

Filogeni Molekuler Katak Sawah (*Fejervarya cancrivora*) Berdasarkan Segmen Gen Sitokrom b dan Evaluasinya Sebagai Pengenal Spesies

Molecular Phylogeny of Frog Rice Fields (*Fejervarya cancrivora*) Based on Segment of Cytochrome b Gene and It's Evaluation As a Species Identifier

Suriana*, Nasaruddin, Munir, Parakkasi

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Halu Oleo
email: suriana0568@gmail.com

Abstract: Molecular phylogeny is a buildup of kinship relationships between animal or plant taxa made base on a particular gene sequence. Currently several genes have been used to reconstruct kinship relationships in animal/plant evolutionary studies. The cytochrome b gene is one of the genes used for that purpose. This study aims to reconstruct the phylogeny of frog rice field (*F. cancrivora*), from Kendari, Southeast Sulawesi, based on the cytochrome b gene sequence, as well as to evaluate whether these gene sequence can be used as a species identifier. This research is an explorative research. Frog samples were obtained around the Wanggu River Kendari. The genome of frog was extracted by conventional extraction method. The cytochrome b gene, amplified using frog-specific primers by the Polymerase chain reaction (PCR) method. Subsequent amplification products are then characterized and used it to build a tree of frog kinship. To determine the taxonomy position of the frog from Kendari, another sequence of cytochrome b frog genes is available in GenBank. *Salamandra salamandra* used as an out group. To evaluate ability of the cytochrome b gene as a species identifier, these gene alignment with another group of Vertebrata cytochrome b gene, which was available in GenBank. The results showed that the cytochrome b gene of the frog from Kendari Southeast Sulawesi, along 266 base pairs had a genetic distance with other frogs 0.01 up to 0.18. Phylogeny based on the gene segment showed that the frog from Kendari lie in same clade with *F.cf.cancrivora* with bootstrapped value 90%. The phylogeny is monophyletic. The cytochrome b gene indicates that the gene can be used as a species identifier.

Keywords: *Fajervarya cancrivora*, molekular phylogeny, cytochrome b gene as species identifier.

1. Pendahuluan

Fajervarya cancrivora dikenal dengan nama katak sawah. Pada beberapa literatur katak sawah disebut sebagai katak air asin/payau dan pemakan kepiting, oleh karena keberadaan dan ada bukti bahwa katak tersebut ada yang pemakan kepiting. Oleh karea itu nama *cancrivora* berasal dari hal tersebut. *Fajervarya cancrivora* sebelumnya termasuk genus *Rana*, tetapi berdasarkan rekarakterisasi berubah menjadi genus *Fejervarya* Iskandar, 1998; Dubois and Ohler, 2000). *Fajervarya cancrivora* merupakan katak dengan daerah penyebaran luas. Hidup pada ketinggian 0-1500 mdpl dan tersebar di beberapa negara Asia sedangkan di Indonesia tersebar di pulau Sumatera, Jawa, Bali, Kalimantan dan Sulawesi (Iskandar 1998).

F.cancrivora dan kebanyakan Ranidae masih merupakan kompleks spesies; kajian status taksonomi katak (Ranidae) masih terus dikembangkan baik menggunakan data morfologi maupun data molekuler (Tanako-Ueno, 1998; Sumida *et al.*2007; Kurniawan *et. al.*, 2010). Penanda molekuler yang sering digunakan dalam studi filogenetik yaitu gen-gen yang terdapat di inti maupun mitokondria. Gen *Cytochrhome b* (*cyt b*) yang terdapat pada genom mitokondria sel eukaryot merupakan salah satu gen yang sering dipergunakan untuk tujuan tersebut. Sejauh ini penelitian mengenai genetik termasuk posisi taksonomi katak asal Sulawesi masih terbatas (Kurniawan *et al.*, 2011.) terutama katak yang berasal dari Sulawesi Tenggara (Suriana dan Nasaruddin 2010). Bahkan Kurniawan *et.al.*, 2011 menjelaskan bahwa berdasarkan morfologi dan eksperimen *F.cancrivora* asal Sulawesi masih belum terdeskripsi, meskipun hal ini masih merupakan peneltian awal. Oleh karena itu maka data molekuler *cyt b* sebagai pengenal spesies dalam penelitian ini merupakan data awal dan pertama bagi *F.cancrivora asal* Sulawesi Tenggara diharapkan dapat menjadi data pembanding untuk kajian serupa. Selain untuk kajian hubungan kekerabatan fragmen pendek gen sitokrom b pada beberapa hewan telah dipergunakan untuk pengenal/identifikasi spesies pada produk makanan/daging (Ahmed & El-

mezawy 2005; Silva-neto, 2016) sehingga diharapkan hal serupa dapat diberlakukan bagi katak dan amfibi pada umumnya.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif. Sampel katak diperoleh di aliran sungai Wanggu Kota Kendari. Prosedur Isolasi DNA sampel mengikuti prosedur Suriana dan Nasaruddin (2012). Otot paha katak ditimbang 1 gram, kemudian digerus dan ditambahkan *buffer lysis* sebanyak 700 μ L. Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 2 jam dan dibolak-balikkan tabung setiap 30 menit. Selanjutnya ditambah dengan kloroform sebanyak 500 μ L, kemudian disentrifugase pada kecepatan 14.500 rpm selama 12 menit lalu supernatan dipindahkan ke *ependorf* baru. Supernatan yang telah diambil kemudian ditambahkan 0,08 volume 7,5 M amonium asetat (NH₄Ac) dan 0,54 volume isopropanol kemudian dihomogenkan dengan membolak-balikkan tabung. Selanjutnya sampel diinkubasi ke dalam *freezer* selama 40 menit. Setelah itu, sampel disentrifuge pada kecepatan 14.500 rpm selama 3 menit, lalu supernatan dibuang hingga hanya tersisa pellet. Pellet kemudian ditambahkan dengan alkohol 70% sebanyak 500 μ L dan sampel disentrifuge kembali dengan kecepatan 14.500 rpm selama 3 menit. Alkohol 70% tersebut dibuang dan pelet dikering-anginkan lalu diresuspensi dengan TE sebanyak 35 μ L dan diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 37^\circ\text{C}$).

Elektroforesis digunakan untuk memigrasikan DNA, dan memvisualisasikan pita DNA berdasarkan berat molekulnya. *Gel agarose* 1% yang telah diberi Etidium bromida sebanyak 2.5 μ L dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi TBE 1X. Selanjutnya diambil 3 μ L sampel dan dicampur dengan 1 μ L *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur *agarose*. Elektroforesis dijalankan hingga 30 menit. Setelah selesai, *gel* divisualisasi dengan menggunakan *photoforesis*. Sampel hasil isolasi yang bagus selanjutnya akan di PCR untuk mengamplifikasi gen *cyt b*.

Segmen gen *cyt b* diamplifikasi dengan teknik PCR. Digunakan primer khusus kakat dengan sekuen: Primer Forwad : 5'-GTCCTACCGTTAGCTATT-3' Primer reverse : 5'-CAGACAACCTTACACCAA-3' Campuran reaksi PCR sebanyak 10 μ L terdiri atas *master mix* sebanyak 5 μ L, masing-masing primer sebanyak 0,5 μ L, DNA cetakan sebanyak 1 μ L dan *aquabidest* sebanyak 3 μ L. Mesin PCR diset dengan *Pre Denaturation* selama 3 menit pada suhu 95°C, diikuti 35 siklus dari *Denaturation* selama 1 menit, pada suhu 95°C, *Annealing* selama 30 detik pada suhu 53°C dan *Extension* 1 menit 30 detik, pada suhu 72°C serta diikuti dengan *Post Extension* selama 8 menit, pada suhu 72°C. Hasil amplifikasi divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis (Prosedur elektroforesis serta alat dan bahan yang dipergunakan sama dengan prosedur elektroforesis hasil purifikasi DNA Total). Pita DNA yang baik akan diperbanyak hingga 50 μ L dan dikirim ke perusahaan jasa sekuensing.

Hasil sekuensing diblast (akses langsung dengan <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. untuk meyakinkan bahwa hasil sekuensing adalah DNA target, yaitu gen *cyt b*. Karakterisasi gen *cyt b* dilakukan dengan menggunakan *software Bioedit* dan *MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 7.0*. Sekuen perbandingan dan spesies *out group*nya diperoleh dari data *GenBank* yang diakses melalui website <http://nucleotida.ncbi.nlm.nih.gov>. Hasil analisis sekuen dipergunakan untuk merekonstruksi filogenetik dengan metode *Neighbor-Joining (NJ)* model Kimura 2-parameter, bootstrapped 1000X. Proses ini dilakukan dengan menggunakan *software* MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

3. Hasil Penelitian

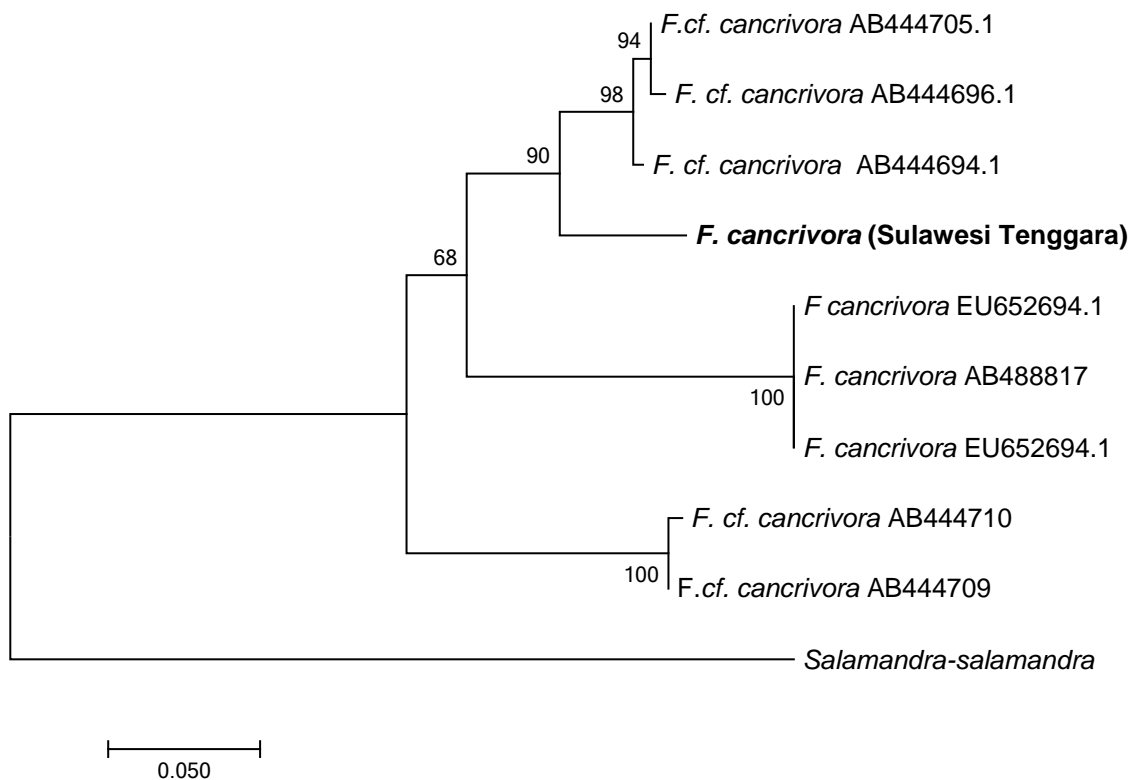
Hasil peruntukan gen sitokrom katak sawah asal Kendari Sultra dianalisis menggunakan *software* MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Data sekuen terdiri atas 226 pasang basa (pb), disejajarkan dengan data set gen sitokrom b katak yang tersedia pada *GenBank*, yaitu: 8 spesies *F. cancrivora* dengan no akses pada *GenBank* adalah AB444705.1, AB444696.1, AB444694.1, EU652694.1, AB488817, EU652694.1, AB444710, AB444709. Hasil perbandingan menunjukkan ada 172/266 Situs yang bersifat kekal dan 54/266 situs berbeda. Diantara situs yang berbeda, terdapat 52/266 situs parsimoni informatif dan 2 situs singelstone (Tabel 1).

Spesies	Situs 2a
	1 1111111111 1111111111 1111111111 2222
	122344 5566778899 0112233445 6677889900 1112
	1369213625 1369473623 5470346925 6649036931 2430023824 0493
<i>F. cancrivora</i> (eu652694.1)	GCCGrraCCG rAcAGCrACG CCGCrAGrGC CrrGrCGrra ACrrraACrCa AArr
<i>F. cancrivora</i> (ab488817)
<i>F. cf. cancrivora</i> (ab444710)	A.GrCCGAGr C..GC.CGrra ...Cr.CCGr ACCaCra.CC GrC.CC.CcC r..C
<i>F. cf. cancrivora</i> (ab444709)	A.GrCCGAGr C..GC.CGrra ...Cr.CCGr ACCaCra.CC GrC.CC.CcC r..C
<i>F. cancrivora</i> (eu652694.1)
<i>F. cf. cancrivora</i> (ab444705.1)	AGr.CaGr. .Ga.CrC..A rrrC.rC.Az .G.A.rAc... Gr.G....C ..CC
<i>F. cf. cancrivora</i> (ab444696.1)	AGr.CaGr. .Ga.CrC..A rrrC.rC.Az .G.A.rAc... Gr.G....C ..CC
<i>F. cf. cancrivora</i> (ab444694.1)	AGr.CaGr. .Ga.CrC..A rrrC.rC.Az .G.A.rAc... Gr.G....C ..CC
<i>F. cancrivora</i> (Sulawa)	A.G..GGrrG .Ga..r...C rrrrrrC.Az .GCa.rAc.C r.GC.rC.C ..CA

keterangan: tanda panah menunjukkan arah pembacaan situs/posisi nukleotida. tanda titik menunjukkan nukleotida yang identik.

Tabel 1 menunjukkan bahwa *F. cancrivora* (EU652694.1), *F. cancrivora* (AB488817), dan *F. cancrivora* (EU652694.1), memiliki situs yang sama, tetapi berbeda dengan *F. cancrivora* lainnya. *F. cancrivora* (EU652694.1) memiliki nukleotida singlestone, pada situs ke 42, yaitu C (sitosin) sedangkan pada haplotip lain berupa G (guanin) atau T(Timin). Situs singlestone juga dimiliki oleh *F. cancrivora* asal Kendari Sulawesi Tenggara pada basa ke 222, berupa A, sedangkan C atau T pada *F. cancrivora* lainnya. Hal tersebut menunjukkan adanya substitusi non sinonim pada situs tersebut.

Rekonstruksi pilogeni dilakukan dengan menggunakan *Neighbor Joining*, model jarak Kimura 2-parameter. *Salamandra-salamandra* sebagai out group, sebab spesies tersebut merupakan anggota salah satu ordo Amphibia (Gambar 1).



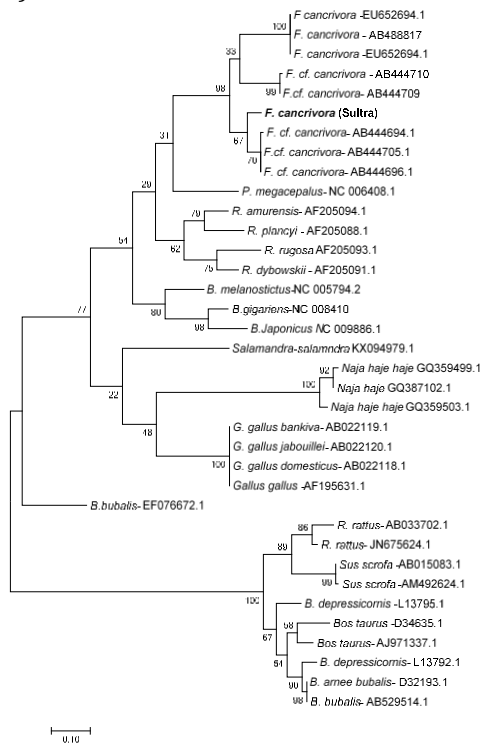
Gambar 1. Filogeni katak sawah berdasarkan segmen gen sitokrom b sepanjang 266 pasang basa., model Kimura 2-parameter. Angka di atas klade menunjukkan nilai bootstrapped 1000x.

Tabel 2. Jarak Genetik antar *F.cancrivora* berdasarkan segmen gen sitokrom b.

<i>F_cancrivora</i> _EU652694.1		0.00	0.04	0.04	0.00	0.03	0.03	0.03	0.03
<i>F_cancrivora</i> _AB488817	0.00		0.04	0.04	0.00	0.03	0.03	0.03	0.03
<i>F.cf.cancrivora</i> AB444710	0.22	0.22		0.00	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03
<i>F.cf_cancrivora</i> _AB444709	0.21	0.21	0.00		0.04	0.03	0.03	0.03	0.03
<i>F_cancrivora</i> _EU652694.1	0.00	0.00	0.22	0.21		0.03	0.03	0.03	0.03
<i>F.cf_cancrivora</i> _AB444705.1	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17		0.01	0.00	0.02
<i>F_cf_cancrivora</i> _AB444694.1	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.01		0.01	0.02
<i>F.cf_cancrivora</i> AB444696.1	0.17	0.17	0.18	0.17	0.17	0.00	0.01		0.02
<i>F_cancrivora</i> _(Sultra)	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.07	0.07	0.08	

Keterangan: angka di atas diagonal menunjukkan standar error.

Untuk mengevaluasi apakah fragmen gen sitokrom b dapat dipergunakan sebagai pengenalan spesies, maka gen tersebut disejajarkan dengan gen sitokrom b hewan vertebrata yang tersedia pada *GenBank*. Kemudian dipergunakan untuk merekonstruksi pohon filogeni (Gambar 2).



Gambar 2. Filogeni katak sawah dan beberapa wakil Vertebrata bedasarkan segmen gen sitokrom b sepanjang 266 pb, model Kimura 2-parameter. Angka di atas klade menunjukkan nilai bootstrapped 1000x.

Gambar 2 menunjukkan bahwa katak yang terdiri dari 4 genus (*Fejervarya*, *Polypedates*, *Rana*, dan *Bufo*) mengelompok klade Amphibia, diikuti kelompok Reptil yang terdiri atas 1 genus, kemudian Aves pada klade berikutnya, dan terakhir Mamalia (3 genus). Nyata bahwa filogeni tersebut bersifat monofiletik.

4. Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa segmen gen sitokrom b yang telah dikarakterisasi mampu membedakan inter dan antar populasi. Hal ini tercermin dari pengelompokan masing-masing spesies dan atau haplotip pada klade yang berbeda (Gambar 1 dan 2). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil yang diperoleh Kurniawan *et al.*, (2010), Sumida

et al., 2007 pada *F. limnocaris*. Bahkan antar haplotip *F. cancrivora*, teramati adanya substitusi basa G -A/ G-A, C-T/T-C, C-G-T, T-C-A. Substitusi tersebut umumnya bersifat sinonim (Tabel 1).

Jarak genetik antar *F. cancrivora* berkisar 0.01 sampai 0.18, menunjukkan adanya hubungan kekerabatan yang sangat dekat, tetapi masih dapat dibedakan antar satu haplotip dengan haplotip lainnya. Jarak genetik yang ditemukan pada katak sawah berkisar antara 0.36 sampai 16.38 (Kurniawan *et al.*, 20...), 0.104 sampai 0.12 (Sumida *et al.* 1998). Jarak genetik yang ditemukan oleh dengan menggunakan data gen 16S berkisar 0.2 (Vences *et al.* 2004), dan jarak genetik Nei 0.3 (Sasa *et al.* 1998) untuk hibrid inviabilitas. Variasi yang ditemukan pada jarak tersebut disebabkan metode jarak yang dipergunakan berbeda. Meskipun demikian adanya jarak tersebut menunjukkan adanya perubahan basa yang terjadi pada sekuen gen yang dipergunakan.

5. Kesimpulan

Filogeni molekul katak sawah asal Kendari Sultra yang direkonstruksi menggunakan segmen gen sitokrom b, menempatkan katak sawah asal Kendari pada klade yang sama dengan katak sawah lain (no akses GenBank : AB444705, AB444696.1 dan AB444694.1) dengan nilai bootstrapped 90%. Filogeni tersebut robust ditandai dengan posisi out group berada pada klade paling luar. Jarak genetik antara katak sawah yang dibandingkan berkisar 0.01 sampai 0.18. Segmen gen sitokrom b yang diamplifikasi pada penelitian ini dapat dipergunakan sebagai pengenalan spesies.

Referensi

- Ahmed M & El-mezawy. (2005). Detection of spesific genetic markers in farm animal by RFLP analysis of cytochrome b gene. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21 (3-4): 1-11.
- Dubois, A., Ohler, A. (2000). Systematics of *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) (Amphibia, Anura, Ranidae) and related species. 1. Nomenclatural status and type-specimens of the nominal species *Rana limnocharis* Gravenhorst, 1829. *Alytes* 18: 15-50.
- Farias, I.P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H., & Meyer, A. (2001). The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing. *Journal of Molecular Evolution*, 53, 89-103.
- Iskandar, D.T. (1998) *The Amphibian of Java and Bali*. LIPI, Indonesia
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets diakses dari <http://mbe.oxfordjournals.org/> at Temple University on June 22, 2016
- Kurniawan N, Djong TH., Islam MM., Nishizawa T., Belabu DM., Sen YH., Wanichanon R., Yasir I., Sumida M. (2011) Taxonomic Status of Three Types of *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and Other Asian Countries Based on Morphological Observations and Crossing Experiments. *Zoological Science*, 28, 12-24.
- Kurniawan, N., Islam, M.M., Djong, T.H., Igawa, T., Belabut, D.M., Yong, H.S., Wanichanon, R., Khan, M.R., Iskandar, D.T. (2010) Genetic divergence and evolutionary relationship in *Fejervarya cancrivora* from Indonesia and other Asian countries inferred from allozyme and mtDNA sequence analyses. *Zoological Science*, 27, 222-233.
- Sasa MM, Chippindale PT, Johnson, N.A., (1998). Pattern of postzygotic isolation in frogs. *Evolution*, 53, 1811-1820.
- Silva-Neto, A.A., Ferreira, P.B., Torres, R.A., Texeira, R.H.F., Duarte, J.M.B., Barbosa, A.C., Vargas, R.C., & Garcia, J.E. (2016). Diagnostic Cytochrome *b* gene profiles for the identification of

paca (*Cuniculus paca*) bushmeat: implications for the monitoring of illegal hunting and wildlife trade. *Brazil Journal Biology*, 76 (1), 55-58.

- Sumida, M., Manabu, K., Islam, M. M., Hon, D.C., Takeshi, I., Yasuyuki, K.,; Masafumi, M., Silva, D.A., Wichase, K.M., Midori, N. (2007). Evolutionary Relationships and Reproductive Isolating Mechanisms in the Rice Frog (*Fejervarya limnocharis*) Species Complex from Sri Lanka, Thailand, Taiwan and Japan, Inferred from mtDNA Gene Sequences, Allozymes, and Crossing Experiments. *Zoological Science*, 24(6), 547-562.
- Sumida, M., Ogata, M., Kaneda, H., Yonekawa, H. (1998). Evolutionary relationship among Japanese pond frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of cytochrome *b* and 12S ribosomal RNA genes. *Genes Genetics Systematics*, 73, 121-133.
- Tanaka-Ueno, T., Matsui, M., Chen, SL., Takenaka, O., Ota, H. (1998). Phylogenetic Relationships of Brown frog from Taiwan an Japan assessed by mitochondrial cytochrome *b* gene sequences (*Rana*: Ranidae). *Biological Science*, 15, 283-288.
- Vences M, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR (2005) Deciphering amphibian diversity through DNA bar-coding: chances and challenges. *Phil Trans R Soc London B*, 360, 1859-1868.