



Identifikasi Keanekaragaman Reptil Menggunakan Metode eDNA di Bagian Hulu Sungai Opak

Identification of Reptiles Diversity Using eDNA Method on the Upstream Part of Opak River

Donan Satria Yudha^{1*}, Rama Yudhistira Ismail², Kinanti Ayurahmawati Pranatami², Dwi Sendi Priyono¹

¹*Laboratorium Sistematika Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada*

Yogyakarta, 55251, Indonesia

²*Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada*

Yogyakarta, 55251, Indonesia

Email: donan.satria@ugm.ac.id

*Penulis Korespondensi

Abstract

Opak River is one of the main rivers that flows in DIY Province and as a habitat for reptiles such as turtles, lizards, snakes and crocodiles. Environmental DNA (eDNA) is known more efficient for species identification instead of conventional methods which have several limitations. The aim of this research is to determine the diversity of reptiles in the Upstream part of Opak River using eDNA sampling method. Water samples were taken from the upstream part of the Opak River, afterwards we conducted filtration, DNA extraction and preservation, then continued with PCR and electrophoresis, sequencing and bioinformatic analysis. The results of eDNA analysis show that there were 6 species of turtles and 33 species of snakes. The eDNA method can show precise results in identifying samples to the species level, although there are still false positives and false negatives. The use of eDNA metabarcoding in identifying reptile species diversity in the upstream part of the Opak River can be done rapidly but is less effective. This is caused by eDNA contamination, lack of specific target sequences and primers for reptile monitoring, as well as an incomplete reference database for reptiles which inhabit around and inside rivers in Indonesia.

Keywords: Diversity, eDNA, Opak River, snakes, turtles

Abstrak

Sungai Opak adalah salah satu sungai utama yang mengalir di Provinsi DIY dan merupakan habitat bagi reptil seperti kura-kura, kadal dan ular. Environmental DNA (eDNA) merupakan metode yang lebih efisien untuk identifikasi spesies dibandingkan metode konvensional yang memiliki beberapa kekurangan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keanekaragaman reptil di Hulu Sungai Opak dengan menggunakan metode sampling eDNA. Sampel air diambil dari bagian hulu Sungai Opak, kemudian dilakukan filtrasi, ekstraksi dan preservasi DNA, kemudian dilanjutkan PCR dan elektroforesis, sequencing, serta analisis bioinformatik. Hasil analisis eDNA menunjukkan adanya 6 spesies kura-kura dan 33 spesies ular. Metode eDNA dapat menunjukkan hasil yang presisi dalam identifikasi sampel ke tingkat spesies, walaupun masih terdapat false positive dan false negative. Penggunaan eDNA metabarcoding dalam identifikasi keanekaragaman jenis reptil di hulu Sungai Opak dapat dilakukan secara cepat namun kurang efektif. Hal tersebut disebabkan oleh kontaminasi eDNA, kurang spesifiknya target sekuen dan primer untuk monitoring reptil, serta database referensi yang belum lengkap untuk reptil yang habitatnya di dalam dan sekitar perairan sungai di Indonesia.

Kata kunci: Keanekaragaman, eDNA, Sungai Opak, ular, kura-kura

Submitted: 11 September 2023; Revised : 16 July 2024; Accepted : 30 October 2025

Copyright© 2025. Donan Satria Yudha, Rama Yudhistira Ismail, Kinanti Ayurahmawati Pranatami, Dwi Sendi Priyono



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

How to Cite : Yudha, D. S., Ismail, R. Y., Pranatami, K. A., & Priyono, D. S. (2025). Identifikasi Keanekaragaman Reptil Menggunakan Metode eDNA di Bagian Hulu Sungai Opak. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati* 10(3):255-263.

Pendahuluan

Sungai sebagai ekosistem yang dinamis memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi. Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) memiliki banyak aliran sungai, salah satu sungai besarnya adalah Sungai Opak yang mengalir dari Gunung Merapi hingga pantai selatan (Eprilurahman *et al*, 2018). Sungai menjadi rumah bagi berbagai jenis hewan, termasuk kelompok reptil. Reptil yang dapat ditemukan di daerah sungai Yogyakarta antara lain berasal dari Ordo Testudines (kura-kura), Squamata (ular dan kadal), dan Crocodylia (buaya) (Yudha *et al*, 2016a; Yudha *et al*, 2016b).

Penelitian mengenai keanekaragaman reptil sebelumnya pernah dilakukan dengan menggunakan metode *Visual Encounter Survey* (VES) atau secara konvensional (Yudha *et al*, 2016a; Yudha *et al*, 2016b). Namun, metode ini memiliki beberapa keterbatasan, seperti lokasi survei yang sulit diakses dan spesies yang sulit untuk ditemukan (Yudha *et al*, 2016a; Yudha *et al*, 2021). Maka dari itu, diperlukan metode yang lebih efisien sebagai alternatif, seperti metode *environmental DNA* (e-DNA).

Environmental DNA merupakan materi genetik yang terdapat pada sampel lingkungan seperti tanah sedimen, udara, air, dan feses. Metode ini menggunakan sisa materi genetik dari makhluk hidup yang tertinggal pada habitatnya sehingga metode ini dapat mengetahui keanekaragaman makhluk hidup hingga hewan yang sulit ditemukan secara langsung (Davy *et al*, 2015; Adams *et al*, 2019). e-DNA dapat diambil dari sampel alami dan kemudian diawetkan, diesktraksi, diamplifikasi, disekuensi, dan dikategorikan berdasarkan sekuenya (Ruppert *et al*, 2019). Selain itu, penggunaan e-DNA ini juga meminimalisir kerusakan habitat pada saat dilakukannya penelitian. Metode ini sangat cocok sebagai penyaji data pelengkap untuk penelitian keanekaragaman secara tradisional karena kemampuannya untuk mendeteksi spesies langka dan elusif, namun kurang dapat memberi informasi mengenai kualitas populasinya. Pemanfaatan e-DNA untuk monitoring dan identifikasi organisme telah menunjukkan performa dan efektivitas yang baik dalam banyak studi yang telah dilakukan selama 10 tahun terakhir, dan juga menunjukkan

perkembangan yang sangat pesat seiring waktu (Pawlowski *et al*, 2021)

Penelitian keanekaragaman reptil menggunakan eDNA pernah dilakukan di Sungai Code. Pada penelitian tersebut digunakan primer CO1 metazoan universal 313 bp. Hasil penelitian menunjukkan kurang akurat dalam identifikasi spesies, hal tersebut dimungkinkan karena primer target terlalu umum (Yudha, *et al*, 2023). Terkait hal tersebut maka dilakukan penelitian keanekaragaman reptil di sungai menggunakan eDNA kembali, tetapi di Sungai Opak dan dengan primer target berbeda yaitu primer 16S vertebrata 250 bp. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman reptil di Hulu Sungai Opak dengan menggunakan metode eDNA dengan primer 16S vertebrata 250 bp.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Pada penelitian ini, digunakan alat-alat berupa PC atau laptop, botol sampel 1 liter, *coolbox*, *vacuum pump*, *nalgene rapid flow*, *gloves*, gunting, pinset, selang, bunsen, *cryotube* 2 mL, pipet tip, mikropipet, *thermocycler*, *electrophoresis* set, UV Transilluminator, dan platform MiSeq oleh Illumina (Ismail, 2023; Pratanami, 2023).

Adapun bahan-bahan yang digunakan berupa sampel air dari area hulu Sungai Opak sebanyak 2 liter, Alkohol 96%, pemutih atau *bleach* 10%, *Pall membrane* 0,45 μ m, Zymobiomics DNA Shield 150 μ L, Qiagen DNEASY *Blood and Tissue Kit*, fluorosafe, 1,5% agarose gel, 0,6 μ l dari 10 μ M pada *forward* dan *reverse* primer, sebanyak 0,2 μ l dari Biolase taq polymerase (5 U/ μ l), 0,8 μ l dari 50 mM Mg²⁺, serta 1 μ l dari 10 μ M dNTP (Ismail, 2023; Pratanami, 2023).

Metode

1. Pengambilan Sampel Air

Sampel air diambil dari lokasi penelitian, yaitu bagian hulu Sungai Opak pada titik 7°39'25.5"S 110°27'10.8"E, dari bagian tengah sungai yang berarus tidak begitu deras dan tidak begitu dalam. Titik sampling memiliki vegetasi riparian yang bervariasi, mulai dari rerumputan, semak, dan beberapa pohon berkanopi rendah (Gambar 1).



Gambar 1. Lokasi sampling Hulu Sungai Opak, saat pengambilan sampel air untuk analisis eDNA

Sebelum pengambilan sampel, dilakukan observasi lokasi untuk menentukan titik sampling yang paling optimal. Kriteria lokasi yang ideal berupa aliran sungai berarus yang tidak terlalu dangkal dan jauh dari pencemaran. Sampel air diambil secara langsung menggunakan botol steril yang diikatkan pada tali tambang, kemudian dilemparkan ke titik yang telah ditentukan. Sebelum sampel air diambil, dilakukan pembilasan dengan tiga kali pengambilan air sungai yang kemudian dibuang kembali. Hal ini dilakukan untuk membersihkan sisa deterjen dan alkohol dalam botol pada proses sterilisasi. Sampel air lalu diambil sebanyak 2 liter dari bagian tengah sungai, dan disimpan dalam cool box selama transportasi menuju laboratorium (Yudha, et al, 2023).

2. Ekstraksi DNA

Ekstraksi dilakukan dengan tahapan filtrasi dan preservasi DNA terlebih dahulu. Filtrasi dilakukan menggunakan filter *pall membrane* yang dipasangkan pada botol *Nalgene Rapid Flow* yang tersambung pada *vacuum pump*. Hasil filtrasi kemudian diambil, kemudian dipotong dan dimasukkan ke dalam *Cryotube* 2 ml berisi DNA shield. Ekstraksi DNA dari filter kemudian dilakukan menggunakan Qiagen DNEASY Blood and Tissue Kit, sesuai standar dan prosedur dari kit (Yudha, et al, 2023).

3. PCR dan Sequencing

Polymerase Chain Reaction atau PCR dilakukan dengan target sekuen gen 16S

rRNA (\pm 250 bp) dengan primer Vert-16S-eDNA-
F1
(AGACGAGAAGACCCYdTGGAGCTT) sebagai primer *forward* dan Vert- 16S-eDNA-R1 (GATCCAACATCG-AGGTCGTA) sebagai primer *reverse* (Vences et al, 2016). Amplifikasi dilakukan dalam volume total 20 μ l, dengan 0.6 μ l dari 10 μ M primer *Forward* dan *Reverse*, 0.2 μ l Biolase taq polymerase (Bioline) 5 U/ μ l, 0.8 μ l dari 50 mM Mg²⁺, 1 μ l dari 10 μ M dNTP dan 1 μ l *genomic* DNA. Proses PCR dilakukan sebagai berikut: pada 16 siklus awal, dilakukan 10 detik denaturasi pada suhu 95°C, 30 detik *annealing* pada suhu 62°C, dan 60 detik perpanjangan pada suhu 72°C, lalu diikuti dengan 25 siklus pada 46°C untuk *annealing*. Tingkat keberhasilan amplifikasi kemudian diperiksa melalui proses elektroforesis pada gel agarosa 1,5%, dengan pewarnaan Fluorosafe (Leray et al, 2013). Adapun proses *sequencing* dilakukan dengan metode Next Generation Sequencing (NGS) pada platform MiSeq oleh Illumina (Yudha, et al, 2023).

4. Analisis Data

Sampel sekuen eDNA hasil sequencing disiapkan dalam format .fastq, lalu dilakukan tahapan preparasi terlebih dahulu. Preparasi dapat berupa *demultiplexing* untuk memisahkan data sekuen secara individual, *trimming* untuk mendapatkan target sekuen yang diinginkan, serta *quality control* (QC) dan *denoising* untuk menghilangkan data sekuen berkualitas rendah. Analisis kemudian dilanjutkan menggunakan

Kraken2, yang merupakan program untuk menentukan klasifikasi taksonomik berdasarkan kecocokan k-mer pada sampel sekuens dengan *least common ancestor* (LCA) paling rendah (Wood & Salzberg, 2014).

Hasil dan Pembahasan

Keanekaragaman Kura-kura (Ordo Testudines) di Hulu Sungai Opak

Hasil identifikasi keanekaragaman spesies kura-kura menggunakan metode eDNA metagenomik, didapatkan enam spesies kura-kura (Tabel 1). Tabel 1 menunjukkan keanekaragaman spesies kura-kura yang ditemukan, beserta nilai *read classification* dan keterangan persebaran alaminya. Nilai *read classification* menunjukkan jumlah relatif fragmen eDNA pada lokasi pengambilan sampel yang berhasil teridentifikasi. Oleh karena itu, tinggi atau rendahnya nilai *read classification* dapat menjadi indikasi keberadaan spesies yang ditemukan. Adapun keterangan mengacu pada persebaran alaminya yang menjelaskan reptil tersebut merupakan hewan asli atau distribusi spesies secara biogeografis, relatif terhadap lingkup Indonesia dan Pulau Jawa.

Amyda cartilaginea merupakan spesies asli atau memiliki persebaran alami di Indonesia, yang distribusinya meliputi wilayah Sumatera, Jawa, Kalimantan, Bali, dan Lombok (Auliya *et al.* 2016). Adapun *Pelodiscus sinensis* merupakan spesies introduksi yang berasal dari Cina (Yudha *et al.* 2019; Iskandar, 2000). *Pelodiscus sinensis* pada awalnya didatangkan ke Indonesia untuk dikembangbiakkan di penangkaran. Akan tetapi, seiring waktu spesies ini terintroduksi ke perairan Sumatera dan Jawa, baik secara sengaja maupun tidak. Penelitian Muslim (2017), *Amyda cartilaginea* ditemukan di berbagai aliran sungai di wilayah DIY, termasuk Sungai Opak, sedangkan *Pelodiscus sinensis* juga ditemukan di sungai-sungai lain, yaitu Sungai Progo dan Tinalah. Berdasarkan hasil penelitian, kura-kura tempurung lunak anggota familia Trionychidae, terutama *Amyda cartilaginea* adalah yang paling sering dijumpai

di ekosistem sungai wilayah DIY (Yudha *et al.*, 2020).

Ditemukannya *Carettochelys insculpta*, *Podocnemis unifilis*, *Sternotherus depressus*, dan *Mauremys leprosa* di bagian hulu Sungai Opak memiliki implikasi menarik, mengingat Yogyakarta dan bahkan seluruh Pulau Jawa bukanlah habitat asli dari spesies ini. Selain itu, belum pernah ada literatur yang menjelaskan adanya indikasi pelepasan ataupun introduksi layaknya *Pelodiscus sinensis*. Hasil ini tentunya dapat berupa *false positive*, yang berarti terjadi kesalahan dalam sekuens DNA, baik dikarenakan fragmen sekuens yang tidak lengkap, ataupun primer yang tidak cukup spesifik untuk membedakan spesies kura-kura berdasarkan region nukleotida yang terskuens. Selain itu, *false positive* secara umum juga dapat terjadi akibat kontaminasi sampel dan galat dalam penggunaan alat analisis bioinformatika (Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016; Garrido-Sanz *et al.*, 2022).

Dalam kasus *Carettochelys insculpta* dan *Podocnemis unifilis*, hal ini mungkin saja terjadi mengingat statusnya sebagai spesies kura-kura yang banyak diperjualbelikan, serta status Yogyakarta sebagai wilayah yang berperan penting dalam simpul perdagangan satwa liar (Hidayat, 2019; Putranto *et al.*, 2016). Laporan perdagangan satwa oleh Burgess dan Lilley (2014) menemukan setidaknya 11 kasus perdagangan *Carettochelys* melalui internet yang terjadi di Indonesia, dengan beberapa kasus ditemukan di Yogyakarta. Selain itu, sebanyak 13 kali penyitaan telah dilaporkan terjadi di Jakarta, Surabaya, dan Yogyakarta, yang melibatkan sebanyak 25.685 individu *Carettochelys*. Pada penelitian oleh Putranto *et al.* (2016) mengenai keanekaragaman reptil impor di Yogyakarta mencatat *Podocnemis unifilis* sebagai salah satu dari 44 spesies kura-kura asing yang diperjualbelikan di Yogyakarta, dengan sebanyak 7 individu tercatat dalam kurun waktu penelitian. Adapun hasil survei ke blok reptil di Pasar Satwa dan Tanaman Hias Yogyakarta (PASTY) menemukan setidaknya satu toko (tidak semua toko buka pada saat survei) yang menjual langsung *Podocnemis unifilis*. Adapun hasil survei melalui aplikasi Tokopedia menemukan setidaknya ada tiga toko di Yogyakarta yang memiliki stok.

Tabel 1. Keanekaragaman jenis kura-kura di bagian Hulu Sungai Opak menggunakan metode eDNA

No.	Suku (Familia)	Spesies	Read Classification	Keterangan
1	Trionychidae	<i>Pelodiscus sinensis</i>	17	Asing
2		<i>Amyda cartilaginea</i>	1	Lokal (Jawa)
3	Carettochelyidae	<i>Carettochelys insculpta</i>	16	Lokal (Luar Jawa)
4	Podocnemididae	<i>Podocnemis unifilis</i>	15	Asing
5	Kinosternidae	<i>Sternotherus depressus</i>	27	Asing
6	Geoemydidae	<i>Mauremys leprosa</i>	36	Asing

Podocnemis unifilis pada saat penelitian ini dilakukan. Melihat paparan kasus di atas, bukanlah tak mungkin apabila pernah ada individu dari kedua spesies ini yang lepas di sekitar area tempat sampel diambil, baik secara disengaja maupun tidak. Kemungkinan lain ialah keberadaan peternakan atau penangkaran kura-kura ilegal yang memiliki sistem air terbuka di wilayah yang lebih tinggi dari lokasi pengambilan sampel, sehingga materi genetik dari kura-kura tersebut dapat terbawa arus dan masuk ke dalam sampel air sungai yang diambil.

Walaupun nilai *read classification*-nya relatif tinggi, ditemukannya *Sternotherus depressus* dan *Mauremys leprosa* merupakan suatu kejanggalan, terutama *Sternotherus depressus* yang merupakan spesies langka dengan habitat alami yang terisolasi pada satu sistem sungai di Alabama, Amerika Serikat (Lovich & Gibbons, 2021). Selain ketiadaan data mengenai penemuannya di Pulau Jawa, status konservasi dan kebijakan pemerintah di habitat asli kedua spesies melarang adanya upaya perdagangan spesies secara internasional, sehingga kemungkinan untuk adanya individu yang lepas di alam melalui jalur perdagangan sangatlah kecil (Bertolero & Busack, 2017; van Dijk, 2011). Walau begitu, terdapat beberapa spesies dari Genus *Sternotherus* dan *Mauremys* yang tercatat memang diperdagangkan di Yogyakarta. Spesies ini berupa *Sternotherus carinatus*, *Sternotherus odoratus*, *Mauremys sinensis*, *Mauremys reevesii*, dan *Mauremys japonica*. Apabila terdapat individu dari *Sternotherus* sp. dan *Mauremys* sp. yang terlepas di sekitar wilayah pengambilan sampel, maka hasil yang ditemukan mungkin saja berupa *false positive* dari fragmen DNA yang salah teridentifikasi. Mengingat keterbatasan metode eDNA yang tidak dapat menjamin 100% kualitas ekstrak DNA dari sampel, kesalahan dalam identifikasi bisa saja terjadi. Selain itu, dimungkinkan karena banyaknya

homoplasy pada karakter morfologi, banyaknya hibridisasi generasi yang tumpang-tindih, serta karakter diagnostik yang dapat sewaktu-waktu berubah akibat faktor lingkungan sehingga menyebabkan kajian studi kekerabatan pada taksa rendah kura-kura termasuk *Sternotherus* menjadi terbaca pada eDNA penelitian ini (Scott et al, 2018).

Keanekaragaman Jenis Ular (Ordo Squamata, Subordo Serpentes) di Hulu Sungai Opak

Tabel 2. menunjukkan keanekaragaman spesies ular yang ditemukan, beserta nilai *read classification* dan keterangan persebaran alaminya. Tinggi atau rendahnya nilai *read classification* dapat menjadi indikasi keberadaan spesies yang ditemukan. Adapun keterangan mengacu pada persebaran alaminya apakah merupakan hewan asli atau distribusi spesies secara biogeografis, relatif terhadap lingkup Indonesia dan Pulau Jawa.

Berdasarkan hasil pada Tabel 2 tersebut hanya *Homalopsis buccata* dan *Python bivittatus* yang tercatat persebaran alaminya di Indonesia (Uetz et al, 2023). *Python bivittatus* memiliki habitat hidup di hutan lembab, hutan hujan tropis, daerah rawa, dan sekitar sesuai sungai dan danau, sedangkan *Homalopsis buccata* memiliki habitat alami di genangan air dangkal, rawa, sungai, daerah tepi perairan (Uetz et al, 2023). Kedua habitat spesies ular ini sesuai dengan karakteristik titik sampling penelitian.

Berdasarkan hasil wawancara dengan Bapak Susilo Irwanjasmoro selaku pegiat satwa yang berdomisili di Yogyakarta, terdapat 1 spesies introduksi yaitu *Crotalus catalinensis* dari familia Viperidae, hewan asli Meksiko (Uetz et al, 2023) yang diperdagangkan sebagai hewan koleksi. Menurut beliau, spesies ini, beserta *Oligodon ocellatus*, *Pseudechis papuanus* dan *Morella spilota* mungkin teridentifikasi di Hulu Sungai Opak.

Tabel 2. Keanekaragaman jenis ular di bagian Hulu Sungai Opak menggunakan metode eDNA.

No.	Suku (Familia)	Spesies	Read Classification	Keterangan
1	Colubridae	<i>Hemorrhois hippocrepis</i>	39	Asing
2		<i>Dryocalamus davisonii</i>	27	Asing
3		<i>Lytorhynchus diadema</i>	1	Asing
4		<i>Oligodon cinereus</i>	2	Asing
5		<i>Oligodon ocellatus</i>	1	Asing
6		<i>Pantherophis guttatus</i>	4	Asing
7		<i>Coluber constrictor</i>	1	Asing
8		<i>Pseudoxenodon macrops</i>	1	Asing
9		<i>Thamnophis sirtalis</i>	1	Asing
10	Dipsadidae	<i>Oxyrhopus petolarius</i>	6	Asing
11		<i>Synophis bicolor</i>	5	Asing
12		<i>Leptodeira septentrionalis</i>	3	Asing
13		<i>Contia tenuis</i>	3	Asing
14		<i>Tachymenis peruviana</i>	2	Asing
15		<i>Philodryas psammophidea</i>	1	Asing
16		<i>Erythrolamprus mimus</i>	1	Asing
17	Viperidae	<i>Siphlophis ayauma</i>	1	Asing
18		<i>Protobothrops jerdonii</i>	10	Asing
19		<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	1	Asing
20		<i>Sistrurus catenatus</i>	3	Asing
21		<i>Porthidium nasutum</i>	3	Asing
22		<i>Bothrops erythromelas</i>	2	Asing
23	Lamprophiidae	<i>Crotalus catalinensis</i>	1	Asing
24		<i>Lycophidion laterale</i>	8	Asing
25		<i>Homalopsis buccata</i>	2	Lokal (Jawa)
26		<i>Hydrophis schistosus</i>	2	Asing
27		<i>Pseudechis papuanus</i>	1	Lokal (Luar Jawa)
28	Typhlopidae	<i>Anilius pilbarensis</i>	10	Asing
29		<i>Anilius bituberculatus</i>	3	Asing
30	Leptotyphloidae	<i>Leptotyphlops scutifrons</i>	2	Asing
31	Pythonidae	<i>Python bivittatus</i>	1	Lokal (Jawa)
32		<i>Morelia spilota</i>	1	Asing
33	Boidae	<i>Acrantophis madagascariensis</i>	1	Asing

Hal ini dikarenakan keempat spesies ini banyak diperdagangkan di Yogyakarta sebagai hewan koleksi peliharaan. Keempat spesies ini mungkin saja terlepas di sekitar wilayah *sampling*. Sehingga jaringan kulit, kotoran, atau hasil ekskresi lain yang ditinggalkan oleh spesies tersebut mungkin terbawa ke aliran sungai. Alternatif lain adalah buangan limbah kotoran dari spesies ini yang dibuang pemelihara ke sungai. Hal ini juga dikonfirmasi oleh drh. Budi Pranomo selaku dokter hewan di salah satu kebun binatang di Yogyakarta. Beliau juga menambahkan, bahwa spesies *Crotalus cataliensis* dipelihara di kebun binatang sebagai koleksi pribadi pemilik kebun binatang untuk beberapa waktu.

Sementara itu *Python bivittatus* dan *Homalopsis buccata* yang telah terkonfirmasi ada dalam penelitian sebelumnya (Yudha *et al*,

2016) dan kemungkinan besar ada di Hulu Sungai Opak berdasarkan wawancara dengan narasumber, memiliki nilai *read classification* yang sangat rendah. Dengan *Python bivittatus* sebanyak 2 fragmen dan *Homalopsis buccata* sebanyak 1 fragmen. Sedangkan pembacaan nilai *read classification* tertinggi, yakni *Hemorrhois hippocrepis* (39 fragmen) dan *Dryocalamus davisonii* (27 fragmen) justru merupakan spesies yang tidak tersebar di Asia (Uetz *et al*, 2023).

Kesalahan pembacaan identifikasi dapat terjadi karena adanya *false positive* dan *false negative* ketika dilakukan pengolahan data menggunakan perangkat lunak. *False positive* terjadi apabila pada spesies teridentifikasi, namun seharusnya spesies tersebut tidak ada di Sungai Opak. Hal ini dapat terjadi karena adanya kontaminasi DNA dari mahluk hidup

lain yang terbawa oleh air, angin, atau vector lain yang membawa DNA yang terpreservasi dengan baik. Adapun *false negative* terjadi apabila spesies yang seharusnya berhabitat di Sungai Opak justru tidak terdeteksi. Hal ini dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti degradasi DNA dalam air akibat adanya sinar UV, ataupun faktor fisikokimia lainnya. *False positive* juga dapat disebabkan oleh sekuen DNA yang belum terdaftar pada GenBank, atau gen target yang digunakan tidak cukup spesifik. Panjang sekuen gen target yang digunakan juga relatif pendek (± 250 bp), sehingga sampel sekuen justru teridentifikasi sebagai spesies terdekat dengan genom serupa (Garrido-Sanz *et al*, 2022; Yudha *et al*, 2021). Selain itu, beberapa studi e-DNA juga melaporkan bahwa meskipun metode e-DNA memiliki keunggulan di biaya dan waktu, penggunaan metode ini untuk deteksi dan identifikasi reptil cenderung kurang sensitif dibandingkan dengan sampling konvensional (Nordstrom *et al*, 2022).

Simpulan dan Saran

Teridentifikasi 6 spesies kura-kura dari 5 suku (familia) berbeda, dan 33 spesies ular dari 11 suku (familia) yang berbeda pada penelitian ini. Metode eDNA terbukti dapat digunakan sebagai alternatif metode konvensional untuk mengetahui keanekaragaman reptil di ekosistem sungai, dengan hasil identifikasi yang jauh lebih presisi. Walau begitu, hasil deteksi spesies yang ditemukan dalam penelitian ini masih belum akurat, yang dibuktikan oleh keberadaan *false positive* dan *false negative* pada hasil identifikasi. Metode eDNA dalam monitoring biodiversitas ekosistem sungai di Indonesia dapat dimaksimalkan dengan memperkuat beberapa variabel penelitian, yaitu primer dan gen target yang lebih spesifik, serta lingkup pengambilan sampel yang lebih luas. Terkait penelitian keanekaragaman reptil di Indonesia menggunakan metode eDNA, sementara ini sebaiknya di verifikasi menggunakan metode visual karena terbatasnya *database* molekuler jenis-jenis reptil Indonesia.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada Fakultas Biologi UGM yang telah memberikan dana penelitian melalui program Hibah Kolaborasi Dosen dan Mahasiswa tahun 2022.

Daftar Pustaka

- Adams, C. I. M., Hoekstra, L. A., Mell, M. R., Janzen, F. J. (2019). A Brief Review of Non-Avian Reptile Environmental DNA (e-DNA), with a Case Study of Painted Turtle (*Chrysemys picta*) e-DNA Under Field Conditions. *Diversity*, 11(50): 1-22.
- Auliya, M., van Dijk, P.P., Moll, E.O. & Meylan, P.A. (2016). Amyda cartilaginea (Boddart 1770) – Asiatic Softshell Turtle, Southeast Asian Softshell Turtle. *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. A.G.J. Rhodin, P.C.H. Pritchard, P.P. van Dijk, R.A. Saumure, K.A. Buhlmann, J.B. Iverson, and R.A. Mittermeier, Eds. Chelonian Research Monographs (ISSN 1088-7105) No.5: 092.1-092.17.
- Bertolero, A. & Busack, S.D. (2017). *Mauremys leprosa* (Schoepff in Schweigger 1812) – Mediterranean Pond Turtle, Spanish Terrapin, Mediterranean Stripe-necked Terrapin. *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. A.G.J. Rhodin, J.B. Iverson, P.P. van Dijk, K.A. Buhlmann, P.C.H. Pritchard, and R.A. Mittermeier, Eds. Chelonian Research Monographs (ISSN 1088-7105) No.5: 102.1-102.19.
- Burgess, A.B. & Lilley, R.. (2014). Assessing the Trade in Pig-nosed Turtles *Carettochelys insculpta* in Papua, Indonesia. *TRAFFIC* Petaling Jaya, Selangor, Malaysia. Pp. 18-19
- Davy, C.M., Kidd, A.G., & Wilson, C.C. (2015). Development and Validation of Environmental DNA (eDNA) markers for detection of freshwater turtles. *PLoS ONE*, 10(7): e0130965.
- Eprilurahman, R., Muslim, S.N., & Yudha, D.S. (2018). Amyda cartilaginea: Labi-labi yang masih bertahan di Daerah Istimewa Yogyakarta. *Warta Herpetofauna*, X(3): 56-58.
- Garrido-Sanz, L., Senar, M. À., Piñol, J. (2022). Drastic reduction of false positive species in samples of insects by intersecting the default output of two popular metagenomic classifiers. *PLoS ONE*, 17(10): e0275790
- Hidayat, A.A. (2019). *Peran Balai Konservasi Sumber Daya Alam (BKSDA) dalam Perlindungan*

- Satwa Dilindungi di Yogyakarta.* (Bachelor's thesis). Fakultas Hukum, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Iskandar, D.T. (2000). *Kura-kura dan Buaya Indonesia dan Papua Nugini, Dengan Catatan Mengenai Jenis-jenis di Asia Tenggara.* PALMedia Citra. Bandung. Hal. 77-92.
- Ismail, R.Y. (2023). *Identifikasi Keanekaragaman Kura-kura dengan Metode eDNA Metabarcoding di Bagian Hulu Sungai Opak, Daerah Istimewa Yogyakarta.* (Bachelor's thesis). Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Lacoursière-Roussel, A., Dubois, Y., Normandeau, E., Bernatchez, L., Adamowicz, S. (2016). Improving Herpetological Surveys in Eastern North America Using The Environmental DNA Method. *Genome*, 59: 991-1007.
- Lovich, J.E. & Gibbons, W. (2021). *Turtles of the World: A Guide to Every Family.* Princeton (New Jersey): Princeton University Press.
- Muslim, S.N. (2017). *Keanekaragaman Jenis dan Distribusi Testudinata Air Tawar di Sungai-Sungai Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta.* Laporan Seminar Sarjana Strata S1 Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.
- Nordstrom, B., Mitchell, N., Byrne, M., Jarman, S. (2022). A review of applications of environmental DNA for reptile conservation and management. *Ecology and Evolution*, 2022(12): 1-14.
- Pawlowski, J., Bonin, A., Boyer, F., Cordier, T., Taberlet, P. (2021). Environmental DNA for biomonitoring. *Mol Ecol*, 30(13): 2931-2936.
- Pratanami, K.A. (2023). *Identifikasi Keanekaragaman Jenis Ular Menggunakan Metode eDNA di Bagian Hulu Sungai Opak Daerah Istimewa Yogyakarta.* (Bachelor's thesis). Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Putranto, D.I., Yuda, P., & Zahida, F. (2016). Keanekaragaman Reptil Impor di Yogyakarta. *Biota*, 1(3): 117-125.
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (e-DNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global e-DNA. *Global Ecology and Conservation*, 17(2019): 1-30.
- Scott, P.A., Glenn, T.C. & Rissler, L.J. (2018). Resolving taxonomic turbulence and uncovering cryptic diversity in the musk turtles (*Sternotherus*) using robust demographic modeling. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 120(2018): 1-15.
- Uetz, P., Freed, P., Aguilar, R., Reyes, F. & Hošek, J. (eds.) (2023). *The Reptile Database*, <http://www.reptile-database.org> accessed on July 17th 2023.
- van Dijk, P.P. (2011). *Sternotherus depressus.* The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T20824A97383753.
- <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T20824A9231032.en>
- Vences, M., Lyra, M.L., Perl, R.G.B., Bletz, M.C., Stankovic, D., Lopes, C.M., Jarek, M., Bhuju, S., Geffers, R., Haddad, C.F.B. & Steinfartz, S. (2016). Freshwater vertebrate metabarcoding on Illumina platforms using double-indexed primers of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Conservation Genetics Resources*, 8: 323-327.
- Yudha, D.S., Eprilurahman, R., Pratiwi, R., Muhtianda, I.A., Arimbi, A., & Asti, H.A. (2016a). Snakes and lizards (Reptilia: Squamata) of the Opak River area, province of Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia. Proceedings of the 4th International Conference of Biological Sciences of the Faculty of Biology Universitas Gadjah Mada. *AIP Conference Proceedings* 1744: 020013-1-020013-8.
- Yudha, D.S., Eprilurahman, R., Jayanto, H., Wiryawan, I. F. (2016b). Keanekaragaman Jenis Kadal dan Ular (Squamata: Reptilia) di Sepanjang Sungai Code, Daerah Istimewa Yogyakarta. *Biota*, 1(1): 31-38.
- Yudha, D.S., Eprilurahman, R., Irwanjasmoro, S., & Supramono, Y. (2019). Survei awal analisa habitat ditemukannya labi-labi bintang (Chitra chitra) di Sungai Sempor, Sleman, DIY. *Warta Herpetofauna*, XI(1): 25-33.
- Yudha, D.S., Priyono, D.S., Izzati, R., Ardianto, A.S. & Nainggolan, A.P. (2021). Comparising DNA extraction from environmental DNA samples to reveal the diversity of freshwater metazoans. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*. 9(2): 206-212.
- Yudha, D.S., Izzat, R., Ardianto, A.S., Nainggolan, A.P. & Priyono, D.S. (2023). Monitoring the Diversity of Amphibians and Reptiles In the Upstream of Code River Using eDNA Method. *Berkala Ilmiah Biologi*, 14 (1): 8-20.