

TEKNIK MOLEKULER UNTUK IDENTIFIKASI SPESIES ORDO CETARTIODACTYLA MENGGUNAKAN DNA BARCODE

Moch. Syamsul Arifin Zein dan Yuli Sulistya Fitriana

Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Gedung Widyasatwaloka, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong 16911
e-mail: zein_genetic@yahoo.com

ABSTRAK

Zein, M.S.A & Y.S. Fitriana. 2012. Teknik molekuler untuk identifikasi spesies ordo Cetartiodactyla menggunakan DNA barcode. Zoo Indonesia 21(2), 1-8. Di Indonesia banyak terjadi kasus produk makanan yang berasal dari ternak tidak jelas identitasnya. Sebagian besar kasus yang terjadi berasal dari ordo Cetartiodactyla yang banyak dikonsumsi sebagai sumber protein hewani. Oleh sebab itu diperlukan alat identifikasi spesies yang akurat dari organ tubuh/daging atau produk olahan yang berasal dari hewan tersebut untuk menyelesaikan berbagai kasus yang dapat merugikan konsumen. Keragaman urutan sekuen gen sub unit cytochrome c oxidase subunit I (COI) telah terbukti menjadi alat yang efektif untuk identifikasi spesies hewan. Studi ini menganalisis 112 spesimen terdiri dari 4 Famili, 10 Genus dan 15 spesies dari ordo Cetartiodactyla yang dikumpulkan dari berbagai lokasi di Indonesia. Hasil yang didapat dari studi ini menunjukkan bahwa gen ini sangat cocok untuk mengidentifikasi tingkat spesies pada hewan tercermin pada pohon filogeni yang terbentuk. Jarak genetik dalam spesies berkisar antara 0-0,7% (rata-rata $0,13 \pm 0,05\%$) dan antar spesies berkisar antara 2-28%, dalam genus berkisar antara 8,8-27,4% (rata-rata $1,36 \pm 0,037\%$) dan antar genus berkisar antara 8,8-27,4%, sedangkan dalam famili berkisar antara 5,8-11,9% (rata-rata $7,8 \pm 2,85\%$) dan antar famili berkisar antara 18,6-26,3%. Hasil konstruksi pohon filogeni Cetartiodactyla menunjukkan semua spesies membentuk sebuah cluster kohesif yang jelas berbeda.

Kata kunci: *Cetartiodactyla*, COI, alat identifikasi

ABSTRACT

Zein, M.S.A & Y.S. Fitriana. 2012. Molecular techniques for species identification of Cetartiodactyla order using DNA barcode. Zoo Indonesia 21(2), 1-8. In Indonesia, many illegal cases derived from animal products of order Cetartiodactyla were widely consumed as a source of animal protein and not clearly identifiable. Therefore an accurate tool for species identification was required to solve the various cases that can harm consumers. Sequences diversity in the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene has been shown to be an effective tool for species identification in various species of Cetartiodactyla order. 112 specimens of Cetartiodactyla order collected from various locations in Indonesia, representing 15 species, 10 genera and 4 families were evaluated in this study. The results of this study suggest that this gene is highly suitable for identifying at species level in animals and it was reflected by the phylogeny tree. Genetic distance within species ranged from 0% to 0.7% (average $0.13 \pm 0.05\%$) and between species ranged from 2% to 28%, within genera ranged from 8.8% to 27.4% (average $1.36 \pm 0.037\%$) and between genera ranged from 8.8% to 27.4%, while within family ranged from 5.8% to 11.9% (average $7.8 \pm 2.85\%$) and between families ranged from 18.6% to 26.3%. Phylogeny tree construction of the order Cetartiodactyla indicated that all species formed a cohesive and divergent clusters.

Keywords: *Cetartiodactyla*, COI, tool identification

PENDAHULUAN

Ordo Cetartiodactyla merupakan mamalia besar dan mempunyai daerah sebaran luas. Saat ini di dunia terdapat 10 famili yang terdiri dari 220 spesies anggota ordo Cetartiodactyla. Selain itu, banyak spesies dari ordo Cetartiodactyla sukses

mengalami domestikasi menjadi ternak dan sumber protein utama bagi kebutuhan manusia. Sumber daya hayati Indonesia dari ordo Cetartiodactyla terdiri atas 4 famili, yaitu Suidae, Tragulidae, Cervidae dan Bovidae. Famili Suidae memiliki anggota 10 spesies yaitu babirusa buru (*Babyrousa babyrussa*), babirusa

sulawesi (*Babyrousa celebensis*), babirusa togian (*Babyrousa togeanensis*), babirusa bola batu (*Babyrousa bolabatuensis*), babi nangui (*Sus barbatus*), babi vavu (*Sus celebensis*), babi flores (*Sus heureni*), babi celeng (*Sus scrofa*), babi timor (*Sus timorensis*), dan babi bagong (*Sus verrucosus*) (Suyanto *et al.* 2002; Wilson & Reeder 2005). Famili ini umumnya masih hidup liar dan hanya satu yang sudah dibudidayakan, yaitu babi celeng (*Sus scrofa*). Famili Tragulidae terdiri atas 3 spesies, yaitu pelanduk jawa (*Tragulus javanicus*), pelanduk kancil (*Tragulus kanchil*) dan pelanduk napu (*Tragulus napu*), ketiganya masih hidup liar di habitat alam. Enam jenis anggota famili Cervidae semuanya masih hidup liar, yaitu rusa bawean (*Axis kuhlii*), rusa timor (*Rusa timorensis*), rusa sambar (*Rusa unicolor*), kijang muncak (*Muntiacus muntjak*), kijang sumatera (*Muntiacus montanus*), dan kijang kuning (*Muntiacus atherodes*) (Suyanto *et al.* 2002; Wilson & Reeder 2005). Famili Bovidae sebagian besar sudah menjadi hewan ternak dan menjadi sumber protein penting bagi manusia yaitu sapi (*Bos taurus* dan *Bos indicus*), kambing (*Capra hircus*), domba (*Ovis aries*), dan kerbau (*Bubalus bubalis*), sedangkan anoa (*Bubalus depressicornis* dan *Bubalus quarlesi*) serta banteng (*Bos javanicus*) masih hidup liar di daerah konservasi, sedangkan sapi bali yang merupakan hasil domestikasi banteng telah menjadi komoditas ternak penting sebagai penghasil daging.

Di Indonesia banyak terjadi kasus daging/ produk olahan asal hewan yang tidak jelas identitasnya beredar di berbagai pasar tradisional, seperti daging celeng, dendeng, dan bakso. Di tempat tertentu produk olahan berasal dari daging hidupan liar juga sering dijumpai. Selain itu, pemalsuan produk olahan asal ternak juga sering terjadi dan membuat keresahan masyarakat. Oleh sebab itu dalam rangka penegakkan hukum diperlukan alat identifikasi spesies yang akurat

dengan *DNA barcode*.

DNA barcoding merupakan teknik mengkarakterisasi dan mengidentifikasi spesies menggunakan sekuen DNA yang disebut *DNA barcode*. Gen cytochrome c oxidase subunit I (COI) adalah protein coding pada DNA mitokondria dan telah banyak digunakan sebagai alat identifikasi spesies hewan. Segmen dekat ujung 5' dari COI sepanjang sekitar 650 basa merupakan daerah yang banyak digunakan sebagai *DNA barcode* untuk fauna (Herbert *et al.* 2003). Efektifitas COI telah divalidasi untuk bermacam kelompok fauna dan sebagian besar jenis fauna yang diteliti bisa dibedakan menggunakan *DNA barcode*. Efektifitas ini disebabkan oleh variasi intraspesifik rendah, tetapi variasi interspesifiknya tinggi terutama pada taksa yang berdekatan (Ward *et al.* 2005; Hajbabaie *et al.* 2006).

Karakterisasi molekuler pada penelitian ini merupakan langkah awal membentuk *DNA barcode* spesies yang termasuk ordo Cetartiodactyla yang ada di Indonesia. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai alat identifikasi organ/bahan olahan yang berasal dari hewan dalam rangka monitoring, penegakkan hukum, dan klarifikasi spesies untuk keperluan kasus tertentu, serta memberi rasa aman pada konsumen terhadap kebenaran dari suatu produk berasal dari hewan/ternak.

METODE PENELITIAN

Material DNA

Penelitian ini menggunakan koleksi darah/jaringan yang tersimpan di Bank DNA Laboratorium Genetika Molekuler, Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Material DNA dikoleksi dari berbagai tempat di Indonesia terdiri atas 2 spesies anggota famili Suidae (*Babyrousa babyrussa* dan *Sus scrofa*), 2 spesies anggota famili Tragulidae (*Tragulus javanicus* dan *Tragulus napu*), 4 spesies anggota famili Cervidae (*Axis kuhlii*, *Rusa unicolor*,

Rusa timorensis dan *Muntiacus muntjak*), dan 7 spesies anggota famili Bovidae terdiri dari *Bos javanicus* (banteng dan sapi bali), *Bos indicus*, *Bos taurus*, *Bubalus depressicornis*, *Bubalus bubalis*, *Ovis aries* (domba garut, batur, ekor tipis, ekor gemuk), dan *Capra hircus* (kambing kacang, kosta, jawarandu, peranakan etawa, dan gembrong). Total 112 sekuen digunakan dalam analisis ini termasuk 17 sekuen dari *GenBank*.

Preparasi DNA, PCR, dan sekuen

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti standar prosedur dari Sambrook *et al.* (1989), yaitu menggunakan teknik phenol chloroform. Amplifikasi fragmen gen COI menggunakan teknik yang telah dikembangkan Ivanova *et al.* (2006), yaitu menggunakan empat pasang primer forward dan reverse, yaitu cocktail forward primer masing-masing 10 pmol/ul yaitu LepF1-tl (5"TGTAACGACGCGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG3"); VF1-tl (5"TGTAACGACGCGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG3"); VF1d-tl (5"TGTAACGACGCGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG3"); dan VFli-tl (5"TGTAACGACGCGGCCAGTTCTCAACCAACCAAGAATGG3") dengan perbandingan 1:1:1:3, demikian juga pada cocktail reverse primer yang terdiri dari LepR1-tl (CAGGAAACAGCTATGCTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA3"); VR1-tl (5"CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA3"); VR1d-tl(5"CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3"); dan Vrli-tl(5"CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAACA3").

Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan *Thermal Cycler Applied Biosystems Type 2700* dengan volume sebanyak 25 ml yang berisi 100 ng/ml DNA total, 2 ml 2,5 mM dNTP, 0,625 ml (10 p mol) *mix forward primer* dan 0,625

ml (10 p mol) *mix reverse primer*, 1 unit taq DNA polymerase (Fermentas, Native with BSA), 2,5 ml 10x bufer. Kondisi PCR meliputi predenaturasi 94°C selama 1 menit, dilanjutkan denaturasi 94°C selama 30 detik, 50°C selama 40 detik, 72°C selama 11 detik, 5 siklus, dilanjutkan kembali dengan 35 siklus denaturasi 94°C selama 30 detik, 55°C selama 40 detik, 72°C selama 1 menit, setelah itu dilakukan final elongasi 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi fragmen dari gen COI di elektroforesis dengan menggunakan 2% AGE (*Agarose Gel Electrophoresis*). Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan *ethidium bromide* dengan bantuan sinar ultra violet.

Sekuen gen COI dilakukan dengan menggunakan jasa pelayanan sekuen DNA di 1stBASE Pte Ltd, Singapore dan Macrogen Co, Korea. Sekuen COI dilakukan dengan menggunakan *forward primer* M13F(-21) 5"TGTAACGACGCGGCCAGT3" dan *reverse primer* M13R (-27) 5"CAGGAAACAGCTATGAC3" (Messing 1983).

Analisis filogenetik

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekuen dan statistik

Spesimen anggota ordo Cetartiodactyla yang dianalisis terdiri dari famili Tragulidae (*Tragulus javanicus*, *Tragulus napu*), famili Suidae (*Babyrousa babyrussa*, *Sus scrofa*), famili Bovidae (*Bos indicus*, *Bos taurus*, *Bos javanicus*, *Bubalus*

bubalis, *Bubalus depressicornis*, *Ovis aries*, *Capra hircus*), dan famili Cervidae (*Rusa timorensis*, *Rusa unicolor*, *Muntiacus muntjak*, *Axis kuhlii*). Data statistik dari sekuen DNA Cytochrome Oxydase Subunit I (COI) dari DNA mitokondria dianalisis sepanjang 613 bp dan tidak ditemukan adanya *insertion* dan *diletion* setelah diblast dengan data ordo Cetartiodactyla yang ada di GenBank. Hasil sekuen menunjukkan ada 226 situs variabel (36,86%), 219 situs informatif parsimoni (35,72%) dengan jumlah total mutasi 331 situs, dan ratio transisi-tranversi adalah 5,666.

Kandungan GC adalah 43,9% pada kodon pertama, 32,6% pada kodon kedua, 55,5% kodon ketiga, dengan rata-rata 44%. Kandungan AT untuk semua posisi 56%, berarti komposisi kandungan GC < AT dan relatif seimbang. Umumnya kandungan GC pada vertebrata 40-45% (Sueoka 1962) dan proporsi rata-rata nukleotida dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Proporsi rata-rata nukelotida (%) pada gen COI ordo Cetartiodactyla

Posisi Kodon	Thymine T	Cytosine C	Adenine A	Guanine G
Kodon pertama	0,419	0,293	0,142	0,146
Kodon kedua	0,263	0,265	0,411	0,610
Kodon ketiga	0,173	0,242	0,272	0,313
Rata-rata	0,285	0,267	0,275	0,173

Jarak genetik ordo Cetartiodactyla

Jarak genetik dalam spesies dari ordo Cetartiodactyla hasil analisa pada studi ini adalah *Bos javanicus* (0%), *Bos indicus* (0%), *Bos taurus* (0,1%), *Capra hircus* (0%), *Ovis aries* (0,3%), *Babyrousa babirussa* (0,3%), *Bubalus depressicornis* (0%), *Bubalus bubalis* (0%), *Sus scrofa* (0%), *Axis kuhlii* (0%), *Rusa timorensis* (0,4%), *Rusa unicolor* (0%), *Muntiacus muntjak* (0,7%), *Tragulus javanicus* (0%), dan *Tragulus napu* (0%). Hasil yang didapat pada studi ini serupa dengan hasil penelitian Mitchell *et al.*

(2010) dimana diversitas genetik COI dalam spesies pada *Bovidae*, *Suidae*, *Crocodylidae*, *Alligatoridae*, dan *Cercopithecidae* berkisar 0,0-1,92% (rata-rata 0,24%) dan antar spesies rata-rata 9,77%. Hasil studi ini memperlihatkan bahwa jarak genetik dalam spesies sangat rendah dengan rata-rata 0,13±0,05%, sedangkan jarak genetik antar spesies pada penelitian ini berkisar antara 2-28% (Tabel 2.). Jarak genetik dalam spesies rendah namun tinggi antar spesies menunjukkan bahwa gen COI efektif untuk identifikasi pada tingkat spesies dan tepat untuk digunakan sebagai *DNA barcode*. Efektifitas gen ini juga terlihat pada tingkat genus dan famili pada penelitian ini dimana variasi interspesifik lebih tinggi dibandingkan variasi intraspesifik. Jarak genetik dalam genus pada *Bos* (3,5%), *Capra* (0,0%), *Ovis* (0,003%), *Ovis* (0,003%), *Babyrousa* (0,003%), *Bubalus* (0,019%), *Axis* (0,0%), *Rusa* (0,011%), *Muntiacus* (0,007%), *Tragulus* (0,058%), *Sus* (0,0%), dan rata-rata

1,36±0,037%, sedangkan antar genus berkisar antara 8,8-27,4% (Tabel 3). Jarak genetik dalam famili *Bovidae* (11,9%), *Suidae* (7,6%), *Cervidae* (5,9%), dan *Tragulidae* (5,8%) dengan rata-rata 7,8%±2,85, sedangkan antar famili berkisar antara 18,6%-26,3% (Tabel 4). Penelitian Clare *et al.* (2006) pada ordo Chiroptera dapat digunakan sebagai pembanding, hasilnya adalah jarak genetik rata-rata dalam spesies 0,60±0,49, genus 7,80±4,78, famili 21,26±2,09, dan ordo 23,73±1,94.

Tabel 2. Jarak genetik antar spesies dari ordo Cetartiodactyla

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Bos javanicus</i>															
<i>Bos indicus</i>	0,066														
<i>Bos taurus</i>	0,062	0,014													
<i>Capra hircus</i>	0,173	0,192	0,014												
<i>Ovis aries</i>	0,184	0,175	0,170	0,107											
<i>Babyrousa babyrussa</i>	0,262	0,273	0,239	0,224	0,223										
<i>Bubalus depressicornis</i>	0,160	0,157	0,159	0,182	0,198	0,253									
<i>Bubalus bubalis</i>	0,151	0,143	0,138	0,173	0,182	0,245	0,028								
<i>Axis kuhlii</i>	0,219	0,212	0,202	0,178	0,197	0,255	0,183	0,183							
<i>Rusa timorensis</i>	0,195	0,178	0,178	0,192	0,184	0,268	0,194	0,181	0,088						
<i>Muntiacus muntjak</i>	0,184	0,179	0,180	0,184	0,178	0,238	0,178	0,178	0,087	0,086					
<i>Tragulus javanicus</i>	0,236	0,253	0,246	0,251	0,247	0,278	0,237	0,234	0,252	0,254	0,252				
<i>Tragulus napu</i>	0,230	0,241	0,235	0,232	0,235	0,249	0,251	0,243	0,248	0,244	0,238	0,058			
<i>Sus scrofa</i>	0,280	0,258	0,259	0,218	0,223	0,160	0,255	0,258	0,255	0,278	0,257	0,277	0,250		
<i>Rusa unicolor</i>	0,193	0,180	0,180	0,176	0,172	0,259	0,184	0,174	0,095	0,020	0,094	0,257	0,248	0,263	

Tabel 3. Jarak genetik antar genus dari ordo Cetartiodactyla

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bos										
Capra	0,183									
Ovis	0,177	0,107								
Babyrousa	0,247	0,224	0,223							
Bubalus	0,152	0,177	0,190	0,249						
Axis	0,211	0,178	0,197	0,255	0,183					
Rusa	0,184	0,187	0,180	0,265	0,185	0,090				
Muntiacus	0,181	0,184	0,178	0,238	0,178	0,087	0,088			
Tragulus	0,240	0,241	0,241	0,236	0,241	0,250	0,250	0,245		
Sus	0,266	0,281	0,223	0,160	0,256	0,255	0,274	0,257	0,264	

Tabel 4. Jarak genetik antar Famili dari ordo Cetartiodactyla

	1	2	3	4
Bovidae				
Suidae		0,234		
Cervidae		0,186	0,261	
Tragulidae		0,241	0,263	0,249

Pohon filogeni ordo Cetartiodactyla

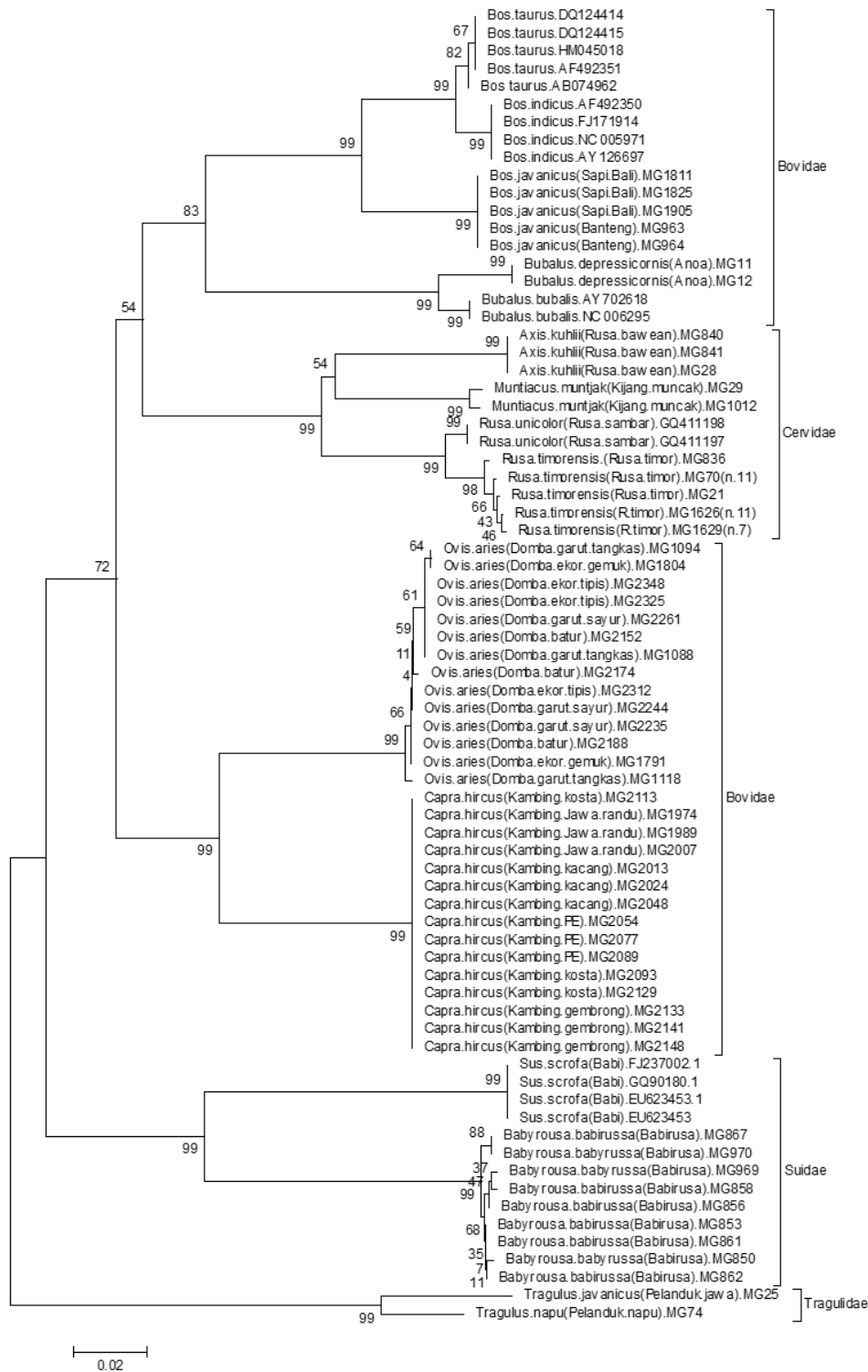
Konstruksi pohon filogeni ini menggunakan 112 sekuen gen CO1 DNA mitokondria terdiri 15 spesies, 10 genus, dan 4 famili dari Ordo Cetartiodactyla dengan panjang sekuen 613

situs. Seperti telah diketahui bahwa pohon filogenetik merupakan grafik yang menunjukkan hubungan kekerabatan (geneologi) antar taksa. Grafik terdiri dari sejumlah nodus dan cabang. Nodus yang terbentuk mewakili unit taksonomi, se-

dangkan cabang mewakili hubungan antar unit yang menggambarkan keturunan dengan leluhur. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik juga akan membentuk percabangan utama yang sering disebut *clade*. Analisis filogeni berdasarkan metoda

Neighborjoining secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil konstruksi pohon filogeni ordo Cetartiodactyla menunjukkan bahwa analisis dengan *Neighborjoining* semua genus/spesies membentuk



Gambar 1. Konstruksi pohon filogeni ordo Cetartiodactyla berdasarkan metoda *Neighborjoining* dengan menggunakan perangkat lunak Mega versi 4.0.1.

unit yang kohesif dimana tingkat perbedaan sekuen gen COI antar taksa menunjukkan keserasian bervariasi yang substansial. Beberapa studi sebelumnya pada vertebrata (Amfibia) yang dilaporkan Vences *et al.* (2005) telah mengangkat kekhawatiran mengenai akuisisi dan kemudahan interpretasi data barcode DNA. Hal ini disebabkan karena tidak menggunakan satu set primer yang dirancang untuk group. Sangat berbeda dengan hasil yang dilaporkan pada kelompok burung dan ikan oleh Hebert *et al.* (2004) dan Ward *et al.* (2005) dimana amplifikasi wilayah barcode telah terbukti langsung dapat diinterpretasikan dengan mudah dan semua spesies membentuk unit yang kohesif. Investigasi ini telah memperkuat kesimpulan sebelumnya mengenai DNA barcode pada hewan, bahwa semua spesies ordo Cetartiodactyla yang dianalisis sebanyak 15 spesies membentuk cluster kohesif tunggal yang jelas berbeda.

Hasil sekuen gen COI ini merupakan alat untuk identifikasi spesies yang dapat digunakan dalam melakukan monitoring perdagangan daging maupun produk olahan asal daging dalam perdagangan legal maupun ilegal terutama dalam mendeteksi pemanfaatan hidupan liar yang dilindungi atau tidak dilindungi. Seperti diketahui banyak kesulitan masyarakat dalam membedakan produk daging dipasar. Tingkat kesulitan masyarakat akan bertambah jika dihadapkan pada produk olahan asal daging berupa bakso, dendeng, sosis dan sebagainya.

KESIMPULAN

Barcode DNA ordo Cetartiodactyla dengan menggunakan gen Cytochrome c Oxidase subunit I dapat digunakan sebagai alat identifikasi spesies. Dengan demikian semua hasil produk olahan yang berasal dari hewan Cetartiodactyla dapat diketahui dan ditelusur spesiesnya secara akurat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Program "Pengembangan *Genetic Resources Bank* untuk Barcoding DNA Fauna Indonesia" DIPA Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Saya ucapkan terima kasih kepada Dr. Hari Sutrisno, Dr. Sri Sulandari dan semua anggota tim peneliti serta teknisi (Inda Natalia dan Anik Bhudi Dhamayanthi) yang telah banyak membantu dalam penulisan dan analisis di Laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Clare, E.L., B.K. Lim, M.D. Engstrom, J.L. Eger, P.D.N. Herbert. 2006. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology*. Jurnal Compilation 2006. Blackwell Publishing Ltd.
- Hajbabaie, M., J.R. deWaard, N.V. Ivanova. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*. 103:968-971.
- Herbert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. deWaard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal society of London. Serie B, Biological Sciences*, 270:313-322
- Herbert, P.D.N., E.H. Penton, J.M. Burn, D.H. 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.
- Ivanova, N.V., J.R. deWaard, P.D.N. Herbert. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Molecular ecology*. Notes doi:10.1111/j.1471-8286.2006.0147x.
- Messing J. 1983. New M13 vector for cloning. *Methodes in Enzymology*, 101:20-79
- Mitchell J.E., L.M. Greta, O.K. Sergion, S.L. Matthew, P.M. Andrew, A. George. 2010. Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conserv Genet*:11:1389-1404.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Suyanto, A., M. Yoneda, I. Maryanto, Maharadantunkamsi, J. Sugarjito. 2002. Check list of Indonesian Mammals. 2nd edition. Biodiversity Conservation Project. LIPI, JICA and PHPA, Bogor.

- Tamura K, D. Peterson, N. Peterson , G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.
- Vences MR, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical transaction of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360, 1859-1868
- Ward, R.D., T.S. Zemplak, B.H. Innes, P.R. Last, P.D.N. Herbert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Sciences*. 360:1847-1857.
- Wilson, D.E., D.M. Reeder. 2005. *Mammal species of the world: a taxonomic and Geographical reference*, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore.