

Keragaman Genetik Gen Penyandi *Dehydrogenase Sub-unit 3 Mitokondria* pada Monyet Hantu (*Tarsius sp.*)

(GENETIC DIVERSITY OF MITOCHONDRIAL DEHYDROGENASE SUB-UNIT 3
GENE ON TARSIVS SP.)

Rini Widayanti¹, Niken Satuti Nur Handayani², I Made Budiarsa³

¹Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna No. 2, Karangmalang, Sleman, Telpon: 0274-798893, 085878931444.
Email: riniwida@yahoo.co.uk.

²Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Tadulako, Sulawesi Tengah

ABSTRAK

Tarsius merupakan salah satu satwa endemik Indonesia yang keberadaannya terancam punah. Upaya konservasi secara *insitu* dan *exsitu* pada satwa ini akan memperoleh hasil yang lebih sempurna apabila keragaman genetiknya diketahui dengan pasti. Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari keragaman genetik spesifik *Tarsius sp.* berdasarkan sekuen penyusun gen *Dehydrogenase Sub-unit 3 (ND3)*. Sekuensing DNA menggunakan primer ND3 *Forward* dan ND3 *Reverse* menghasilkan sekuen 437 nt. Hasil sekuen fragmen ND3 dilakukan penjajaran berganda dengan primata lain yang diambil dari Genbank menggunakan perangkat lunak Clustal W, dan selanjutnya dianalisis menggunakan MEGA versi 4.1. Satu situs nukleotida beragam (*Simple nucleotide polymorphysm, SNP*) didapatkan pada penelitian ini yaitu pada nukleotida nomor 24. Jarak genetik berdasarkan sekuen nukleotida ND3 menggunakan metode Kimura 2-parameter menghasilkan jarak genetik terkecil 0%, paling tinggi 0,03% dan rata-rata 0,01%. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metoda *Neighbor joining* tidak dapat membedakan antara *T. dianae* (asal Sulawesi Tengah), *T. spectrum* (asal Sulawesi Utara) dan *T. bancanus* (asal Lampung, Sumatera Selatan).

Kata kunci: *Tarsius sp.*, gen ND3, nukleotida, sekuensing

ABSTRACT

Tarsius is an endemic species in Indonesia but is getting threatened. In-situ and ex-situ conservation of this species would yield better results when its genetic information and diversity determined. The objective of this research was to study the genetic diversity of ND3 gene of *Tarsius sp.* Based on sequencing of PCR products using primer ND3F and ND3R resulted in 437 nts base sequence. Results of ND3 fragments sequencing were put on multiple alignment with other primates from Genbank using of software Clustal W, and then were analyzed using MEGA program version 4.1. A different nucleotide site was found (nucleotide no. 24). The genetic distance based on nucleotide ND3 was calculated using Kimura 2-parameter model. The genetic distance showed the smallest genetic distance 0%, the biggest 0,03% and average 0,01%. The phylogenetic tree using neighbor joining method based on the sequence of nucleotide ND3 gene could not be used to differentiate among *T. Dianae* (from Central Sulawesi), *T. Spectrum* (from North Sulawesi) and *T. bancanus* (from Lampung, South Sumatera).

Key words: *Tarsius sp.*, ND3 gene, nucleotide, mt-DNA sequens

PENDAHULUAN

Tarsius atau monyet hantu merupakan satwa primata langka dan endemik Sulawesi yang dilindungi sejak tahun 1930. Perlindungan tersebut juga diprkuat oleh Undang-Undang No. 5/1990 dan PP No. 7/1999. Di dalam

International Union for Conservation Nature and Natural Resourches (IUCN) *Tarsius* termasuk dalam kategori *endangered* dan termasuk satwa *insufficiently known*, atau belum diperoleh pemahaman yang cukup tentang keberadaannya (Mursidin, 2008). Oleh walau status monyet hantu tergolong satwa

endemik namun populasinya semakin menurun, sehingga usaha pelestarian harus segera dilakukan secara serius, baik secara *in situ* maupun *ex situ*.

Keanekaragaman spesies *Tarsius* berdasarkan pada perbedaan morfologi telah dilakukan oleh Musser dan Dagosto (1987) dan Groves (2001). Mereka mengelompokkan *Tarsius* ke dalam 6 spesies, yaitu 5 spesies (*T. spectrum*, *T. diana*, *T. pumilus*, *T. sangiriensis* dan *T. pelengensis*) berada di Sulawesi dan 1 spesies (*T. bancanus*) berada di Sumatera Selatan dan Kalimantan. Selanjutnya, Shekelle dan Leksono (2004) melaporkan di Sulawesi saat ini berdasarkan pada data morfologi dan vokalisasi telah ditemukan 16 populasi *Tarsius* (lima populasi sudah diberi nama oleh peneliti sebelumnya) yang kemungkinan dapat menjadi spesies tersendiri. Shekelle et al., (2008) juga melaporkan bahwa adanya satu spesies baru di Sulawesi yang diberi nama *T. tumpara*. Secara morfologi, *T. bancanus* dan *Tarsius* yang berasal dari Sulawesi sangat sulit dibedakan, sehingga perlu upaya pengkajian dari segi genetik untuk membedakan masing-masing spesies *Tarsius*.

Pengungkapan status genetik spesies *Tarsius* merupakan landasan untuk penentuan tujuan dan arah serta pengembangan kegiatan konservasi. Sampai saat ini, informasi tersebut masih terbatas sehingga perlu dilakukan penelitian-penelitian lanjutan, salah satunya melalui pendekatan molekuler dengan teknik sekuensing yang telah berkembang dengan pesat.

Sekuen DNA mitokondria dipilih sebagai penanda genetik karena jumlah kopinya banyak, berukuran relatif kecil (sekitar 16,5 kb), diturunkan dari induk betina (maternal), dan beberapa gen dalam mitokondria mutasinya lebih cepat daripada gen inti (Wertz, 2000). Menurut Majerus et al., (1996), genom mitokondria mempunyai kecepatan evolusi 5-10 kali lebih cepat daripada genom inti. Daerah *coding* dan *non coding* DNA mitokondria sering digunakan untuk penelitian tentang evolusi dan hubungan kekerabatan antar spesies hewan oleh karena mutasinya tinggi.

Gen penyandi *Dehydrogenase Sub-unit 3* (*ND3*) mempunyai ukuran 347 pb, terletak di antara gen penyandi *tRNA^{Gly}* (di sebelah kiri atau depan) dan gen penyandi *tRNA^{Arg}* (di sebelah kanan atau belakang) pada mt-DNA (Schmitz et al., 2002). Menurut Galina et al., (2003) pada beberapa spesies hewan gen penyandi *COX 2* dan *ND3* memiliki angka mutasi yang

lebih besar dibanding gen-gen penyandi lainnya di dalam DNA mitokondria.

Kajian molekuler gen penyandi *12SrRNA* pada *Tarsius* telah dilakukan Shekelle (2003), Karena homologinya tinggi maka gen tersebut tidak dapat dijadikan penanda genetik untuk membedakan antar spesies *Tarsius*. Demikian juga yang telah dilakukan Widayanti dan Solihin (2007), kajian molekuler daerah *D-loop* pada *Tarsius* tidak dapat dijadikan sebagai penanda genetik serta Yuriadi et al., (2010) melaporkan bahwa sekuen *D-loop* pada Kuda sangat kecil keragamannya sehingga tidak dapat untuk membedakan kuda asli tengger dengan kuda lokal Indonesia lainnya. Gen *Cyt b* dapat digunakan sebagai penanda genetik walaupun hanya pada tingkat nukleotida saja (pada tingkat asam amino kurang mendukung) (Widayanti et al., 2006). Selanjutnya Widayanti et al., (2010) juga melakukan kajian pada gen *COX2*, namun hanya dapat membedakan antara spesies *Tarsius* yang berasal dari Sulawesi terhadap spesies *Tarsius* yang berasal dari Lampung, Sumatra Selatan. Sedangkan di antara spesies *Tarsius* yang ada di Sulawesi tidak dapat dibedakan. Oleh karena itu masih dibutuhkan penelitian lanjutan untuk mendapatkan penanda genetik lain yang lebih spesifik pada masing-masing spesies *Tarsius*.

METODE PENELITIAN

Sejumlah 5 sampel darah *T. bancanus* diperoleh dari Lampung, Sumatera Selatan, *T. spectrum* sebanyak 1 ekor dari Sulawesi Utara dan 1 ekor *T. diana* dari Sulawesi Tengah. DNA total diekstraksi dari darah. Darah diambil dari pembuluh darah pada pangkal ekor, ditambah larutan EDTA 10% sebagai antikoagulan. Isolasi dan purifikasi DNA menggunakan DNA Isolation Kit (Qiagen). Sampel DNA yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C . Hasil isolasi DNA dideteksi dengan dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% dengan menggunakan buffer 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM asam borat dan 2 mM EDTA, pH 8,0). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ($\lambda = 260 \text{ nm}$) setelah gel diwarnai dengan *cyber save* (Invitrogen).

Desain primer oligonukleotida spesifik untuk gen *ND3* dilakukan berdasarkan database dari *Genebank* dengan menggunakan program Clustal W. Pasangan primer dipilih pada daerah yang memiliki kesamaan nukleotida yang tinggi

(konser-vatif). Selanjutnya primer oligonukleotida dianalisis menggunakan *software Design Oligoprimer*. Urutan basa primer untuk meng-amplifikasi gen *ND3* disajikan pada Tabel 1.

DNA total hasil ekstraksi digunakan sebagai cetakan DNA untuk proses amplifikasi. Komposisi 30 µl campuran pereaksi PCR terdiri dari 2,5 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq DNA polimerase* beserta bufernya.

Amplifikasi DNA dengan PCR pada penelitian ini menggunakan mesin PCR (Invinigen, Biotech, Inc). Amplifikasi gen *ND3* dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, 51°C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72°C selama 1 menit untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri 5 menit pada 72°C.

Produk PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% dengan menggunakan buffer 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Mupid exu). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV (λ = 260 nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave* (Invitrogen). Penanda DNA dengan ukuran 100 pb (RBC) digunakan sebagai penunjuk berat molekul.

Produk PCR selanjutnya dipergunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi sekuensing DNA. Sekuensing dilakukan dengan metode *Chain termination*, masing-masing sampel dilakukan 2 reaksi sekuensing yaitu menggunakan primer ND3F dan ND3R. Sekuensing dilakukan di PT Charoend Pokphand Indonesia, Jakarta.

Kondisi untuk reaksi sekuensing adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik, 51°C selama 45 detik, 72°C selama 1 menit; reaksi amplifikasi sebanyak 35

siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada 72°C. Sekuensing DNA menggunakan alat sekuensing DNA otomatis *ABI Prism 3.1*.

Data sekuen DNA dari gen *ND3* hasil sekuensing dan sekuen DNA yang diperoleh dari data bases internasional disejajarkan dengan perangkat lunak program Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Selain berdasarkan sekuen nukleotida, gen *ND3* dianalisis berdasarkan urutan asam amino dari basa-basa yang diterjemahkan mengikuti *vertebrate mitochondrial translation code* yang ada dalam MEGA versi 4.1. Urutan asam amino *sinonimus* dianalisis secara manual berdasarkan sekuen triplet kodon yang mengalami mutasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sepasang primer pada penelitian ini dirancang untuk mengamplifikasi daerah gen *ND3*. Produk PCR hasil amplifikasi menggunakan primer ND3F dan ND3R adalah sekitar 587 pb. Hasil PCR yang dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% yang diwarnai dengan *cyber save* (Invitrogen) dapat dilihat pada Gambar 1.

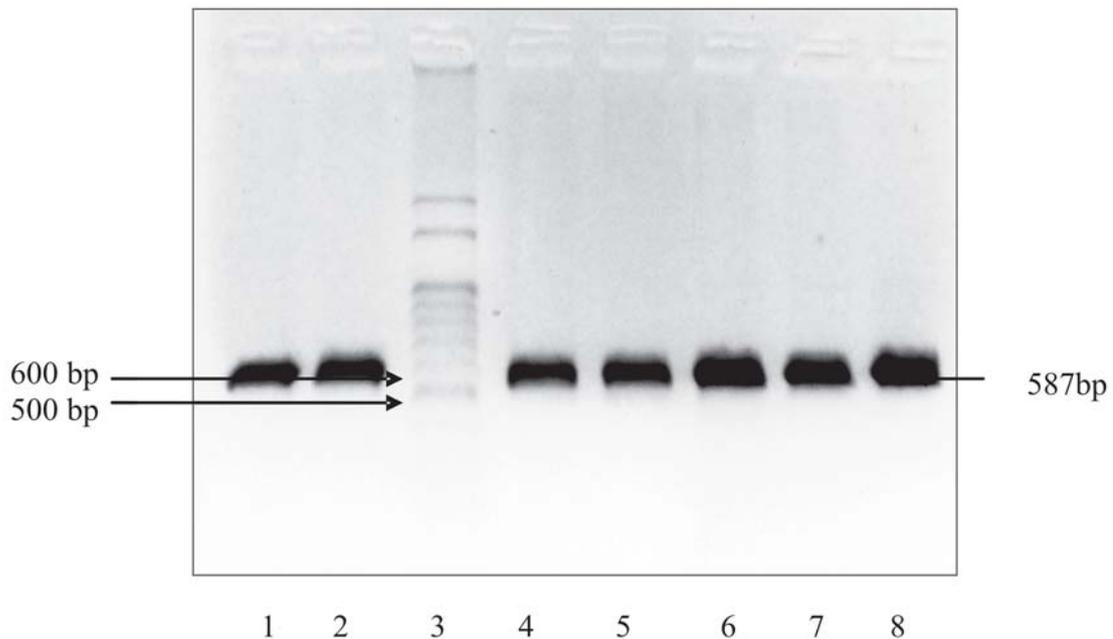
Berdasarkan sekuen genom mt-DNA *T. bancanus* (Schmitz *et al.*, 2002) fragmen DNA pada penelitian ini terletak pada gen *COX3* (basa ke 761 dari ujung 5' gen *COX3*), gen *tRNA^{Gly}*, gen *ND3*, gen *tRNA^{Arg}* dan pada gen *ND4L* (basa ke 78 dari ujung 5' gen *ND4L*). Besarnya fragmen DNA yang teramplifikasi pada penelitian ini setelah diplotkan dengan data sekuen DNA mitokondria *T. bancanus* hasil penelitian Schmitz *et al.*, (2002) adalah 587 pb, yaitu terdiri dari 24 pb fragmen gen *COX3*, 71 pb gen *tRNA^{Gly}*, 347 pb gen *ND3*, 67pb gen *tRNA^{Arg}*, dan 78 pb fragmen gen *ND4L*. Skema letak penempelan primer untuk mengamplifikasi gen *ND3* dapat dilihat pada Gambar 2.

Analisis keragaman nukleotida dilakukan setelah semua sekuen DNA hasil penelitian dan primata spesies lain yang diambil dari *Genbank*

Tabel 1. Primer untuk amplifikasi gen *ND3* pada *Tarsius sp.*

| Target | R/F | Urutan Basa | Jml basa | Tm |
|--------|-----|-------------------------------|----------|-----------|
| 587 bp | F | 5' ACTCTATCTATTGATGAGGATC 3' | 22 | 57, 78° |
| | R | 5' AGATGTGAGCGATAAATTAGTAT 3' | 23 | C58, 37°C |

Keterangan : R : Reverse; F : Forward; bp : base pair; Tm : Temperatur melting



Gambar 1. Hasil PCR gen *ND3* *T.bancanus*, *T. spectrum* dan *T.diana* menggunakan primer ND3F dan ND3R pada gel agarose 1,2%
Keterangan: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 produk PCR dengan ukuran \pm 587 bp. 3. DNA ladder 100bp (RBC), 1. *T. diana*, 2. *T. spectrum*, 4-8. *T.bancanus*

disejajarkan berganda (*multiple alignment*). Hasil sekuensing sepanjang 587 nukleotida (nt) setelah disejajarkan dengan sekuen *T. bancanus* (*Genbank*), dipilih 347 nt yang merupakan sekuen gen *ND3*. Tiga ratus empat puluh tujuh basa nukleotida ini menyandi 115 asam amino. Spesies primata yang digunakan sebagai pembanding adalah *T. bancanus* (Nomor akses NC_002811), *Nycticebus coucang* (NC_002765), *Cebus albifrons* (NC_002763), *Macaca sylvanus* (NC_002764), *Macaca mullata* (NC_005943), *Hylobates lar* (NC_002082), *Pongo pygmaeus* (NC_002083), *Pongo abelii* (NC_002083), *Pan paniscus* (NC_001644), *Pan troglodytes* (NC_001643), *Gorilla gorilla* (NC_001645), *Homo sapiens* (NC_001807).

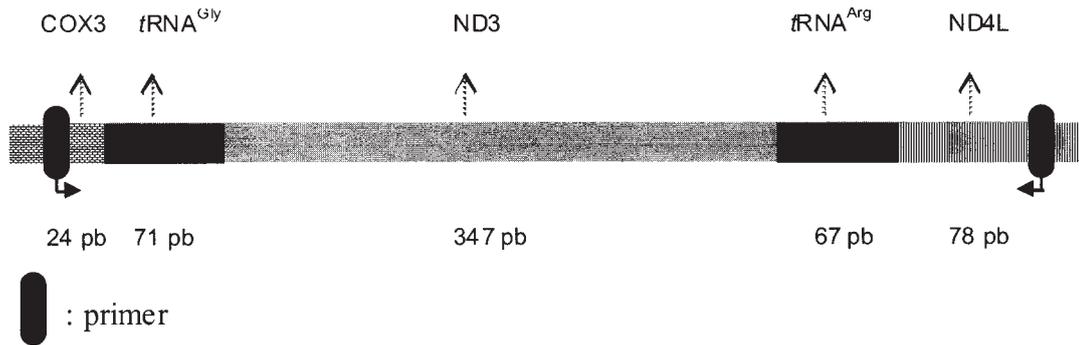
Hasil penjajaran berganda sekuen nukleotida gen *ND3* semua sampel *Tarsius* pada penelitian ini tidak terjadi insersi dan delesi sehingga ukurannya tetap sama. Demikian juga terhadap DNA primata lain yang digunakan sebagai pembanding. Perubahan yang terjadi adalah substitusi. Hasil perbandingan ke 347 nukleotida *Tarsius* dengan *T. bancanus* pembanding (Schmitz *et al.*, 2002), sebanyak 28 nukleotida dikategorikan sebagai situs beragam dan berdasarkan pada sekuen asam amino ditemukan 4 situs asam amino yang beragam.

Ke empat situs asam amino tersebut dapat membedakan antara *T. bancanus* pembanding dengan *T. bancanus*, *T. spectrum* dan *T.diana*, yaitu urutan asam amino ke 5 (M dengan L), 12 (A dengan T), 29 (T dengan M), dan 93 (T dengan A). *T. spectrum* dan *T. diana* pada penelitian ini tidak ditemukan perbedaan pada tingkat asam amino maupun nukleotida. Di antara sampel-sampel *Tarsius* pada penelitian ini (tanpa pembanding) ditemukan 1 situs nukleotida beragam dan tidak ditemukan adanya asam amino beragam. Situs nukleotida yang beragam pada penelitian ini terletak pada urutan basa ke 24, yaitu basa cytosin pada *T.bancanus*2, dan lainnya pada *T. diana* dan *T. spectrum*, *T. bancanus*3, *T. bancanus*7, *T. bancanus*8, dan *T. bancanus*11 adalah basa timin. Sekuen nukleotida *Tarsius sp* hasil penelitian dengan *T. bancanus* pembanding disajikan pada Tabel 2. Berdasar sekuen asam amino dari ketiga spesies *Tarsius* pada penelitian ini tidak ada perbedaan.

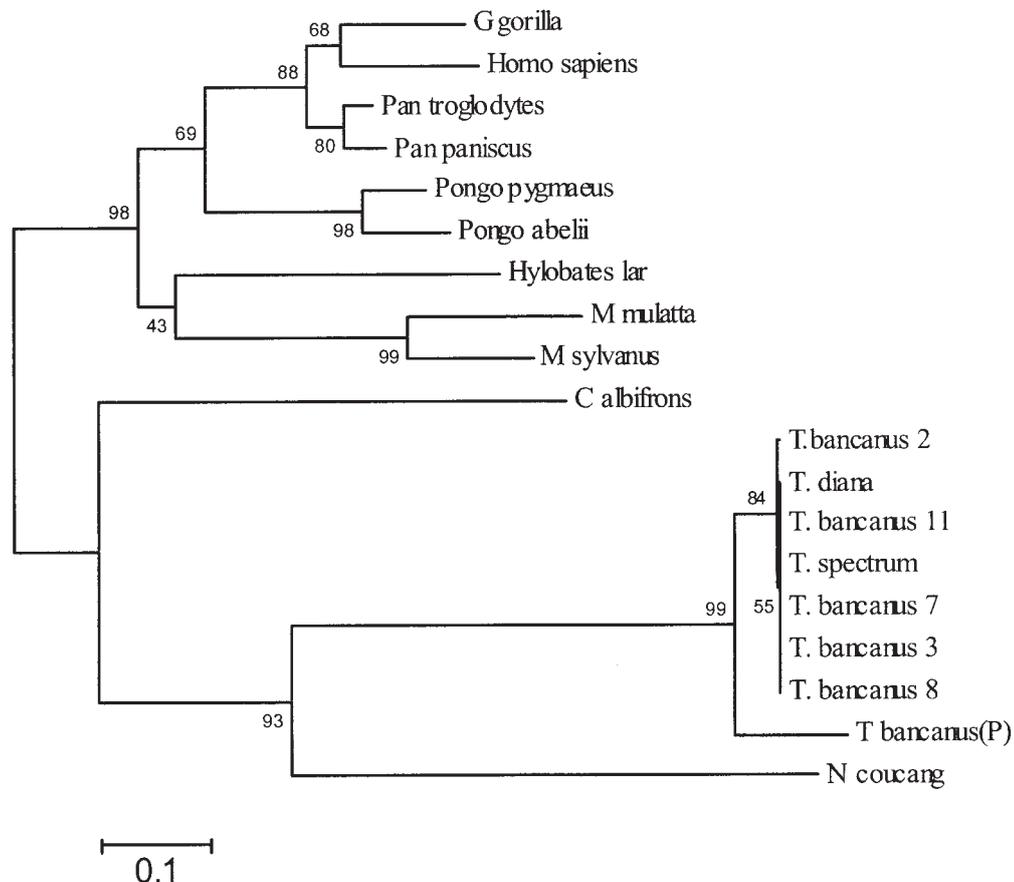
Jarak genetik dengan metode Kimura- 2 parameter berdasar sekuen nukleotida gen *ND3* (347 nt) *Tarsius* pada penelitian ini paling kecil 0 %, yaitu antara *T. spectrum* dan *T. diana*; *T. bancanus*3 dan *T. bancanus*7; *T.bancanus*8 dan *T. bancanus*11, dan nilai paling besar 0,03%

Tabel 2. Hasil sekuensing gen *ND3* pada *Tarsius sp.*

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| T.bancanus2 | ATA | AAT | TTA | ATT | CTA | TCA | CTA | ATC | ACA | AAC | ATA | ACC | CTT | GCT | TTA | [45] |
| T.bancanus3 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | T | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [45] |
| T.bancanus7 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | T | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [45] |
| T.bancanus8 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | T | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [45] |
| T.bancanus11 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | T | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [45] |
| T.spectrum | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | T | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [45] |
| T.dianae | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | T | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [45] |
| T_bancanus (P) | ... | ... | ... | ... | A | ... | ... | T | ... | T | ... | G | ... | A | C | [45] |
| T.bancanus2 | CTC | CTA | GTC | TCC | ATC | GCA | TTC | TGA | CTC | CCA | CAA | CTT | AAC | ATA | TAT | [90] |
| T.bancanus3 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [90] |
| T.bancanus7 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [90] |
| T.bancanus8 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [90] |
| T.bancanus11 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [90] |
| T.spectrum | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [90] |
| T.dianae | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [90] |
| T_bancanus (P) | ... | T | ... | T | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | CG | C | [90] |
| T.bancanus2 | ACA | GAA | AAA | TCA | AGC | CCC | TAT | GAA | TGT | GGA | TTT | GAC | CCA | ACA | GAA | [135] |
| T.bancanus3 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [135] |
| T.bancanus7 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [135] |
| T.bancanus8 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [135] |
| T.bancanus11 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [135] |
| T.spectrum | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [135] |
| T.dianae | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [135] |
| T_bancanus (P) | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | C | G | ... | ... | T | ... | ... | ... | [135] |
| T.bancanus2 | TCA | GCC | CGC | CTT | CCC | TTC | TCT | ATA | AAA | TTT | TTC | CTA | ATT | GCC | ATT | [180] |
| T.bancanus3 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [180] |
| T.bancanus7 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [180] |
| T.bancanus8 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [180] |
| T.bancanus11 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [180] |
| T.spectrum | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [180] |
| T.dianae | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [180] |
| T_bancanus (P) | ... | ... | ... | C | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | C | ... | ... | [180] |
| T.bancanus2 | ACC | TTC | CTC | TTA | TTT | GAC | CTG | GAA | ATC | GCC | CTC | CTT | CTC | CTT | CTC | [225] |
| T.bancanus3 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [225] |
| T.bancanus7 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [225] |
| T.bancanus8 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [225] |
| T.bancanus11 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [225] |
| T.spectrum | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [225] |
| T.dianae | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [225] |
| T_bancanus (P) | ... | T | ... | C | T | A | G | ... | ... | ... | T | ... | ... | C | ... | [225] |
| T.bancanus2 | CCC | TGA | GCC | ACC | CAA | ATA | ACA | AAT | CTT | AGT | CTC | ATA | ATA | TTT | ATA | [270] |
| T.bancanus3 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [270] |
| T.bancanus7 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [270] |
| T.bancanus8 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [270] |
| T.bancanus11 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [270] |
| T.spectrum | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [270] |
| T.dianae | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [270] |
| T_bancanus (P) | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [270] |
| T.bancanus2 | GCC | CTC | GCA | CTA | ATT | TCT | ATT | CTA | GCC | CTA | GGC | CTT | GCA | TAC | GAA | [315] |
| T.bancanus3 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [315] |
| T.bancanus7 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [315] |
| T.bancanus8 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [315] |
| T.bancanus11 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [315] |
| T.spectrum | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [315] |
| T.dianae | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | [315] |
| T_bancanus (P) | ... | A | A | ... | C | ... | ... | ... | ... | ... | ... | C | ... | ... | ... | [315] |



Gambar 2. Skema letak penempelan primer ND3F dan ND3R untuk mengamplifikasi daerah gen ND3 pada *Tarsius sp.* (Schmitz et al., 2002)



Gambar 3. Filogram menggunakan metode *Neighbor joining* dari nukleotida daerah gen ND3 (berukuran 347 nt) pada *Tarsius sp.* dan beberapa spesies primata lain

yaitu antara *T. bancanus2* terhadap *T. dianae* dan *T. spectrum*, *T. bancanus3*, *T. bancanus7*, *T. bancanus8*, dan *T. bancanus11*. Jarak genetik keseluruhan berdasarkan nukleotida pada penelitian ini adalah 0,01%. Apabila dibandingkan dengan *T. bancanus* (pembanding) jarak genetik rata-rata adalah 2,2%.

Jarak genetik *Tarsius sp.* berdasar sekuen nukleotida gen ND3 pada penelitian ini adalah

0,01%, sedangkan jarak genetik pada gen COX2 (3,2%) (Widayanti et al., 2010), pada gen *Cyt b* (13,1%) (Widayanti et al., 2006) dan jarak genetik pada daerah *D-loop* (2,3%) (Widayanti dan Solihin, 2007). Di antara ke-empat sekuen fragmen DNA ini yang paling baik digunakan sebagai penanda genetik adalah gen *Cyt b*, walaupun pada tingkat asam amino gen *Cyt b* tersebut kurang memberikan hasil yang

memuaskan. Oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian pada gen-gen lain yang dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk membedakan spesies-spesies *Tarsius*.

Analisis filogenetik pada penelitian ini menggunakan metode *Neighbor Joining* dilakukan terhadap 347 nukleotida yang menyusun gen *ND3* parsial dengan spesies primata lain yang diambil dari *Genbank* sebagai pembanding. Gambar 3 menyajikan filogram berdasar sekuen nukleotida gen *ND3*. Filogram yang dihasilkan terlihat bahwa *T. spectrum*, *T. diana* (asal Sulawesi), dan *T. bancanus* (asal Lampung) berada dalam satu subcabang, sedangkan *T. bancanus* pembanding membentuk subcabang tersendiri. Pemisahan ini didukung oleh nilai *bootstrap* yang tinggi (99%). Pola filogram tersebut menunjukkan bahwa hasil yang didapat berbeda dengan pembagian spesies *Tarsius* berdasar morfologi dan vokalisasi (Musser dan Dagosto 1987; Niemitz *et al.*, 1991). Hal ini disebabkan oleh adanya homologi nukleotida yang sangat tinggi antara *Tarsius* asal Sulawesi, yaitu *T. spectrum* dan *T. diana* dan *T. bancanus* asal Lampung.

Berdasar morfologi, sampai saat ini *Tarsius* masih menjadi perdebatan apakah masuk subordo *Strepsirrhini* (dahulu *prosimian*, kelompok primata kecil) atau *intermedier* (dipertengahan) antara subordo *anthropoidea* (kelompok primata besar) dan *prosimian*, karena menunjukkan ciri-ciri di antara keduanya. Ciri-ciri yang sama dengan *prosimian* adalah yaitu *nocturnal*, mata besar, telinga dapat digerakkan, mempunyai "toilet claw" pada jari kaki kedua dan ketiga, serta mandibula tersusun dari dua tulang. Ciri-ciri yang sama dengan *anthropoidea* adalah cermin hidung kering dan berambut, gigi seri bawah menghadap ke atas, dan plasenta *hemochorial* (Napier dan Napier 1983). Demikian juga hasil yang diperoleh pada penelitian ini, filogram berdasarkan pada urutan nukleotida gen *ND3* *Tarsius* sp., *N. coucang* dan *Cebus albifrons* berada dalam satu kelompok ke dalam subordo *prosimian*. Hasil ini sama dengan pengelompokan berdasarkan sekuen nukleotida dan asam amino gen *Cyt b* (Widayanti *et al.*, 2006) dan gen *COX2* (Widayanti *et al.*, 2010), akan tetapi berdasar urutan nukleotida daerah *D-loop*, *Tarsius* sp. terletak dipertengahan (*intermedier*) antar sub ordo *prosimian* dan *anthropoidea* (Widayanti dan Solihin, 2007).

Untuk lebih memperjelas pengelompokan *Tarsius* di dalam klasifikasi primata, mungkin perlu penelitian lebih lanjut pada gen lain dari mt-DNA.

SIMPULAN

Jarak genetik antara *T. spectrum* dan *T. diana* sangat dekat (0,0%), dan rata-rata jarak genetik antara *T. bancanus* dengan *T. spectrum* dan *T. diana* adalah 0,01%.

Sekuen nukleotida dan asam amino gen *ND3* tidak dapat digunakan untuk membedakan antara *T. bancanus*, *T. diana* dan *T. spectrum*, tetapi hanya dapat digunakan untuk membedakan ketiga spesies *Tarsius* tersebut dengan *T. bancanus* pembanding. Berdasar sekuen gen *ND3* *Tarsius* dikelompokkan ke dalam subordo *Strepsirrhini*.

SARAN

Perlu penelitian lanjutan pada gen-gen lainnya sehingga didapatkan penanda genetik untuk identifikasi spesies-spesies *Tarsius*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada DIKTI melalui proyek Hibah Bersaing XVI Perguruan Tinggi tahun 2009 yang telah memberi dukungan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Galina V, Glazko, Nei M. 2003. Estimation of Divergence Times for Major Lineages of Primate Species. *Mol Biol Evol* 20(3):424-434. 2003
- Groves C. 2001. *Primate taxonomy*. London: Smithsonian Inst Pr.
- Majerus M, Amos W, Hurst G. 1996. *Evolution: The four billion year war*. Malaysia: Longman: 198-203, 213.
- Mursidin. 2008. *Tarsius* Di Taman Nasional Bantimurung, Sulawesi Selatan. *Tropika*. 12 (2): 30-31.
- Musser GG, Dagosto M. 1987. The identity of *Tarsius pumilus*, a pygmy species endemic to the montane mossy of Central Sulawesi. *Am Museum Novitates*. 2867: 1-53.

- Napier JR, Napier PH. 1983. The natural history of the primates. British Museum (Natural History). Cromwell Road. London.
- Niemitz C, Nietsch A, Warter S, Rumpler Y. 1991. *Tarsius diana*: A New Primate Species from Central Sulawesi (Indonesia). *J Folia Primatol* 56:105-116.
- Schmitz J, Ohme M, Zischler H. 2002. The complete mitochondrial sequence of *Tarsius bancanus*: evidence for an extensive nucleotide compositional plasticity of primate mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 19: 544-553.
- Shekelle M, Leksono SM. 2004. Strategi Konservasi di Pulau Sulawesi dengan Menggunakan *Tarsius* Sebagai Flagship Species. *Biota* 9:1-10.
- Shekelle M. 2008. The History and Mystery of the Mountain Tarsier, *Tarsius pumilus*. *Primate Conservation* (23):121-124.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, Position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.
- Wertz DC. 2000. The DNA ancestree. Geneletter 1(8). <http://www.geneletter.org/09-01-00/features/sncestreea.html>. (18 Agustus 2004)
- Widayanti R, Solihin DD, Sajuthi D, Perwita D. 2006. Kajian Penanda Genetik Gen Cytochrome B pada *Tarsius sp.* *J Sain Vet* 24 (1): 1-8
- Widayanti R, Solihin DD. 2007. Kajian Penanda Genetik *Tarsius bancanus* dan *Tarsius spectrum* dengan Sekuen D-Loop Parsial dari DNA Mitokondria. *Biota* 12(3).
- Widayanti R, Handayani NSH, Budiarsa IM. 2010. Kajian molekular *Tarsius sp.* pada gen penyandi *Cytochrome Oxidase* sub-unit 2 (COX2) mitokondria. *Biota* (In pres).
- Yuriadi, Widayanti R, Purwantoro A, Tabbu CR. 2010. Kajian Molekuler Daerah D-Loop Parsial DNA Mitokondria Kuda (*Equus caballus*) Asli Tengger. *J Veteriner* 11(1): 1-6.