

This file has been cleaned of potential threats.

If you confirm that the file is coming from a trusted source, you can send the following SHA-256 hash value to your admin for the original file.

466c5b5b968db7b08660f9d5d5eaf018e9c7c36dab53c2e21d2bb093198f497a

To view the reconstructed contents, please SCROLL DOWN to next page.

**KERAGAMAN GENETIK DAN DISTRIBUSI HAPLOGROUP TRENGGILING
(*Manis javanica* Desmarest, 1822) (*Genetic Diversity and Haplogroups
Distribution of Pangolin, Manis javanicus* Desmarest, 1882)***

Reny Sawitri¹, Mariana Takandjandji¹, M. S A. Zein², dan/and Anita Rianti¹

¹Pusat Litbang Konservasi dan Rehabilitasi
Jl. Gunung Batu No. 5 PO Box 165; Telp. 0251-8633234; Fax 0251-8638111 Bogor;
e-mail: p3hka_pp@yahoo.co.id; rambu_merry@yahoo.co.id

²Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia; Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46 Cibinong
e-mail: zein_genetic@yahoo.com

*Diterima : 11 Februari 2013; Disetujui : 18 Oktober 2013

ABSTRACT

Genetic research of pangolin (Manis javanica Desmarest, 1822) is very limited, so the study of genetic diversity pangolin using mitochondrial DNA analysis is important. This study was conducted to identify and analyze variability of genes and genetic distance of pangolin from various locations of conservation areas and conservation organizations in Sumatera and Java islands. Sequence analysis of mitochondrial (mt) DNA D-loop of pangolin resulted 1129 base pairs, which contained 55 haplotypes with total numbers of 120 polymorphic sites and 12 haplogroups. Nucleotide diversity (Pi) was 0.008 and haplotype diversity (Hd) was 0.994 ± 0.006 , indicated that genetic diversity of the population was very high. Tajima test resulted D value of -2.337 and it was significantly different ($P < 0.01$), whereas Fu and Li's tests resulted D: -4.444 and F: -4.337, both were significantly different ($P < 0.02$) on genetic distance between haplotypes of pangolin populations. It is an indicator of high genetic diversity and population expansion on the pangolin.

Keywords: Pangolin, mitochondrial DNA, haplotype, genetic

ABSTRAK

Kajian keragaman genetik dari populasi trenggiling (*Manis javanica* Desmarest, 1822) belum banyak dilakukan. Penelitian ini menganalisis sekuen fragmen D-loop DNA mitokondria trenggiling, yang bertujuan untuk menyelidiki diversitas genetika trenggiling dari dua populasi, yaitu kawasan konservasi dan lembaga konservasi di Sumatera Utara dan Jawa. Fragmen D-loop DNA mitokondria yang teramplifikasi sepanjang 1129 pasang basa, terdapat 55 haplotipe dengan 120 situs, dan 12 haplogroup. Tiga frekuensi haplotipe tertinggi dijumpai pada H-19 (9,09%), H-15 dan H-43 (3,64%), dan lainnya 1,8%. Jarak genetik antar haplotipe trenggiling berkisar antara 0,001-0,099 dengan rata-rata 0,012. Jarak genetik haplogroup dengan *reference* berkisar 0,001-0,019; jarak genetik dalam haplogroup berkisar antara 0,003-0,015; jarak genetik antar haplogroup berkisar 0,003-0,021, dan jarak genetik antara haplogroup dengan *outgroup* berkisar 0,094-0,109. Diversitas nukleotida (Pi) sebesar 0,008 dan diversitas haplotipe (Hd) $0,994 \pm 0,006$, yang menunjukkan keragaman genetik yang tinggi. Hasil *Tajima test* pada jarak genetik antar haplotipe populasi trenggiling menunjukkan nilai D: -2,337 (berbeda nyata pada taraf $P < 0,1$), sedangkan hasil Fu and Li's test menghasilkan D: -4,444 dan F: -4,337 (berbeda nyata pada taraf $P < 0,02$). Hal ini merupakan indikator tingginya keragaman genetik dan ekspansi populasi trenggiling.

Kata kunci: Trenggiling, DNA mitokondria, haplotipe, genetika

I. PENDAHULUAN

Trenggiling (*Manis javanica* Desmarest, 1822) merupakan jenis mamalia yang masuk dalam daftar jenis satwa dilindungi menurut PP No. 7 tahun 1999 dan terdaftar pada Appendix II *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*

(CITES) (Newton *et al.*, 2008). Di Indonesia jenis ini menyebar di Sumatera, Jawa, Kalimantan, Kepulauan Riau, Lingga, Bangka, Belitung, Nias, Pagai, dan Bali (Corbet & Hill, 1992). Di Sumatera dan Jawa satwa ini ditemukan hanya pada ketinggian sampai 400 m dpl (Boedi pers. comm., 2006 dalam Nowak, 1999).

Populasi trenggiling di alam diperkirakan menurun lebih dari 50% dalam waktu 15 tahun terakhir (IUCN, 2012). Demikian juga menurut *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), bahwa populasi semua jenis trenggiling di Afrika dan Asia cenderung menurun (Rodrigues, 2011). Penurunan populasi trenggiling tersebut ditunjukkan oleh status konservasi yang digolongkan ke dalam satwa yang terancam punah, yaitu *Manis crassicauda*, *M. culionensis*, *M. triscupis*, dan *M. gigantea*. Spesies *M. javanica* dan *M. pentadactyla* termasuk jenis *endangered*.

Kondisi ini berkaitan dengan kerusakan habitat, reproduksi trenggiling yang berjalan lambat, program penangkaran yang belum berhasil, permintaan daging dan sisik trenggiling semakin besar, sehingga memicu terjadi perburuan dan perdagangan ilegal yang terus meningkat (Pantel & Chin, 2009 dalam Rodrigues, 2011). Menurut TRAFFIC (2008), hasil temuan daging trenggiling yang akan diekspor sejak tahun 2008 sampai 2012 di antaranya di Palembang 18 ton (tahun 2008), di Banjarmasin 360 individu (tahun 2008), di Merak 4,2 ton (tahun 2012), di Jakarta 7,2 ton (tahun 2012), sedangkan hasil sitaan trenggiling yang masih menunggu proses yudikatif dijumpai di Pangkalan Bun, 24 individu (tahun 2012), di Surabaya 288 individu (tahun 2012), dan di Jakarta 8,5 ton (tahun 2012).

Perburuan, perdagangan, dan konsumsi trenggiling tidak hanya terjadi di Indonesia, tetapi dijumpai juga di benua Afrika dan Asia terutama China (sebanyak 31 individu ditemukan di pelabuhan China pada tahun 2007), demikian juga di Thailand ditemukan 5000 satwa dilindungi di antaranya trenggiling sebanyak 138 individu di atas truk (tahun 2012). Untuk melindungi satwa ini, maka negara di Asia Tenggara memberlakukan perdagangan trenggiling merupakan perdagangan ilegal, kecuali Laos (Hence, 2008).

Kondisi yang demikian dikhawatirkan akan menyebabkan terjadinya kepunahan. Seperti diketahui keragaman genetik yang tinggi dapat membantu suatu populasi beradaptasi terhadap perubahan-perubahan yang terjadi di lingkungan sekitarnya, termasuk mampu beradaptasi terhadap penyakit yang ada di alam (Damayanti, 2010). Dalam rangka memberikan kontribusi tentang trenggiling maka dilakukan penelitian untuk mendapatkan informasi tentang keragaman genetik melalui analisis D-loop DNA mitokondria dari beberapa wilayah sebaran populasi trenggiling di Jawa dan Sumatera.

II. BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama dua tahun yaitu tahun 2011-2012, dengan mengumpulkan sampel darah, daging, dan rambut sebagai material DNA. Lokasi penelitian meliputi beberapa lembaga konservasi seperti kebun binatang dan tempat penangkaran di Sumatera Utara, Sumatera Selatan, Banten, Jawa Barat, Kebun Binatang Ragunan, Kebun Binatang Surabaya, dan UD. Multi Jaya Abadi.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah 61 sampel darah, daging, dan rambut trenggiling sebagai material DNA yang berasal dari populasi trenggiling pada lima lokasi (Tabel 1).

Pengambilan sampel darah dilakukan apabila memungkinkan. Sampel darah diperoleh dengan menggunakan alat suntik sekali pakai (tiga ml) yang telah disterilkan dengan alkohol, kemudian disuntikkan di vena jugularis pada pangkal ekor. Darah dikoleksi dalam tabung dua ml yang telah diisi terlebih dahulu dengan alkohol 100% (*high grade/extra pure*) kemudian dikocok. Jumlah/volume darah

Tabel (Table) 1. Sampel darah, rambut, dan daging trenggiling sebagai material DNA (*The pangolin samples of blood, hairs, and meats as material DNA*)

No.	Lokasi (<i>Locations</i>)	Jumlah sampel (<i>Number of samples</i>)		
		Darah (<i>Blood</i>)	Rambut (<i>Hairs</i>)	Daging (<i>Meats</i>)
1.	Sibolga, Sumatera Utara (<i>North Sumatra</i>)	47	-	-
2.	Lahat, Sumatera Selatan (<i>South Sumatra</i>)	2	-	-
3.	Kebun Binatang Ragunan (<i>Ragunan Zoo</i>)	2	1	-
4.	Kebun Binatang Surabaya (<i>Surabaya Zoo</i>)	-	2	-
5.	Sukabumi, Jawa Barat (<i>West Java</i>)	3	-	-
6.	Rangkasbitung, Banten	-	-	1
7.	UD. Multi Jaya Abadi, Binjai, Medan	-	3	-
Jumlah (<i>Total</i>)		54	6	1

yang dikoleksi, kira-kira seperlima bagian dari jumlah/volume alkohol yang digunakan untuk preservasi.

Pengambilan sampel rambut dilakukan dengan mencabut rambut dan akar rambut atau folikel trenggiling pada bagian ekor sebanyak \pm 10-15 helai. Selanjutnya potongan rambut tersebut dimasukkan ke dalam tabung yang berisi alkohol (96-100%) sebagai bahan pengawet.

Sampel daging didapatkan dari kadaver trenggiling hasil sitaan yang diawetkan dengan alkohol (96-100%) dalam tabung. Selanjutnya, seluruh sampel darah dibawa ke laboratorium genetika molekuler disimpan di Bank DNA Laboratorium Genetika, Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI di Cibinong untuk dilakukan analisis lebih lanjut.

C. Metode Penelitian

1. Analisis DNA

Analisis DNA yang dilakukan meliputi: ekstraksi/isolasi DNA menggunakan *Dneasy Blood & Tissue Kit*, *Qiagen Sciences*, Maryland, USA (Sambrock *et al.*, 1989), elektroforesis dan visualisasi DNA total, pemeriksaan kuantitas dan kualitas DNA dengan menggunakan spektrofotometer (Beckman, DU 650), proses amplifikasi D-loop DNA mitokondria dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elektroforesis dan visualisasi produk PCR dengan gel agarose 2%, purifikasi produk PCR, sekuensing fragmen D-loop DNA mitokondria, analisis data sekuen D-loop DNA mitokondria dengan

berbagai perangkat lunak komputer, yaitu MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 5.05, NETWORK 4.1.0.8 dan DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) versi 5.10.01.

Amplifikasi fragmen D-loop DNA mitokondria dilakukan proses PCR menggunakan Thermal Cycler 2720 AB-USA. Proses amplifikasi dengan sepasang primer forward H-600(5'-CATTTCAGTGCTTTGCTTT-3') dan reverse L-15997(5'-AGCCCCCAAAGCTGATATTCT-3'). Reaksi PCR dengan volume 50 μ l terdiri dari: 1,25 μ l *forward primer* (10 pmol), 1,25 μ l *reverse primer* (10 pmol), 5 μ l 10 x buffer PCR, 5 μ l MgCl₂ (25 pmol), 1 μ l dNTP (10 pmol), 0,3 μ l Taq (5 U/ μ l), 0,5 μ l BSA (25 pmol), DNA template dan 33,7 μ l H₂O. Kondisi PCR sebagai berikut: pre denaturasi 94°C selama 5 menit, kemudian dilanjutkan 35 siklus yang meliputi denaturasi 94°C selama 60 detik, annealing 60°C selama 45 detik, elongasi 72°C selama 60 detik. Setelah proses tersebut dilakukan final elongasi 72°C selama 10 menit.

Terhadap 61 sampel dilakukan proses PCR dan berhasil diamplifikasi dengan sempurna. Hasil elektroforesis produk PCR dengan *Agarose Gel Electrophoresis* (AGE) 2% terlihat ada pita (*band*) yang cukup tebal dan bersih sehingga akan dilakukan *clean up* sebelum proses sekuen DNA, tetapi produk PCR yang masih terlihat ada *band non target* dilakukan isolasi pada *band target* dengan

menggunakan Gel/PCR DNA *Fragments Extraction Kit Aid*).

Sekuen fragmen *D-loop* DNA mitokondria dilakukan dari arah primer *forward* H-600 dan primer *reverse* L-15997. Proses analisis dilakukan sebagai berikut: produk PCR dari fragmen *D-loop* DNA mitokondria dipurifikasi dengan menggunakan MicroSpin S-400 HR Columns. *Kit cycle sekuensing* yang digunakan adalah Big Dye*Terminator Version 3.1 (*Applied Biosystems*), dengan total volume 20 μ l yang mengandung 20 ng produk PCR yang telah dipurifikasi sebagai *template* DNA dan 3.2 pmol primer. Pada setiap tabung reaksi PCR berisi 8 μ l *big dye terminator ready reaction mix* (campuran dNTP, ddNTP, bufer, enzim, dan $MgCl_2$), 8 μ l air milliQ, 2 μ l masing-masing primer *forward* atau *reverse*, dan 2 μ l *tem-plate* DNA. Kemudian tabung divortex sebentar, disentrifugasi selama 10 detik dan dilakukan reaksi sekuen di mesin PCR (*Thermal Cycler Applied Biosystems type 9700*). Kondisi PCR untuk reaksi se-kuen adalah 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik, dan 60°C selama 4 menit sebanyak 25 siklus. Setelah proses se-kuen selesai, produk PCR (reaksi sekuen) di purifikasi dengan menggunakan AMPure*PCR purification kit (*Agencourt Bioscience Corporation, 500 Cummings Center, Beverly, MA*). Purifikasi dilakukan untuk menghilangkan kelebihan primer, nukleotida, dye-terminator, garam, dan enzim. Proses terakhir yaitu melakukan sekuen pada produk yang telah dipurifikasi, dengan menggunakan mesin DNA sekuenser kapiler (ABI 3100).

2. Analisis Data Molekuler

Data sekuen dianalisis meliputi *viewing* dan *editing* dari 122 sekuen fragmen *D-loop* DNA mitokondria yaitu 61 sekuen dari arah primer *forward* H-600 dan 61 sekuen dari arah primer *reverse* L-15997. Setelah dilakukan editing hasil sekuen dari kedua arah maka dilakukan *multiple alignment* sekuen dan analisa fi-

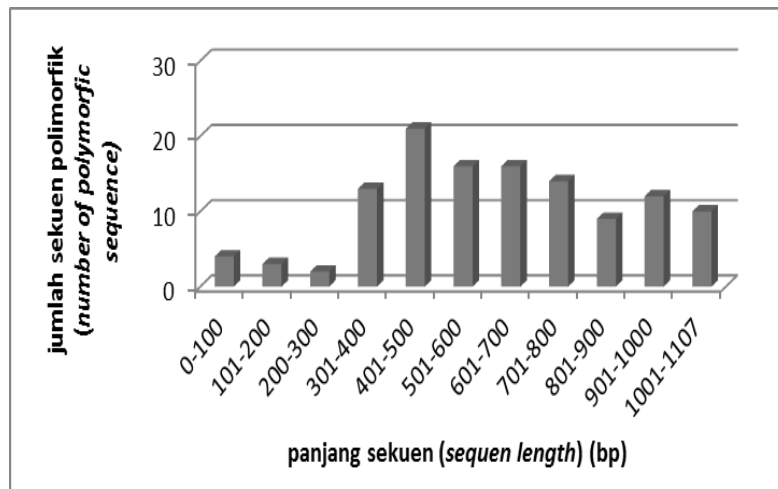
logenetik dengan metoda *neighbor-joining*, di mana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura-2 parameter yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program perangkat lunak MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Analisa *Median-joining Network* dari 61 sekuen trenggiling dilakukan dengan menggunakan program perangkat lunak NETWORK 4.1.0.8 (Bandelt *et al.*, 1999). Estimasi polimorfisme DNA di dalam populasi meliputi jumlah haplotipe, situs polimorfik, keragaman haplotipe (*haplotype diversity*), keragaman nukleotida (*nucleotide diversity*), uji Fu & Li, dan uji Tajima menggunakan perangkat lunak DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) versi 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2003).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Polimorfisme Sekuen *D-Loop* DNA Mitokondria

Hasil analisis sekuen *D-loop* DNA mitokondria sepanjang 1129 pasang basa (*base pair*) dari populasi trenggiling terdapat 55 haplotipe. Distribusi situs polimorfik sekuen *D-loop* DNA mitokondria tersebut yaitu empat situs polimorfik pada urutan 0-100 bp (3,33%), tiga situs polimorfik (2,50%) pada urutan 101-200 bp, dua situs polimorfik (1,66%) pada urutan 201-300 bp, 13 situs polimorfik (10,83%) pada urutan 301-400 bp, 21 situs polimorfik (17,50%) pada urutan 401-500 bp, 16 situs polimorfik (13,33%) pada urutan 501-600 bp, 16 situs polimorfik (13,33%) pada urutan 601-700 bp, 14 situs polimorfik (11,66%) pada urutan 701-800 bp, sembilan situs polimorfik (7,50%) pada urutan 801-900 bp, 12 situs polimorfik (8,57%) pada urutan 901-1000 bp, dan 10 situs polimorfik (8,33%) pada urutan 1001-1129 bp (Gambar 1).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa situs polimorfik tertinggi pada sekuen fragmen *D-loop* DNA mitokondria pada



Gambar (Figure) 1. Distribusi situs polimorfik sekuen *D-loop* DNA mitokondria (*Situs polymorphic distribution of D-loop DNA mitochondria sequences*)

urutan 401-500 bp, yang berarti variabilitas tinggi pada trenggiling terdapat pada urutan nukleotida 401-500, yaitu 21 situs polimorfik (17,50%). Hal ini berarti bahwa analisis keragaman genetik trenggiling sebaiknya cukup menggunakan 401-500 bp dari sekuen *D-loop* DNA mitokondria. Kondisi yang demikian juga telah dimanfaatkan untuk menganalisis hasil sekuen ayam lombok yang memiliki variabilitas tinggi pada urutan nukleotida 200-400 yaitu 20 situs polimorfik (80%), yang berarti bahwa analisis keragaman genetik ayam lombok sebaiknya dilakukan pada segmen *hipervariable-1* (397 basa) dari *D-loop* DNA mitokondria (Zein & Sulandari, 2008).

Penggunaan *D-loop* DNA mitokondria memiliki beberapa kelebihan karena tidak dipengaruhi oleh perubahan lingkungan, faktor pertumbuhan, derajat polimorfisme tinggi atau laju evolusi yang cepat, informasi dan ciri gen lebih banyak serta bersifat lebih sensitif, sehingga sifat tersebut sesuai dengan penelaahan masalah ekologis yang terkait dengan unit populasi, filogenetik, filogeografi, pola migrasi, hibridisasi antar stok sistematis dan pemandu genetik stok (Birmingham, 1990). Analisis tentang DNA mitokondria yang berasal dari hati dalam bentuk situs polimorfik telah digunakan untuk membedakan trenggiling China yang memiliki si-

sik berbeda warnanya yaitu coklat dan kehitam-hitaman (Zhang & Li-ming, 1991). Hasil analisis dari 196 bp pada dilokasi 51-56 dengan mengkombinasikan pola *cleavage* dari masing-masing enzim, jumlah nukleotide substitusi per lokasi pada tipe dusky dan coklat adalah 0,002 dan antara tipe kehitam-hitaman dan coklat adalah 0,012.

B. Filogeni dan Distribusi Haplotipe

Analisis filogeni berdasarkan fragmen *D-loop* DNA mitokondria dilakukan dengan perangkat lunak MEGA versi 5.05 dengan nilai *bootstrap* 1000. Nilai *bootstrap* tersebut menjadi tolok ukur penentu tingkat kepercayaan pohon filogeni, karena menentukan tingkat kepercayaan pohon filogeni yang didasarkan pada distribusi karakter pada data yang dipengaruhi efek acak. Semakin besar nilai *bootstrap*, maka semakin tinggi nilai kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi (Nei & Kumar, 2000). Hasil analisis filogeni terdapat 55 haplotipe dan 12 *haplogroup*.

Frekuensi haplotipe (H) tertinggi pada populasi trenggiling berturut-turut terdapat pada H-19 (9,09%) dari populasi Sumatera Utara, H-15 dan H-43 (3,64%) dari populasi Sumatera Utara dan Sukabumi, dan frekuensi haplotipe 1,8% yang tersebar di Sumatera Utara, Sukabumi,

Banten, Kebun Binatang Ragunan, Kebun Binatang Surabaya, dan di UD. Multi Jaya Abadi (MJA). Keragaman haplotipe yang tinggi menunjukkan bahwa diversitas genetik trenggiling masih tinggi dan indikator bahwa sampel dikoleksi dari berbagai lokasi yang berjauhan. Hal ini sesuai dengan modus perdagangan ilegal trenggiling yang akan diekspor melalui pelabuhan Belawan, Sumatera Utara berasal dari daerah sekitarnya seperti Provinsi Aceh, Riau, dan Sumatera Barat (Dewantoro, 2013). Distribusi haplotipe trenggiling secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.

Rekonstruksi pohon filogeni dari fragmen *D-loop* DNA mitokondria menunjukkan keragaman genetik dari individu trenggiling yang digunakan dalam analisa ini. Ekspresi dari keragaman genetik populasi trenggiling tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.

Pengetahuan tentang deskripsi variasi genetik dapat digunakan sebagai unit konservasi potensial yang dinamakan filogeografi yang berkaitan dengan biogeografi dan filogenetik. Pohon filogeni juga telah digunakan untuk melacak hubungan kekerabatan trenggiling dengan mamalia lainnya, hasilnya diketahui bahwa trenggiling lebih dekat dengan karnivor dibandingkan dengan pemakan semut lainnya seperti armadillo (Beck *et al.*, 2006). Hubungan filogenetik antar populasi yang terpisah secara geografis dapat dikenali pola pergerakan dan tingkat aliran gen di antara populasi, sehingga dapat digunakan, baik dalam program penangkaran maupun pelepasliaran (Avice, 1994). Hal ini dapat dimanfaatkan dalam program pengembangbiakan trenggiling dengan melakukan perkawinan antar *haplogroup* dalam usaha meningkatkan keragaman genetik dari populasi trenggiling.

C. Analisis *Median-joining Network*

Analisis *Median-joining Network* dari 61 sekuen fragmen *D-loop* DNA mitokondria (55 haplotipe) dari trenggiling di-

lakukan dengan menggunakan program perangkat lunak NETWORK 4.1.0.8. (Bandelt *et al.*, 1999). *Median joining network* membuat deskripsi variasi genetik trenggiling yang dikoleksi dari Sumatera Utara, Sumatera Selatan, Banten, Sukabumi, Kebun Binatang Ragunan, Kebun Binatang Surabaya, dan penangkaran di Sumatera Utara. Posisi dari 12 *haplogroup* (*Haplogroup* A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, dan L) ditunjukkan dengan warna yang berbeda. Secara umum frekuensi masing-masing haplotipe dalam *haplogroup* tidak ada yang dominan. Hal ini dapat ditunjukkan oleh area masing-masing lingkaran yang secara proporsional besarnya sama yang merupakan gambaran dari nilai frekuensi, kecuali pada haplotipe (H-19, H-15, dan H-43). Gambaran lebih rinci dapat dilihat pada Gambar 3.

Median-joining Network menunjukkan deskripsi variasi genetik trenggiling dari beberapa lokasi yang ditunjukkan oleh 12 *haplogroup* dalam 12 warna yang berbeda (Tabel 2). Data tersebut menunjukkan bahwa trenggiling yang terdapat di penangkaran UD. Multi Jaya Abadi berasal dari Sumatera Utara, sedangkan trenggiling di Kebun Binatang Ragunan berasal dari Sukabumi dan Banten. Sementara, trenggiling di Kebun Binatang Surabaya merupakan pemberian masyarakat yang berasal dari tempat berbeda di Jawa Timur.

D. Diversitas Genetik dan Uji Polimorfisme

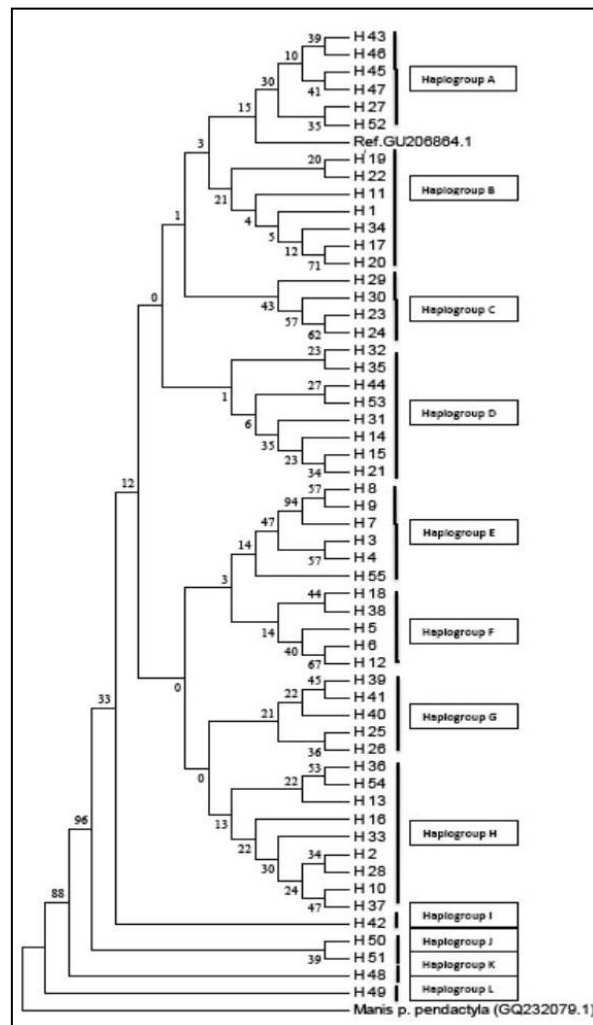
Keragaman genetik dari populasi trenggiling di Sumatera Utara, Sumatera Selatan, Rangkasbitung, Sukabumi, Kebun Binatang Surabaya, Kebun Binatang Ragunan, dan penangkaran di Sumatera Utara dilakukan dengan perangkat lunak DnaSP versi 5.10.01. Hasil analisis sekuen fragmen *D-loop* DNA mitokondria terdapat 55 haplotipe dengan jumlah 120 situs polimorfik. Jarak genetik antar haplotipe (55 haplotipe) trenggiling pada

Tabel (Table) 2. Distribusi haplotipe trenggiling (*Manis javanica*) berdasarkan D-loop DNA mitokondria (*Haplotypes distribution of pangolin based on D-loop DNA mitochondrial*)

Haplotipe (Haplo- types)	Lokasi populasi trenggiling (<i>Locations of trenggiling populations</i>)							Total	Frekuensi (<i>Frequency</i>) (%)
	Sumatera Utara (<i>North Sumatera</i>)	Sumatera Selatan (<i>South Sumatera</i>)	Kebun Bina- tang Ragu- nan (<i>Ragu- nan Zoo</i>)	Kebun Binatang Surabaya (<i>Surabaya Zoo</i>)	Sukabumi, Jawa Ba- rat (<i>Suka- bumi, West Java</i>)	Rang- kasbi- tung, Banten	UD. Multi Jaya Abadi		
H-1	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-2	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-3	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-4	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-5	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-6	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-7	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-8	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-9	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-10	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-11	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-12	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-13	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-14	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-15	2	-	-	-	-	-	-	2	3,64
H-16	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-17	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-18	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-19	5	-	-	-	-	-	-	5	9,09
H-20	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-21	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-22	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-23	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-24	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-25	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-26	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-27	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-28	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-29	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-30	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-31	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-32	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-33	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-34	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-35	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-36	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-37	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-38	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-39	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-40	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-41	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-42	1	-	-	-	-	-	-	1	1,8
H-43	-	-	-	-	2	-	-	2	3,64
H-44	-	-	-	-	1	-	-	1	1,8
H-45	-	-	1	-	-	-	-	1	1,8
H-46	-	-	1	-	-	-	-	1	1,8
H-47	-	-	1	-	-	-	-	1	1,8
H-48	-	-	-	1	-	-	-	1	1,8
H-49	-	-	-	1	-	-	-	1	1,8
H-50	-	1	-	-	-	-	-	1	1,8
H-51	-	1	-	-	-	-	-	1	1,8
H-52	-	-	-	-	-	1	-	1	1,8
H-53	-	-	-	-	-	-	1	1	1,8
H-54	-	-	-	-	-	-	1	1	1,8
H-55	-	-	-	-	-	-	1	1	1,8

Keterangan (*Remarks*):

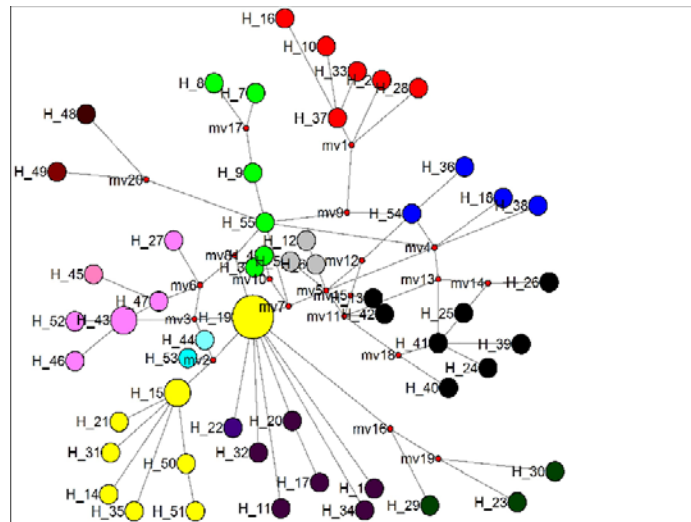
Angka bercetak tebal menunjukkan distribusi haplotipe tertinggi (*Bold number was the highest of distribution haplotypes*)



Gambar (Figure) 2. Pohon filogeni trenggiling (*Manis javanica*) berdasarkan sekuen D-loop DNA mitokondria (Phylogeny tree of pangolin based on D-loop DNA mitochondria)

semua populasi berkisar antara 0,00-0,099 dengan rata-rata 0,012, jarak genetik *haplogroup* dengan *reference* berkisar 0,001-0,019, dan jarak genetik dalam *haplogroup* berkisar antara 0,003-0,015, jarak genetik antar *haplogroup* berkisar 0,003-0,021 dan jarak genetik antara *haplogroup* dengan *outgroup* berkisar 0,094-0,109 (Tabel 3). Diversitas nukleotida (P_i) 0,00771 dan diversitas haplotipe (H_d) $0,994 \pm 0,006$. Hasil tersebut menunjukkan jarak genetik masing-masing *haplogroup* dengan sekuen *reference* dan jarak genetik antar *haplogroup* pada kisaran yang sama, sedangkan jarak genetik masing-masing *haplogroup* dengan sekuen *outgroup* sangat jauh karena berbeda spesies.

Pengujian hipotesis mutasi netral pada polimorfisme DNA dilakukan dengan uji Tajima (1989) dan uji Fu & Li (1993). Hasil uji Tajima menunjukkan nilai D : -2,33757 (negatif) dan berbeda sangat nyata $P < 0,01$. Uji Fu dan Li D : -4,44398 dan F : -4,33706 (negatif) dan berbeda sangat nyata $P < 0,02$. Menurut Simonsen *et al.* (1995) dikatakan uji Fu dan Li sedikit lebih sensitif dibandingkan dengan uji Tajima, selain itu nilai Fu's F_s negatif (-69,917). Nilai negatif pada pengujian di atas menunjukkan belum terjadi perkawinan antar keluarga dekat. Hal ini merupakan indikator tingginya diversitas genetik dan ekspansi populasi pada trenggiling karena pengambilan sampel meliputi sebaran yang luas.



Keterangan (Remarks):

- Haplogroup A, ■ Haplogroup B, ■ Haplogroup C, ■ Haplogroup D, ■ Haplogroup E, ■ Haplogroup F
- Haplogroup G, ■ Haplogroup H, ■ Haplogroup I, ■ Haplogroup J, ■ Haplogroup K, ■ Haplogroup L

Gambar (Figure) 3. Analisis *median-joining network* trenggiling berdasarkan sekuen *D-loop* DNA mitokondria, masing-masing lingkaran merupakan proporsi frekuensi haplotipe (*Analysis of median-joining network of pangolin based on D-loop DNA mitochondria sequences, each circle was a proportional frequency of haplotype*)

Tabel (Table) 3. Jarak genetik antar *haplogroup* dari populasi *Manis javanica* (*Genetic distance among haplogroups of population Manis javanica*)

Reference,	
Outgroup,	0,103
Haplogroup_B,	0,003 0,104
Haplogroup_H,	0,006 0,104 0,007
Haplogroup_E,	0,008 0,106 0,009 0,01,
Haplogroup_F,	0,004 0,104 0,005 0,007 0,009
Haplogroup_D,	0,004 0,102 0,005 0,008 0,010 0,007
Haplogroup_C,	0,011 0,109 0,011 0,014 0,016 0,012 0,013
Haplogroup_G,	0,007 0,105 0,008 0,008 0,011 0,006 0,009 0,014
Haplogroup_A,	0,003 0,105 0,005 0,008 0,010 0,006 0,006 0,013 0,008
Haplogroup_K,	0,006 0,101 0,007 0,005 0,009 0,006 0,007 0,013 0,008 0,007
Haplogroup_I,	0,004 0,100 0,005 0,007 0,009 0,004 0,007 0,012 0,004 0,007 0,007
Haplogroup_L,	0,019 0,094 0,020 0,017 0,023 0,020 0,018 0,026 0,021 0,021 0,017 0,016
Haplogroup_J,	0,004 0,099 0,005 0,007 0,009 0,006 0,004 0,013 0,009 0,007 0,006 0,004 0,015

Keterangan (Remarks):

Angka berwarna merah berarti kisaran jarak genetik antar *haplogroup* (*red number was genetic distance among haplogroups*), angka berwarna biru berarti jarak genetik antara *haplogroup* dengan *outgroup* (*blue number was genetic distance between outgroup with haplogroups*)

Diversitas genetik populasi trenggiling yang tinggi sebagai suatu unit evolusi yang nyata (*evolutionary significant unit*) menunjukkan adanya proses evolusi yang alamiah dan reproduksi dengan aliran gen secara teratur, sehingga kepunahan populasi yang disebabkan oleh keragaman genetik rendah atau terjadinya *inbreeding* di antara individu di dalam populasi belum terjadi. Ancaman kepunahan dapat terjadi

pada populasi trenggiling karena adanya perburuan ilegal untuk memenuhi permintaan perdagangan ilegal dan penyelundupan (Novriyanti, 2011; Dandy, 2013; Wibisono, 2009; Marini, 2013). Di samping itu, resiko kepunahan populasi trenggiling juga karena kerusakan habitat akibat deforestasi dan degradasi hutan terutama konversi hutan untuk penggunaan lain, sehingga habitat satwa menjadi

semakin menyempit dan terfragmentasi (Himawan, 2012). Deforestasi dan degradasi hutan di Indonesia mencapai 480.000 ha/tahun (Kementerian Kehutanan, 2012).

E. Implikasi Bagi Konservasi

Hasil analisis menunjukkan keragaman genetika trenggiling saat ini dari populasi trenggiling di Sumatera Utara dan Jawa masih tinggi, namun demikian penurunan populasi secara dratis akibat perburuan dan perdagangan ilegal akan dapat berdampak pada penurunan keragaman genetik pada generasi selanjutnya. Keragaman genetik antar populasi trenggiling yang tinggi dapat merupakan dampak dari habitat yang terisolasi dan terfragmentasi atau habitat antara populasi yang berjauhan. Kondisi ini juga terjadi pada harimau di India yang mengalami kenaikan keragaman genetik antar populasi tetapi variasi genetik di dalam populasi sangat rendah, dikarenakan habitat yang terfragmentasi dan terisolasi sehingga tidak terjadi aliran gen di antara populasi yang ada (Mondol *et al.*, 2013).

Berdasarkan sekuen *D-loop* DNA mitokondria dan analisis *Median-joining Network* diketahui variasi genetik trenggiling terdiri dari 12 *haplogroup* yang merupakan kesatuan unit konservasi, maka translokasi antar individu dan antar *haplogroup* perlu dipertimbangkan sebagai upaya konservasi. Berdasarkan pohon filogeni, trenggiling di Kebun Binatang Ragunan ternyata memiliki kekerabatan geografik dengan trenggiling yang berasal dari Banten maupun Sumatera Utara, sehingga dapat dipergunakan untuk program pengembangbiakan untuk memperkuat populasi dari kedua provinsi tersebut.

Pendekatan konservasi genetik diaplikasikan untuk identifikasi jenis, mendesain manajemen jenis, forensik untuk koleksi ilegal dan analisa penyakit, identifikasi dinamika populasi, dan informasi biologi jenis yang berharga lainnya (Ho-

wes *et al.*, 2009). Dengan demikian konservasi genetik merupakan komponen yang penting dalam implikasi konservasi manajemen dan pemulihan jenis dari populasi yang dilindungi. Hal ini berhubungan dengan identifikasi keragaman genetik dan masalah sistematika dalam pengenalan unit evolusi. Hasil penelitian ini dapat digunakan dalam mengetahui asal-usul trenggiling, hubungan kekerabatan, dan strategi pengelolaan populasi maupun jenis trenggiling melalui program pengembangbiakan dan pelepasliaran dengan aliran gen yang teratur berdasarkan unit kesatuan konservasi yaitu *haplogroup*. *Haplogroup* sebagai suatu unit konservasi merupakan suatu kesatuan unit pengelolaan untuk tujuan konservasi tertentu. Sebagai contoh pelepasliaran kobra China ke alam harus mempertimbangkan asal-usul dan tiga *haplogroup* yang telah ditemukan untuk menghindari keseragaman secara tidak alamiah (Lin *et al.*, 2012).

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Sekuen *D-loop* DNA mitokondria populasi trenggiling (*Manis javanica* Desmarest, 1822) sepanjang 1.129 pasang basa (*base pair*) terdapat 55 haplotipe dengan 120 situs polimorfik.
2. Situs polimorfik tertinggi terdapat pada sekuen fragmen *D-loop* DNA mitokondria urutan 40-500 bp.
3. Populasi trenggiling di Sumatera Utara, Sumatera Selatan, Sukabumi, Rangkasbitung Banten, Kebun Binatang Ragunan, Kebun Binatang Surabaya, dan UD. Multi Jaya Abadi berdasarkan sekuen *D-loop* DNA mitokondria terdapat 12 *haplogroup*, yaitu *haplogroup* A (12,73%), B (7,27%), C (5,45%), D (10,91%), E (10,91%), F (7,27%), G (10,91%), H (14,55%), I (3,64%), J (12,67%), K (1,8%), dan L (1,8%), di mana frekuensi terbesar adalah *haplogroup* H dan terkecil adalah *haplogroup* K dan L.

4. Jarak genetik antar haplotipe trenggiling berkisar antara 0,001-0,099 dengan rata-rata 0,012, jarak genetik *haplogroup* dengan *reference* berkisar 0,001-0,019, jarak genetik dalam *haplogroup* berkisar antara 0,003-0,015, jarak genetik antar *haplogroup* berkisar 0,003-0,021, dan jarak genetik antara *haplogroup* dengan *outgroup* berkisar 0,094-0,109. Diversitas nukleotida (Pi) 0,00771, diversitas haplotipe (Hd) $0,994 \pm 0,006$, dan Fu's Fs statistik yaitu negatif 59,917 yang menunjukkan keragaman genetik karena populasi berasal dari habitat yang berjauhan.
5. Implikasi hasil penelitian adalah unit kesatuan konservasi trenggiling terbagi ke dalam 12 *haplogroup* yang dapat dimanfaatkan dalam mengetahui asal-usul, hubungan kekerabatan, program pelepasliaran, dan pengembangbiakan *in-situ* dan *ex-situ*.

B. Saran

1. Strategi pengelolaan trenggiling hendaknya didasarkan pada konservasi genetik melalui analisis filogeni, analisis *Median-joining Network*, diversitas genetik serta uji polimorfisme.
2. Penelitian lanjutan yang diperlukan guna melengkapi penelitian ini adalah kajian keragaman genetik trenggiling yang berasal dari Pulau Kalimantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Avise, J.C. (1994). *Molecular markers natural history and evolution*. New York: Chapman and Hall.
- Bandelt, H.J., Forster, P., & Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intra specific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37-38.
- Beck, R.M.D, Bininda-Emonds, O.R.P., Cardillo, M., Liu, F.G.R. & Purvis, A. (2006). A higher-level MRP supertree a placental mammals. *Bio-*
- Med Central Evolutionary Biology* 6:93.
- Birmingham, E. (1990). Mitochondrial DNA and the analysis of fish population structure. In D.H. Whitmore (Ed.), *Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management* (pp. 107-129). Florida: CRC Press, Inc Boca Raton.
- Corbet, G. & Hill, J. (1992). *Mammals of the Indomalayan region*. Oxford: Natural History Museum, London and Oxford University Press.
- Damayanti, S.C. (2010). *Peranan studi genetika dalam kegiatan konservasi*. Diakses 5 Pebruari 2010 dari www.docstoc.com/Peranan-Studi-Genetika-dalam-Kegiatan-Konservasi.
- Dandy. (2013). *Study save trenggiling 2013*. Diakses 5 Juli 2013 dari <http://dandysmainfile.blogspot.com/2013/03/study-save-trenggiling-2013>.
- Dewantoro. (2013, 5 Maret). Medan pintu gerbang perdagangan hewan dilindungi. *Medan Bisnis*. Diakses 5 Juli 2013 dari http://www.medanbisnis.daily.com/news/read/2013/03/05/16294/medan_pintu_gerbang_perdagangan_hewan_dilindungi/#.
- Fu, Y.X. & Li, W.H. (1993). Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- Hence, J. (2008). *Illegal wildlife trade devastating Asia's pangolins*. Diakses 25 Juni 2013 dari <http://www.mongabay.com>.
- Himawan, S. (2012). *Pemberantasan wildlife crime di Indonesia melalui kerjasama Asian Wildlife Enforcement Network (ASIAN-WEN)*. (Tesis). Program Pasca Sarjana, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Howes, B.J., Pither, R., & Prior, K.A. (2009). Conservation implications should guide the application of conservation genetics research. *Endangered Species Research* 8,193-199.

- IUCN. (2012). *IUCN redlist of threatened species*. Diakses 30 Desember 2013 dari www.iucnredlist.org.
- Kementerian Kehutanan. (2012). *Statistik Kehutanan Indonesia Tahun 2012*. Jakarta: Kementerian Kehutanan. Diakses 4 Juli 2013 dari <http://www.dephut.go.id/index.php?q=id/taxonomy/term/287/0>.
- Lin, L.H., Qi, Y.F., Zhou, K.Y., & Ji, X. (2012). *Genetic structure and demographic history should inform conservation: Chinese cobras currently treated as homogenous show population*. Diakses 4 Juli 2013 dari <http://worldwidescience.org/topicpages/t/t-dna+medicted+gene-html>.
- Marini, H.S. (2013, 18 Februari). Populasi trenggiling di Sumsel semakin terancam. *Antara News*. Diakses 4 Juli 2013 dari <http://www.antarbengkulucom/berita/10645/populasi-trenggiling-di-sumsel-semakin-terancam>.
- Mondol, S., Bruford, M.W., & Ramakrishnan, U. (2013). *Demographic loss, genetic structure and the conservation implications for Indian tigers*. Diakses 5 Juli 2013 dari The Royal Society, <http://www.royalsocietypublishing.org/20130496>.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press, Inc.
- Newton, P., Thai, N.V., Robertson, S., & Bell, D. (2008). Pangolins in Peril: using local hunter's knowledge to conserve exclusive species in Vietnam. *Endangered Species Research* 6, 41-53.
- Novriyanti. (2011). *Kajian manajemen penangkaran, tingkat konsumsi, palatabilitas pakan, dan aktivitas harian trenggiling (Manis javanica Desmarest, 1822) di penangkaran UD. Multi Jaya Abadi Sumatera Utara*. (Skripsi). Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, Fakultas Kehutanan IPB, Bogor.
- Nowak, R. (1999). *Walker's mammals of the world* (6th ed.). Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Rodrigues, A. (2011). *Developing techniques to recover and analyze DNA from processed pangolin products for combating illegal wildlife trade*. Vancouver: Simon Fraser University.
- Rozas, J., Sanches-Delbarrio, J.C., Messegger, X., & Rozas, R. (2003). DNA SP, DNA polymorphism analysis by coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- Sambrock, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory Press.
- Simonsen, G.K., Churchill, G.A., & Aquadro, C.F. (1995). Properties of statistical test of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics* 141:413-429.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- TRAFFIC. (2008). *Indonesian police smash one of country's largest illegal wildlife smuggling operations*. TRAFFIC news, 5 August 2008. Diakses 24 November 2012 dari <http://www.traffic.org/home/2008/8/5/indonesian-police-smash-one-of-countrys-largest-illegal-wild.html>.
- Wibisono, B.K. (2009). *Bengkulu sasaran perburuan trenggiling dan kum-*

bang tanduk. Diakses 4 Juli 2013 dari <http://www.antaraneews.com/berita/1252963242/bengkulu-sasaran-perb>.

Zein, M.S.A. & Sulandari, S. (2008). Keragaman genetik ayam lombok berdasarkan sekuen *D-loop* DNA mitokondria. *JITV* 13(4), 308-314.

Zhang, Y.P. & Li-ming, S. (1991). *Genetic diversity in the Chinese pangolin (Manis pentadactyla): inferred from restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs*. Kunming: Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Institute of Zoology, Academia Sinica.