

**Kajian Genetika untuk Konservasi Badak Sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis* Gloger, 1841)  
(Study of Genetics for Sumatran Rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis* Gloger, 1841) Conservation)**

**Moch Syamsul Arifin Zein<sup>1</sup>, Yuli Sulistya Fitriana<sup>1</sup>, Yuyun Kurniawan<sup>2</sup>, Kurnia Chaerani<sup>2</sup>, & Meriam Sirupang<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Jalan Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong, <sup>2</sup>WWF-Indonesia,  
Email: zein\_genetic@yahoo.com

**Memasukkan:** November 2018, **Diterima:** April 2019

**ABSTRACT**

The Sumatran rhinoceros is one of the most critically endangered species of large mammals due to habitat loss, fragmentation and illegal hunting so that the population of this species drastically decreased. At present, reproductive problems with a limited population are also a threat and require an appropriate solution. Therefore, data on molecular genetic information is very important as a basis for conservation management in maintaining long-term persistence of this species. Phylogenetic analysis based on sequences of CO1, 12SrRNA, and Cytochrome b gen from mitochondrial DNA genomes using neighbor-joining and genetic distance matrix calculations with the Kimura 2-parameter model (K2P) were implemented in pairwise distance calculations in the Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program version 6.05. The study results show the genetic distance of Sumatran Rhinos from Sumatra and Kalimantan respectively  $0.2 \pm 0.00\%$ ,  $0.8 \pm 0.4\%$ , and  $0\%$ . These results were reconfirmed that the Sumatran Rhino species in Sumatra and Kalimantan were taxonomy is no different. The study of genetic diversity based on D-loop of mitochondrial DNA contained 5 haplotypes, namely haplotypes 1 and 2 originating from the island of Sumatra and haplotypes 3, 4, and 5 originating from the island of Borneo. The genetic distance between individuals in this study ranged from  $2.54 \pm 1.4\%$ , haplotype diversity (Hd) was  $0.8 \pm 0.172$ , nucleotide diversity (Pi) was 0.02269, Fu's Fs value was 2.523, and Tajima's test was 0.69497. The positive value (Fu's Fs and Tajima's test) indicated low genetic diversity and population expansion in the Sumatran rhino. In the study using 10 microsatellite loci, where the average number of allele/loci in Kalimantan (1.68) was higher than in Sumatra (1.22). Data from this study show that genetic variation between Sumatran rhinoceros from Sumatra and Kalimantan can be used as a basis for alternative that the populations of Sumatra and Borneo be considered as a single management unit.

**Keywords:** Sumatran Rhinoceros, Mitochondrial DNA, Microsatellite

**ABSTRAK**

Badak Sumatera merupakan salah satu spesies mamalia besar yang paling terancam punah karena hilangnya habitat, fragmentasi, dan perburuan liar sehingga populasi spesies ini menurun secara drastis. Saat ini masalah reproduksi dengan populasi terbatas juga merupakan ancaman dan memerlukan jalan keluar yang tepat. Oleh sebab itu data informasi genetika molekuler sangat penting sebagai dasar pengelolaan konservasi dalam mempertahankan persistensi jangka panjang spesies ini. Analisis filogeni berbasis sekuens fragmen gen CO1, 12SrRNA, dan Cytochrome b dari genome DNA mitokondria menggunakan *neighbor-joining* dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura 2-parameter (K2P) diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program Mega (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 6.05. Hasil analisis menunjukkan jarak genetik Badak Sumatera dari Sumatera dan Kalimantan berturut turut adalah  $0,2 \pm 0,00\%$ ,  $0,8 \pm 0,4\%$ , dan  $0\%$ . Hasil ini merupakan rekonfirmasi bahwa spesies Badak Sumatera di Sumatera dan Kalimantan tidak berbeda secara taksonomi. Kajian keragaman genetik berbasis D-loop DNA mitokondria terdapat 5 haplotipe, yaitu haplotipe 1 dan 2 berasal dari pulau Sumatera dan haplotipe 3, 4, dan 5 berasal dari pulau Kalimantan. Jarak genetik antar individu pada penelitian ini berkisar  $2,54 \pm 1,4\%$ , keragaman haplotipe (Hd)  $0,8 \pm 0,172$ , keragaman nukleotida (Pi) 0,02269, nilai Fu's Fs 2,523, dan Tajima's test 0,69497. Nilai positif (Fu's Fs dan Tajima's test) mengindikasikan rendahnya keragaman genetik dan ekspansi populasi pada Badak Sumatera. Dalam kajian menggunakan 10 lokus mikrosatelit, dimana jumlah rata-rata alele/lokus di Kalimantan (1,68) lebih tinggi dari pada di Sumatera (1,22). Data kajian ini dapat digunakan sebagai dasar alternatif dalam kerangka pengelolaan Badak Sumatera di Sumatera dan Kalimantan dibawa satu unit konservasi.

**Kata Kunci:** Badak Sumatera, COI, 12SrRNA, Mikrosatelit

## PENDAHULUAN

Badak Sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*) pernah menyebar luas di Asia Tenggara, saat ini diperkirakan tinggal sekitar 30 individu di Sumatera dan Kalimantan (Brandt *et al.* 2018). Distribusi Badak Sumatera di Sumatera terdapat di Taman Nasional Gunung Leuser Taman Nasional Bukit Barisan Selatan, dan Taman Nasional Way Kambas (Foose & Strien 1997), sedangkan di Kalimantan sebarannya di wilayah pesisir Sarawak Utara dan Selatan, Semenanjung Sangkulirang (Kalimantan Timur), Kalimantan Tengah antara Banjarmasin dan Kotawaringin, dan Kalimantan Barat di utara Sungai Kapuas. Namun sampai sekitar tahun 1940, Badak Sumatera menghilang dari sebagian besar daerah dataran rendah barat, tengah, selatan, dan timur Kalimantan (Mejaard 1996). Koleksi cula Badak Kalimantan di Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia terdapat 10 cula berasal dari daerah Bulungan Kalimantan Timur yang dikoleksi pada tahun 1933 dan 2 cula dari Pontianak Kalimantan Barat yang dikoleksi pada tahun 1934. Informasi terakhir di Kalimantan dijumpai di Kutai Barat (Propinsi Kalimantan Timur) oleh tim WWF Indonesia. Hal ini memberi harapan baru upaya konservasi badak Sumatera yang dapat dilakukan di masa depan (Atmoko dkk. 2016). Pada 28 November 2018 berhasil diselamatkan satu ekor Badak Sumatera berjenis kelamin betina pada tempat yang sama di Kabupaten Kutai Barat, Provinsi Kalimantan Timur (Press rilist Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan RI Nomor: SP. 663/HUMAS/PP/HMS.3/11/2018). Seperti diketahui Badak Sumatera masuk dalam kategori *Critically Endangered species* (IUCN Red List, 2008) di Sumatera dan Kalimantan. Meskipun kerusakan habitat dan perburuan liar adalah alasan kemunduran dari populasi yang menurun dratis, tetapi saat ini isolasi reproduksi juga menjadi ancaman utama bagi kelangsungan hidup Badak Sumatera. Oleh sebab itu diperlukan solusi untuk kelangsungan reproduksi hasil penyelamatan Badak Sumatera di Kabupaten Kutai Barat dalam keterbatasan jumlah individu yang tersisa secara *in-situ* atau *ex-situ*. Data keragaman genetik dapat digunakan sebagai dasar dalam mengidentifikasi prioritas konservasi Badak

Sumatera. Hasil kajian genetik dan geografis diperhitungkan dalam memutuskan intervensi konservasi yang sangat dibutuhkan, seperti populasi Sumatra dan Kalimantan untuk dipertimbangkan sebagai unit manajemen tunggal (Goossens *et al.* 2013).

Teknologi DNA molekuler merupakan solusi memberi informasi usaha pengembangan populasi lestari dan berkelanjutan. Gen pada DNA mitokondria (mtDNA) dapat digunakan untuk memecahkan pola diferensiasi genetik pada skala filogenetik yang berbeda. Bagian tertentu dari DNA mitokondria ditandai berdasarkan tingkat evolusi sekuen lebih tinggi yang umumnya digunakan untuk mempelajari tingkat perbedaan genetik antar populasi dan untuk merekonstruksi sejarah pola penyebaran (Avise 2004). Selain itu, informasi genetik pada genom DNA mitokondria atau genom DNA inti juga dapat digunakan dalam usaha melakukan penilaian terhadap daya hidup sebuah populasi. Informasi struktur genetik pada populasi dapat mengungkap bukti adanya aliran gen atau isolasi genetik pada badak Sumatera di Sumatera dan Kalimantan.

Hasil kajian berbagai pihak telah menetapkan utilitas urutan DNA mitokondria dalam membedakan spesies hewan. Beberapa dekade terakhir genetika molekuler memiliki peran penting membantu, memperjelas, dan menentukan identifikasi spesies terutama yang mempunyai hubungan kekerabatan dekat (*criptic species*). Pendekatan DNA molekuler dalam bidang taksonomi telah digunakan sejak 20 tahun yang lalu dan saat ini telah tersedia akses protokol lebih cepat dan besar (Borisenko *et al.* 2008). Teknik DNA molekuler ini diketahui dapat digunakan sebagai alat bantu identifikasi jenis melalui urutan sekuen barcode DNA dari gen CO1 (*Cytochrome c oxidase subunit-1*) DNA mitokondria (Hebert *et al.* 2003). Gen CO1 diketahui memiliki variasi dalam spesies (intraspecies) rendah, tetapi mempunyai variasi antar taksa (interspecies) tinggi (Ward *et al.* 2005; Hajibabaei *et al.* 2006). Amplifikasi fragmen gen CO1 menggunakan primer standard DNA barcode yang dikembangkan Ivanova *et al.* (2006) yang sudah banyak digunakan untuk identifikasi spesies mamalia, sedangkan sekuen fragmen gen 12SrRNA dan cytochrome b digunakan sebagai pembanding.

Perhitungan keragaman genetik dalam dan antar populasi juga penting untuk merancang rencana yang bertujuan untuk menjaga keragaman genetik demi mempertahankan persistensi jangka panjang suatu spesies. Variasi genetik telah terbukti terkait langsung dengan daya hidup suatu populasi hidupan liar. Beberapa bukti yang berhubungan dengan penurunan keragaman genetik berakibat pada penurunan kemampuan bertahan hidup dan performa individu seperti keberhasilan reproduksi atau daya tahan terhadap penyakit. Namun demikian pola ini tetap ditemukan pengecualian pada hidupan liar di alam (Frankham *et al.* 2010). Oleh sebab itu pengetahuan secara komprehensif tentang keragaman genetik spesies dalam atau antar populasi merupakan langkah penting untuk merancang rencana yang bertujuan menjaga keragaman genetik pada generasi selanjutnya (Li *et al.* 2008).

Kajian genetika konservasi adalah salah satu bagian aplikasi ilmu genetika yang bertujuan mempertahankan spesies sebagai entitas yang dinamis untuk mengatasi perubahan lingkungan. Saat ini, aplikasi teknologi DNA dalam bidang konservasi telah membuka fenomena baru dalam memberikan informasi dasar yang akurat dalam memberikan solusi. Dalam usaha pengembangan populasi, faktor manajemen konservasi diperlukan untuk mempertahankan keberadaan populasi melalui program pengkayaan variasi genetik, di mana dasar informasi dapat diidentifikasi melalui rekonstruksi filogenetik dari suatu populasi (Moritz *et al.* 1996).

Berbagai marker molekuler DNA mitokondria (CO1, Cytochrome b, 12SrRNA, dan D-loop) dan DNA inti (Mikrosatelit) akan digunakan mempelajari intraspesifik diferensiasi genetik pada Badak Sumatera di Sumatera dan Kalimantan. Data ini penting bagi tindakan konservasi Badak Sumatera ke depan. Variasi genetik dan heterozigositas tinggi dari individu di Sumatera dan Kalimantan merupakan dasar baik untuk program reproduksi antar individu dari populasi yang berbeda untuk meningkatkan keragaman genetik secara berkelanjutan dalam penangkaran *in-situ/ex-situ*. Data hasil kajian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar pengambilan keputusan dalam kerangka usulan alternatif populasi Badak Sumatera dan Kalimantan dikelola dibawa satu unit konservasi.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Material DNA yang digunakan dalam kajian ini berasal dari Badak Sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*) yang mati (WWF Indonesia 2013) dan yang berhasil diselamatkan (Press rilist Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan RI Nomor: SP. 663/HUMAS/PP/HMS.3/11/2018) di Kabupaten Kutai Barat, Propinsi Kalimantan Timur, serta Badak Sumatera yang berasal dari Sumatera diambil dari badak yang pernah dipelihara di konservasi *ex-situ* Taman Safari Indonesia, Cisarua, Bogor. Ekstraksi DNA menggunakan *Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit* dengan prosedur ekstrak dan isolasi DNA mengikuti petunjuk dari produsen.

Amplifikasi fragmen DNA dari gen cytochrome c oxydase subunit 1 (CO1) menggunakan teknik yang telah dikembangkan Ivanova *et al.* (2006), yaitu menggunakan empat pasang primer *forward* dan *reverse* masing-masing 10 pmol/μl. *Cocktail forward primer* terdiri dari: LepF1-tl; VF1-tl; VF1d-tl; dan VFli-tl dengan perbandingan 1:1:1:3 dan *cocktail reverse primer* terdiri dari LepR1-tl; VR1-tl; VR1d-tl; dan Vrli-tl dengan perbandingan 1:1:1:3. Design primer secara lengkap dapat dilihat pada *Canadian Centre for DNA Barcoding* ([www.dnabarcoding.ca/clareetal2006.php](http://www.dnabarcoding.ca/clareetal2006.php)).

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan *Thermal Cycler Applied Biosystems Type 2700* dengan volume sebanyak 25 ml yang berisi 1 ml DNA total; 0,625ml (10 mM dNTP); 0,625 ml (10 pmol) *mix forward primer* dan 0,625 ml (10 pmol) *mix reverse primer*; 1 unit taq DNA polymerase (*Fermentas, Native with BSA*); 2,5 ml 10x bufer; dan ditambah air milliQ hingga volume total 25 ml (Clare *et al.* 2006). Kondisi PCR optimal adalah 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 detik, *annealing* 55°C selama 40 detik, elongasi 72°C selama 1 menit, 35 siklus), elongasi akhir 72°C selama 10 menit. Sekuen fragmen CO1 dilakukan dengan menggunakan *forward primer* M13F(-21) 5"TGTAACGACGACGCCAGT3" dan *reverse primer* M13R (-27) 5"CAGGAAACA GCTATGAC3" (Messing 1983).

Amplifikasi fragmen lain yaitu fragmen gen cytochrome b (L14724 5"CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC3" dan H15915 5"TC A TCT CCG GTT TAC AAG AC3"), 12SrRNA (L1091 "CA AAC TGG GAT TAG ATA CCC CAC3" dan H1478 5"GA GGG TGA CGG GCG GTG TGT3"), dan D-Loop (L15997 5"AGC CCC CAAAGC TGA TAT TCT3" dan H600 5"CAT TTT CAG TGC TTT GCT TT3") (Kocher *et al.* 1989). PCR *cocktail* sebanyak 25 ml terdiri dari 1 ml DNA total, 2 ml (2,5 mM dNTP), 1ml (10 pmol) *forward primer* dan 1 ml (10 pmol) *reverse primer*, 1 unit taq DNA polymerase (*KAPA2G Robust HotStart PCR Kit*), 5 ml *5x KAPA2G Buffer B* dan ditambah air milliQ hingga volume total 25 ml. Kondisi PCR optimal adalah denaturasi awal 94°C selama 5 menit, dilanjutkan denaturasi 94°C selama 45 detik, *annealing* 55°C selama 45 detik, *elongasi* 72°C selama 1 menit dengan 35 siklus, *elongasi* akhir 72°C selama 10 menit.

Hasil PCR dielektroforesis dengan menggunakan 2% AGE (*Agarose Gel Electrophoresis*) untuk melihat kualitas hasil amplifikasi fragmen target. Visualisasi pita target menggunakan *Gelred* dan sinar ultra violet. Dokumentasi hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan kamera digital. Sekuen hasil amplifikasi dilakukan dengan menggunakan jasa layanan sekuen DNA di *1<sup>st</sup>BASE Pte Ltd*, Malaysia.

Hasil sekuen fragmen berbasis gen barkode, yaitu CO1, gen cytochrome b, dan 12SrRNA Badak Sumatera berasal dari Sumatera (Taman Safari Indonesia, Cisarua) sebanyak satu sekuen dan Kalimantan (Kutai Barat, Kalimantan Timur) sebanyak dua sekuen yaitu Kutai 1 dan Kutai 2, dianalisis bersama dengan data sekuen dari *GenBank* seperti pada Tabel 1, 2, dan 3.

Analisis filogenetik berbasis barkode DNA (CO1, Cytochrome b, dan 12SrRNA) untuk melihat *cluster* dan jarak genetik antar individu pada populasi Badak Sumatera di Sumatera dan Kalimantan menggunakan *neighbor-joining* dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura 2-parameter (K2P) yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program *Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)* versi 6.05 (Tamura *et al.* 2013). Jarak genetik dalam spesies dan antar spesies dilakukan untuk

mengetahui kedekatan antara spesies badak Sumatera yang ada di pulau Sumatera dan Kalimantan sebagai klarifikasi status taksonomi serta jarak genetik antar spesies badak yang ada di Asia dan Afrika.

Selain itu dilakukan juga analisis fragmen D-loop DNA mitokondria yang merupakan daerah non koding untuk melihat keragaman genetik. Analisis data sekuen dilakukan bersama dengan data sekuen dari *Genbank*, secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 4. Analisis dilakukan meliputi diversitas nukleotida (Pi), diversitas haplotipe (Hd), Fu and Li's test, dan Tajima test dengan menggunakan perangkat lunak *DnaSP* versi 5.10.01.(Rozas *et al.* 2003)..

Analisis *genotyping* dilakukan menggunakan 10 *marker* mikrosatelit khusus untuk Badak Sumatera (Scott *et al.* 2004). *Marker* tersebut yaitu: SR IIIA, SR IIIB, SR 54, SR 63, SR 71, SR 74, SR 191, SR 261, SR 275, dan SR 281. Informasi secara lengkap 10 *marker* mikrosatelit ini disajikan pada Tabel 5. Amplifikasi fragmen mikrosatelit menggunakan mesin RT-PCR (*Rotor-Gen Qiagen*) dengan *QuantiNova SYBR Green PCR Kit*. Campuran larutan sebanyak 20 µL terdiri dari 40 ng/µL sampel DNA, *forward primer* dan *reverse primer* masing-masing 0,7 µM, *1xSYBR Green PCR Master*, dan dH<sub>2</sub>O hingga volume 20 µL. Kondisi PCR meliputi denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan 40 siklus, yaitu denaturasi pada 95°C selama 15 detik, suhu *annealing* setiap *marker* dapat dilihat pada Tabel 5.

Visualisasi fragmen mikrosatelit dilakukan dengan teknik *multiplex* dan setiap tabung reaksi diisi dengan tiga produk PCR. Masing-masing produk PCR mempunyai panjang fragmen yang relatif tidak tumpang tindih dan label berwarna *marker* yang berbeda (Hex, Ned, dan 6Fam). Prosedur yang dilakukan adalah dengan mencampur hingga homogen larutan yang terdiri dari 1µL masing-masing produk PCR; 0,25 µL *Liz standard*; dan 7,75 µL formamide kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, setelah itu dilakukan denaturasi pada suhu 94°C selama lima menit, langsung didinginkan pada 0°C dan dibiarkan selama sekitar lima menit. Campuran larutan tersebut siap dianalisis dengan menggunakan layanan analisis fragmen dengan mesin *automated capillary DNA sequencer (1<sup>st</sup>BASE*

Pte Ltd Malaysia). Editing hasil grafik fragmen mikrosatelit DNA dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Peak Scanner* Versi 1.0.

## HASIL

### DNA Barkoding Berbasis Gen CO1:

Saat ini terdapat lima spesies famili Rhinocerotidae, yaitu dua spesies badak yang hidup di Afrika (Badak Hitam/*Diceros bicornis* dan Badak Putih/*Ceratotherium simum*) dan tiga spesies lainnya yang hidup di Asia (Badak

Sumatera/*Dicerorhinus sumatrensis*, Badak Jawa/*Rhinoceros sondaicus*, dan Badak India/*Rhinoceros unicornis*). Pada penelitian ini dapat dilihat posisi Badak Sumatra dari Sumatera dan Kalimantan (Kutai Barat) terhadap spesies badak lainnya berbasis sekuen gen CO1 dari genom DNA mitokondria. Data sekuen dianalisis bersama dengan data dari *GenBank* dengan *outgroup* Tapir/*Tapirus indicus* dan Anoa/*Bubalus depressicornis* (Gambar 1).

Hasil penyelarasan 16 sekuen sepanjang 609 pasang basa fragmen gen CO1 DNA mitokondria dari 5 spesies badak (famili Rhinocerotidae) yang

**Tabel 1.** Sekuen *GenBank* gen COI famili Rhinocerotidae

Nama Spesies	Kode Akses	Keterangan
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	FJ905816.1; NC012684.1	Badak Sumatera
<i>Rhinoceros unicornis</i>	NC001779.1	Badak India
<i>Rhinoceros sondaicus</i>	NC012683.1; FJ905815.1; NC012682.1	Badak Jawa
<i>Diceros bicornis</i>	KX012667.1; KX012628; KX012628 JX998188.1; FJ905814.1; NC012682.1	Badak Hitam Afrika
<i>Ceratotherium simum</i>	NC001808.1; Y07726.1	Badak Putih Afrika
<i>Tapirus indicus</i>	Sekuen sendiri	Tapir (outgroup)
<i>Bubalus depressicornis</i>	Sekuen sendiri	Anoa (outgroup)

**Tabel 2.** Sekuen dari *GenBank* gen cytochrome b dari *D. sumatrensis*

Nama Spesies	Kode Akses	Keterangan
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	NC012684.1; JF718875.1; AJ245723.1	Badak Sumatera
<i>Rhinoceros unicornis</i>	NC001779.1	Badak India (outgroup)
<i>Bubalus depressicornis</i>	D88642.1	Anoa (outgroup)

**Tabel 3.** Sekuen dari *GenBank* gen 12SrRNA dari *D. sumatrensis*

Nama Spesies	Kode Akses	Keterangan
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	NC012684; FJ905816.1; AY73916.1,	Badak Sumatera (Sumatera)
<i>D. Sumatrensis harrissoni</i>	AY739617.1	Badak Sumatera (Sabah)
<i>Rhinoceros sondaicus</i>	FJ905815.1	Badak Jawa (outgroup)
<i>Rhinoceros unicornis</i>	NC012682.1	Badak Asia (outgroup)

**Tabel 4.** Sekuen dari *GenBank* fragmen D-loop DNA mitokondria *D. sumatrensis*

Nama Spesies	Kode Akses	Keterangan
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	FJ905816.1; NC012684.1	Badak Sumatera (Sumatera)
<i>D. sumatrensis harrissoni</i>	JQ281904.1; JQ281903	Badak Sumatera (Sabah)
<i>Rhinoceros sondaicus</i>	NC012683.1; FJ905815.1; NC012682.1	Badak Jawa
<i>Diceros bicornis</i>	KX012667.1; KX012628; KX012628 JX998188.1; FJ905814.1; NC012682.1	Badak Hitam Afrika
<i>Ceratotherium simum</i>	NC001808.1; Y07726.1	Badak Putih Afrika
<i>Tapirus indicus</i>	Sekuen sendiri	Tapir (outgroup)
<i>Bubalus depressicornis</i>	Sekuen sendiri	Anoa (outgroup)

ada di dunia terdapat 154 situs polimorfik. Rata-rata frekuensi basa dari data sekuen ini adalah T (*Thymine*)=27,9%, C (*Cytosine*)=27,3%, A (*Adenine*)=27,%, dan G (*Guanine*)=17,8% didominasi oleh T, sedangkan pada kodon pertama frekuensi basa yaitu T=20,0%, C=24,8%, A=26,1%, G=29,1% didominasi oleh G; kodon kedua yaitu T=41, 3%, C=28,3%, A=16,3%, dan G=14, 1% didominasi oleh T; dan kodon ketiga yaitu T=22,4%, C=28,8%, A=38,6%, dan G=10,2% didominasi A. Selain itu komposisi AT>GC, yaitu 55,4% dan 44,6%. Ratio transisi/tranversi adalah  $k_1=5,25$  (*purines*) dan  $k_2=75,054$  (*pyrimidines*), sedangkan bias transisi/tranversi secara keseluruhan adalah  $R=24,574$  dimana  $R = [AGk_1 + TCk_2] / [(A+G)(T+C)]$ .

Jarak genetik antar spesies pada famili Rhinocerotidae berkisar antara 6,6–18,0% dengan rata-rata 14,78±4,09%. Jarak genetik paling dekat adalah antara Badak Jawa (*Rhinoceros sondaicus*) dan Badak India (*Rhinoceros unicornis*) yaitu 6,6%, sedangkan paling jauh adalah Badak Putih Afrika (*Ceratotherium simum*) dan Badak Jawa (*Rhinoceros sondaicus*) yaitu 18,0%. Badak Sumatera dan Badak Jawa mempunyai jarak genetik 16,4%. Nilai *bootstrap* terhadap *outgroup* tinggi yaitu 86%.

Jarak genetik secara lengkap dari 5 spesies badak yang ada di dunia dapat dilihat pada Tabel 6.

Hasil analisa pohon filogeni spesies Badak Sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*) dari Sumatera dan Kalimantan berbasis gen CO1 DNA mitokondria dapat dilihat pada Gambar 2. Menggunakan *outgroup* Badak Jawa (*Rhinoceros sondaicus*) kode akses NC012683.1 dan Badak India (*Rhinoceros unicornis*) kode akses KX012668. Jarak genetik dalam spesies antara Badak Sumatera di Sumatera dan Kalimantan adalah 0,2±0,0% (Tabel 7) dan nilai *bootstrap* terhadap *outgroup* 100%.

### Berbasis Gen Cytochrome b

Hasil analisa pohon filogeni spesies Badak Sumatera berbasis gen cytochrome b sepanjang 1046 pasang basa dan data sekuen dari *GenBank*, serta menggunakan *outgroup* *Rhinoceros unicornis* (NC 001779) dan *Bubalus depressicornis* (D88642.1) dapat dilihat pada Gambar 3. Jarak genetik dalam spesies berkisar antara 0-1,2% dengan rata-rata 0,8±0,4% (Tabel 8). Nilai *bootstrap* terhadap *outgroup* 100%.

**Tabel 5.** Lokus, motif pengulangan, sekuen primer, label premer, dan suhu aneling yang digunakan untuk amplifikasi fragmen DNA mikrosatelit

Lokus	Motif Pengulangan	Sekuen Premer (5'-3")	Label Premer	Anneling (°C)
SR IIIA	(CA)22	F: GGCGAAAGGTAAGAGCAGC R: GCTTCTTTCCGAGGATCTGG	FAM	62
SR IIIB	(GT)22	F: GCCAGCCACCTTCCTCAATG R: TTCATAGACGACGAATGCCTACATG	HEX	63
SR 54	(CA)26	F: CAATATCCAGGCTTCCAGG R: CTGTTTACTGTTATCGATGCTC	HEX	63
SR 63	(AC)19	F: CTTGAGCAGAGTAGAATTTGG R: CTCTGTATCCACCTCATTCC	TAMRA	63
SR 71	(CA)21	F: ATCATCTCTCTCACACAGACC R: CAACGCTGCACAGACTTCAC	FAM	63
SR 74	(CA)19	F: CAGCACAATGTTTGGCACTTG R: TTGGAGTCTTATGTCACCACC	HEX	63
SR 191	(CA)21	F: TGTAATGTAAAGCACAGTGAC R: GACGTGTATATTGCAAAGTG	TAMRA	63
SR 261	(CA)22	F: CTGCTGGCCTGTAGATTGC R: CTCCTGAGCAGTAACTATCC	TAMRA	63
SR 275	(CA)25	F: GGAAGTGTAAAGCACAGTGAC R: GTCTTGATGCCTGCATTCTG	FAM	62
SR 281	(GT)23	F: AGGTGATTAGGGAATTGCTGG R: TTCTTCTGTCTGTCCTGGCATTGC	FAM	62

### Berbasis Gen 12SrRNA

Pohon filogeni spesies Badak Sumatera berbasis gen 12SrRNA sepanjang 453 pasang basa dari data sekuen Badak Sumatera (Sumatera dan Kalimantan/Kutai Timur) dan data sekuen dari *GenBank* dan *Outgroup* yang digunakan *Rhinoceros sondaicus* (FJ905815.1) dan *Rhinoceros unicornis* (NC001779.1) dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil analisa filogeni menunjukkan jarak genetik dalam spesies badak Sumatera berbasis gen 12SrRNA adalah 0%.

### Diversitas Genetik: D-Loop DNA mitokondria

Hasil analisa diversitas genetik Badak Sumatera berbasis fragmen D-loop DNA mitokondria sepanjang 429 pasang basa dengan enam individu terdapat empat tipe sekuen/haplotipe, yaitu haplotipe 1 di pulau Sumatera, haplotipe 2 di Kutai Barat, Haplotipe 3 dan 4 di Sabah. Diversitas haplotipe (Hd)  $0,8 \pm 0,172$ , diversitas nukleotida (Pi) 0,02269. Nilai Fu's Fs positif (2,523) demikian juga nilai Tajima's test positif (0,69497) menunjukkan rendahnya diversitas genetik dan ekspansi populasi pada Badak Sumatera. Selain itu posisi Badak Sumatera dari Pulau Sumatera dan Kalimantan terlihat membentuk gap kluster yang jelas terpisah (Gambar 5).

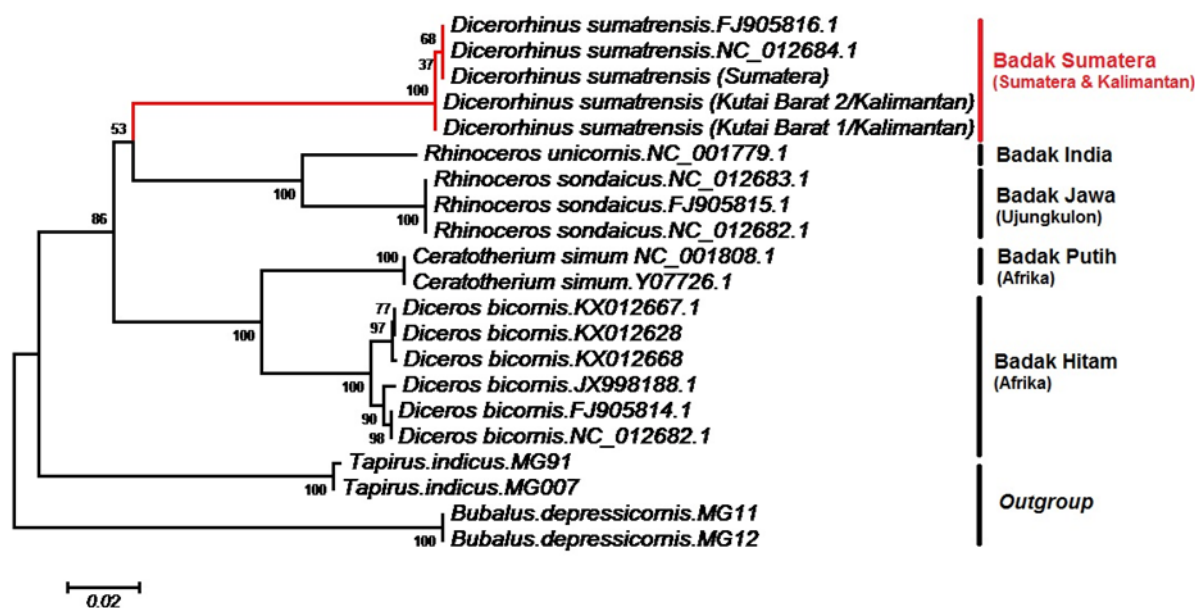
### Mikrosatelit

Jumlah alel Badak Sumatera pada 9 lokus mikrosatelit dapat dilihat pada Tabel 10. Hasil analisa dari tiga sampel Badak Sumatera tersebut diketahui rata-rata alel setiap lokus adalah 1,22 (Sumatera), 1,66 (Kutai Barat/Kalimantan 1), dan 1,7 (Kutai Barat/Kalimantan 2), berarti di Kalimantan rata-rata alel setiap lokus 1,68. Lokus SR 275 tidak teramplifikasi terhadap sampel berasal dari Sumatera maupun yang berasal dari Kalimantan. Secara lengkap jumlah alel dapat dilihat pada Tabel 10.

### PEMBAHASAN

#### Status taksonomi

Frekuensi basa rata-rata fragmen CO1 dari 5 spesies badak relatif seimbang, yaitu T =27,9%; C=27,3%; A=27,% dan G=17,8%, bias kuat terhadap G (*Guanine*) menjadi lebih jelas dalam posisi kodon ketiga di mana frekuensi basa rata-rata untuk G turun menjadi 10,2% (T=22,4%, C=28,8%, A=38,6%, dan G=10,2%). Penjelasan mengenai hal ini karena pemilihan terhadap nukleotida *Guanine* (G) kurang stabil ditemukan di *light strand* ketika terjadi sebagai *single strand* untuk periode waktu panjang selama DNA mitokondria mengalami replikasi



Gambar 1. Pohon filogeni famili Rhinocerotidae berbasis gen COI genom DNA mitokondria

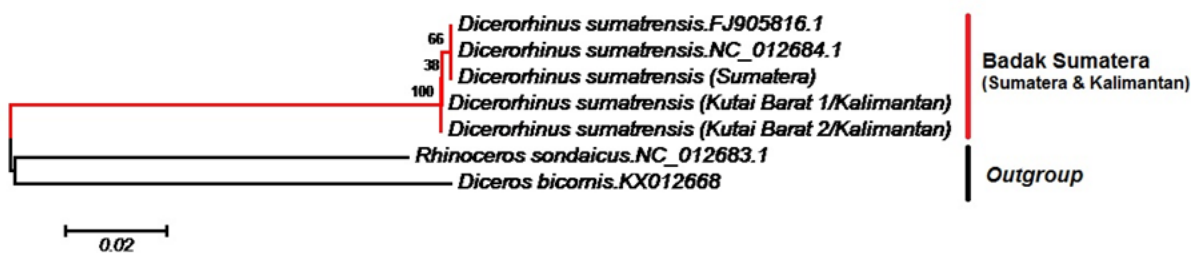
(Clayton 1982). Pada vertebrata lainnya terjadi bias lebih besar, yaitu burung famili Accitripidae di Filipina (Ong *et al.* 2011), dimana frekuensi basa G turun rata-rata menjadi 2,5% pada kodon ketiga, famili Accitripidae di Indonesia frekuensi basa G turun rata-rata menjadi 4,6% juga pada kodon ketiga (Zein 2018), dan burung dari genus Macgregoria (Cracraft & Feinstein 2000). Komposisi AT>GC yaitu 54,4% dan 44,1% relatif seimbang, hal ini sesuai menurut Muto & Osawa (1987). Lebih lanjut juga dikatakan pada umumnya kandungan GC pada vertebrata berkisar antara 40-45% (Sueoka 1962). Ratio transisi/transversi pada penelitian ini adalah  $k_1=5,25$  (*purines*) dan  $k_2=75,054$  (*pyrimidines*), sedangkan bias transisi/transversi secara keseluruhan adalah  $R=24,574$ , berarti kejadian substitusi transversi sekitar 24 kali lebih banyak dari terjadinya substitusi

transisi.

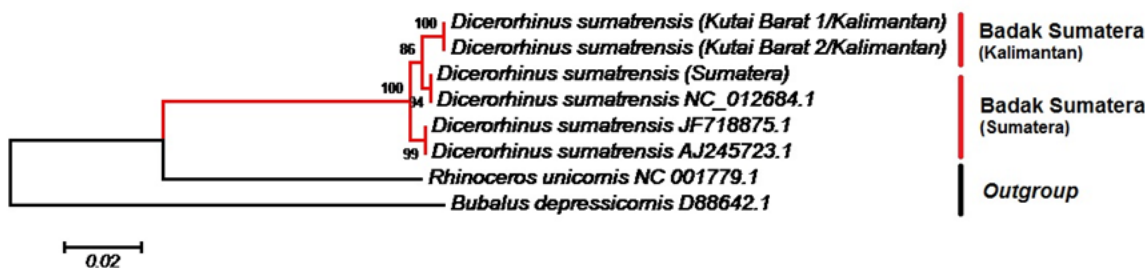
Jarak genetik antar 5 spesies badak di dunia tinggi, yaitu berkisar antara 6,6–18,0% dengan rata-rata  $14,78\pm 4,09\%$ . Jarak genetik paling dekat adalah antara Badak Jawa (*Rhinoceros sondaicus*) dan Badak India (*Rhinoceros unicornis*) yaitu 6,6%. Hal ini disebabkan masih dalam satu genus. Badak Putih Afrika (*Ceratotherium simum*) dan Badak Jawa (*Rinoceros sondaicus*) adalah yang paling jauh, yaitu 18,0% (berbeda genus). Badak Sumatera dan Badak Jawa mempunyai jarak genetik 16,4% (berbeda genus), sedangkan jika dibandingkan hasil kajian jarak genetik dalam spesies berbasis gen COI pada famili Bovidae, Suidae, Crocodilidae, Alligatoridae, dan Cercopithecidae berkisar 0,0-1,92% (rata-rata 0,24%) dan antar spesies rata-rata 9,77% (Mitchell *et al.* 2010). Kajian barkoding pada famili Bovidae di China diketahui rata-rata jarak genetik dalam spesies rata-rata 0,63% dan antar spesies 6,3% (Cai *et al.* 2011) dan pada ordo Cetartiodactyla di Indonesia dilaporkan jarak genetik dalam spesies rata-rata  $0,13\pm 0,05\%$  dan antar spesies berkisar antara 2-28% (Zein & Fitriana 2012). Hal ini menunjukkan bahwa analisis jarak genetik berbasis gen COI dari DNA mitokondria pada berbagai satwa tingkat tinggi menunjukkan hasil pohon filogeni membentuk gap kluster antar spesies yang jelas terpisah. Hal ini juga terjadi pada hasil kajian pada badak

**Tabel 6.** Jarak genetik antar spesies famili Rhinocerotidae berbasis gen CO1 DNA mitokondria

Spesies	1	2	3	4
<i>D. sumatrensis</i>				
1 <i>R. sondaicus</i>	0.164			
2 <i>R. unicornis</i>	0.168	0.066		
3 <i>D. bicornis</i>	0.172	0.166	0.157	
4 <i>C. simum</i>	0.155	0.18	0.173	0.077



**Gambar 2.** Pohon filogeni Badak Sumatera (*D. sumatrensis*) berbasis gen CO1 dari genom DNA mitokondria



**Gambar 3.** Pohon filogeni Badak Sumatera (*D.sumatrensis*) berbasis gen cytochrome b DNA mitokondria



dimana setiap spesies membentuk gap *cluster* yang jelas terpisah dan selaras dengan karakter morfologi yang menjadi dasar penamaan spesies badak.

Jarak genetik dalam spesies antara Badak Sumatera di Sumatera dan Kalimantan adalah 0,2% dan nilai *bootstrap* 100% terhadap *outgroup* *Tapirus indicus*. Badak Sumatera di Pulau Sumatera dan Kalimantan dengan jarak

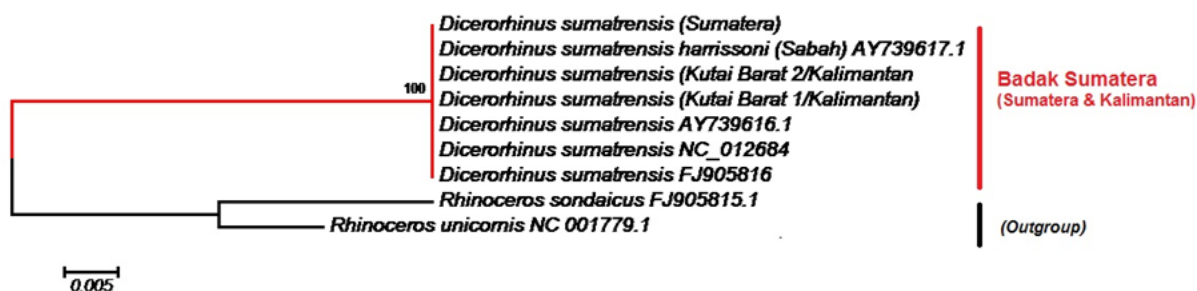
genetik 0,2% berada pada kisaran rata-rata pada mamalia besar di Indonesia ((Zein & Fitriana 2012) yaitu  $0,13 \pm 0,05\%$ , artinya kedua populasi badak di Sumatera dan Kalimantan adalah spesies yang sama dan tidak mempunyai hambatan reproduksi jika dilakukan perkawinan. Hal ini didukung dengan hasil analisis berbasis gen cytochrome b, jarak genetik dalam spesies berkisar antara 0-1,2% (rata-rata  $0,8 \pm 0,4\%$ ) dan

Tabel 7. Jarak genetik Badak Sumatera (*D. sumatrensis*) berbasis gen CO1 dari genom DNA mitokondria

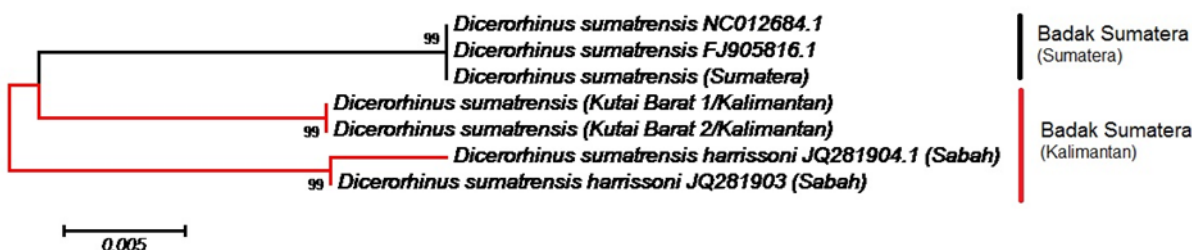
Spesies	1	2	3	4
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i> (Kutai Barat/Kalimantan)				
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i> (Sumatera)	0,002			
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i> FJ905816.1	0,002	0		
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i> NC_012684.1	0,002	0	0	
<i>Rhinoceros sondaicus</i> NC 012682.1	0,162	0,164	0,164	0,164

Tabel 8. Jarak genetik Badak Sumatera (*D. sumatrensis*) berbasis gen cytochrome b DNA mitokondria

Nama Spesies	1	2	3	4	5	6
<i>D. sumatrensis</i> NC012684.1						
<i>D. sumatrensis</i> (Kutai Barat/Kalimantan)	0.008					
<i>D. sumatrensis</i> (Sumatera)	0	0.008				
<i>D. sumatrensis</i> JF718875.1	0.01	0.012	0.01			
<i>D. sumatrensis</i> AJ245723.1	0.01	0.012	0.01	0		
<i>Bubalus depressicornis</i> D88642.1	0.222	0.225	0.222	0.216	0.216	
<i>Tapirus indicus</i> AB469776.1	0.174	0.176	0.174	0.176	0.176	0.211



Gambar 4. Pohon Filogeni Badak Sumatera (*D. sumatrensis*) berbasis gen 12SrRNA DNA mitokondria



Gambar 5. Pohon Filogeni Badak Sumatera (*D. sumatrensis*) berbasis fragmen D-loop DNA mitokondria

berbasis gen 12SrRNA adalah 0%. Lebih lanjut berdasarkan analisis *Population Aggregation analysis* (PAA) dari DNA mitokondria dari tiga populasi yang terpisah di Malaysia, Sumatera, dan Kalimantan dilaporkan bahwa haplotipe di Malaysia dan Sumatera lebih dekat satu sama lain dibandingkan dengan populasi yang ada di Kalimantan (Amato *et al.* 1995). Laporan lebih dalam hasil analisis diferensiasi genetik berdasarkan sekuen genom DNA mitokondria secara lengkap maka terdeteksi populasi di Sumatera, Kalimantan, dan Semenanjung Malaysia adalah sebagai tiga subspecies badak sumatera yang berbeda. Saat ini yang masih eksis adalah *D. s. sumatrensis* (subspecies Sumatera) dan *D. s. harrisoni* (subspecies Kalimantan). Perkiraan waktu divergensi terjadi sekitar 360.000 tahun yang lalu. Oleh sebab itu disarankan sebagai unit manajemen konservasi yang terpisah (Steiner *et al.* 2018). Namun dikatakan lebih lanjut, pengelolaan subspecies sebagai bagian dari metapopulasi dapat dilakukan sebagai tindakan terakhir untuk menghindari kepunahan mengingat terjadinya penurunan populasi yang cepat walaupun hal ini dilema bagi konservasi.

	11111111122222223334	
	00345889901445990162	n
	16816026999297898551	
H_1	AAAAAAGATTTTAAATTTCC	3
H_2	GAGGAGGGCTCTCAACCTC	1
H_3	GGGGGAAGTCCCTGCCTTTT	1
H_4	GGGGGAAGTCCCTGACTTTC	1

**Gambar 6.** Haplotipe dan situs polimorfik sekuen D-loop DNA mitokondria Badak Sumatera

**Diversitas genetik**

Keragaman haplotipe (variasi genetik) dari D-loop DNA mitokondria merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur variasi genetik pada Badak Sumatera. Hasil kajian ini diharapkan dapat membantu mengambil keputusan yang tepat untuk konservasi populasi Badak Sumatera yang semakin sedikit. Hasil analisa tiga sekuen dan empat sekuen D-Loop DNA mitokondria dari *GenBank*, terdapat 4 tipe sekuen/haplotipe yaitu: haplotipe 1 berasal dari Pulau Sumatera dan haplotipe 2, 3, dan 4 berasal dari Pulau Kalimantan (Gambar 6). Jarak genetik antar individu pada penelitian ini berkisar 0,02-3,8% (2,54±1,4%). Jelas menunjukkan perbedaan haplotipe individu yang ada di Sumatera dan Kalimantan.

Berdasarkan hasil kajian yang berbasis sekuen fragmen D-loop DNA mitokondria sepanjang 218 pasang basa terhadap spesimen museum di Laos dan Myamar memiliki haplotipe yang berbeda dan konsisten ke dalam subspecies *D. s. lasiotis* yang distribusinya di daratan Asia Tenggara dan subspecies ini telah dinyatakan punah (Foose & Strien, 1997). Haplotipe di Kalimantan mendukung kekhasan subspecies *D. s. harrisoni*, sedangkan badak di Sumatra dan Semenanjung Malaysia berbagi haplotipe yang konsisten dengan penempatan tradisional mereka ke dalam satu subspecies tunggal *D. s. sumatrensis* (Brandt *et al.* 2018). Hal ini membuktikan individu haplotipe di Sumatera dan Kalimantan berbeda dan selaras dengan yang dilaporkan dalam penelitian ini.

Dalam kajian menggunakan 10 marker mikrosatelit (satu marker tidak teramplifikasi), dimana satu individu di Sumatera memiliki rata-rata alel setiap lokus adalah 1,22 dan dua

**Tabel 9.** Jarak genetik individu *D. sumatrensis* berbasis D-loop DNA mitokondria

Nama spesies	Jarak Genetik				
	1	2	3	4	5
<i>D. sumatrensis</i> (Sumatera)	0				
<i>D. sumatrensis</i> (Kutai Barat/Kalimantar	0.029				
<i>D. s. harrisoni</i> JQ281904.1	0.036	0.031			
<i>D. s. harrisoni</i> JQ281903	0.031	0.026	0.005		
<i>D. sumatrensis</i> FJ905816.1	0.002	0.031	0.038	0.034	
<i>D. sumatrensis</i> NC012684.1	0.002	0.031	0.038	0.034	0

individu di Kalimantan memiliki rata-rata alel 1,68. Sampel yang terbatas tentu hanya dapat memberi sedikit gambaran tentang heterozigositas alel dari Badak Sumatera di kedua pulau yang menjadi habitatnya. Laporan lebih jelas dilakukan terhadap lima individu Badak Sumatera menggunakan 10 marker mikrosatelit, yaitu jumlah rata-rata alel adalah 3,7 dengan rata-rata  $H_0$  (*observed heterozygosity*)  $0,522 \pm 0,081$  dan  $H_E$  (*expected heterozygosity*)  $0,551 \pm 0,067$  (Scott *et al.* 2004). Hal ini dapat dibandingkan dengan hasil penelitian yang telah dilakukan pada spesies badak lainnya dengan jumlah sampel yang lebih besar, yaitu pada badak hitam (*Diceros bicornis bicornis*)  $H_E = 0,551$  (Brown & Houlden) dan  $H_E = 0,500$  (Cunningham *et al.* 1999), badak India (*Rhinoceros unicornis*)  $H_E = 0,593$  (Zschokke *et al.* 2003), dan badak putih (*Ceratotherium simum simum*)  $H_E = 0,593$  (Florescu *et al.* 2003). Data tersebut menunjukkan heterozigositas semua populasi badak di dunia tidak berbeda. Selain itu hasil kajian menggunakan 18

lokus mikrosatelit, menunjukkan badak di Sumatera membentuk 2 sub-populasi, kemungkinan karena dipisahkan oleh pegunungan bukit barisan, meskipun hanya diferensiasi genetik sederhana di antara mereka. Populasi kecil Badak Sumatera yang tersisa maka memisahkan strategi pengelolaan untuk subspecies atau sub-populasi kemungkinan menjadi tidak layak, sementara setiap populasi badak yang tersisa cenderung mempertahankan alel yang tidak ditemukan pada individu lain (Brandt *et al.* 2018).

### KESIMPULAN

Hasil rekonfirmasi menunjukkan bahwa Badak Sumatera dari populasi di Sumatera dan Kalimantan masih dalam spesies yang sama berdasarkan analisis gen COI (Cytochrome c oxidase subunit I), Cytochrome b, dan 12SrRNA dengan jarak genetik berturut turut  $0,2 \pm 0,0\%$ ,  $0,8 \pm 0,4\%$ , dan  $0\%$ . Keragaman genetik berbasis D-loop DNA mitokondria terdapat diversitas haplotipe (Hd)  $0,8 \pm 0,172$ , diversitas nukleotida (Pi)  $0,02269$ . Nilai positif dari  $F_u$ 's  $F_s$  ( $2,523$ ) dan Tajima's test ( $0,69497$ ) mengindikasikan rendahnya diversitas genetik dan ekspansi populasi pada badak Sumatera. Rata-rata alel setiap lokus mikrosatelit adalah 1,22 (Sumatera) dan 1,68 (Kalimantan). Data hasil kajian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar pengambilan keputusan dalam kerangka usulan alternatif populasi Badak Sumatera dan Kalimantan dikelola dibawa satu unit konservasi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih pada BKSDA Kalimantan Timur yang telah menyerahkan material genetik Badak Sumatera ke Pusat Penelitian Biologi-LIPI dan teman teman WWF yang banyak membantu waktu melakukan kunjungan di habitat Badak Sumatera di Kabupaten Kutai Barat, Kalimantan Timur. Selain itu juga kami ucapkan terima kasih pada Rini teknisi Laboratorium Genetika Hewan Bidang Zoologi yang telah banyak membantu pekerjaan di Laboratorium.

**Tabel 10.** Polimorfik mikrosaelit pada Badak Sumatera dari Sumatera dan Kalimantan masing masing satu sampel.

Lokus	Motif Pengulangan	Alel	Alel Kutai	
		Sumatera (bp)	Barat 1 (bp)	Barat 2 (bp)
SR IIIA (CA)22		118	122	121
		118	124	123
SR IIIB (GT)22		171	151	106
		173	153	153
SR 54 (CA)26		183	189	189
		185	191	189
SR 63 (AC)19		199	201	199
		199	201	199
SR 71 (CA)21		118	104	103
		120	108	119
SR 74 (CA)19		174	172	171
		174	184	183
SR 191 (CA)21		199	207	197
		199	207	205
SR 261 (CA)22		180	178	177
		180	178	201
SR 275 (CA)25		X	X	x
		X	X	x
SR 281 (GT)23		217	223	222
		223	227	240

## DAFTAR PUSTAKA

- Amato, G., D. Wharton, Z.Z. Zainuddin & JR. Powel. 1995. Assessment of conservation units for the sumatran Sumatran Rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*); <https://doi.org/10.1002/zoo.1430140502>.
- Atmoko, T., BS. Sitepu, Mukhlisi, SJ. Kustini & R. Setiawan. 2016. *Jenis Tumbuhan Pakan Badak Sumatera (Dicerorhinus sumatrensis harrissoni) di Kalimantan*. Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Konservasi Sumber Daya Alam. Balikpapan, Kalimantan Timur.
- Avise, JC. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Borisenko, AV., BK. Lim, NV. Ivanova, RH. Hanner & PDN. Hebert. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: afield study in Suriname. *Molecular Ecology Resources* 8:471-479.
- Brandt, JR., PJ. van Coeverden de Groot, KE. Witt, PK. Engelbrektsson, KM. Helgen, RS. Malhi, OA. Ryder & AL. Roca. 2018. Genetic structure and diversity among historic and modern population of the Sumatran Rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Journal Heredity* 109(5): 553-565.
- Cai, YS., L. Zang, FJ. Shen, WP. Zang, R. Hou, BS. Yue, J. Li & ZH. Zhang. 2011. DNA barcoding of 18 species of Bovidae. *Chinese Science Bulletin*. DOI: 10.1007/s11434-010-4302-1 <https://www.researchgate.net/publication/22566813>.
- Clayton, DA. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705.
- Cracraft, J. & J. Feinstein. 2000. What is not a bird of paradise? Molecular and morphological evidence places *Macgregoria* in the Meliphagidae and the Cnemophilinae near the base of the corvid tree. *Proceeding Royal Society London*, 267, pp. 233–241.
- Cunningham, J., E. Harley, & C. O’Ryan. 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci in black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Electrophoresis* 20:1778–1780.
- Florescu, A., JA. Davila, C. Scott, P. Fernando, K. Kellner, JC. Morales, D. Melnick, PT. Boag & PJ. van Coeverden De Groot. 2003. Polymorphic microsatellites in white rhinoceros. *Molecular Ecology Notes* 3: 344–345.
- Frankham, R., JD. Ballou, DA. Briscoe. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Foose, TJ. & Strien van. N. (Editors). 1997. Asian Rhinos Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland, and Cambridge, UK. 112+v pp.
- Hebert, PDN., A. Cywinska, SL. Ball & JR. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences, Series B*. 270: 313–322.
- Hajibabaei M., DH. Janzen, JM. Burns, W. Hallwachs & PDN. Hebert. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings National Academy of Sciences*. USA. 103(4) 968-971.
- Ivanova, NV., JR. deWaard, PDN. Hebert. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Molecular ecology Notes*. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.0147x.
- Kocher, TD., WK. Thomas, A. Meyer, SV. Edwards, S. Paabo, Villablanca & AC. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primer. *Proceeding Natural Academy Sciences USA*. 86: 6196-6200.
- Li, JY., H. Chen, XY. Lan, XJ. Kong & LJ. Min. 2008. Genetic diversity of five Chinese goat breeds assessed by microsatellite marker. *Czech Journal Animal Sciences* 53(8):315-319).
- Messing, J. 1983. New M13 vector for cloning. *Methodes in Enzymology* 101:20-79
- Meijaard, E. 1996. The Sumatran rhinoceros in Kalimantan, Indonesia: its possible distribution and conservation prospects. *Pachyderm* 21: 15-23.
- Moritz, C., WJ. Worthington & L. Pope. 1996. Applications of genetics to the conservation and management of Australian fauna: four case studies from Queensland. In:

- Smith TB, Wayne RK (eds). *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press. Oxford. 442-456.
- Muto, A. & S. Ozawa. 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proceeding Natura Academy Sciences*. USA. 84: 116-119
- Ong, PS., AU. Luczon, JP. Quilang, AMT. Sumaya, JC. Ibanez, DJ. Salvador & IKC. Fontanilla. 2011. DNA barcode of Philippine accipitride. *Molecular Ecology Resources* 11: 245-254.
- Rozas, J., JC. Sánchez-DelBarrio, X. Messegyer & R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Scott C., T. Foose, JC. Morales, P. Fernando, DJ. Melnick, PT. Boag, JA. Davila & PJ. Van Coeverder De Groot. 2004. Optimization of novel polymorphic microsatellites in the endangered sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Molecular Ecology Notes* 4:194-196.
- Steiner, CC., ML. Houch & OA Ryder. 2018. Genetic variation of complete mitochondrial genome sequences of the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Conservation Genetic* 19:397-408.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Ward, RD., TS. Zemlak, BH. Innes, PR. Last & PDN. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Sciences*. 360:1847-1857.
- Zein, MSA. & YS. Fitriana. 2012. Teknik Molekuler untuk Identifikasi Spesies Ordo Cetartiodactyla Menggunakan Barcoding DNA. *Zoo Indonesia* 21(2):1-8.
- Zein, MSA. 2018. Barkoding DNA Burung Elang Famili Accipitridae di Indonesia. *Berita Biologi* 17(2):165-173.
- Zschokke S., B. Gautschi, B. Baur. 2003. Polymorphic microsatellite loci in the endangered Indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*. *Molecular Ecology Notes* 3(2): 233-235.

**Zein dkk.**