

IDENTIFIKASI TRENGGILING (*Manis javanica*) MENGUNAKAN PENANDA *CYTOCHROME B* mtDNA

Wirdateti^{*)}, Gono Semiadi dan Yulianto

^{*)}Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Jl. Raya Jakarta- Bogor KM 46. Cibinong 16911
email : teti_mzb@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian genetik trenggiling *Manis javanica* dilakukan untuk mendapatkan gambaran profil dari lokasi asal satwa. Koleksi sampel dilakukan dari hasil sitaan yaitu Bandara Cengkareng-Tangerang, Medan dan Lampung, serta sampel hasil koleksi di alam yaitu dari daerah Balik Bukit, Tanggamus, Provinsi Lampung dan Sukabumi, Jawa Barat. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui profil genetik trenggiling dalam penentuan asal satwa dalam proses budidaya dan asal usul perdagangan ilegal. Penelitian menggunakan gen *Cytochrome b* (Cyt. B) mitokondria DNA (mtDNA). Hasil menunjukkan bahwa trenggiling hasil sitaan tersebar di dalam tiga *clade* dan dua kelompok berdasarkan perbedaan basa dari jajaran nukleotida sepanjang 420 nt. Variasi haplotipe tinggi yaitu terdiri dari 19 haplotipe (TR1-TR19) dari 19 individu. Pada *clade* pertama yaitu TR4,7,16,9,dan 19, substitusi tinggi pada basa adenin (A); *clade* kedua yaitu TR14,17,1,2,15,3,8, dan 13, substitusi tinggi pada basa guanin (G) dan *clade* ketiga yaitu TR5,6,10,11, dan 12,, substitusi tinggi pada basa cytosin (C). Dapat disimpulkan bahwa variasi haplotipe dari masing-masing populasi cukup tinggi tetapi jarak genetik antar individu rendah. Secara keseluruhan mutasi yang terjadi didominasi oleh transisi dari basa guanin ke adenin.

Kata kunci : trenggiling, *Manis javanica*, genetik, sitaan, perdagangan, DNA

PENDAHULUAN

Trenggiling Jawa (*Manis javanica*) ditemukan mulai di Asia Tenggara sampai Indo China, dimana di Indonesia tersebar di pulau Sumatra, Jawa, dan Kalimantan serta pulau-pulau sekitarnya (Corbert & Hill 1992). Populasi satwa ini mengalami penurunan cepat karena perburuan.

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) yang telah berumur ratusan tahun dan merupakan budaya bangsa. Saat ini dilaporkan bahwa di kawasan tersebut keberadaan jenis trenggiling setempat (*M. pentadactyla*) telah sangat rendah dan dikhawatirkan diambang kepunahan, sehingga pensuplai trenggiling banyak mencari ke negara Asia dan Asia Tenggara, seperti Indonesia, Malaysia hingga ke daerah India dan kemungkinan sampai ke Afrika. Ini dapat terjadi mengingat harga jual yang sangat tinggi dengan teknik penangkapan yang relatif mudah (Semiadi, 2008, data tidak dipublikasi; Wu *et al.* 2002). Sementara itu sisik dan daging trenggiling menunjukkan permintaan yang besar di Asia dan Afrika. Ancaman terbesar terhadap keberadaan trenggiling adalah perburuan liar (Newton *et al.*, 2008; Pantel & Chin, 2009; Duckworth *et al.*, 1999; Ellis, 2005). Hal ini menjadi 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 & Ng, 2008).

Selain itu, trenggiling di penangkaran sulit untuk berkembang biak, sehingga program penangkaran trenggiling untuk tujuan konservasi sulit berhasil (Chin *et al.*, 2006; Pantel & Chin, 2009). Penelitian tentang trenggiling sangat terbatas. Hingga saat ini, perhatian mengenai trenggiling masih sangat didominasi oleh permasalahan kekhawatiran karena tingkat perdagangan antar negara yang terjadi (Pantel & Chin 2009). Perlindungan hewan ini rentan oleh badan-badan penegak hukum satwa liar karena terhambat oleh kurangnya metode yang handal dan akurat dalam mengidentifikasi spesies trenggiling ataupun produk trenggiling. 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 & Wible 1999). Dengan demikian perlu dilakukan pengungkapan penciri dari sumber genetik trenggiling yang berguna dalam mengidentifikasi satwa tersebut di dalam perdagangan ilegal dan juga di dalam usaha konservasi dan restorasi trenggiling baik secara in-situ maupun ek-situ.

Untuk itu dilakukan penelitian menggunakan sekuen dari genome mtDNA gen *Cytochrome b* pada *Manis javanica*. Gen cytochrom b mtDNA banyak digunakan pada studi phylogenetik dan identifikasi species karena mengalami mutasi rendah dan konserve (Kuwayama dan Ozawa, 2000; Irwin *et al.*, 1991) dan juga digunakan dalam studi evolusi molekuler (Kocher *et al.*, 1989). Selain itu, mtDNA memiliki stabilitas tinggi dan mempunyai jumlah copy DNA yang lebih tinggi dari DNA inti (Parson *et al.*, 2000). Gen tersebut juga telah digunakan untuk analisis di dalam mengendalikan perdagangan internasional pada spesies terancam punah (Prusak *et al.*, 2005). Hsieh *et al.*, (2003). Menunjukkan bahwa fragmen dari gen *Cyt. b* cukup dapat membedakan spesies yang berhubungan

dekat. Dalam penelitian ini penggunaan *Cyt. b* bertujuan untuk mengungkapkan profile genetik trenggiling guna aplikasinya di dalam konservasi dan identifikasi asal usul perdagangan satwa.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel dan laboratorium

Penelitian menggunakan sampel berupa jaringan (daging) trenggiling yang dikoleksi dari hasil sitaan dan tangkapan di beberapa lokasi yaitu Tangerang, Medan, Sukabumi, dan Lampung. Sebanyak 19 individu terkumpul yaitu sembilan sampel dari sitaan di Tangerang; dua sampel dari BKSDA Tegal Alur; lima sampel dari Medan, dua sampel hasil sitaan tangkapan wilayah Lampung (Balik Bukit dan Tanggamus) dan satu sampel dari hasil tangkapan wilayah Sukabumi (Jawa Barat). Tiga sampel hasil tangkapan adalah mewakili dari populasi alam yang diketahui asal usulnya, sementara 16 sampel lainnya merupakan *unidentified* (tidak diketahui).

Total DNA diekstrak dari daging yang diawetkan pada ethanol 95%. Keseluruhan sampel trenggiling di amplifikasi dengan PCR menggunakan gen *Cyt b* mtDNA. Primer yang digunakan adalah universal (Kocher *et al.*, 1989) yaitu forward H 15149, 5'-GCCCCCAGAAATGATATTTGTCCTCA-3 dan reverse L 14724, 5'-CGAA GCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3. Volume PCR dalam 25 ul terdiri dari; 10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 1,5–3,0 mM MgCl₂; 10um dNTP; 2.5 pm primers (First Base), 5 U Taq Polymerase (Qiagen), DNA template konsentrasi 100–200 ng dan *Milliquote* (MQ) water. Kondisi PCR predenaturasi 5 menit pada 95oC; (denaturasi 95oC selama 30 detik, *annealing* 56oC selama 30 detik, *elongasi* 72oC selama 1 menit) sebanyak 40 siklus , dan final *elongasi* 10 menit pada 72oC.

Analisis Data

Semua sekuen yang dihasilkan dibandingkan dengan data base GenBank program BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) untuk mengetahui sekuen sesuai dengan spesies yang diteliti dan digunakan sebagai pembanding dalam analisis. Semua sekuen diedit dengan program Bioedit v 5.0.6 (Hall, 2001). dan di aligned (penjajaran) menggunakan Clustal X version 1.82 software (Thompson *et al.*, 1997). Analisis data dari haplotipe (hd), *Nucleotide diversity* (π) dengan metode Tajima (1989), distance (d), variability dan transisi/transversi diuji menggunakan MEGA Version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Sekuen dari *M. javanica* hasil penelitian dibandingkan dengan sekuen *M. pendactyla* yang tersedia di GenBank dengan accession no. AJ304500.1 dan JN411577.1, kemudian sekuen tersebut digunakan sebagai pembanding dalam analisis sehingga total sampel yang dianalisis sebanyak 20 sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekuen Cytochrome b Trenggiling

Amplikasi gen Cyt b dari 19 sampel menghasilkan panjang sekuen sekitar 420 bp dengan menggunakan primer universal H15149 dan L14724. Sekuensing dilakukan menggunakan kedua primer forward (H) dan reverse (L). Sekuen tersebut setelah disejajarkan menggunakan Clustal X. Terdapat beberapa insersi dan delesi basa atau gap (basa yang tidak berpasangan), sehingga panjang sekuen yang dapat dianalisis diluar gap tersebut sepanjang 373 nt. Sekuen nukleotida *M. javanica* dari sampel penelitian memberikan kesamaan yang tinggi dengan sekuen *M. pendactyla* yaitu sekitar 98% sampai 99% untuk panjang sekuen sekitar 420 nt atau sepertiga dari keseluruhan panjang sekuen *Cyt b* dengan variasi situs antara 4 sampai 8 nt. Akan tetapi hasil penelitian Hsieh *et al.*, (2011), analisis sekuen *D-loop M. pendactyla* memberikan kesamaan sekitar 71,7% sampai 82,7% dengan *M. tetradactyla* dan dibandingkan dengan *M. pendactyla* dari GenBank memiliki kesamaan sekitar 99,9%. Dengan demikian hasil penelitian ini menunjukkan secara genetik *M. javanica* lebih dekat dengan *M. pendactyla* yang tersebar di wilayah China atau Asia sementara *M. tetradactyla* tersebar di wilayah Afrika. Hal ini menunjukkan bahwa gen *Cyt b* merupakan daerah *conserve* (mutasi rendah), sehingga banyak digunakan sebagai marker guna identifikasi dalam ataupun antar spesies. *Cytochrome b* secara luas juga digunakan dalam studi sistematik guna memecahkan perbedaan pada tingkat taksonomi dan dianggap gen yang paling berguna dalam studi phylogenetik yang berkaitan dengan struktur dan fungsi protein (Esposti *et al.*, 1993).

Hasil analisis 20 sekuen sepanjang 373 nt *Cyt-b* mtDNA ditemukan 32 variasi situs dan memberikan 20 haplotipe yaitu 21 situs informatif dan 11 situs *singletone* (Tabel 1.) dengan nilai ratio transisi/transversi $R = 2,319$. Laju transisi basa purin adalah 8,107 dan laju tranversi basa pyrimidin adalah 3,780. Persentase perbedaan nukleotida pada sekuen *Cyt b* dari sampel trenggiling hasil tangkapan dan sitaan adalah berkisar dari 0,3% sampai dengan 4, 2% (rataan 2,25%). Sedangkan keragaman nukleotida (π) menunjukkan 0,025 atau 2,5% dan keragaman haplotipe (h) adalah sekitar 0,947 atau 94,7%. Keragaman genetik terlihat cukup tinggi tetapi dari rataannya jarak genetik (d_{ij} ; $0,026 \pm 0,006$) menunjukkan variasi rendah di dalam populasi. Populasi disini terutama adalah dari hasil sitaan, sehingga untuk identifikasi asal trenggiling hanya dapat mengacu kepada tiga sampel yang diperoleh dari alam yaitu Lampung dan Sukabumi.

Tabel 1. Variasi situs nukleotida dari 20 haplotipe gen Cytochrome b pada sampel trenggiling sitaan dan alam.

Haplotipeb	Nec	Nucleotide sita			
		1466789	1124446902	2223333333	
		1340807873	5711242519	6673677091	23
TR4LM	1	GTCAATGTAT	GCGAATGTAG	CGAATGAAGC	AA
TR7LT	1	.G.....
NC0160081	1A..GCT.	T.
TR9LJ	1	.AA.....	A....A..	.A.....	..
TR19Lb	1	.AA.....	AA....A..	.A.....	..
TR16Lg	1	.AA.....A..
TR1LM	1C...	..G..A..	..GG.A....	..
TR17LJ	1C...A..	..GG.....	..
TR14LJ	1C..G.A..	..GG.....	..
TR18LT	1GC..G.GCA..	..GG.....	..
TR8LS	1	CC.G.....	A....A..	.AGG.....	..
TR2LM	1	.AA..C...	..G..A..	..GG....A	..
TR15LM	1	.AA..C....	..G..A..	..GG.....	..
TR13LJ	1	.AA..CA.G.	A.....C	.AGG....A	..
TR3LM	1	.G...C...A..	..G.....A	..
TR5LJ	1C...C	.T...CCCG.C.....	.T
TR6LJ	1C...C	.T...CCCG.	T.G.C.....	..
TR10LJ	1	AAA..C.C.C	ATA..CCCG.C.....	..
TR11LJ	1	.AA..C.C.C	ATA..CCCGC	.A..C....A	..
TR12LJ	1	AAA..C...C	AT...CCCG.C....A	..

Keterangan :a.Posisisitusyangmengalamimutasipadajajaran sekuenCyt-b

b. Haplotipe yang ditemukan pada penelitian ini

c. Jumlah sampel TR19Lb, TR16Lg : Trenggiling asal Lampung;
TR8LS: Trenggiling asal Sukabumi TRLM, TRLJ, TRLT:
Trenggiling sitaan

Perbedaan Genetik Antara Populasi

Trenggiling tersebar hampir menyeluruh di Pulau Sumatra, Jawa, dan Kalimantan serta pulau-pulau sekitarnya. Hasil sitaan trenggiling merupakan tangkapan dari pesebaran yang tidak diketahui asal usulnya. Hasil analisis menunjukkan bahwa rata-rata jarak genetik (d) adalah $0,026 \pm 0,006$ pada sampel yang diperoleh dari hasil sitaan dan tangkapan dari alam (Tabel 2). Jarak genetik tersebut terlihat cenderung rendah di antara individu, yang menunjukkan struktur genetik diantara populasi trenggiling dari pesebaran berbeda tidak begitu bervariasi. Hal ini disebabkan sifat gen *Cyt b* yang *conserve* jarang mengalami mutasi basa, sehingga kecil terjadi perbedaan basa pada jajaran nukleotida. Dibandingkan dengan kelompok Cervidae (rusa), jarak genetik, keragaman nukleotida dan keragaman haplotipe pada trenggiling lebih baik atau lebih tinggi. Hasil penelitian pada jenis rusa yang juga merupakan hasil

tangkapan alam atau perburuan menunjukkan, bahwa pada rusa sambar (*Rusa unicolor*) jarak genetik (d) $0,013 \pm 0,002$, keragaman nukleotida (π) 0,025 (Wiradateti, 2011); pada sika deer (*Cervus nippon*) keragaman nukleotida (π) 0,0106 (Wu et al. 2004), Chinese water deer (*Hydropotes inermis inermis*) dengan keragaman haplotipe (h) $0,923 \pm 0,025$ dan keragaman nucleotida (π) $1,318 \pm 0,146\%$ (Hu et al., 2006); dan kijang hitam (*Muntiacus muncak*) dengan keragaman haplotipe (h) 0,862 dan keragaman nucleotide (π) 0,0056 (Wu dan Fang, 2005).

Tabel 2. Jarak genetik (d) trenggiling dari 20 sampel hasil sitaan dan tangkapan alam.

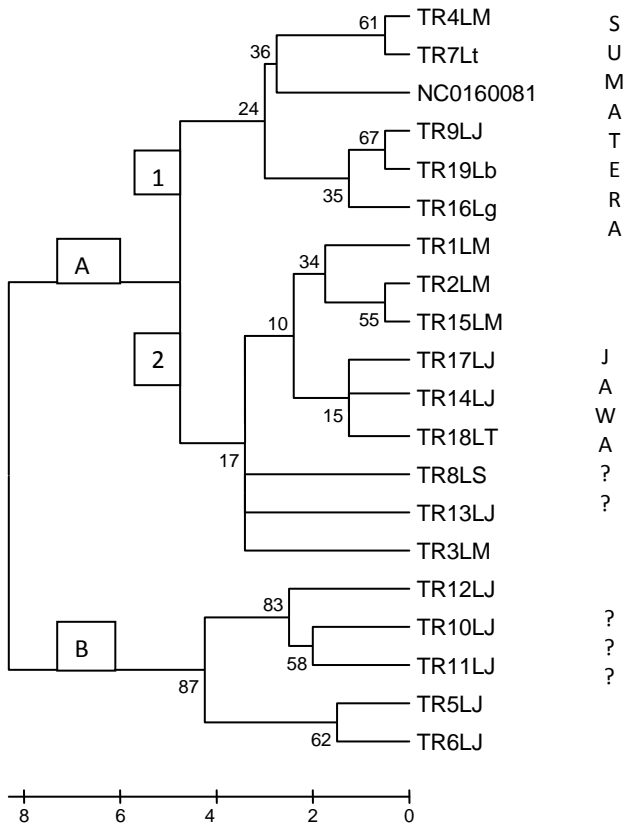
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

1	-																		
2	0.003																		
3	0.014	0.016																	
4	0.014	0.014	0.022																
5	0.016	0.016	0.025	0.003															
6	0.008	0.008	0.016	0.005	0.008														
7	0.016	0.019	0.025	0.025	0.027	0.019													
8	0.011	0.014	0.019	0.019	0.022	0.014	0.005												
9	0.014	0.016	0.022	0.022	0.025	0.016	0.008	0.002											
10	0.022	0.025	0.030	0.030	0.033	0.025	0.016	0.011	0.008										
11	0.022	0.022	0.030	0.016	0.019	0.022	0.022	0.016	0.019	0.027									
12	0.022	0.022	0.031	0.019	0.022	0.014	0.011	0.011	0.014	0.022	0.025								
13	0.019	0.019	0.028	0.016	0.019	0.011	0.008	0.008	0.011	0.019	0.022	0.003							
14	0.030	0.030	0.045	0.022	0.025	0.027	0.030	0.025	0.022	0.030	0.028	0.019	0.022						
15	0.014	0.011	0.022	0.019	0.022	0.014	0.014	0.008	0.011	0.019	0.022	0.011	0.014	0.025					
16	0.025	0.028	0.036	0.036	0.036	0.031	0.033	0.028	0.030	0.033	0.045	0.039	0.036	0.051	0.031				
17	0.028	0.030	0.039	0.039	0.039	0.033	0.030	0.025	0.028	0.030	0.042	0.036	0.033	0.048	0.028	0.008			
18	0.039	0.039	0.051	0.033	0.033	0.033	0.047	0.042	0.045	0.047	0.048	0.042	0.039	0.047	0.042	0.019	0.022		
19	0.045	0.045	0.057	0.033	0.033	0.039	0.053	0.048	0.051	0.053	0.051	0.042	0.045	0.036	0.042	0.025	0.028	0.011	
20	0.036	0.036	0.048	0.030	0.030	0.030	0.045	0.039	0.042	0.045	0.045	0.033	0.036	0.039	0.033	0.016	0.019	0.008	0.014

Keterangan: No. 1-20 mengikuti urutan haplotipe pada Tabel. 1

Pohon filogeni digambarkan dengan *Neighbor Joining* (NJ) dari 20 haplotipe trenggiling (Gambar 1). Analisis filogeni berdasarkan haplotipe, digunakan untuk menggambarkan kelompok trenggiling yang diperoleh dari hasil sitaan dan tangkapan alam. Hasil pohon filogeni menunjukkan dua kelompok dan satu kelompok terdiri dari dua sub kelompok. Individu pada kelompok kedua sebanyak lima haplotipe menunjukkan jarak genetik yang cukup tinggi dibandingkan dengan haplotipe lainnya. Jarak genetik kelima haplotipe tersebut dengan haplotipe lain berkisar 0,02–0,057 (rata-rata 0,041; Tabel 2.). Kelima haplotipe ini berasal dari lokasi sitaan yang sama yaitu daerah Jakarta, sehingga dimungkinkan kelima haplotipe berasal dari populasi atau lokasi yang sama. Tiga haplotipe lain hasil sitaan Jakarta tersebar di dua *clade*

yaitu dua haplotipe membentuk *clade* dengan sampel berasal dari Sukabumi, Jawa Barat (alam) dan satu haplotipe membentuk *clade* dengan sampel yang berasal dari Lampung (alam). Sementara haplotipe lain dari sampel sitaan Medan tersebar di dua *clade* pada kelompok yang sama yaitu pada *clade* haplotipe Sumatra (Lampung) dan *clade* Jawa Barat (Sukabumi). Di dalam penelitian ini berdasarkan pohon filogeni menggambarkan bahwa populasi trenggiling dari Sumatera memiliki kekerabatan yang lebih dekat dengan populasi Jawa.



Gambar 1. Pohon filogeni dari haplotipe trenggiling berdasarkan gen *Cyt b* mtDNA, menggunakan metode *neighbor joining* (Saitou & Nei,1987).

Komposisi variasi basa haplotipe pada kelompok atau *clade* yang terbentuk menunjukkan struktur berbeda yaitu pada *clade* 1 kelompok A mutasi yang terjadi tinggi pada substitusi basa adenin (A), *clade* 2 kelompok A substitusi tinggi pada basa guanin (G) dan pada haplotipe kelompok B, substitusi tinggi pada basa cytosin (C; Tabel 1). Dari hasil analisis ini dapat memberikan gambaran asal usul trenggiling hasil sitaan. Perhitungan persentase substitusi nukleotida menunjukkan transversi dari timin (T)-adenin (A) 3,83%, A-T 3,18%, C-A 3,83%, A-C 3,7%, C-T 3,18%, T-G 2,13%, dan C-G 2,13%. Substitusi transisi

dari G-A 31,03%, C-T 12,01%, T-C 13,99% dan A-G 17,29%. Artinya pada jajaran nukleotida gen *cyt b* trenggiling, mutasi atau pergantian basa tinggi terjadi pada basa purin dari guanin ke adenin dan rendah pada basa pyrimidin. Hasil ini menunjukkan bahwa komposisi mutasi di jajaran sekuen *Cyt b* mtDNA *M. javanica* tinggi pada basa purin. Mutasi yang terjadi secara transisi dari G-A adalah dominan ditemui pada *clade* 2 dan berdasarkan pengelompokan berada dalam satu *clade* dengan trenggiling berasal dari Sukabumi (Jawa Barat). Sementara persentase mutasi dari A-G tinggi pada populasi yang berada satu *clade* dengan sampel berasal dari Lampung. Dengan demikian pola mutasi tersebut dari profil genetik trenggiling dan gambaran pohon filogeni diharapkan dapat memberikan suatu informasi asal penangkapan dan populasi trenggiling di masing-masing wilayah persebaran sebagai acuan dalam manajemen konservasi trenggiling baik secara *in-situ* maupun *ex-situ*.

Berdasarkan hasil analisis gen *Cytochrome b* mtDNA, menunjukkan bahwa keragaman haplotipe trenggiling cukup tinggi, tetapi jarak genetik antar individu adalah rendah. Pola mutasi nukleotida pada *cyt b* trenggiling lebih didominasi oleh substitusi transisi yaitu pada basa purin (G-A) pada populasi Jawa dan A-G pada populasi Sumatra. Tetapi hasil ini belum dapat memberikan hasil yang signifikan karena asal sampel umumnya tidak diketahui dengan pasti.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih atas segala bantuan dan dukungan kami sampaikan kepada pengelola Program Kompetitif LIPI yang telah mendanai penelitian ini. Kepada staf BKSDA Lampung, Bapak Yuliansyah (Kapolsek Balik Bukit, Lampung) dan pihak-pihak yang telah membantu dalam perolehan sampel penelitian selama kegiatan lapang tidak lupa kami ucapkan terima kasih banyak..

DAFTAR PUSTAKA

- Chin SC, Liu CH, Guo JC, Chen, L.S.& Yeh SY. 2006. A 10-year review of autopsy of rescued Formosan pangolin (*Manis pentadactyla pentadactyla*) in Taipei zoo. *Proceedings of AZWM*, 43.
- Duckworth JW, Salter RE & Khounboline K. 1999. Wildlife in Laos PDR: status report. IUCN, Vientiane.
- Ellis, T. 2005. Tiger bone and rhino horn: the destruction of wildlife for traditional Chinese medicine. Island Press, London, U.K.
- Esposti DM, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T & Meyer A. 1993. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1143:243–271.

- Gaudin TJ & John R W. 1999. The Entotympanic of Pangolins and the Phylogeny of the Pholidota (Mammalia)
- Hall T. 2001. Bioedit version 5.0.6. Department of Microbiology, North Carolina State University. [http:// www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) *Journal of Mammalian Evolution*, Vol. 6.
- Hsieh HM, Huang LH, Tsai LC, Kuo YC, Meng HH, Linacre & Lee JCI, 2003. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b. *Forensic Science International* 136, 1-11
- 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 (2011) 303–307.
- Hu J, Fang SG & Wan QH. 2006. Genetic Diversity of Chinese Water Deer (*Hydropotes inermis inermis*): Implications for conservation. *Biochemical Genetics* 44(314): 161-172
- Irwin DM, Kocher TD & Wilson A.C.. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals, *J. Mol. Evol.* 32 (1991) 128–144.
- IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 February 2011 .
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer M, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX & Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6196-6200.
- Kuwayama P & Ozawa T. 2000. Phylogenetic relationships among European red deer, wapiti, and sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.* 15: 115–123.
- Lim NTL & Ng PKL. 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, Liumsiricharoen 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, Liumsiricharoen 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.
- Newton P, Thai NV, Robertson S & Bell D. 2008. Pangolins in peril: using local hunters’ knowledge to conserve elusive species in Vietnam. *Endangered Species Research*, 6: 41-53. .
- 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

- Nowak RM, Walker's. 1999. Mammals of the world, Vol 2, 6th ed., John Hopkins University Press, Baltimore, USA.
- Pantel S & Chin SY. 2009. Proceedings of the Workshop on Trade and Conservation of Pangolins Native to South and Southeast Asia, TRAFFIC Southeast Asia, Kuala Lumpur.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstatter H, Foger M & Steinlechner M. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114, 23-28.
- Prusak B, Grzybowski G & Zieba G. 2004 – Taxonomic position of Bison bison (Linnaeus, 1758) and Bison bonasus (Linnaeus, 1758) based on analysis of cytb gene. *Animal Science Papers and Reports* 22, (1), 27-35.
- Saitou N & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* 4;406-425
- Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595
- Tajima F & Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1:269-285.
- Tamura K, Nei M. & Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS* 101:11030-11035.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0
- Thomson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG. 1997. The clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleid Acids Res.* 24: 4876-4882
- Wirdateti. 2011. Keragaman Genetik Rusa sambar (*Rusa unicolor*), Pemanfaatan dan Implikasinya untuk Konservasi. *Jurnal Biologi Indonesia* Vol. 8(1): 131-140
- 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.).
- Wu HL & Fang SG. 2005. MtDNA genetic diversity of black muntjac (*Muntiacus crinifrons*): n endangered species endemic to China. *Biochem. Genet.* 43:407-416.
- Wu H, Wang, QH & Fang SG. 2004. Two genetically distinct units of the Chinese Sika deer (*Cervus nippon*): Analyses of mitochondrial DNA variation. *Biol. Conserv.* 119:183-190.