

Variasi dan Filogeni Kancil dan Napu (*Tragulus Sp.*) di Indonesia Menggunakan Gen 12s rRNA Mitokondria

(VARIATION AND PHYLOGENI ON GENUS TRAGULUS (TRAGULUS SP.)
IN INDONESIA USING MITOCHONDRIAL 12s rRNA GENE)

Wirdateti, Raden Taufiq Purna Nugraha

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Cibinong Science Center
Jl. Raya Jakarta – Bogor km 46. Cibinong 16911
Telp: 021 8765056; Email: teti_mzb@yahoo.com

Abstrak

Ruminasia kecil seperti kancil dan napu termasuk ke dalam genus *Tragulus*, dan di Indonesia terdiri dari tiga spesies yaitu *Tragulus javanicus*, *T. napu*, dan *T. kanchil*. Pesebaran dari ketiga spesies tersebut adalah di Kalimantan, Jawa, Sumatera, dan Kepulauan Nusa Tenggara. Secara taksonomi berdasarkan morfologi *T. javanicus* merupakan spesies yang sama dengan *T. kanchil*, sedangkan *T. napu* memiliki perbedaan di dalam ukuran tubuh dengan kedua spesies tersebut. Status genus *Tragulus* di Indonesia dilindungi Undang-Undang dan di dalam IUCN dikategorikan *least concern* untuk *T. napu* dan *data deficient* untuk *T. javanicus*. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat variasi genetik di antara spesies dan hubungan kekerabatan berdasarkan gen mitokondrial DNA. Gen yang digunakan pada penelitian adalah 12S rRNA sepanjang 300 bp pada delapan sampel *Tragulus* berasal dari Kepulauan Singkep sebanyak empat ekor, tiga ekor dari Gunung Halimun, Jawa Barat, dan satu ekor dari Kalimantan Timur. Sebagai pembandingan digunakan sekuen nukleotida masing-masing spesies dari *GeneBank*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jarak genetik (d) di antara individu adalah cukup tinggi $d=0,322 \pm 0,023$ dengan keragaman nukleotida (π) = 0,2402 yang mengindikasikan sampel yang digunakan terdiri dari spesies berbeda. Pohon filogeni berdasarkan nukleotida menunjukkan bahwa sampel penelitian terdiri dari tiga spesies yaitu *T. javanicus*, *T. kanchil*, dan *T. napu*. Sampel asal Gunung Halimun dan Kalimantan Timur terdapat dalam satu kelompok yaitu *T. kanchil* (Kalimantan) dan *T. javanicus* (G. Halimun). Dua sampel dari Singkep pada kelompok yang berbeda dan mungkin *T. napu*.

Kata-kaya kunci: *Tragulus spp.*, gen 12S rRNA, molekuler, keragaman, genetic

Abstract

Genus *Tragulus* in Indonesia is consisted of three species, namely *Tragulus javanicus*, *T. napu*, and *T. kanchil*. These three species are distributed in Kalimantan (Borneo), Java, Sumatra and Lesser Sunda islands. Taxonomically, based on morphological characteristic, *T. javanicus* is the same species as *T. kanchil*, while *T. napu* have differences in body size compared to the previous species. The status of genus *Tragulus* in Indonesia are protected by the law and categorized as *least concern* for *T. napu* and *data deficient* for *T. javanicus* in the IUCN Redlist. The aims of this study was to look at genetic variation among species and kinship based on mitochondrial DNA gene genus *Tragulus*. Genes used in this study was 12S ribosomal RNA with 300 bp long, using eight samples originated from Singkep Islands (four individuals), Mount Halimun, West Java (three individuals) and East Kalimantan (one individual). As a comparisons, published nucleotide sequence of each species from *GeneBank* database were used. The results showed that the genetic distances (d) between individuals is high $d = 0.322 \pm 0.023$ with the nucleotide diversity (δ) = 0.2402 which indicates that samples was consisted of samples from different species. Phylogenetic tree based on the nucleotide analysis indicated that these samples composed of three species namely *T. javanicus*, *T. kanchil* and *T. napu*. Samples from Mt. Halimun and East Kalimantan are clustered in one group, namely *T. kanchil* (Borneo) and *T. javanicus* (Mt. Halimun). Two samples from Singkep are clustered in different groups with the possibility as *T. napu*.

Keyword: *Tragulus spp.*, 12S rRNA gene, molecular, diversity, genetic

PENDAHULUAN

Genus *Tragulus* terdistribusi di kawasan Asia Tenggara dan India, terdiri dari enam spesies, tiga di antaranya tersebar di Indonesia yaitu *Tragulus javanicus* (Jawa), *T. kanchil* (Kalimantan, Sumatera), dan *T. napu* (Sumatera, Kalimantan, NTB, NTT). Di Indonesia genus *Tragulus* secara morfologi dan ukuran tubuh terdiri dari dua spesies yaitu berukuran kecil (*lesser mouse deer*) yaitu *T. javanicus* dikenal dengan nama kancil dan berukuran besar *T. napu* (*greater mouse deer*) dikenal dengan nama pelanduk (Lekagul dan McNeely, 1988; Corbet dan Hill, 1992; Wilson dan Reeder, 1993). Endo *et al.*, 2004 menyatakan bahwa perbedaan dua species tersebut di samping ukuran tubuh adalah pada warna rambut pada leher, tulang metatarsal, dan femur yang diamati pada specimen dewasa. Pendapat terbaru menurut Meijaard dan Groves (2004), dua spesies baru dipisahkan dari *T. napu*, yakni *T. nigricans* dan *T. versicolor*, dan dua yang lain juga dipisahkan dari *T. javanicus*, yaitu *T. kanchil* dan *T. williamsoni*. Spesies-spesies yang terakhir ini telah dideskripsi sebelumnya, namun selama ini hanya dianggap sinonim dari dua spesies sebelumnya, dan *T. javanicus* dan *T. kanchil* merupakan spesies yang sama berdasarkan morfologi dengan penyebaran berbeda. Ketiga species tersebut termasuk satwa yang dilindungi oleh pemerintah Indonesia berdasarkan Peraturan Pemerintah Nomor 7 Tahun 1999. Populasi kancil (*Tragulus sp.*) hingga kini tidak diketahui dengan pasti, baik oleh pemerintah Indonesia maupun oleh organisasi konservasi lingkungan hidup lainnya. Demikian juga data biologi hasil penelitian sangat sedikit sekali dilaporkan tentang genus *Tragulus* Indonesia. Oleh karena itu, *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) *Redlist* memasukkannya dalam status konservasi *least concern* untuk *T. napu* dan *T. kanchil*, dan *data deficient* untuk *T. javanicus* yang berarti selama lima tahun terakhir belum diadakan evaluasi atau penelitian ulang (IUCN, 2014)

Kancil maupun napu merupakan salah satu kekayaan biodiversitas yang dimiliki Indonesia. Hewan ini merupakan ruminansia terkecil yang memiliki potensi untuk dikaji lebih lanjut. Selain sebagai salah satu kekayaan biodiversitas yang dimiliki Indonesia, kancil juga potensial untuk dimanfaatkan sebagai alternatif sumber protein hewani dan sebagai model pada penelitian

biomedis. Kancil maupun napu termasuk hewan herbivora, sama seperti rusa dan kijang yang banyak diburu untuk dikonsumsi, sehingga satwa ini sulit ditemukan. Umumnya hewan-hewan ini aktif di waktu malam (nokturnal), memakan dedaunan, buah, rerumputan, dan bagian-bagian tumbuhan lainnya di dasar hutan yang rapat dengan tumbuh-tumbuhan (Nowak, 1999). Habitat napu dan kancil di hutan primer dan sekunder yang cukup lebat atau tanah kering di dataran rendah atau kaki bukit tidak jauh dari sungai dengan vegetasi lebat.

Kancil dan napu memiliki tubuh berwarna kecokelatan sampai kemerahan, dengan garis-garis putih dan cokelat kehitaman membujur di leher dan dadanya, dan garis hitam di tengkuknya. Hewan ini mempunyai masa bunting selama 137-155 hari dan anak disapih setelah berumur antara 60-70 hari. Belum ada laporan tentang keberhasilan penangkaran atau konservasi *ex-situ*, karena kancil memiliki tingkat stres tinggi.

Untuk memenuhi kebutuhan akan kancil oleh masyarakat selama ini pemburu mengambilnya dari alam. Hal tersebut sangat mengkhawatirkan keberadaan populasi kancil dan napu di alam, karena secara kuantitas dan kualitas akan menurun, sementara data biologi sebagai data pendukung belum banyak tersedia. Belum banyak laporan ataupun hasil penelitian tentang keberadaan kancil, sedangkan populasi kancil di alam diperkirakan terus menurun. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian terhadap genus *Tragulus* terutama yang tersebar di Indonesia untuk mengungkap status secara genetik sehingga didapatkan suatu informasi perbedaan genus *Tragulus* secara genetik.

METODE PENELITIAN

Sampel

Sampel penelitian sebanyak delapan individu, berasal dari Gunung Halimun, Jawa Barat tiga ekor; Nunukan, Kalimantan Timur, satu ekor; dan empat ekor dari Pulau Singkep, Kepulauan Riau. Keseluruhan sampel adalah berupa jaringan yang diawetkan dalam etanol absolute (Tabel 1).

Ekstraksi Total DNA

Ekstraksi DNA menggunakan phenol-chloroform mengikuti metode Sambrook *et al.* (1989). Sebanyak 30 mg jaringan dihaluskan pada tabung 1,5 mL dan dilarutkan di dalam

extraction buffer 500 μ L yang terdiri dari 1M Tris-Cl pH 8,0, 5 M NaCl, 0,5 M *Etilen Diamin Tetraacetat* (EDTA) pH 8,0 dan 10% *Sodium dedocyl Sulfat* (SDS). Ke dalam larutan ditambahkan 10 uL *Proteinase K* (20mg/mL), kemudian sampel diinkubasi semalam pada suhu 60°C. Tahap purifikasi menggunakan phenol-chloroform dan presipitasi dengan etanol absolute dan DNA yang diperoleh dilarutkan di dalam ddH₂O atau *MilliQ water*.

Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan Sekuensing DNA

Amplifikasi menggunakan sepasang primer universal gen 12S rRNA dari Kocher *et al.* (1989) yaitu H1478 dan L1091 dengan urutan basa H1478: 5'GAGGGT GACGGCGGTGTGT3' dan L1091: 5'CAAACCTGGGATTAGATACCCCA CTAT3'. Komposisi di dalam 25 μ L reaksi PCR terdiri dari 2 μ L 2,5 mM dNTP, 2,5 μ L 2,5 pmol/ μ L, 1,25 μ L 1,25U/ μ L Taq, DNA *template* 1 uL dan sisanya MQ. Kondisi amplifikasi pada PCR adalah 95°C, lima menit denaturasi awal; 40 siklus (*denaturation* 95°C 30 detik, *annealing* 55°C 30 detik, *extension* 72°C satu menit), dan *extention* 72°C, lima menit. Hasil PCR kemudian dicek pada 2% gel agarose dan menggunakan *marker* DNA 100 bp, dan selanjutnya disekuensi menggunakan *primer forward* di *First Base Company*.

Analisis Sekuen

Sekuen gen 12S rRNA dari semua sampel diedit dengan menggunakan BioEdit software (Hall, 1999) kemudian dijajarkan (*aligned*) menggunakan program Clustal X (Larkin *et al.*, 2007). Sebelum analisis semua hasil sekuen diBLAST pada NCBI program untuk menghindari adanya sampel terkontaminasi atau sekuen pseudogen dan melihat tingkat homologi sekuen nukleotida dengan genus *Tragulus* (*Tragulus* sp.). Analisis data menggunakan Program MEGA version 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Analisis jarak genetik (*d*) menggunakan model *kimura-2 parameter* dan analisis filogeni menggunakan metode *Neighbour-Joining* dengan 1000 kali pengulangan (Saitou dan Nei, 1987) yang terdapat pada program MEGA 6. Analisis data meliputi *variable sites* berdasarkan nukleotida, indeks transisi/trans-verse, dan jarak genetik (*d*). Sebagai pembandingan untuk mengetahui posisi sampel digunakan sekuen *GeneBank* pada species *Tragulus* di Indonesia yaitu *T. javanicus* (AY121991), *T. kanchil* (NC020753), dan *T. napu* (M55539).

Tabel 1. Sampel *Tragulus* sp., yang digunakan pada penelitian

No. Sampel	Lokasi	Keterangan
1	KS1	Singkep
2	KS2	Singkep
3	KS3	Singkep
4	KS4	Singkep
5	KL	Kaltim (Nunukan)
6	KH1	Gn. Halimun
7	KH2	Gn. Halimun
8	KH3	Gn. Halimun
9	AY121991	<i>GeneBank</i>
10	NC020753	<i>GeneBank</i>
11	M55539	<i>GeneBank</i>

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil sekuensing sekuen nukleotida 12S rRNA *Tragulus* sp., pada penelitian ini sekitar 310 sampai 325 bp, tetapi yang dapat dianalisis sepanjang 300 bp. Panjang sekuen nukleotida 12S rRNA pada genus *Tragulus* sekitar 959 bp (*GeneBank*), sehingga panjang sekuen yang digunakan pada penelitian ini sekitar sepertiga panjang sekuen keseluruhan gen 12S rRNA. Gen tersebut telah terbukti memberikan resolusi setidaknya pada satu ordo mamalia yaitu *Artiodactyla* (Miyamoto dan Boyle, 1989; Miyamoto *et al.*, 1990.), yang menegaskan genus *Tragulus* merupakan salah satu ordo *Artiodactyla*. Untuk memastikan bahwa spesies adalah genus *Tragulus* dilakukan tingkat homologi sekuen dengan sekuen *GeneBank* pada genus yang sama dengan metode BLAST. Delapan sampel yang diperoleh dari alam, menunjukkan tiga sampel memiliki tingkat homologi nukleotida dengan *T. napu* sekitar 90 sampai 97% yang berasal dari Kepulauan Singkep dan Gn. Halimun. Tiga sampel menunjukkan tingkat homologi dengan *T. javanicus* yaitu sekitar 90 sampai 98% yang berasal dari Gn. Halimun, dan satu sampel menunjukkan tingkat homologi dengan *T. kanchil* sekitar 98% dan *T. javanicus* 98% yang berasal dari Nunukan, Kalimantan Utara. Dua sampel dari Kepulauan Singkep memiliki tingkat homologi 90% dan 95% antara species *T. kanchil* dan *T. javanicus* dan dua sampel asal Pulau Singkep yang lain, tingkat homologi dengan *T. napu* sekitar 91% dan 93%. Nilai kesamaan tingkat homologi sekuen berdasarkan

Tabel 2. Variasi situs nukleotida 11 haplotipe gen 12S rRNA dari 11 sampel

Haplotipe ^a	Nucleotide site ^c							
	111	1111122222	2333344445	5555566666	6677777777	8888899999	1111111111	1111111111
	1234678012	3467812358	9168902571	2345891346	8923456789	0124923789	1389012346	7812478014
KS4	GGATGGGTTT	TAACCCCTGG	AGGTTGATGA	AACCGAAACT	ACAACCTTGC	TAATTTACGC	ATGCAAACCT	AAAGAAAAGA
KS3	.AC..TCG.CG.....	G.TC.....	T.....	...C.....	C...C.....	.C.....	.C..C.....
KH2	AAC...CG..C...	GATC..T...	...A.....	...C.....	...C.....	.C.....	...A.....
NC020753	.AC...CG..TC.....C.....	C...C.....	.C.....
KH3	.AC...CG..TC.....C.....	C...C.....	.C.....
M539	.AC...CG..	G.TC..T...C.....	...C.....	.C.....	...A.....
KS2	.A.CTTC..C	.TGTGTAGAT	G.TC.TCCCT	GG.TCTGCTA	GTT.TGA..G	.GG..CTGTT	T..GGGTTTC	TGGACGTTAG
AY1	.AC...CG..TC.....C.....	C...C.....	.C.....
KH1	.AC...CG..TC.....C.....	C...C.....	.C.....G....
KL	...C..CCAG	CG..A.C...	..AC..G..	..A.....	...C...C..	G..CCG....	.C.....A	...A.....
KS1	.A.CTTC..C	CTGTGTAGAT	G.TC.TCCCT	GG.TCTGCTA	GTT.TGA.AA	.T...CTGCT	T.AGGGTTTC	TGGACGTTAG

Haplotipe	1111111111	1111111111	1111111111	1111222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222
	3344444445	5555555566	6667777788	9999000000	1111112222	2233333344	4455555566	6666777788
	8912345790	1234567912	3671345709	0145046789	0124791346	8901358946	7801678923	4689167801
KS4	TATAATTTTCG	ATAAAAATAG	GAAGAGCAGA	GATGATTCTA	TCCCGACCAC	AAGTCCGAGC	AACAAGGATA	AATAGGAAAG
KS3	.G.G.....A	TG....C.G.GA....G	...A...G
KH2	..CC.CC..A	TA....C...	CT..A...G	G.....	G.....
NC020753A	TA....C...	C...A...G
KH3A	TA....C...A...G
M539	..CC.....A	TA....C...	CT..A.TT.G	G.....	G.....
KS2	G..T.GCAG.	T.GGTG.GTT	AGGTTATGTC	AGCACCAGGG	GGTTAC..GA	GTCCTGT..T	GGT.GTAGCT	CGCGAATTTGT
AY1	...G.....A	TA....C...A...G
KH1	..CC..C..A	TA....C...	CA..A...GT	..T.....
KL	..CC.CC..A	TA....C...	CT..A...GT	G.....
KS1	G..TGCCAG.	T.GGTG.GTT	AGGTTATGTC	AGCACCAAGG	GGTTAC..GA	GTCCTGTT..	GG.G.TAGCT	CGCGACTTTGT

Haplotipe	22222222]
	8889999]
	3565679]
KS4	GGCACTG
KS3
KH2C.
NC020753
KH3
M539
KS2	TAATT.T
AY1
KH1C.
KLC.
KS1	TAATT.T

NCBI BLAST memungkinkan bahwa antara *T. kanchil* dengan *T. javanicus* adalah sama. Hal tersebut dijelaskan oleh Meijaard dan Groves (2004), bahwa terdapat kesamaan secara morfologi dari kedua species tersebut dan termasuk *small mouse-deer*.

Variasi Sekuen

Penjajaran urutan nukelotida dilakukan dengan Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) dalam bentuk fasta untuk selanjutnya dianalisis

menggunakan MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Hasil analisis menunjukkan terdapat sebanyak 167 variasi situs nukleotida dari panjang sekuen 300 bp dengan 140 situs informatif yang menunjukkan perbedaan nukleotida di antara individu dalam spesies dan antar spesies. Tingginya variasi situs disebabkan oleh perbedaan sekuen nukleotida pada dua sampel yang berasal dari Kepulauan Singkep dimungkinkan adalah *T. napu* (Tabel 2). Variasi situs tinggi dan *haplotipe* yang terbentuk menunjukkan sampel berasal dari species berbeda. Perbedaan nukleotida berkisar dari 1 sampai 149 nukleotida atau dari 0,3% sampai 49,6% (Tabel 3). Perbedaan paling tinggi adalah antara sampel KSI dan KS2 dari Pulau Singkep dengan sampel yang lain, sedangkan perbedaan paling kecil yaitu hanya satu nukleotida adalah antara sampel KH3 dari Gn. Halimun dengan AY1 (*T. javanicus*) dan NC (*T. khancil*) dari *GeneBank* pada Tabel 3. Hal tersebut menunjukkan bahwa *T. javanicus* dengan *T. kanchil* sangat mungkin adalah species yang sama. Meijaard dan Groves (2004) menyatakan

bahwa *T. javanicus* dan *T. kanchil* berdasarkan ukuran morfologi adalah species yang sama.

Perbedaan nukleotida menunjukkan nilai jarak genetik (d) antar individu yang digunakan pada penelitian. Rataan jarak genetik di antara individu secara keseluruhan $d=0,322\pm0,023$, nilai tersebut cukup tinggi karena sampel yang digunakan diperkirakan dari species berbeda. Berdasarkan sekuen homologi dari *GeneBank* dari *T. napu* (M55539), *T. javanicus* (AY121991), dan *T. kanchil* (NC020753) menunjukkan spesies *T. napu* sebanyak dua individu yaitu KH1 dan KH2 dari Gn. Halimun. *Tragulus kanchil* satu individu dari Kalimantan Timur dan *T. javanicus* sebanyak tiga individu yaitu KH3, KS3, dan KS4 yang berasal dari Gn. Halimun dan Kepulauan Singkep. Berdasarkan sekuen pembandingan belum bisa digunakan sebagai penentu dari masing-masing spesies, dimungkinkan keenam individu tersebut adalah satu spesies yaitu *T. javanicus*. Sementara dua individu lain yaitu KS1 dan KS2 memiliki rata-rata jarak genetik yang cukup tinggi dengan keenam individu lainnya yaitu sekitar $0,429\pm0,031$ atau rata-ratanya 47,66% perbedaan nukleotida. Dua individu tersebut memiliki tingkat homologi dengan *T. napu* yang ada pada *GeneBank* yaitu 91 dan 93%. Pola substitusi sekuen nukleotida pada masing-masing haplotipe menunjukkan adanya perbedaan yang jelas antara *T. napu* dengan *T. javanicus* dan *T. kanchil*. Hewan *T. napu* yang terdapat di Indonesia tersebar di Pulau Sumatera dan Kalimantan memiliki deskripsi yang lebih dekat dengan *T. versicolor* tersebar di Indochina dan *T. nigricans* yang terdapat di Philipina. Sementara itu *T. versicolor* dikatakan sebagai subspecies dari *T. napu* yang terdapat di Vietnam

Nilai indeks bias substitusi kejadian transisi dan transversi pada penelitian ini pada *T. napu*, *T. kanchil*, dan *T. javanicus* adalah $R=2,41$ dengan frekuensi nukleotida A=25,00%, T/U=25,00%, C=25,00%, dan G=25,00% (Kimura, 1980). Menurut Tamura dan Nei (1993) laju dan pola substitusi dari perbedaan transisi dan transversi pada matriks substitusi dengan frekuensi nukleotida adalah A=33,24%, T/U=24,77%, C=19,73%, dan G=22,27%. Nilai indeks tersebut jauh lebih kecil di antara *artiodactyla* lainnya yaitu antara rusa sambar (*Cervus unicolor*) dengan *reeves muncack* (*Muntiacus reevesi*) $R=5,33$; *Chinese water deer* (*Hydropotes inermis*) dengan rusa sambar $R=4,67$ dan antara rusa sambar dengan sapi (*Bos taurus*) yaitu $R=5,07$ (Allard *et al.*, 1991; Hixson dan Brown, 1986; Miyamoto *et al.*, 1991). Nilai indeks transisi/transversi kecil pada *Tragulus sp.*, dalam penelitian ini adalah karena spesies masih dalam satu genus. Nilai bias transisi/transversi dan laju evolusi tinggi adalah yang paling menarik di dalam mitokondria DNA vertebrata. Nilai bias transisi diketahui menurun secara cepat dengan peningkatan perbedaan sekuen sampai mencapai nilai eksponensial (Brown *et al.*, 1982; Moritz *et al.*, 1987).

Filogeni

Pohon filogenetik digunakan untuk menggambarkan posisi dari sampel *Tragulus sp.*, penelitian dan dibuat berdasarkan sekuen nukleotida gen 12S rRNA menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dengan *bootstrap* 1000 kali (Gambar 1). Sebagai pembandingan untuk mengetahui posisi sampel, digunakan sekuen yang sama dari *GeneBank* yaitu *T. javanicus*

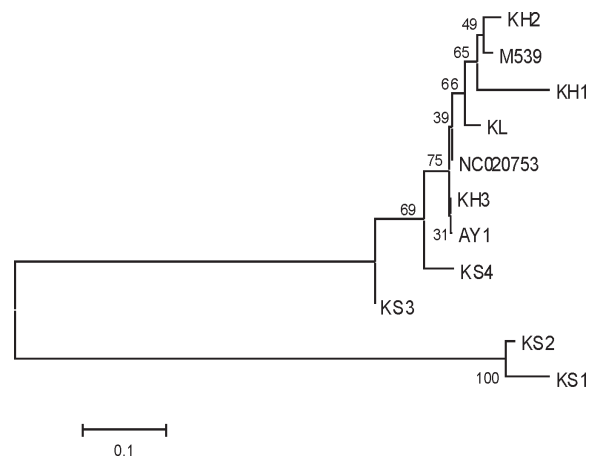
Tabel 3. Perbedaan nukleotida dan persentase perbedaan di antara individu penelitian

Sampel	KH3	AY1	KS2	KH2	M539	KS4	KH1	KI	NC	KS3	KS1
KH3	-	0.3	47.6	5.7	4.0	7.0	9.3	3.0	0.3	7.0	48.0
AY1	1		47.6	5.7	4.0	7.0	9.3	3.0	0.3	7.0	48.0
KS2	143	143		46.6	48.0	45.7	46.3	47.3	47.3	47.3	3.0
KH2	17	17	140		3.0	10.7	7.0	1.3	4.0	8.7	47.3
M539	12	12	144	9		7.3	6.7	4.0	3.7	7.7	46.6
KS4	21	21	137	32	22		12.3	8.3	7.3	10.7	48.3
KH1	28	28	139	21	20	37		8.0	9.3	11.7	49.6
KL	9	9	142	4	12	25	24		1.7	6.0	49.0
NC	1	1	142	12	11	22	28	5		4.3	48.7
KS3	12	11	143	26	23	32	35	18	13		48.7
KS1	144	144	9	142	140	145	149	147	146	144	-

Keterangan: Atas : Persentase perbedaan (%)
 Bawah : Perbedaan nukleotida

AY121991.1, *T. kanchil* NC020753, dan *T. napu* M55539.1. Pohon filogeni terdapat dua kelompok, dan kelompok kedua hanya terdiri dari dua sampel yaitu KS1 dan KS2 dari Pulau Singkep. Kedua sampel tersebut secara homologi sekuen melalui metode BLAST pada NCBI secara similaritas dekat dengan *T. napu* tetapi dengan tingkat homologi rendah yaitu 91% dan 93%. Enam sampel lainnya dengan menggunakan pembandingan dari *GeneBank* terdapat dalam satu kelompok, dan KS4 dan KS3 terpisah dalam sub cabang berbeda. Berdasarkan sekuen *GeneBank* yang digunakan sebagai pembandingan menunjukkan sampel dari Gn. Halimun yaitu KH2 dan KH1 sebagai *T. napu* (M55539.1), KL sebagai *T. kanchil* (NC020753), dan KH3 mengelompok sebagai *T. javanicus* (AY121991 (Gambar 1 dan 2). Pohon filogenetik jelas memperlihatkan antara *T. javanicus* dan *T. kanchil* dalam satu kelompok, dan membuktikan bahwa kedua spesies tersebut adalah sama. Berdasarkan jarak genetik dan perbedaan nukleotida KS3 dan KS4 lebih dekat dengan *T. javanicus* dan *T. kanchil* nilai *bootstrap* 75% dari pada KS1 dan KS2 dengan nilai *bootstrap* 100%, dan mungkin kedua spesies adalah *T. kanchil* atau *T. javanicus* yang tersebar di Sumatera. Pada pohon filogeni terlihat nilai *bootstrap* antara kelompok satu dan dua adalah 100%. Nilai *bootstrap* tersebut termasuk dalam kategori stabil karena suatu cabang dikatakan stabil jika nilai *bootstrap* di atas 95% dan dikatakan tidak stabil jika nilai *bootstrap* berada di bawah 70% (Osawa *et al.*, 2004).

Meijaard dan Groves (2004) menyatakan bahwa *T. kanchil* dari Sumatera mirip dengan *T. javanicus* yaitu pada ukuran tubuh dan warna abu-abu serta merah pada leher. Sampel KH1 dan KH2 dari Gn. Halimun yang mengelompok ke *T. napu GeneBank*, memberikan hasil yang berbeda berdasarkan sebaran *T. napu*, secara morfologi tidak terdapat di Pulau Jawa. Hal tersebut menarik karena dari penelitian terdapat dua sampel dari Gn. Halimun teridentifikasi sebagai *T. napu* berdasarkan similaritas sekuen dengan data *GeneBank* dan di pohon filogeni. Menurut laporan Dobroruka (1967) pada tiga spesimen dari Jawa, teridentifikasi sebagai *T. napu* yang berasal dari Gn. Wilis meskipun dilaporkan analisis *discriminant* ini dilakukan bersama dengan specimen *T. javanicus*. Sebelumnya peneliti tersebut juga menyatakan kemungkinan ada dua subspecies di Jawa yang dinamakan *T.*



Gambar 1. Pohon filogeni dari 11 sampel berdasarkan perbedaan nukleotida M539 *T. napu*; NC020753 *T. kanchil*, dan AY1 *T. javanicus* (*GeneBank*)

j. javanicus dan *T. j. pelandoc* berdasarkan perbedaan ukuran tubuh dan perbedaan bentuk abu-abu pada leher (Miller, 1903). Dengan demikian dimungkinkan *T. napu* dari *GeneBank* adalah *T. javanicus* karena subspecies *T. j. pelandoc* yang persebarannya terbatas pada wilayah Jawa Barat, sehingga KH2 dan KH1 adalah *T. javanicus GeneBank* hanya digunakan sebagai pembandingan tetapi bukan suatu indikator data sekuen. Berdasarkan hasil-hasil secara taksonomi ini sampel KS1 dan KS2 yang terpisah dari kelompok pertama, adalah *T. napu* dari Sumatera. Penggunaan gen 12S rRNA dalam identifikasi pengelompokan kancil (*mouse-deer*) dan sekuen data *GeneBank* sebagai pembandingan tidak dapat menunjukkan pemisahan yang jelas antar spesies pada pohon filogeni. Hal tersebut berbeda dengan penggunaan gen *cytochrome b* yang dapat memisahkan dengan jelas antara species dari *T. javanicus* asal Semenanjung Malaysia dan Laos dengan *T. javanicus* asal Sabah, Malaysia, dan *T. napu* asal Kalimantan dan Pulau Tioman (Endo *et al.*, 2004).

SIMPULAN

Penggunaan gen 12 rRNA pada genus *Tragulus* memberikan variasi yang cukup tinggi intraspecies maupun interspecies berdasarkan perbedaan nukleotida. Komposisi perbedaan nukleotida pada haplotipe dapat digunakan

sebagai pembeda interspecies antara *T. napu* dengan *T. javanicus*/*T. kanchil* tetapi tidak dapat digunakan antara *T. javanicus* dan *T. kanchil* yang berhubungan dekat. Sekuen *GeneBank* yang digunakan sebagai pembandingan pengelompokan posisi *Tragul* sp. pada pohon filogeni tidak dapat digunakan sebagai indikator pembeda antar spesies.

SARAN

Jumlah sampel yang terbatas dari masing-masing lokasi belum dapat memberikan hasil sensitif terhadap perbedaan antar spesies. Dengan demikian diperlukan penelitian lanjutan dengan penambahan jumlah sampel dari berbagai lokasi persebaran genus *Tragul* dan juga perlu penggunaan gen lain sehingga data pembeda sekuen lebih lengkap.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada Program JICA di Pusat Penelitian Biologi, LIPI periode tahun 1997–2002 yang telah membantu di dalam pendanaan pada penelitian ini.

PUSTAKA

- Allard MW, Honeycutt RL. 1992. Variation in the Mitochondrial 12srRNA Gene and the Phylogeny of African Mole-Rats (Rodentia: Batheyrigidae). *Molecular Biology Evolution* 9(1): 27-40
- Corbert GB, Hill JE. 1992. *The Mammals of the Indomalayan Region: A Systematic Review*. Oxford. Oxford Uni Press.
- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J Mol Evol* 18(4): 225-239.
- Dobroruka LJ. 1967. On the nomenclature and taxonomy of the lesser mouse-deer of Java. *Mammalia* 31: 456-458
- Endo H, Fukuta K, Kimura J, Sasakti M, Hayashi Y, Oshida T. 2004. Phylogenetic relationship among populations of the mouse deer in the Southeast Asian Region from the nucleotide sequence of cytochrome *b* gene. *Mammal Study* 29: 119-123
- Hall TA. 1999. BioEdit: a User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid Symp Ser* 41: 95-98
- Hixson JE, Brown WM. 1986. A comparison of the small ribosomal RNA genes from the mitochondrial DNA of the great apes and humans: sequence, structure, evolution, and phylogenetic implications. *Molecular Biology Evolution* 3(1): 1-18.
- IUCN. 2014. Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 November 2014.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(16): 6196-200
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007 Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lekagul B, Mc Neely JA. 1988. *Mammals of Thailand*. 2nd ed. Bangkok. Saha Karn Bhaet, Co.
- Meijaard E, Groves CP. 2004. A taxonomic revision of the *Tragul* mouse-deer. *Zoological Journal of the Linnean Society* 140: 63-102.
- Miller GS. 1903. Descriptions of eleven new Malayan mouse deer. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 16: 3–44
- Miyamoto MM, Kraus F, Ryder A. 1990. Phylogeny and evolution of antlered deer determined from mitochondrial DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 826: 127-131.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 1: 269-292.

- Nowak RM. 1999. *Walker's Mammals of the World*. 6th edition. Baltimore. Johns Hopkins University Press.
- Osawa Syozo, Zhi-Hui Su, Yuki Imura. 2004. *Molecular Phylogeny and Evolution of Carabid Graound Beetles*. Springer-Verlag Tokyo: SNP Best-set Typesetter Ltd., Hong Kong.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729
- Wilson DE, Reeder DA. 1993. *Mammal species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 2nd ed. Washington DC. Smithsonian Institution Press.