

## Pelacakan Molekuler terhadap Hasil Sitaan Karkas Trenggiling pada Perdagangan Ilegal di Indonesia Berbasis Gen Barkode (Molecular Tracking of Confiscated Carcasses of the Pangolin on Illegal Trade in Indonesia based on Barcode Genes)

Moch Syamsul Arifin Zein

Pusat Penelitian Biologi-LIPI. E-mail: zein\_genetic@yahoo.com

Memasukkan: Oktober 2019, Diterima: Maret 2020

### ABSTRACT

Illegal trade in pangolins are generally in the form of carcasses, flour, scales, embryos, blood and bones. Therefore, physical tracking and identification are difficult so molecular analysis is needed to identify the specimen precisely. Investigations in the illegal trade of wildlife have benefited greatly from the advancement of DNA forensic techniques. Here, I reconstructed phylogenetic trees from the neighbor-joining analyses based on the CO1 gene sequences from the confiscated carcasses of pangolins. The genetic distance matrix calculations with the Kimura Two-parameter model (K2P) were implemented in the pairwise distance calculation in the Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program version 6.05. I included total 77 sequences of pangolins from confiscated and 92 sequences from GenBank (*Manis javanica*, *Manis* sp., *Manis pentadactyla*, *Manis culionensis*, *Phataginus tricuspis*, *Phataginus tetradactyla*, *Smutsia temminckii*, and *Smutsia gigantea*). The results of phylogenetic analysis revealed two clades of Asia and Africa with a genetic distance of  $23.85 \pm 2.38\%$  and all pangolin haplotypes confiscated identified as a species of *Manis javanica*. The genetic distance between *Manis javanica* and *Manis culionensis* was  $3.9 \pm 0.89\%$ , which it was a sister clade and the farthest genetic distance between *Manis culionensis* and *Smutsia temminckii* was  $23.19 \pm 2.14\%$ . The phylogenetic tree shows the monophyletic clade of pangolins species in the world. Phylogenetic relationships between haplotypes from *Manis javanica* were confiscated separately into two subclades, namely subclade A1 (19 haplotypes) and A2 (12 haplotypes). The genetic distance in subclade A1 averaged were  $0.59 \pm 0.14\%$  and subclade A2 were  $1.01 \pm 0.24\%$ , whereas it was  $3.09 \pm 0.64\%$  between subclades A1 and A2. Total there were 31 haplotypes showing *Manis javanica* originating from a different habitat with a wide distribution.

**Keywords:** Illegal trade, pangolin, gene barcode

### ABSTRAK

Perdagangan ilegal trenggiling umumnya berupa karkas, tepung, sisik, embrio, darah, dan tulang. Oleh sebab itu, pelacakan dan identifikasi secara fisik menjadi sulit sehingga diperlukan analisis molekuler untuk ketepatan dalam identifikasi. Investigasi perdagangan ilegal hidupan liar banyak mendapat manfaat dari kemajuan teknik DNA forensik. Saya merekonstruksi pohon filogenetik dari analisis *neighbor-joining* berdasarkan gen CO1 dari karkas trenggiling hasil sitaan. Saya juga menghitung jarak genetik dengan model Kimura Two-parameter (K2P) yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 6,05. Total menggunakan 77 sekuen trenggiling hasil sitaan dan 92 sekuen dari *GenBank* (*Manis javanica*, *Manis pentadactyla*, *Manis culionensis*, *Phataginus tricuspis*, *Phataginus tetradactyla*, *Smutsia temminckii*, dan *Smutsia gigantea*). Hasil analisis filogenetik terdapat dua clade Asia dan Afrika dengan jarak genetik  $23,85 \pm 2,38\%$  dan semua haplotipe trenggiling hasil sitaan teridentifikasi sebagai spesies *Manis javanica*. Jarak genetik antara *Manis javanica* dan *Manis culionensis* adalah  $3,9 \pm 0,89\%$  yang merupakan *sister species* dan jarak genetik terjauh antara *Manis culionensis* dan *Smutsia temminckii* adalah  $23,19 \pm 2,14\%$ . Pohon filogenetik menunjukkan *clade* monofiletik spesies trenggiling di dunia. Hubungan filogenetik antar haplotipe dari *Manis javanica* hasil sitaan terpisah menjadi dua *subclade*, yaitu *subclade* A1 (19 haplotipe) dan A2 (12 haplotipe). Jarak genetik dalam *subclade* A1 rata-rata  $0,59 \pm 0,14\%$  dan *subclade* A2  $1,01 \pm 0,24\%$ , sedangkan jarak genetik antara *subclade* A1 dan A2 sangat tinggi yaitu  $3,09 \pm 0,64\%$ . Total terdapat 31 haplotipe menunjukkan *Manis javanica* berasal dari habitat yang berbeda dengan sebaran yang luas.

**Kata Kunci:** Perdagangan ilegal, trenggiling, gen barkode

### PENDAHULUAN

Kejahatan terhadap hidupan liar sangat sulit dilacak dan diawasi, karena tidak ada laporan dan data yang akurat. Oleh sebab itu, perdagangan ilegal menjadi ancaman besar bagi konservasi dan

keanekaragaman hayati. Eksploitasi hidupan liar yang dilakukan secara berlebihan akan mendorong banyak spesies ke tepi kepunahan. Selain itu, perdagangan ilegal satwa liar yang tidak berkelanjutan telah diidentifikasi sebagai salah satu tantangan utama bagi konservasi. Penurunan populasi

hidupan liar juga disebabkan oleh kerusakan habitat, perburuan, dan tingkat reproduksi yang lambat. Akibatnya berdampak terhadap jaringan rantai makanan dan keseimbangan ekologis. Oleh sebab itu, monitoring dan regulasi sangat penting untuk membatasi ruang gerak dari perdagangan ilegal yang terus berlanjut.

Trenggiling sebagai satwa liar yang paling banyak diperdagangkan, hampir semua bagian tubuhnya dimanfaatkan untuk makanan dan obat tradisional yang dilakukan secara ilegal. Indikasi data CITES diperkirakan jumlah trenggiling Asia yang diperdagangkan antara tahun 1977 dan 2011 berjumlah 576.303 trenggiling, dimana sebagian besar adalah *Manis javanica* (87%) dan *Manis pentadactyla* (11%). Negara asal trenggiling dari Kamboja (26%), Malaysia (23%), Thailand (16%), dan Indonesia (7%) (Challender *et al.* 2015). Saat ini, dua spesies trenggiling Asia menuju kepunahan karena sebagian besar didorong oleh permintaan dari China (Heinrich *et al.* 2016), sehingga populasi menurun hingga sekitar 80% selama 21 tahun terakhir (Challender *et al.* 2014). Oleh sebab itu perlu dilakukan larangan penggunaan trenggiling untuk obat tradisional China (Zhang *et al.* 2017). Penangkaran trenggiling yang dilakukan oleh banyak pihak juga belum banyak berhasil. Perdagangan trenggiling hasil penangkaran diduga kuat masih berasal dari habitat alam (Shepherd 2008). Oleh sebab itu perlu kajian mengenai permintaan, penyebab, dan dampak perdagangan trenggiling.

Secara taksonomi, trenggiling termasuk famili Manidae dan ordo Pholidota. Famili Manidae dibagi menjadi subfamili Maninae dan Smutsiinae, serta tiga genera yaitu *Manis* (Asia), *Smutsia* (Afrika), dan *Phataginus* (Afrika). Hasil kajian kladistik secara komprehensif berbasis 395 karakteristik osteologis tengkorak dan rangka postkranial menjadikan klasifikasi famili Manidae menjadi jelas (Gaudin *et al.* 2009). *Manis culionensis* (Filipina) telah diangkat ke tingkat spesies atas dasar perbedaan morfologi dengan *Manis javanica* (Gaubert & Antunes 2005), sehingga diketahui trenggiling saat ini terdapat delapan spesies, yaitu *Manis javanica*, *Manis culionensis*, *Manis pentadactyla*, dan *Manis crassicaudata* ada di Asia, sedangkan *Phataginus tetractyla*, *Phataginus tricuspis*, *Smutsia gigantea*, dan *Smutsia temminckii* merupakan spesies yang hidup di Afrika.

Di Indonesia terdapat satu spesies trenggiling,

yaitu *Manis javanica* Desmarest, 1822. Sebaran spesies ini meliputi wilayah luas mulai dari China Selatan, Birma, Thailand, Laos, Vietnam, Kamboja, semenanjung Malaysia hingga pulau Sumatera, Jawa, dan Kalimantan dari 0 dpl hingga 1700 meter dpl. Trenggiling dalam IUCN *Red List* termasuk kategori *critically endangered species* karena perburuan trenggiling termasuk tinggi dan dapat mengancam kepunahan. Konferensi para pihak pada Konvensi CITES di Johannesburg, Afrika Selatan, memperlakukan larangan pada perdagangan internasional semua trenggiling dan bagian-bagiannya pada tahun 2016. Trenggiling diperdagangkan secara ilegal umumnya berupa karkas beku, tepung, sisik, embrio, darah, dan tulang (Soewu & Ayodele 2009). Daging trenggiling berupa karkas beku umumnya untuk kebutuhan restoran dengan harga yang mahal (Soewu & Sodeinde 2015). Oleh sebab itu pelacakan dan identifikasi secara fisik menjadi sulit sehingga diperlukan analisis DNA molekuler.

Perkembangan teknologi molekuler saat ini telah meningkatkan efisiensi dan akurasi dalam studi karakterisasi genetik satwa. Sekuen mtDNA telah berhasil digunakan untuk menentukan keragaman genetik DNA mitokondria dan banyak digunakan dalam berbagai kasus forensik. Hal ini disebabkan karena memiliki karakteristik unik, yaitu memiliki tingkat mutasi dan salinan yang tinggi setiap sel (Parson *et al.* 1998). Sel DNA mitokondria terkandung sekitar  $10^3$ - $10^4$  salinan, sehingga pemulihan DNA mitokondria yang sedikit atau sudah mengalami degradasi lebih mudah daripada DNA inti. Investigasi perdagangan ilegal atau kejahatan terhadap satwa liar banyak mendapat manfaat dari perkembangan kemajuan teknik DNA (Ogden *et al.* 2009). Kemajuan terbaru dalam biologi molekuler dengan metode telah dikembangkan berdasarkan perbedaan genetik antar spesies (Nakamura *et al.* 2009). Saat ini gen COI telah digunakan sebagai standar barcode untuk semua spesies yang hidup di muka bumi (Ratnasingham & Hebert 2007) dan telah menunjukkan potensi besar dalam forensik margasatwa dengan primer universal siap pakai.

Seperti telah diketahui bahwa Cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) DNA mitokondria merupakan representasi dari *protein coding* pada DNA mitokondria dan sangat akurat sebagai alat identifikasi spesies hewan. Segmen dekat terminus 5' dari CO1 sepanjang sekitar 650 basa merupakan daerah yang digunakan sebagai barcode DNA

untuk fauna (Herbert *et al.* 2003). Efektifitas 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 divergensinya tinggi antara taksa yang berdekatan (*closely allied taxa*) (Ward *et al.* 2005; Hajbabaei *et al.* 2006a). Hassanin *et al.* (2015) melaporkan hasil kajian genetik berbasis genome DNA mitokondria dari spesies trenggiling secara lengkap. Selain itu kajian mitogenome dan DNA inti juga telah dilaporkan Gaubert *et al.* (2018). Hasil kajian DNA molekuler ini sangat penting dalam penegakan klasifikasi taksonomi dari ordo Pholidota. Selain itu juga dilaporkan pertama kali *Whole genome sequences* trenggiling dipublikasikan pada tahun 2016 (Choo *et al.* 2016).

Amplifikasi fragmen DNA dari gen COI menggunakan teknik yang telah dikembangkan Ivanova *et al.* (2006) dapat digunakan untuk mengidentifikasi berbagai spesies mamalia. Identifikasi spesies trenggiling dari spesimen ilegal di Hongkong telah menggunakan fragmen gen COI (Zhang *et al.* 2015). Identifikasi spesies dengan teknik molekuler ini dapat digunakan sebagai rujukan dalam usaha memantau perdagangan ilegal trenggiling dalam bentuk apapun.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Hasil penyitaan karkas trenggiling beku telah dilakukan di berbagai tempat di Indonesia. Sebanyak 72 sampel diambil secara acak dari berbagai tempat penyitaan yang dilakukan di berbagai tempat. Jumlah sampel, tempat penyitaan/koleksi, dan asal trenggiling yang dianalisis dapat dilihat seperti pada Tabel 1.

Analisis DNA yang dilakukan meliputi: ekstraksi DNA, pemeriksaan kuantitas dan kualitas DNA, *Polymerase Chain Reaction*, elektroforesis untuk visualisasi produk PCR, purifikasi produk PCR, sekuensing fragmen target, dan analisis data sekuen. Adapun uraian lengkap tentang metoda dapat dilihat dibawah ini.

Ekstraksi/isolasi DNA menggunakan Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Pengerjaan ekstraksi dilakukan sesuai dengan protokol yang telah disediakan. Validasi kuantitas dan kualitas DNA secara kuantitatif ditentukan konsentrasinya melalui spektrofotometri sinar ultra violet dengan meng-

gunakan alat spektrofotometer (Beckman DU 650, Made in USA).

Polymerase Chain Reaction dilakukan dengan menggunakan mesin *thermocycler GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). Amplifikasi fragmen DNA dari gen cytochrome c oxydase subunit I (COI) menggunakan teknik yang telah dikembangkan Ivanova *et al.* (2006). Design primer secara lengkap dapat dilihat pada *Canadian Centre for DNA Barcoding* ([www.dnabarcoding.ca/clareetal2006.php](http://www.dnabarcoding.ca/clareetal2006.php)), yaitu menggunakan empat pasang primer *forward* dan *reverse* masing-masing 10 pmol/ $\mu$ l. *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. Komponen yang terdapat dalam setiap tabung reaksi adalah sebagai berikut: 2,5 ml 10x bufer, 0,625ml (10 mM dNTP), 0,625 ml (10 pmol) *mix forward primer* dan 0,625 ml (10 pmol) *mix reverse primer*, 1 unit enzim taq DNA polymerase (*Fermentas, Native with BSA*), 0,5 ml BSA, 1 ml DNA total DNA dan H<sub>2</sub>O dengan total volume 25 (Clare *et al.* 2007).

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, *annealing* 55°C selama 40 detik, elongasi 72°C selama 1 menit, 35 siklus), elongasi akhir 72°C selama 10 menit. Analisis sekuen fragmen COI dilakukan

**Tabel 1.** Tempat penyitaan/koleksi, jumlah sampel dan asal trenggiling.

Tempat Penyitaan/dikoleksi	Jumlah	Asal
Kalimantan Timur	15	Kalimantan Timur
Sumatera Utara	5	Tidak diketahui
Pangkalan Bun	9	Tidak diketahui
Bengkulu	10	Bengkulu
Jakarta	10	Tidak diketahui
Pelabuhan Merak	9	Tidak diketahui
Kebun Binatang Surabaya	3	Tidak diketahui
Kebun Binatang Ragunan	3	Tidak diketahui
Sukabumi	3	Tidak diketahui
Sibolga	9	Sibolga
Banten	1	Tidak diketahui
Total	77	

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). Sekuen hasil PCR dilakukan dengan menggunakan jasa layanan sekuen DNA di 1<sup>st</sup>BASE Pte Ltd, Malaysia.

Analisis filogeni dilakukan terhadap 72 sekuen gen CO1 spesies trenggiling hasil sitaan dianalisis bersama dengan spesies dari famili Manidae dari Asia dan Afrika yang diambil dari data sekuen GenBank, yaitu *Manis javanica* (62 sekuen), *Manis* sp. (4 sekuen), *Manis culionensis* (1 sekuen), *Manis pendactyla* (5 sekuen), *Smutsia gigantea* (2 sekuen), *Smutsia temminckii* (1 sekuen), *Phataginus tricuspis* (9 sekuen), dan *Phataginus tetradactyla* (8 sekuen). Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan analisis *neighbor-joining* dengan perhitungan jarak genetik model Kimura Two-parameter (K2P). Diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program Mega (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 6.05 (Tamura *et al.* 2013). Ilustrasi diversitas haplotipe menggunakan analisis Network dengan program NETWORK versi 10.0 (BANDELT *et al.* 1999). Polimorfisme DNA meliputi diversitas haplotipe, distribusi haplotipe, diversitas nukleotida dilakukan menggunakan DnaSP versi 12.03 (Rozas *et al.* 2003).

**HASIL**

**Filogenetik Famili Manidae**

Rekonstruksi pohon filogenetik famili Manidae berbasis sekuen gen CO1 dari karkas trenggiling hasil sitaan sebanyak 77 sekuen dan 92 data sekuen dari GenBank (*Manis javanica*, *Manis* sp., *Manis pentadactyla*, *Manis culionensis*, *Phataginus tricuspis*, *Phataginus tetradactyla*, *Smutsia*

*temminckii*, dan *Smutsia gigantea*). Hasil rekonstruksi terbentuk dua *clade* trenggiling Asia dan Afrika dengan jarak genetik 23,85±2,38% (Gambar 1). Semua haplotipe trenggiling hasil sitaan secara jelas teridentifikasi sebagai spesies *Manis javanica*. Jarak genetik dalam spesies, yaitu *Manis javanica* 01,76±0,42%, *Manis culionensis* 0%, *Manis pendactyla* 0,85±0,32%, *Phataginus tricuspis* 02,98±0,61%, *Phataginus tetradactyla* 1,11±0,42%, *Smutsia temminckii* n/c, dan *Smutsia gigantea* 0,28±0,27%. Jarak genetik antar spesies terdekat adalah antara *Manis javanica* dan *Manis culionensis* (3,9±0,89%) yang merupakan *sister species* (Gambar 1) dan jarak genetik terjauh adalah antara *Manis culionensis* dan *Smutsia temminckii* (23,19±2,14%) dapat dilihat lebih lengkap pada Tabel 2, serta didukung nilai *bootstrap* 85-100% (Gambar 1).

Selain itu, berdasarkan hasil analisis filogenetik dari famili Manidae diketahui sekuen dari GenBank *Manis* sp (kode akses GenBank KU207440.1 dan KU207434.1 terdeteksi sebagai *Manis javanica* dan *Manis* sp (kode akses GenBank KU207431 dan KU207431) adalah *Manis culionensis* (Gambar 1).

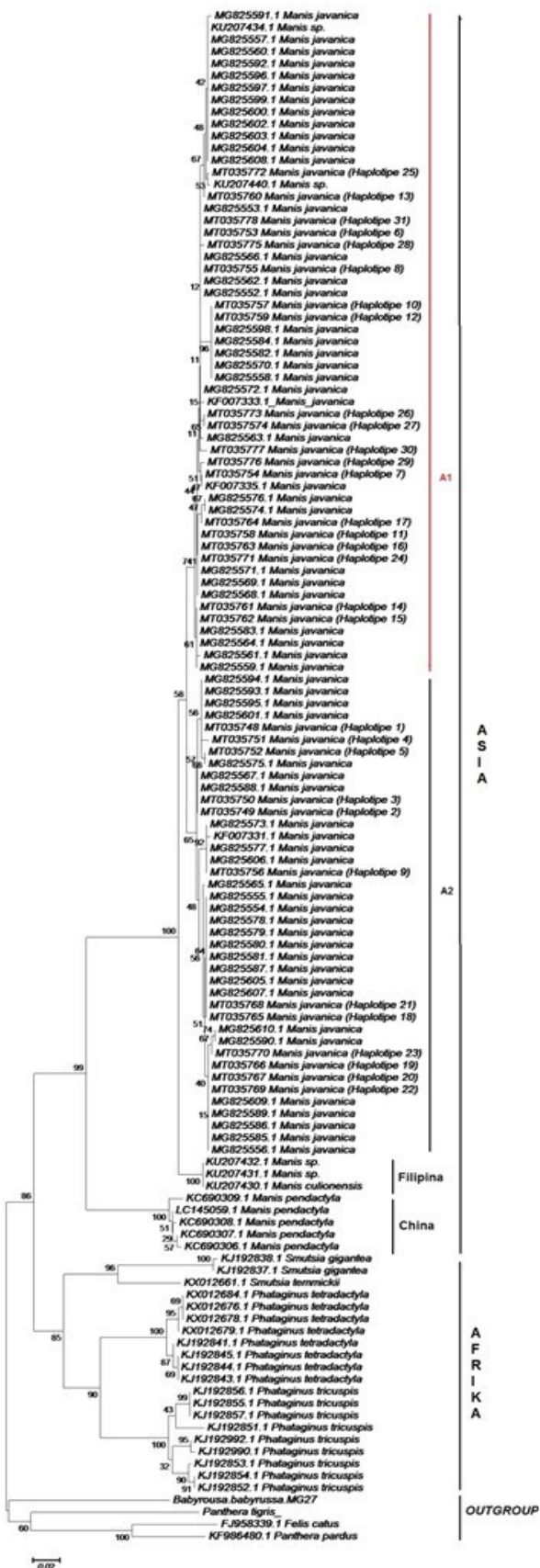
**Pohon Filogeni *Manis javanica***

Analisis filogenetik *Neighbor Joining* trenggiling (*Manis javanica*) hasil sitaan dari berbagai tempat di Indonesia menggunakan gen CO 1 dengan hasil filogenetik menunjukkan 31 haplotipe terpisah menjadi dua *subclade*, yaitu *subclade* A1 dan A2 (Gambar 2). *Subclade* A1 terdapat 19 haplotipe dari tempat penyitaan/koleksi sampel yang tidak diketahui asal habitatnya, yaitu di Sumatera Utara, Pangkalan Bun, Kebun Binatang Ragunan, Sukabumi, Banten, Kebun Binatang Surabaya, dan Pelabuhan Merak, serta trenggiling yang diketahui asalnya dari

**Tabel 2.** Jarak genetik antar spesies famili Manidae ordo Pholidota berbasis gen COI

Nama spesies	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Manis javanica</i>		0,0089	0,0253	0,0257	0,0205	0,0262	0,0269	0,0241
2 <i>Manis culionensis</i>	0,039		0,026	0,0268	0,0214	0,0273	0,0286	0,0241
3 <i>Phataginus tricuspis</i>	0,2416	0,2342		0,0182	0,0256	0,0234	0,0238	0,0218
4 <i>Phataginus tetradactyla</i>	0,231	0,234	0,1283		0,0264	0,0248	0,0227	0,0227
5 <i>Manis pentadactyla</i>	0,1529	0,158	0,2456	0,2321		0,0237	0,0278	0,0232
6 <i>Smutsia temminckii</i>	0,2319	0,2435	0,1946	0,1955	0,2015		0,0183	0,0232
7 <i>Smutsia gigantea</i>	0,2583	0,2615	0,1971	0,1743	0,2428	0,1185		0,0243
8 Outgroup	0,2864	0,2814	0,2734	0,2707	0,2594	0,2737	0,2798	

**Keterangan:** Di bawah diagonal jarak genetik, di atas diagonal SE



Gambar 1. Pohon Neighbor Joining memperlihatkan hubungan filogenetik antar spesies Trenggiling (clade Asia, dan Afrika) berbasis gen CO1.

habitat alam, yaitu dari Sibolga dan Bengkulu. *Subclade* A2 terdapat 12 haplotipe dari tempat penyitaan/koleksi yang tidak diketahui asal habitat alamnya, yaitu hasil sitaan di pelabuhan Merak, Pangkalan Bun, dan Jakarta, serta trenggiling yang diketahui asal habitat alamnya, yaitu dari Kalimantan Timur (Tabel 3). Jarak genetik dalam *subclade* A1 rata-rata  $0,59\pm 0,14$  dan *subclade* A2 rata-rata  $1,01\pm 0,24\%$ , sedangkan jarak antar *subclade* A1 dan A2 adalah  $3,09\pm 0,64\%$  dengan nilai bootstrap *subclade* A1 terhadap A2 adalah 99% (Gambar 2). Ilustrasi menggunakan analisis Network semakin memperjelas diversitas haplotipe *subclade* A1 dan A2, dapat dilihat pada Gambar 3.

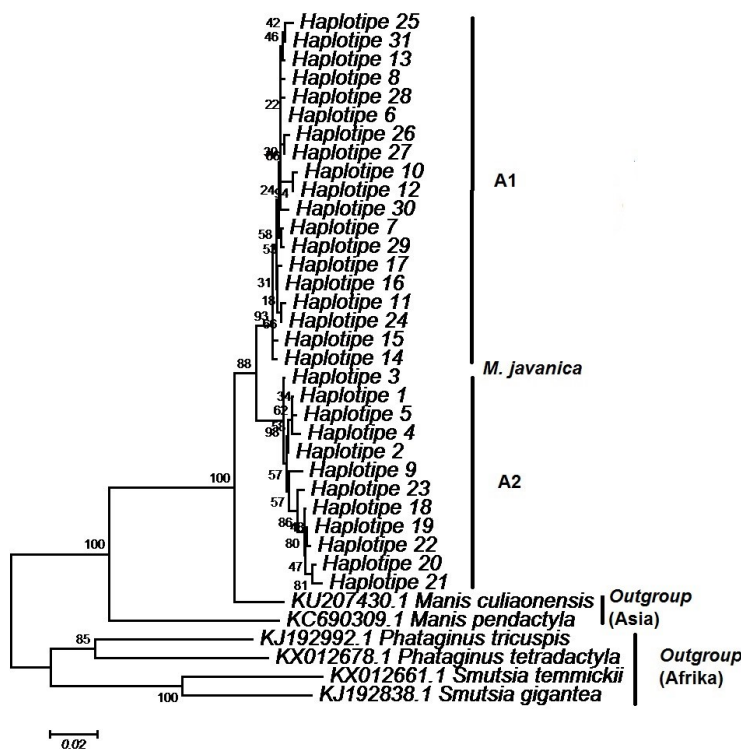
Analisis filogenetik Neighbor Joining Trenggiling (*Manis javanica*) dengan menggunakan mini barkode berbasis gen cytochrome b (400bp) menggunakan primer L14724 dan H15149 (Linacre & Chun 2005) untuk melihat hubungan filogenetik antar spesies trenggiling. Hasil analisis filogenetik ini menunjukkan bahwa haplotipe trenggiling hasil sitaan terpisah menjadi menjadi dua *clade* seperti menggunakan standar barkode CO1. Namun pada spesies Asia, yaitu *Manis javanica*, *Manis culionensis*, dan *Manis pentadactyla* menyatu dalam satu *clade* (Gambar 4). Berarti primer ini tidak bisa membentuk cluster yang terpisah diantara spesies trenggiling Asia yang mempunyai jarak genetik relatif lebih dekat.

## PEMBAHASAN

### Filogeni Famili Manidae

Jarak genetik famili Manidae berbasis sekuen gen CO1 dari karkas trenggiling hasil sitaan dan data GenBank, terlihat bahwa jarak genetik dalam spesies trenggiling tertinggi, yaitu *Phataginus tricuspis* adalah  $2,98\pm 0,61\%$  dan *Manis javanica*  $1,76\pm 0,42\%$ . Jarak genetik dalam spesies rendah dibawa 1%, yaitu *Manis culionensis* 0%, *Manis pendactyla*  $0,78\pm 0,24\%$ , *Phataginus tetradactyla*  $1,03\pm 0,30\%$ , *Smutsia temminckii* n/c, dan *Smutsia gigantea*  $0,85\pm 0,32\%$ . Secara umum jarak genetik dalam famili Manidae berkisar antara 0% sampai  $2,98\pm 0,61\%$ , dengan didukung nilai bootstrap 85-100%.

Hasil kajian jarak genetik dalam spesies pada mamalia pada umumnya menunjukkan pada kisaran yang tidak jauh berbeda, yaitu pada famili Bovidae dan Suidae berkisar 0,0-1,92% dengan rata-rata 0,24% (Mitchell *et al.* 2010), famili Bovidae di China rata-



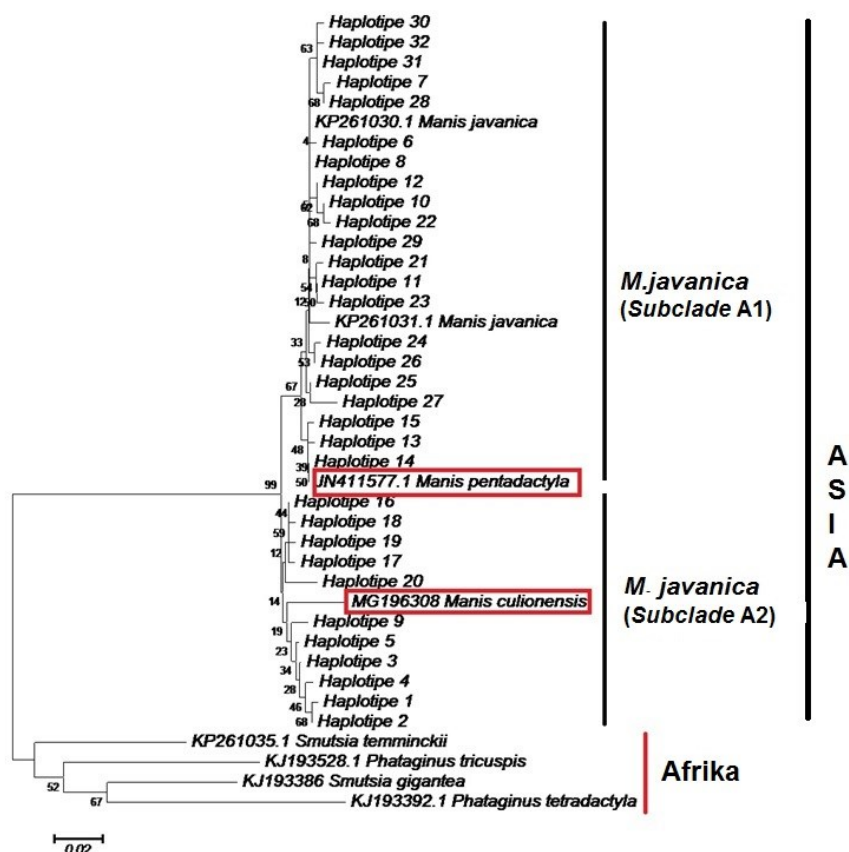
**Gambar 2.** Pohon *neighbor-joining* berbasis gen CO1(standar barkode) memperlihatkan hubungan filogenetik antar haplotipe *Manis javanica* (subclade A1 & A2).

**Tabel 3.** Distribusi *subclade* dan haplotipe *Manis javanica* berbasis gen COI berdasarkan tempat penyitaan/koleksi sampel dan asal

SC Haplotipe	Jumlah (%)	Tempat Penyitaan/koleksi	Asal	SC Haplotipe	Jumlah (%)	Tempat Penyitaan/koleksi	Asal		
A1	6	11(35,48)	Sumatera Utara	?	A1	25	1(3,22)	Kebun Binatang Surabaya	?
			Ragunan	?	A1	26	2(6,45)	Kebun Binatang Ragunan	?
			Sukabumi	?	A1	27	1(3,22)	Sukabumi	?
			Sibolga	Sibolga	A1	28	1(3,22)	Sibolga	Sibolga
			Pangkalan Bun	?	A1	29	2(6,45)	Sibolga	Sibolga
A1	7	3(9,67)	Banten	?	A1	30	1(3,22)	Sibolga	Sibolga
			Medan	?	A1	31	1(3,22)	Sibolga	Sibolga
A1	8	1(3,22)	Sibolga	Sibolga	A2	1	6(19,35)	Kalimantan Timur	Kalimantan Timur
			Sumatera Utara	?				Surabaya	?
A1	10	1(3,22)	Pangkalan Bun	?	A2	2	5(16,13)	Kalimantan Timur	Kalimantan Timur
			Pelabuhan Merak	?				Pelabuhan Merak	?
A1	11	2(6,45)	Pangkalan Bun	?	A2	3	1(3,22)	Kalimantan Timur	Kalimantan Timur
			Pelabuhan Merak	?	A2	4	1(3,22)	Kalimantan Timur	Kalimantan Timur
A1	12	3(9,67)	Pangkalan Bun	?	A2	5	4(12,90)	Kalimantan Timur	Kalimantan Timur
			Pelabuhan Merak	?	A2	9	2(6,45)	Pangkalan Bun	?
A1	13	4(12,90)	Pangkalan Bun	?	A2	18	5(16,13)	Jakarta	?
			Pelabuhan Merak	?	A2	19	2(6,45)	Jakarta	?
A1	14	1(3,22)	Bengkulu	Bengkulu	A2	20	1(3,22)	Jakarta	?
A1	15	3(9,67)	Bengkulu	Bengkulu	A2	21	1(3,22)	Jakarta	?
A1	16	4(12,90)	Bengkulu	Bengkulu	A2	22	1(3,22)	Jakarta	?
A1	17	2(6,45)	Bengkulu	Bengkulu	A2	23	3(9,68)	Jakarta	?
A1	24	2(6,45)	Pelabuhan Merak	?					

**Keterangan:** SC= subclade, ?= tidak diketahui





**Gambar 4.** Pohon *neighbor-joining* berbasis mini barkode gen cytochrome b (400bp) memperlihatkan posisi spesies *Manis pentadactyla* bergabung dengan *Manis javanica* (Subclade A1) dan posisi *Manis culionensis* bergabung dengan *Manis javanica* (Subclade A2), sehingga semua spesies Asia bergabung dalam satu *clade*.

Selain itu, analisis forensik hidupan liar telah tersedia primer universal siap pakai (Dawnay *et al.* 2007; Eaton *et al.* 2010). Penelitian sebelumnya menunjukkan identifikasi spesies dengan aplikasi forensik DNA sudah dilakukan terhadap cula badak (Hsieh *et al.* 2003), gading (Ishida *et al.* 2013), daging satwa liar (Gaubert *et al.* 2015), dan sisik pangolin yang disita (Hsieh *et al.* 2011).

Selain itu, hasil analisis filogenetik dari famili Manidae ini diketahui bahwa sekuen dari *GenBank* *Manis* sp (kode akses *GenBank* KU207440.1 dan KU207434.1) terdeteksi sebagai *Manis javanica* dan *Manis* sp (kode akses *GenBank* KU207431 dan KU207431) terdeteksi sebagai *Manis culionensis* (Gambar 1). Hasil ini telah memperjelas status spesies dari data *GenBank* pada kode akses seperti yang disebutkan di atas.

#### Pohon Filogeni *Manis javanica*

Investigasi hasil analisis filogenetik *Neighbor Joining* trenggiling (*Manis javanica*)

hasil sitaan berbasis gen COI memperlihatkan hubungan filogenetik antar haplotipe terpisah menjadi dua *subclade*, yaitu *subclade* A1 dan A2 (Gambar 2). *Subclade* A1 terdapat 19 haplotipe yang berasal dari tempat penyitaan atau koleksi sampel yang tidak diketahui asalnya, yaitu di Sumatera Utara, Kalimantan Tengah, Kebun Binatang Ragunan, Sukabumi, Banten, dan Pelabuhan Merak, serta trenggiling yang diketahui asal dari habitat alam, yaitu dari Sibolga dan Bengkulu, sedangkan *subclade* A2 terdapat 12 haplotipe yang dikoleksi dari Kebun Binatang Surabaya dan Jakarta (tidak diketahui asalnya), serta trenggiling yang diketahui berasal dari habitat alam yaitu dari Kalimantan Timur.

Hasil ini menunjukkan adanya indikasi sampel yang berada dari dari habitat alam, yaitu dari Sibolga dan Bengkulu menyatu di *subclade* A1 dan yang berasal dari habitat alam di Kalimantan Timur berada di *subclade* A2. *Manis javanica* *subclade* A1 (rata-rata 0,59±0,14%) dan



*subclade* A2 (rata-rata 1,01%), namun jarak genetik antar *subclade* A1 dan A2 tinggi, yaitu  $3,09 \pm 0,64\%$ . Hal ini dampak dari daerah sebaran yang luar di pulau Sumatera dan Kalimantan dengan adanya bentang alam (*natural barrier*) yang memisahkan dua populasi, sehingga membentuk dua *subclade* yang mempunyai jarak genetik tinggi. Namun demikian masih terlalu dini untuk dapat disimpulkan bahwa distribusi asal trenggiling dapat diidentifikasi berbasis gen CO1. Hal ini disebabkan banyak sampel yang digunakan pada kajian ini tidak diketahui asal (*origin*) dari trenggiling yang disita. Seperti yang dikatakan Hebert *et al.* (2003) bahwa spesies atau bahkan populasi dapat dibedakan oleh substitusi nukleotida fragmen urutan DNA seperti gen cytochrom c oksidase subunit 1 (COI).

Identifikasi trenggiling hasil perdagangan ilegal di Hongkong juga telah dilakukan berbasis gen CO1 dengan menggunakan sebanyak 239 sampel untuk mengetahui spesies, haplotipe, dan asal geografis. Hasil identifikasi dari analisis filogenetik ternyata juga menghasilkan dua *subclade* B1 dan B2 dan satu *sister clade* dari spesies *Manis javanica* dengan jarak genetik 8,7%. *Sister clade* *Manis javanica* tersebut tidak teridentifikasi spesiesnya (Zhang *et al.* 2015). Pada penelitian ini *sister clade* dari *Manis javanica* dapat teridentifikasi sebagai *Manis culionensis* yang sebarannya di Filipina (Gambar 2), dengan demikian penelitian ini telah membantu mengisi kesenjangan dalam basis data referensi untuk kelompok famili Manidae, ordo Pholidota dan menunjukkan penggunaan informasi genetik untuk membantu dalam konservasi dan pemantauan perdagangan ilegal. Penegakan hukum dan penguatan kebijakan secara teratur akan dapat membantu pihak berwenang memerangi perdagangan ilegal trenggiling dengan melengkapi bukti ilmiah yang kuat untuk memastikan bahwa hukum ditegakkan secara adil dan transparan serta membuat jerah para pelakunya.

## KESIMPULAN

DNA forensik berbasis gen CO1 merupakan alat yang kuat untuk investigasi kejahatan pada hidupan liar dan perdagangan ilegal dalam

identifikasi spesies dalam bentuk fisik berupa apapun yang merupakan bagian dari tubuh fauna.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih pada pada semua rekan rekan di Laboratorium Genetika Hewan, Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi atas semua kerjasama dan saling membantu dalam melaksanakan penelitian ini yang mendapat pendanaan dari Puslit. Biologi-LIPI.

## DAFTAR PUSTAKA

- Avise, JC. & CF. Aquadro. 1982. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates. *Evolution Biology* 15: 151–184.
- Bandelt, HJ., P. Forster & A. Rohlf. 1999. Medianjoining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-38.
- Borisenko, AV., BK. Lim, NV. Ivanova, RH. Hanner, & PDN. Herbert. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: A field study in Suriname. *molecular Ecology Resources* 8(3):471-479.
- 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>.
- Challender, DWS., SR. Harrop, & DC. MacMillan. 2015. Understanding markets to conserve trade-threatened species in CITES. *Biological Conservation* 187:249-259.
- Challender, DWS., TN. Van, C. Shepherd, K. Krishnasamy, A. Wang, B. Lee, E. Panjang, L. Fletcher, S. Heng, SH. Ming, J. Olsson, AN. The Truong, A. Nguyen, Q. Van & Y. Chung. 2014. *Manis javanica*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2014: e.T12763A45222303. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014.2.RLTS.T12763A45222303.en>. Downloaded on 29 April 2019.
- Choo, SW., M. Rayko, TK Tan, R. Hari, A. Komissarov, WY. Wee, AA. Yurchenko, S.

- Kliver, G. Tamazian, A. Antunes, RK. Wilson, WC. Warren, KP. Koepfli, P. Minx, K. Krasheninnikova, A. Kotze, DL. Dalton, E. Vermaak, IC. Paterson, P. Dobrynin, FT. Sitam, JJ. Rovie-Ryan, WE. Johnson, AM. Yusoff, SJ. Luo, KV. Karuppanan, G Fang, D. Zheng, MB. Gerstein, L. Lipovich, SJ. O'Brien & GJ. Wong. 2016. Pangolin genomes and the evolution of mammalian scales and immunity. *Genome Research* 26: 1312–1322.
- Clare, EL., BK. LIM, MD. Engstrom, JL. Eger, & PDN. Hebert 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7: 184–190.
- Dawnay, N., R. Ogden, R. McEwing, GR. Carvalho, & RS. Thorpe. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic science international* 173(1):1-6. DOI:10.1016/j.forsciint.2006.09.013.
- Eaton, MJ., Meyers, GL., Kolokotronis, S.O., Leslie, M.S., Martin, A.P., Amato, & G. 2010. Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetic* 11:1389–1404.
- Gaubert, P., & A. Antunes. 2015. What's behind these scales? Comments to "The complete mitochondrial genome of Temminck's ground pangolin (*Smutsia temminckii*; Smuts, 1832) and phylogenetic position of the Pholidota (Weber, 1904). *Gene* 563: 06-108.
- Gaubert, P., A. Antunes, H. Meng, L. Miao, S. Peigne, F. Justy, F Njiokou, S. Dufour, E. Danquah, J. Alahakoon, E. Verheyen, WT. Stanley, SJ. O'Brien, WE. Johnson, & SJ. Luo. 2018. The complete phylogeny of pangolin: Scaling up resources for the molecular tracing of the most trafficked mammals on earth. *Journal of Heredity* 109(4): 347-359.
- Gaubert, P., G Ades, & GA. Fischer. 2015. Molecular tracing of confiscated pangolin scales for conservation and illegal trade monitoring in Southeast Asia. *Global Ecology and Conservation* 4: 414–422.
- Gaudin, TJ., RJ. Emry & JR. Wible. 2009. The phylogeny of living and extinct pangolins (Mammalia, Pholidota) and associated taxa: a morphology base analysis. *Journal of Mammalian Evolution* 16:235-305.
- Hassanin A., JP. Hugot, & BJ van Vuuren. 2015. Comparison of mitochondrial genome sequences of pangolins (Mammalia, Pholidota). *Comptes Rendus Biologies* 338: 260-265.
- Hebert, PDN., A. Cywinska, SL. Ball & JR. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society London* 270:313–321.
- Heinrich S., TA. Wittmann, TAA. Prowse, JV. Ross, S. Delean, CR. Shepherd, & P. Cassey. 2016. Where did all the pangolins go? International CITES trade in pangolin species. *Global Ecology and Conservation* 8:241–253.
- Hsieh, HM., LH. Huang, LC Tsai. YC. Kuo. HH. Meng. A. Linacre, & JCI. Lee. 2003. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. *Forensic Science International* 136:1-11.
- Hsieh, HM., JC. Lee, JH. Wu, CA. Chen, YJ. Chen, GB. Wang, SC. Chin, LC. Wang, A. Linacre, & LC. Tsai. 2011. Establishing the pangolin mitochondrial D-loop sequences from the confiscated scales. *Forensic Science International Genetic* 5: 303-307.
- Ishida, Y., NJ. Georgiadis, T. Hondo, & AL. Roca. 2013. Triangulating the provenance of African elephants using mitochondrial DNA. *Evolutionary Application* 6: 253-265.
- Ivanova, NV., JR. deWaard, & PDN. Herbert. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Molecular ecology Notes*. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.0147x.
- Linacre, A. & J. Chun. 2005. Species Determination: the Role and Use of the Cytochrome. *Methodes in Molecular Biology* 297:45-52.
- Messing, J. 1983. New M13 vector for cloning. *Methodes in Enzymology* 101: 20-79.
- Mitchell, JE., LM. Greta, OK. Sergion, SL. Matthew, PM. Andrew & A. George. 2010. Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetic* 11:1389-1404.
- Nakamura, H., T. Muro, S. Imamura, & I. Yuasa. 2009. Forensic species identification based on size variation of mitochondrial

- DNA hypervariable regions. *International Journal Legal Medicine* 123:177-184.
- Ogden, R., N. Dawnay, & R. McEwing. 2009. Wildlife DNA forensics - bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research* 9:179-195.
- Parson, W., T.J. Parsons, R. Scheithauer, & MM. Holland. 1998. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA D-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *International of Journal Legal Medicine* 111:124-32.
- Ratnasingham, S. & PDN. Hebert. 2007. The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7:355-364.
- Rozas, J., J.C. Sanchez-Delbarrio, X. Messegyer & R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses bycoalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Shepherd, CR. 2008. Overview of pangolin trade in Southeast Asia. In: Pantel, S., SY. Chin (Eds.): Proceedings of the Workshop on Trade and Conservation of Pangolins Native to South and Southeast Asia. Singapore Zoo. pp. 6-9.
- Soewu, DA. & OA. Sodeinde. 2015. Utilization of pangolins in Africa: Fuelling factors, diversity of uses and sustainability. *International Journal of Biodiversity and Conservation* 7(1):1-10.
- Soewu, DA & IA. Ayodele. 2009. Utilisation of Pangolin (*Manis* sp) in traditional Yorubic medicine in Ijebu province, Ogun State, Nigeria. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 5(39):1-11.
- 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. Zemplak, BH. Innes, PR. Last, & PDN. Hebert. 2005. Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science* 360:1847-1857.
- Wible. JR. 2009. The Phylogeny of Living and Extinct Pangolins (Mammalia, Pholidota) and Associated Taxa: A Morphology Based Analysis. *Journal Mammal Evolution* 16: 235-305.
- Zhang, M., A. Gouveia, T. Qin, R. Quan, & V. Nijman. 2017. Illegal pangolin trade in northernmost Myanmar and its links to India and China. *Global Ecology and Conservation* 10:23-31.
- Zhang, H., MP. Miller, F. Yang, HK. Chan, P. Gaubert, G. Ades, & GA. Fischer. 2015. Molecular tracing of confiscated pangolin scales for conservation and illegal trade monitoring in Southeast Asia. *Global Ecology and Conservation* 4: 414-422.
- Zein, MSA. & YS. Fitriana. 2013. Teknik Molekuler untuk Identifikasi Spesies Ordo Cetartiodactyla. *Zoo Indonesia* 21 (2): 1-8.

