

**KAJIAN AWAL GENETIK TRENGGILING
(*MANIS JAVANICA* DESMAREST, 1922)
[Preliminary Studies of Genetic Pangolin
(*Manis Javanica* Desmarest, 1922)]**

M. Syamsul Arifin Zein^{*)} dan Sri Sulandari

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

ABSTRAK

Populasi Trenggiling (*Manis javanica* Desmarest, 1922) semakin menurun, hal ini disebabkan karena terjadi perdagangan ilegal yang terus meningkat. Oleh sebab itu perlu dilakukan kajian genetik untuk kehidupan liar ini. Hasil kajian DNA barcode dengan menggunakan Gen *cytochrome c oxidase* subunit I (COI) dan gen *Cytochrome b* dari DNA mitokondria menunjukkan hasil jarak genetik dalam dan antar populasi yang hampir sama, sedangkan hasil kajian keragaman genetik dengan menggunakan D-loop DNA mitokondria menunjukkan hasil keragaman genetik yang tinggi dengan (Hd) $0,9872 \pm 0,00003$ dan diversitas nukleotida (Pi) $0,01244$. $Fu's F_s$ statistik $-39,843$. Hasil analisis dari fragmen COI, *Cytochrome b*, dan D-loop DNA mitokondria akan digunakan untuk kajian biogeografi trenggiling dari berbagai tempat di Jawa, Kalimantan, dan Sumatera.

Kata kunci: trenggiling, DNA barcode, diversitas genetik

ABSTRACT

Population of pangolin (*Manis javanica* Desmarest, 1922) has declined, it is caused due to the growing illegal trade. Therefore genetic studies for the pangolin were conducted using three (3) markers of *cytochrome c oxidase* subunit I (COI), *cytochrome b* and D-loop of mitochondrial DNA genes. The analysis results from this preliminary study indicated that genetic distances within and between populations were almost the same. Further results based on mitochondrial DNA D-loop showed high genetic diversity (Hd) (0.9872 ± 0.00003), nucleotide diversity (Pi) (0.01244), and $Fu's F_s$ statistic (-39.843). If all analysis based on COI fragment, *Cytochrome b* and D-loop mitochondrial DNA are completed, the results will be used to study biogeography of pangolin from various places in Java, Borneo, and Sumatra.

Keywords: pangolin, DNA barcoding, genetic diversity

PENDAHULUAN

Trenggiling atau *pangolin* (*Manis javanica* Desmarest, 1922) adalah mamalia yang tidak bergigi, berkaki pendek, dan berekor panjang. Trenggiling aktif melakukan kegiatannya hanya di malam hari (*nocturnal*). Pada siang hari trenggiling tidur di dalam tanah. Sarang ini biasanya dibuat sendiri atau merupakan bekas sarang binatang lain yang tidak lagi ditinggali. Hewan ini unik karena sisiknya yang tersusun layaknya genting rumah. Untuk memangsa makanannya yang berupa semut dan serangga "*anteater*", trenggiling menggunakan lidah yang terjulur dan bersaput lender (Sari, 2007). Panjang juluran lidahnya dapat mencapai setengah panjang badan. Untuk menggantikan fungsi gigi, lalu ia akan memakan kerikil untuk melumatkan makanannya. Meski begitu lambungnya tidak rusak karena lambung trenggiling telah dilapisi oleh epitel pipih berlapis banyak dan mengalami keratinisasi cukup tebal. Epitel yang mengandung keratin ini akan melakukan adaptasi terhadap jenis makanan keras. Gesekan mekanik antara rangka semut atau rayap yang dimakan dapat diminimalisir dengan adanya keratin tersebut.

Guna melindungi diri dari serangan musuh seperti anjing dan harimau, trenggiling menyebarkan bau busuk. Ia memiliki zat yang dihasilkan kelenjar di dekat anus yang mampu mengeluarkan bau busuk, sehingga musuhnya lari. Binatang unik itu berkembang biak dengan melahirkan. Hanya ada satu anak yang dilahirkan oleh seekor trenggiling betina. Lama buntingnya hanya dua sampai tiga bulan saja. Jika diganggu, trenggiling akan menggulungkan badannya seperti bola. Ia dapat pulaengebatkan ekornya, sehingga sisiknya dapat melukai kulit pengganggunya.

Menurut Wilson, *et al.* (2005) bahwa trenggiling terdiri dari 4 spesies yang distribusinya di Afrika (*Manis tricuspis*, *M. gigantea*, *M. tetradactyla* dan *M. temminckii*) dan 4 spesies yang distribusinya di Asia (*M. pentadactyla*, *M. culionensis*, *M. crassicaudata* dan *M. javanica*). *Manis javanica* (*Malayan pangolin* atau *Sunda Pangolin*) adalah salah satu dari genus *Manis* yang hidup di Indonesia (Jawa, Sumatera, dan Kalimantan) dan beberapa negara lain di Asia Tenggara (Brunnei, Lao PDR, Malaysia, Myanmar, Thailand dan Vietnam). Di Indonesia, menurut penyebarannya satwa ini dibedakan menjadi tiga sub-species yaitu *Manis javanica sumatrana* (Sumatera), *Manis javanica javensis* (Jawa) dan *Manis javanica borneoensis* (Kalimantan) (Departemen Kehutanan, 1993), dan telah dinyatakan oleh pemerintah bahwa trenggiling (*Manis javanica*) adalah sebagai satwa yang dilindungi berdasarkan PP Nomor 7 tahun 1999, dan secara global dalam perdagangan satwa, trenggiling juga sudah dimasukkan ke dalam daftar lampiran (Appendix) II CITES (*Convention on International Trade on Endangered Species of Flora and Fauna*) yang berarti bahwa perdagangannya hanya dibenarkan berasal dari hasil penangkaran (budidaya). Oleh karena itu, trenggiling dilarang untuk diburu, dilukai, dipelihara, diperdagangkan, atau disimpan dalam kondisi hidup maupun bagian-bagiannya.

Perdagangan ilegal pada trenggiling yang terjadi terutama untuk memenuhi permintaan dari Cina (Michael *dkk.*, 1996), khususnya permintaan daging dan sisik yang digunakan sebagai bahan dalam pengobatan tradisional Cina (TCM/Traditional Chinese Medicine) (Wu *et al.*, 2002 and Wu *et al.*, 2007). Estimasi rata-rata antara 100.000 dan 135.000 trenggiling dibutuhkan untuk memenuhi permintaan di Cina (Wu *et al.*, 2007). Untuk memenuhi kebutuhan lokal di Cina maka sejak tahun 1990 an, trenggiling di import dari berbagai negara ASEAN (Li & Li, 1998, Wu *et al.*, 2007). Perdagangan trenggiling secara ilegal ini mengakibatkan terjadi penurunan drastis pada populasi trenggiling. Seperti yang diinformasikan oleh Adiseno (2008) bahwa populasi trenggiling di alam diperkirakan menurun drastis lebih dari 50% dalam waktu 15 tahun terakhir.

Kepunahan spesies trenggiling merupakan ancaman yang serius terhadap keanekaragaman hayati organisme hidup dan ini harus dihindari. Spesies terancam punah merupakan isu mendesak dan prioritas penting dalam penelitian yang harus segera dilakukan. Sampai saat ini di dunia termasuk Indonesia, artikel ilmiah/jurnal (nasional/internasional) tentang kajian genetik molekuler trenggiling masih kurang atau masih terbatas sekali. Jangan sampai spesies trenggiling di Indonesia punah tanpa adanya informasi genetik terutama mengenai keragaman genetik trenggiling. Hal ini juga untuk mencegah hilangnya gen penting yang mungkin memiliki nilai ekonomis sangat penting di masa depan.

Seperti diketahui bahwa untuk mendapatkan sampel trenggiling di alam adalah sulit karena populasinya semakin menurun, juga karena perilaku trenggiling seperti *secretive*, soliter dan bergerak pada malam hari sehingga agak sulit ditemui (Medwey, 1969). Tersedianya sampel/material DNA adalah penting harus didapat terlebih dahulu sebelum penelitian dimulai. Sampel material DNA trenggiling yang biasanya dalam bentuk tissue diperoleh dari hasil sitaan pemerintah oleh BKSDA atau TRAFFIC. Sampai saat ini telah terkumpul sampel sitaan dari berbagai lokasi untuk studi keragaman genetik trenggiling di Indonesia, yaitu Kalimantan Timur, Kalimantan Tengah, Sumatera Utara, Bengkulu, dan Jawa.

DNA barcoding merupakan teknik mengkarakterisasi dan mengidentifikasi spesies menggunakan sekuen DNA yang disebut *DNA barcode*. Gen cytochrome c oxidase subunit I (COI) adalah protein coding pada DNA mitokondria dan telah banyak digunakan sebagai alat identifikasi spesies hewan. Segmen dekat ujung 5' dari COI sepanjang sekitar 650 basa merupakan daerah yang banyak digunakan sebagai *DNA barcode* untuk fauna (Herbert *et al.* 2003). Efektifitas COI telah divalidasi untuk bermacam kelompok fauna dan sebagian besar jenis fauna yang diteliti bisa dibedakan menggunakan *DNA barcode*. Efektifitas ini disebabkan oleh variasi intraspesifik rendah, tetapi variasi interspesifiknya tinggi terutama pada taksa yang berdekatan (Ward *et al.* 2005;

Hajbabaie *et al.* 2006). Selain itu juga dilakukan kajian barcoding DNA dengan menggunakan gen Cytochrome b DNA mitokondria.

BAHAN DAN CARA KERJA

Material DNA

Penelitian ini menggunakan koleksi sel jaringan trenggiling berasal dari yaitu: Samarinda, Pangkalan Bun, Sumatera Utara, Bengkulu, Banten, Sukabumi, Kebun Binatang Ragunan, penyitaan di Jakarta, penyitaan di Serang/Banten, dan penyitaan di Surabaya.

Preparasi DNA, PCR, dan sekuen:

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti standar prosedur dari Sambrook *et al.* (1989), yaitu menggunakan teknik phenol chloroform. Purifikasi hasil ekstrak DNA digunakan alkohol 100 % dan 70%.

Amplifikasi fragmen gen COI:

Amplifikasi fragmen COI DNA mitokondria menggunakan teknik yang telah dikembangkan Ivanova *et al.* (2006), yaitu menggunakan empat pasang primer *forward* dan *reverse*. *Cocktail forward* primer masing-masing dibuat dengan konsentrasi 10 pmol/ μ l

Campuran primer forward terdiri dari:

1. LepF1-tl
(5"TGTA AACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG3");
2. VF1-tl
(5"TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG3")
;
3. VF1d-tl
(5"TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG3");
4. VFli-tl
(5"TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCAAGAATGG3")
(perbandingan 1:1:1:3)

Campuran primer reverse terdiri dari:

1. LepR1-tl
(CAGGAAACAGCTATGACTAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA3")
2. VR1-tl
(5"CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA3";
3. VR1d-
tl(5"CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3
");
4. Vrli-tl
(5"CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGCCAAAACA3").
(perbandingan 1:1:1:3)

Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan *Thermal Cycler Applied Biosystems Type 2700* dengan volume sebanyak 25 µl yang berisi 100 ng/ml DNA total, 2 µl 2,5 mM dNTP, 0,625 µl (10 p mol) *mix forward primer* dan 0,625 µl (10 p mol) *mix reverse primer*, 1 unit taq DNA polymerase (Fermentas, Native with BSA), 2,5 µl 10x bufer. Kondisi PCR meliputi predenaturasi 94°C selama 1 menit, dilanjutkan denaturasi 94°C selama 30 detik, 50°C selama 40 detik, 72°C selama 11 detik, 5 siklus, dilanjutkan kembali dengan 35 siklus denaturasi 94°C selama 30 detik, 55°C selama 40 detik, 72°C selama 1 menit, setelah itu dilakukan final elongasi 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi fragmen dari gen CO1 di elektroforesis dengan menggunakan 2% AGE (*Agarose Gel Electrophoresis*). Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan *ethidium bromide* dengan bantuan sinar ultra violet. Sekuen CO1 dilakukan dengan menggunakan *forward primer* M13F(-21) 5"TGTAACGACGGCCAGT3" dan *reverse primer* M13R (-27) 5"CAGGAAACAGCTATGAC3" (Messing, 1983).

Amplifikasi fragmen gen cytochrome b:

Amplifikasi fragmen gen Cytochrome b dilakukan dengan menggunakan sepasang primer universal L14724 () dan H15149 (). PCR dilakukan dengan volume sebanyak 30µl yang berisi 100 ng/ml DNA total, 0,6µl 10 mM dNTP, 1µl (10 p mol) masing-masing primer L14724 dan H15149. 1,25 unit taq DNA polymerase (Fermentas, Native with BSA), 3µl 10x bufer dan H₂O hingga volume 30 µl.

Kondisi PCR meliputi predenaturasi 94°C selama 1 menit, dilanjutkan denaturasi 94°C selama 30 detik, 50°C selama 40 detik, 72°C selama 11 detik, 5 siklus, dilanjutkan kembali dengan 35 siklus denaturasi 94°C selama 30 detik, 55°C selama 40 detik, 72°C selama 1 menit, setelah itu dilakukan final elongasi 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi fragmen dari gen CO1 di elektroforesis dengan menggunakan 2% AGE (*Agarose Gel Electrophoresis*). Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan *ethidium bromide* dengan bantuan sinar ultra violet.

Amplifikasi fragmen D-loop DNA mitokondria:

Amplifikasi fragmen D-loop DNA mitokondria dilakukan proses PCR menggunakan *Thermal Cycler 2720 AB-USA*. Proses amplifikasi dengan sepasang primer forward H-600(5'-CAT TTT CAG TGC TTT GCT TT-3') dan reverse L-15997(5'-AGC CCC CAA AGC TGA TAT TCT-3'). Reaksi PCR dengan volume 50µl terdiri dari: 1,25 µl *forward primer* (10 pmol), 1,25 µl *reverse primer* (10 pmol), 5 µl 10x bufer PCR, 5 µl MgCl₂ (25 pmol), 1 µl dNTP (10 pmol), 0,3 µl Taq (5 U/ µl), 0,5 µl BSA (25 pmol), DNA template dan 33,7 µl 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.

Analisa SekuenDNA

Sekuen gen CO1, Cytochrome b, D-loop DNA Mitokondria dilakukan dengan menggunakan jasa pelayanan sekuen DNA di 1stBASE Pte Ltd, Singapore dan Macrogen Co, Korea.

Analisis filogenetik

Analisis filogenetik menggunakan metoda neighbor-joining (NJ), dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura-2 parameter yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program Mega (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) software Versi 5 (Tamura *et al.* 2011). Kepercayaan statistik dari dua metoda dievaluasi menggunakan tes bootstrap dengan 1000 ulangan.

Analisis dilakukan pada masing-masing fragmen yaitu COI, Cytochrome b, dan D-loop DNA mitokondria. Selanjutnya pada final report akan dianalisis gabungan dari ketiga fragmen untuk menentukan biogeografi dari spesies trenggiling (*Manis javanica*) di Indonesia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fragmen COI

Data sementara dari sekuen DNA Cytochrome Oxydase Subunit I (COI) dari DNA mitokondria dianalisis sepanjang 602 bp dan tidak ditemukan adanya *insertion* dan *deletion* setelah diblast dengan data di GenBank. Hasil sekuen menunjukkan ada 47 situs variabel (7,8%), 37 situs informatif parsimoni (6,15%), dan kandungan GC adalah 46,4%, berarti kandungan GC<AT dan relatif seimbang. Umumnya kandungan GC pada vertebrata 40-45% (Sueoka, 1962).Setelah diselaraskan dengan full genome DNA mitokondria dari GenBank, maka situs polimorfik pada fragmen gen COI DNA mitokondria dari sampel trenggiling yang dikoleksi di Sumatera, Kalimantan, dan Jawa dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1. Situs polimorfik fragmen COI DNA Mitokondria trenggiling (*Manis javanica*)

```
555555555555555555555555555555555555555555555555555555555555555555556  
4444444445555555555555555555555555555555555555555555555555555555555555556  
23356677903567788901338924566778897791123455700  
15641328758320409516570715106284831480921928003
```

```
H_1 ATTGACGCGAGGATGGATGACGACAATACTTGAAAAGGTAGAGCAAT 1  
H_2 ATCAATGTGAAGGTGGATGGCGGCGATGTTTCGAGAAGGTAACGAT 5  
H_3 ATCAATGTGAAGGTGGATGGCGGCGATGTTTCGAGAAGGTAACAAT 4  
H_4 ATTAATGTGAAGGTGGATGGCGGCGATGTTTCGAGAAGGTAACAAT 1  
H_5 ATCAATGTGAAGGTGGATGGCGGCGATGTTTCGAGAAAATAACGAT 1
```

H_6 ATCAATGTGAAGGTGGATGGCGGCGATGTTCAAGAAGGTAAAACGAT 1
 H_7 ATCAATGTGAAGGTGGATGGTAGCGATGTCCGAGAAGGCCAAAACAAT 3
 H_8 ATTGGCGCGAGGATGGATGACGGAAATACTTGGGAAGGTGAAGCAAT 1
 H_9 ATTGACGCGAGGATGGATGACGGCAATACTTGGGAAGGTAAAGCAAT 7
 H_10 ATTGACGCGAGGATGGATGACGGCAGTACTTGGGAAGGTAAAGCAAT 2
 H_11 ATTGACGCAAGGATGGATGACGGCAATACTTGGGAAGGTAAAGCAAT 1
 H_12 CTTGACGCGAGGATGGATGACAGCAATACTTGGGAAGGTAAAGCAAT 2
 H_13 ATTGACGCGAGGATGGATGACAGCAATACTTGGGAAGGTAAAGCAAT 1
 H_14 ATTGACACGAGGATGGATGACGGCAATACTTAAAAAGGTAAAGCAGT 1
 H_15 ATTGACGCGAGGATGGACGACGGCAATACTTAAAAAGGTAAAGCAAT 3
 H_16 ATTGACGCGAGGATGGATGACGGCAATACTTGGAAAGGTAAAGCAAT 4
 H_17 ATTGACGCGAGGATGGATGACGGCAACTTGGAAAGGTAAAGCAAT 2
 H_18 ATCAGTGTGAAAGTGGATGGTAGCAATGTCCGAGAAGGTAAAACAAT 5
 H_19 ATCAGTGTGAAAGTGGATGGTAGCGATGTCCGAGAAGGTAAAACAAT 2
 H_20 ATCAGTGTAGAAGTGGATGGTAGCGATGTCCGAGAAGGTAAAACAAT 1
 H_21 AACAGTGTAGAAGAGGATGGTAGCAATGTCCGAGAAGGTAAAACAAT 1
 H_22 ATCAGTGTGAAAGTGAATGGTAGCGATGTCCGAGAAGGTAAAACAAT 1
 H_23 ATTGACGCGAGGATAGATGACGGCAATACTTGGAAAGGTAAAGCAAT 2
 H_24 ATTGACGCGAGGATGGATGACGGCAATACTTGGGAAGGTGAAGCAAT 4
 H_25 ATTGACGCGAGGATAGGTGACGGCAATACTTGGAAAGGTAAAGCAAT 2
 H_26 ATTGACGCGAGGATGGATGACGGCAATACTTGGGCGGGTAAGGCAAT 3
 H_27 ATCAATGTGAAGGTGGATAGTGGCGATGTTCGAAAAGGTAAAATAAC 2
 H_28 ATTGACGCGAGGATGAATGACGGCAATACTTGGGCGGGTAAGGCAAT 1

Rata-rata jarak genetik antar individu pada semua populasi adalah 0,018, sedangkan jarak genetik dalam populasi dari Pangkalan Bun (0,016), Samarinda (0,002), Sumatera Utara (0,002), Bengkulu (0,003), Banten (n/c), Ragunan (0,002), Sukabumi (0,003), sitaan di Jakarta (0,003), sitaan di Serang Banten (0,018), dan sitaan di Surabaya (0,024). Jarak genetik antar populasi berkisar antara 0,001 hingga 0,031. Selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jarak genetik antar populasi trenggiling (*Manis javanica*) berdasarkan sekuen fragmen gen COI DNA mitokondria

Samarinda	
Pangkalan_Bun	0,023
Sitaan_di_Serang	0,020 0,016
Sumatera_Utara	0,025 0,010 0,013
Bengkulu	0,026 0,011 0,013 0,005
Banten	0,023 0,009 0,012 0,001 0,004
Sukabumi	0,024 0,010 0,012 0,002 0,004 0,001
Kebun_Binatang_Ragunan	0,026 0,012 0,013 0,003 0,006 0,002 0,002
Sitaan_di_Surabaya	0,013 0,021 0,020 0,020 0,022 0,019 0,019 0,021
Sitaan_di_Jakarta	0,012 0,030 0,026 0,032 0,033 0,031 0,030 0,031 0,017

Fragmen Cytochrome b

Data sementara dari sekuen DNA Cytochrome b dari DNA mitokondria dianalisis sepanjang 347 bp dan tidak ditemukan adanya *insertion* dan *diletion* setelah diblast dengan data di GenBank. Hasil sekuen menunjukkan ada 28 situs variabel (8,07%), 28 situs informatif parsimoni (8,07%), dan kandungan GC adalah 44,6%, berarti kandungan GC<AT dan relatif seimbang. Umumnya kandungan GC pada vertebrata 40-45% (Sueoka, 1962). Setelah diselaraskan dengan full genome DNA mitokondria dari GenBank, maka situs polimorfik pada fragmen gen COI DNA mitokondria dari sampel trenggiling yang dikoleksi di Sumatera, Kalimantan, dan Jawa dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 1. Situs polimorfik fragmen Cytochrome b DNA Mitokondria trenggiling (*Manis javanica*)

```

11111111111111111111111111111111
4444444444444444444444444444446
11122222223333333333334444445
6773566789113344688990269997
4127826651590628067398313587
    
```

```

H_1 AACCTTTTATCGCATCATATAGATCACA 1
H_2 AACCCCTTCGCTACACCCTACGGATCACT 1
H_3 AACCCCTTCACTACACCCTACGGATCACT 4
H_4 AACCCCTTTACTGCACCCTACGGATCACT 4
H_5 AACTCTTTACTACACCCTACGGATCACT 1
H_6 AACCCCTTTACTGCACCCTACGGATCGCT 1
H_7 AACCCCTTTACTGCACCCTATGGGACACT 2
H_8 AACCCCTTTATCGCATCATATAGATCGCT 8
H_9 AACCCCTCTATCACATCATATAGATCGCT 3
H_10 AACCCCTTTGTCGCATCATATAGATCGCT 5
H_11 AACCCCTCTATCGCATCATATAGATCGCT 1
H_12 AACCCCTTTACTGCACCCTATAGATCACT 7
H_13 AACCTTTCACTATACTCTATAGATCACT 1
H_14 AACCCCTTTGTCGCATCGTATAGATCGCT 1
H_15 AACCCCTCTATAACATCATATAGATCGCT 1
H_16 AACCCCTTTATCGCATCACATAGATCGCT 1
H_17 AACCCCTTATCGCGTCATATAGATTGCT 1
H_18 AACCTTTTATCGCATCGTATAGATCACT 4
H_19 AACCTTTTATCGCATCATATAGATCACT 4
H_20 AACCTTTTATCGTATCATATAGATCACT 1
H_21 AACCCCTTTGTCGCATCATGTAGATCGCT 1
H_22 ATCCCTTCATCGTACCATATAGCTCGCT 1
H_23 AACCCCTTATCGTATCATATAGATCGAT 1
    
```


H_24 AACCTTCATCGCATCATATAGATCGCT 1
 H_25 AACCTTTATCGCATCATATAGATCGAT 1
 H_26 AACCTTTACTGCACCCTATAAATCACT 4
 H_27 CACCCTTTACTGCACCCTATAGATCACT 1
 H_28 AAACCTTTACTGCACCCTATAGATCACT 1

Rata-rata jarak genetik antar individu pada semua populasi berdasarkan sekuen fragmen gen cytochrome b adalah 0,015 adalah, sedangkan jarak genetik dalam populasi dari Pangkalan Bun (0.012), Samarinda (0.005), Sumatera Utara (0.006), Bengkulu (0.002), Banten (n/c), Ragunan (0.006), Sukabumi (0.01), sitaan di Jakarta (0.003), sitaan di Serang Banten (0.015), dan sitaan di Surabaya (0.022). Jarak genetik antar populasi berkisar antara 0,003 hingga 0,027. Selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jarak genetik antar populasi trenggiling (*Manis javanica*) berdasarkan sekuen cytochrome b DNA mitokondria.

Samarinda	
Pangkalan Bun	0,023
Sitaan di Serang	0,021 0,013
Sumatera Utara	0,027 0,010 0,013
Bengkulu	0,025 0,013.0,014 0,010
Sitaan di Surabaya	0,014 0,017 0,017 0,019 0,018
Sukabumi	0,026 0,011 0,014 0,008 0,012 0,019
Kebun Binatang Ragunan	0,027 0,011.0,013 0,007 0,011 0,019 0,007
Banten	0,024 0,007 0,010 0,003 0,007 0,016 0,005 0,004
Sitaan di Jakarta	0,011 0,017 0,016 0,019 0,017 0,013 0,019 0,020 0,016

Fragmen D-loop DNA mitokondria

Sekuen D-loop yang teramplifikasi sepanjang 1133 pasang basa dengan situs monomorfik sebanyak 916 situs, terdapat 65 haplotipe dengan diversitas haplotipe (Hd) 0,9872±0,00003 dan diversitas nukleotida (Pi) 0,01244. Fu’s Fs statistik -39,843 menunjukkan keragaman dan ekspansi genetik yang tinggi.

Jarak genetik dalam populasi menunjukkan di Sumatera Utara (0,008), Sukabumi (0.001), Ragunan (0.003), sitaan di Jakarta (0.002), sitaan di Surabaya (0.006), sitaan di Serang Banten (0.009), dan Pangkalan Bun (0.011). Sedangkan antara populasi berkisar antara 0,001-0.019, selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Jarak genetik antar populasi trenggiling (*Manis javanica*) berdasarkan sekuen D-loop DNA mitokondria.

Ref	
Sumatera Utara	0,005
Sukabumi	0,001 0,006
Ragunan	0,003 0,008 0,002
Sitaan Jakarta	0,017 0,019 0,017 0,02
Sitaan Surabaya	0,016 0,018 0,016 0,018 0,004
Sitaan Serang Banten	0,008 0,010 0,008 0,010 0,014 0,014
Pangkalan Bun	0,008 0,011 0,009 0,010 0,016 0,015 0,010

Hasil analisis dari framen COI, Cytochrome b, dan D-loop DNA mitokondria akan dianalisis untuk mengetahui biogeografi dari populasi Trenggiling di Indonesia. Oleh sebab itu perlu dilakukan penambahan spesimen dan analisis ulang dari beberapa sampel yang belum berhasil di sekuen.

KESIMPULAN

Barcode DNA trenggiling (*Manis javanica*) menggunakan gen Cytochrome c Oxidase subunit I sepanjang 602 pasang basa dan gen Cytochrome b sepanjang 347 pasang basa menunjukkan jarak genetik antar individu, dalam populasi, dan antar populasi berada pada kisaran yang relatif sama. Analisis D-loop DNA mitokondria menunjukkan diversitas genetik yang tinggi dengan (Hd) $0,9872 \pm 0,00003$ dan diversitas nukleotida (Pi) 0,01244. Fu's Fs statistik -39,843

DAFTAR PUSTAKA

- Adiseno. 2008. Belasan trenggiling dari Mentawai disita. Harian Surat Kabar "Sinar Harapan", 20 Oktober 2008.
- Hajbabaie, M., J.R. deWaard, & N.V. Ivanova. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*. 103:968-971.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL & De Waard, JR. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Philos Trans Ser B*: 270: 313-321
- Ivanova N.V., J.R. Dewaard and P D. N. Hebert. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*. Journal compilation. Blackwell Publishing Ltd.
- Li, Y. M. & D. M. Li (1998). The dynamics of trade in live wildlife across the Guangxi border between China and Vietnam during 1993-1996 and its control strategies. *Biodiversity Conservation* 7: 859-914.

- Medway, L., 1969. *The Wild Mammals of Malaya*. London: Oxford University Press.
- Messing J. 1983. New M13 vector for cloning. *Methods in Enzymology*, 101:20-79.
- Michael Wai-Neng Lau, G. Ades, N. Goodyer & F. S. Zou. (1996). Wildlife Trade in Southern Hong Kong and Macao China including. In: MacKinnon, J. & S. Wang (Eds.) *Conserving China's Biodiversity*. China Environmental Science Press, Beijing. Pp.141-159.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sari, M.R. 2007. Kajian morfologi lidah trenggiling (*Manis javanica*). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, IPB. Bogor
- Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last, & P.D.N. Herbert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Sciences*. 360:1847-1857.
- Wilson, D.E., Reeder D.M. 2005. *Mammal species of the world: a taxonomic and Geographical reference*, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Wu, S. B., G. Z. Ma, M. Than, H. Chen, D. F. Liu (2002). The status and conservation strategy of pangolin resource in China. *Journal of Natural Resources* 17(2):174-180. (In Chinese)
- Wu, S. B. & G. Z. Ma (2007). The status and conservation of pangolins in China. *TRAFFIC East Asia Newsletter* (4):1-5.
- Wu, S., G. Ma, H. Chen, Z. Xu, Y. Li, N. Liu. 2004. A preliminary Study on burrow ecology of *Manis pentadactyla*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 15: 401-407.