya masing-masing berkisar 6,8–8,2% dan 8,4–8,6%, kecuali *M. nanopollexa* yang belum disertakan dalam penelitiannya.

Microhyla ornata, *M. nilphamariensis* dan *M. rubra* tergabung dalam kelompok 7 dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 93%, NJBS = 87%, MLBS = 74% dan BPP =

100%) (Gambar 2). *Microhyla ornata* dan *M. nilphamariensis* tergabung dalam subkelompok dengan nilai bootstrap (UPGMABS = 100%, NJBS = 100%, MLBS = 97% dan BPP = 100%) (Gambar 2) dan nilai jarak genetik berkisar 0,8% sedangkan nilai jarak genetik dengan *M. rubra* yang menjadi *sister taxa* berkisar 6,5% (Tabel 3). Nilai ini berbeda jauh dengan hasil penelitain Howlander *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa jarak genetik antara *M. ornata* dan *M. nilphamariensis* berkisar 5,7–6% sedangkan jarak genetik *M. nilphamariensis* dan *M. rubra* berkisar 7,5–8,2%.

KESIMPULAN

Marga *Microhyla* berdasarkan gen 16S rRNA kemungkinan membentuk monofiletik karena hanya didukung oleh nilai bootstrap 77 % pada analisis UPGMA. Terdapat beberapa jenis *Microhyla* asal Sumatra yang mengindikasikan adanya *cryptic species*, yaitu kelompok *M. achatina*, kelompok *M. heymonsi* dan kelompok *M. palmipes*. Populasi yang tergabung dalam kelompok *M. fissipes* merupakan catatan pertama adanya jenis *M. fissipes* di Sumatra.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada semua peneliti dan teknisi laboratorium Herpetologi dan Genetika MZB atas bantuannya dalam penelitian ini. Penelitian ini, sebagian didukung oleh hibah dari E. N. Smith dan M. B. Harvey (NSF DEB 1146324), disetujui oleh RISTEK, dan mengikuti protokol penggunaan hewan (UTA IACUC A12.004).

DAFTAR PUSTAKA

- Das, I., Yaakob, N. & Sukumaran, J. (2007). A new species of *Microhyla* (Anura:Microhylidae) from the Malay Peninsula. *Hamadryad*, 31(2), 304–314.
- Das, I. & Haas, A. (2010). New species of *Microhyla* from Sarawak: old world's smallest frogs crawl out of miniature pitcher plants on Borneo (Amphibia: Anura: Microhylidae). *Zootaxa*, 2571, 37–52.
- Duellmann, W.E. (1993). *Amphibian species of the world: additions and corrections. Series: Special publication (University of Kansas. Museum of Natural History) no. 21.* Lawrence: University of Kansas Publications.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. & Gemmell, N.J. (2007). Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2, 10, e1109.
- Frost, D.R (Ed). (1985) *Amphibian Species of the world: A Taxonomic and Geographical Reference.* Lawrence: Allen Press.
- Frost, D.R. (2016). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 [Online]. Diambil dari <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

- Hamidy, A., Matsui, M., Nishikawa, K. & Belabut, B.M. (2012). Detection of cryptic taxa in *Leptobrachium nigrops* (Amphibia, Anura, Megophryidae), with description of two new species. *Zootaxa*, 3398, 22–39.
- Hamidy, A., Matsui, M., Shimada, T., Nishikawa, K., Yambun, P., Sudin, A., Kusriani, M.D. & Kurniati, H. (2011). Morphological and genetic discordance in two species of Bornean *Leptobrachium* (Amphibia, Anura, Megophryidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3), 904
- Hasan, M., Islam, M.M., Kuramoto, M., Kurabayashi, A. & Sumida, M. (2014). Description of two new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Bangladesh. *Zootaxa*, 3755(5), 401–418
- Hasan, M., Islam, M.M., Khan, M.M.R., Igawa, T., Alam, M.S., Djong, H.T., Kurniawan, N., Joshy, H., Sen, Y.H., Belabut, D.M., Kurabayashi, A., Kuramoto, M. & Sumida, M. (2014). Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: a case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 389–411
- Hedges, S.B. (1994). Molecular evidence for the origin of birds. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 91, 2621–2624.
- Hillis, D.M., Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K. & Zimmer, E.A. (1996). *Nucleic acids IV: sequencing and cloning*. Sunderland: Molecular Systematics Sinauer.
- Howlader, M.S.A., Nair, A., Gopalan, S.V. & Merilä, J. (2015). A new species of *Microhyla* (Anura: Microhylidae) from Nilphamari, Bangladesh. *PLoS ONE*, 10(3), 1–18.
- Huelsenbeck, J.P. & Hillis, D.M. (1993). Success of phylogenetic methods in the fourtaxoncase. *Systematic Biology*, 42, 247–264.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F.R. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Inger, R.F. (1999). Distribution of amphibians of the Ryukyu islands. *Fieldiana Zoology*, 32, 295–352.
- Inger, R.F., Stuart, B.L. & Iskandar, D.T. (2009). Systematics of a widespread Southeast Asian frog, *Rana chalconota* (Amphibia: Anura: Ranidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155, 123–147.
- Jobb, G., von Haeseler, A. & Strimmer, K. (2004). Treefinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 18.
- Khan, M.S. (2000) Buccopharyngeal morphology and feeding ecology of *Microhyla ornata* tadpoles. *Asiatic Herpetological Research*, 9, 130–138.

- Kurabayashi, A., Matsui, M., Daicus, B.M., Yong, H.S., Norhayati, A., Sudin, A., Kuramoto, M., Hamidy, A. & Sumida, M. (2011) From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian-New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoides*. *BMC Evolutionary Biology*, *11*, 175.
- Kuraishi, N., Matsui, M., Hamidy, A., Belabut, D.M., Ahmad, N., Panha, S., Sudin, S., Yong, H.S., Jiang, J.P., Ota, H., Thong, H.T. & Nishikawa, K. (2012). Phylogenetic and taxonomic relationships of the *Polypedates leucomystax* complex (Amphibia). *Zoologica Scripta*, *42*(1), 54–70.
- Leaché, A.D. & Reeder, T.W. (2002). Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. *Systematics Biology*, *51*, 44–68.
- Matsui, M., Ito, H., Shimada, T., Ota, H., Saidapur, S. K., Khonsue, W., Ueno, T.T. & Wu, G.F. (2005). Taxonomic relationships within the Pan-oriental narrow-mouth toad *Microhyla ornata* as revealed by mtDNA analysis (Amphibia, Anura, Microhylidae). *Zoological Science*, *22*, 489–495.
- Matsui, M., Panha, S., Khonsue, W. & Kuraishi, N. (2010). Two new species of the “kuhlii” complex of the genus *Limnonectes* from Thailand (Anura: Dicroglossidae). *Zootaxa*, *2615*, 1–22.
- Matsui, M. (2011). Taxonomic revision of one of the Old World’s smallest frogs, with description of a new Bornean *Microhyla* (Amphibia, Microhylidae). *Zootaxa*, *2814*, 33–49.
- Matsui, M., Hamidy, A., Belabut, D.M., Ahmad, N., Panha, S., Sudin, A., Khonsue, W., Oh, H.S., Yong, J.P., Jiang, J.P. & Nishikawa, K. (2011). Systematic relationships of Oriental tiny frogs of the family Microhylidae (Amphibia, Anura) as revealed by mtDNA genealogy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *61*, 167–179.
- Matsui, M., Hamidy, A. & Eto, K. (2013). Description of a New Species of *Microhyla* from Bali, Indonesia (Amphibia, Anura). *Zootaxa*, *3670*(4), 579–590.
- Peloso, P.L.V., Frost, D.R., Richards, S.J., Rodrigues, M.T., Donnellan, S., Matsui, M., Raxworthy, C.J., Biju, S.D., Lemmon, E.M. & Lemmon, A.R. & Wheeler, W.C. (2015). The impact of anchored phylogenomics and taxon sampling on phylogenetic inference in narrow-mouthed frogs (Anura, Microhylidae). *Cladistics*, *1*, 1–28.
- Sheridan, J.A., Bickford, D. & Yi Su, K.F. (2010). An examination of call and genetic variation in three wide-ranging southeast Asian anuran species. *The Raffles Bulletin Of Zoology*, *58*(2), 369–379.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 2731–2739.
- Tanabe, A.S. (2007). Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Molecular Ecology Notes*, 7, 962–964.
- Vences, M., Thomas, M., Meijden, A., Chiari, Y. & Vietes, D.R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2 (5), 1–12.
- Vieth, M., Kosuch, J., Ohler, A. & Dubois, A. (2001). Systematics of *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) (Amphibia, Anura, Ranidae) and related species. 2. Morphological and molecular variation in frogs from Greater Sunda island (Sumatra, Java, Borneo) with the definition of two species. *Alytes*, 19, 5–28.
- Zhao, E.M. (1999). Distribution patterns of amphibians in temperate East Asia. In: Duellman, W.E. (editor) *Patterns of Distribution of Amphibians: A Global Perspective*. Maryland: Johns Hopkins University Press, page. 421-423.

Tabel 1. Sampel *Microhyla* dan *out group* yang digunakan dengan informasi voucher, lokasi, nomer genbank dan sumber.

No	Jenis	Voucher	Lokasi	No. Genbank	Sumber
1	<i>Microhyla achatina</i>	MZB Amph 16328	Bengkulu, Sumatra, Indonesia	AB634681	Matsui <i>et al.</i> (2011)
2	<i>Microhyla achatina</i>	MZB Amph 16402	Ungaran, Jawa, Indonesia	AB634656	Matsui <i>et al.</i> (2011)
3	<i>Microhyla achatina</i>	MDK 24	Gunung Gede pangrango, Jawa, Indonesia	AB634657	Matsui <i>et al.</i> (2011)
4	<i>Microhyla achatina</i>	MZB Amph 15291	Lampung, Sumatra, Indonesia	AB634680	Matsui <i>et al.</i> (2011)
5	<i>Microhyla achatina</i>	MZB Amph 26079	Gunung Dempo, Sumatra selatan, Indonesia	LC213130	Penelitian ini
6	<i>Microhyla achatina</i>	UTA (ENS 17612)	Gunung Patah, Sumatra selatan, Indonesia	LC213131	Penelitian ini
7	<i>Microhyla achatina</i>	UTA (ENS 16466)	Gunung Kencana, Bandung, Indonesia	LC213129	Penelitian ini
8	<i>Microhyla annectens</i>	KUHE 52438	Cameron, Pahang, Malaysia	AB634659	Matsui <i>et al.</i> (2011)
9	<i>Microhyla annectens</i>	KUHE 53373	Genting, Selangor, Malaysia	AB634658	Matsui <i>et al.</i> (2011)
10	<i>Microhyla berdmorei</i>	MZB Amph 16413	Bengkulu, Sumatra, Indonesia	AB634660	Matsui <i>et al.</i> (2011)
11	<i>Microhyla berdmorei</i>	MZB Amph 15270	Paramasan, Kalimantan, Indonesia	AB634661	Matsui <i>et al.</i> (2011)
12	<i>Microhyla berdmorei</i>	MZB Amph 26082	Pagar alam, Bengkulu, Indonesia	LC213132	Penelitian ini
13	<i>Microhyla borneensis</i>	ZRC 1.12432	Matang range, Sarawak, Malaysia	GU154885	Das & Haas (2010)
14	<i>Microhyla borneensis</i>	KUHE 53165	Gunung Serapi, Sarawak, Malaysia	AB598329	Matsui <i>et al.</i> (2011)
15	<i>Microhyla butleri</i>	KUHE 40591	Vietnam, A Roang, A Luoi	AB634664	Matsui <i>et al.</i> (2011)
16	<i>Microhyla butleri</i>	KUHE 44203	Tainan, Taiwan	AB634665	Matsui <i>et al.</i> (2011)
17	<i>Microhyla fissipes</i>	KUHE 22064	Bangkok, Thailand	AB634666	Matsui <i>et al.</i> (2011)
18	<i>Microhyla fissipes</i>	KUHE 32943	HuangShan, Anhui, Cina	AB201185	Matsui <i>et al.</i> (2011)
19	<i>Microhyla fissipes</i>	MZB Amph 26091	Aceh besar, Aceh, Indonesia	LC213135	Penelitian ini
20	<i>Microhyla fissipes</i>	MZB Amph 23551	Kuala Namu, Sumatra Utara, Indonesia	LC213133	Penelitian ini
21	<i>Microhyla fissipes</i>	UTA (ENS 16264)	Kuala Namu, Sumatra Utara, Indonesia	LC213134	Penelitian ini
22	<i>Microhyla fissipes</i>	MZB Amph 26092	Tanah putih, Riau, Indonesia	LC213136	Penelitian ini
23	<i>Microhyla fissipes</i>	MZB Amph 28443	Bagansiapiapi, Riau, Indonesia	LC213145	Penelitian ini
24	<i>Microhyla fowleri</i>	KUHE 21992	Mae Yom, Phrae, Thailand	AB634667	Matsui <i>et al.</i> (2011)
25	<i>Microhyla heymonsi</i>	KU DSM1136	Sakaerat, Thailand	HM359087	Sheridan <i>et al.</i> (2010)
26	<i>Microhyla heymonsi</i>	-	Cina	AY458596	Sheridan <i>et al.</i> (2010)
27	<i>Microhyla heymonsi</i>	RM MIHEJ53	Singapore	HM359092	Sheridan <i>et al.</i> (2010)
28	<i>Microhyla heymonsi</i>	MZB Amph 26807	Longkha, Aceh, Indonesia	LC213139	Penelitian ini
29	<i>Microhyla heymonsi</i>	MZB Amph 24084	Gunung Sibuatan, Sumatra, Indonesia	LC213137	Penelitian ini
30	<i>Microhyla heymonsi</i>	UTA (ENS 18334)	Suelewah Agam, Aceh, Indonesia	LC213138	Penelitian ini
31	<i>Microhyla malang</i>	KUHE 53018	Gunung Serapi, Sarawak, Malaysia	AB598319	Matsui (2011)
32	<i>Microhyla malang</i>	KUHE 53034	Gunung Serapi, Sarawak, Malaysia	AB598320	Matsui (2011)
33	<i>Microhyla mantheyi</i>	KUHE 15726	Gombak, Selangor, Malaysia	AB598333	Matsui <i>et al.</i> (2011)

Lanjutan Tabel 1

No	Jenis	Voucher	Lokasi	No. Genbank	Sumber
34	<i>Microhyala manthevi</i>	KUHE 52556	Temerloh, Pahang, Malaysia	AB598334	Matsui <i>et al.</i> (2011)
35	<i>Microhyala marmorata</i>	KUHE 32455	Samneua, Houaphan, Laos	AB634668	Matsui <i>et al.</i> (2011)
36	<i>Microhyala marmorata</i>	KUHE 32455	Samneua, Houaphan, Laos	AB611955	Kurabayashi <i>et al.</i> (2011)
37	<i>Microhyala mixtura</i>	CIB 20070248	Sichuan, Cina	AB634669	Matsui <i>et al.</i> (2011)
38	<i>Microhyala mukhlesuri</i>	IABHU 3879	Raozan, Chittagong, Bangladesh	AB543608	Hasan <i>et al.</i> (2014)
39	<i>Microhyala mukhlesuri</i>	IABHU 3880	Raozan, Chittagong, Bangladesh	AB543609	Hasan <i>et al.</i> (2014)
40	<i>Microhyala nanopollexa</i>	-	Cina	KM509164	Peloso <i>et al.</i> (2015)
41	<i>Microhyala nilphamariensis</i>	MZH 2360	Saidpur, Nilphamari, Bangladesh	KP072789	Howlander <i>et al.</i> (2015)
42	<i>Microhyala okinavensis</i>	KUHE 12840	Amami oshima, Jepang	AB530635	Matsui <i>et al.</i> (2011)
43	<i>Microhyala okinavensis</i>	KUHE 12840	Okinawa, Jepang	AB530634	Hasan <i>et al.</i> (2014)
44	<i>Microhyala orientalis</i>	MZB Amph 20404	Wongaya Gede, Bali, Indonesia	AB781469	Matsui <i>et al.</i> (2013)
45	<i>Microhyala orientalis</i>	KUHE 55074	Batu karu, Bali, Indonesia	AB781466	Matsui <i>et al.</i> (2013)
46	<i>Microhyala ornata</i>	RBRL 060709-29	Talapu, Medikeri, India	AB530631	Hasan <i>et al.</i> (2014)
47	<i>Microhyala ornata</i>	BNHS 5036	Mudigere, India	AB530632	Hasan <i>et al.</i> (2014)
48	<i>Microhyala palmipes</i>	KUHE 55074	Wongaya Gede, Bali	AB781470	Matsui <i>et al.</i> (2011)
49	<i>Microhyala palmipes</i>	MZB Amph 26075	Bukit Daun, Bengkulu, Indonesia	LC213142	Penelitian ini
50	<i>Microhyala palmipes</i>	UTA (ENS 18697)	Bukit Kaba, Bengkulu, Indonesia	LC213143	Penelitian ini
51	<i>Microhyala palmipes</i>	UTA (ENS 16234)	Gunung Kencana, Bandung, Indonesia	LC213140	Penelitian ini
52	<i>Microhyala palmipes</i>	MZB Amph 23092	Gunung Kencana, Bandung, Indonesia	LC213141	Penelitian ini
53	<i>Microhyala perparva</i>	KUHE UN	Balikpapan, Kalimantan, Indonesia	AB634672	Matsui <i>et al.</i> (2011)
54	<i>Microhyala perparva</i>	KUHE 53675	Mulu, Sarawak, Malaysia	AB634673	Matsui <i>et al.</i> (2011)
55	<i>Microhyala petrigena</i>	KUHE 53743	Bukit kana, Serawak, Malaysia	AB634675	Matsui <i>et al.</i> (2011)
56	<i>Microhyala petrigena</i>	BORN 22412	Maliau Basin, Sabah, Malaysia	AB634674	Matsui <i>et al.</i> (2011)
57	<i>Microhyala pulchra</i>	KUHE 35119	Phu Luang, Loei, Thailand	AB201191	Matsui <i>et al.</i> (2011)
58	<i>Microhyala pulchra</i>	KUHE 22113	Pilok, Kanchaburi, Thailand	AB634676	Matsui <i>et al.</i> (2011)
59	<i>Microhyala pulchra</i>	KUHE 22113	Dharwad Karnatak, India	AB201192	Matsui <i>et al.</i> (2011)
60	<i>Microhyala superciliaris</i>	KUHE 52558	Temerloh, Pahang, Malaysia	AB634682	Matsui <i>et al.</i> (2011)
61	<i>Microhyala superciliaris</i>	KUHE 53371	Kenaboi, Negeri Sembilan, Malaysia	AB634683	Matsui <i>et al.</i> (2011)
62	<i>Microhyala superciliaris</i>	MZB Amph 23587	HutaImbaru, Sumatra, Indonesia	LC213144	Penelitian ini
Outgroup					
63	<i>Kaloula pulchra</i>	KUHE 22206	Nongkhai, Thailand	AB634690	Matsui <i>et al.</i> (2011)
64	<i>Kalophrynus pleurostigma</i>	MZB Amph 15295	Lampung, Sumatra, Indonesia	AB634700	Matsui <i>et al.</i> (2011)
65	<i>Phrynella pulchra</i>	UKMHC 820	Hulu Trengganu, Malaysia	AB634694	Matsui <i>et al.</i> (2011)
66	<i>Hylarana chalconota</i>	IABHU 21104	Langkawi island, Malaysia	AB530588	Hasan <i>et al.</i> (2014)
67	<i>Leptobranchium waysepuitense</i>	MZB Amph15862	Lampung, Sumatra, Indonesia	AB530401	Hamidy <i>et al.</i> (2011)

Tabel 2. Nilai jarak genetik (*p-uncorrected distance*) jenis *Microhyla* dari Sumatra.

No	Jenis	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>M. achatina</i> AB634656							
2	<i>M. achatina</i> AB634657	3,1						
3	<i>M. achatina</i> ENS 16466	1,1	3,4					
4	<i>M. achatina</i> MZB Amph 26079	6,4	6,2	5,8				
5	<i>M. achatina</i> ENS 17612	6,2	5,9	6,2	0,8			
6	<i>M. achatina</i> AB634680	6,7	6,2	6,9	2,7	2,7		
7	<i>M. achatina</i> AB634681	5,7	5,4	6,2	0,7	0,9	2,9	
8	<i>M. berdmorei</i> MZB Amph 26082	8,8	9,1	8,6	10,9	10,0	11,6	10,9
9	<i>M. berdmorei</i> AB634660	8,6	8,8	8,8	11,4	11,1	11,4	10,6
10	<i>M. berdmorei</i> AB634661	9,6	9,6	9,8	11,9	11,9	11,6	11,1
11	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 26092	8,1	9,1	8,9	9,2	8,9	8,7	8,7
12	<i>M. fissipes</i> ENS 16264	8,1	9,1	9,0	9,1	10,0	8,7	8,7
13	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 23551	8,1	9,1	8,6	8,7	9,6	8,7	8,7
14	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 28443	8,4	9,4	9,1	9,2	10,0	8,9	8,9
15	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 26091	8,1	9,1	8,6	8,7	9,6	8,7	8,7
16	<i>M. fissipes</i> AB634666	9,4	10,4	9,9	10,2	10,2	9,9	10,0
17	<i>M. fissipes</i> AB201185	8,3	8,8	8,5	8,3	8,3	8,4	8,4
18	<i>M. heymonsi</i> AY458596	9,1	8,8	9,4	10,3	10,0	9,1	10,6
19	<i>M. heymonsi</i> HM359092	10,6	11,1	11,2	12,0	12,0	11,4	11,7
20	<i>M. heymonsi</i> HM359087	8,4	8,9	10,1	11,0	11,0	9,7	9,9
21	<i>M. heymonsi</i> MZB Amph 24084	10,1	10,6	10,2	11,2	11,2	11,4	11,8
22	<i>M. heymonsi</i> ENS 18334	9,6	10,1	8,8	9,6	10,5	11,7	10,7
23	<i>M. heymonsi</i> MZB Amph 26807	9,9	10,4	9,3	10,0	10,5	12,0	11,0
24	<i>M. palmipes</i> ENS 16234	14,0	14,7	14,2	12,7	12,9	13,2	12,9
25	<i>M. palmipes</i> MZB Amph 23092	14,0	14,7	13,9	12,5	11,8	13,2	12,9
26	<i>M. palmipes</i> MZB Amph 26075	14,8	15,6	13,4	12,5	13,0	13,4	13,7
27	<i>M. palmipes</i> ENS 18697	14,8	15,6	14,6	13,7	13,7	13,4	13,7
28	<i>M. palmipes</i> AB781470	14,0	14,5	14,0	13,5	13,5	13,5	13,2
29	<i>M. superciliaris</i> AB634682	12,6	13,7	12,6	13,5	13,5	13,7	13,2
30	<i>M. superciliaris</i> AB634683	12,9	13,9	12,9	13,7	13,8	14,0	13,5
31	<i>M. superciliaris</i> MZB Amph 23587	13,4	13,9	12,7	13,4	13,9	14,5	14,0

Lanjutan Tabel 2

No	Jenis	8	9	10	11	12	13	14
1	<i>M. achatina</i> AB634656							
2	<i>M. achatina</i> AB634657							
3	<i>M. achatina</i> ENS 16466							
4	<i>M. achatina</i> MZB Amph 26079							
5	<i>M. achatina</i> ENS 17612							
6	<i>M. achatina</i> AB634680							
7	<i>M. achatina</i> AB634681							
8	<i>M. berdmorei</i> MZB Amph 26082							
9	<i>M. berdmorei</i> AB634660	0,2						
10	<i>M. berdmorei</i> AB634661	1,5	1,3					
11	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 26092	10,7	10,6	11,1				
12	<i>M. fissipes</i> ENS 16264	11,8	10,6	11,1	0,6			
13	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 23551	11,3	10,6	11,1	0,4	0,2		
14	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 28443	11,8	10,9	11,4	0,8	0,6	0,4	
15	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 26091	11,3	10,6	11,1	0,4	0,2	0,0	0,4
16	<i>M. fissipes</i> AB634666	12,4	12,2	12,7	2,2	2,2	2,2	2,5
17	<i>M. fissipes</i> AB201185	10,4	10,6	11,1	1,7	1,7	1,7	1,9
18	<i>M. heymonsi</i> AY458596	12,2	12,2	12,8	8,8	8,8	8,8	8,8
19	<i>M. heymonsi</i> HM359092	12,5	12,4	12,6	8,6	8,8	8,6	9,1
20	<i>M. heymonsi</i> HM359087	12,8	11,6	12,4	9,2	9,1	8,9	9,4
21	<i>M. heymonsi</i> MZB Amph 24084	12,0	12,4	12,6	9,1	10,0	9,5	10,0
22	<i>M. heymonsi</i> ENS 18334	12,0	12,4	12,9	9,3	9,3	8,9	9,3
23	<i>M. heymonsi</i> MZB Amph 26807	12,0	12,6	13,2	9,3	9,7	9,3	9,8
24	<i>M. palmipes</i> ENS 16234	14,9	14,8	15,6	9,0	9,5	9,0	9,5
25	<i>M. palmipes</i> MZB Amph 23092	13,9	14,8	15,6	10,2	11,1	10,6	11,1
26	<i>M. palmipes</i> MZB Amph 26075	13,7	14,2	14,8	10,4	10,8	10,4	10,8
27	<i>M. palmipes</i> ENS 18697	14,1	14,2	14,8	9,3	10,1	9,7	10,2
28	<i>M. palmipes</i> AB781470	14,5	14,3	14,8	10,3	10,3	10,3	10,6
29	<i>M. superciliaris</i> AB634682	12,1	11,8	12,1	10,3	10,3	10,3	10,6
30	<i>M. superciliaris</i> AB634683	12,4	12,1	12,4	10,6	10,6	10,6	10,8
31	<i>M. superciliaris</i> MZB Amph 23587	12,7	12,4	12,6	11,6	12,0	11,5	11,1

Lanjutan Tabel 2

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
2,2												
1,7	3,4											
8,8	10,5	8,5										
8,6	8,8	7,8	6,8									
8,9	9,1	7,6	3,1	4,8								
9,5	9,1	8,5	6,6	3,3	7,1							
8,9	9,1	8,5	6,6	3,3	6,4	2,2						
9,3	9,3	8,7	6,8	3,5	6,9	2,2	0,4					
9,0	10,3	9,7	14,1	11,8	12,8	13,2	13,0	12,9				
10,6	10,3	9,7	14,1	11,8	12,8	12,0	12,7	12,7	1,4			
10,4	10,8	9,9	15,4	12,1	13,6	12,7	13,0	13,4	2,8	2,2		
9,7	10,8	9,9	15,4	12,1	13,8	13,4	14,2	14,2	1,8	2,8	1,0	
10,3	10,8	10,1	14,2	11,9	12,4	13,4	12,9	13,2	2,5	2,5	3,4	3,4
10,3	11,3	10,1	12,3	11,1	11,3	11,6	11,6	11,8	10,6	10,6	10,6	10,6
10,6	11,6	10,3	12,6	11,3	11,6	11,9	11,9	12,1	10,9	10,9	10,9	10,9
11,5	12,1	10,4	11,7	11,6	12,8	12,0	11,3	11,5	11,8	11,5	11,1	12,0

Lanjutan Tabel 2

No	Jenis	28	29	30
1	<i>M. achatina</i> AB634656			
2	<i>M. achatina</i> AB634657			
3	<i>M. achatina</i> ENS 16466			
4	<i>M. achatina</i> MZB Amph 26079			
5	<i>M. achatina</i> ENS 17612			
6	<i>M. achatina</i> AB634680			
7	<i>M. achatina</i> AB634681			
8	<i>M. berdmorei</i> MZB Amph 26082			
9	<i>M. berdmorei</i> AB634660			
10	<i>M. berdmorei</i> AB634661			
11	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 26092			
12	<i>M. fissipes</i> ENS 16264			
13	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 23551			
14	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 28443			
15	<i>M. fissipes</i> MZB Amph 26091			
16	<i>M. fissipes</i> AB634666			
17	<i>M. fissipes</i> AB201185			
18	<i>M. heymonsi</i> AY458596			
19	<i>M. heymonsi</i> HM359092			
20	<i>M. heymonsi</i> HM359087			
21	<i>M. heymonsi</i> MZB Amph 24084			
22	<i>M. heymonsi</i> ENS 18334			
23	<i>M. heymonsi</i> MZB Amph 26807			
24	<i>M. palmipes</i> ENS 16234			
25	<i>M. palmipes</i> MZB Amph 23092			
26	<i>M. palmipes</i> MZB Amph 26075			
27	<i>M. palmipes</i> ENS 18697			
28	<i>M. palmipes</i> AB781470			
29	<i>M. superciliaris</i> AB634682	9,6		
30	<i>M. superciliaris</i> AB634683	9,8	0,2	
31	<i>M. superciliaris</i> MZB Amph 23587	10,3	1,1	1,3

Tabel 3. Nilai jarak genetik (*p*-uncorrected distance) jenis *Microhyla* dari kawasan Asia.

No	Jenis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1	<i>M. borneensis</i>																								
2	<i>M. malang</i>	2,4																							
3	<i>M. orientalis</i>	4,7	5,0																						
4	<i>M. mantheyi</i>	5,8	6,7	5,8																					
5	<i>M. achatina</i>	7,1	7,9	7,0	6,6																				
6	<i>M. mixtura</i>	8,6	8,9	8,3	8,1	8,8																			
7	<i>M. okinawensis</i>	10,4	10,2	9,7	10,2	10,2	2,9																		
8	<i>M. fissipes</i>	9,5	8,2	8,2	8,1	9,0	5,9	6,8																	
9	<i>M. mukhtesuri</i>	9,5	8,1	8,7	8,3	9,0	6,0	7,2	2,2																
10	<i>M. heymonsi</i>	8,3	7,9	8,6	9,2	10,4	9,4	11,1	9,0	8,5															
11	<i>M. pulchra</i>	14,1	12,3	12,7	12,8	11,4	11,4	11,4	10,8	11,1	11,7														
12	<i>M. fowleri</i>	10,9	11,0	10,1	10,1	9,3	11,4	11,8	11,3	11,8	12,3	9,1													
13	<i>M. berdmonei</i>	11,8	11,8	10,8	10,9	10,3	11,6	11,9	11,2	11,6	12,4	8,9	2,4												
14	<i>M. annectens</i>	13,5	13,6	13,9	13,5	14,3	13,7	15,5	13,3	13,1	13,8	13,4	10,8	10,2											
15	<i>M. marmorata</i>	11,1	11,1	12,0	12,7	12,3	11,3	12,7	11,1	11,3	12,4	12,5	12,1	11,8	6,0										
16	<i>M. perpava</i>	13,6	13,6	14,4	14,3	14,4	12,5	13,7	11,9	11,4	13,6	13,8	13,3	13,9	8,4	7,4									
17	<i>M. petrigena</i>	13,9	13,9	14,3	13,6	14,0	12,5	14,6	12,7	12,1	13,7	13,7	12,0	12,1	8,5	8,2	7,0								
18	<i>M. nanopollexa</i>	13,8	13,0	12,2	13,3	13,0	13,4	14,8	13,5	13,7	15,1	14,3	12,1	12,4	10,3	10,9	10,3	9,4							
19	<i>M. palmipes</i>	14,0	13,5	14,5	14,3	13,7	12,1	13,3	10,2	11,2	13,2	12,7	14,4	14,6	12,3	11,2	11,3	12,1	14,3						
20	<i>M. ornata</i>	11,0	10,9	11,6	11,3	10,6	9,7	10,8	9,4	9,1	12,0	9,7	9,7	9,9	11,7	10,5	11,9	11,1	13,4	9,2					
21	<i>M. nilphamariensis</i>	10,8	10,9	11,0	10,8	10,2	10,1	10,5	10,0	10,0	12,0	10,2	9,8	9,9	12,5	10,9	12,7	12,1	13,3	10,3	0,8				
22	<i>M. rubra</i>	11,6	11,2	11,4	11,4	11,0	11,6	12,9	10,3	10,5	12,2	10,4	10,6	11,0	13,1	10,8	13,8	12,6	13,3	11,8	6,7	6,5			
23	<i>M. butleri</i>	12,5	11,1	13,0	12,8	12,7	11,5	14,3	12,1	11,4	13,7	11,6	12,4	12,1	11,9	11,2	12,9	13,0	13,3	12,3	10,0	10,3	10,1		
24	<i>M. superciliaris</i>	13,5	12,5	13,2	12,0	13,5	11,2	13,1	10,9	10,0	11,8	12,7	12,1	12,3	12,2	11,5	11,5	11,3	12,7	10,8	9,8	10,3	9,8	8,6	