

**ANALISIS KEKERABATAN KURA-KURA BATOK (*Cuora Amboinensis*)  
WILAYAH INDONESIA TIMUR (AMBON, LUWU, DAN GORONTALO)  
BERBASIS SEKUEN GEN *CYTOCHROME B***

**Candra Hermawan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan,  
Universitas 17 Agustus 1945 Banyuwangi  
email: candrahermawan87@gmail.com

**Abstrak**

Tujuan dari penelitian ini untuk melihat hubungan kekerabatan Kura-Kura Batok (*Cuora amboinensis*) wilayah Indonesia Timur (Ambon, Luwu, dan Gorontalo) berdasarkan hasil analisis konstruksi pohon filogeni, jarak genetik, dan similaritas berdasarkan variasi sekuens gen *Cytochrome b*. Penelitian ini masuk ke dalam penelitian deskriptif eksploratif yang dilakukan di dalam laboratorium. Tahapan dalam penelitian ini meliputi isolasi DNA jaringan, purifikasi DNA, *Poly Chain Reaction* (PCR), elektroforesis horizontal, sekuensing gen, dan analisis filogeni menggunakan *software MEGA 6*. Sampel dalam penelitian ini merupakan 8 spesies yang berasal dari Ambon, Gorontalo, dan Luwu. Hasil analisis filogeni menunjukkan nilai jarak genetik sebesar 0,003-0,349 dan nilai similaritas genetik sebesar 65,13%-99,70%. *Cuora amboinensis* dari daerah yang sama memiliki hubungan kekerabatan lebih tinggi dibanding dari daerah yang berbeda. Terdapat anomali pada sampel Gorontalo 10 yang berkerabat dekat dengan wilayah Ambon padahal kedua sampel tersebut terletak pada pulau yang berbeda. Kondisi ini dapat karena terjadi perdagangan lintas wilayah pada *C. amboinensis* sehingga menyebabkan variasi genetik rendah serta tingkat simialiaritas genetik tinggi pada spesies yang terletak pada pulau berbeda.

**Kata Kunci:** *Cuora amboinensis*; filogeni; neighbor joining; jarak genetik; similaritas genetik

**Abstract**

*The purpose of this study was to look at the kinship relationship between the shell turtles (Cuora amboinensis) in Eastern Indonesia (Ambon, Luwu, and Gorontalo) based on the analysis of phylogenetic tree construction, genetic distance, and similarities based on variations in the Cytochrome b gene sequence. This research is included in the exploratory descriptive research conducted in the laboratory. The stages in this study included tissue DNA isolation, DNA purification, Poly Chain Reaction (PCR), horizontal electrophoresis, gene sequencing, and phylogeny analysis using the MEGA 6 software. The samples in this study were 8 species originating from Ambon, Gorontalo and Luwu. The results of the phylogenetic analysis showed a genetic distance value of 0.003-0.349 and a genetic similarity value of 65.13%-99.70%. Cuora amboinensis from the same area has a higher kinship relationship than from a different area. There is an anomaly in the Gorontalo 10 sample which is closely related to the Ambon region even though the two samples are located on different islands. This condition could be due to cross-regional trade in C. amboinensis, causing low genetic variation and high levels of genetic similarity among species located on different islands.*

**Keywords:** *Cuora amboinensis*; phylogeny; neighbor joining; genetic distance; genetic similarity

## 1. PENDAHULUAN

Kura-kura adalah hewan berkaki empat bersisik yang termasuk dalam kelas reptil. Hewan yang termasuk dalam suku *Testudinata* atau *Chelonians* ini mudah dikenali dengan adanya tempurung luar yang keras atau cangkang bertulang (bony shell). Tempurung kura-kura terdiri dari dua bagian, dimana bagian atas menutupi punggung yang disebut karapas dan bagian bawah berisi perut yang disebut plastron. Setiap bagian terdiri dari dua lapisan, yaitu lapisan luar umumnya bersisik besar dan keras yang tersusun seperti genting, sedangkan lapisan dalam berupa lempeng-lempeng tulang yang tersusun rapat seperti tempurung (Iskandar, 2000).

*C. amboinensis* di Indonesia tersebar di beberapa wilayah meliputi pulau Sumatera, Kalimantan, dan Sulawesi (Ernst & Barbour, 1989). Hal ini dimungkinkan karena kemampuan adaptasi yang dimiliki oleh spesies ini sangat tinggi. Hewan ini dapat hidup di kolam, rawa air payau, rawa air tawar, sungai dan persawahan, bahkan secara umum hewan ini dapat hidup di darat maupun di air sehingga sering disebut hewan semi akuatik (Lim & Indraneil Das, 1999).

Keberadaan *C. amboinensis* yang tersebar di Indonesia tidak menjamin bahwa spesies ini berada pada status konservasi yang aman. Mulai tahun 2010 banyak reptil yang dimanfaatkan dalam perdagangan meliputi tokek tanah, kadal duri, maupun kura-kura. Kura-kura batok yang dalam bahasa ilmiah disebut *C. amboinensis* merupakan kura-kura endemik daerah Indonesia Timur yang banyak diperdagangkan hingga keluar negeri. Hal tersebut mengakibatkan terjadinya penurunan drastis populasi *C. amboinensis* (Guntoro *et al.*, 2020). Keberadaan *C. amboinensis* di Indonesia saat ini sedang dalam kondisi terancam punah (Nasution & Fatah, 2021). Menurut data *International Union for Conservation of Nature and Nature Resources* (IUCN) diketahui jenis kura-kura ini memiliki resiko tinggi dan berpotensi mengalami kepunahan. Walaupun statusnya belum kritis namun dalam kurun waktu 10 tahun terakhir telah terjadi penurunan jumlah sebanyak 20% (Schoppe, 2008). Kondisi ini jika dibiarkan tentu akan mengancam keberadaan *C. amboinensis* di

Indonesia. Penurunan jumlah kura-kura ini disebabkan oleh adanya eksploitasi terhadap hewan ini khususnya untuk kebutuhan ekonomi. Kura-kura Indonesia pada tahun 2000 banyak ditemukan diekspor ke China untuk dimanfaatkan dalam produk makanan dan produk obat-obatan (Schoppe, 2008). Kondisi ini harus segera ditindaklanjuti agar tidak terus terjadi penurunan jumlah populasi dari *C. amboinensis* di Indonesia.

Tindakan konservasi diperlukan untuk mencegah penurunan populasi *C. amboinensis*. Upaya konservasi dapat dilakukan melalui perkawinan silang antar kura-kura yang berkerabat jauh dan menghindari perkawinan sedarah, sehingga mampu memunculkan sifat yang unggul pada kura-kura tersebut (Hermawan, 2016). Perkawinan silang bertujuan untuk menghasilkan spesies dengan tingkat variasi genetik yang tinggi. Hewan yang terancam punah dicirikan oleh tingkat variasi genetik yang rendah, terutama jika dibandingkan dengan spesies yang tidak terancam punah (Spielman *et al.*, 2004). Untuk mengetahui tingkat variasi genetik dapat dilihat melalui pohon filogenetik. Ternyata pohon filogenetik dapat digunakan untuk menunjukkan hubungan evolusi antar organisme selain untuk menentukan kekerabatan (Schmidt, 2003).

Guna mengetahui kepastian tentang kekerabatan dan variasi genetik *C. amboinensis* di wilayah Indonesia timur perlu dilakukan sebuah penelitian berbasis molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat hubungan kekerabatan *C. amboinensis* wilayah Indonesia timur (Ambon, Gorontalo, dan Luwu) berdasarkan hasil analisis konstruksi pohon filogeni, jarak genetik, dan *similaritas* genetik.

## 2. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah deskriptif eksploratif dimana bertujuan untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena (Arikunto, 2006). Penelitian ini menggunakan pendekatan observasi laboratorium, dengan teknik analisis biologi molekuler. Rangkaian kegiatan pada penelitian ini meliputi: Isolasi DNA jaringan,

Purifikasi DNA, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Elektroforesis horizontal, dan Sekuensing gen. Hasil sekuen gen dianalisis secara deskriptif eksploratif menggunakan *software MEGA 6* untuk mengetahui hasil analisis filogeni, jarak genetik, dan similaritas genetik.

Objek penelitian pertama adalah koleksi jaringan ekor *C. amboinensis* di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang. Jaringan ekor *C. amboinensis* berukuran 1 – 3 cm yang disimpan pada tabung Eppendorf 1,5 ml berisi etanol 70%. Sampel jaringan ekor *C. amboinensis* yang digunakan berasal dari daerah Ambon sejumlah 3 sampel, Luwu sejumlah 2 sampel, dan Gorontalo sejumlah 3 sampel.

Waktu isolasi DNA, purifikasi, PCR, dan elektroforesis horizontal dilakukan pada bulan Februari 2017 di laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang. Sekuensing gen dilakukan di PT. Genetika Science, Jakarta pada bulan Maret 2017.

Daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian pada setiap tahapnya dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 2.1 Alat dan Bahan Isolasi DNA

Alat	Bahan
• Centrifuge	• 0,03 gr jaringan ekor
• Eppendorf 2 ml	• Buffer STE
• Mikropipet 1 – 10 $\mu$ l, 10 – 100 $\mu$ l, 100 – 1000 $\mu$ l	• Proteinase – K (Pro – K)
• Tip (biru, kuning, putih)	• SDS 10%
• Rak eppendorf	• NaCl 5M
• Freezer	• Phenol
• Vortex	• Chloroform Isoamil
• Mortar	• Etanol absolute
• Pistil	• Etanol 70%
• Gunting	• TE
• Pinset	• RNAse
• Water Bath incubator	• Aquades
	• Aqua Bidestilasi
	• Chloroform

Tabel 2.2 Alat dan Bahan Purifikasi DNA

Alat	Bahan
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Satu set alat elektroforesis horizontal</li> <li>• Mikropipet 1 – 10 µl</li> <li>• Tip warna putih</li> <li>• Gel document</li> <li>• Rak tube</li> <li>• Microwave oven</li> <li>• Vortex</li> <li>• Mortar</li> <li>• Pistil</li> <li>• Gunting</li> <li>• Pinset</li> <li>• Waterbath incubator</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agarose</li> <li>• Glove</li> <li>• TBE 1x</li> <li>• Tissue</li> <li>• Loading dye</li> <li>• Ethidium Bromine (EtBr)</li> <li>• Sampel DNA</li> <li>• Aquades steril</li> </ul>

Tabel 2.3 Alat dan Bahan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Alat	Bahan
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tube PCR</li> <li>• Mikropipet 1 – 10 µl</li> <li>• Tip warna putih</li> <li>• Rak tube</li> <li>• Ice box</li> <li>• Centrifuge</li> <li>• Satu set mesin PCR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 µl primer Cytochrome b</li> <li>• 25 µl PCR mix (dNTP, Taq polimerase, buffer)</li> <li>• 10 µl dH<sub>2</sub>O</li> <li>• µl sampel DNA</li> </ul>

Tabel 2.4 Alat dan Bahan Elektroforesis Horizontal

Alat	Bahan
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Satu set alat elektroforesis horizontal</li> <li>• Mikrowave oven</li> <li>• Timbangan analitik</li> <li>• Mikropipet 1 – 10 µl, 10 – 100 µl</li> <li>• Tip (putih dan kuning)</li> <li>• Tabung Erlenmeyer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agarose</li> <li>• Glove</li> <li>• TBE 1x</li> <li>• Tissue</li> <li>• Parafilm</li> <li>• Loading dye</li> <li>• EtBr</li> <li>• Sampel DNA</li> <li>• Aquades steril</li> </ul>

Data diperoleh dari hasil sekuen gen dari sampel Ambon A, Ambon C, Ambon F, Gorontalo 5, Gorontalo 10, Gorontalo 13, Luwu 3, dan Luwu 6 menggunakan primer *Cytochrome b*. Data akhir yang diperoleh dari hasil sekuensing adalah komposisi basa

nitrogen dari masing-masing sampel kura-kura.

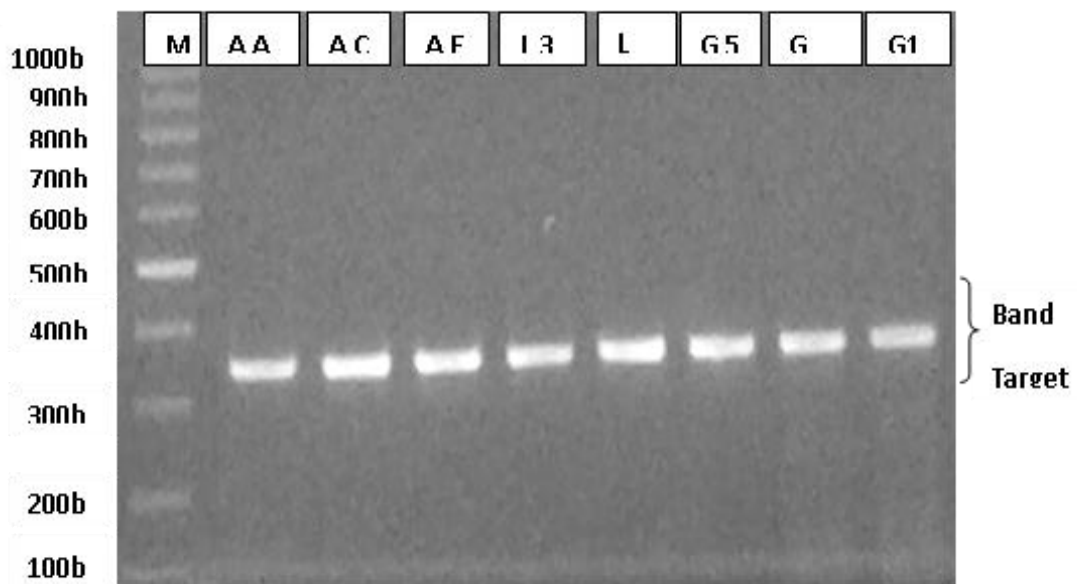
Analisis filogenetik menggunakan analisis model *Neighbor Joining* (NJ) dari *software MEGA 6*, ditunjang dengan data similaritas dan variasi genetik. Sekuens sampel *C. amboinensis* dibandingkan dengan sekuens *Cytochrome b* spesies *C. trifasciata* yang sudah dipublikasikan di *Gene Bank* (Bank Data). Tujuan perbandingan ini untuk mengetahui posisi kekerabatan tiap sampel *C. amboinensis*.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Hasil Penelitian

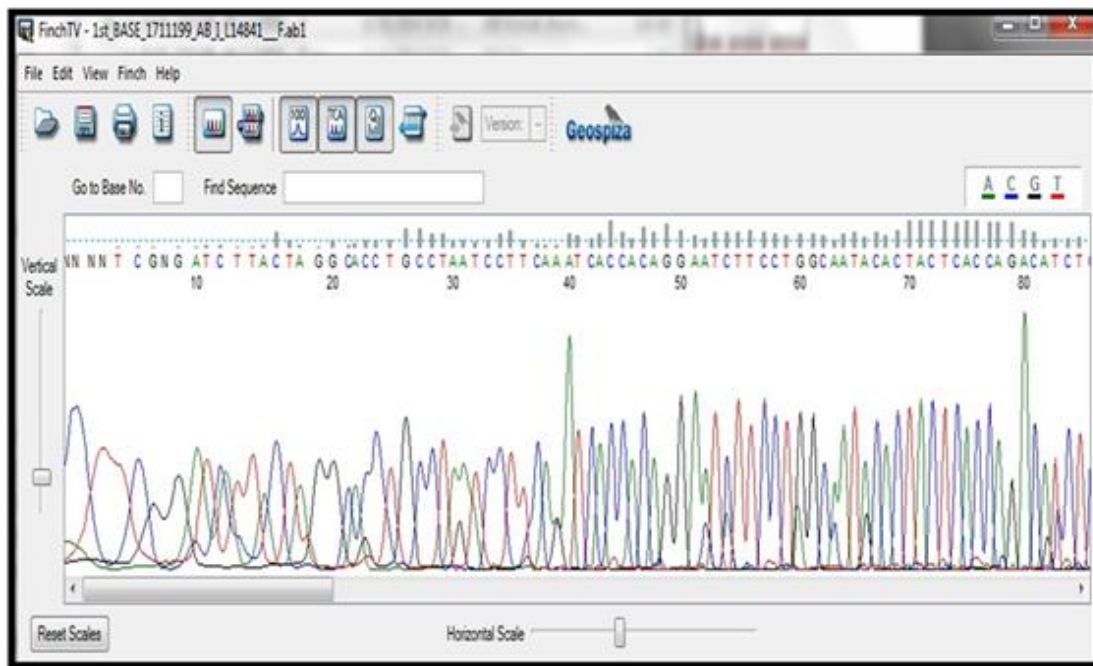
##### 3.1.1 Konstruksi Pohon Filogeni

Analisis kekerabatan atau filogeni *C. Amboinensis* wilayah Ambon, Luwu, dan Gorontalo didukung dengan data variasi sekuen gen *Cytochrome b* DNA mitokondria. Sebelummnya dilakukan amplifikasi pada gen *Cytochrome b* untuk menentukan posisi gen target yang sesuai melalui proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu  $\pm 340$  bp (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Hasil Amplifikasi Gen *Cytochrome b* pada proses PCR. M (Marker), AA (Ambon A), AC (Ambon) C, AF (Ambon F), L3 (Luwu 3), L6 (Luwu 6), G5 (Gorontalo 5), G13 (Gorontalo 13), G 10 (Gorontalo 10).

Hasil dari amplifikasi Gen *Cytochrome b* pada proses *PCR* digunakan sebagai rujukan dalam melakukan sekuensing. Hal ini dikarenakan pada proses sekuensing diperlukan jumlah gen target yang cukup banyak agar susunan basa nukleotida DNA dapat dimunculkan. Hasil sekuensing dari *C. amboinensis* dapat dilihat menggunakan *software Finch TV* (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Hasil Sekuensing Basa Nukleotida DNA (*software Finch TV*)

Hasil sekuensing yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan *software BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk mengetahui persentase kecocokan hasil sekuensing basa nukleotida DNA (Hidayatun *et al.*, 2011), yang telah diperoleh dengan data urutan basa nukleotida DNA *C. amboinensis* yang terdapat pada *Genbank* (Gambar 3.3).

Download ▾ GenBank Graphics					
Cuora amboinensis mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b					
Sequence ID: <a href="#">embIAJ564447.1</a> Length: 1036 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 326 GenBank Graphics					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
575 bits(311)	2e-160	321/326(98%)	0/326(0%)	Plus/Plus	
Query 7	GGATCATTACTAGGCACCTGCCTAATCCTCCAGATCACCACAGGAATCTTCCTGGCAATA	66			
Sbjct 1	GGATCATTACTAGGCATCTGCCTAATCCTTCAGATCACCACAGGAATCTTCCTGGCAATA	60			
Query 67	CACTACTCACCAGATATCTCACTAGCATTTTCATCAGTGGCCCATATCACCCGAGATGTA	126			
Sbjct 61	CACTACTCACCAGACATCTCACTAGCATTTTCATCAGTGGCCCATATCACCCGAGATGTA	120			
Query 127	CAATACGGATGACTCATCCGCAATGCACATGCCAACGGGGCCCTCCATCTTCTTCATATGC	186			
Sbjct 121	CAATACGGATGACTCATCCGCAATGCACATGCCAACGGGGCCCTCCATCTTCTTCATATGC	180			
Query 187	AICTACCTTCATATCGGTCGAGGACTCTACTACGGCTCATACCTGTACAAAGAAACCTGA	246			
Sbjct 181	AICTACCTTCATATCGGTCGAGGACTCTACTACGGCTCATACCTGTACAAAGAAACCTGA	240			
Query 247	AACACAGGAATTATCCTACTATTCTTAACATATAGCTACTGCATTTCGTAGGCTACGTCCTA	306			
Sbjct 241	AACACAGGAATTATCCTACTATTCTTAACATATAGCTACTGCATTTCGTAGGCTACGTCCTA	300			
Query 307	CCATGAGGACAAATATCATTCTGAGG	332			
Sbjct 301	CCATGAGGCCAAATATCATTCTGAGG	326			

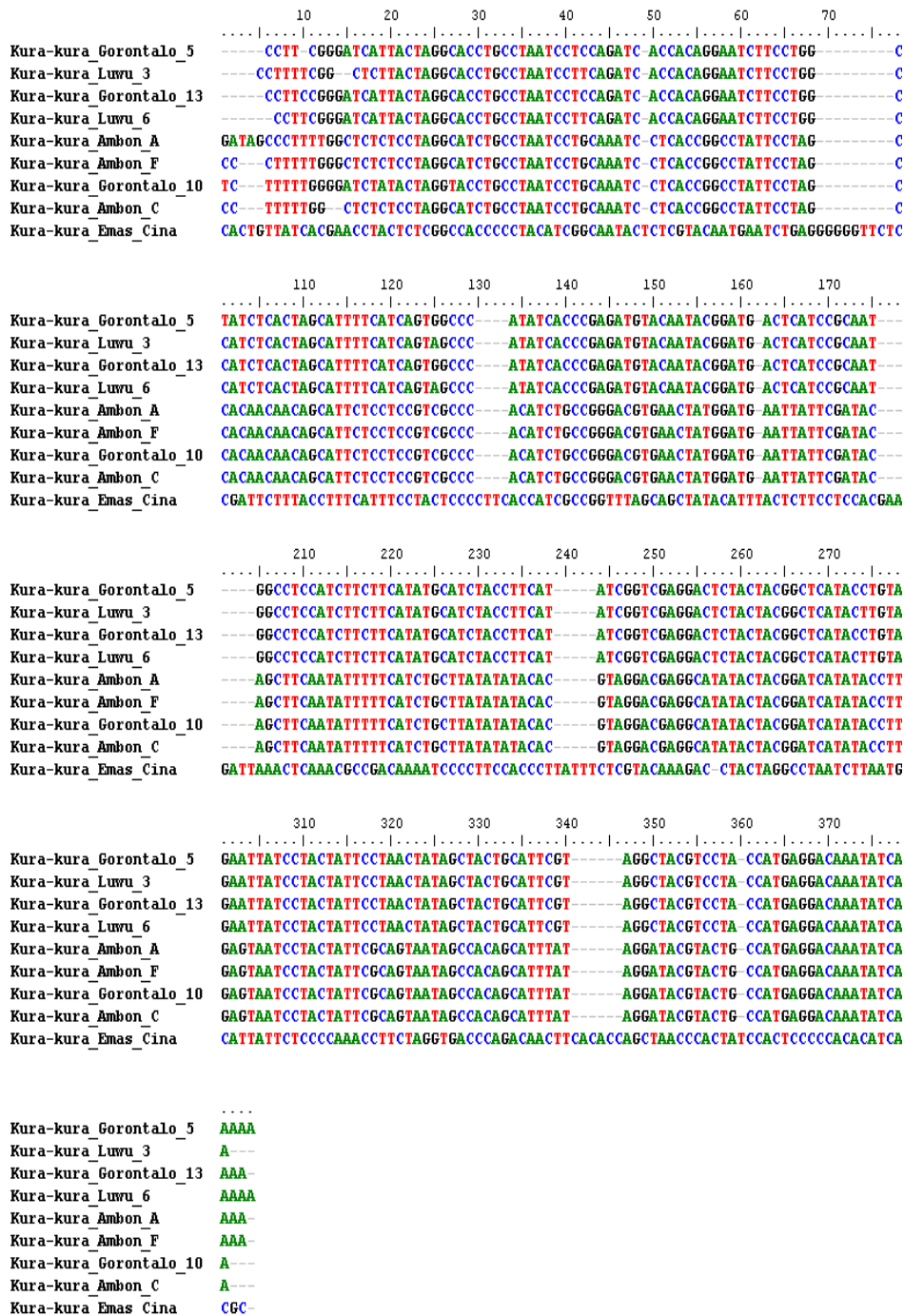
Gambar 3.3 Hasil Analisis Menggunakan *BLAST* untuk Mengetahui Persentase Kecocokan dengan Sekuen DNA yang Terdapat pada *Genbank*

Berdasarkan analisis menggunakan *BLAST* diperoleh bahwa hasil sekuen yang diperoleh menunjukkan tingkat homologi sekuen  $\geq 300$  bp dengan kesamaan sebesar 98%. Hal ini menunjukkan bahwa sekuen *Cytochrome b* yang diperoleh dari penelitian merupakan sekuen gen *Cytochrome b* dari *C. amboinensis*.

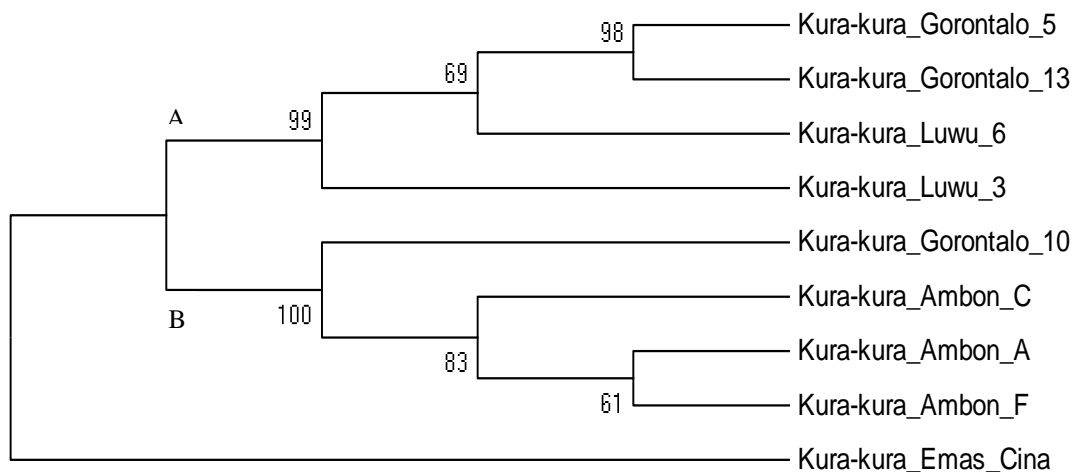
Analisis filogeni dilakukan dengan melibatkan keseluruhan sampel yang digunakan yaitu sebanyak 8 sampel yang berasal dari Ambon, Luwu, dan Gorontalo. Sebagai pembandingan digunakan sekuen gen *Cytochrome b* Kura-kura Emas (*Cuora trifasciata*) yang berasal dari wilayah perairan Cina. Sekuen gen *Cytochrome b* *C. trifasciata* diperoleh dari *Genbank* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) dengan nomer aksesori JN710010.1. Sekuen gen *Cytochrome b* yang diperoleh selanjutnya disejajarkan (*alignment*) menggunakan program *Clustal X*. Fungsi *Clustal X* untuk pensejajaran sekuen DNA (Rohimah *et al.*, 2018). Hasil *alignment* dapat dilihat pada Gambar 3.4.

Analisis filogenetik dapat dilakukan dengan melakukan rekonstruksi pohon filogenetik dari 9 sampel. *Software MEGA 6* digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik melalui metode *Neighbor Joining (NJ)* (Tindi *et al.*, 2017). Luaran hasil rekonstruksi pohon filogenetik ditampilkan melalui Gambar 3.5.





Gambar 3.4 Hasil *Alignment* 9 Sampel Sekuen Gen *Cytochrome b* Kura-kura Lokal Indonesia (*C. amboinensis*) dengan Sekuen Acuan Kura-kura Emas Cina (*C. trifasciata*)



Gambar 3.5 Pohon Filogeni *C. amboinensis* melalui Metode *Neighbor Joining*

Berdasarkan hasil konstruksi pohon filogeni dengan *Neighbor Joining* terlihat percabangan dua kelompok besar pada Kura-kura Batok (*C. amboinensis*) wilayah Indonesia Timur (Ambon, Gorontalo, dan Luwu). Terlihat pada kelompok A maupun kelompok B terdapat spesies kura-kura yang berkumpul dan berasal dari daerah yang berbeda. Pada kelompok A ditempati jura-kura Gorontalo 5, Gorontalo 13, Luwu 6, dan Luwu 3, sedangkan pada kelompok B ditempati kura-kura Gorontalo 10, Ambon A, Ambon F, dan Ambon C. Kura-kura yang digunakan sebagai pembandingan yakni kura-kura Emas Cina (*C. trifasciata*) terlihat memiliki cabang sendiri dan keluar dari dua kelompok besar (A dan B).

### 3.1.2 Jarak Genetik

Jarak genetik digunakan untuk menunjukkan kekerabatan antara sampel. Semakin kecil jarak genetik antar sampel, maka kesamaan basa nukleotida DNA semakin besar (Brahmantiyo *et al.*, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan antar sampel semakin dekat. Nilai jarak genetik antar sampel *C. amboinensis* dapat dilihat pada Gambar 3.6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Kura-kura_Gorontalo_5		0.008	0.004	0.006	0.038	0.037	0.037	0.037	0.099
2. Kura-kura_Luwu_3	0.024		0.008	0.006	0.039	0.037	0.037	0.037	0.095
3. Kura-kura_Gorontalo_13	0.006	0.024		0.006	0.038	0.037	0.037	0.037	0.099
4. Kura-kura_Luwu_6	0.015	0.015	0.015		0.037	0.037	0.037	0.037	0.098
5. Kura-kura_Ambon_A	0.339	0.349	0.338	0.329		0.005	0.008	0.006	0.098
6. Kura-kura_Ambon_F	0.334	0.334	0.334	0.334	0.009		0.006	0.003	0.098
7. Kura-kura_Gorontalo_10	0.329	0.329	0.329	0.329	0.024	0.015		0.006	0.098
8. Kura-kura_Ambon_C	0.334	0.334	0.333	0.334	0.012	0.003	0.012		0.097
9. Kura-kura_Emas_Cina	0.967	0.937	0.958	0.947	0.956	0.947	0.946	0.946	

Gambar 3.6 Nilai Jarak Genetik (*Genetic Distance*) antar Sampel *C. amboinensis* dengan Spesies Acuan *C. trifasciata*

### 3.1.3 Nilai Similaritas dan Varian Sekuen


Analisis similaritas dan varian sekuen gen dilakukan untuk mengetahui persentase kemiripan sekuen gen dari beberapa sampel yang dibandingkan (Munir *et al.*, 2012). Sekuen gen *Cytochrome b* *C. amboinensis* dari wilayah Ambon, Gorontalo, dan Luwu akan dibandingkan dengan sekuen gen *Cytochrome b* *C. trifasciata* sebagai *outgroup*. Nilai similaritas dan varian sekuen gen *Cytochrome b* *C. amboinensis* dapat dilihat pada Tabel 3.1.


Melalui Tabel 3.1 diketahui bahwa nilai similaritas *C. trifasciata* sangat kecil ketika dibandingkan dengan semua sampel *C. amboinensis*, yakni berkisar pada angka 3-6%. Kondisi itu membuktikan bahwa sekuen *C. trifasciata* dengan *C. amboinensis* memiliki kemiripan yang sangat rendah. Dapat dilihat pada perbandingan semua sampel antara *C. amboinensis* (Ambon, Gorontalo, dan Luwu) memiliki nilai similaritas yang tinggi (berkisar 66%-99%) dimana hal itu menunjukkan bahwa ketiga sampel *C. amboinensis* dari ketiga wilayah tersebut memiliki kemiripan sekuen yang tinggi antara satu dengan yang lain.


Tabel 3.1 Nilai Similaritas dan Varian Sekuen Gen *Cytochrome b* *Cuora amboinensis*


Spesies 1	Spesies 2	Jarak Genetik	Std. Err	Similaritas	Varians
Gorontalo 5	Luwu 3	0,024	0,008	97,59 %	2,41 %
Gorontalo 5	Gorontalo 13	0,006	0,004	99,41 %	0,59 %
Luwu 3	Gorontalo 13	0,024	0,008	97,59 %	2,41 %
Gorontalo 5	Luwu 6	0,015	0,006	98,50 %	1,50 %
Luwu 3	Luwu 6	0,015	0,006	98,51 %	1,49 %
Gorontalo 13	Luwu 6	0,015	0,006	98,51 %	1,49 %
Gorontalo 5	Ambon A	0,339	0,038	66,15 %	33,85 %
Luwu 3	Ambon A	0,349	0,039	65,13 %	34,87 %
Gorontalo 13	Ambon A	0,338	0,038	66,18 %	33,82 %
Luwu 6	Ambon A	0,329	0,037	67,11 %	32,89 %
Gorontalo 5	Ambon F	0,334	0,037	66,60 %	33,40 %
Luwu 3	Ambon F	0,334	0,037	66,56 %	33,44 %
Gorontalo 13	Ambon F	0,334	0,037	66,63 %	33,37 %
Luwu 6	Ambon F	0,334	0,037	66,60 %	33,40 %
Ambon A	Ambon F	0,009	0,005	99,11 %	0,89 %
Gorontalo 5	Gorontalo 10	0,329	0,037	67,11 %	32,89 %
Luwu 3	Gorontalo 10	0,329	0,037	67,08 %	32,92 %
Gorontalo 13	Gorontalo 10	0,329	0,037	67,13 %	32,87 %
Luwu 6	Gorontalo 10	0,329	0,037	67,11 %	32,89 %
Ambon A	Gorontalo 10	0,024	0,008	97,60 %	2,40 %
Ambon F	Gorontalo 10	0,015	0,006	98,51 %	1,49 %
Gorontalo 5	Ambon C	0,334	0,037	66,63 %	33,37 %
Luwu 3	Ambon C	0,334	0,037	66,60 %	33,40 %
Gorontalo 13	Ambon C	0,333	0,037	66,66 %	33,34 %

Luwu 6	Ambon C	0,334	0,037	66,63 %	33,37 %
Ambon A	Ambon C	0,012	0,006	98,81 %	1,19 %
Ambon F	Ambon C	0,003	0,003	99,70 %	0,30 %
Gorontalo 10	Ambon C	0,012	0,006	98,81 %	1,19 %
Gorontalo 5	Emas Cina	0,967	0,099	3,28 %	96,72 %
Luwu 3	Emas Cina	0,937	0,095	6,34 %	93,66 %
Gorontalo 13	Emas Cina	0,958	0,099	4,16 %	95,84 %
Luwu 6	Emas Cina	0,947	0,098	5,26 %	94,74 %
Ambon A	Emas Cina	0,956	0,098	4,37 %	95,63 %
Ambon F	Emas Cina	0,947	0,098	5,26 %	94,74 %
Gorontalo 10	Emas Cina	0,946	0,098	5,36 %	94,64 %
Ambon C	Emas Cina	0,946	0,097	5,36 %	94,64 %

Keterangan:  Nilai similaritas antar sampel *C. amboinensis*

 Nilai similaritas antara *C. amboinensis* dengan *C. trifasciata*

 Nilai varians antar sampel *C. amboinensis*

 Nilai varians antara *C. amboinensis* dengan *C. trifasciata*

### 3.2 Pembahasan

#### 3.2.1 Pola Substitusi Sekuen Gen *Cytochrome b*

Analisis filogenetik Kura-kura *C. amboinensis* dilakukan berdasarkan variasi sekuen gen *Cytochrome b* DNA mitokondria. Gen *Cytochrome b* pada sampel diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dengan panjang sekuen gen  $\pm 340$  bp. Dilihat dari panjang sekuen gen terbukti bahwa gen tersebut adalah *Cytochrome b*, (Koh *et al.*, 2009) menyatakan bahwa panjang sekuen parsial gen *Cytochrome b* pada beberapa spesies kura-kura sebesar 340 bp.

*Sequence alignment* dilakukan dari sekuen gen *Cytochrome b* antar sampel dan spesies acuan terlihat adanya substitusi basa nukleotida (Toha *et al.*, 2016). Substitusi yang terjadi meliputi substitusi transisi dan transversi. Substitusi transisi merupakan pergantian antara basa purin (A dan G) atau antara basa pirimidin (C dan T),

sedangkan substitusi transversal adalah pergantian antara basa purin dan pirimidin (Karmana, 2009).

### 3.2.2 Analisis Filogeni

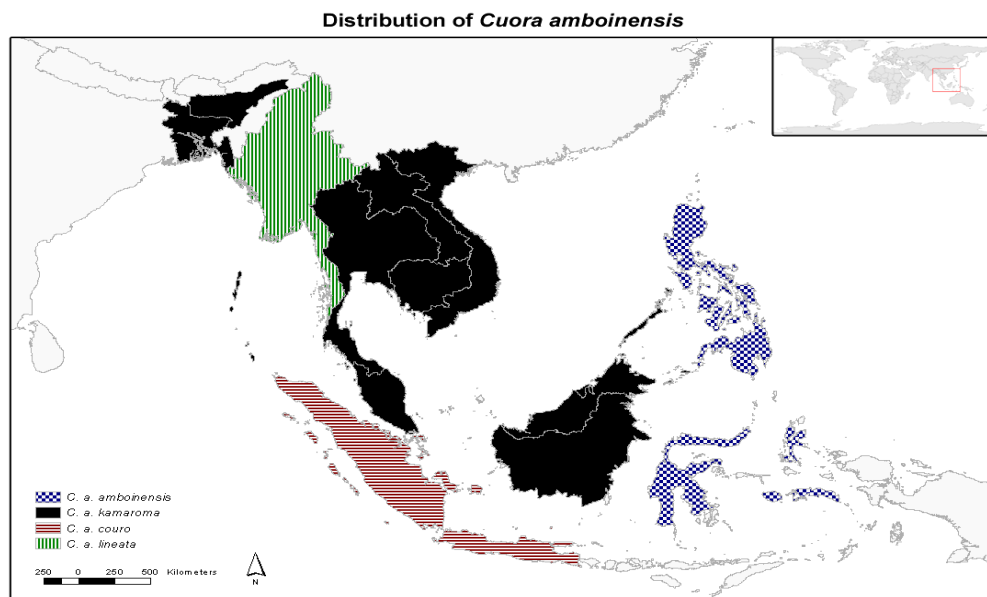
Analisis filogeni dilakukan dengan cara merekonstruksi pohon filogeni menggunakan *software MEGA 6*. Program yang digunakan untuk merekonstruksi pohon filogeni meliputi *Neighbor Joining (NJ)*. *Neighbor Joining* termasuk ke dalam metode jarak (*distance method*), yaitu cara untuk merekonstruksi pohon filogeni berdasarkan jarak evolusi, yaitu jumlah perbedaan basa nukleotida antara dua sekuen DNA atau lebih (Saleky *et al.*, 2020).

Hasil rekonstruksi pohon filogeni *C. amboinensis* daerah Ambon, Gorontalo, dan Luwu dengan spesies acuan menggunakan metode *neighbor joining* (Gambar 5), menunjukkan adanya pengelompokan individu kura-kura berdasarkan daerah masing-masing. Hal ini dapat diamati dari gambar konstruksi pohon filogeni seperti kura-kura Ambon yang masuk ke dalam rumpun kura-kura Ambon dengan nilai bootstrap 83 dan 61. Hal serupa juga terjadi pada individu-individu *C. amboinensis* dari daerah lain seperti Gorontalo dan Luwu. Pengelompokan berdasarkan daerah ini diduga karena masing-masing individu kura-kura mengalami perkawinan antara kura-kura pada daerahnya masing-masing (*inbreeding*), sehingga memunculkan kekerabatan dekat antara individu yang berasal dari daerah yang sama jika dibandingkan dengan individu dari daerah yang berbeda. (Muharam *et al.*, 2012) menegaskan bahwa perkawinan secara *inbreeding* mengakibatkan individu memiliki kekerabatan yang dekat. Hal ini didukung dengan nilai jarak genetik (Gambar 6) dan nilai similaritas (Tabel 5) pada masing-masing individu kura-kura antar tiap daerah. Semakin besar jarak genetik antar sampel menunjukkan kesamaan basa nukleotida yang semakin kecil, sehingga hubungan kekerabatan semakin jauh. Dilihat dari similaritas, semakin besar nilai similaritas antar sampel menunjukkan kemiripan basa nukleotida semakin besar sehingga hubungan kekerabatan semakin dekat (Sujaya *et al.*, 2016).

Pohon filogeni pada Gambar 3.5 menunjukkan pengelompokan *C. amboinensis*

yang diteliti menjadi dua kelompok besar yaitu kelompok A yang terdiri dari *C. amboinensis* Gorontalo dan Luwu, dan kelompok B terdiri dari Ambon dan Gorontalo. Pengelompokan dua kelompok besar ini menunjukkan bahwa daerah berpengaruh terhadap kekerabatan *C. amboinensis*. Pada kelompok A yang terdiri dari kura-kura Gorontalo dan Luwu menunjukkan bahwa kura-kura Luwu 6 satu cabang dengan kura-kura Gorontalo 5 dan Gorontalo 1, hal ini menunjukkan bahwa kekerabatan yang dekat antara kura-kura Gorontalo dan Luwu.

Tingginya tingkat kekerabatan antara kura-kura Gorontalo dan Luwu pada kelompok A diduga karena terjadi perkawinan antar populasi kura-kura pada kelompok A. Hal ini didasari dengan gambar peta persebaran *C. amboinensis* (Gambar 7) yang menunjukkan bahwa posisi Gorontalo dan Luwu berdekatan dan hanya dipisahkan oleh laut sempit. Peta persebaran *C. amboinensis* ditunjukkan oleh (Schoppe, 2008) juga menunjukkan daerah persebaran *C. amboinensis* meliputi Sulawesi, Kepulauan Halmahera, dan Filipina, sehingga sangat dimungkinkan terjadi perkawinan antar populasi kura-kura dalam kelompok A yang berakibat pada kedekatan kekerabatannya.



Gambar 3.7 Peta Persebaran *Cuora amboinensis* (Schoppe, 2008)

*C. amboinensis* pada kelompok B yang terdiri dari daerah Ambon dan Gorontalo menunjukkan hasil yang berbeda dengan kelompok A (Gambar 5). Pohon filogeni pada kelompok B menunjukkan bahwa kura-kura Gorontalo 10 satu kelompok dengan kura-kura Ambon (Gambar 3.5). Hal ini menunjukkan adanya kedekatan kekerabatan pada individu-individu yang masuk dalam kelompok tersebut. Secara geografis letak pulau Sulawesi dan Ambon terpisah oleh lautan, namun dari peta persebaran *C. amboinensis* (Gambar 3.7) menunjukkan bahwa *C. amboinensis* memang tersebar meliputi Sulawesi dan Ambon, sehingga sangat dimungkinkan adanya percampuran genetik antara kura-kura Gorontalo dan Ambon sehingga menunjukkan adanya hubungan genetik yang dekat (Van Dijk *et al.*, 2014).



Gambar 3.8 Peta Persebaran *Cuora trifasciata* (Van Dijk *et al.*, 2014)

Pohon filogeni menunjukkan bahwa kura-kura yang digunakan sebagai *outgroup* yakni kura-kura Emas Cina (*Cuora trifasciata*) memiliki kekerabatan yang jauh dengan *C. amboinensis* dari berbagai daerah yang telah dijadikan sampel, hal itu dapat dilihat dengan terpisahnya cabang pohon filogeni *C. trifasciata* pada Gambar 5. Kenyataan itu menunjukkan bahwa daerah memang mempengaruhi kedekatan kekerabatan, terbukti dimana *C. trifasciata* yang tersebar di daerah Cina Selatan (Gambar 3.8) dan *C. amboinensis* yang tersebar di daerah Sulawesi, Kepulauan



Halmahera, dan Filipina (Gambar 7) (Van Dijk *et al.*, 2014). Dapat dikatakan bahwa bahwa Kura-kura Batok (*C. amboinensis*) dari wilayah yang sama memiliki nilai kekerabatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan *C. amboinensis* dari wilayah lain.

### 3.2.3 Nilai Jarak Genetik dan Similaritas

Jarak genetik individu dari daerah yang sama memiliki nilai yang lebih rendah jika dibandingkan dengan nilai jarak genetik antar individu dari daerah yang berbeda (Hadiati, 2003). Fenomena ini dapat dijumpai pada hampir seluruh sampel *C. amboinensis*. Jarak genetik *C. amboinensis* sampel berkisar antara 0,003-0,349 (Gambar 3.6). Hal ini menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan antar individu dari satu daerah lebih dekat jika dibandingkan dengan individu dari daerah lain. Contoh itu dapat diamati pada nilai jarak genetik seperti pada individu kura-kura Ambon C dengan kura-kura Ambon F yang memiliki nilai jarak genetik sebesar 0,003. Nilai jarak genetik akan lebih besar ketika dibandingkan dengan individu dari daerah lain, seperti pada kura-kura Ambon F dengan kura-kura Luwu 3 yang memiliki nilai jarak genetik sebesar 0,334 (Gambar 3.6). Nilai similaritas genetik juga mendukung hubungan kekerabatan spesies (Murtiyaningsih, 2017). Nilai similaritas diperoleh antara 65,13%-99,70% (Tabel 3.1). Nilai similaritas terkecil ditunjukkan antara kura-kura Luwu 3 dengan kura-kura Ambon A sebesar 65,13%, sedangkan nilai similaritas terbesar ditunjukkan antara kura-kura Ambon F dengan kura-kura Ambon C sebesar 99,70%. Semakin besar nilai similaritas menunjukkan semakin dekat hubungan kekerabatan antara dua individu. Berdasarkan nilai similaritas diketahui bahwa hubungan kekerabatan antar individu dalam satu daerah lebih besar jika dibandingkan dengan nilai similaritas individu dari daerah yang berbeda. Spesies pada wilayah yang sama akan memiliki jarak genetik yang kecil dan memiliki nilai similaritas genetik yang tinggi (Gusmiaty *et al.*, 2017). Namun terdapat satu individu yang memiliki nilai similaritas kecil dalam satu daerah yaitu kura-kura Gorontalo 10, dimana menunjukkan fenomena nilai similaritas lebih besar dengan kura-kura

Ambon. Hal itu mengindikasikan bahwa sampel kura-kura Gorontalo 10 berasal dari daerah atau populasi yang berbeda dengan sampel kura-kura Gorontalo 5 dan 13. Penyebab yang memungkinkan hal ini terjadi adalah adanya perdagangan *C. amboinensis* antar pulau, bahkan sampai ke luar negeri. *C. amboinensis* merupakan kura-kura endemik Indonesia timur yang sering diperdagangkan, selain di dalam negeri juga sampai ke luar negeri untuk dijadikan produk makanan dan produk obat-obatan (Schoppe, 2008).

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

##### 4.1 Kesimpulan

Hasil analisis kekerabatan *C. Amboinensis* wilayah Ambon, Gorontalo, dan Luwu menunjukkan nilai jarak genetik sebesar 0,003-0,349 dan nilai similaritas genetik sebesar 65,13%-99,70%. Diketahui bahwa *C. amboinensis* pada satu daerah akan memiliki nilai jarak genetik semakin kecil dan memiliki nilai similaritas yang semakin besar. Sedangkan *C. amboinensis* pada daerah yang berbeda akan memiliki nilai jarak genetik yang besar dan akan memiliki nilai similaritas yang kecil. Terdapat anomali pada sampel Gorontalo 10 yang berkerabat dekat dengan wilayah Ambon padahal kedua sampel tersebut terletak pada pulau yang berbeda. Penyebab yang memungkinkan hal ini terjadi adalah adanya perdagangan *C. amboinensis* antar pulau yang mengakibatkan kura-kura berpindah dari daerah asalnya.

##### 4.2 Saran

Penelitian sejenis perlu menambah jumlah sampel dari setiap wilayah sehingga representasi data yang diperoleh akan semakin baik. Selain itu perlu dilakukan penelitian menggunakan pendekatan molekuler yang lain seperti menggunakan gen *Cytochrome C Oxidase Subunit I* (COI) atau D-Loop DNA mitokondria untuk dibandingkan hasilnya dengan penelitian ini.

## 5. REFERENSI

- Arikunto, S. (2006). *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktik*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Brahmantiyo, B., Priyono, P., & Rosartio, R. (2016). Pendugaan Jarak Genetik Kelinci (Hyla, Hycle, Hyclex NZW, Rex, dan Satin) Melalui Analisis Morfometrik (ESTIMATION OF RABBIT GENETIC DISTANCE (HYLA, HYCOLE, HYCOLEXNZW, NZW, REX AND SATIN) THROUGH MORPHOMETRIC ANALYSIS). *Jurnal Veteriner*, 17(2), 226–234. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.2.226>
- Ernst, C. H., & Barbour, R. W. (1989). *Turtles of the world*. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Guntoro, J., Wirdateti, & Riyanto, A. (2020). The very low genetic variability on aceh tamiang's (Indonesia) population of painted terrapin (batagur borneoensis) inferred by cytochrome oxidase I (CO I) and D-loop (control region). *Biodiversitas*, 21(6), 2514–2520. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210624>
- Gusmiaty, G., Restu, M., Asrianny, A., & Larekeng, S. H. (2017). Polimorfisme Penanda RAPD untuk Analisis Keragaman Genetik Pinusmerkusii di Hutan PendidikanUnhas. *Jurnal Natur Indonesia*, 16(2), 47. <https://doi.org/10.31258/jnat.16.2.47-53>
- Hadiati, S. (2003). Pendugaan Jarak Genetik dan Hubungan Kekerabatan Nanas Berdasarkan Analisis Isozim. *Jurnal Hortikultura*, 13(2), 87–94. <http://ejournal.litbang.pertanian.go.id/index.php/jhort/article/view/1156>
- Hermawan, C. (2016). Rendahnya Diversitas Tingkat Gen Pada Kura-Kura (Cuora Amboinensis) Dilihat Dari Hasil Analisis Kekerabatan. *Jurnal Ilmiah PROGRESSIF*, 13(37), 1.
- Hidayatun, N., Susilowati, D. N., & Mulya, K. (2011). Identifikasi 26 Isolat Bakteri Endofitik Dan Filosfer Padi Dengan Analisis Sekuen 16s Rdna 1 [ Identification of 26 Endophytic and Phyllosphere Bacteria Isolated from Rice by 16S rDNA Sequence Analyses ]. *Berita Biologi*, 10(April), 455–461.
- Iskandar. (2000). *Kura-kura dan Buaya Indonesia dan Papua Nugini*. Palmedia Citra: Bandung.
- Karmana, I. W. (2009). Kajian Evolusi Berbasis Urutan Nukleotida. *GaneÇ Swara*, 3(3), 75–81.
- Koh, H. S., Lee, B. K., Wang, J., Heo, S. W., & Jang, K. H. (2009). Two sympatric Analisis Kekerabatan Kura-Kura Batok (*Cuora Amboinensis*) Wilayah Indonesia Timur (Ambon, Luwu, dan Gorontalo) Berbasis Sekuen Gen *Cytochrome B*

- phylogroups of the chinese water deer (*Hydropotes inermis*) identified by mitochondrial dna control region and cytochrome b gene analyses. *Biochemical Genetics*, 47(11–12), 860–867. <https://doi.org/10.1007/s10528-009-9285-8>
- Lim, B. L., & Indraneil Das. (1999). *Turtles of Borneo and Peninsular Malaysia*. Kinabalu: Natural History Publications (Borneo).
- Muharam, E. G., Buwono, I. D., & Yuniar Mulyani. (2012). Analisis Kekerabatan Ikan Mas Koi (*Cyprinus carpio koi*) Dan Ikan Mas Majalaya (*Cyprinus carpio*) Menggunakan Metode Rapd. *Perikanan Dan Kelautan*, 3(3), 15–23.
- Munir, M., Suryaningtyas, H., & Kuswanhadi, K. (2012). Analisis Keragaman Genetik Isolat *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei. Di Indonesia Menggunakan Marker Issr (Inter Simple Sequence Repeat). *Jurnal Penelitian Karet*, 30(2), 86–99. <https://doi.org/10.22302/ppk.jpk.v30i2.125>
- Murtiyaningsih, H. (2017). Isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik nanas menggunakan RAPD. *Journal Agritop*, 15(1), 84–93.
- Nasution, E. D., & Fatah, H. (2021). Rapid Survei Keanekaragaman Hayati Status Konservasi Permen LHK (P.106/2018) dan IUCN di areal Nilai Konservasi Tinggi Perkebunan Kelapa Sawit. *Agrifor*, 20(1), 161. <https://doi.org/10.31293/agrifor.v20i1.5211>
- Rohimah, S., Mukarramah, L., Sindiya, V., S., V. Y., K., G. A., & Su'udi, M. (2018). Eksplorasi Jenis dan Potensi DNA BARCODE ANGGREK *Thrixspernum* Secara In Silico. *Jurnal Biodjati*, 3(2), 50–58. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v3i2.3409>
- Saleky, D., Supriyatin, F. E., & Dailami, M. (2020). Pola Pertumbuhan dan Identifikasi Genetik Turbo setosus Gmelin, 1791 [Turbinidae, Gastropoda]. *Jurnal Kelautan Tropis*, 23(3), 305–315. <https://doi.org/10.14710/jkt.v23i3.7514>
- Schmidt, H. a. (2003). Phylogenetic trees from large datasets. *Unpublished PhD Thesis*. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.87.1104&rep=rep1&type=pdf%5Cnpapers://0bf253c3-7396-4811-afa5-28e5fa189e15/Paper/p22437>
- Schoppe, S. (2008). Science in CITES: the biology and ecology of the Southeast Asian box turtle and its uses and trade in Malaysia. In *Science in CITES: the biology and ecology of the Southeast Asian box turtle and its uses and trade in Malaysia*. [www.traffic.org/species-reports/traffic\\_species\\_reptiles18.pdf](http://www.traffic.org/species-reports/traffic_species_reptiles18.pdf)

- Spielman, D., Brook, B. W., & Frankham, R. (2004). Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(42), 15261–15264. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403809101>
- Sujaya, I., Nociantiri, K., Aryantini, N., Nursini, W., Ramona, Y., Orikasa, Y., Kenji, F., Urashima, T., & Oda, Y. (2016). Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Isolat Susu Segar Sapi Bali (Identification And Characterization Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Bali Cattle's Raw Milk). *Jurnal Veteriner*, *17*(2), 155–167. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.2.155>
- Tindi, M., Mamangkey, N. G. F., & Wullur, S. (2017). The DNA Barcode and molecular phylogenetic analysis several Bivalve species from North Sulawesi Waters based on COI gene. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, *1*(2), 32–38.
- Toha, A., Hakim, L., & Sumitro, S. (2016). *Panduan Dasar Analisis Data Genetik Untuk Publikasi* (Vol. 3, Issue July). Proyek Marine Biodiversity of Raja Ampat Islands. Kerjasama Universitas Papua-Universitas Brawijaya.
- Van Dijk, P. P., Iverson, J., Rhodin, A., Shaffer, B., & Bour, R. (2014). *Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status*. <https://doi.org/10.3854/crm.5.000.checklist.v7.2014>.