

Monitoring Keanekaragaman Amfibi dan Reptil di Bagian Hulu Sungai Code Menggunakan Metode *environmental DNA*

Monitoring the Diversity of Amphibians and Reptiles In the Upstream of Code River Using eDNA Method

Donan Satria Yudha^{1,*}, Rahma Izzati², Aulia Sigit Ardianto², Ananto Puradi Nainggolan², Dwi Sendi Priyono¹

¹Laboratory of Animal Systematics, Universitas Gadjah Mada, Faculty of Biology, Department of Tropical Biology, Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Sleman, Yogyakarta, Indonesia, 55281;

²Herpetology Study Club, Universitas Gadjah Mada, Faculty of Biology, Department of Tropical Biology, Jl. Teknik Selatan, Sleman, Indonesia, 55281;

*Corresponding Author: donan_satria@ugm.ac.id

Abstrak: Penelitian mengenai keanekaragaman jenis amfibi dan reptil di bagian hulu Sungai Code telah dilakukan di tahun 2012 dan 2017. Hasil dua penelitian terdahulu dijumpai anura, ular dan kadal tetapi tidak dijumpai kura-kura air tawar. Metode yang digunakan pada penelitian tahun 2012 dan 2017 adalah konvensional menggunakan metode *Visual Encounter Survey* (VES). Metode konvensional seperti VES memiliki keterbatasan yaitu ketidakmampuan untuk mendata hewan yang sukar dijumpai seperti kura-kura air tawar. Oleh karena itu, pendekatan terbaru dilakukan untuk memonitor keanekaragaman amfibi dan reptil terutama untuk mendeteksi keberadaan kura-kura air tawar di Sungai Code. Pendekatan terbaru tersebut dengan menggunakan metode *environmental DNA* (eDNA). Tujuan penelitian ini adalah memonitor keanekaragaman amfibi dan reptil serta untuk mengungkap efisiensi sampling eDNA dibandingkan sampling VES. Proses metabarcoding eDNA dilakukan dengan primer CO1 universal terhadap sampel air yang diambil dari wilayah hulu Sungai Code. Hasil yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan data dari penelitian konvensional yang dilakukan tahun 2012 dan 2017. Hasil penelitian tahun 2021 didapatkan 12 spesies amfibi tetapi semua spesies tersebut tidak memiliki persebaran alami di Yogyakarta bahkan di Indonesia. Selanjutnya, didapatkan 5 spesies ular dengan hanya 1 spesies ular yang persebaran alaminya di Yogyakarta. Kemudian didapatkan 6 spesies kadal yang persebaran alaminya tidak ada di Yogyakarta bahkan di Indonesia. Terakhir didapatkan data 1 spesies kura-kura darat yang persebaran alaminya tidak ada di Yogyakarta bahkan di Indonesia. Sejangkau ini, di Indonesia identifikasi spesies amfibi dan reptil di sungai menggunakan metode eDNA menunjukkan hasil yang kurang akurat. Sekuens target yang digunakan dalam penelitian ini tidak memiliki perbedaan yang signifikan diantara spesies reptil dan amfibi, sehingga herpetofauna yang terekam di Sungai Code tidak teridentifikasi menggunakan metode eDNA. Berdasarkan penelitian ini, pengambilan sampel secara konvensional direkomendasikan untuk pemantauan herpetofauna di wilayah sungai.

Kata kunci: Monitoring; Amfibi; Reptil; Sungai Code; eDNA

Abstract: Research on the diversity of amphibians and reptiles on the upstream part of Code River was done in 2012 and 2017. Two previous research found anurans, snakes, and lizards, but did not find any freshwater turtles. The method used in the 2012 and 2017 research was conventional, using a Visual Encounter Survey (VES) with the limitation, of an inability to detect difficult-to-find animals such as freshwater turtles. Therefore, a new approach was taken to monitor the diversity of amphibians and reptiles, especially to detect freshwater turtles in the Code River, namely the environmental DNA (eDNA) method. This research aimed to monitor the diversity of amphibians and reptiles and to reveal eDNA sampling efficiency compared to VES. An eDNA metabarcoding process was conducted with universal CO1 primer on the water sample taken from the upstream part of Code River. The results obtained were compared to the data from conventional studies held in 2012 and 2017. In 2021, the research found twelve species of amphibians but none of these species were naturally distributed in Yogyakarta or even in Indonesia. Furthermore, five species of snakes were found, but only one species of them was naturally found in Yogyakarta. Subsequently, six species of lizards did not exist in Yogyakarta or even in

Indonesia. Lastly, one species of tortoise did not exist in Yogyakarta or even in Indonesia. By far, in Indonesia, the identification of amphibian and reptile species in rivers using the eDNA method has shown less accurate results. The inaccuracy may be due to the lack of specificity of the sequence targets and primers for monitoring reptiles and amphibians in rivers. The target sequences used in this study did not have significant differences between species in reptiles and amphibians, so the herpetofauna recorded in the Code River were not identified using the eDNA method. Based on this research, conventional sampling is recommended for monitoring herpetofauna in river areas.

Keywords: Monitoring, Amphibians; Reptiles; Code River, eDNA

Dikumpulkan: 17 Juni 2022 Direvisi: 5 November 2022

Diterima: 14 April 2023

Dipublikasi: 16 April 2023

Pendahuluan

Penelitian mengenai keanekaragaman amfibi dan reptil di Sungai Code telah dilakukan di tahun 2012 (Yudha *et al.*, 2012; Yudha, *et al.*, 2013; Yudha, *et al.*, 2016a) dan di tahun 2017 (Yudha, *et al.*, 2019; Muslim, 2017; Putra, 2017; Putra, 2019). Pada penelitian keanekaragaman amfibi di hulu Sungai Code tahun 2012 didapatkan 4 kelompok takson tingkat familia dengan 7 spesies, sedangkan di tahun 2017 didapatkan 4 familia dengan 7 spesies. Sedangkan keanekaragaman reptil di hulu Sungai Code tahun 2012, didapatkan 4 spesies kadal yang tergolong dalam 4 familia dan 8 spesies ular dalam 4 familia (Yudha *et al.*, 2016a). Pada penelitian tahun 2012 dan 2017 digunakan metode *Visual Encounter Survey* (VES). Selain itu, pada survei di hulu Sungai Code yang dilakukan tim herpetofauna, tampak jenis ular akuatik yang dimungkinkan genus *Enhydria* tetapi tidak tertangkap dan tidak teridentifikasi hingga tingkat spesies.

Dua penelitian sebelumnya menggunakan metode VES tetapi belum mampu untuk mengungkap semua spesies amfibi dan reptil di hulu Sungai Code, sehingga di penelitian kali ini, digunakan metode *environmental DNA* (eDNA). eDNA merupakan materi genetik yang berasal dari berbagai bagian tubuh organisme dan materi tersebut terlepas kemudian melekat di lingkungan seperti tanah sedimen, udara, air, dan feses (Taberlet, 2018 dalam Adams *et al.*, 2019). Metode eDNA dalam studi dan monitoring keanekaragaman hewan tergolong baru, namun memungkinkan adanya survei yang tidak terbatas pada taksonomi dan dapat mengungkap spesies kecil dan sukar ditangkap dengan cara konvensional (Rupert *et al.*, 2019).

Dalam waktu kurun waktu 5 tahun, kondisi hulu Sungai Code mengalami perubahan, maka setelah 5 tahun berlalu dari tahun 2017, perlu diadakan penelitian kembali untuk memonitor keanekaragaman amfibi dan reptil di hulu Sungai Code. Monitoring tahun ini, digunakan metode *environmental DNA* (eDNA) dengan sampel yang didapatkan dari air sungai.

Tujuan dari penelitian ini yaitu: (1) untuk monitoring keanekaragaman amfibi dan reptil di bagian hulu Sungai Code, (2) menggunakan metode berbeda yaitu eDNA guna mengungkap spesies bertubuh kecil, penyembunyi yang sukar diobservasi, dan (3) mengetahui performa atau akurasi metode eDNA dalam mengungkap keanekaragaman amfibi dan reptil, serta (4) membandingkan hasil *sampling* yang telah dilakukan pada tahun 2012 dan 2017 dengan penelitian ini.

Bahan dan Metode

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan berupa *vacuum pump*, *nalgene rapid flow*, *gloves*, *gunting*, *tweezer*, *bunsen*, *cryotube* 2 mL, air dari lokasi *sampling*, *bleach* 10%, *alkohol* 96%, *membran filter polikarbonat* 0.4 μm (*Sterlitech™, USA*)

Metode

1. Pengambilan Sampel

Sampel eDNA dikoleksi secara langsung dari kolom air Sungai Code dengan botol yang telah disterilkan. Kolom air ditentukan berupa badan air dengan kedalaman minimal 1 meter dengan arus alir mengalir lancar. Air dikoleksi sebanyak 4 liter. Kemudian, air disaring dengan membran filter polikarbonat 0.4 μm (*Sterlitech™, USA*) menggunakan bantuan pompa peristaltik. Kertas filter kemudian

dikeluarkan dan dipotong 2 lalu tiap potongan dimasukkan ke *cryotube* 2 mL yang telah diisi oleh DNA shield 1 mL. Sampel kemudian dikemas dan dikirim ke PT. Oceanogen Baruga Indonesia untuk dianalisis lebih lanjut.

2. Ekstraksi DNA sampel

Langkah ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan DNA Extraction Kits Geneaid gSYNC mengikuti panduan produk. DNA yang diekstraksi kemudian diamplifikasi menggunakan PCR dengan primer mlCOIintF (GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYC) dan dgHCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAAYCA) berdasarkan Leray, et al, (2013). Langkah PCR pertama menggunakan 13 µL MyTaq Red Mix (Bioline), masing masing 1 µL dari 1 nM primers (F and R), 8 µL ddH₂O, dan 2 µL Template DNA. Langkah PCR pertama dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 1. Pengaturan siklus PCR pertama

No	Reaksi	Suhu	Waktu	Siklus
1.	<i>Pre-Denaturation</i>	95°C	5 menit	1
2.	<i>Denaturation</i>	98°C	30 detik	35
3.	<i>Annealing</i>	42°C		
4.	<i>Extension</i>	72°C		
5.	<i>Final Extension</i>	72°C	5 menit	1

Adapun pengaturan tiap siklus untuk PCR kedua adalah sebagai berikut (Tabel 2).

Tabel 2. Pengaturan siklus PCR kedua

No	Reaksi	Suhu	Waktu	Siklus
1.	<i>Pre-Denaturation</i>	95°C	5 menit	1
2.	<i>Denaturation</i>	95°C	30 detik	9
3.	<i>Annealing</i>	55°C		
4.	<i>Extension</i>	72°C		
5.	<i>Final Extension</i>	72°C	5 menit	1

3. Analisis Data

Sekuens DNA disejajarkan dan primer dipangkas menggunakan Geneious Prime 2020.1.2 (Biomatters, Auckland, Selandia Baru, <http://www.geneious.com/>). Identifikasi taksonomi dari urutan OTU dilakukan menggunakan RDP Classifier MIDORI. Output diimpor ke MEGAN Community Edition v6.12.38. Identifikasi taksonomi semua urutan OTU divalidasi secara manual dan identifikasi tingkat spesies ditetapkan jika urutan OTU memiliki kecocokan identitas 100% dengan urutan referensi NCBI. Dalam beberapa kasus di mana beberapa OTU merujuk ke spesies yang sama, sekuens DNA yang sesuai diperiksa secara visual di Geneious Prime 2020.1.2. Selain itu, OTU yang diidentifikasi sebagai manusia dihapus.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian dilakukan di bagian Hulu Sungai Code dengan 1 titik *sampling*. Beberapa penelitian sebelumnya pernah dilakukan penelitian di sungai ini dengan metode *sampling* konvensional. Lokasi titik *sampling* memiliki pepohonan rimbun, aliran air yang tidak terlalu deras dengan kedalaman kurang lebih 1 meter. Area sekitar lokasi *sampling* terdapat pepohonan yang rimbun dan bebatuan di tepian sungai (Gambar 1).



Gambar 1. Kondisi lokasi titik *sampling* Sungai Code bagian hulu tahun 2021

Keanekaragaman Amfibi di Hulu Sungai Code

Berdasarkan hasil analisis data yang ditunjukkan pada tabel 3 terdapat 2 ordo anggota amfibi yang memiliki persebaran di Indonesia terutama wilayah Yogyakarta yaitu Anura dan Gymnophiona. Ordo Anura sendiri ditemukan 8

familia yaitu Microhylidae, Eleutherodactylidae, Craugastoridae, Dendrobatidae, Ptychadenidae, Ranidae, Rhacophoridae, Mantellidae. Sedangkan dari ordo Gymnophiona ditemukan 2 familia yaitu Dermophiidae dan Indotyphlidae. Berdasarkan hasil 8 familia anggota ordo Anura yang diidentifikasi menggunakan eDNA, hanya 3 familia yang memiliki persebaran alami di Yogyakarta yaitu Microhylidae, Ranidae, dan Rhacophoridae dengan 4 genus yang memiliki persebaran serupa yaitu *Microhyla*, *Polypedates*, dan *Rhacophorus*. Hasil analisis yang berupa takson familia dan genus anggota Ordo Gymnophiona tidak memiliki persebaran alami di daerah Yogyakarta. Satu-satunya

Gymnophiona yang terdapat di Pulau Jawa adalah *Ichthyophis hypocyaneus* dengan persebaran di daerah Banten, Pekalongan, Bodogol di sekitar tepi Taman Nasional Gunung Gede Pangrango, dan Taman Nasional Gunung Halimun-Salak. Selain itu, habitat lokasi *sampling* kurang sesuai dengan preferensi spesies yang bersangkutan dimana spesies ini cenderung hidup di daerah sekitar hutan primer dan padang rumput (Borzée *et al.*, 2017). Terdapat juga familia yang tidak ditemukan di Indonesia yaitu Eleutherodactylidae, Craugastoridae, Dendrobatidae, Ptychadenidae, Mantellidae, Dermophiidae, dan Indotyphlidae (Kusrini, 2007; Iskandar, 1998).

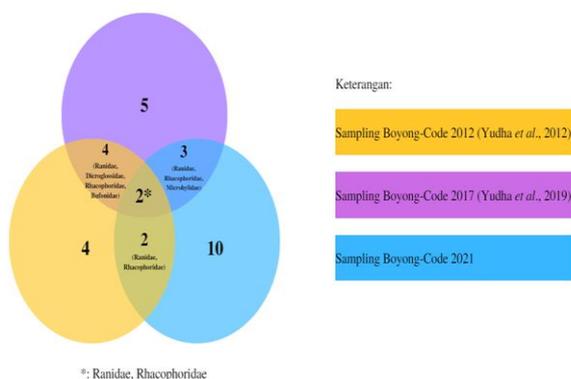
Tabel 3. Hasil penemuan Anura dan Gymnophiona dari Sungai Code menggunakan metode eDNA

No	Familia	Consensus	Spesies	Consensus
Anura				
1.	Ranidae	0.01	<i>Rugosa rugosa</i>	0.0
2.	Rhacophoridae	0.05	<i>Polypedates braueri</i>	0.05
		0.08	<i>Rhacophorus maximus</i>	0.06
3.	Microhylidae	0.04	<i>Microhyla pulchra</i>	0.02
			<i>Microhyla pulchra</i>	0.04
4.	Eleutherodactylidae	0.02	<i>Eleutherodactylus atkinsi</i>	0.02
5.	Craugastoridae	0.04	<i>Craugastor gollmeri</i>	0.04
6.	Dendrobatidae	0.0	<i>Mannophryne trinitatis</i>	0.0
7.	Ptychadenidae	0.0	<i>Ptychadena mascareniensis</i>	0.0
8.	Mantellidae	0.06	<i>Boophis liliana</i>	0.06
Gymnophiona				
9.	Dermophiidae	0.03	<i>Schistometopum gregorii</i>	0.03
10.	Indotyphlidae	0.02	<i>Grandisonia sechellensis</i>	0.02
		0.04	<i>Indotyphlus maharashtraensis</i>	0.04

Berdasarkan *sampling* yang telah dilaksanakan di bagian hulu Sungai Code tahun 2012 dan 2017 (gambar 2 dan tabel 4), ditemukan masing-masing 7 dan 9 spesies total dari 4 familia dan 5 familia berturut-turut. Penelitian tahun 2012 menunjukkan spesies yang paling banyak berasal dari familia Bufonidae yaitu 3 spesies serta yang

paling sedikit berasal dari familia Dicroglossidae dan Rhacophoridae yaitu berjumlah 1 spesies. Penelitian tahun 2017 menunjukkan spesies yang paling banyak berasal dari Bufonidae yaitu 3 spesies dan paling sedikit berasal dari Rhacophoridae dan Microhylidae yaitu 1 spesies. *Sampling* Code 2021 sendiri berhasil

diidentifikasi total 10 familia yang terdiri atas 8 familia Anura dan 2 familia Gymnophiona. Familia yang paling banyak ditemukan yaitu Rhacophoridae yang berjumlah 2 spesies dan yang paling sedikit adalah Ranidae, Microhylidae, Eleutherodactylidae, Craugastoridae, Dendrobatidae, Ptychadenidae, Mantellidae, dan Dermophiidae yaitu 1 spesies (lihat tabel 6 dan gambar 6). Jumlah pembacaan data oleh metode ini dapat diartikan dalam dua makna. Penemuan ini dapat menjelaskan bahwa biomassa taksa yang bersangkutan tinggi di daerah tersebut, aktivitas perkembangbiakan yang tinggi, dan penggunaan air yang intensif. Aktivitas lain seperti predasi atau makan juga memicu lepasnya DNA pada tubuh individu.



Gambar 2. Diagram Venn antara familia yang terdeteksi dan familia yang ditemukan di Yogyakarta

Tabel 4. Perbandingan jumlah familia dari classis Amphibia tahun 2012, 2017 dan 2021 (Yudha *et al.*, 2013; Yudha *et al.*, 2019)

No.	Familia	2012	2017	2021
1.	Ranidae	2	2	1
2.	Dicroglossidae	1	2	0
3.	Rhacophoridae	1	1	2
4.	Bufonidae	3	3	0
5.	Microhylidae	0	1	1

6.	Eleutherodactylidae	0	0	1
7.	Craugastoridae	0	0	1
8.	Dendrobatidae	0	0	1
9.	Ptychadenidae	0	0	1
10.	Mantellidae	0	0	1
11.	Dermophiidae	0	0	1
12.	Indotyphlidae	0	0	2
Jumlah Total Spesies		7	9	12
Jumlah Total Familia		4	5	10

Walaupun eDNA yang dihasilkan banyak dan terdeteksi, individu dapat bersifat kriptik sehingga sulit diamati oleh metode konvensional (Goldberg *et al.*, 2018; Barnes dan Turner, 2016; Bani *et al.*, 2020; McKee *et al.*, 2015). Namun, hal ini dapat juga diartikan sebagai kesalahan dalam metode PCR atau sequencing. Sehingga, perlu metode dan analisis bioinformatik yang tepat sehingga dapat menurunkan resiko kesalahan yang terjadi. Hal ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya yang tidak menemukan taksa-taksa baru seperti Gymnophiona (Li *et al.*, 2021; Yudha *et al.*, 2013; Yudha *et al.*, 2019).

Keanekaragaman Reptil di Hulu Sungai Code

Berdasarkan hasil analisis data yang ditunjukkan tabel 5, ditemukan 5 spesies ular dari 5 familia berbeda. Kolom konsensus menunjukkan hasil identifikasi oleh RDP Classifier MIDORI. Tiga diantaranya tidak tercatat distribusinya di Indonesia, yaitu *Daboia russelii* yang distribusinya di India, Pakistan, Myanmar, Thailand, dan Sri Lanka; *Lichanura trivirgata* yang terdistribusi di Amerika Utara dan Mexico; serta *Achalinus meiguensis* yang distribusinya di China.

Tabel 5. Spesies ular yang ditemukan di Sungai Code pada tahun 2021 dengan metode eDNA (RDP Classifier MIDORI)

No	Familia	Consensus	Spesies	Consensus
1	Elapidae	0.1	<i>Bungarus fasciatus</i>	0.1
2	Colubridae	0.03	<i>Oreocryptophis porphyraceus</i>	0.03
3	Viperidae	0.01	<i>Daboia russelii</i>	0.0
4	Boidae	0.02	<i>Lichanura trivirgata</i>	0.02
5	Xenodermidae	0.04	<i>Achalinus meiguensis</i>	0.04

Sementara itu ular *Oreocryptophis porphyraceus* tercatat ditemukan di Indonesia dengan distribusi alami di Pulau Sumatera. Tetapi ular *Oreocryptophis porphyraceus* tidak pernah ada catatan dijumpai di Pulau Jawa. Ular welang *Bungarus fasciatus* terdistribusi di Indonesia dan tercatat berada di Pulau Jawa. Akan tetapi, sejauh ini ular *Bungarus fasciatus* belum ada rekaman data maupun publikasi yang menjelaskan bahwa ular ini dijumpai di hulu Sungai Code. Familia Boidae yang tercatat berada di Indonesia sendiri hanya dari genus *Candoia* (Das, 2010; Gao, 1991; O'Shea, 2018; Putra, 2019; Yudha *et al.*, 2016a).

Perbandingan hasil dengan metode eDNA tahun 2021 dan *sampling* konvensional tahun 2012 dan 2017 dilakukan pada tingkat familia (tabel 6). Dilihat dari tabel 5, spesies yang didapat pada hasil eDNA yang sebagian besar bukan merupakan spesies dari Indonesia menyebabkan tidak bisa dilakukan perbandingan pada tingkat spesies dan genus. Oleh sebab itu, perbandingan dilakukan pada tingkat familia.

Berdasarkan tabel 5 dan gambar 3 terdapat 4 familia yang tercatat ditemukan di tahun 2021, tetapi tidak ditemukan di tahun 2012 dan 2017. Familia tersebut yaitu Elapidae, Viperidae, Boidae, dan Xenodermidae. Sementara familia yang ditemukan di tahun 2012 dan 2017, tetapi tidak ditemukan kembali di tahun 2021 yaitu Homalopsidae dan Natricidae, sedangkan familia Pythonidae hanya ditemukan di tahun 2012. Terdapat pula 1 familia yang sama yang ditemukan pada tahun 2012, 2017, dan

2021 yaitu Colubridae (Putra, 2019; Yudha *et al.*, 2016a).

Tabel 6. Keanekaragaman familia ular yang ditemukan di Hulu Sungai Code pada tahun 2012 (Yudha *et al.*, 2016a), 2017 (Putra, 2019) dan 2021

No	Familia	2012	2017	2021
1	Elapidae	0	0	1
2	Colubridae	4	9	1
3	Viperidae	0	0	1
4	Boidae	0	0	1
5	Xenodermidae	0	0	1
6	Homalopsidae	1	2	0
7	Natricidae	2	1	0
8	Pythonidae	1	0	0
Jumlah Total Spesies		8	11	5
Jumlah Total Familia		4	3	5



Gambar 3. Diagram Venn perbandingan hasil monitoring ular di Sungai Code pada tahun 2012 (Yudha, *et al.*, 2016), 2017 (Putra, 2019), dan 2021

Tabel 7. Jenis keanekaragaman kura-kura yang ditemukan di Sungai Code pada tahun 2021 dengan metode eDNA (RDP Classifier MIDORI)

No	Familia	Consensus	Spesies	Consensus
1	Geoemydidae	0.06	<i>Heosemys depressa</i>	0.04

Berdasarkan hasil eDNA didapatkan 1 spesies kura-kura dalam sampel air Hulu Sungai Code. Spesies tersebut adalah *Heosemys depressa* yang merupakan anggota familia Geoemydidae (Tabel 7). Familia ini sebelumnya tidak ditemukan selama penelitian konvensional di Hulu Sungai Code. Familia Geoemydidae beranggotakan kura-kura akuatik dan terestrial yang secara alami terdistribusi dari wilayah Asia Tenggara bagian Utara hingga Pulau Jawa (Iskandar, 2000). Dalam familia ini terdapat beberapa genus yang dapat dijumpai di Indonesia yakni *Cyclemis*, *Batagur*, *Callagur*, *Malayemys*, *Notochelis*, *Orlitia*, *Siebenrockiella*, dan *Heosemys*. Dari seluruh genus tersebut, hanya *Siebenrockiella* (*S. crassicollis*) yang tercatat dapat ditemukan secara alami di Pulau Jawa (Iskandar, 2000; Kurniati, 2010; Muslim, 2017). Spesies *H. depressa* sendiri bukan merupakan spesies yang secara alami terdistribusi di Indonesia. Spesies ini merupakan spesies *terrestrial* terdistribusi di Myanmar dan Bangladesh, serta merupakan spesies yang terancam punah dengan status konservasi

Critically Endangered (CR) menurut IUCN Red List (Platt *et al.*, 2020). Penelitian mengenai keanekaragaman familia kura-kura di sungai-sungai DIY, semenjak tahun 2000 hingga 2021 didapatkan dua familia dengan total 3 spesies, yaitu Geoemydidae dengan satu spesies dan Trionychidae dengan dua spesies (Tabel 8).

Tabel 8. Keanekaragaman familia kura-kura yang ditemukan di Hulu Sungai Code pada tahun 2012 (Yudha *et al.*, 2012; Yudha *et al.*, 2017; Muslim, 2017).

No	Familia	2000	2012	2017	2021
1	Geoemydidae	0	0	0	1
2	Trionychidae	2	0	0	0
Jumlah Total Spesies		2	0	0	1
Jumlah Total Familia		1	0	0	1

Sampling konvensional dengan metode VES yang dilakukan pada tahun 2012 dan 2017 hanya berhasil menemukan spesimen kadal dan ular (ordo Squamata) (Yudha *et al.*, 2012; Yudha *et al.*, 2017). Demikian pula dengan studi keanekaragaman konvensional oleh Muslim (2017), yang juga tidak berhasil menemukan spesimen kura-kura setelah beberapa kali melakukan *sampling* VES. Dalam studi tersebut, dilakukan pula wawancara kepada warga lokal yang menunjukkan adanya penemuan 5 individu *Amyda cartilaginea* dan 4 individu *Dogania subplana* pada tahun 2000. Kedua spesies bulus (Familia: Trionychidae) tersebut berdasarkan wawancara diperoleh oleh warga secara tidak sengaja, baik terekspos saat air sungai surut, terbawa arus banjir, atau terjatuh kail saat warga memancing. Menurut studi keanekaragaman yang telah dilakukan di Sungai Code hingga tahun 2021, hanya bulus (Familia: Trionychidae) saja yang diketahui terdapat di Sungai Code terutama oleh pengakuan warga setempat (Muslim, 2017; Yudha *et al.*, 2018).



Gambar 4. Diagram Venn perbandingan hasil monitoring kura-kura di Sungai Code pada tahun 2012 (Yudha, *et al.*, 2012; Yudha *et al.*, 2017; Muslim, 2017)

Hasil penelitian dengan metabarcoding eDNA ini tidak koheren dengan hasil studi keanekaragaman konvensional sebelumnya.

Sejauh ini, hanya familia Trionychidae yang diketahui hidup secara alami di Sungai Code, walaupun spesimen hidupnya sendiri belum berhasil didapatkan dari *sampling* konvensional sejauh ini. Keberadaan familia Geoemydidae di Sungai Code belum pernah tercatat sebelumnya, baik melalui *sampling* konvensional, wawancara dengan warga, maupun perdagangan (Kurniati, 2010; Muslim, 2017). Dua penelitian tentang jenis kura-kura di Sungai Code pada tahun yang berbeda, mendapatkan hasil yang berbeda jauh (Gambar 4). Penelitian tahun 2000 hanya didapatkan anggota familia Trionychidae sedangkan di tahun 2021 didapatkan anggota familia Geoemydidae.

Tabel 9. Spesies kadal yang ditemukan di Sungai Code pada tahun 2021 dengan metode eDNA (RDP Classifier MIDORI)

No	Familia	Consensus	Spesies	Consensus
1	Agamidae	0.05	<i>Pogona vitticeps</i>	0.02
2	Agamidae	0.05	<i>Pseudotrapelus sinaitus</i>	0.05
3	Gekkonidae	0.2	<i>Cyrtodactylus lomyenensis</i>	0.15
4	Gekkonidae	0.02	<i>Lygodactylus blancae</i>	0.02
5	Gekkonidae	0.11	<i>Uroplatus ebenauai</i>	0.08
6	Scincidae	0.02	<i>Voeltzkowia lienata</i>	0.02

Keanekaragaman kadal yang terdeteksi dari sampel air yaitu 3 familia kadal dengan nama Agamidae, Gekkonidae, dan Scincidae. Ketiganya merupakan familia kosmopolitan yang umum dijumpai di berbagai habitat terutama lokasi yang berdekatan dengan badan air, seperti sungai (Das, 2016). Ketiga familia kadal tersebut beranggotakan kadal yang umumnya memiliki gaya hidup *arboreal*, *terrestrial*, dan *fossorial*. Tidak terdapat kadal yang secara khusus memiliki gaya hidup akuatik, seperti hanya bisa bertahan dalam waktu terbatas di luar air atau mencari makan secara eksklusif di badan air (Bauer & Jackman, 2008). Meskipun demikian, kehidupan kadal-kadal tersebut tetap tidak dapat terpisahkan dengan badan air, karena kadal dapat memanfaatkan badan air untuk berlindung dari predator, mencari makan,

minum, dan berteduh. Aktivitas-aktivitas yang berhubungan dengan badan air tersebut dapat pula meninggalkan jejak biologis dari kadal semisal kulit atau sisik tua yang tanggal, saliva, feses, lendir, dan lain sebagainya dalam Sungai Code, sehingga dapat terdeteksi dalam metabarcoding eDNA yang dilakukan. Hasil identifikasi secara lebih rinci dapat diamati pada tabel 9, yakni Familia Agamidae yang terdeteksi adalah *Pogona vitticeps* dan *Pseudotrapelus sinaitus*; Familia Gekkonidae terdiri atas *Cyrtodactylus lomyenensis*, *Lygodactylus blancae*, dan *Uroplatus ebenauai*; Familia Scincidae yakni *Voeltzkowia lienata*.

Tabel 10. Keanekaragaman familia kadal yang ditemukan di Hulu Sungai Code pada tahun 2012 (Yudha *et al.*, 2012; Yudha *et al.*, 2017; Putra, 2017).

No	Familia	2000	2012	2017	2021
1	Agamidae	-	2	2	2
2	Gekkonidae	-	1	1	1
3	Scincidae	-	1	1	3
Jumlah Total Spesies		-	4	3	6
Jumlah Total Familia		-	4	4	3

Tiga familia kadal yang diidentifikasi dalam penelitian ini memiliki kecocokan dengan hasil penelitian *sampling* konvensional yang telah dilakukan pada tahun 2012 dan 2017 (Tabel 10). Agamidae, Gekkonidae, dan Scincidae merupakan familia kadal yang secara umum dan konsisten dijumpai di seluruh penelitian keanekaragaman herpetofauna di Sungai Code. Hasil penelitian dengan penggunaan eDNA ini mengindikasikan masih adanya ketiga familia tersebut di sekitar Sungai Code. Demikian pula dengan keanekaragaman spesies kadal yang masih konsisten ditemukan di Hulu Sungai Code. Pada penelitian oleh Yudha *et al.* (2012), ditemukan 2 spesies anggota familia Agamidae yakni *Bronchocela jubata* dan *Bronchocela cristatella*, 1 anggota Gekkonidae yakni *Cyrtodactylus marmoratus*, dan 1 anggota familia Scincidae yakni *Eutropis multifasciata*. Pada penelitian oleh Putra (2017) spesies-spesies kadal tersebut juga berhasil didapat dan diidentifikasi. *Sampling* konvensional oleh Yudha *et al.* (2017) juga turut kembali menemukan dan mengidentifikasi keempat spesies kadal tersebut. Namun, dalam penelitian dengan eDNA ini didapati terdapat 6 spesies kadal yang teridentifikasi.



Gambar 5. Diagram Venn perbandingan hasil monitoring kadal di Sungai Code pada tahun 2012 (Yudha, *et al.*, 2012; Yudha *et al.*, 2017; Putra, 2017)

Kesalahan dalam identifikasi beberapa takson amfibi ini dapat diakibatkan oleh *false positive* dan *false negative* yang terjadi baik saat proses pengambilan sampel dan proses pengolahan sampel. *False positive* atau kesalahan tipe I merupakan kesalahan yang terjadi jika spesies lain terdeteksi ketika tidak ada spesies target baik dalam sampel maupun di ekosistem. Kesalahan ini disebabkan oleh deteksi yang kurang tepat pada eDNA non-target (sensitivitas yang kurang), kontaminasi DNA, dan aktivitas transpor eDNA dari lokasi yang jauh. Sedangkan *false negative* atau kesalahan tipe 2 terjadi ketika eDNA spesies tidak dapat dideteksi baik dalam sampel ataupun ekosistem walaupun terkonfirmasi hadir. Hal ini dapat disebabkan oleh sensitivitas metode yang masih kurang, kesalahan metode, kegagalan dalam koleksi DNA dari lokasi, dan terjadinya degradasi pada sampel (Evans *et al.*, 2017). Faktor pendukung terjadinya kesalahan ini juga dapat berasal dari lingkungan itu sendiri seperti kondisi sungai yang berarus dapat menurunkan konsentrasi eDNA spesies target sehingga proses deteksi semakin sulit. Selain itu, aktivitas sedimen pada badan air dapat mengubur eDNA target sehingga sulit dideteksi. Lokasi *sampling* memiliki arus yang tidak terlalu kencang serta kaya akan substrat berupa batu dan debris-debris tumbuhan. Hal ini dapat menyebabkan eDNA menempel pada substrat dan berpotensi untuk menahan distribusi eDNA pada badan air sehingga menurunkan potensi deteksi spesies target (Curtis *et al.*, 2020; Shogren *et al.*, 2020).

Kekurangan lain yang dapat ditemukan pada data penelitian ini dapat diilustrasikan pada tabel 4 yaitu minimnya nilai *consensus* yang dihasilkan oleh sistem klasifikasi RDP-MIDORI dengan nilai berada di antara 0.0-0.06. Sistem klasifikasi RDP-MIDORI merupakan *database* yang memuat semua gen dari NCBI-Blast yang kemudian difiltrasi kualitasnya menggunakan 13 protein pengkode yaitu (ATP synthase subunit 6 dan 8; Cytochrome oxidase subunit I, II dan III; Cytochrome b apoenzyme; NADH dehydrogenase subunit 1–4, 4L, 5 dan 6), serta 2 gen RNA ribosomal (RNA ribosomal subunit besar dan kecil). Hal ini menyebabkan beberapa sampel kurang bisa diklasifikasikan secara tepat oleh sistem ini. Angka *consensus* yang rendah pada sistem klasifikasi RDP-MIDORI dapat disebabkan oleh sekuens yang digunakan terlalu panjang atau terlalu pendek. Sekuens ini akan menyebabkan sistem cenderung mengklasifikasikan sekuens ke taksa yang kurang tepat. Panjang sekuens pada penelitian ini yang berkisar 200-300 bp tidak mampu memberi prediksi yang tepat terhadap sampel yang digunakan karena tergolong cukup pendek. Panjang sekuens yang tepat untuk analisis sekuens COI adalah 200-2000 bp (Machida *et al.*, 2017; McDonald *et al.*, 2012; Leray *et al.*, 2018). Hal ini berlaku juga pada anggota Gymnophiona yang terdeteksi yaitu *Schistometopum gregorii*, *Grandisonia sechellensis*, *Indotyphlus maharashtraensis* yang dapat dikatakan tidak valid, karena sejauh ini anggota Gymnophiona yang terdeteksi di Indonesia adalah *Ichthyophis hypocyaneus* yang tidak tersebar di wilayah Yogyakarta (Borzée *et al.*, 2017). Namun, terdapat penemuan *Hylarana chalconota* yang memiliki persebaran di Yogyakarta.

Teridentifikasinya spesies ular yang tidak terdistribusi di Indonesia dapat dijelaskan oleh beberapa faktor. Ada kemungkinan DNA dari spesies ular di Sungai Code belum terdaftar dalam GenBank, sehingga hasil identifikasi menunjukkan spesies ular yang berkerabat dekat dan sekuens DNA-nya tersedia dalam GenBank. Selain itu, dapat dilihat pada tabel 4 bahwa *consensus* pada tiap spesies ular yang teridentifikasi dapat dikatakan sangat rendah. Nilai *consensus* menunjukkan derajat keyakinan terhadap hasil identifikasi, dengan nilai maksimal 1 dan nilai terendah 0. Berdasarkan hasil dapat dilihat bahwa nilai *consensus* yang

didapatkan berada pada rentang 0-0.1 yang cenderung rendah. Hal ini menandakan hasil identifikasi tersebut masih meragukan.

Hasil tersebut dapat terjadi karena perbedaan metode *sampling* yang digunakan. Kelima spesies ular yang teridentifikasi dengan eDNA merupakan ular *terrestrial*, *arboreal*, dan *semi-fossorial*. Tidak ditemukan spesies ular akuatik maupun semi-akuatik, sedangkan pada tahun 2012 dan 2017 dengan metode *sampling* konvensional, ditemukan 2 familia ular yang tergolong akuatik dan semi-akuatik. Hal ini kemungkinan disebabkan karena sekuens DNA dari ular – ular akuatik maupun semi-akuatik di Indonesia masih belum terdaftar dalam GenBank, sehingga tidak ada ular akuatik maupun semi-akuatik yang teridentifikasi dengan eDNA. Selain itu, terdapat kemungkinan fragmen target yang digunakan kurang spesifik untuk ular, sehingga tidak baik digunakan untuk identifikasi. Terdapat pula teori “*shedding hypothesis*” dimana hewan yang memiliki integumen keras dan terkeratinisasi tidak melepaskan DNA sebanyak organisme yang berlendir (Adams *et al.*, 2019; Das, 2010).

Hasil penelitian terhadap kura-kura dengan *metabarcoding* eDNA ini juga tidak koheren dengan hasil studi keanekaragaman konvensional sebelumnya. Sejauh ini, hanya familia Trionychidae yang diketahui hidup secara alami di Sungai Code, walaupun spesimen hidupnya sendiri belum berhasil didapatkan dari *sampling* konvensional sejauh ini. Keberadaan familia Geoemydidae di Sungai Code belum pernah tercatat sebelumnya, baik melalui *sampling* konvensional, wawancara dengan warga, maupun perdagangan (Kurniati, 2010; Muslim, 2017). Hal ini menjadikan hasil dari penelitian *metabarcoding* eDNA ini masih meragukan. Hasil demikian juga dilaporkan pada beberapa studi keanekaragaman dengan pemanfaatan eDNA untuk kura-kura air tawar, terutama studi eDNA *metabarcoding* dengan primer universal (Adams *et al.*, 2019). Dikarenakan hasil tersebut, keanekaragaman kura-kura di Hulu Sungai Code tidak dapat disimpulkan berubah selama 21 tahun terakhir.

Adapun ketiga familia kadal yang diidentifikasi dalam penelitian ini memiliki kecocokan dengan hasil penelitian *sampling* konvensional yang telah dilakukan pada tahun 2012 dan 2017. Agamidae, Gekkonidae, dan

Scincidae merupakan familia kadal yang secara umum dan konsisten dijumpai di seluruh penelitian keanekaragaman herpetofauna di Sungai Code. Hasil penelitian dengan penggunaan eDNA ini mengindikasikan masih adanya ketiga familia tersebut di sekitar Sungai Code. Demikian pula dengan keanekaragaman spesies kadal yang masih konsisten ditemukan di Hulu Sungai Code. Pada penelitian oleh Yudha *et al.* (2012), ditemukan 2 spesies anggota familia Agamidae yakni *Bronchocela jubata* dan *Bronchocela cristatella*, 1 anggota Gekkonidae yakni *Cyrtodactylus marmoratus*, dan 1 anggota familia Scincidae yakni *Eutropis multifasciata*. Pada penelitian oleh Putra (2017) spesies-spesies kadal tersebut juga berhasil didapat dan diidentifikasi. *Sampling* konvensional yang dilakukan oleh Yudha *et al.* (2017) juga turut kembali menemukan dan mengidentifikasi keempat spesies kadal tersebut. Namun, dalam penelitian dengan eDNA ini didapati 6 spesies kadal yang teridentifikasi. Hal ini dapat mengindikasikan adanya 2 spesies kadal yang baru pertama kali tercatat keberadaannya di Hulu Sungai Code. Namun demikian, hasil identifikasi yang kurang akurat tersebut menjadikan hasil yang diperoleh tidak dapat digunakan untuk menentukan bertambahnya keanekaragaman kadal di Hulu Sungai Code.

Penelitian tentang eDNA untuk mengidentifikasi reptil di badan air telah beberapa kali dilakukan. Beberapa penelitian yang melakukan identifikasi dengan eDNA terhadap kura-kura dan ular menunjukkan tingkat kegagalan yang cukup tinggi. Hasil yang didapat oleh beberapa studi tersebut bersifat *false negative* dimana spesies reptil yang secara nyata dapat dipastikan berada di lokasi, tidak terdeteksi melalui eDNA (Adams *et al.*, 2019). Hal ini membuktikan bahwa metode eDNA memiliki kelemahan dalam mengidentifikasi reptil di suatu habitat. Hasil identifikasi yang didapat pada penelitian ini kemungkinan tidak dapat dipastikan kebenarannya secara mutlak.

Kesimpulan

Hasil penelitian tahun 2021 ini, yaitu: didapatkan 12 spesies amfibi dimana semua spesies tersebut tidak memiliki persebaran alami di wilayah Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) bahkan di Indonesia; didapatkan 5 spesies ular dimana hanya 1 spesies yang memiliki

persebaran alami di wilayah DIY; kemudian didapatkan 6 spesies kadal dimana semua spesies kadal tersebut tidak memiliki persebaran alami di DIY bahkan di Indonesia; dan terakhir didapatkan 1 spesies kura-kura yang persebaran alaminya tidak dijumpai di DIY bahkan di Indonesia.

Sejauh ini, di Indonesia, identifikasi amfibi dan reptil di sungai menggunakan metode eDNA menunjukkan hasil yang kurang akurat. Pada penelitian ini, ketidakakuratan mungkin disebabkan oleh kurangnya spesifisitas target sekuens dan primer untuk monitoring reptil dan amfibi di sungai. Target sekuens yang digunakan dalam penelitian ini masih universal, yakni tingkat Metazoa, sehingga target sekuens yang digunakan pada penelitian ini tidak memiliki perbedaan yang cukup signifikan antar spesies pada reptil dan amfibi, serta herpetofauna yang sudah tercatat keberadaannya di Sungai Code tidak teridentifikasi menggunakan metode eDNA. Berdasarkan penelitian ini, *sampling* konvensional lebih disarankan untuk monitoring herpetofauna di area sungai.

Ucapan terima kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada Fakultas Biologi UGM yang telah memberikan dana penelitian melalui program Hibah Kolaborasi Dosen dan Mahasiswa tahun 2021.

Referensi

- Adams, C. I. M., Hoekstra, L. A., Mell, M. R., Janzen, F. J. (2019). A Brief Review of Non-Avian Reptile Environmental DNA (eDNA), with a Case Study of Painted Turtle (*Chrysemys picta*) e-DNA Under Field Conditions. *Diversity*, 11(50): 1-22.
- Bauer, A. M., Jackman, T. (2008). Global diversity of lizards in freshwater (Reptilia: Lacertilia). *Hydrobiologia*, 595: 581-586.
- Bani, A., Brauer, M. D., Creer, S., Dumbrell, A. J., Limmon, G., Jompa, J., Heyden, S. V. D. & Beger, M. (2020). *Tropical Ecosystems in the 21st Century*. Elsevier. p. 375-382.
- Barnes, M. A. & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and

- implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* 17: 1-17.
- Borzée, A., Yi, Y., Kusriani, M. D. & Jang, Y. (2017). Habitat use by the Javan caecilian (*Ichthyophis hypocyaneus*). *Korean Journal of Herpetology* 8: 15-18.
- Das, I. (2010). *A Field Guide to the Reptiles of South-East Asia*. London: Bloomsbury Natural History.
- Evans, N. T., Shirey, P. D., Wieringa, J. G. & Mahon, A. R. (2017). Comparative Cost and Effort of Fish Distribution Detection via Environmental DNA Analysis and Electrofishing. *Fisheries* 42 (2): 90-99.
- Gao, Z. (1991). Discovery of *Achalinus meiguensis* in Anxian County, Sichuan [in Chinese]. *Sichuan Journal of Zoology*, 10(1): 33.
- Goldberg, C. S., Strickler, K. M. & Fremier, A. K. (2018). Degradation and dispersion limit environmental DNA detection of rare amphibians in wetlands: Increasing efficacy of sampling designs. *Science of The Total Environment* 633: 695-703.
- Iskandar, D. T. (1998). *The Amphibians of Java and Bali*. LIPI. p. 14.
- Iskandar D. T. (2000). *Kura-Kura & Buaya Indonesia & Papua Nugini*. Bandung: PALMedia Citra. p. 77-123.
- Kurniati, H. (2010). Kura-Kura dan Bulus yang Diperdagangkan di Propinsi Jawa Tengah dan Yogyakarta. *Fauna Indonesia*, 9(1): 10-14.
- Leray, M., J.Y. Yang, C.P. Meyer, S.C. Mills, N. Agudelo, V. Ranwez, J.T. Boehm, and R.J. Machida. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut content. *Frontiers in Zoology* 2013, 10:34. <http://www.frontiersinzoology.com/content/10/1/34>
- Leray, M., Ho, S., Lin, I. & Machida, R. J. (2018). MIDORI server: a webserver for taxonomic assignment of unknown metazoan mitochondrial encoded sequences using a curated database. *Bioinformatics* 4 (21): 3753-3754.
- Li, W., Hou, X., Xu, C., Qin, M., Wang, S., Wei, L., Wang, Y., Liu, X. & Li, Y. (2021). Validating e-DNA measurements of the richness and abundance of anurans at a large scale. *Journal of Animal Ecology* 90 (6): 1-14.
- Machida, R. J., Leray, M. Ho, S. & Knowlton, N. (2017). Metazoan mitochondrial gene sequence reference datasets for taxonomic assignment of environmental samples. *Scientific Data* 4 (170027): 1-7.
- McKee, A. M., Calhoun, D. L., Barichivich, W. J., Spear, S. F., Goldberg, C. S. & Glenn, T. C. (2015). Assessment of Environmental DNA for Detecting Presence of Imperiled Aquatic Amphibian Species in Isolated Wetlands. *Journal of Fish and Wildlife Management* 6 (2): 498-510.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R., & Hugenholtz. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal* 6: 610-618.
- Muslim, S. N. (2017). *Keanekaragaman Jenis dan Distribusi Testudinata Air Tawar di Sungai-Sungai Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta*. Naskah Skripsi. hal. 1-47.
- O'Shea, M. (2018). *The Book of Snakes: A Life-Size Guide to Six Hundred Species from around the World*. United States: University of Chicago Press.
- Putra, A. D. R. (2017). *Pemantauan Keanekaragaman, Kemelimpahan, dan Distribusi Kadal (Squamata: Lacertilia) di Sungai Code Provinsi DIY*. Naskah Skripsi. hal. 1-74.
- Putra, H. E. (2019). *Pemantauan Keanekaragaman, Kemelimpahan, dan*

- Distribusi Ular di Sepanjang Sungai Code Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta*. Naskah Skripsi. hal. 1-51.
- Shogren, A. J., Tank, J. L., Andruszkiewicz, E. A., Olds, B., Jerde, C. & Bolster, D. (2016). Modelling the transport of environmental DNA through a porous substrate using continuous flow-through column experiments. *R. Soc. Interface* 13 (20160290): 1-16.
- Xia, Z. Zhan, A., Johansson, M. & DeRoy, E. (2021). Screening marker sensitivity: Optimizing e-DNA-based rare species detection. *Diversity and Distributions* 27 (10): 1982-1988.
- Yudha, D. S., Akmal, W. & R., Eprilurahman, R. (2019). Monitoring Anurans Diversity along Code River, Province of Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia. *Biogenesis* 7(2): 132-138.
- Yudha, D. S., Eprilurahman, R., Andryani, K. & Trijoko. (2013). Keanekaragaman jenis Katak dan Kodok di sepanjang Sungai Code, Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta. *Berkala Ilmiah Biologi* 12 (1): 19-25.
- Yudha, D. S., Eprilurahman, R., Putra, H. E., Putra, R. A. D., Akmal, W. R., Muslim, S. N. (2017). *Keanekaragaman dan Monitoring Herpetofauna di sepanjang Sungai Boyong-Code, Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta*. Laporan Kegiatan Hibah Penelitian Biodiversitas Tropika Dosen: Tidak Dipublikasikan. hal. 1-24
- Yudha, D. S., Eprilurahman, R. Jayanto, H. & Wiryawan, I. F. (2016). Keanekaragaman Jenis Kadal dan Ular (Squamata: Reptilia) di Sepanjang Sungai Code, Daerah Istimewa Yogyakarta. *Biota*, 1 (1): 31-38.
- Yudha, D. S., Eprilurahman, R., Muhtianda, I. A., Ekarini, D. F., Ningsih, O. C. (2015). Keanekaragaman Spesies Amfibi Amfibi dan Reptil di Kawasan Suaka MArgasatwa Sermo Daerah Istimewa Yogyakarta. *Jurnal Mipa*, 38(1): 7-12.
- Yudha, D. S., Eprilurahman, R., Rizky, E. P. S., Wijiastuti, W. F. & Nashrullah, M. A. (2018). Snakes and Lizards (Reptilia: Squamata) of Gadjah Wong River Area, Province of Daerah Istimewa Yogyakarta. *AIP Conference Proceedings*, 2002 (020014): 1-6.
- Yudha, D. S., Trijoko, Pambudi, S. S., Andryani, K. (2012). *Keanekaragaman Jenis Ikan dan Herpetofauna di sepanjang Sungai Code dari Hulu hingga Hilir Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta*. Laporan Akhir Hibah Penelitian Laboratorium Dana Masyarakat Fakultas Biologi UGM: Tidak Dipublikasikan. hal. 1-31