

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.

bb9ee0e512b9ea6f1133c37e02fb1d9ee28c6b7d4d54049861bf629a426314bc

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

**KERAGAMAN GENETIK DAN SITUS POLIMORFIK TRENGGILING
(*Manis javanica* Desmarest, 1822) DI PENANGKARAN (*Genetic Diversity and Situs
Polymorphic of Javan Pangolin in Captive Breeding*)***

Reny Sawitri dan/and Mariana Takandjandji

Pusat 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; renyawitri@gmail.com rambu_merry@yahoo.co.id

*Diterima : 13 Desember 2011; Disetujui : 17 Oktober 2013

ABSTRACT

Javan pangolin (Manis javanica Desmarest, 1822) is an endangered species due to poaching and illegal trading. It is protected by Indonesian law and listed in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). A private company in Medan, North Sumatra, has initiated a javan pangolin's captive breeding, who maintained the natural broodstocks and let them mated randomly. The study aimed to determine genetic variability and phylogenetic relationship of javan pangolin in the captive breeding to prevent inbreeding and further genetic loss. D-loop mitochondrial (mt) DNA was analysed through blood samples. DNA concentration of 11 individual javan pangolin ranged from 74.75-1013.25 ng/μl; D-loop mt-DNA has eight haplotypes. Genetic diversity of javan pangolin was very low (0.00337). Both Tajima test ($D = -0.75298$) and F_u & L_i tests (0.19158) showed that all individuals were inbreeding and came from close location, although the values were not significant ($P > 0.10$). In order to reduce inbreeding rate and to preserve the genetic variations, the phylogenetic tree would suggest mating selection within population as follows: SIB-05/SIB-10 (♂) can be mated with SIB-08/SIB-09 (♀), SIB-01/SIB-07/SIB-03/SIB-06 (♂) can be mated with SIB-04 (♀), while SIB-02 (♀) can be mated with SIB-11 (♂).

Keywords: Javan pangolin, mt-DNA, genetic diversity, phylogeny tree

ABSTRAK

Trenggiling (*Manis javanica* Desmarest, 1822) merupakan satwa yang terancam keberadaannya akibat perburuan liar dan perdagangan ilegal, sehingga termasuk satwa dilindungi dan terdaftar pada Appendix II CITES. Upaya penangkaran trenggiling telah dilakukan oleh penangkar satwa di Medan, Sumatera Utara, menggunakan indukan dari alam. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi tentang variabilitas genetik dan hubungan kekerabatan populasi trenggiling di penangkaran tersebut untuk mencegah perkawinan sedarah. Metode yang digunakan adalah analisis sekuen D loop mitokondria (mt) DNA melalui sampel darah. Konsentrasi DNA dari 11 individu trenggiling berkisar antara 74,75-1013,25 ng/μl, memiliki delapan macam haplotipe. Keragaman genetik ke-11 trenggiling sangat rendah (0,00337). Uji Tajima ($D = -0,75298$) dan uji F_u & L_i (0,19158) menunjukkan 11 individu dalam populasi tersebut telah terjadi *inbreeding* dan berasal dari lokasi yang berdekatan, tetapi kedua nilai tersebut tidak signifikan ($P > 0,10$). Berdasarkan pohon filogeni, perkawinan induk trenggiling dapat diatur sebagai berikut: SIB-05/SIB-10 (♂) dapat dikawinkan dengan SIB-08/SIB09 (♀), SIB 01/SIB-07/SIB-03/SIB-06 (♂) dapat dikawinkan dengan SIB-04 (♀), sedangkan SIB-02 (♀) dapat dikawinkan dengan SIB-11 (♂), sehingga laju *inbreeding* dapat ditekan dan keragaman genetiknya dapat dipertahankan.

Kata kunci: Trenggiling, mt DNA, keragaman genetik, pohon filogeni

I. PENDAHULUAN

Perdagangan trenggiling (*Manis javanica* Desmarest, 1822) di Indonesia naik secara drastis sejak tahun 2003, di mana volume ekspor dalam satu bulan mencapai 10-20 ton dengan omset ratusan

milyar rupiah (Dahnial, 2008; Sawitri *et al.*, 2012). Di Palembang, tahun 2008 ditemukan empat karung daging beku yang berisi 13,8 ton daging trenggiling. Dari temuan tersebut negara dirugikan sebesar 14,1 milyar rupiah, dan apabila sudah

menjadi daging siap saji di rumah makan China, maka nilai kerugiannya mencapai 36,4 miliar rupiah (Sihombing, 2008), sedangkan kerugian akibat perdagangan sisik trenggiling sebesar Rp 182.400.000,- (\$ 400 per kg). Kerugian negara dari perdagangan ilegal merupakan suatu rangkaian dari peran trenggiling dalam suatu ekosistem sebagai pemakan rayap dan semut serta dampaknya terhadap siklus hara (Hance, 2008).

Permintaan trenggiling, baik untuk konsumsi lokal maupun ekspor akan memicu meningkatnya perburuan dan perdagangan liar yang dilakukan oleh masyarakat sekitar hutan. Di sisi lain, menurunnya kualitas habitat turut memicu penurunan populasi di alam (Novriyanti, 2011; Wihardandi, 2013). Menurut Admin (2009), tingginya perburuan dan perdagangan trenggiling didorong oleh kepercayaan masyarakat tentang bagian-bagian tubuh berupa daging dan sisik yang dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Sejak tahun 2000 satwa ini dikategorikan sebagai *endangered species* oleh IUCN (Hance, 2008).

Pengembangan trenggiling secara *ex-situ* di penangkaran diperlukan untuk memenuhi kebutuhan pasar, sehingga pemanfaatan langsung dari alam dapat ditekan. Penangkaran yang dilakukan oleh lembaga konservasi bertujuan menghasilkan keturunan yang dapat diperdagangkan melalui sertifikasi yang menyatakan sebagai keturunan generasi kedua (F₂) (Direktorat Jenderal Perlindungan Hutan dan Konservasi Alam, 1999).

Upaya penangkaran trenggiling telah dilakukan oleh UD Multi Jaya Abadi di Sibolga, kemudian dilanjutkan di Binjai, Medan sejak 2007, di bawah naungan Balai Besar Konservasi Sumberdaya Alam (BBKSDA) Sumatera Utara (Novriyanti, 2011). Kegiatan penangkaran bertujuan untuk menghasilkan keturunan yang dapat diperdagangkan dan dilepasliarkan. Unit usaha penangkaran ini menggunakan induk hasil sitaan Balai Besar Konservasi Sumberdaya Alam Sumatera Uta-

ra, sehingga belum diketahui asal-usul dan keragaman genetiknya.

Informasi variabilitas genetik dan hubungan kekerabatan antar individu di penangkaran diperlukan untuk mencegah terjadinya perkawinan sedarah. Suatu kelompok dengan keragaman genetik yang rendah merupakan kelompok individu atau populasi yang saling bersaudara satu sama lain sehingga dalam jangka panjang, perkawinan yang terjadi di dalam kelompok tersebut merupakan perkawinan antar saudara atau *inbreeding* (Wilson, 1992). Populasi efektif yang sehat genetiknya adalah 50-500 individu; apabila di bawah 50 individu akan terjadi depresi *inbreeding* dalam perkembangan populasinya (Thohari, 1993).

Keragaman genetik suatu populasi dapat diungkapkan pada tingkat DNA yang memberikan informasi lebih pasti karena DNA merupakan materi genetik yang diwariskan ke generasi berikutnya (Evi *et al.*, 2013). Dengan mengetahui status genetik suatu kelompok akan dapat dirancang program konservasi untuk menghindari kepunahan suatu spesies, misalnya dengan memasukkan individu baru yang berasal dari alam, atau merancang model perkawinan dalam penangkaran untuk mengurangi risiko *inbreeding*. Menurut Damayanti (2010), *inbreeding* akan menyebabkan penurunan kualitas reproduksi dan produksi ataupun menyebabkan suatu individu menjadi sensitif terhadap patogen. Kondisi yang demikian telah terjadi pada banteng (*Bos javanicus* d'Alton) di Kebun Binatang Surabaya. Dilihat dari keragaman genetiknya, satwa ini memperlihatkan tanda-tanda terjadinya *inbreeding* dan mengalami penurunan kualitas reproduksi, di mana dari 11 individu hanya ada satu individu betina yang masih bereproduksi (Sawitri & Takandjandji, 2012).

Penelitian keragaman genetik trenggiling bertujuan untuk mendapatkan informasi tentang hubungan kekerabatan antar induk trenggiling di penangkaran melalui jarak genetik, pohon filogeni, dan situs

polimorfik. Hasil ini diharapkan dapat digunakan dalam menentukan skema perkawinan silang individu trenggiling yang terdapat di penangkaran.

II. BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Sampel darah trenggiling diambil dari tempat penangkaran trenggiling yang dikelola UD Multi Jaya Abadi, Sumatera Utara di Medan, pada bulan April 2010. Tempat penangkaran ini merupakan satu-satunya di Indonesia yang telah berhasil menangkarkan trenggiling sampai keturunan F_1 dan anaknya sudah dapat dikawinkan lagi (Cik *press com*, 2010). Analisis DNA mitokondria sampel darah trenggiling dilakukan di Laboratorium Genetika, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, di Cibinong, Bogor.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan adalah sampel darah dari 11 individu trenggiling, kapas, *box cooler*, es batu, alkohol 70% dan 100%. Alat yang digunakan adalah kamera, alat tulis, alat suntik 3 ml, tube 2 ml, dan botol sampel 2 ml. Karakteristik individu trenggiling yang digunakan dalam penelitian ini secara rinci disajikan pada Tabel 1.

C. Metode Penelitian

Materi genetik yang digunakan adalah sampel darah dari semua induk trenggiling di penangkaran sejumlah 11 ekor. Sampel darah diambil dari *vena jugularis* pada pangkal ekor menggunakan alat suntik 3 ml. Darah dikoleksi di dalam tabung Eppendorf 2 ml yang telah diisi alkohol 100% (*high grade/extra pure*). Volume darah yang dikoleksi kira-kira seperlima bagian dari volume alkohol yang digunakan untuk preservasi. Tahapan kerja analisis DNA (*deoxyribonucleic acid*) meliputi ekstraksi DNA, elektroforesis, dan visualisasi DNA total, pemeriksaan kuantitas dan kualitas DNA dengan menggunakan spektrofotometer (Beckman DU 650), analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elektroforesis dan visualisasi produk PCR, purifikasi produk PCR dan sekuensing.

1. Ekstraksi atau Isolasi DNA

Pada dasarnya ekstraksi atau isolasi DNA dilakukan melalui tiga tahapan, yaitu penghancuran sel, penghilangan protein dan RNA (*ribonucleic acid*), serta pemanenan DNA. Ekstraksi material DNA yang berasal dari jaringan rambut atau darah dilakukan menggunakan metode *phenol/chloroform* (Sambrook & Russell, 2001). Pelaksanaan ekstraksi DNA mengikuti standard protokol yang biasa digunakan untuk ekstraksi DNA, yakni

Tabel (Table) 1. Karakteristik individu trenggiling (*Individual characteristic of pangolin*)

Kode (Code)	Jenis kelamin (Sex)	Kelas umur (Age structure)	Asal trenggiling (Pangolin origin)	Keterangan (Remark)
SIB-01	Jantan	Remaja	Sibolga	F ₂
SIB-02	Betina	Dewasa	Sibolga	F ₁
SIB-03	Jantan	Remaja	Sibolga	F ₂
SIB-04	Betina	Dewasa	Sibolga	F ₁
SIB-05	Jantan	Dewasa	Sibolga	F ₁
SIB-06	Jantan	Dewasa	Sibolga	F ₁
SIB-07	Jantan	Dewasa	Sibolga	F ₁
SIB-08	Betina	Dewasa	Sibolga	F ₁
SIB-09	Betina	Anak	Sibolga	F ₂
SIB-10	Jantan	Remaja	Sibolga	F ₂
SIB-11	Jantan	Dewasa	Sibolga	F ₁

dengan cara sampel darah (250-500 µl) ditempatkan pada 1,5 ml tabung ependorf. Apabila sampel darah tersebut menggumpal (akibat disimpan dalam ethanol), maka sampel tersebut harus dihaluskan terlebih dahulu dengan mortar, kemudian uapkan atau hilangkan sisa-sisa ethanolnya. Larutan penyangga pelisis (*lysis buffer*) ditambahkan dengan volume yang sama dan dikocok secara manual sampai larut, sentrifugasi dengan kecepatan 6.500 rpm selama satu menit pada temperatur kamar, kemudian supernatan dibuang dan endapan erythrosit dan leukosit ditambahkan larutan penyangga pencuci (*rinse buffer*) dengan volume sama (200 µl), lalu goyang dengan tangan dan divortex sampai endapan larut. Larutan penyangga digesti (*digestion buffer*) ditambahkan sebanyak 500 µl, 15 µl proteinase K (10 mg/ml) dan 5 µl RNAase (10 mg/ml), kemudian digoyang dengan menggunakan tangan dan vortex.

Inkubasi dilakukan dengan menggunakan *shaking water bath* pada temperatur 55°C selama kurang lebih 16 jam (*overnight*), apabila sampel tercerna semua, sampel dari inkubator diambil dan ditambah fenol sebanyak 500 µl. Larutan divortex atau menggunakan *rotary mixer* selama 30 menit sampai larutan tercampur. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama dua menit, hingga di dalam tabung Eppendorf terlihat larutan terpisah menjadi dua. Larutan bagian atas/supernatan (warna seperti putih telur) diambil dan pindahkan ke tabung Eppendorf baru. Fenol-kloroform (1:1) ditambahkan dengan volume yang sama, vortex atau menggunakan *rotary mixer* perlahan-lahan selama 30 menit, kemudian sentrifugasi pada 13.000 rpm selama dua menit. Supernatan berwarna putih diambil dan pindahkan ke tabung Eppendorf baru, lalu ethanol 100% ditambahkan sebanyak dua kali volume sampel. Tabung digoyang dengan tangan selama 10 menit dan biasanya akan terbentuk material putih (jika kandungan DNA sedikit, material putih tersebut ti-

dak jelas). Tabung disimpan di dalam *freezer* selama lima menit, kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama dua menit, lalu ethanol dibuang dan diganti dengan 600 µl ethanol 70%, kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama dua menit. Ethanol 70% dibuang secara hati-hati agar pelet DNA tersebut tidak ikut terbang bersama ethanol dengan menggunakan pipetor dan material/pelet dikeringkan dengan bantuan aspirator. Tambahkan larutan penyangga TE sebanyak 100 µl, sentrifugasi sebentar dan inkubasi dalam *shaking water bath* pada temperatur 37°C selama 15 menit dan simpan sampel DNA pada temperatur 4°C dalam *freezer*.

2. Validasi Kuantitas dan Kualitas DNA

Secara kuantitatif, konsentrasi DNA ditentukan melalui spektrofotometri sinar ultra violet dengan menggunakan alat *spektrofotometer* (Beckman DU 650). DNA menyerap secara kuat sinar ultra violet pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang 260 nm, absorbansi dengan nilai satu setara dengan 50µg/ml DNA untai ganda (Zein & Prawiradilaga, 2013). Dengan demikian untuk mendapatkan konsentrasi DNA untai ganda dapat digunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Tingkat kemurnian DNA, yang berkorelasi dengan kualitas DNA, ditentukan dengan cara membagi nilai *optical density* (OD)₂₆₀ dengan OD₂₈₀. Apabila nilai ratio yang didapatkan berkisar antara 1,8-2,0 maka DNA dikatakan murni (kualitas DNA baik). Jika nilai rasio melebihi 2,0 maka larutan yang diuji masih mengandung kontaminan dari membran protein dan senyawa lainnya sehingga kadar DNA belum murni. Tetapi, apabila nilai rasio kurang dari 1,8 maka larutan yang diambil terlalu banyak sedangkan kadar

DNA terlalu sedikit (Sambrook & Russel, 2001). Penentuan kualitas DNA dilakukan melalui analisis PCR, DNA diamplifikasi dengan primer F 15740 dan R 16542 (*list base* Singapura) seperti pada Tabel 2.

3. Analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Analisis PCR merupakan teknik memperbanyak molekul DNA dengan ukuran tertentu secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu. Reaksi PCR dibuat dalam tabung Eppendorf 2 ml dan proses reaksinya dilakukan dengan alat thermocycler GeneAmp* PCR system 9700 (*Applied Biosystems*). Komponen yang terdapat dalam setiap tabung reaksi adalah: larutan penyangga *digesti* (*digestion buffer*) yakni BSA, MgCl₂, Taq DNA Polymerase (native, fermentes), dNTP mixture (*deoxynucleoside triphosphate*), primer (192 dan 195), enzim *Takara Ex Taq* DNA polymerase, sampel DNA, dan air ultra murni (*distilled water*). Semua komponen tersebut dicampur dalam total volume 50 µl.

Reaksi PCR untuk volume 50 µl adalah sebagai berikut:

1,25 µl forward primer 192 (10 pmol)
 1,25 µl reverse primer 195 (10 pmol)
 5 µl 10x PCR-buffer (manual)
 5 µl MgCl₂ (25 pmol)
 1 µl dNTP (10 pmol)
 0,3 µl Taq (5 U/ul)
 0,5 µl Bovine Serum Albumin (BSA) (25 pmol)
 2 µl DNA template
 33,7 µl H₂O

DNA produk analisis PCR selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1%. Alat PCR dihubungkan dengan *power supply* (*ladder* 100) pada tegangan 100 volt, dengan *constant current* 20 mA selama 30 menit. Setelah elektroforesis, visualisasi DNA menggunakan *ultra violet* (UV) *photo*. Pewarna DNA yang paling umum digunakan agar dapat terlihat ketika elektroforesis pada gel agarose adalah *ethidium bromide* (EtBr) yang dapat menyala di bawah sinar UV. *Ethidium*

bromide dengan konsentrasi 0.1µg/ml-0.5µl/mg ditambahkan langsung ke dalam gel agarose sebelum elektroforesis. *Ethidium bromide* akan menyisip di dalam sekuen DNA dan menghasilkan cahaya yang berfluoresen. Apabila terlihat adanya fragmen yang teramplifikasi maka fotograf dilaksanakan, dan dilanjutkan dengan sekuensing fragmen *D-loop* dari produk PCR. Amplifikasi fragmen *D-loop* mitokondria dilakukan dengan menggunakan derivat primer spesifik untuk trenggiling.

Amplifikasi mitokondria (mt DNA) trenggiling menggunakan sepasang PCR primer spesifik dengan kondisi PCR sebagai berikut:

<i>Pre denaturasi</i>	94° C selama 5 min	} 35 siklus
<i>Denaturasi</i>	94° C selama 55 detik	
<i>Annealing</i>	55° C selama 55 detik	
<i>Extension</i>	72° C selama 55 detik	
<i>Final extension</i>	72° C selama 10 min	

4. Analisis Data Molekuler

Sekuen segmen *D-loop* genom DNA mitokondria sepanjang 712 bp digunakan untuk analisis dalam penelitian ini. Sekuen trenggiling menggunakan sekuen referensi *Genbank Accesion Number* (Ref GU 206864.1) *Manis pentadactyla*. Data sekuen dianalisis menggunakan komputer *software* yaitu Chromas versi 2.0.1 untuk *viewing* dan *editing* hasil sekuen, BioEdit versi 7.0.1. untuk koreksi sekuen antara *forward* dan *reverse*, dan Clustal X 1.83 untuk *multiple alignment* sekuen. Untuk analisis filogenetik digunakan metode *neighbor-joining*, di mana kalkulasi matrik jarak genetik menggunakan model Kimura-2 parameter yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program MEGA (*molecular evolutionary genetics analysis*) *software* versi 4.0.2 (Kumar *et al.*, 2004). Estimasi variasi sekuen DNA di dalam populasi, keragaman *haplotype* (*haplotype diversity*), dan keragaman nukleotida (*nucleotide diversity*) menggunakan DNA *sequence polymorphisme* (DnaSP) versi 5.10.01.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi DNA dan Analisis PCR

Perhitungan spektrofotometer menunjukkan kuantitas DNA dengan konsentrasi yang bervariasi, antara 62,50-1013,25 ng/μl (Tabel 2). Konsentrasi DNA yang digunakan dalam ekstraksi dan analisis PCR sebanyak 60-120 ng/μl. Konsentrasi DNA (ng/μl) yang terlalu tinggi, di atas 100 ng/μl DNA per 40 μl sel, akan menghasilkan tingkat efisiensi transformasi yang rendah (Sambrook & Russel, 2001).

Tabel (Table) 2. Konsentrasi DNA sebelas individu trenggiling (*DNA concentration of eleven individual javan pangolin*)

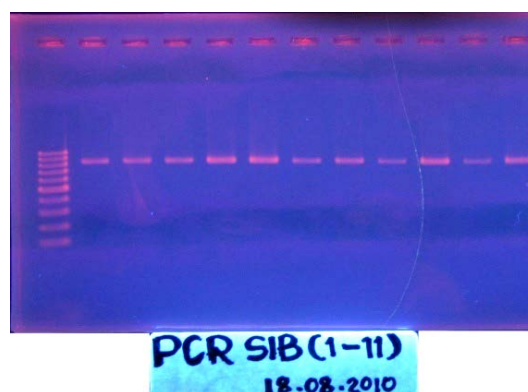
No	Nama sampel (Name of samples)	Konsentrasi (Concentration, ng/μl)
1	SIB-01	120
2	SIB-02	184
3	SIB-03	100
4	SIB-04	74,75
5	SIB-05	78,25
6	SIB-06	82,50
7	SIB-07	1013,25
8	SIB-08	333,50
9	SIB-09	390,50
10	SIB-10	62,50
11	SIB-11	66,00

Keterangan (Remark): SIB = Sibolga

Visualisasi produk PCR dapat dilihat pada foto elektroforesis (Gambar 1). Sebelas sampel darah berhasil diamplifikasi dengan sempurna sepanjang 712 pasang basa (*base pairs*).

Gel elektroforesis digunakan untuk mendeteksi perbedaan bentuk setiap protein darah didasarkan pada kecepatan geraknya (Nicholas, 1987 *dalam* Thohari, 1993). Molekul yang lebih besar akan bergerak lebih cepat dan lebih jauh dalam

satuan waktu yang sama. Banyaknya kelompok keragaman bentuk protein darah menunjukkan karakteristik protein tertentu dan setiap kelompok protein darah akan diwariskan dari generasi ke generasi berikutnya. Protein tersebut merupakan penampilan bentuk satu pita pada gel elektroforesis dengan nilai yang berbeda (Tabel 3, Gambar 1). Perbedaan nilai tersebut menunjukkan konsentrasi DNA dan urutan DNA D-loop mitokondria.



Gambar (Figure) 1. Visualisasi produk PCR dengan menggunakan *Agarose Gel Electrophoresis (AGE) 2%* (*Visualisation of PCR products using Agarose Gel Electrophoresis (AGE) 2%*)

B. Analisis Sekuen

Sebanyak 22 sekuen (11 sekuen *forward* dan 11 sekuen *reverse*) dihasilkan, dan hasil sekuen fragmen *D-loop* dari DNA mitokondria trenggiling (SIB-1 sampai SIB-11) mempunyai panjang 712 pasang basa (bp). Sebelas produk PCR yang disekuen semua menghasilkan *haplotype* sekuen yang sempurna dengan perbedaan sekuen *D-loop* dari DNA mitokondria (Tabel 4).

Tabel 4 menunjukkan bahwa dari 712 pasang basa yang diperoleh, urutan DNA *D-loop* mitokondria yang memiliki perbedaan kandungan asam amino terdapat

Tabel (Table) 3. Primer yang digunakan untuk analisis PCR dan sekuen (*Primer used for analysis PCR and sequence*)

Tipe primer (<i>Primer type</i>)	Nama primer (<i>Primer name</i>)	5' to 3' sekuen (<i>Sequence 5' to 3'</i>)
Primer PCR	F 15740	<i>Forward:</i> 5'-TGCGTATCACCTCCACTGAA-3'
	R 16542	<i>Reverse:</i> 5'-ATGTAGGGGGCAATTAGTTT-3'

Tabel (Table) 4. *Haplotype* sekuen urutan DNA *D-loop* dari DNA mitokondria, 11 ekor trenggiling (*Alignment of sequence haplotype D-loop mitochondrial DNA from 11 individual javan pangolin*)

No.	Kode sampel (Sample code)	Alignment sekuen urutan DNA <i>D-loop</i> pasang basa (Alignment sequence DNA <i>D-loop</i> base pairs)							
		26	49	263	337	387	524	527	557
1.	SIB-01	G	C	G	C	A	C	G	A
2.	SIB-02	G	C	G	C	A	C	G	G
3.	SIB-03	G	C	G	C	C	C	G	G
4.	SIB-04	G	A	T	C	A	C	G	G
5.	SIB-05	A	C	G	C	A	C	G	G
6.	SIB-06	G	C	G	C	C	C	G	G
7.	SIB-07	G	C	G	A	A	T	A	G
8.	SIB-08	G	C	G	A	A	T	A	G
9.	SIB-09	G	C	G	A	A	T	A	G
10.	SIB-10	A	C	G	C	A	C	G	G
11.	SIB-11	G	C	G	C	C	C	G	G

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SIB-01	0										
SIB-02	0.001										
SIB-03	0.003	0.001									
SIB-04	0.006	0.004	0.006								
SIB-05	0.003	0.001	0.003	0.006							
SIB-06	0.003	0.001	0.000	0.006	0.003						
SIB-07	0.000	0.001	0.003	0.006	0.003	0.003					
SIB-08	0.006	0.004	0.006	0.008	0.006	0.006	0.006				
SIB-09	0.006	0.004	0.006	0.008	0.006	0.006	0.006	0.000			
SIB-10	0.003	0.001	0.003	0.006	0.000	0.003	0.003	0.006	0.006		
SIB-11	0.006	0.004	0.003	0.008	0.006	0.003	0.006	0.008	0.008	0.006	

Gambar (Figure) 2. Jarak genetik antar individu dalam populasi di penangkaran trenggiling (*Genetic distance among 11 individuals Javan pangolin in a captive breeding population*)

pada nomor 26, 49, 263, 337, 387, 524, 527, dan 557, sedangkan pasang basa lainnya memiliki kandungan asam amino yang sama.

Haplotype sekuen urutan DNA *D-loop* dari DNA mitokondria merupakan struktur berbagai protein atau enzim yang dibedakan berdasarkan runutan asam amino sebagai runutan basa-basa dalam DNA. Perbedaan runutan basa-basa dalam DNA dianggap sebagai sifat biokimia yang membedakan jenis dan organisme yang diwariskan serta merupakan produk langsung dari gen yang relatif tidak terpengaruh oleh perubahan lingkungan (Thohari, 1993).

C. Jarak Genetik

Jarak genetik antar individu dari populasi trenggiling di dalam penangkaran

berkisar antara 0,001-0,008 (Gambar 2). Jarak genetik seperti ini tergolong sangat dekat bila dibandingkan dengan jarak genetik badak sumatera di Suaka Rhino Sumatera di Taman Nasional Way Kambas yang berkisar antara 0,016-0,147 dari empat individu (Handayani *et al.*, 2011). Trenggiling SIB-05 dan SIB-10 mempunyai jarak genetik 0,000, demikian juga dengan SIB-07 dan SIB-01, SIB-08 dan SIB-09 serta SIB-06 dan SIB-03, dapat dikatakan merupakan satu keturunan.

Jarak genetik yang berdekatan mengindikasikan keragaman genetik yang rendah. Keragaman genetik yang rendah akibat *inbreeding* akan menurunkan potensial evolusi populasi terhadap faktor stokastik seperti perubahan alam, meningkatnya pemenuhan alel letal, dan menurunkan tingkat *survival* (Frankham *et al.*, 2004 dalam Evi *et al.*, 2013). Di

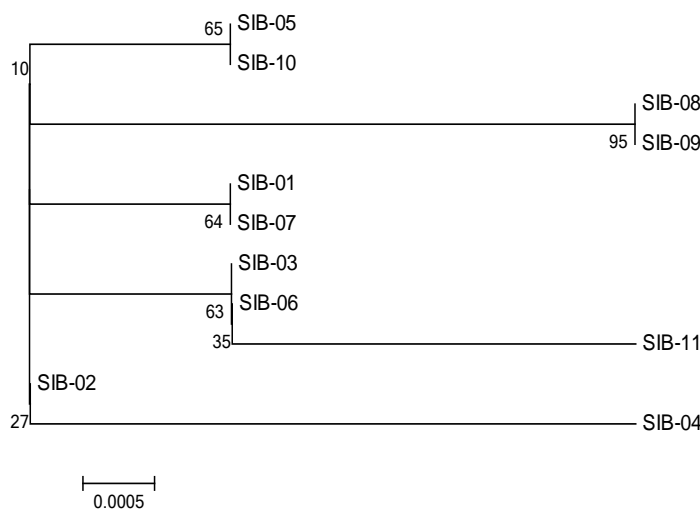
samping itu, *inbreeding* menyebabkan depresi kehidupan dan reproduksi (Wilson, 1992).

Konsep dasar depresi *inbreeding* menyatakan bahwa hanya bagian kecil saja gen letal dan sebagian besar termasuk *sublethal* atau *subvital*. Variasi komposisi genetik mempengaruhi perkembangan/produksi, menurunkan kekuatan, dan mengurangi kesuburan. Hal ini terjadi pada cheetah (*Acinonyx jubatus* Schreber, 1775) dan impala (*Antilope cervicapra* Linnaeus, 1758) yang dipelihara di kebun binatang, di mana keragaman genetik mempengaruhi organ dalam di hatinya (Moritz *et al.*, 1992).

Suatu jenis apabila menghadapi risiko kepunahan yang tinggi dari depresi genetik maka upaya mempertahankan dan meningkatkan keragaman genetik suatu populasi atau kelompok satwa merupakan salah satu cara pengelolaan populasi jenis yang terancam punah tersebut.

D. Pohon Filogeni

Pohon filogeni digunakan untuk menunjukkan hubungan kedekatan antar individu. Hasil rekonstruksi pohon filogeni trenggiling di penangkaran dengan metoda *neighbour-joining* menggunakan software MEGA Versi 4.0.2 disajikan pada Gambar 3.



Gambar (Figure) 3. Rekonstruksi pohon filogeni trenggiling (*Reconstruction of phylogeny tree of eleven javan pangolin*)

Rekontruksi pohon filogeni trenggiling di atas dapat dijadikan sebagai dasar pengelolaan perkawinan antar individu. Trenggiling SIB-05 memiliki kedekatan dengan SIB-10, terdapat dalam satu sub-cabang dengan nilai *bootstrap* 65%, sedangkan SIB-08 dan SIB-09 merupakan sub-cabang lainnya dengan nilai *bootstrap* 95%. Metode *bootstrap*, disebut juga nilai *bootstrap*, menjadi tolak ukur penentu terhadap tingkat kepercayaan pohon filogeni, sehingga semakin tinggi nilai *bootstrap* menyatakan pula semakin tinggi tingkat kepercayaan pohon hasil rekontruksi tersebut (Nei & Kumar, 2000).

E. Situs Polimorfik

Hasil *multiple alignment* 712 urutan basa *control region* hasil sekuen yang dilakukan secara sebagian (parsial) diketahui terdapat situs polimorfik terdiri dari dua varian *singleton variable sites* dan sembilan *parsimony informative sites*. Total jumlah mutasi 11 situs dan terdapat delapan *haplotype*. Diversitas *haplotype* populasi trenggiling adalah $0,890 \pm 0,036$ dan diversitas nukleotida (π/π_i) 0,00337. Hasil tersebut menunjukkan bahwa delapan *haplotype* dari 11 sampel yang dianalisis memiliki diversitas nukleotida yang rendah. Uji statistik menggunakan Fu dan

Li's *test* menghasilkan nilai 0,19158 dan tidak signifikan ($P > 0,10$). Hal yang sama terjadi pada uji Tajima di mana $D = -0,75298$ dan juga tidak signifikan ($P > 0,10$). Hasil uji Fu dan Li serta uji Tajima mengindikasikan adanya *inbreeding*, walaupun tidak signifikan dan berasal dari lokasi yang berdekatan.

Dapat disimpulkan bahwa populasi trenggiling di penangkaran UD Multi Jaya Abadi memiliki keragaman genetik yang rendah. Potensi *inbreeding* akan terus berlanjut apabila terjadi perkawinan secara acak di antara induk yang sudah sangat berdekatan jarak genetiknya, mengakibatkan terjadinya depresi *inbreeding* seperti individu yang homozygot, kerusakan mutasi dari *allel resesive*, efek *bottlenecks*, dan ketidakseimbangan aliran gen (Wright *et al.*, 2008). Kondisi ini akan berdampak negatif terhadap daya tahan tubuh, kesuburan reproduksi yang menurun terutama pada satwa jantan, terjadinya penurunan hormon jantan dan jumlah sperma, serta adanya perubahan bentuk sperma yang abnormal (Brown *et al.*, 2009). Oleh karena itu diperlukan pengaturan pasangan dari ke-11 induk trenggiling tersebut agar tidak terjadi perkawinan secara acak. Berdasarkan pohon filogeni, pasangan induk dapat diatur sebagai berikut: SIB-05/SIB-10 (♂) dapat dikawinkan dengan SIB-08/SIB09 (♀), SIB 01/SIB-07/SIB-03/SIB-06 (♂) dapat dikawinkan dengan SIB-04 (♀), sedangkan SIB-02 (♀) dapat dikawinkan dengan SIB-11 (♂). Alternatif terbaik untuk mengurangi potensi *inbreeding* di penangkaran UD Multi Jaya Abadi yaitu memasukkan induk baru dari populasi alam yang berbeda dengan populasi induk yang sebelumnya telah dikoleksi untuk meningkatkan keragaman genetik trenggiling yang ada.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Trenggiling di UD Multi Jaya Abadi sebanyak 11 individu yang dianalisis

kuantitas DNA-nya menghasilkan konsentrasi bervariasi antara 74,75-1013,25 ng/μl. *Haplotype* sekuen urutan DNA *D-loop* dari DNA mitokondria menghasilkan delapan *haplotype* sekuen yang menandakan delapan ragam genetik.

2. Jarak genetik antar individu trenggiling termasuk dekat, berkisar antara 0,001-0,008. Beberapa individu memiliki jarak genetik 0,000 seperti SIB-05 dan SIB-10, SIB-07 dan SIB-01, SIB-08 dan SIB -09, serta SIB-06 dan SIB-03, sehingga dapat dikatakan merupakan satu keturunan atau berasal dari lokasi yang berdekatan. Kondisi ini didukung oleh diversitas nukleotida yang juga menunjukkan keragaman genetik yang sangat rendah (0,00337).
3. Hasil uji Tajima ($D = -0,75298$) dan Fu & Li (0,19158) bernilai positif, sehingga dapat dikatakan bahwa populasi trenggiling tersebut menunjukkan *inbreeding*, tetapi tidak signifikan ($P > 0,10$).

B. Saran

1. Berdasarkan pohon filogeni, perkawinan individu trenggiling tersebut dapat dilakukan sebagai berikut: SIB-05/SIB-10 (♂) dapat dikawinkan dengan SIB-08/SIB09 (♀), SIB 01/SIB-07/SIB-03/SIB-06 (♂) dapat dikawinkan dengan SIB-04 (♀), sedangkan SIB-02 (♀) dapat dikawinkan dengan SIB-11 (♂).
2. Diperlukan indukan baru yang berasal dari alam dan lokasi berbeda untuk meningkatkan keragaman genetiknya.

DAFTAR PUSTAKA

- Admin. (2009). *Nasib trenggiling yang terus diburu manusia*. Diakses 1 Juli 2010 dari <http://www.vivaborneo.com/nasib-trenggiling-yang-terus-diburu-manusia.htm>.
- Brown, A.R., Hosken, D.J., Balloux, F., Bickley, L.K., LePage, G., Owen,

- S.F., ..., & Tyler, C.R. (2009). Genetic variation, inbreeding and chemical exposure-combined effects in wildlife and critical considerations for ecotoxicology. *Philosophical Transactions of the Royal Society. Biological Sciences* 364(1534), 3377-3390. Diakses 3 Oktober dari 2013 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.../V364\(1534\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.../V364(1534)).
- Dahnial, I. (2008). *Omzet trenggiling milyaran rupiah*. Diakses 20 Desember 2010 dari <http://iwandahnial.files.wordpress.com/2008/08/trenggiling>.
- Damayanti, S.C. (2010). *Peranan studi genetik dalam kegiatan konservasi*. Diakses 5 Pebruari 2010 dari www.docstoc.com/Peranan-Studi-Genetik-dalam-Kegiatan-Konservasi.
- Direktorat Jenderal Perlindungan Hutan dan Konservasi Alam. (1999). *Peraturan Pemerintah Nomor 8 Tahun 1999 tentang Pemanfaatan Jenis Tumbuhan dan Satwaliar*. Jakarta: Direktorat Jenderal Perlindungan Hutan dan Konservasi Alam.
- Evi, K.D., Soma, I G., & Wandia, I N. (2013). Diversitas genetik populasi monyet ekor panjang di Mekori menggunakan marka molekul mikrosatelit. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(1), 43-57.
- Hance, J. (2008). *Illegal wildlife trade devastating Asia's pangolins*. Diakses 25 Mei 2013 dari <http://www.mongobay.com>.
- Handayani, D.D., Solihin, & Alikodra, H.S. (2011). Analisis DNA mitokondria badak sumatera dalam konservasi genetik. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. Surakarta: Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Sebelas Maret. Diakses 25 Mei 2013 dari <http://jurnal.fkip.uns.ac.id/index.php/prosbio/article/.../641>.
- Kumar, S, Tamara, K., & Nei, M. (2004). Mega3: Integrated software for molecular evolutionar genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5(2), 150-163.
- Moritz, C., Dowling, T.E., & Brown, W.M. (1992). Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population Biology and systematics. *Animal Review of Ecology and Systematics* 18, 269-292.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford XIV, 333.
- Novriyanti. (2011). *Kajian manajemen penangkaran, tingkat konsumsi, palatabilitas pakan, dan aktivitas harian trenggiling (Manis javanica Desmarest, 1822) di penangkaran UD Muti Jaya Abadi Sumatera Utara*. (Skripsi). Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, Fakultas Kehutanan, IPB, Bogor.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. (3nd ed.). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawitri, R. & Takandjandji, M. (2012). *Inbreeding pada populasi banteng (Bos javanicus d'Alton, 1832) di Kebun Binatang Surabaya*. *Buletin Plasma Nutfah* 18(2), 84-94.
- Sawitri, R., Bismark, M., & Takandjandji, M. (2012). Perilaku trenggiling (*Manis javanica* Desmarest, 1822) di penangkaran Purwodadi, Deli Serdang, Sumatera Utara. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam* 9(3), 285-297.
- Sihombing, M. (2008). *RI rugi Rp. 36,4 miliar dari perdagangan trenggiling*. *Siaran Pers Nomor: S.435/PIK-1/2008*. Diakses 20 Desember 2010.
- Thohari, M. (1993). *Kajian genetika populasi gajah Sumatera (Elephas maximus sumatranus) dengan teknik elektroforesis sebagai dasar pengelolaan populasinya secara*

- lestari (Populasi Aceh)*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Wihardandi, A. (2013). *Enam ton trenggiling Indonesia berhasil disita di Vietnam*. Diakses 3 Oktober 2013 dari <http://www.mongobay.co.id/2013/08/15/enam-ton-trenggiling...>
- Wilson, E.O. (1992). *The diversity of life*. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press.
- Wright, L.I., Tragenza, T. & Hosken, D.J. (2008). Inbreeding, inbreeding depression and extinction. *Conservation Genetics* 9(4), 833-834. Diakses 3 Oktober 2013 dari <http://link.springer.com/article/10.1007/s10592-007-9405>.
- Zein, M.S.A. & Prawiradilaga, D.M. (2013). *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Jakarta: Kencana Prenadamedia Group.