

Variasi Genetik Trenggiling Sitaan di Sumatra, Jawa, dan Kalimantan Berdasarkan *Control Region* DNA Mitokondria.

(GENETIC VARIATION ON CONFISCATED PANGOLIN OF SUMATRA, JAWA,
AND KALIMANTAN BASED ON CONTROL REGION MITOCHONDRIAL DNA)

Wirdateti, Gono Semiadi

Pusat Penelitian Biologi
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong Science Center
Jl. Raya Jakarta-Bogor km 46 Cibinong, Jawa Barat, Indonesia
Email: teti_mzb@yahoo.com; Telp: 0218765056

ABSTRAK

Tingginya tingkat perburuan trenggiling (*Manis javanica*; Desmarest 1822) Indonesia untuk diperdagangkan secara ilegal sebagai bahan dasar obat terutama di China, menyebabkan terjadinya penurunan populasi di alam. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat tingkat kualitas dan keragaman genetik trenggiling serta mengetahui asal usul satwa sitaan berdasarkan analisis molekuler. Sebagai kontrol asal usul trenggiling sitaan digunakan sampel alam berdasarkan sebaran populasi yang diketahui pasti yang berasal dari Jawa, Kalimantan, dan Sumatera. Analisis molekuler menggunakan daerah *non coding control region (D-loop)* mitokondrial DNA (mtDNA). Hasil analisis dari pohon filogeni menunjukkan bahwa dari 44 sampel trenggiling sitaan terindikasi berasal dari Kalimantan sebanyak 24 individu, asal Sumatera tujuh individu, dan dari populasi Jawa 13, sementara rata-rata jarak genetik (d) antara Kalimantan-Jawa $d = 0,0121 \pm 0,0031$; Kalimantan-Sumatera $d = 0,0123 \pm 0,0038$; dan Sumatera-Jawa $d = 0,0075 \pm 0,038$. Jarak genetik secara keseluruhan di antara populasi adalah $d = 0,0148 \pm 0,0035$, dengan keragaman nukleotida (δ) 0,0146. Hasil ini menunjukkan bahwa lebih 50% trenggiling sitaan berasal dari Kalimantan, dan populasi Kalimantan menunjukkan kelompok terpisah dengan Jawa dan Sumatera dengan *bootstrap* 98%.

Kata-kata kunci: *Manis javanica*; keragaman genetic; *control region*; jarak genetik

ABSTRACT

High levels of illegal trading on Java pangolin (*Manis javanica*, Desmarest. 1822) for the basic ingredient of Traditional Chinese Medicine have caused sharp decline in its wild population. The purposes of this study were to assess the level of quality and genetic diversity, and to identify the origin of the confiscated individuals by molecular analysis. The original species used as a control were obtained from known areas in Java, Kalimantan, and Sumatera. Molecular analysis was carried out using non-coding region control region (D-loop) of mitochondrial DNA (mtDNA). The results of phylogenetic tree analysis showed that 44 confiscated pangolins were from Kalimantan (24 individuals), from Sumatera (seven individuals), and from Java (13 individuals). As many as 19 haplotypes were found on the basis of their base substitutions consisting of nine from Kalimantan, seven from Java and three from Sumatera. Average genetic distance (d) between those from Kalimantan-Java was $d = 0.0121 \pm 0.0031$; those from Borneo-Sumatra was $d = 0.0123 \pm 0.0038$ and those from Sumatera-Java was $d = 0.0075 \pm 0.038$, respectively. Overall genetic distance between populations was $d = 0.0148 \pm 0.0035$, with the nucleotide diversity (δ) of 0.0146. These results indicate that over 50% of pangolins seized came from Kalimantan, and Kalimantan populations show a separate group with Java and Sumatera with *bootstrap* 98%.

Keywords: *Manis javanica*; genetic diversity; control region; genetic distance

PENDAHULUAN

Trenggiling (*Manis javanica*, Desmarest, 1822) di Indonesia tersebar di Pulau Sumatra, Jawa, Kalimantan, dan pulau-pulau sekitarnya. Satwa ini sudah dilindungi Undang-undang Indonesia sejak tahun 1932, dan di tingkat internasional tercatat sebagai species yang terancam punah (IUCN, 2010), sementara di CITES meskipun spesies ini terdaftar dalam Appendix II namun konvensi telah memutuskan moratorium perdagangan (Newton *et al.*, 2008; Pantel dan Chin, 2009). Dimasukkannya *M. javanica* ke Status Moratorium adalah karena efek domino dari tekanan perburuan di Indo China pada *M. pentadactyla* yang sudah mulai habis dan sebagai pengganti kemudian bergeser ke spesies Asia Tenggara yaitu *M. javanica*. Hal ini telah mengakibatkan Indonesia sebagai pemasok tertinggi perdagangan trenggiling ilegal di kawasan Asia Tenggara (Semiadi *et al.*, 2008).

Tingginya minat internasional terhadap trenggiling lebih banyak sebagai akibat dari tingginya konsumen satwa eksotik di daratan Cina dan semenanjung sekitar Vietnam, Laos, dan Kamboja. Trenggiling terutama di wilayah Indo-China, menjadi salah satu bahan dasar *Traditional Chinese Medicine* (TCM). Saat ini dilaporkan bahwa di kawasan tersebut keberadaan jenis trenggiling setempat (*M. pentadactyla*) telah sangat rendah dan dikhawatirkan di ambang kepunahan, sehingga pensuplai trenggiling banyak mencari ke Negara Asia dan Asia Tenggara, seperti Indonesia, Malaysia hingga ke daerah India dan kemungkinan sampai ke Afrika. Hal tersebut berpengaruh terhadap populasi *M. javanica* khususnya yang tersebar di kepulauan di Indonesia. Dengan demikian perlu diberi perhatian khusus karena trenggiling memiliki laju reproduksi lambat, yang menghambat kemampuan mereka untuk pulih dari penurunan populasi yang begitu cepat (Newton *et al.*, 2008; Nowak, 1999; Lim dan Ng, 2008).

Kasus penyitaan trenggiling serta bagian-bagiannya di wilayah Indonesia telah banyak terjadi, dengan pusat penangkapan terpusat di wilayah Sumatera dan Jawa. Permasalahan muncul ketika diperolehnya trenggiling yang masih hidup maka pelepasliaran seharusnya dilakukan sesuai dengan wilayah persebaran aslinya. Namun, di sisi lain informasi akurat mengenai asal usul satwa sitaan sering tidak jelas atau akurat. Penelitian tentang trenggiling

sangat terbatas, beberapa penelitian dasar yang telah dilaporkan adalah mengenai taksonomi, kromosom, dan sangat sedikit mengenai molekuler, persebaran dan ekologi. Semua penelitian tentang trenggiling tersebut lebih memfokuskan pada jenis yang tidak berasal dari Indonesia (Munyala *et al.*, 2008; Nie *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2010; Gaudin dan Wible, 1999).

Sekuen DNA mitokondria dipilih sebagai penanda genetik karena jumlah kopinya banyak, berukuran relatif kecil ($\pm 16,5$ kb), diturunkan dari induk betina (maternal), dan beberapa gen dalam mitokondria mutasinya lebih cepat dari pada gen inti (Wertz, 2000). Daerah *D-Loop* mtDNA atau dikenal juga dengan “daerah kontrol” (*control region*) merupakan tempat yang mengatur replikasi dan transkripsi yaitu awal dari replikasi rantai berat (Foran *et al.*, 1988). Daerah ini telah dibuktikan merupakan bagian yang paling bervariasi pada genom mitokondria. Wilayah *D-loop* merupakan daerah yang paling hipervariabel, mempunyai laju kecepatan mutasi 4-5 kali lebih cepat dibandingkan dengan daerah mtDNA lainnya. Daerah *control region* (*D-loop*) mtDNA mempunyai variasi basa yang cukup tinggi atau berevolusi dengan cepat dan memiliki fragmen pendek yang konservatif (Horai *et al.*, 1993). Oleh karena itu daerah *control region*/*D-loop* sering digunakan untuk analisis filogenetik baik di dalam spesies maupun antar spesies. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan data variasi genetik, dan asal usul trenggiling sitaan berdasarkan penanda genetik dalam membantu strategi konservasi trenggiling.

METODE PENELITIAN

Sampel Trenggiling

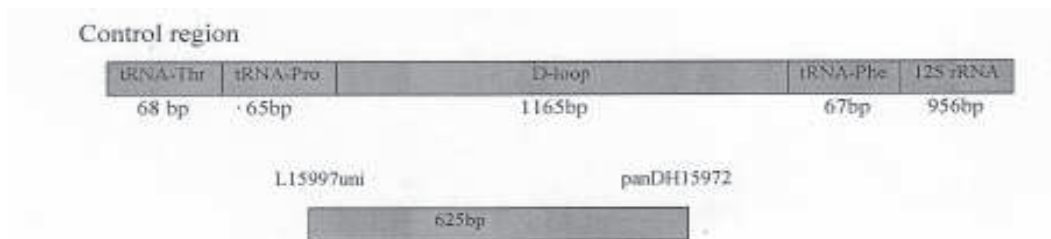
Sampel penelitian merupakan trenggiling hasil sitaan dari tahun 2010-2014 yang dikoleksi di Jakarta, Medan, Surabaya, Kalimantan Tengah, Jember, dan Lampung sebanyak 44 sampel dan dari koleksi alam sebanyak enam sampel diperoleh dari Lampung, Palangkaraya, dan Jember, sebagai kontrol (Tabel 1). Sampel berupa daging dan sisik yang diawetkan di dalam alkohol absolute PA.

Isolasi dan Purifikasi DNA

Total DNA dari sampel sisik diperoleh dengan mengekstrak sisik menggunakan *phenol-chloroform* dan dipresipitasi dengan

Tabel 1. Sampel trenggiling hasil sitaan dan koreksi alam yang digunakan pada penelitian

No.	No.Id	Lokasi sitaan	Keterangan
1	MZBR.0270	Cijeruk, Sukabumi	Daging
2	MZBR.0272	Medan	Daging
3	MZBR.0273	Medan	Daging
4	MZBR.0274	Medan	Daging
5	MZBR.0275	Medan	Sisik
6	MZBR.0276	Medan	Sisik
7	MZBR.1030	Tegal Aur, Jakarta	Daging
8	MZBR.1034	BKSDA, Jakarta	Daging
9	MZBR.1036	BKSDA, Jakarta	Daging
10	MZBR.1038	BKSDA, Jakarta	Daging
11	MZBR.1040	BKSDA, Jakarta	Daging
12	MZBR.1042	BKSDA, Jakarta	Daging
13	MZBR.1044	BKSDA, Jakarta	Daging
14	MZBR.1046	BKSDA, Jakarta	Daging
15	MZBR.1048	BKSDA, Jakarta	Daging
16	MZBR.1050	BKSDA, Jakarta	Daging
17	MZBR.1052	BKSDA, Jakarta	Daging
18	MZBR.1053	BKSDA, Jakarta	Daging
19	MZBR.1054	BKSDA, Jakarta	Daging
20	MZBR1057	Tanggamus, Sitaan Lampung	Sisik
21	MZBR1063	BKSDA, Jakarta	Daging
22	MZBR.1064	BKSDA, Jakarta	Daging
23	MZBR.1069	Surabaya	Daging
24	MZBR.1070	Surabaya	Daging
25	MZBR.1071	Surabaya	Daging
26	MZBR.1072	Surabaya	Daging
27	MZBR.1073	Surabaya	Daging
28	MZBR.1074	Surabaya	Daging
29	MZBR.1076	Surabaya	Daging
30	MZBR.1077	Surabaya	Daging
31	MZBR.1177	Balik Bukit 1, Lampung	Sisik (alam)
32	MZBR.1178	Balik Bukit 2, Lampung	Sisik (alam)
33	MZBR.1081	Palangkaraya Kalteng,	Daging
34	MZBR.1082	Palangkaraya Kalteng,	Daging
35	MZBR.1083	Palangkaraya Kalteng,	Daging
36	MZBR1084	Palangkaraya Kalteng,	Sisik (alam)
37	MZBR.1085	Palangkaraya Kalteng,	Daging
38	MZBR.1086	Palangkaraya Kalteng,	Daging
39	MZBR.1157	Pangkalan Bun, Kalteng,	Daging
40	MZBR.1162	Pangkalan Bun, Kalteng,	Daging
41	MZBR.1163	Pangkalan Bun, Kalteng,	Sisik (alam)
42	MZBR.1164	Pangkalan Bun, Kalteng,	Daging
43	MZBR.1165	Pangkalan Bun, Kalteng,	Daging
44	MZBR.1166	Pangkalan Bun, Kalteng,	Daging
45	MZBR.1179	Jember, Jawa Timur	Sisik (alam)
46	MZBR.1180	Jember, Jawa Timur	Sisik (alam)
47	MZBR.1181	Jember, Jawa Timur	Daging
48	MZBR1182	Jember, Jawa Timur	Daging
49	MZBR1183	Jember, Jawa Timur	Daging
50	MZBR1184	Jember, Jawa Timur	Daging



Gambar 1. Posisi primer dan ukuran amplifikasi pada penelitian ini

etanol absolute untuk mengendapkan DNA. Sisik dihaluskan sekitar 30 mg dan dilarutkan di dalam *extraction buffer* yang terdiri dari 200 μ L lisis buffer, 10% *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) dan 10 μ L/mL proteinase K (100 mg/mL), kemudian sampel diinkubasi semalam pada suhu 59°C. Tahap purifikasi dan presipitasi mengikuti prosedur Sambrook *et al.* (1989). Sementara sampel daging mengikuti purifikasi standar phenol dan DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Kit). Selanjutnya DNA yang diperoleh dilarutkan di dalam ddH₂O atau *MilliQ water*.

Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplifikasi dan DNA Sekuensing

Primer untuk amplifikasi *D-loop* menggunakan dua pasang primer spesifik yang digunakan pada *M. pendactyla* (Hsieh *et al.*, 2010) dengan sekuen primer: L15997uni AGCCCCAAAGCTGATATTCT; PanDH15972 AGGGCATGACA CCACAGTTATG. Amplifikasi PCR dibentuk di dalam 30 μ L dari *reaction mixture* terdiri dari 17 μ L KAPA Robust Hot Start (KAPA Biosystems), 1-2 μ L genom DNA, 2,5 μ L primers 2,5 pm/ μ L, 1,25 Units Taq DNA Polymerase (Qiagen) dan MilliQ. Amplifikasi dilakukan pada Esco Swift Mini Thermo Cycler (USA). Detail kondisi amplifikasi: denaturation 95°C 5m, 35 cycles (denaturation 94°C 1 menit, *annealing* 62°C 45 detik, *extension* 72°C 45 detik) dan *extension* 72°C 10 menit. Hasil PCR kemudian diamati pada 2% agarose gel dan menggunakan Marker 100 bp, dan selanjutnya disekuen menggunakan primer *forward* dan *reverse* di First Base Company.

Primer L15997uni dan panDH15972 yang digunakan mengamplifikasi sepanjang 625 bp termasuk 40 bp tRNA Prolin. Posisi primer yang digunakan untuk amplifikasi daerah tersebut seperti pada Gambar 1.

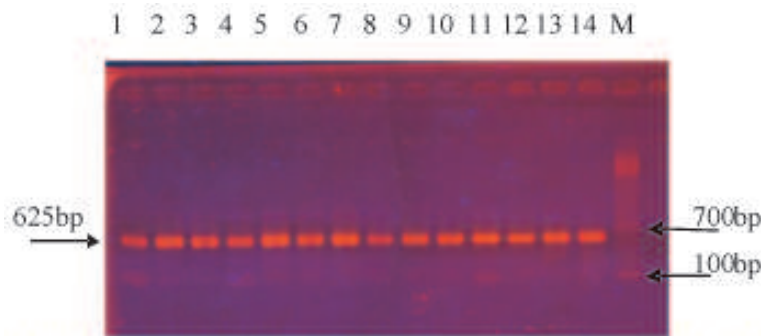
Analisis Sekuen

Sekuen *D-loop* dari semua sampel diedit menggunakan *BioEdit software* (Hall, 1999) kemudian dijajarkan (*aligned*) menggunakan program Clustal X. Sebelum dianalisis, semua hasil sekuen di-*blast* pada *National Center for*

Biotechnology Information (NCBI) program untuk menghindari adanya sampel terkontaminasi atau sekuen pseudogen. Analisis data menggunakan Program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Analisis data meliputi *variable sites* berdasarkan nukleotida, *haplotipe* (hd), keragaman nukleotida (δ), indeks transisi/*transverse* dan jarak genetik (d). Untuk memastikan hasil sekuen adalah genus *Manis* atau spesies *Manis* spp. maka dilakukan similaritas dengan program *Blast* pada *GenBank* untuk memastikan bahwa spesies yang disekuen adalah *Manis* sp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total panjang DNA hasil amplifikasi (PCR) adalah sekitar 625 bp pada *control region* seperti disajikan pada Gambar 2. *Control region* (*D-loop*) diapit oleh tRNA prolin dan tRNA phenilalanin. Panjang sekuen nukleotida *control region* tidak sama untuk semua spesies terutama pada mamalia dan tergantung pada masing-masing spesies. Pada trenggiling panjang *control region* sekitar 1164 bp (Qin *et al.*, 2012). Sekuen DNA mitokondria dipilih sebagai penanda genetik karena jumlah kopinya banyak, berukuran relatif kecil ($\pm 16,5$ kb), diturunkan dari induk betina (maternal), dan beberapa gen dalam mitokondria mutasinya lebih cepat dari pada gen inti (Wertz, 2000). Daerah *D-Loop* tDNA atau dikenal juga dengan daerah *control* (*control region*) merupakan tempat yang mengatur replikasi dan transkripsi yaitu awal dari replikasi rantai berat (Foran *et al.*, 1988). Daerah ini telah dibuktikan merupakan bagian yang paling bervariasi pada genom mitokondria dan merupakan daerah yang paling hipervariabel, mempunyai laju kecepatan mutasi empat sampai lima kali lebih cepat dibandingkan dengan daerah mtDNA lainnya. Daerah *control region* (*D-loop*) mtDNA mempunyai variasi basa yang cukup tinggi atau berevolusi dengan cepat dan memiliki fragmen



Gambar 2. Hasil sebagian amplifikasi *control region* sepanjang 625bp 1–14 sampel penelitian ; M = marker 100bp.

pendek yang konservatif (Horai *et al.*, 1993). Oleh karena itu daerah *control region*/D-loop sering digunakan untuk analisis filogenetik baik dalam spesies maupun antar spesies.

Hasil sekuensing pada *control region* dari 50 sampel sekitar 600 bp, tetapi yang digunakan untuk analisis sekitar 563 bp. Spesies ini memiliki kesamaan nukleotida tinggi dengan *M. pendactyla* yaitu dengan nilai homologi sekitar 93% sampai 95%, sedangkan dengan *M. tetradactyla* dari Afrika nilai homologi sekitar 88% sampai 89%. Hasil penelitian lain dengan menggunakan *D-loop* menunjukkan bahwa nilai homologi antara *M. pendactyla* dengan *M. tetradactyla* sekitar 71,7% sampai 82,7% (Hsieh *et al.*, 2011). Hasil ini menunjukkan bahwa *M. pendactyla* berhubungan lebih dekat dengan *M. javanica* dari pada dengan *M. tetradactyla*.

Data sekuen nukleotida selanjutnya digunakan di dalam penghitungan perbedaan nukleotida, jarak genetik, dan keragaman nukleotida antar populasi. Jumlah situs nukleotida yang berbeda pada jajaran sekuen adalah sebanyak 22 situs dan membentuk 19 haplotipe yang terdiri dari sembilan haplotipe populasi Kalimantan, tiga haplotipe diperkirakan dari populasi Sumatera, dan tujuh haplotipe populasi Jawa (Tabel 2.). Perbedaan nukleotida antara Jawa dengan Sumatera sangat kecil, tetapi dengan adanya sampel trenggiling dari alam yang mewakili masing-masing daerah persebaran, maka penentuan haplotipe dari masing-masing populasi dapat ditentukan yaitu populasi Jawa, Sumatera, dan Kalimantan. Pemisahan antara populasi Jawa dan Sumatera pada pohon filogeni menggunakan perbedaan nukleotida pada *control region* (*D-loop*) terlihat kurang jelas. Daerah kontrol sangat *conserve* pada ke lima spesies *Manidae*, baik dalam struktur dan panjang (urutan panjang bervariasi antara 1156 dan 1169 bp)

(Hassanin *et al.*, 2015)

Pada Tabel 2. terlihat perbedaan nukleotida antara ketiga populasi. Sampel yang teridentifikasi berasal dari Kalimantan memiliki perbedaan nukleotida sekitar 2,3% sampai 2,8% dengan Jawa dan Sumatera, sementara antara Jawa dengan Sumatera perbedaan nukleotida hanya sekitar 0,5% sampai 0,7%. Berdasarkan tipe haplotipe yang diperoleh dari masing-masing populasi menunjukkan trenggiling dari Kalimantan memiliki pola substitusi basa berbeda dengan populasi Jawa dan Sumatera, sedangkan antara populasi Jawa dan Sumatera tidak ada karakter spesifik yang membedakan di antara haplotipe. Berdasarkan perbedaan dari posisi situs bervariasi, hanya ada satu situs basa berbeda antara Sumatera dan Jawa yaitu pada situs 145 antara Thymin (T) pada Jawa dan Cytosine (C) pada populasi Sumatera. Sementara haplotipe populasi Kalimantan terdapat sembilan situs informatif (hanya dimiliki oleh Kalimantan) yang berbeda dengan Sumatera dan Jawa yaitu pada situs 114, 119, 122, 123, 124, 128, 141, 217, dan 219 yaitu Thymin (T) ke Adenin (A), Cytosin (C) -T, Guanin (G) - C, T-C, A-T, A-G, T-G, G-A dan T-C (Tabel 2.). Berdasarkan hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan *control region* (*D-loop*) sebagai penanda pada spesies ini terutama pada populasi Sumatera dan Jawa tidak sensitif memberikan karakter pembeda tetapi dari variasi genetik dapat memberikan informasi pembeda di antara populasi.

Jarak genetik dan keragaman nukleotida juga menunjukkan perbedaan yang jauh antara populasi Kalimantan dengan Jawa dan Sumatera. Jarak genetik (d) antara individu pada seluruh populasi sebesar $d = 0,0148 \pm 0,0035$, dengan keragaman genetik (δ) 0,0146. Tingkat keragaman genetik dari masing-masing populasi dapat dilihat dari jarak genetik

Table 2. Variasi situs nukleotida dari 19 haplotipe pada *D-loop* dari 50 sampel

Haplotipe ^a	N ^b	Nucleotide site ^c
		111111111112222234
		169011122223441112396
		785424923489154799460
CRKaLA	7	CTTTTTCGTAAGTTGGTCGCA
CRJawB	3	. . . C . ATCCTG . G . . ACT . TG
CRKaLC	11 T .
CRKaLD	1 G .
CRJawE	2 ATCCTG . G . . AC G
CRKaLF	1	. . . C G T .
CRJawG	1	. . C . . ATCCTG . G . . AC . . TG
CRJawH	1 TCCTGAG . . ACT . TG
CRSumtI	3	. CC . . ATCCCGAGC . AC . ATG
CRJawJ	2 CATCCTG . G . . AC . . TG
CRKaLK	2	T A T .
CRJawL	1 ATCCTGAG . . ACT . TG
CRKaLM	1 G T .
CRKaLN	1 A T .
CRKaLO	1	. C G TG
CRSumtP	4	. . C . . ATCCCG . GC . AC . ATG
CRSumtQ	2	. . C . . ATCCCGAGC . AC . ATG
CRJawR	3	T CATCCTG . G . . ACT . TG
CRJawS	2 ATCCTG . G . . AC . . TG
CRKaLT	1 G T .

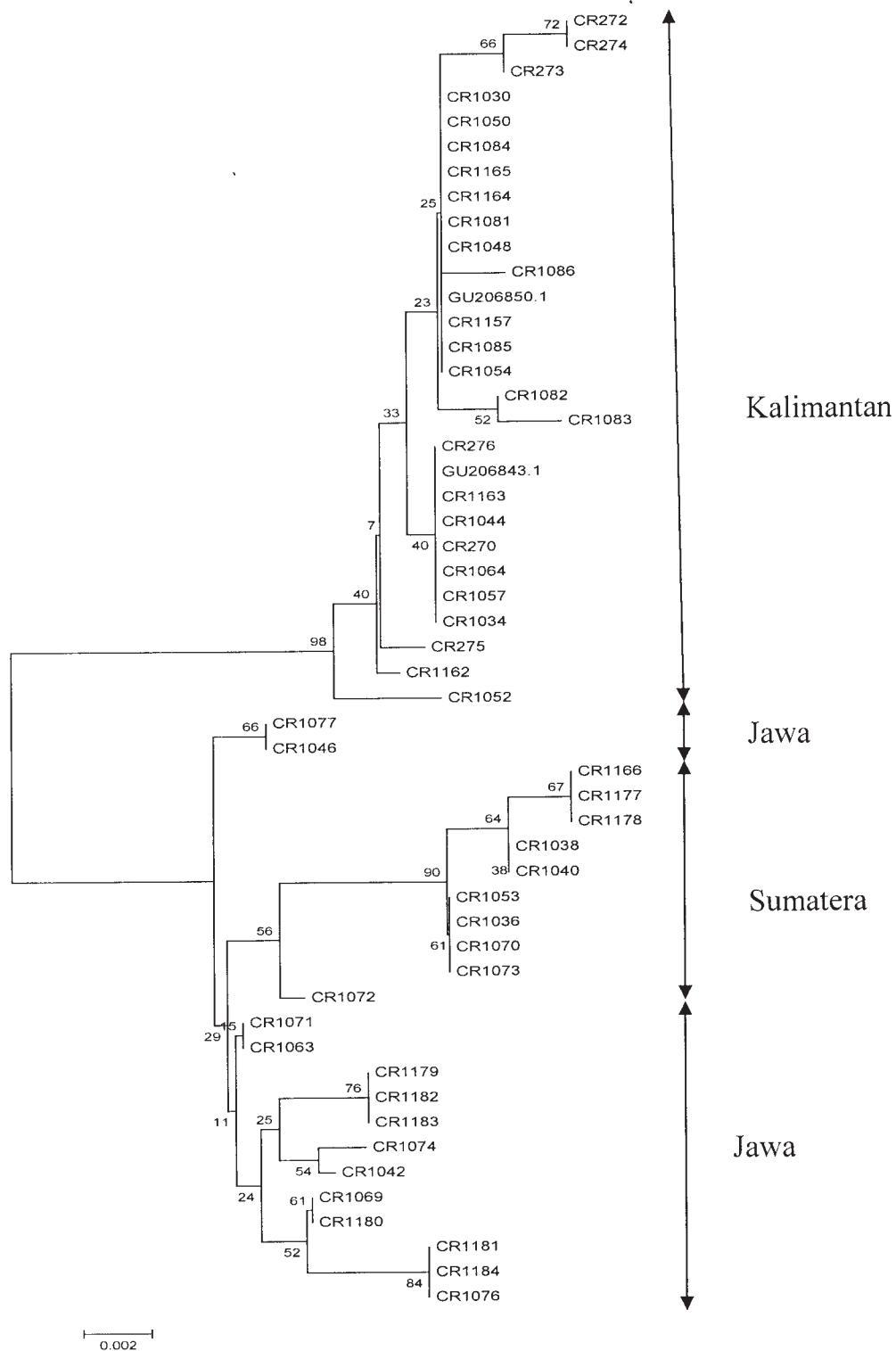
Keterangan: ^aJumlah haplotipe pada penelitian ini; ^bUkuran sampel; ^cPosisi situs yang bervariasi
D-loop pada penelitian ini

antar individu pada masing-masing populasi yaitu populasi Kalimantan $d=0,0027$, Sumatera $d=0,0020$ dan Jawa $d=0,0045$. Karakter pembeda antar populasi dapat dilihat dari jarak genetik, perbedaan nukleotida, dan keragaman nukleotida. Jarak genetik (d) antar populasi yaitu berturut turut $d=0,0121\pm0,0031$ (Kal-Jawa), $d=0,0123\pm0,0038$ (Kal-Sumt), sementara antara Jawa dan Sumatra $d=0,0075\pm0,0038$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa jarak genetik antara populasi Kalimantan dengan Jawa, dan Sumatera cukup tinggi yaitu sekitar 1,22%, sedangkan antara Jawa dengan Sumatera sangat kecil dibawah 1% yaitu 0,75%. Perbedaan nukleotida antara Kalimantan-Jawa berkisar 1,8%-3,0%; Kalimantan-Sumatera berkisar 2,1%-2,8%; Jawa-Sumatera berkisar 0,5%-1,6%. Hasil tersebut juga ditunjukan dengan nilai keragaman nukleotida (π) yaitu berturut-turut adalah $\pi=0,0121\pm0,0025$ (Kalimantan-Jawa), $\pi=0,0112\pm0,0020$ (Kalimantan-Sumatera) dan $\pi=0,0017\pm0,0008$ (Jawa-Sumatera). Laporan penelitian sebelumnya yang menggunakan sampel berbeda dan tidak diketahui asal usulnya pada gen *cytochrome-b*, rataan jarak genetik sedikit lebih

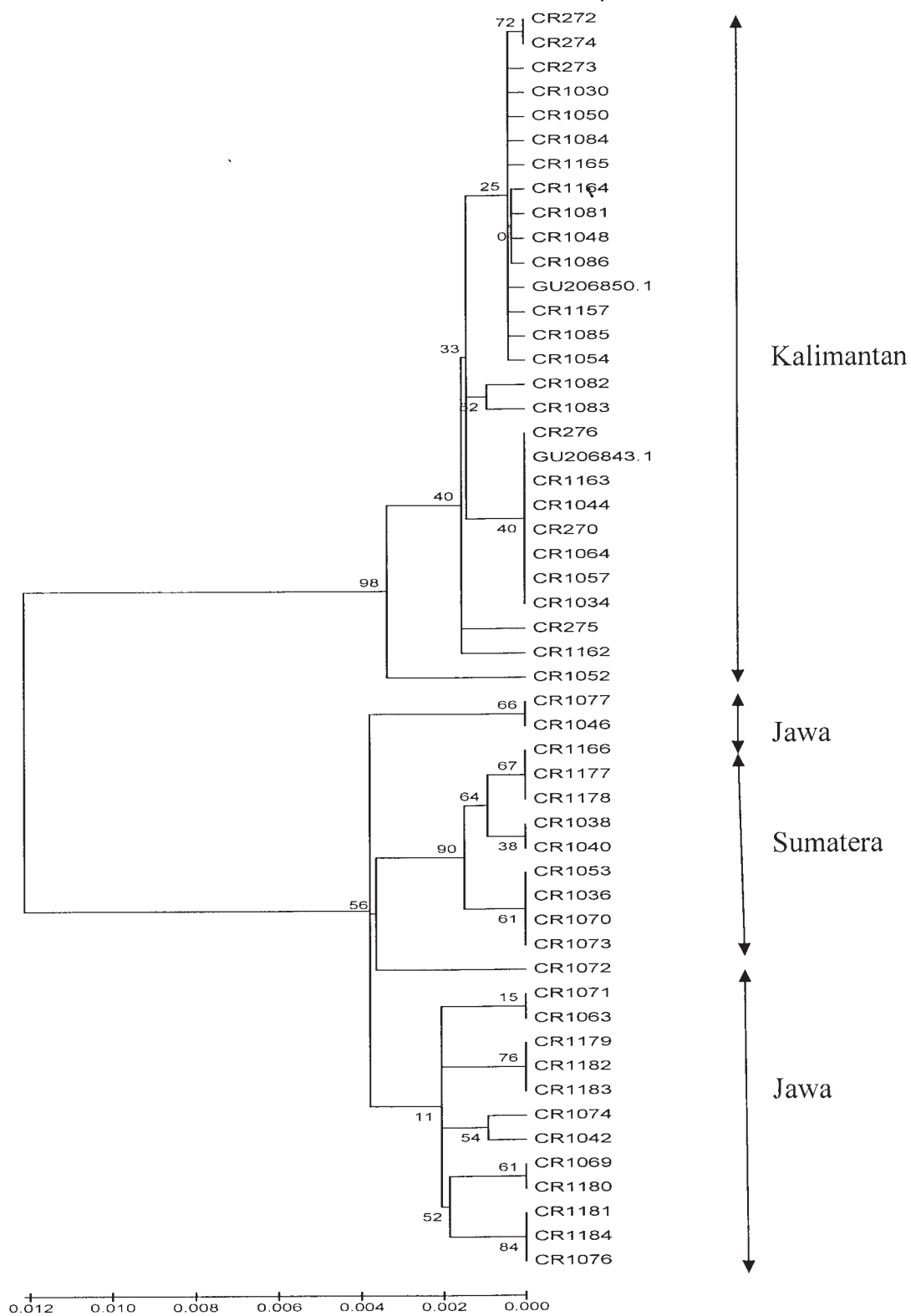
tinggi yaitu $d=0,026\pm0,006$, dan perbedaan nukleotida berkisar dari 0,3% sampai 4,2% (Wirdateti *et al.*, 2013). Perbedaan genetik yang luas juga ditemukan pada sisik trenggiling sitaan dengan menggunakan *D-loop* mitokondria di Taiwan, dan hampir semua teridentifikasi sebagai *M. javanica* (Hsieh *et al.*, 2011).

Data genetik ini dapat digunakan untuk melacak asal geografi dari spesies hewan jika masing-masing populasi mempunyai struktur keragaman genetik secara geografis (Ishida *et al.*, 2013). Namun, hasil tersebut tidak bisa menentukan asal-usul sampel secara jelas karena data referensi yang terbatas dan distribusi geografis *M. javanica* belum diketahui berdasarkan garis keturunan genetik. Keragaman genetik intra spesies *M. javanica* sepertinya sedikit diketahui, di samping itu jalur perdagangan trenggiling cukup rumit seperti terlihat pada spesies yang diperdagangkan secara ilegal lainnya yaitu *Chelonians* (Ades *et al.*, 2000), sehingga pemantauan dan mengatur perdagangan satwa penting (Nijman, 2009). Trenggiling *M. javanica* menunjukkan paling tinggi diperdagangkan dari tangkapan di wilayah Asia Tenggara berdasarkan analisis forensik sampel sisik hasil sitaan menggunakan *cytochrome-c oxidase subunit-I* (COI) mitokondria (Zhang *et al.*, 2015). Penelitian ini sedikitnya dapat membantu dalam mengungkap tingkat kejahatan satwa liar dalam hal ini trenggiling dari sampel jaringan dan forensik seperti sisik.

Analisis filogeni menunjukkan adanya dua *clade* yang terpisah dan membentuk tiga kelompok (Gambar 3 dan 4). Pemisahan yang jelas di antara dua *clade* dan tiga kelompok dapat mengidentifikasi sampel sitaan berdasarkan sampel alam yang digunakan. Dari pohon filogeni dapat dilihat bahwa *clade* pertama (Gambar 3), dari 44 sampel sitaan terdapat 24 individu dari populasi Kalimantan yaitu satu *clade* dengan sampel alam No MZBR 1084 dan 1163. Sampel tersebut hasil sitaan dari Pangkalan Bun, Palangkaraya, dan Medan. Tetapi penggunaan sekuen *D-loop M. pendactyla* dari *GenBank* (GU206843.1 dan GU20650.1) trenggiling dari China pada pohon filogeni menunjukkan kekerabatan yang lebih dekat yaitu satu kelompok dengan populasi Kalimantan. Hasil ini menarik karena *M. pendactyla* berasal dari China yang cukup jauh dari wilayah persebaran Kalimantan. Untuk mendukung hasil tersebut perlu dilakukan



Gambar 3. Pohon filogeni yang menggambarkan posisi trenggiling sitaan menggunakan *Neighbour Joining matrix* dengan *Kimura's two-parameter model*



Gambar 4. Pohon filogeni yang menggambarkan posisi trenggiling sitaan menggunakan *Maximum Parsimony method*

penelitian lebih lanjut mengenai pola sebaran dan evolusi dari *Manis* spp. dengan menggunakan berbagai sampel *Manis* sp. dari masing wilayah persebaran. *Clade* kedua terdiri dari dua kelompok yaitu kelompok populasi Jawa dan populasi Sumatera. Pemisahan *clade* pertama dan kedua dengan nilai *bootstrap* cukup tinggi, yaitu 98%. *Bootstrap* dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan cabang. Nilai *bootstrap* pada pohon filogenetik di atas termasuk dalam kategori stabil, karena suatu cabang dikatakan stabil jika nilai *bootstrap* di atas 95% dan dikatakan tidak stabil jika nilai *bootstrap* berada di bawah 70% (Osawa *et al.*, 2004).

Pengelompokan antara sampel Jawa dan Sumatera ditunjukkan berdasarkan sampel alam yang digunakan pada masing-masing kelompok. Pada kelompok Sumatera terindikasi sebanyak tujuh sampel sitaan berasal dari populasi Sumatera dan 13 sampel dari populasi Jawa. Masing-masing sampel alam terdapat dalam satu kelompok yaitu sampel dari Lampung no MZBR 1177 dan 1178 mewakili Sumatera dan sampel Jember no. MZBR 1179 dan 1180 mewakili populasi Jawa. Nilai *bootstrap* antara Jawa dan Sumatera adalah 90% yang memungkinkan populasi terpisah. Pemisahan ketiga populasi terutama Jawa dan Sumatera tidak begitu jelas, hal ini karena semua sampel sitaan adalah dalam satu spesies, tetapi penelitian filogenetik menggunakan *marker* DNA mitokondria antar spesies terlihat pemisahan secara jelas pada pohon antara *M. pendactyla* dan *M. javanica* (Gaubert dan Antunes, 2015; Hassanin *et al.*, 2015). Pohon filogeni dilihat dari lokasi sitaan dapat menjelaskan bahwa sampel sitaan dari Jakarta (Tanjung Priuk dan BKSDA Jakarta) merupakan trenggiling hasil tangkapan dari populasi Jawa, Sumatera, dan Kalimantan, sementara sitaan dari Kalimantan dan Medan umumnya trenggiling berasal dari Kalimantan, dan sitaan dari Jember dan Surabaya merupakan hasil tangkapan dari Jawa dan Sumatera. Berdasarkan pohon filogeni *control region* tersebut menunjukkan 50% trenggiling sitaan pada penelitian ini adalah berasal dari penangkapan di wilayah Kalimantan; 15,90% dari Sumatera; dan sisanya dari Jawa. Hasil ini dapat memberikan informasi pola perdagangan trenggiling dimana tangkapan melalui beberapa jalur pengumpulan sebelum diekspor. Perdagangan satwa liar merupakan bencana bagi trenggiling dan ekosistem habitat

mereka. Pemanenan trenggiling tidak hanya mengancam keberadaan mereka, tetapi juga memengaruhi ketersediaan makanan dan ekosistem setempat karena trenggiling sangat memengaruhi terhadap kelimpahan dan keragaman invertebrata penting dalam ekosistem ini (Swart *et al.*, 1999; Sileshi *et al.*, 2009). Jenis trenggiling yang paling banyak diperdagangkan di wilayah Asia saat ini adalah *M. javanica* berupa sisik (Challender, 2011; TRAFFIC, 2013), karena semakin berkurangnya populasi dari jenis *M. pendactyla* dari China yang memiliki sejarah panjang di dalam perdagangan trenggiling untuk permintaan obat dan makanan (Wu *et al.*, 2002; TRAFFIC, 2004)

SIMPULAN

Berdasarkan perbedaan nukleotida dan variasi genetik pada *control region* mtDNA menunjukkan bahwa populasi Kalimantan merupakan kelompok yang terpisah dengan populasi Sumatra dan Jawa berdasarkan jarak genetik dan pohon filogeni. Populasi trenggiling antar populasi Jawa dan Sumatra tidak menunjukkan pemisahan yang jelas pada pohon filogeni. Hasil penelitian memberikan informasi tentang asal usul populasi trenggiling sitaan yaitu 24 ekor dari Kalimantan, 13 ekor dari Jawa, dan tujuh ekor dari Sumatera. Dengan demikian dapat membantu di dalam menentukan kebijakan untuk langkah konservasi pada trenggiling bagi instansi terkait pada masing-masing wilayah persebaran.

SARAN

Untuk mendapatkan hasil penelitian yang lebih sensitif, maka diperlukan penambahan sampel dari alam terutama untuk populasi Jawa dan Sumatera, di samping itu juga diperlukan penelitian lanjutan dengan menggunakan gen yang lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung dana DIPA Biotrop 2014. Penulis menyampaikan terima kasih kepada segenap pimpinan Biotrop Bapak Jesus C Fernandes, PhD dan Prof Dr drh Bambang Purwantara atas bantuan dana hibah yang diberikan sehingga penelitian dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Ades G, Banks CB, Buhlmann KA, Chan B, Chang HC, Chen TH, Crow P, Haupt H, Kan R, Lai JY, Lau M, Lin HC, Shi H. 2000. Turtle trade in northeast Asia: regional summary (China, Hong Kong and Taiwan). Dalam: van Dijk PP, Stuart BL, Rhodin AGJ (Eds.), *Asian Turtle Trade: Proceedings of a Workshop on Conservation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia*. Dalam: *Chelonian Research Monographs*, vol. 2. Chelonian Research Foundation, Lunenburg, Massachusetts, 32–54.
- Challender DWS. 2011. Asian pangolins: Increasing affluence driving hunting pressure. *TRAFFIC Bull* 23: 92–93.
- Foran DR, Hixson JE, Brown WM. 1988. Comparisons Of Ape and Human Sequences That Regulate Mitochondrial DNA Transcription and D-Loop DNA Synthesis. *Journal Nucleic Acids* 16(13): 13–19
- Gaubert P, Antunes A. 2015. What's behind these scales? Comments to “The complete mitochondrial genome of Temminck’s ground pangolin (*Smutsia temminckii*; Smuts, 1832) and phylogenetic position of the Pholidota (Weber, 1904)”. *Gene* 563: 106–108.
- Gaudin TJ, Wible JR. 1999. The entotympanic of pangolins and the phylogeny of the Pholidota. *Journal of Mammalian Evolution* 6(1): 39–65.
- Hall TA. 1999. BioEdit; a User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95–98
- Hassanin A, Hugot JP, van Vuuren BJ. 2015. Comparison of mitochondrial genome sequences of pangolins (Mammalia, Pholidota). *Comptes Rendus Biologies* 338: 260–265.
- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonada S, Tajima K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 10: 23–47.
- Hsieh HM, James CI, Lee BC, Wud JH, Chen CA, Chen YJ, Wang GB, Chin SC, Wang LC, Adrian L, Tsai LC. 2011. Establishing the pangolin mitochondrial D-loop sequences from the confiscated scales. *Forensic Science International: Genetics* 5: 303–307.
- Ishida Y, Georgiadis NJ, Hondo T, Roca AL. 2013. Triangulating the provenance of African elephants using mitochondrial DNA. *Evol Appl* 6: 253–265.
- IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 February 2011 .
- Lim NTL, PKL Ng. 2008. Home range, activity cycle and natal den usage of a female Sunda pangolin (*Manis javanica*) (Mammalia: Pholidota) in Singapore). *Endangered Species Research* 4: 233–240.
- Meyer W, Liumsricharoen M, Hornickel I, Suprasert A, Schnapper A, Fleischer L. 2010. Demonstration of substances of innate immunity in the integument of the Malayan pangolin (*Manis javanica*). *Eur J Wildl Res* 56:287–296
- Munyala R, Liumsricharoen M, Pongket P, Prapong T, Suprasert A. 2008. Characterization of Glycoconjugates in the Sublingual Salivary Gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*). *Kasetsart J (Nat Sci)* 42: 88–94
- Nie W, Wang J, Su W, Wang Y, Yang F. 2009. Chromosomal rearrangements underlying karyotype differences between Chinese pangolin (*Manis pentadactyla*) and Malayan pangolin (*Manis javanica*) revealed by chromosome painting *Chromosome Research* 17: 321–329
- Newton P, Thai NV, Robertson R, Bell D. 2008. Pangolins in peril: using local hunters knowledge to conserve elusive species in Vietnam. *Endangered Species Research*, 6: 41–53
- Nijman V. 2009. An overview of international wildlife trade from Southeast Asia. *Biodivers Conserv* 19: 1101–1114.
- Nowak RM. 1999. *Walker s mammals of the world*, Vol 2, 6th Ed. Baltimore, USA. John Hopkins University Press.
- Osawa S, Zhi-Hui S, Imura Y. 2004. *Molecular Phylogeny and Evolution of Carabid Graound Beetles*. Springer-Verlag Tokyo: SNP Best-set Typesetter Ltd. Hongkong

- Pantel S, Chin SY. 2009. Proceedings of the Workshop on Trade and Conservation of Pangolins Native to South and Southeast Asia, TRAFFIC Southeast Asia, 30 June-2 July 2008, Singapore Zoo.
- Qin X, Dou S, Guan Q, Qin P, She Y. 2012. Complete mitochondrial genome of the *Manis pentadactyla* (Pholiata, Manidae): Comparison on *M. pentadactyla* and *M. tetradactyla*. *Mitochondrial DNA* 23: 37-38
- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Semiadi G, Darnaedi D, Arief AJ. 2008. Sunda Pangolin (*Manis javanica*) conservation in Indonesia: Status & Problems. Dalam: Asian Pangolin Conservation Workshop on Trade and Conservation of Pangolins Native to South and Southeast Asia. *Singapore Zoo & TRAFFIC Asia. Singapore 30 June-2 July 2008. Proceedings*: 12-17
- Sileshi GW, Nyeko P, Nkunika POY, Sekematte BM, Akinnifesi FK, Ajayi OC. 2009. Integrating ethno-ecological and scientific knowledge of termites for sustainable termite management and human welfare in Africa. *Ecol Soc* 14: 48.
- Swart JM, Richardson PRK, Ferguson JWH. 1999. Ecological factors affecting the feeding behaviour of pangolins (*Manis temminckii*). *J Zool* 247: 281-292.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28(10): 2731-9
- TRAFFIC. 2013. TRAFFIC bulletin seizures and prosecutions: March 1997-April 2013, Cambridge, TRAFFIC.
- TRAFFIC Southeast Asia, 2004. Armoured but endangered. *Asian Geographic*. Hlm. 64-71.
- Wertz PW. 2000. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm. Venereol Suppl (Stockh)* 208: 7-11.
- Wirdateti, Semiadi G, Yulianto. 2013. Identifikasi trenggiling (*Manis javanica*) menggunakan penanda Cytochrome-b Mitokondria DNA. *J Veteriner* 14(4): 467-474
- Wu SB, Ma GZ, Tang M, Chen H, Liu NF. 2002. The status and conservation strategy of pangolin resource in China. *J Nat Res* 17: 174-180.
- Zhang H, Miller MP, Yang F, Chan HK, Gaubert P, Ades G, Fisher GA. 2015. Molecular tracing of confiscated pangolin scales for conservation and illegal trade monitoring in Southeast Asia. *Global and Ecology and Conservation* 4: 414-422.