

Barcoding DNA pada Komunitas Kelelawar Pemakan Buah di Indonesia (DNA Barcoding of Fruit Bats Communities in Indonesia)

Moch Syamsul Arifin Zein & Yuli Sulistya Fitriana
Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong
E-mail: zein_genetic@yahoo.com

Memasukkan: Agustus 2014, Diterima: November 2014

ABSTRACT

Family Pteropodidae known as fruit bats which has ecological services as seed dispersers, pollinator, and plays important role in the forest regeneration. Identification of bat species frequently encountered problems, i.e., cryptic morphology and behaviour. Therefore it is necessary to confirm its identity using DNA barcodes. Cytochrome c oxidase subunit I (COI) mitochondrial DNA is representative of the protein coding mitochondrial DNA and has been used extensively as a means of animal species identification. This study evaluated 141 specimens consist of 42 species and 17 genera which were collected from Java, Nusa Tenggara, Sumatra, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, and Papua. Phylogenetic analysis using the neighbor-joining method, in which the genetic distance matrix calculation by Kimura-2 parameter models are implemented on the pairwise distance calculation in the program MEGA version 6:05. The results of the analysis showed variation intraspecific ranging from 0 to 7.9% ($0.9 \pm 0.014\%$) and there were 4 species with very high intraspecific average sequence divergence, i.e., *Penthetor lucasi* (3.2%), *Thoopterus nigrescens* (3.7%), and *Chironax melanocephalus* (8.7 %). Average interspecific of genetic distance of fruit bats in Indonesia was 20% (1.3-26.1%). These results produce a phylogeny tree construction to form a clearly different cohesive cluster, except in the genus *Dobsonia* (*D. moluccensis*, *D. viridis*, and *D. crenulata*), *Cynopterus* (*C. brachyotis*, *C. minutus*, and *C. luzoniensis*), and *Macroglossus* (*M. minimus* and *M. sobrinus*), because this did not correspond with currently recognized species boundaries based on morphology.

Keywords: DNA barcoding, COI, Pteropodidae

ABSTRAK

Famili Pteropodidae dikenal sebagai kelelawar pemakan buah yang berperan sebagai penyebar biji, membantu proses penyerbukan bunga, dan mempunyai arti penting dalam proses regenerasi hutan. Di dalam proses identifikasi spesies kelelawar sering ditemui masalah, antara lain *cryptic morphology* dan *behaviour*. Oleh sebab itu perlu dilakukan konfirmasi dengan menggunakan barkode DNA. Cytochrome c oxidase subunit I (COI) DNA mitokondria merupakan representasi dari *protein coding* pada DNA mitokondria dan telah digunakan secara luas sebagai alat identifikasi spesies hewan. Penelitian ini mengevaluasi sebanyak 141 spesimen yang terdiri dari 42 spesies dan 17 genus yang dikoleksi dari Jawa, Nusa Tenggara, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, dan Papua. Analisis filogenetik menggunakan metoda *neighbor-joining*, dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura-2 parameter yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program MEGA versi 6.05. Hasil analisa menunjukkan variasi intraspesifik berkisar antara 0-7,9% ($0,9 \pm 0,014\%$) dan terdapat 4 spesies dengan rata-rata divergensi sekuen intraspesifik sangat tinggi yaitu *Penthetor lucasi* (3,2%), *Thoopterus nigrescens* (3,7%), dan *Chironax melanocephalus* (8,7%). Rata-rata jarak genetik interspesifik dari kelelawar pemakan buah di Indonesia adalah 20% (1.3-26.1%). Hasil ini membuahkan sebuah konstruksi pohon filogeni dengan klaster kohesif yang jelas berbeda, kecuali pada genus *Dobsonia* (*D. moluccensis*, *D. viridis*, dan *D. crenulata*), *Cynopterus* (*C. brachyotis*, *C. minutus*, dan *C. luzoniensis*), dan *Macroglossus* (*M. minimus* dan *M. sobrinus*) karena tidak sesuai dengan batas-batas yang diakui sebagai spesies yang berbeda berdasarkan morfologi.

Kata Kunci: barcoding DNA, COI, Pteropodidae

PENDAHULUAN

Ordo Chiroptera mempunyai jumlah spesies paling banyak kedua di dalam kelas mamalia, yang terdiri dari sekitar 1116 spesies atau kurang lebih 20% dari total mamalia (5416 spesies) di dunia. Pteropodidae merupakan salah satu familia dari Ordo Chiroptera, dikenal sebagai kelelawar pemakan buah dan memiliki peran sebagai penyebar biji, serta ikut membantu dalam proses penyerbukan bunga. Oleh sebab itu kelelawar ini berperan menjaga keseimbangan ekologi dalam ekosistem dan mempunyai arti penting dalam proses regenerasi hutan (Kitchener *et al.* 1990; Alikodra 1990; Fujita dan Tuttle, 1991). Dalam proses identifikasi kelelawar sering ditemui masalah, yaitu *cryptic morphology* dan *behaviour* (Clare 2007).

Saat ini tersedia alat bantu dengan validitas tinggi sebagai pendekatan standar untuk mengidentifikasi fauna/flora dengan urutan minimal sekuen DNA yang disebut barkode DNA. Seperti diketahui bahwa barkode DNA telah berhasil mengkonfirmasi status spesies yang telah dideskripsi secara morfologi dan dapat mengungkap spesies-spesies tersamar (*cryptic*) (Hebert *et al.* 2004; Smith *et al.* 2007). Konfirmasi dengan menggunakan barkode DNA dapat mempercepat klarifikasi spesies kelelawar. Namun ketersediaan informasi barkode DNA untuk kelelawar di Indonesia masih terbatas, oleh sebab itu perlu dilakukan kajian morfologi dan barkode DNA terhadap populasi kelelawar di Indonesia secara sistematis untuk meluruskan masalah taksonomi. Kelelawar pemakan buah di Indonesia diperkirakan sebanyak 78 spesies (Suyanto dkk. 2002).

Hasil kajian dari beberapa gen, menunjukkan cytochrome c oxidase subunit I (COI) dikatakan sebagai representasi dari *protein coding* pada DNA mitokondria dan telah digunakan secara luas sebagai alat identifikasi spesies fauna. Segmen dekat terminus 5' dari COI sepanjang sekitar 650 basa merupakan daerah yang digunakan sebagai barkode DNA (Hebert *et al.* 2003). Efektivitas COI telah divalidasi untuk bermacam kelompok

fauna dan sebagian besar jenis fauna yang diteliti memiliki barkode DNA yang beda, selain itu COI memiliki variasi intraspesifik rendah, tetapi divergensi tinggi antara taksa yang berdekatan (*closely allied taxa*) (Ward *et al.* 2005; Hajibabaei *et al.* 2006). Barkode DNA umumnya diprioritaskan pada jenis-jenis yang tersamar (Hebert *et al.* 2004) dan banyak diantaranya diketahui memiliki perbedaan karakter morfologi dan ekologi (Ward *et al.* 2005; Hajibabaei *et al.* 2006a). Diversitas sekuen dari gen COI juga telah terbukti mempunyai validitas tinggi dan efektif untuk identifikasi kelelawar di daerah tropika (Clare 2007). Standardisasi barkode DNA menggunakan gen COI telah dilakukan oleh "Consortium for Barcode of Life" dalam usaha mempercepat pembangunan perpustakaan referensi yang konsisten, komprehensif, cepat, dan ekonomis untuk identifikasi spesies. Penelitian ini dilakukan terhadap spesimen kelelawar pemakan buah hasil eksplorasi dan survei dari berbagai tempat di Indonesia. Hasil analisis barkode DNA diharapkan dapat melakukan koreksi secara cepat terhadap hasil identifikasi spesies yang dilakukan di lapangan atau laboratorium, terutama pada jenis-jenis tersamar. Barkode DNA diharapkan juga dapat digunakan sebagai alat bantu identifikasi spesies dan sebagai acuan melakukan kajian ulang terhadap spesies yang sulit dibedakan berdasarkan karakter morfologi. Dengan penyelarasan menggunakan barkode DNA maka spesimen acuan (*voucher specimen*) dari jenis-jenis tersamar yang dideposit sebagai koleksi ilmiah mempunyai validitas tinggi. Hal ini sangat penting karena spesimen ilmiah yang disimpan di Museum Zoologi Bogor menjadi rujukan para taksonom.

BAHAN DAN CARA KERJA

Material DNA yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari hasil eksplorasi dan survei kelelawar di berbagai tempat di Indonesia. Spesimen acuan disimpan di Laboratorium Mamalia dan material DNA berupa jaringan disimpan di "Bank of Material DNA for Indonesia Fauna"

Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Spesimen kelelawar pemakan buah yang digunakan berjumlah 121 spesimen yang terdiri dari 43 spesies dan 17 genus yang dikoleksi dari Jawa, Nusa Tenggara, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, dan Papua.

Ekstraksi DNA dilakukan mengikuti standar prosedur dari Sambrook *et al.* (1989), yaitu menggunakan teknik *phenol chloroform*. Amplifikasi fragmen DNA dari gen COI menggunakan teknik yang telah dikembangkan Ivanova *et al.* (2006), yaitu menggunakan empat pasang *forward primer* dan *reverse primer*, dengan *cocktail forward primer* masing-masing 10 pmol/ μ l terdiri dari LepF1-tl; VF1-tl; VF1d-t1; dan VFli-tl dengan perbandingan 1:1:1:3, demikian juga pada *cocktail reverse primer* yang terdiri dari LepR1-tl; VR1-tl; VR1d-tl; dan Vfli-tl, sedangkan desain primer dapat dilihat pada www.dnabarcoding.ca/clareetal2006.php.

Amplifikasi fragmen dari gen COI dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan *Thermal Cycler Applied Biosystems Type 2700* dengan volume sebanyak 25 μ l yang berisi 1 μ l DNA total, 2 μ l 2,5 μ l dNTP, 0,625 μ l (10 p mol) *cocktail forward primer* dan 0,625 μ l (10 p mol) *cocktail reverse primer*, 1 unit taq DNA polymerase (*Fermentes Life Sciences, Native*), 2,5 μ l 10x bufer, dan ditambah air milliQ hingga volume total 25 μ l (Clare *et al.* 2006) dengan sedikit modifikasi dimana tidak digunakan larutan 10% trehalose pada campuran PCR.

Kondisi PCR adalah sebagai berikut: pre denaturasi 94°C selama 1 menit, (denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 50°C selama 40 detik, elongasi 72°C selama 11 detik, 5 siklus), (denaturasi 94°C selama 30, *annealing* 55°C selama 40 detik, elongasi 72°C selama 1 menit, 35 siklus), post elongasi 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi fragmen dari gen COI di elektroforesis dengan menggunakan 2% AGE (*Agarose Gel Electrophoresis*). Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan *ethidium bromide* dengan bantuan sinar ultra violet. Dokumentasi hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan kamera digital.

Analisis sekuen dari gen COI dilakukan dengan menggunakan jasa pelayanan sekuen DNA di Macrogen Co, Seoul, Korea dan dilakukan dengan menggunakan *forward primer* M13F(-21) 5" TGT AAA ACG ACG GCC AGT3" dan *reverse primer* M13R (-27) 5" CAG GAA ACA GCT ATG AC3" (Messing 1983). Analisis filogenetik menggunakan metode *neighbor-joining*, dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura-2 parameter yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 6.05 (Tamura *et al.* 2013).

HASIL

Filogeni dan Divergensi DNA Barcode

Analisis sekuen fragmen gen COI DNA mitokondria dilakukan terhadap 121 sampel terdiri dari 43 spesies dan 17 genus kelelawar pemakan buah yang dikoleksi dari Jawa, Nusa Tenggara, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, dan Papua. Hasil analisis menunjukkan divergensi sekuen barcode intraspesifik berkisar antara 0,0-7,9% (0,93 \pm 1,6%), diantaranya terdapat 5 spesies mempunyai rata-rata divergensi sekuen barcode DNA intraspesifik >2,5%, yaitu *Chironax melanocephalus* (7,9 %), *Macroglossus minimus* (6,4%), *Penthetor lucasi* (3,7%), *Thoopterus nigrescens* (3,0%), and *Thoopterus suhaniahae* (2,6%), sedangkan jarak genetik interspesifik berkisar antara 1,3-26,1% dengan rata-rata 20%. Jarak genetik intersgenus berkisar antara 0,1-13,9% (5,2 \pm 4,6%) dan intergenus berkisar 16,5-25,2%.

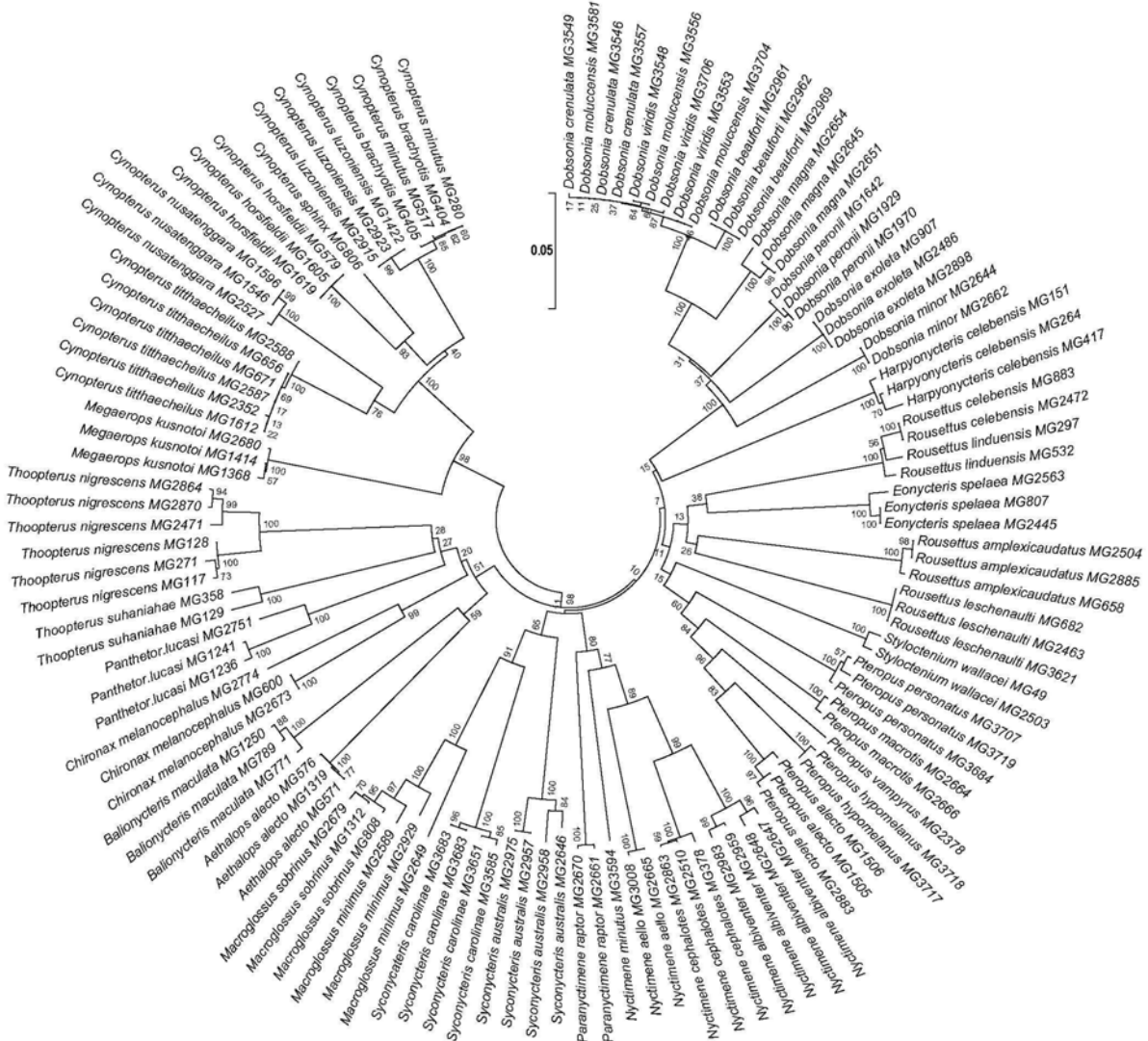
Rekonstruksi filogenetik kelelawar pemakan buah di Indonesia dengan gen COI menggunakan metoda *neighbor-joining*, dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura-2 parameter yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 6.05 (Tamura *et al.* 2013) dapat dilihat pada Gambar 1. Rekonstruksi filogenetik pada spesies yang memiliki divergensi intraspesifik >2,5% secara khusus dapat dilihat pada

Gambar 2, sedangkan jumlah garis keturunan, divergensi sekuen antar garis keturunan, dan nilai *bootstrap* antar garis keturunan dapat dilihat pada Tabel 1.

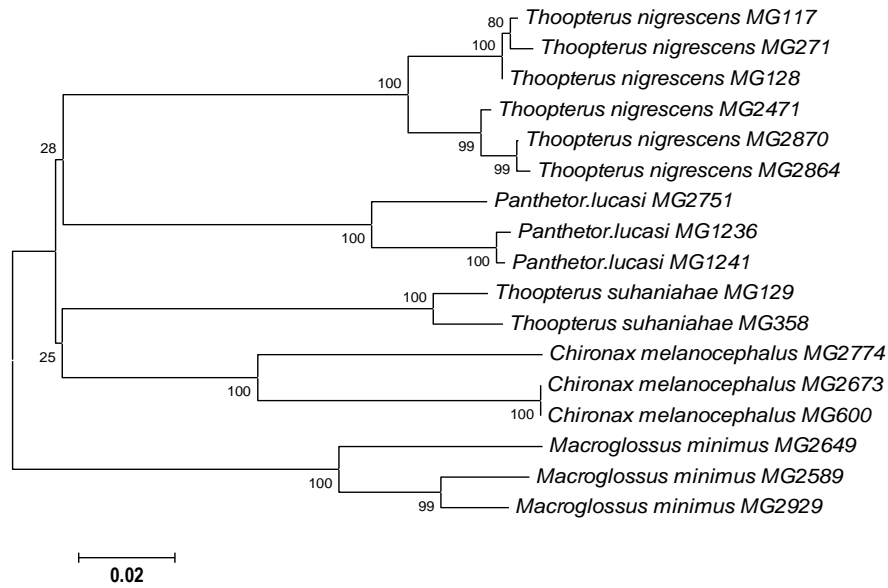
Namun demikian, kenyataan di lapangan masih dijumpai barkode DNA tidak sesuai dengan batas-batas yang diakui sebagai spesies yang berbeda berdasarkan karakter morfologi. Fenomena ini dapat dilihat dari hasil analisis filogenetik pada beberapa spesies kelelawar pemakan buah pada penelitian ini, yaitu pada genus *Macroglossus* (*M. minimus* dan *M. sobrinus*), *Cynopterus* (*C. minutus* dan *C. brachyotis*), serta *Dobsonia* (*D. moluccensis*, *D. crenulata*, dan *D. viridis*). Hasil analisis filogenetik spesies dari genus

Macroglossus, *Cynopterus*, *Dobsonia* pada penelitian ini masih bermasalah. Rekonstruksi filogeni group takson ini dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 3.

Rekonstruksi pohon filogeni genus *Cynopterus* secara khusus pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4, sedangkan jarak genetik intraspesifik pada spesies *Cynopterus brachyotis* (0,2%), *Cynopterus minutus* (0,2%), *Cynopterus nusatenggara* (0,4%), *Cynopterus luzoniensis* (0%), *Cynopterus titthaechilus* (0,1%), dan *Cynopterus sphinx* (n/c), sedangkan jarak genetik interspesifik genus *Cynopterus* berkisar antara 0,2-11,3% dan secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Rekonstruksi pohon filogeni kelelawar pemakan buah dengan metoda *neighbor-joining* berdasar sekuen



Gambar 2. Rekonstruksi pohon filogeni dari lima spesies yang mempunyai divergensi intraspesifik tinggi berdasarkan sekuen gen COI DNA mitokondria.

Tabel 1. Lima spesies dengan divergensi sekuen antar garis keturunan lebih dari 2,5% pada gen COI DNA mitokondria

No	Nama	Jumlah garis keturunan	Jarak genetik (%)	Nilai Bootstrap antar garis keturunan
1	<i>Thoopterus nigrescens</i>	6	0,5-6,3	100/99/99/100/92
2	<i>Panthetor lucasi</i>	2	11,8	100/100
3	<i>Thoopterus suhaniahiae</i>	1	3,6	100
4	<i>Chironax melanocephalus</i>	2	11,8	99/100
5	<i>Macroglossus minimus</i>	2	6,4	99/100

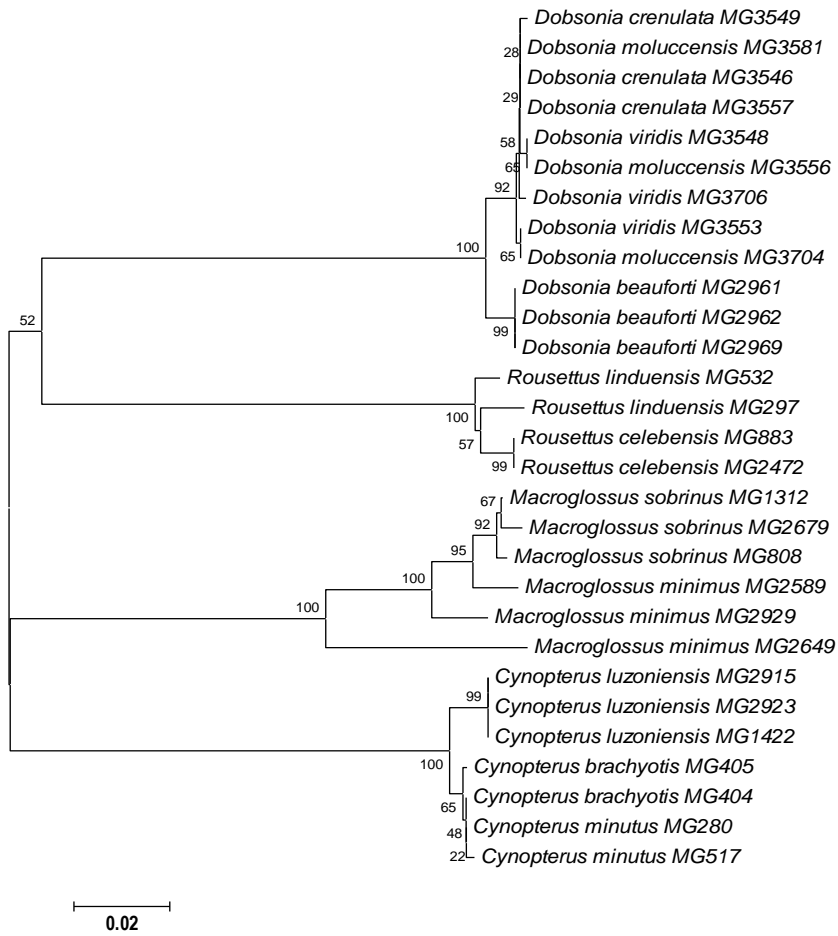
Kenyataan lain dimana hasil kajian morfologi terhadap spesimen acuan di Museum Zoologi Bogor telah dilakukan terhadap spesies *Thoopterus nigrescens* (Maryanto *et al.* 2012). Spesimen yang berasal dari Sulawesi, Kepulauan Talaud, dan Wowoni, ternyata mempunyai karakter morfologi yang berbeda dan diberi nama *Thoopterus suhaniahiae*. Deskripsi morfologi dari spesies ini, yaitu memiliki ukuran lebih besar pada tengkorak, gigi, rahang bawah, ukuran morfologi eksternal, dan calcar yang lebih luas. Spesies baru diketahui tidak memiliki ekor atau mereduksi seperempat hingga setengah di bawah dari uropatagium, jarang berambut dan *aperture urethral glans penis* tidak memiliki proyeksi seperti sisik yang mencolok.

Spesies baru ini *sympatric* dengan *T. nigrescens* dan diketahui pada ketinggian 60-2100 m dpl. Hasil kajian barkode DNA terhadap kedua spesies itu mendukung temuan tersebut dimana kedua spesies membentuk klaster yang berbeda. Jarak genetik intraspesifik *T. nigrescens* sekitar 3,0% dan *Thoopterus suhaniahiae* 2,6%, sedangkan jarak genetik kedua spesies ini sekitar 18,8%. Secara lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 5.

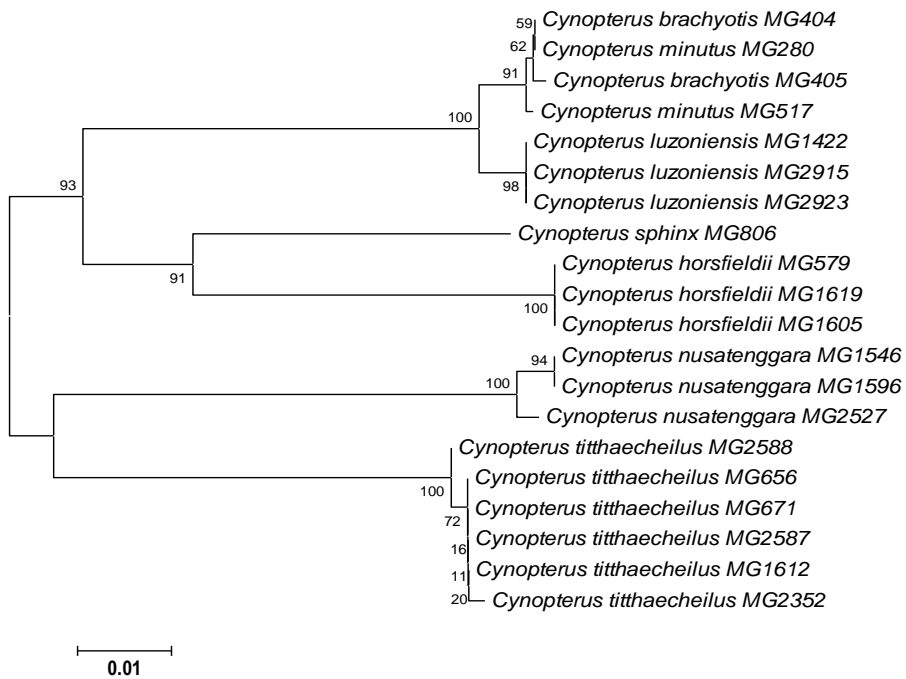
PEMBAHASAN

Divergensi Barkode DNA

Hasil kalkulasi jarak genetik intraspesifik dari 141 sekuen gen COI, berkisar antara 0% hingga



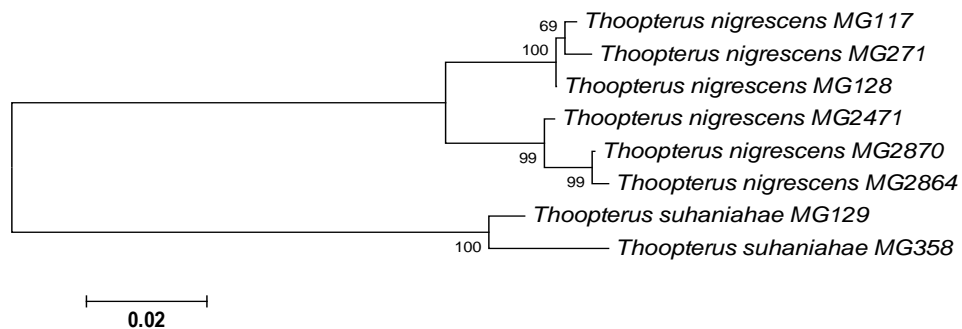
Gambar 3. Pohon filogeni dari spesies berbeda yang masih dalam satu kluster dalam Genus *Dobsonia*, *Cynopterus*, dan *Macroglossus* berdasarkan sekuen gen COI DNA mitokondria.



Gambar 4. Jarak genetik beberapa spesies pada genus *Cynopterus* dengan sekuen gen COI DNA mitokondria.

Tabel 2. Jarak genetik interspesifik pada genus *Cynopterus*.

Spesies	1	2	3	4	5
<i>Cynopterus brachyotis</i>					
<i>Cynopterus minutus</i>	0,002				
<i>Cynopterus nusatenggara</i>	0,113	0,115			
<i>Cynopterus luzoniensis</i>	0,012	0,010	0,112		
<i>Cynopterus titthaechilus</i>	0,102	0,104	0,096	0,105,,	
<i>Cynopterus sphinx</i>	0,095	0,093	0,108	0,092	0,1



Gambar 5. Jarak genetik *Thoopterus nigrescens* dan *Thoopterus suhaniahae* dengan sekuen gen COI DNA mitokondria.

7,9% ($0,93 \pm 1,6\%$). Jika dibandingkan dengan hasil survei kelelawar di Guyana menunjukkan hasil yang relatif sama, yaitu jarak genetik intraspesifik rata-rata $0,60 \pm 0,49\%$ dan dikategorikan rendah yaitu $<1\%$ (Clare *et al.* 2007). Namun demikian pada penelitian kelelawar pemakan buah di Indonesia diketahui terdapat 5 spesies (*C. melanocephalus*, *M. minimus*, *P. lucasi*, *T. nigrescens*, dan *T. suhaniahae*) yang dianalisa memiliki jarak genetik intraspesifik lebih tinggi dari 2,5% yaitu berkisar 2,6% hingga 7,9%, kemungkinan merupakan spesies kompleks (Lewis-Oritt *et al.* 2001; Wilson & Reeder 2005). Di Guyana terdapat 6 spesies yang mempunyai perbedaan sekuen intraspesifik berkisar 2,5% hingga 13,8%, dan dikategorikan tinggi yaitu $>2,5\%$. Secara umum dapat dikatakan rata-rata jarak genetik intraspesifik pada spesies kelelawar pemakan buah di Indonesia termasuk katagori rendah, yaitu $<1\%$ dan relatif sama dengan beberapa yang dilaporkan dari populasi kelelawar dari wilayah lain. Hal ini sesuai dengan yang dikehendaki pada barkode DNA, yaitu diversitas rendah pada intraspesifik dan tinggi pada interspesifik.

Jika dibandingkan dengan hasil kajian jarak genetik intraspesifik pada mamalia di Kanada, dilaporkan rata-rata 0,5% (Borisenko *et al.* 2008), antelop di Tanzania $<1\%$ (Bitanyi, 2011), dan ordo Cetartiodactyla di Indonesia 0,0-07% ($0,13 \pm 0,05\%$) (Zein dan Fitriana 2012). Data barkode DNA pada mamalia di Asia Tenggara juga menunjukkan indikasi gen COI mempunyai kinerja efektif dan kuat sebagai alat identifikasi spesies (Francis *et al.* 2010). Sebagai pembanding, barkode DNA pada sekuen gen cytochrome-*b* DNA mitokondria menunjukkan jarak genetik intraspesifik berkisar antara 0,09-8,70 pada kelelawar dan 0,00-6,29 pada tikus (Bradley dan Baker 2001). Hasil kajian perbandingan antara kedua gen ini dengan menggunakan hasil sekuen *full gen*, ternyata gen cytochrome-*b* menunjukkan resolusi sedikit lebih baik (Tobe *et al.* 2010), sedangkan dalam barkode DNA gen COI hanya menggunakan sekuen pendek sepanjang sekitar 650 pasang basa. Hasil ini dapat memberi dukungan kuat terhadap penggunaan gen COI DNA mitokondria sebagai standar barkode DNA.

Resolusi yang baik pada separasi antar spesies akan ditunjukkan oleh perbedaan sekuen interspesifik yang tinggi. Hasil kajian kelelawar di Indonesia dengan sekuen COI menunjukkan hasil divergensi genetik interspesifik berkisar antara 1,3-26,1% dengan rata-rata 20%, pada mamalia di Asia Tenggara rata-rata 12,9±6% (Francis *et al.* 2010), dan antara 6,3-22% pada antelop di Tanzania (Bitanyi 2011). Pada penelitian ini diversitas genetik intragenus 0,1-13,9% (5,2±4,6%) dan intergenus berkisar antara 16,5-25,2%.

Hasil kalkulasi dari diversitas genetik sekuen COI pada kelelawar pemakan buah di Indonesia menghasilkan rekonstruksi pohon filogeni membentuk sebuah klaster kohesif yang jelas berbeda di antara spesies, kecuali beberapa spesies pada genus *Macroglossus*, *Cynopterus*, dan *Dobsonia*. Hasil ini juga relatif sama dengan data sekuen gen COI pada kelelawar di Guyana (Clare *et al.* 2007). Standardisasi barkode DNA dari Gen COI yang dilakukan oleh “*Consortium for Barcode of Life*” adalah dalam usaha mempercepat pembangunan perpustakaan referensi yang konsisten, komprehensif, cepat, dan ekonomis untuk identifikasi spesies, kecuali terdapat kendala pada kelompok takson tertentu dimana tidak menyelesaikan perbedaan pada tingkat spesies.

Konflik Barkode DNA dan Identifikasi Morfologi

Peran barkode DNA semakin penting dalam mempercepat melakukan revisi dan perbaikan dalam menentukan karakter morfologi setiap spesies. Pada penelitian ini masih dijumpai fenomena dimana barkode DNA tidak sesuai dengan batas-batas yang diakui sebagai spesies yang berbeda berdasarkan karakter morfologi. Hasil analisis filogenetik pada genus *Macroglossus* (*M. minimus* dan *M. sobrinus*) masih dalam satu klaster, dimana barkode DNA tidak dapat membedakan kedua spesies ini. Hasil kajian mamalia di Asia Tenggara yang dilaporkan Francis *et al.* (2010) juga menemui hal serupa, dimana barkode DNA dari spesies *M. minimus* dan *M. sobrinus* tidak merespon sebagaimana

kajian morfologi yang telah ditetapkan. Oleh sebab itu perlu dilakukan kajian secara menyeluruh dari kedua spesies ini, sebagai spesies yang berdiri sendiri atau merupakan spesies yang sama.

Hasil serupa terjadi pada *Cynopterus* (*C. minutus* dan *C. brachyotis*). Seperti diketahui Genus *Cynopterus* beranggotakan tujuh spesies, yaitu *C. brachyotis*, *C. titthaechelus*, *C. sphinx*, *C. luzoniensis*, *C. nusatenggara*, *C. horsfieldii*, dan *C. minutus*. Pada genus ini banyak terjadi perdebatan taksonomi, terutama pada tumpang tindih dan ketidakjelasan batas ukuran morfologi pada tiap jenis anggotanya. Beberapa ahli zoologi menganggap bahwa *C. minutus* dan *C. luzoniensis* bukanlah jenis yang berdiri sendiri seperti hasil klasifikasi ulang dari Kitchener dan Maharadatunkamsi (1991), melainkan anak jenis dari *C. brachyotis*. Rekonstruksi genus *Cynopterus* secara khusus dapat dilihat pada Gambar 4.

Berdasarkan analisa morfometri Kitchener dan Maharadatunkamsi (1991) sebaran *C. brachyotis* disebelah timur terbatas hanya sampai Pulau Bali dan Kalimantan dengan mengusulkan jenis baru yaitu *C. nusatenggara* untuk pulau-pulau di timur Bali dan *C. luzoniensis* untuk Sulawesi dan Filipina. Pemisahan dua spesies tersebut dari *C. brachyotis* didukung juga oleh penelitian Schmitt *et al.* (1995) berdasarkan data *allozyme*. Meskipun demikian revisi yang diusulkan tersebut tidak konsisten diterima (Corbet & Hill 1992 ; Koopman 1993, 1994). Campbell *et al.* (2004) menggunakan sekuen mtDNA melakukan studi mengenai hubungan filogenetik antara tiga anggota genus *Cynopterus* yang terdistribusi paling luas yaitu *C. brachyotis*, *C. horsfieldii*, dan *C. sphinx* dan menganalisa apakah *C. brachyotis* merupakan spesies tunggal yang tersebar luas atau merupakan sebuah kompleks garis keturunan (*lineage*). Hasilnya menunjukkan bahwa haplotipe *C. horsfieldii* dan *C. sphinx* membentuk grup monofiletik bersarang dalam *C. brachyotis* kompleks. Mereka juga mengidentifikasi enam garis keturunan yang berbeda pada *C. brachyotis* kompleks yang disebut sebagai *C. brachyotis* garis keturunan India, Myanmar,

Sulawesi, dan Filipina yang secara geografis jelas terpisah. Dua garis keturunan lainnya yaitu Sunda dan Forest merupakan garis keturunan yang simpatrik dan secara ekologi berbeda. Dari hasil tersebut jelas bahwa antara populasi Sulawesi dan Filipina terpisah membentuk klaster tersendiri dan mereka mengusulkan bahwa *C. luzoniensis* spesifik hanya untuk populasi di Filipina. Hasil studi Campbell *et al.* (2004) mendukung hasil studi kami yang menunjukkan bahwa *Cynopterus* populasi Sulawesi yang kami sebut sebagai *C. luzoniensis* membentuk klaster tersendiri dan terpisah dari *C. brachyotis* hanya saja jarak genetik interspesifiknya rendah sekitar 1% sehingga tidak memenuhi syarat untuk dipisahkan menjadi spesies tersendiri (Tabel 2). Kejadian hampir sama dilaporkan pada spesies *Pteropus vampyrus* dan *Pteropus lylei* dimana genetik interspesifik hanya 2% (Francis, *et al.* 2010). Namun pada banyak kasus dikatakan jarak genetik interspesifik rata-rata $12,9 \pm 6,0\%$, bahkan hingga 26%.

Pada *C. minutus* seperti yang dijelaskan oleh Kitchener dan Maharadatunkamsi (1991) memiliki panjang lengan 52,9-61,9 mm sesuai dengan *C. cf. brachyotis* Forest menurut studi Abdullah dan Jayaraj (2006) serta Jayaraj, Laman, dan Abdullah (2012). Mereka mempelajari dan menganalisa jenis-jenis anggota Genus *Cynopterus* secara morfologi dan ekologi, hasil kajian menunjukkan ada dua garis keturunan (*lineage*) dalam *C. brachyotis* yaitu *forest lineage* dan *sunda lineage*. *C. brachyotis* Sunda berukuran lebih besar dengan panjang lengan >63mm, ukuran tubuh yang besar sebagai adaptasi untuk bertahan terhadap predator karena kelelawar ini hidup di daerah hutan sekunder, kebun, dan daerah dengan vegetasi yang terbuka. *C. cf. brachyotis* Forest berukuran kecil dengan panjang lengan <63mm dan hidup terbatas hanya di hutan primer dengan vegetasi rapat. Studi lain mengenai filogenetik dan filogeografi juga dilakukan oleh Campbell *et al.* (2004) dengan hasil sama yaitu terdapat dua garis keturunan dari *C. brachyotis* yaitu *forest* dan *sunda lineage*. Dua garis keturunan tersebut secara ekologi

menempati relung habitat yang berbeda dan saat ini masih dilakukan studi komprehensif ekologi, morfometri, dan filogeni untuk memastikan status taksonominya.

Hasil kajian barkode DNA (Gambar 3) terlihat bahwa posisi *C. brachyotis* dan *C. minutus* tumpang tindih pada klaster yang sama, sedangkan dengan *C. luzoniensis* hanya memiliki jarak genetik interspesifik yang sangat rendah, yaitu sekitar 1%. Jika hasil studi ini diterapkan maka status taksonomi *C. minutus* bukanlah spesies yang berdiri sendiri namun akan kembali bersatu dengan *C. brachyotis* sesuai dengan klasifikasi sebelumnya menurut Corbet & Hill (1992) dan Koopman (1993, 1994), demikian juga dengan *C. luzoniensis* kemungkinan hanya anak jenis dari *C. brachyotis*. Oleh sebab itu perlu dilakukan kajian lebih mendalam dan khusus pada takson ini.

Kejadian lebih lanjut dari hasil barkode DNA pada kelelawar pemakan buah di Indonesia, yaitu pada Genus *Dobsonia*. Di Indonesia, Genus *Dobsonia* beranggotakan sembilan spesies. Secara morfologi, karakter yang digunakan untuk identifikasi adalah ada tidaknya tonjolan tambahan *basal ledge* pada gigi premolar dan molar, ukuran tubuh serta warna tubuh. Ukuran tubuh seringkali tumpang tindih dan warna tubuh juga sangat subyektif sehingga kemungkinan kesalahan identifikasi tinggi. Oleh karena itu tonjolan *basal ledge* pada gigi menjadi karakter utama pembeda antar spesies. Kajian ini menemukan sesuatu yang menarik, ada tiga spesies *Dobsonia* yaitu *D. moluccensis*, *D. crenulata*, dan *D. viridis* yang tumpang tindih berada pada klaster yang sama. Selain itu pada penelitian ini *D. Beauforti* membentuk klaster tersendiri, namun jarak genetik interspesifik hanya 1,3% terhadap *D. crenulata*. Secara morfologi spesimen yang digunakan telah diidentifikasi dengan benar dan terpisah sebagai jenis yang berbeda, namun analisa pada studi kami mendapatkan hasil yang berbeda, untuk itu perlu ada studi lain yang lebih komprehensif dan studi ulang pada karakter morfologi untuk menetapkan karakter diagnostik yang tepat untuk identifikasi. Jarak genetik

interspesifik rendah (1,4%) juga ditunjukkan spesies *Rousettus lindoensis* dan *Rousettus celebensis*.

Kajian morfologi terhadap terhadap spesies *Thoopterus nigrescens* pada spesimen koleksi Museum Zoologi Bogor yang dilakukan oleh Maryanto *et al.* (2012) telah menunjukkan keselarasan dengan hasil kajian dengan menggunakan DNA barcode. Spesimen ini merupakan salah satu yang bersifat sebagai spesies tersamar. Hasil deskripsi baru dari kajian morfologi telah memisahkan dan munculnya spesies baru *Thoopterus suhanihae*. Namun perlu dilakukan kajian lebih luas terhadap populasi yang lebih besar. Deskripsi morfologi dari spesies *T. suhanihae*, yaitu memiliki ukuran lebih besar pada tengkorak, gigi, rahang bawah, morfologi eksternal, dan *calcar* yang lebih luas. Ekor spesies baru tidak ada (mereduksi), seperempat hingga setengah dari wajah di bawah dari uropatagium ini jarang berambut dan *aperture urethral glans penis* tidak memiliki proyeksi seperti sisik yang mencolok. Spesies baru ini *sympatric* dengan *T. nigrescens* dan diketahui pada ketinggian 60-2100 m dpl. Hasil ini telah memberi gambaran yang jelas betapa pentingnya DNA barcode digunakan sebagai salah satu alat dalam usaha para taksonomi menyelaraskan berbagai hasil kajian morfologi, terutama pada karakter-karakter utama yang membuat garis dari batas-batas spesies. DNA barcode dapat digunakan sebagai alat bantu yang kuat untuk mendorong proses penyelarasan masalah taksonomi dapat berjalan lebih cepat.

KESIMPULAN

Hasil konstruksi pohon filogeni kelelawar pemakan buah menunjukkan semua spesies membentuk kluster kohesif yang jelas berbeda dari hasil rekonstruksi pohon filogeni dari spesies yang dianalisa, kecuali pada beberapa spesies tersamar yang memerlukan kajian karakteristik morfologi lebih mendalam. Oleh sebab itu barkode DNA dapat membantu dalam meluruskan masalah taksonomi yang secara morfologi sulit dibedakan

sehingga sering menimbulkan kesalahan identifikasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari program “Pengembangan Bank DNA, Diversitas Genetik, dan Barcoding Fauna Indonesia”, DIPA Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Saya ucapkan terima kasih kepada Dr. Sri Sulandari, Dr. Hari Sutrisno dan Anik Bhudi Dhamayanthi, S.Si. yang telah banyak membantu dalam penulisan dan kegiatan di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, MT. & VK. Jayaraj. 2006. Preliminary investigation on the relationship of the nominate *C. brachyotis* with the small-sized and large-sized *C. brachyotis* using clustering analysis. *The Sarawak Museum Journal*. LXII (83): 223-236.
- Alikodra, HS. 1990. *Pengelolaan satwa liar*. Jilid I. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bitanyi, S., G. Bjornstad, EM. Ernest, M. Nesje, LJ. Kusiluka, JD. Keyyu, RH. Mdegela, & KH. Roed. 2011. Species identification of Tanzanian antelopes using DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*. 11:442-449.
- Borisenko, AV., BK. Lim, NV. Ivanova, RH. Hanner, & PDN. Hebert. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*. 8:471-479.
- Bradley, RD. & RJ. Baker. 2001. A test of the genetic species concept: Cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*: 82(4):960-973.
- Campbell, P., CJ. Schneider, AM. Adnan, A. Zubaid, & TH. Kunz. 2004. Phylogeny and phylogeography of old world fruit bats in the *Cynopterus brachyotis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33: 764-781

- Clare, EL., BK. Lim, MD. Engstrom, JL. Eger, & PDN. Hebert. 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology*. 7(2):184-190
- Corbet, GB. & JE. Hill. 1992. *The Mammals of the Indomalayan Region: A Systematic Review*. Natural History Museum Publication. Oxford University Press. New York.
- Francis, CM., AV. Borisenko, NV. Ivanova, JL. Eger, BK. Lim, AG. Servent, SV. Kruskop, I. Mackie, & PDN. Hebert. 2010. The role of DNA Barcodes in understanding and conservation of mammal diversity in Southeast Asia. *PLoS ONE*. 5(9): e12575.
- Fujita, MS. & MD. Tuttle. 1991. Flying Foxes (Chiroptera: Pteropodidae) : Threatened Animals of Key Ecological and Economical Importance. *Conservation Biology*. 5:455-463.
- Hajbabaei, M., JR. deWaard, & NV. Ivanova. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA*. 103:968-971.
- Hebert, PDN., A. Cywinska, SL. Ball, & JR. deWaard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal society of London. Serie B, Biological Sciences*. 270:313-322.
- Hebert, PDN., EH. Penton, JM. Burn, DH. Jansen, & W. Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in Neotropical skipper butterfly *Astraptes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 101:14812-14817.
- Jayaraj, VK., CJ. Laman, & MT. Abdullah. 2012. A predictive model to differentiate the fruit bats *Cynopterus brachyotis* and *C.f.brachyotis* forest (Chiroptera:Pteropodidae) from Malaysia using multivariate analysis. *Zoological Studies*. 51(2): 259-271.
- Kitchener, DJ. & Maharadatunkamsi. 1991. Description of a new species of *Cynopterus* (Chiroptera: Pteropodidae) from Nusa Tenggara Indonesia. *Records Western Australian Museum*. 51: 307-363.
- Kitchener, DJ., A Gunnell & Maharadatunkamsi. 1990. Aspect of the feeding biology of fruit bat (Pteropodidae) on Lombok island, Indonesia. *Mammals*. 54(4):561-574.
- Koopman, KF. 1993. Order Chiroptera. Dalam: Wilson, DE., & DM. Reeder. *Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference*, 2nd ed. Smithsonian Institution Press. Washinton. 137-241.
- Koopman, KF. 1994. Chiroptera: systematics. Dalam: Niethammer, J., H. Schliemann, & D. Starck. *Handbook of Zoology*. Volume VIII Mammalia. Walter de Gruyter. New York. 33.
- Lewis-Oritt, N., RA. Van Denb Bussche, RJ. Baker. 2001. Molecular evidence for evolution of piscivory in *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). *Journal of Mammalogy*. 82:748-759.
- Maryanto I., M. Yani, SN. Prijono, & S. Wiantoro. 2012. Fruit bat (Megachiroptera: Pteropodidae: *Thoopterus* from Sulawesi and adjacent islands, Indonesia. *Records of the Western Australian Museum*. 27:068-084.
- Sambrook, J., EF. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schmitt, LH., DJ. Kitchener, & RA. How. 1995. A genetic perspective of mammalian variation and evolution in the Indonesian Archipelago: biogeographic correlates in the fruit bat genus *Cynopterus*. *Evolution*. 49: 399-412.
- Suyanto, A., M. Yoneda, I. Maryanto, Maharadatunkamsi & J. Sugarjito. 2002. *Check list of Indonesian Mammals*. 2nd edition. Biodiversity Conservation Project. LIPI, JICA and PHPA. Bogor.
- Tobe, SS., AC. Kitchener, & AMT. Linacre. 2010. Reconstructing mammalian phylogenies: A detailed comparison of the cytochrome *b* and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial gene. *PLoS ONE*. 5(11): e14156.

- Ward, RD., TS. Zemlak, BH. Innes, PR. Last, & P.D.N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Sciences*. 360:1847-1857.
- Wilson, DE. & DM. Reeder. 2005. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Zein, MSA. & YS. Fitriana. 2012. Teknik molekuler untuk identifikasi spesies ordo Cetartiodactyla menggunakan DNA Barcode. *Zoo Indonesia*. 21(2):1-8.