

HUBUNGAN FILOGENETIK *Phrynella pulchra* Boulenger, 1887 BERDASARKAN GEN 16S rRNA

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *Phrynella pulchra* Boulenger, 1887 BASED ON 16S rRNA GENE

Farid Akhsani¹, Amir Hamidy², Achmad Farajallah¹, Eric N. Smith³

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

²Museum Zoologicum Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi LIPI

Gedung Widyasatwaloka, Jl. Jakarta Bogor Km. 46, Cibinong, Jawa Barat, Indonesia

³Amphibian and Reptile Diversity Research Center, Department of Biology,

The University of Texas at Arlington, Arlington, Texas 76019, USA

e-mail: hamidyamir@gmail.com

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

ABSTRAK

Phrynella merupakan marga monotipik yang sejauh ini hanya terdiri dari satu jenis, yakni *Phrynella pulchra*. Jenis ini terdistribusi di Semenanjung Malaysia, Sumatra dan Pulau Mentawai. Kami mengevaluasi status taksonomi populasi yang berasal dari Sumatra menggunakan data sekuen dari gen 16S rRNA mitokondria. Hubungan filogenetik dianalisis menggunakan *Neighbour Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML), *Bayesian Inference Analisis* (BI) dan *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means* (UPGMA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *P. pulchra* adalah kelompok monofiletik terhadap anggota luar (*Metaphrynella*, *Kaloula* dan *Micryletta*). Kelompok monofiletik *P. pulchra* terbagi menjadi dua kelompok besar: Sumatra dan Semenanjung Malaysia. Kelompok Sumatra terdiri dari dua subkelompok: Aceh dan Sumatra Utara- Bengkulu. Jarak genetik (*uncorrected p-distance*) antara populasi Semenanjung Malaysia dan Sumatra berkisar antara 1,1 sampai 2,0%, sedangkan di dalam populasi Sumatra berkisar antara 0,0 sampai 1,1%. Rendahnya jarak genetik populasi Semenanjung Malaysia dengan Sumatra secara taksonomi menunjukkan populasi tersebut masih berada pada tingkat Jenis yang sama.

Kata Kunci: Mitokondria, populasi, jenis, Sumatra, taksonomi

ABSTRACT

Phrynella is a monotypic genus that so far only consisted of a single species, *Phrynella pulchra*. This species is distributed in the Malay Peninsula, Sumatra and the Mentawai Island. We evaluated the taxonomic status of populations from Sumatra using mitochondrial 16S rRNA sequence data. The phylogenetic relationships were estimated using Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA), Neighbor Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML), and Bayesian Inference Analysis (BI). The results show that *P. pulchra* is a monophyletic group with respect to out-group members (*Metaphrynella*, *Kaloula* and *Micryletta*). *P. pulchra* comprised of two main clades: Sumatra and Malay Peninsula. The Sumatra clade had two subclades: Aceh and Sumatra Utara-Bengkulu. The genetic distances (*uncorrected p-distance*) between Malay Peninsula and Sumatra ranged from 1.1 to 2.0 %, while within Sumatran populations ranged from 0.0 to 1.1%. Taxonomically, the low genetic distance between the Malay Peninsula and Sumatran populations indicate conspecificity.

Keywords: Mitochondria, population, species, Sumatra, taxonomy

PENDAHULUAN

Phrynella merupakan marga yang monotipik (marga yang terdiri hanya satu jenis), yakni *Phrynella pulchra* (Gambar 1). Marga *Phrynella* termasuk ke dalam suku *Microhylidae* (Frost 2016). Boulenger (1887)

mendesripsikan *P. pulchra* dengan lokasi tipenya (lokasi dimana jenis ini pertama kali didesripsikan) adalah Malacca (Semenanjung Malaysia). Tiga tahun kemudian, Boulenger (1890) mendesripsikan jenis lain dari marga yang sama yakni *Phrynella pollicaris* dari

Perak (Semenanjung Malaysia). Revisi pertama terhadap marga *Phrynella* dilakukan oleh Smith (1926) yang mensinonimkan marga *Phrynella* ke dalam marga *Kaloula*, karena kepemilikan gigi *vomarine* pada *Phrynella* merupakan karakter yang sama dengan *Kaloula*. Marga *Kaloula* sendiri sudah valid sebelumnya dengan tipe jenisnya *Kaloula pulchra* Gray, 1831. Pensinoniman *Phrynella pulchra* ke dalam marga *Kaloula* mengakibatkan penggunaan *pulchra* sebagai nama jenis akan terjadi duplikasi yang tidak bisa dibenarkan menurut kaidah penamaan dalam taksonomi pada saat itu, dan yang sekarang masih berlaku pada saat ini (ICZN 1985). Oleh karena itu, Smith (1926) mengusulkan nama baru untuk *P. pulchra*, yakni *K. boulengeri*. Penamaan *K. boulengeri* ini untuk menghormati G. A. Boulenger yang telah menemukan jenis ini sebelumnya. Konsekuensi dari pensinoniman marga *Phrynella* ke dalam marga *Kaloula* mengakibatkan jenis *P. pollicaris* menjadi *K. pollicaris* (Smith, 1926).

Selanjutnya Smith (1930) merevisi kembali dengan mengembalikan *K. boulengeri* menjadi *P. pulchra* sebagai marga dan jenis



Gambar 1. *Phrynella pulchra* dari Aceh (MZB Amph 25933).

yang valid. Revisi terhadap jenis *Phrynella pollicaris* selanjutnya dilakukan oleh Parker (1934), dengan mengusulkan ke dalam marga baru yakni marga *Metaphrynella*. Satu abad berikutnya, evaluasi global amfibi secara molekuler dilakukan oleh Frost *et al.* (2006), namun studi ini belum memasukan marga *Phrynella*. Hal yang sama juga dilakukan oleh Meijden *et al.* (2007) yang belum memasukkan marga *Phrynella* ke dalam pohon filogenetiknya. Hal ini mengakibatkan tertundanya evaluasi secara molekuler status penempatan marga *Phrynella* ke dalam suku Microhylidae.

Evaluasi secara molekuler terhadap marga *Phrynella* baru dilakukan oleh Matsui *et al.* (2011) yang membuktikan bahwa marga *Phrynella* adalah marga yang valid dan merupakan bagian dari suku Microhylidae. Marga ini berkerabat dekat dengan marga *Metaphrynella*. Pendapat ini didukung oleh de Sa *et al.* (2012) yang membuktikan bahwa hubungan kekerabatan antara *Phrynella* dengan *Metaphrynella* membentuk percabangan pohon monofiletik. Namun demikian, kedua studi di atas baru menggunakan populasi *P. pulchra* dari Semenanjung Malaysia saja dan belum mewakili beberapa populasi dari wilayah distribusi jenis ini.

Catatan tentang spesimen *P. pulchra* dari luar Semenanjung Malaysia telah ada baik di NHM (Natural History Museum, London), maupun MZB (Museum Zoologicum Bogoriense, Bogor). Pada tahun 2015, kami telah melakukan survei intensif di wilayah Sumatra dan berhasil mendokumentasikan kembali *P. pulchra* dari Sumatra. Penemuan ini merupakan catatan kembali setelah publikasi-publikasi

lama sebelumnya. Namun demikian, catatan spesimen di publikasi-publikasi sebelumnya belum bisa menggambarkan evaluasi taksonomi populasi *P. pulchra* yang berasal dari Sumatra. Beberapa evaluasi taksonomi secara molekuler terhadap jenis-jenis katak di Asia Tenggara telah membuktikan beberapa populasi *allopatric* memiliki jarak genetik yang besar dan terbukti menjadi beberapa jenis baru, seperti pada *Lepidobrachium nigrops* (Hamidy *et al.* 2012) dan *Polypedates otitophus* (Matsui *et al.* 2013). Berdasarkan hal tersebut, tujuan penelitian kami adalah mengevaluasi status taksonomi dan hubungan kekerabatan secara molekuler dua populasi *P. pulchra* dari Sumatra dan Semenanjung Malaysia.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan dari spesimen yang dikoleksi dari tiga lokasi di Sumatra yakni propinsi Aceh, Sumatra Utara (Sumut), dan

Bengkulu. Semua spesimen disimpan di Museum Zoologicum Bogoriense (MZB), Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Jumlah total sampel yang dianalisis adalah 11 sekuen data, yang terdiri dari kelompok ingroup berjumlah 6 sekuen data (4 dari spesimen MZB dan 2 dari sekuen GenBank) dan 5 kelompok outgroup (sekuen GenBank). Kelompok outgroup yang digunakan adalah tiga marga dalam suku Microhylidae: *Kaloula pulchra*, *Kaloula baleata*, *Metaphynella sundana*, *Metaphrynella pollicaris* dan *Micryletta inornata* (Tabel 1). Sekuen data diambil dari gen 16S rRNA di mitokondria. Keefektifan penanda 16S rRNA untuk identifikasi level jenis di dalam katak telah dibuktikan oleh Vences *et al.* (2005).

Ekstraksi DNA menggunakan jaringan otot yang diawetkan dalam ethanol 99% menggunakan metode fenol-kloroform (Hillis *et al.* 1996). Jaringan otot tersebut dihomogenkan

Tabel 1. Daftar sampel *Phrynella pulchra* dan kelompok *outgroup* beserta informasi voucher, lokasi, nomer akses GenBank dan sumber.

| No | Jenis | Voucher | Lokasi | No. GenBank | Sumber |
|----|---------------------------------|----------------|---|-------------|----------------------------------|
| 1 | <i>Phrynella pulchra</i> | MZB Amph 23903 | Sumatra Utara, Sumatra Utara, Indonesia | LC314934 | Studi ini |
| 2 | <i>Phrynella pulchra</i> | MZB Amph 25933 | Seulawah Agam, Aceh, Indonesia | LC314935 | Studi ini |
| 3 | <i>Phrynella pulchra</i> | MZB Amph 25936 | Seulawah Agam, Aceh, Indonesia | LC314936 | Studi ini |
| 4 | <i>Phrynella pulchra</i> | UTA A64941 | Kepahiang, Bengkulu, Indonesia | LC314933 | Studi ini |
| 5 | <i>Phrynella pulchra</i> | UKMHC 820 | Hulu Trengganu, Trengganu, Malaysia | AB634694 | Matsui <i>et al.</i> (2011) |
| 6 | <i>Phrynella pulchra</i> | UKMHC 820 | Genting, Selangor, Malaysia | AB611976 | Kurabayashi <i>et al.</i> (2011) |
| 7 | <i>Kaloula pulchra</i> | MF 0812 | Sumatra, Indonesia | KC822624 | Blackburn <i>et al.</i> (2013) |
| 8 | <i>Kaloula baleata</i> | KUHE 32313 | Sumba, Indonesia | AB634687 | Matsui <i>et al.</i> (2011) |
| 9 | <i>Metaphrynella pollicaris</i> | KUZ 21655 | Fraser's Hill, Pahang, Malaysia | AB634692 | Matsui <i>et al.</i> (2011) |
| 10 | <i>Metaphrynella sundana</i> | BORN 8191 | Crocker, Sabah, Malaysia | AB634693 | Matsui <i>et al.</i> (2011) |
| 11 | <i>Micryletta inornata</i> | KUHE 23858 | Ranong, Thailand | AB634695 | Matsui <i>et al.</i> (2011) |

dengan *buffer* STE 0,6 ml (100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl dan 1mM EDTA pH 8,0), selanjutnya ditambahkan Proteinase K (0,1 mg/ml) dan diinkubasi pada suhu 56⁰C sampai homogen. Larutan ditambahkan dengan fenol dan CIAA (perbandingan 24:1) dan diendapkan dengan 1 ml etanol 70%. Endapan DNA divakum dan disimpan dalam 0,6 ml TE (10mM Trish-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). Proses selanjutnya adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang 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 (Hamidy *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' (Hedge 1994) 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 yang didapat 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). Rekonstruksi pohon filogeni menggunakan analisis *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means* (UPGMA), *Neighbour Joining* (NJ), *Maxi-*

mum 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 transversi-transisi dan *gaps pairwise deletion*. Model evolusi DNA untuk ML dan BI menggunakan T92+G (*Tamura 3-parameter plus gamma*) yang merupakan model terbaik pada software Kakusan 3 (Tanabe 2007) berdasarkan AIC (*Akaike Information Cruterion*). Analisis ML dengan 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). Nilai bootstrap pada cabang pohon yang diyakini valid adalah 70% atau lebih untuk analisis NJ, UPGMA dan ML (Huelsenbeck & Hillis 1993) dan 95% atau lebih untuk analisis BI (Leache & Reeder 2002).

Kami menghitung jarak genetik menggunakan model *uncorrected p-distance* yang dianalisis di MEGA 5 (Tamura 2011). Acuan jarak genetik yang digunakan sebagai pembeda jenis adalah 3% (Fouquet *et al.* 2007). Kevalidan penggunaan jarak genetik dari sekuen data gen 16S rRNA untuk memisahkan level jenis telah dibuktikan dibe-

berapa penelitian jenis jenis katak di Asia Tenggara (Hamidy *et al.* 2011, Hamidy *et al.* 2012, Hamidy & Kurniati 2015)

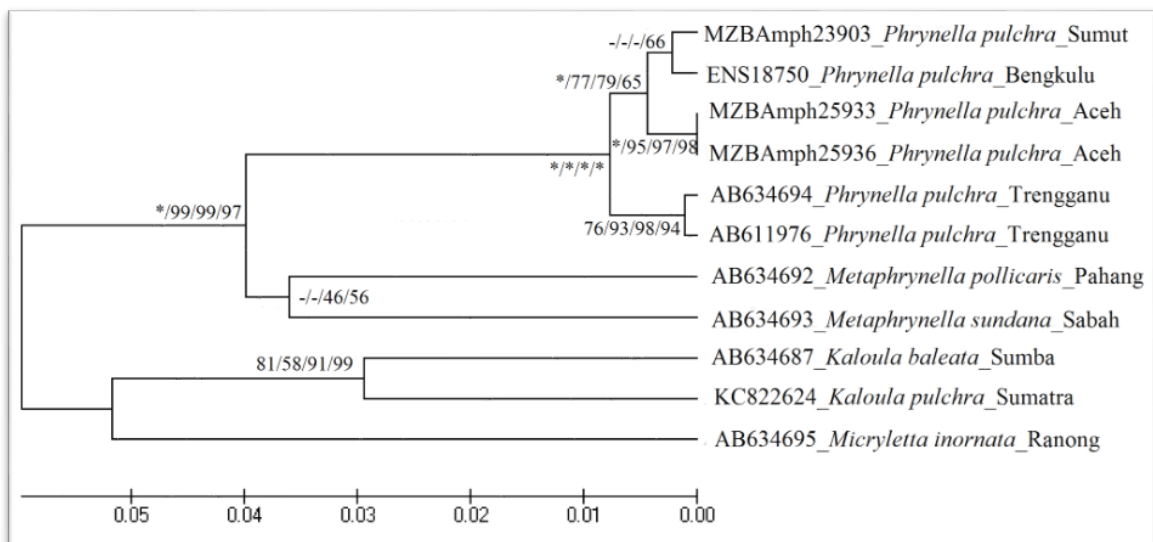
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan Filogenetik *Phrynella pulchra*

Dari total sekuen data 464 pasang basa yang terdiri 362 *invariable sites*, 101 *variable sites* dan 59 situs *parsimony informative*. Rekonstruksi pohon filogeneni yang terbentuk dari keempat analisis yaitu *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means* (UPGMA), *Neighbour Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML) dan *Bayesian Inference* (BI) menunjukkan topologi yang sama. Pohon filogeni menampilkan grup *P. pulchra* berada pada posisi monofiletik. Tampilan UPGMA menggunakan indeks *p-distance* yaitu melihat jauh-dekatnya jarak genetik antar satuan unit dalam satu pohon (Gambar 2).

Pada Gambar 2, marga *P. pulchra* berada pada posisi monofiletik dengan nilai bootstrap (BPP = 100, MLBS = 100%, NJBS = 100% dan UPGMABS = 100%) terhadap kelompok *outgroup* (*Metaphrynella*, *Kaloula*, dan *Micryletta*). Hasil yang sama juga telah ditunjukkan oleh penelitian sebelumnya dari Kurabayashi *et al.* (2011) dan Matsui *et al.* (2011) yang menjelaskan dalam pohon filogeninya bahwa *P. pulchra* merupakan monofiletik yang jelas kevalidan marga *Phrynella* di dalam suku Microhylidae. Kelompok monofiletik *P. pulchra* terdiri dari 2 kelompok besar yaitu Kelompok Sumatra dan Kelompok Semenanjung Malaysia.

Phrynella pulchra yang berasal dari Sumatra memiliki nilai bootstrap (BPP = 100, MLBS = 77%, NJBS = 79% dan UPGMABS = 65%). Kelompok Sumatra terbagi menjadi dua kelompok, yakni Sumatra Utara (Sumut) dan Bengkulu dengan nilai bootstrap



Gambar 2. Filogenetik UPGMA dari 16S rRNA untuk sampel *Phrynella pulchra*. Angka pada cabang merepresentasikan nilai pendukung percabangan untuk analisis *Neighbour Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML), *Bayesian Inference Analisis* (BI) dan *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means* (UPGMA). (BPP/MLBS/NJBS/UPGMABS).

(UPGMABS = 66%), dan kelompok Aceh dengan nilai bootstrap (BPP = 100, MLBS = 95%, NJBS = 97% dan UPGMABS = 96%). Sedangkan kelompok Semenanjung Malaysia memiliki bootstrap (BPP = 76, MLBS = 93%, NJBS = 98% dan UPGMABS = 94%). Dua populasi yang *allopatric* (Semenanjung Malaysia dan Sumatra) secara molekuler terbukti membentuk kelompok filogenetik. Secara molekuler, sister takson dari marga *Phrynella* adalah *Metaphrynella*, hal ini selaras dengan studi morfologi yang dilakukan oleh Boulenger (1890) ketika mendeskripsikan *M. pollicaris*.

Jarak Genetik Populasi *Phrynella pulchra* dan status taksonominya

Di dalam populasi Sumatra Utara-Bengkulu memiliki jarak genetik 0,4%, sedangkan kelompok Aceh 0 %, dan Semenanjung Malaysia 0,2% (Tabel 2). Jarak genetik antara dua populasi Sumatra (Sumut-Bengkulu vs Aceh) berkisar 0,7–1,1%. Jarak genetik populasi Semenanjung Malaysia dengan populasi Aceh 1,7–2,0%, dan Semenanjung Malaysia vs Sumut-Bengkulu 1,1–1,3%. Nilai jarak genetik ditunjukkan sebagaimana tabel di

bawah ini.

Berdasarkan analisis Fouquet *et al.* (2007), jarak genetik minimum yang digunakan sebagai pembeda jenis adalah 3% menggunakan model *p-distance substitution*. Dengan demikian, kelompok Sumatra (Aceh, Sumatra Utara dan Bengkulu) dengan kelompok Semenanjung Malaysia masih dapat digolongkan dalam jenis yang sama (*conspecific species*). Data ini dapat melengkapi hasil penelitian yang dilakukan Matsui *et al.* (2011) dan de Sa *et al.* (2012) yang belum memasukkan data *P. pulchra* yang berasal dari Sumatra ke dalam evaluasi marga *Phrynella*.

Perkiraan pemisahan antar jenis amfibi di wilayah Sundaland (Semenanjung Malaysia, Borneo, Sumatra, Java) berlangsung sejak pada zaman Pleistocene (<1.6 juta tahun yang lalu) sebagaimana dipostulatkan oleh Inger & Voris (2001). Namun demikian, Matsui *et al.* (2010) membuktikan bahwa pada zaman Pleistocene justru hanya terjadi pemisahan pada level populasi, sebagaimana dibuktikan dengan populasi *Leptobrachium hendricksoni* di Semenanjung Malaysia dan Sumatra. Sejalan dengan penelitian Matsui

Tabel 2. Nilai jarak genetik (*uncorrected p-distance*(%)) *Phrynella*, *Kaloula*, *Metaphrynella*, dan *Micryletta inornata* berdasarkan sekuen data dari gen 16S rRNA.

| Jenis | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 1 <i>Phrynella pulchra</i> (Sumatra Utara-Bengkulu) | 0.4 | | | | |
| 2 <i>Phrynella pulchra</i> (Aceh) | 0.7–1.1 | 0 | | | |
| 3 <i>Phrynella pulchra</i> (Trengganu) | 1.1–1.3 | 1.7–2.0 | 0.2 | | |
| 4 <i>Metaphrynella</i> spp | 7.2–8.5 | 7.9–8.8 | 7.0–8.5 | 7.2 | |
| 5 <i>Kaloula</i> spp | 11.1–12.0 | 11.4–12.3 | 10.7–11.8 | 9.6–11.8 | 5.9 |
| 6 <i>Micryletta inornata</i> | 13.1 | 13.3 | 12.7–12.9 | 12.7–14.0 | 9.6–11.1 |

et al. (2010), maka kami berkesimpulan bahwa isolasi reproduksi *P. pulchra* populasi Sumatera dan Semenanjung Malaysia belum berlangsung lama sehingga kedua populasi tersebut masih tergolong ke dalam jenis yang sama.

KESIMPULAN

Phrynella pulchra merupakan kelompok yang monofiletik. Berdasarkan jarak genetik status taksonomi populasi Sumatera dan Semenanjung Malaysia masih bersifat *conspesific species* (satu jenis yang sama).

UCAPAN TERIMA KASIH

FA mengucapkan terima kasih kepada Misbahul Munir, Tengku Gilang Pradana, Farits Alhadi, Wahyu Trilaksono, Syarifudin atas bantuan tutorialnya dalam kerja laboratorium. AH mengucapkan terimakasih kepada DIPA Puslit Biologi LIPI 2016 melalui proyek Barcoding Fauna Indonesia. Kami mengucapkan terima kasih kepada dua mitra bestari yang telah memberikan masukan terhadap naskah.

DAFTAR PUSTAKA

Blackburn, D. C., Siler, C. D., Diesmos, A. C., McGuire, J. A., Cannatella, D. C. & Brown, R. M. (2013). An adaptive radiation of frogs in a Southeast Asian island archipelago. *Evolution*, 67, 2631–2646.

Boulenger, G. A. (1887). On new batrachians from Malacca. *Annual Magazine National History*, 5, 345–348.

Boulenger, G. A. (1890). List of the reptiles,

batrachians, and freshwater fishes collected by Professor Moesch and Mr. Iversen in the district of Deli, Sumatra. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1890, 30–39.

de Sá, R. O., Streicher, J. W., Sekonyela, R., Forlani, M. C., Loader, S. P., Greenbaum, E., Richards, S. J., & Haddad, C. F. B. (2012). Molecular phylogeny of microhylid frogs (Anura: Microhylidae) with emphasis on relationships among New World genera. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 241, 1–21.

Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F. B., de Sá, R. O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S. C., Raxworthy, C. J., Campbell, J. A., Blotto, B. L., Moler, P. E., Drewes, R. C., Nussbaum, R. A., Lynch, J. D., Green, D. M. & Wheeler W. C. (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the AMNH*, 297, 1–370.

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. [Diakses 27 November 2016].

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.
- Gunther, A. (1887) Notes on Batrachians from Perak. *Annual Magazine National History*, 6, 312–316.
- Hamidy, A., Matsui, M., Nishikawa, K., Belabut, D. 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., Kusri, M.D. & Kurniati, H. (2011). Morphological and genetic discordance in two species of Bornean *Leptobrachium* (Amphibia, Anura, Megophryidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 904–913.
- Hawkins, T. L., O'Connor-Morin, T., Roy, A. & Santillan, C. (1994) DNA purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic acids Res*, 22, 4543–4544.
- 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. In: Hillis, D.M., Mable, B.K., Moritz, C. (Eds.), *Molecular Systematics, second ed. Sinauer, Sunderland*, pp. 321–406.
- Huelsenbeck, J. P. & Hillis, D. M. (1993). Success of phylogenetic method in the four taxon case. *Systematics Biology*, 42, 247–264.
- ICZN (1985). *International Code of Zoological Nomenclature, adopted by the XV International Congress of Zoology*. International Trust for Zoological Nomenclature, London. 338 pp.
- Inger, R. F. & Voris, H. (2001). The biogeographical relations of the frogs and snakes of Sundaland. *Journal of Biogeography* 28, 863–891.
- Kurabayashi, A., Matsui, M., Bellabut, D. 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.
- 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., Hamidy, A., Kuraiishi, N. (2014). A new Species of *Polypedates* from Sumatra, Indonesia (Amphibia: Anura). *Species Diversity*, 19, 1–7.
- Matsui, M., Hamidy, A., Murphy, R. M., Khonsue, W., Yambun, P., Shimada, T., Ahmad, N. Belabut, D. M., Jiang, J.P. (2010). Phylogenetic relationships of megophryid frogs of the genus *Leptobrachium* (Amphibia, Anura) as revealed by mtDNA gene sequences.

- Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 259–272.
- 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.
- Parker, H. W. (1934). *A monograph of a frogs of the family microhylidae*. London (GB): Printed by order of the British Museum.
- Smith, M. A. (1926). Spolia Mentawia: Reptiles and amphibians. *Annual Magazine National History*, 9, 76–81.
- Smith, M. A. (1930). *The Reptilia and Amphibia of the Malay Peninsula*. A supplement to GA. Boulenger's Reptilia and Batrachia, 1912. *Bulletin of the Raffles Museum. Singapore* 3: xviii + 149.
- 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.
- The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. Diambil dari [www.iucnredlist.org] tanggal 26 December 2017.
- Vences, M., Thomas, M., Meijden, A., Chiari, Y. & Vietes, D.R. (2004). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(5), 1–12.
- van der Meijden, A., Vences, M., Hoegg, S., Boistel, R., Channing, A. & Meyer, A. (2007). Nuclear gene phylogeny of narrow-mouthed toads (Family Microhylidae) and a discussion of competing hypotheses concerning their biogeographical origins. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 44, 1017–1030.