



**SYSTEMATIC STUDY OF *Limnonectes kuhlii*
(Tschudi, 1838) COMPLEX IN KALIMANTAN, INDONESIA
(ANURA: DICROGLOSSIDAE)**

ADE DAMARA GONGGOLI



**ANIMAL BIOSCIENCE STUDY PROGRAM
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
BOGOR AGRICULTURAL UNIVERSITY
BOGOR
2024**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



STATEMENT REGARDING THE THESIS AND SOURCE OF INFORMATION AND ASSIGNMENT OF COPYRIGHTS

I hereby declare that the thesis entitled “Systematic study of *Limnonectes kuhlii* (Tschudi, 1838) Complex in Kalimantan, Indonesia (Anura: Dicroglossidae)” is my work under the direction of my supervisor and has not been submitted in any form to any university. Sources of information derived from or quoted from published and unpublished works of other authors have been mentioned in the text and included in the bibliography at the end of the thesis.

Herewith I bestow the copyright of my paper to the Bogor Agricultural University.

Bogor, Desember 2024

Ade Damara Gonggoli
G3502222019

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

SUMMARY

ADE DAMARA GONGGOLI, Systematic study of *Limnonectes kuhlii* (Tschudi, 1838) Complex in Kalimantan, Indonesia (Anura: Dicroglossidae). Supervised by ACHMAD FARAJALLAH, and AMIR HAMIDY

Limnonectes kuhlii was described from Java, Indonesia and had been considered as a single species that was widely distributed in Southeast Asia. Along with the development of DNA Barcoding, molecular studies revealed that the populations outside of Java represent distinct species, including the population from Borneo. In the Kalimantan region, there are two unnamed lineages, namely Lineages 3 and 4. These two lineages are genetically distinct; however, no further morphological analyses have been performed.

This study aims to evaluate the taxonomic status of Lineages 3 and 4 based on morphology and molecular analysis using additional samples collected from Meratus Mountain Range, Kalimantan, Indonesia. In molecular analysis, we used 62 sequences to construct the phylogenetic tree using Maximum Likelihood and Bayesian Inference analyses. Twenty-nine morphological characters were measured from 35 specimens collected from the Meratus Mountain Range. Principal Component Analysis, Tukey-Kramer, and Student's t-test were used to differentiate the morphological differences between Lineages 3 and 4. We also developed four modifications of odontoid measurement and three patterns of tibial tuberculation to differentiate Bornean *L. kuhlii* complex.

The phylogenetic tree shows our new samples from Central Kalimantan and South Kalimantan are clustered together with previously published samples, Lineage 3 from Samboja and Lineage 4 from Paramasan, respectively. Lineage 3 and Lineage 4, respectively, form a monophyletic group with highly supported nodes, and have a high genetic distance to their congeners. Morphologically, Lineages 3 and 4 can be distinguished from each other by the multivariate and univariate analyses and from other described species by the combination of morphological characters.

This study, while a valuable contribution, remains incomplete and necessitates further study to address existing gaps to deepen our understanding of these two undescribed species. These descriptions are also an initiation step in taxonomic work to encourage studies of the *L. kuhlii* complex in Kalimantan, Indonesia.

Keywords. *Limnonectes*, Meratus mountain range, morphology, partial 16s rRNA gene, taxonomy.

RINGKASAN

ADE DAMARA GONGGOLI. Studi Sistematika *Limnonectes kuhlii* (Tshcudi, 1838) Komplek di Kalimantan, Indonesia (Anura: Dicroglossidae). Dibimbing oleh ACHMAD FARAJALLAH, dan AMIR HAMIDY.

Limnonectes kuhlii pertama kali dideskripsikan dari Jawa, Indonesia, dan sebelumnya dianggap sebagai satu spesies yang tersebar luas di Asia Tenggara. Namun, dengan berkembangnya metode DNA Barcoding, penelitian molekuler menunjukkan bahwa populasi di luar Jawa sebenarnya merupakan spesies yang berbeda, termasuk populasi dari Kalimantan. Di wilayah Kalimantan, terdapat dua garis keturunan yang belum diberi nama, yaitu Lineage 3 dan Lineage 4. Kedua garis keturunan ini secara genetik berbeda, tetapi belum ada analisis morfologi lebih lanjut yang dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi status taksonomi Lineage 3 dan Lineage 4 berdasarkan analisis morfologi dan molekuler dengan menggunakan sampel tambahan yang dikumpulkan dari Pegunungan Meratus, Kalimantan, Indonesia. Dalam analisis molekuler, 62 sekuens digunakan untuk membangun pohon filogenetik dengan metode *Maximum Likelihood* dan *Bayesian Inference*. Sebanyak 29 karakter morfologi diukur dari 35 spesimen yang dikoleksi dari Pegunungan Meratus. Analisis *Principal Component Analysis* (PCA), Tukey-Kramer, dan uji-t Student digunakan untuk membedakan perbedaan morfologi antara Lineage 3 dan Lineage 4. Empat modifikasi pengukuran odontoid dan tiga pola tuberkulasi tibia baru juga diperkenalkan untuk membedakan kompleks *L. kuhlii* di Kalimantan.

Hasil pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel baru yang dikoleksi dari Kalimantan Tengah dan Kalimantan Selatan berkelompok dengan sampel yang telah dipublikasikan sebelumnya, yaitu Lineage 3 dari Samboja dan Lineage 4 dari Paramasan. Lineage 3 dan Lineage 4 masing-masing membentuk grup monofiletik dengan dukungan nodus yang tinggi dan memiliki jarak genetik yang signifikan dibandingkan dengan kerabat dekatnya. Secara morfologi, Lineage 3 dan Lineage 4 dapat dibedakan satu sama lain melalui analisis multivariat dan univariat, serta dari spesies lain yang sudah dideskripsikan berdasarkan kombinasi karakter morfologi.

Meskipun memberikan kontribusi penting, penelitian ini masih memiliki keterbatasan dan memerlukan studi lanjutan untuk menjawab pertanyaan yang belum terjawab demi pemahaman yang lebih dalam tentang kedua spesies yang belum dideskripsikan ini. Deskripsi ini juga menjadi langkah awal dalam pekerjaan taksonomi untuk mendorong studi lebih lanjut tentang kompleks *L. kuhlii* di Kalimantan, Indonesia.

Kata kunci: *Limnonectes*, Pegunungan Meratus, morfologi, gen parsial 16s rRNA, taksonomi.



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Copyright belongs to IPB, 2024
All Rights Reserved Law

Prohibited quoting part or all of this paper without including or mentioning the source. The quotation is only for educational purposes, research, scientific writing, preparation of reports, writing criticism, or reviewing an issue, and citations are not detrimental to the interest of IPB.

Prohibited announcing and reproducing part or all papers in any form without permission of IPB.



**SYSTEMATIC STUDY OF *Limnonectes kuhlii*
(Tschudi, 1838) COMPLEX IN KALIMANTAN, INDONESIA
(ANURA: DICROGLOSSIDAE)**

ADE DAMARA GONGGOLI

Thesis
as a prerequisite to obtaining a
Magister of Science degree on
Animal Biosciences Program

**ANIMAL BIOSCIENCE STUDY PROGRAM
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
BOGOR AGRICULTURAL UNIVERSITY
BOGOR
2024**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Examiner committee of Thesis:

1. Prof. Dr. Ir. Mirza Dikari Kusriani, M.Si

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Title of Thesis : Systematic study of *Limnonectes kuhlii* (Tschudi, 1838)
Complex in Kalimantan, Indonesia (Anura: Dicroglossidae)
Name : Ade Damara Gonggoli
Student ID Number : G3502222019

Approved by
Advisory Committee

Chairman:
Dr. Ir. Achmad Farajallah, M.Si



Member:
Dr. Amir Hamidy, M.Sc



Acknowledged by

Head of the Animal Biosciences Study Program
Prof. Dr. Drs. Tri Atmowidi, M.Sc
NIP.196708271993031003



Dean of the Faculty of Mathematics and Natural
Sciences
Dr. Berry Juliandi, S.Si., M.Si
NIP. 197807232007011001



Date of Examination: 10 December 2024

Date of Graduation:

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



FOREWORD

All praise is to Jesus Christ for His mercy and grace; this thesis work can be completed. This work entitled “Systematic study of *Limnonectes kuhlii* (Tschudi, 1838) in Kalimantan, Indonesia (Anura: Dicroglossidae)” is intended as one of the final requirements to graduate Degree in Magister of Science of Animal Biosciences in Graduate School, Bogor Agricultural University.

I would like to express my heartfelt gratitude to my parents, Amerta He’o and Linteani, and my Sister, for their unwavering support, love, and prayers throughout this journey. My deepest thanks also to Dr. Ir. Achmad Farajallah, M.Si., and Dr. Amir Hamidy, M.Sc., as supervisors, for their invaluable guidance, insights, and dedication, which have been instrumental in completing this thesis.

During this research and thesis writing, I have received support and assistance from numerous individuals and institutions. Therefore, I would like to extend my deepest gratitude to the following:

1. Prof. Dr. Drs. Tri Atmowidi, M.Si., Head of the Animal Biosciences Study Program, for his encouragement.
2. All lectures of the Animal Biosciences Study Program, who have generously shared their knowledge and expertise throughout my academic journey.
3. The laboratory assistants and staff of the Animal Biosciences Study Program, the Laboratory of Herpetology, Research Center for Biosystematics and Evolution, National Research and Innovation Agency (BRIN), and the Laboratory of Animal Biological Functions and Behavior, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Science, Bogor Agricultural University, for their support and technical assistance.
4. My colleagues at the Laboratory of Herpetology provided companionship, constructive feedback, motivation, and invaluable help during the laboratory.
5. My fellow classmates from the Animal Biosciences Study Program of 2023 for their kindness, collaboration, and shared experiences throughout my academic journey.
6. My beloved friends from Zoo Corner, who offered encouragement and support during my studies.
7. All parties who have extended their generosity and assistance from the research process to the final stages of thesis writing.

Once again, I extend my heartfelt gratitude to all these individuals for their invaluable support.

Bogor, Desember 2024

Ade Damara Gonggoli
G3502222019



TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF APPENDIX	xiii
I INTRODUCTION	1
1.1 Background	1
1.2 Problem Statement	2
1.3 Research Objective	2
1.4 Research Benefits	2
1.5 Research Scope	2
II LITERATURE REVIEW	3
2.1 Morphology, Distribution, and Habitat of <i>Limnnectes kuhlii</i> complex	3
2.2 Systematic Studies of <i>Limnnectes kuhlii</i> complex in Borneo	3
2.3 Phylogeny and Biogeography of <i>L. kuhlii</i> complex	5
III MATERIAL AND METHODS	7
3.1 Time and Place	7
3.2 Molecular Analysis	8
3.3 Morphological Analysis	8
IV RESULTS	14
4.1 Molecular and Morphological Analysis	14
V DISCUSSION	30
VI CONCLUSION AND SUGGESTION	32
6.1 Conclusion	32
6.2 Suggestion	32
REFERENCES	33
APPENDIX I	38
APPENDIX II	39
BIOGRAPHY	40

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



LIST OF TABLES

1	Samples used in the phylogenetic analyses and the information on locality, voucher, and GenBank accession number.	11
2	Morphometric variation of measurements in Lineage 3 and Lineage 4	17
3	Morphological variation between the full webbed toes species of Bornean <i>Limnonectes kuhlii</i> complex	19

LIST OF FIGURES

1	Localities of described species of <i>Limnonectes kuhlii</i> complex in Borneo.	6
2	Map of Borneo showing the known locality of Lineage 3 (round) and Lineage 4 (triangle) in the Meratus Mountain Range. 1) Samboja; 2) Gunung Karasik; (3) Mt. Halau-halau; 4) Lumpangi, Loksado, and Malaris; 5) Dusun Bancing.	7
3	Fang measurements of <i>Limnonectes</i> frogs: odontoid height (OH), odontoid width (OW), outer odontoid length (OOL), inner odontoid length (IOL), odontoid slope length (OSL), and inter odontoid length (ITOL).	9
4	Tibia tuberculation characters described by Matsui et al. (2024) and the patterns we propose in this study. A) <i>Limnonectes tawauensis</i> ; B) <i>L. barioensis</i> ; C) <i>L. kong</i> ; D) <i>L. conspicillatus</i> ; E) <i>L. penerisanensis</i> ; F) <i>L. paginatanensis</i> ; G) <i>L. abanghamidi</i> .	10
5	(A) Maximum Likelihood tree from 890 bp of partial 16S rRNA gene of Lineage 3 and Lineage 4 from Meratus Mountain Range and related species. The numbers near the node branches represent bootstrap support for Maximum Likelihood Bootstrap Support (MLBS) and Bayesian posterior probabilities (BPP). (B) Scatter plot of morphological clustering of females of Lineage 3 (green) and Lineage 4 (yellow). The proportions of eigenvalues of the first and second axes (PC1-PC2) accounted for 80.1% and 4.5%, respectively.	14
6	Dorsolateral view, dorsal view, and ventral view, respectively, of adult female holotype, MZB Amph 33530 (A-C), and unvouchered adult male (D-F) of Lineage 3.	16
7	Dorsal view (A), ventral view (B), ventral view of right foot (C), ventral view of right hand (D), frontal view of head with opened mouth, showing the odontoids processes, not to scale (E) of Lineage 3, adult female holotype (MZB Amph 33530). Scale = 1 mm.	20
8	Dorsolateral view, dorsal view, and ventral view, respectively, of adult male holotype, MZB Amph 33516 (A-C), and unvouchered adult female (D-F) of Lineage 4.	24
9	Dorsal view (A), ventral view (B), ventral view of right foot (C), ventral view of right hand (D), frontal view of head with opened mouth,	25



showing the odontoids processes, not to scale (E) of Lineage 4, adult male holotype (MZB Amph 33516). Scale = 1 mm.

- 10 The upper section of the figure shows the dorsal view of tibia tuberculation of adult female holotype, MZB Amph 33530 (A) and unvouchered adult male (B) of Lineage 3; adult male holotype, MZB Amph 33516 (C), and unvouchered adult female (D) of Lineage 4. The lower section of the figure shows webbing differences between Lineage 3 (E), and Lineage 4 (F) with *L. tawauensis* (G) and *L. barioensis* (H). Dark arrows indicate fairly well excised on the outer and inner webbing of the fourth toe; Red arrows indicate little excised on the outer and inner webbing of the fourth toe. 27
- 11 Natural habitat of Lineage 3 in Mt. Karasik (A), and Lineage 4 in Loksado (B). 28

LIST OF APPENDIX

- 1 Specimens examined 38
- 2 Specimens for morphometry 39



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.