

Keragaman Genetik Sekuen Gen *ATP Synthase FO Subunit 6 (ATP6)* Monyet Hantu (*Tarsius*) Indonesia

(GENETIC DIVERSITY STUDY OF ATP6 GENE SEQUENCES OF TARSIIERS FROM INDONESIA)

Rini Widayanti¹, Niken Satuti Nur Handayani², Hery Wijayanto³

¹Bagian Biokimia, ³Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Jl. Fauna No. 2, Karangmalang, Sleman, Yogyakarta, Telpon:0274-798893, 085878931444.

Email: riniwida@yahoo.co.uk.

²Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta

ABSTRAK

Dalam upaya konservasi, identifikasi spesies monyethantu/*Tarsius* berdasar pada karakter morfologi dan molekuler sangatlah diperlukan. Sampai saat ini identifikasi terhadap satwa tersebut hanya berdasarkan morfologi dan vokalisasi, yang sulit dipakai untuk mengidentifikasi masing-masing spesies tarsius. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji keragaman genetik spesifik *Tarsius sp.* berdasarkan sekuen penyusun gen *ATP synthase FO subunit 6 (ATP6)*. Sekuensing DNA menggunakan primer ATP6 *Forward* dan ATP6 *Reverse* menghasilkan sekuen 681 nt. Hasil sekuen fragmen ATP6 dilakukan penjajaran berganda dengan primata lain yang diambil dari *Genebank* menggunakan perangkat lunak Clustal W, dan selanjutnya dianalisis menggunakan MEGA versi 4.0. Empat situs nukleotida beragam (*Single nucleotide polymorphysm, SNP*) didapatkan pada penelitian ini yaitu pada nukleotida nomor 288, 321, 367, dan 663. Jarak genetik berdasarkan sekuen nukleotida gen *ATP6* menggunakan metode Kimura 2-parameter menghasilkan jarak genetik terkecil 0%, paling tinggi 0,8% dan rata-rata 0,2%. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metoda *Neighbor joining* tidak dapat membedakan antara *T.dianae* (asal Sulawesi Tengah), *T. spectrum* (asal Sulawesi Utara), *T. bancanus* (asal Lampung, Sumatera Selatan) dan *T.bancanus* asal Kalimantan Barat.

Kata kunci: *Tarsius sp.*, gen ATP6, nukleotida, sekuensing

ABSTRACT

In a conservation effort, the identification of Tarsier species, on the bases of the morphological and molecular characteristic is necessary. Up to now, the identification of the animals were based on the morphology and vocalizations, which is extremely difficult to identify each, tarsier species. The objective of this research was to study the genetic diversity on ATP6 gene of *Tarsius sp.* Based on sequencing of PCR product using primer ATP6F and ATP6R with 681 nts. PCR product. The sequence of ATP6 fragments were aligned with other primates from Gene bank with aid of software Clustal W, and were analyzed using MEGA program version 4.0. Three different nucleotide sites were found (nucleotide no. 288, 321 and 367). The genetic distance based on nucleotide ATP6 sequence calculated using Kimura 2-parameter model indicated that the smallest genetic distance 0%, biggest 0.8% and average 0, 2%. The phylogenetic tree using neighbor joining method based on the sequence of nucleotide ATP6 gene could not be used to differentiate among *T. Dianae* (from Central Sulawesi), *T. Spectrum* (from North Sulawesi), *T. bancanus* (from lampung, South Sumatera) and *T.bancanus* from West Kalimantan.

Key words: Tarsier sp., ATP6 gene, nucleotide, mt-DNA sequences

PENDAHULUAN

Tarsius atau disebut monyet hantu, memiliki daya tarik tersendiri karena memiliki bola mata yang besar, leher dapat diputar 180 derajat dan memiliki tubuh sangat kecil (+ 150 g). *Tarsius* merupakan salah satu primata endemik (untuk *Tarsius* di Sulawesi) Indonesia yang keberadaannya tersebar di pulau Sumatra, Kalimantan, Sulawesi dan pulau-pulau kecil di sekitarnya. Keanekaragaman spesies *Tarsius* berdasar perbedaan morfologi dikelompokkan ke dalam tujuh spesies, yaitu lima spesies (*T. spectrum*, *T. diana*, *T. pumilus*, *T. sangiriensis* dan *T. pelengensis*) ada di Sulawesi; satu spesies (*T. bancanus*) ada di Sumatera Selatan, Kalimantan dan Malaysia, serta *T. syrichta* berada di Philipina (Musser dan Dagosto, 1987; Groves, 2001). Keberadaan satwa ini sebagai sumber keragaman hayati Indonesia sekarang mulai memprihatinkan oleh karena semakin berkurangnya habitat yang ditempati dan juga pemanenan satwa sebagai hewan kesayangan. *Tarsius* merupakan satwa primata langka dan endemis Sulawesi yang dilindungi sejak tahun 1930, berdasarkan Undang-Undang No. 5/1990 dan PP No. 7/1999. Di dalam *International Union for Conservation Nature and Natural Resources* (IUCN) *Tarsius* termasuk dalam kategori *endangered* dan termasuk satwa *insufficiently known* (Mursidin, 2008). Usaha yang telah dilakukan untuk pelestarian satwa ini adalah dengan melalui program pelestarian satwa baik secara *in situ* maupun *ex situ*. Pengembalian *Tarsius* ke habitatnya (hasil konservasi *ex situ* atau hasil penangkaran liar) karena satwa ini secara morfologis sulit dibedakan, maka upaya untuk menanggulangi masalah tersebut adalah perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan penanda genetik untuk masing-masing spesies *Tarsius*. Sampai saat ini informasi mengenai status genetik spesies *Tarsius* masih terbatas sehingga perlu dilakukan penelitian-penelitian lanjutan, salah satunya melalui pendekatan molekular dengan teknik sekuensing yang telah berkembang dengan pesat.

Sekuen DNA mitokondria dipilih sebagai penanda genetik karena jumlah kopinya banyak sehingga mudah didapat dari sel, berukuran relatif kecil (sekitar 16,5 kb) sehingga mudah untuk diamplifikasi, diturunkan dari induk betina (maternal) dan beberapa gen dalam mitokondria mutasinya lebih cepat daripada gen inti (Wertz, 2000). Gen penyandi *ATP6*

mempunyai ukuran 681 pb, terletak di antara gen penyandi *ATP8* (di sebelah kiri atau depan) dan gen penyandi *cytochrome c oxidase* subunit 3 (*COX3*) (di sebelah kanan atau belakang) pada mt-DNA (Schmitz *et al.*, 2002). Menurut Forschler *et al.*, (2009), gen penyandi *ATP8* dan gen penyandi *ATP6* dapat digunakan untuk membedakan spesies burung kicau *Carduelis c. citronella* dan *Carduelis c. cossicana*.

Kajian molekuler gen penyandi *12SrRNA* pada *Tarsius* yang dilakukan Shekelle (2003) dan daerah D-loop *Tarsius sp.* (Widayanti dan Solihin, 2007) karena homologinya tinggi maka sekuen fragmen DNA mitokondria tersebut tidak dapat dijadikan penanda genetik. Selanjutnya Widayanti *et al.* (2006) dapat menggunakan gen *cytochrome b (Cyt b)* sebagai penanda genetik walaupun hanya pada tingkat nukleotida (pada tingkat asam amino kurang mendukung). Widayanti *et al.*, (2010a dan 2010b) juga melakukan kajian pada gen *cytochrome c oxidase* subunit 2 (*COX2*) dan gen NADH dehydrogenase subunit 3 (*ND3*). Sekuen nukleotida gen *COX2* dan asam aminonya hanya dapat membedakan antara spesies *Tarsius* yang berasal dari Sulawesi terhadap spesies *Tarsius* yang berasal dari Sumatra, sedangkan di antara spesies *Tarsius* yang ada di Sulawesi tidak dapat dibedakan. Sekuen gen *ND3* tidak dapat membedakan ketiga spesies *T. bancanus*, *T. spectrum*, dan *T. diana*. Untuk itu masih dibutuhkan penelitian lanjutan untuk mendapatkan sejumlah penanda genetik lain yang lebih spesifik untuk masing-masing spesies *Tarsius*. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan penanda genetik yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi masing-masing spesies *Tarsius*.

METODE PENELITIAN

Sampel *Tarsius* berupa darah dan jaringan, diambil dari habitat aslinya, yaitu *T. spectrum* dari Sulawesi Utara (4 ekor), *T. diana* dari Sulawesi Tengah (1 ekor), *T. bancanus* dari Sumatera Selatan (5 ekor), dan *T. bancanus* dari Kalimantan Barat (3 ekor).

Isolasi dan purifikasi DNA yang berasal dari contoh darah dan daun telinga menggunakan DNA Isolation Kit (Qiagen). Sampel DNA yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C . DNA dilihat kualitasnya dengan dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% dengan menggunakan buffer 1xTris Boric EDTA (TBE)

{89 mM Tris, 89 mM asam borat dan 2 mM *Ethylendiaminetetraacetic acid* (EDTA), pH 8,0}. Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar ultra violet (UV, $\lambda = 260$ nm) setelah gel diwarnai dengan *Cyber save* (Invitrogen).

Primer didisain sendiri berdasar data sekuen genom mitokondria *T. bancanus* (Nomor akses NC_002811). Urutan basa primer ATP6F dan ATP6R untuk mengamplifikasi gen ATP6 *Tarsius sp.* disajikan pada Tabel 1.

DNA total hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Proses amplifikasi menggunakan *Polymerase chain reaction* (PCR), *reaction Kit* (Kappa), dengan komposisi 25 μ l campuran pereaksi PCR, 100-300 ng DNA cetakan, 10 pmol masing-masing primer (ATP6F dan ATP6R) dan ddH₂O hingga mencapai volume akhir 50 μ l.

Amplifikasi DNA dengan PCR pada penelitian ini menggunakan mesin GeneAmp[®]PCR system 2400 (Perkin Elmer). Amplifikasi gen *ATP6* 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 1,5% dengan menggunakan buffer 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ($\lambda = 260$ nm) setelah gel diwarnai dengan *Cyber save* (Invitrogen). Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai penunjuk panjang pasangan basa.

Produk PCR hasil amplifikasi dimurnikan dengan menggunakan *GFX Column purification kit*, selanjutnya dipergunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi sekuensing DNA. Masing-masing sampel dilakukan dua reaksi sekuensing yaitu menggunakan pimer ATP6 *forward* dan primer ATP6 *reverse*. Sekuensing DNA dilakukan di PT. Wilmar Benih Indonesia.

Penjajaran berganda sekuen nukleotida gen *ATP6* dianalisis dengan bantuan perangkat lunak Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Analisis hasil berdasarkan sekuen nukleotida gen *ATP6* dengan bantuan perangkat lunak MEGA versi 4.0. Jarak genetik dianalisis dengan metode Kimura dengan dua parameter (Tamura *et al.*, 2007). Pohon filogenetik dianalisis berdasarkan sekuen nukleotida dan asam amino dengan metode *Neighbor joining* dengan nilai *bootstrap* 1000 x. Primata yang digunakan sebagai pembanding diambil dari data *Genbank* antara lain *T. bancanus* (Nomor akses NC_002811), *T. syrichta* (NC_012774), *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 DAN PEMBAHASAN

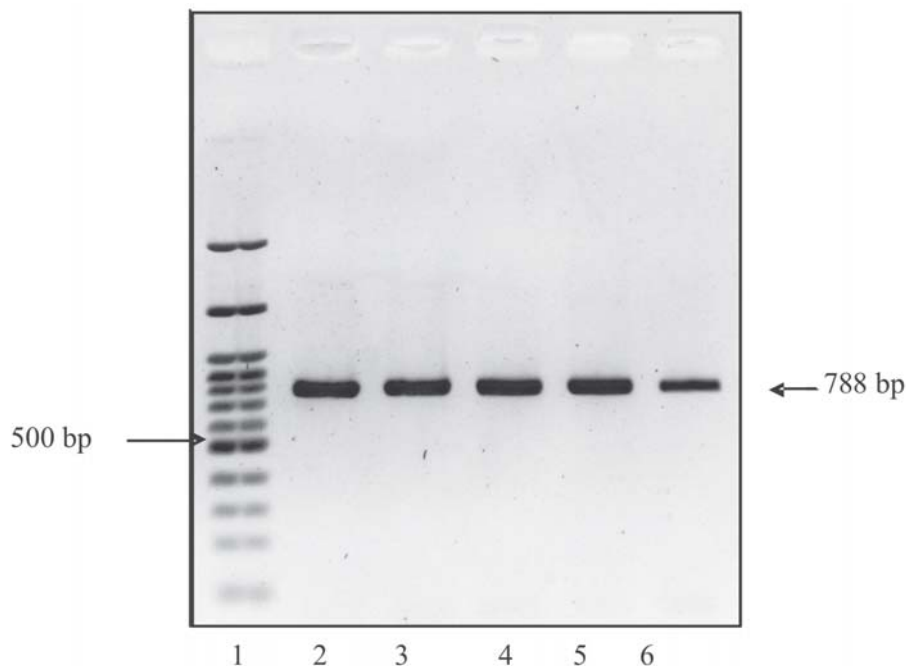
Sepasang primer pada penelitian ini didisain untuk mengamplifikasi daerah gen *ATP6*. Produk PCR hasil amplifikasi menggunakan primer ATP6F dan ATP6R adalah sekitar 788 pb. Hasil PCR yang dimigrasikan pada gel agarosa 1,5% yang diwarnai dengan *Cyber save* (Invitrogen) disajikan pada Gambar 1.

Fragmen DNA yang diamplifikasi pada penelitian ini terletak pada gen *ATP8* (basa ke 72 dari ujung 3' gen *ATP8*), gen *ATP6*, dan pada gen *COX3* (basa ke 35 dari ujung 5 gen *COX3*), dan besarnya fragmen DNA pada penelitian ini setelah diplotkan dengan data sekuen DNA mitokondria *T. bancanus* hasil penelitian Schmitz *et al.*, (2002) adalah 788 pb, yaitu terdiri dari 72 pb fragmen gen *ATP8*, 681 pb gen *ATP6*, dan 35 pb fragmen gen *COX3*. Skema letak penempelan primer untuk mengamplifikasi gen *ATP6* disajikan pada Gambar 2.

Tabel 1. Urutan basa primer ATP6F dan ATP6R untuk mengamplifikasi gen ATP6 *Tarsius*

Target	R/F	Urutan basa	Jumlah basa	Tm
ATP6	F	5' ACTGACTTATCCTCTTAACCTA 3'	22	57,78°C
ATP6	R	5' GTTGACTATATGATAGGCATGT 3'	22	57,78°C

Keterangan : ATP6 = ATP Synthase F0 Submit 6
 F = forward
 R = Reverse



Gambar 1. Hasil PCR gen ATP6 *Tarsius sp.* menggunakan primer ATP6F dan ATP6R pada gel agarose 1,5%

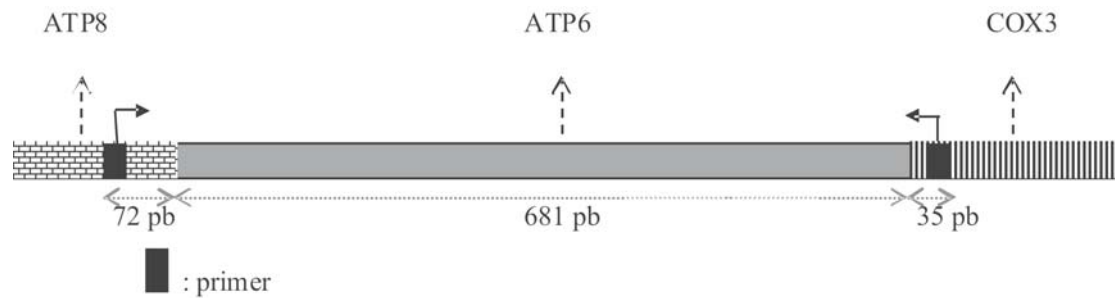
Keterangan: 1. DNA ladder 100 bp (RBC), 2-6 produk PCR dengan ukuran + 788 bp. 2,3. *T.bancanus*, 4,5. *T. spectrum* 6. *T.diana*

Sekuen DNA hasil penelitian dan primata spesies lain yang diambil dari *Genbank* disejajarkan berganda (*multiple alignment*), dan selanjutnya dilakukan analisis keragaman nukleotida. Hasil sekuensing sepanjang 788 nukleotida (nt) setelah disejajarkan dengan sekuen *T. bancanus* (*Genebank*), dipilih 681 nt yang merupakan sekuen penyusun gen *ATP6* yang akan menyandi 226 asam amino. Hasil sekuensing gen *ATP6 Tarsius sp.* disajikan pada Gambar 3.

Hasil penjajaran berganda sekuen nukleotida gen *ATP6* pada sampel penelitian dan sampel pembandingan dari *Genebank* menunjukkan bahwa mutasi basa hanya terjadi secara substitusi dan tidak mengalami insersi dan delesi sehingga ukurannya tetap sama. Hasil perbandingan ke 681 nukleotida *Tarsius* dengan *T. bancanus* pembandingan (Schmitz *et al.*, 2002), sebanyak 29 nukleotida dikategorikan sebagai situs beragam dan berdasar sekuen asam amino ditemukan empat situs asam amino yang beragam (Gambar 4). Tiga situs asam amino dari empat situs yang berbeda tersebut dapat untuk membedakan antara *T. bancanus* pembandingan dengan *T. bancanus* (asal Sumatra dan Kalimantan), *T. spectrum* dan *T.diana*, yaitu urutan asam amino ke 21 (I dengan V), 43 (I dengan V), dan 180 (I dengan V). *Tarsius*

spectrum dan *T. diana* pada penelitian ini tidak ditemukan perbedaan pada tingkat asam amino maupun nukleotida. Perbandingan antara sampel *Tarsius* penelitian dengan *T. syrichta* pembandingan ditemukan 86 situs nukleotida dan 19 situs asam amino yang berbeda. Situs asam amino yang berbeda tersebut adalah pada situs ke 23, 28, 29, 34, 35, 43, 47, 50, 59, 60, 73, 119, 123, 182, 185, 190, dan 197.

Di antara sampel-sampel *Tarsius* pada penelitian ini (tanpa pembandingan) ditemukan empat situs nukleotida beragam dan satu situs asam amino beragam. Situs nukleotida yang beragam pada penelitian ini terletak pada urutan basa ke 288, yaitu basa sitosin pada *T. spectrum5* dan *T.bancanus K1*, dan lainnya adalah basa timin; urutan basa ke 321, yaitu basa timin pada *T. spectrum5* dan *T.bancanus K1*, dan lainnya adalah basa sitosin; urutan basa ke 367, yaitu basa adenin pada *T. bancanus2* dan *T.bancanus3*, dan lainnya adalah basa guanin; dan urutan basa ke 663, yaitu basa sitosin pada *T.bancanus K1* dan lainnya adalah basa timin. Satu situs asam amino beragam di antara sampel *Tarsius* penelitian adalah pada situs asam amino ke 123, yaitu asam amino treonin (T) pada *T. bancanus2* dan *T.bancanus3*, dan asam amino alanin (A) pada sampel *Tarsius* lainnya.



Gambar 2. Skema letak penempelan primer ATP6F dan ATP6R untuk mengamplifikasi daerah gen *ATP6* pada *Tarsius sp.*

T.bancanus	2	ATG	AAC	GAA	AAC	CTA	TTC	GCC	TCT	TTC	ATT	ACC	CCC	ACA	ATA	ATA	[45]
T.bancanus	3	[45]
T.bancanus	4	[45]
T.bancanus	7	[45]
T.bancanus	10	[45]
T.bancanus	K1	[45]
T.bancanus	K2	[45]
T.bancanus	K3	[45]
T.spectrum	1	[45]
T.spectrum	2	[45]
T.spectrum	3	[45]
T.spectrum	5	[45]
T.dianae		[45]
T.bancanus(GB)		[45]
T.syrichta(GB)		T	...	T	T	[45]
T.bancanus	2	GGT	CTA	CCA	GTA	GTA	GTT	CTT	ATT	ATT	ATA	TTT	CCA	ACT	ATA	TTA	[90]
T.bancanus	3	[90]
T.bancanus	4	[90]
T.bancanus	7	[90]
T.bancanus	10	[90]
T.bancanus	K1	[90]
T.bancanus	K2	[90]
T.bancanus	K3	[90]
T.spectrum	1	[90]
T.spectrum	2	[90]
T.spectrum	3	[90]
T.spectrum	5	[90]
T.dianae		[90]
T.bancanus(GB)		..C	A..	[90]
T.syrichta(GB)	A	..A	G..	GBCT	..C	C..	[90]
T.bancanus	2	TTT	CCT	ACC	CCA	ACC	CGC	CTA	ATT	AAT	AAC	CGA	TTT	GTT	TCT	CTC	[135]
T.bancanus	3	[135]
T.bancanus	4	[135]
T.bancanus	7	[135]
T.bancanus	10	[135]
T.bancanus	K1	[135]
T.bancanus	K2	[135]
T.bancanus	K3	[135]
T.spectrum	1	[135]
T.spectrum	2	[135]
T.spectrum	3	[135]
T.spectrum	5	[135]
T.dianae		[135]
T.bancanus(GB)		T..	A..	[135]
T.syrichta(GB)	A	...	T..	G..	..TC	A..C	..C	...	[135]

T.bancanus	2	CAA	CAA	TGG	TTA	ATC	CAA	CTA	GTA	CTT	AAA	CAA	ATA	ATG	ACC	ATA	[180]
T.bancanus	3	[180]
T.bancanus	4	[180]
T.bancanus	7	[180]
T.bancanus	10	[180]
T.bancanus	K1	[180]
T.bancanus	K2	[180]
T.bancanus	K3	[180]
T.spectrum	1	[180]
T.spectrum	2	[180]
T.spectrum	3	[180]
T.spectrum	5	[180]
T.dianae		[180]
T.bancanus(GB)		C..	..T	[180]
T.syrichta(GB)		..G.	G.T	T.T	.C.	[180]
T.bancanus	2	CAT	AAT	AAT	AAA	GGC	CGA	ACT	TGA	TCT	CTA	ATA	TTA	GTC	TCC	CTA	[225]
T.bancanus	3	[225]
T.bancanus	4	[225]
T.bancanus	7	[225]
T.bancanus	10	[225]
T.bancanus	K1	[225]
T.bancanus	K2	[225]
T.bancanus	K3	[225]
T.spectrum	1	[225]
T.spectrum	2	[225]
T.spectrum	3	[225]
T.spectrum	5	[225]
T.dianae		[225]
T.bancanus(GB)	C	[225]
T.syrichta(GB)		..CTCC	A..	[225]
T.bancanus	2	ATT	TTA	TTT	ATC	GGA	TCC	ACA	AAT	TTA	CTA	GGC	CTA	TTG	CCC	CAC	[270]
T.bancanus	3	[270]
T.bancanus	4	[270]
T.bancanus	7	[270]
T.bancanus	10	[270]
T.bancanus	K1	[270]
T.bancanus	K2	[270]
T.bancanus	K3	[270]
T.spectrum	1	[270]
T.spectrum	2	[270]
T.spectrum	3	[270]
T.spectrum	5	[270]
T.dianae		[270]
T.bancanus(GB)		..CGA	[270]
T.syrichta(GB)	TC	C..	T..	C..	[270]
T.bancanus	2	TCC	TTC	ACG	CCA	ACT	ACT	CAA	CTA	TCA	ATA	AAT	TTA	GGA	ATA	GCA	[315]
T.bancanus	3	[315]
T.bancanus	4	[315]
T.bancanus	7	[315]
T.bancanus	10	[315]
T.bancanus	K1C	[315]
T.bancanus	K2	[315]
T.bancanus	K3	[315]
T.spectrum	1	[315]
T.spectrum	2	[315]
T.spectrum	3	[315]
T.spectrum	5C	[315]
T.dianae		[315]

T.spectrum 3	[495]
T.spectrum 5	[495]
T.dianae	[495]
T.bancanus (GB)	[495]
T.syrichta (GB)	[495]
T.bancanus 2	GCA	GGT	CAC	TTA	CTC	ATA	CAT	CTA	ATT	GGA	GGT	GCC	ACT	CTA	GTC		[540]
T.bancanus 3	[540]
T.bancanus 4	[540]
T.bancanus 7	[540]
T.bancanus 10	[540]
T.bancanus K1	[540]
T.bancanus K2	[540]
T.bancanus K3	[540]
T.spectrum 1	[540]
T.spectrum 2	[540]
T.spectrum 3	[540]
T.spectrum 5	[540]
T.dianae	[540]
T.bancanus (GB)	A..	[540]
T.syrichta (GB)	[540]
T.bancanus 2	CTA	CTA	TCA	ATT	AAC	ACC	ATT	GCA	GCA	TCA	ACA	ACA	TTT	ATC	ATT		[585]
T.bancanus 3	[585]
T.bancanus 4	[585]
T.bancanus 7	[585]
T.bancanus 10	[585]
T.bancanus K1	[585]
T.bancanus K2	[585]
T.bancanus K3	[585]
T.spectrum 1	[585]
T.spectrum 2	[585]
T.spectrum 3	[585]
T.spectrum 5	[585]
T.dianae	[585]
T.bancanus (GB)	T..	[585]
T.syrichta (GB)	T..	TC.	[585]
T.bancanus 2	CTT	ACA	TTA	CTT	ACA	ATT	CTA	GAA	CTA	GCT	GTA	GCC	CTC	ATT	CAA		[630]
T.bancanus 3	[630]
T.bancanus 4	[630]
T.bancanus 7	[630]
T.bancanus 10	[630]
T.bancanus K1	[630]
T.bancanus K2	[630]
T.bancanus K3	[630]
T.spectrum 1	[630]
T.spectrum 2	[630]
T.spectrum 3	[630]
T.spectrum 5	[630]
T.dianae	[630]
T.bancanus (GB)	G	[630]
T.syrichta (GB)	...	T.	[630]
T.bancanus 2	GCT	TAT	GTA	TTT	ACA	CTT	CTA	GTA	AGC	CTT	TAT	CTA	CAC	GAC	AAC		[675]
T.bancanus 3	[675]
T.bancanus 4	[675]
T.bancanus 7	[675]
T.bancanus 10	[675]
T.bancanus K1	C	[675]
T.bancanus K2	[675]

T.bancanus K3	...	[675]
T.spectrum 1	...	[675]
T.spectrum 2	...	[675]
T.spectrum 3	...	[675]
T.spectrum 5	...	[675]
T.diana	...	[675]
T.bancanus(GB)	...	[675]
T.syrichta(GB)	...T...T...T...T...	[675]
T.bancanus 2	ACA	[678]
T.bancanus 3	...	[678]
T.bancanus 4	...	[678]
T.bancanus 7	...	[678]
T.bancanus 10	...	[678]
T.bancanus K1	...	[678]
T.bancanus K2	...	[678]
T.bancanus K3	...	[678]
T.spectrum 1	...	[678]
T.spectrum 2	...	[678]
T.spectrum 3	...	[678]
T.spectrum 5	...	[678]
T.diana	...	[678]
T.bancanus(GB)	...	[678]
T.syrichta(GB)	...	[678]

Gambar 3. Hasil sekuensing gen *ATP6 Tarsius sp.*

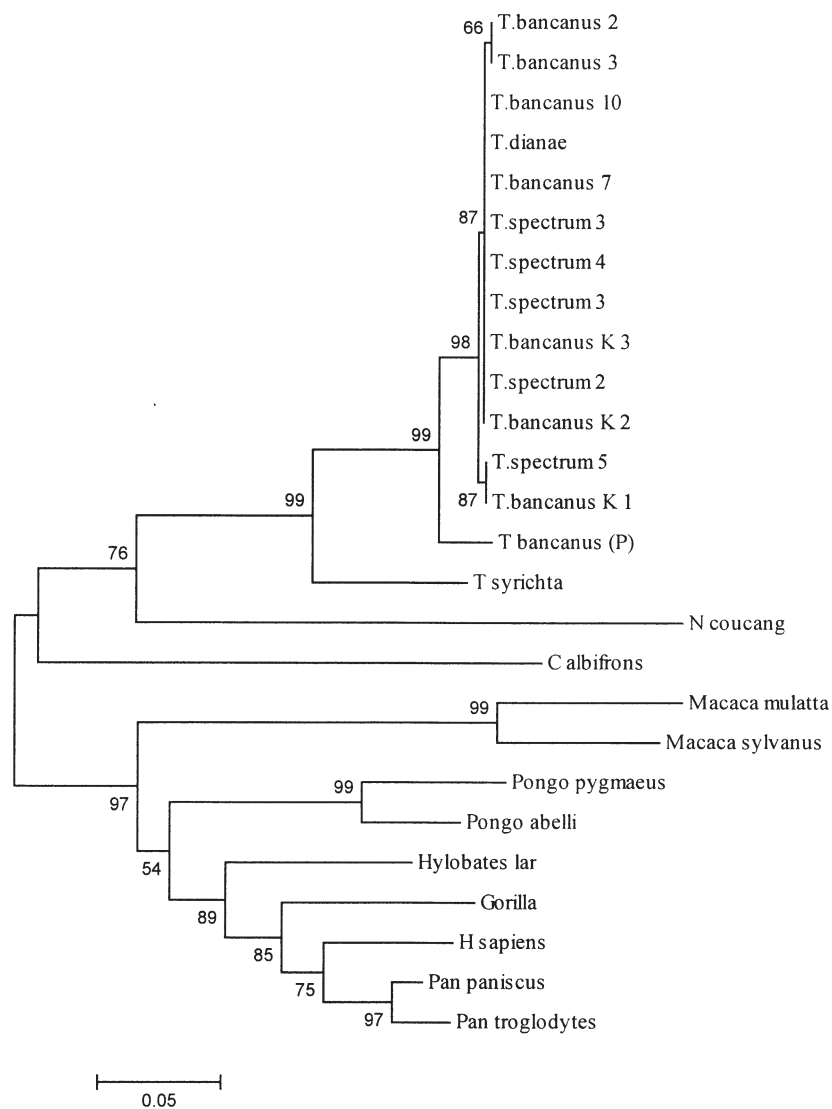
Keterangan: (.) : nukleotida identik dengan nukleotida paling atas (*T.spectrum 1*);
 : situs nukleotida beragam; GB: *Genbank*

T. bancanus K2	MNENLFASFI TPTMMGLPVV VLIIMFPTML FPTPTRLINN RFVSLQQWLI	[50]
T. diana	[50]
T. spectrum 4	[50]
T. bancanus 2	[50]
T. bancanus 3	[50]
T. bancanus 1	[50]
T. bancanus K3	[50]
T. bancanus K1	[50]
T. bancanus 4	[50]
T. bancanus 7	[50]
T. bancanus (Gb) I..... I.....	[50]
T. syrichta (Gb)V.....II.SA..... I...R..V	[50]
T. spectrum 1	[50]
T. spectrum 2	[50]
T. spectrum 3	[50]
T. spectrum 5	[50]
T. bancanus K2	QLVLKQMMTM HNNKGRWLSL MLVSLILFIG STNLLGLLPH SFTPTTQLSM	[100]
T. diana	[100]
T. spectrum 4	[100]
T. bancanus 2	[100]
T. bancanus 3	[100]
T. bancanus 1	[100]
T. bancanus K3	[100]
T. bancanus K1	[100]
T. bancanus 4	[100]
T. bancanus 7	[100]
T. bancanus (Gb)	[100]
T. syrichta (Gb)ST..... I.....	[100]
T. spectrum 1	[100]
T. spectrum 2	[100]

T. spectrum 3	[100]
T. spectrum 5	[100]
T. bancanus K2	NLGMAIPLWA GAVITGFRYK TKASLAHFLP QGTPILLIPM LIIIIETISLF	[150]
T. diana	[150]
T. spectrum 4	[150]
T. bancanus 2T.....	[150]
T. bancanus 3T.....	[150]
T. bancanus 1	[150]
T. bancanus K3	[150]
T. bancanus K1	[150]
T. bancanus 4	[150]
T. bancanus 7	[150]
T. bancanus (Gb)	[150]
T. syrichta (Gb)H.....FP.....	[150]
T. spectrum 1	[150]
T. spectrum 2	[150]
T. spectrum 3	[150]
T. spectrum 5	[150]
T. bancanus K2	IQPMALAVRL TANITAGHLL MHLIGGATLV LLSINTIAAS TTFIILTLLT	[200]
T. diana	[200]
T. spectrum 4	[200]
T. bancanus 2	[200]
T. bancanus 3	[200]
T. bancanus 1	[200]
T. bancanus K3	[200]
T. bancanus K1	[200]
T. bancanus 4	[200]
T. bancanus 7	[200]
T. bancanus (Gb)I.....	[200]
T. syrichta (Gb)S..S...L.....M...	[200]
T. spectrum 1	[200]
T. spectrum 2	[200]
T. spectrum 3	[200]
T. spectrum 5	[200]
T. bancanus K2	ILELAVALIQ AYVFTELLVSL YLHDNT	[226]
T. diana	[226]
T. spectrum 4	[226]
T. bancanus 2	[226]
T. bancanus 3	[226]
T. bancanus 1	[226]
T. bancanus K3	[226]
T. bancanus K1	[226]
T. bancanus 4	[226]
T. bancanus 7	[226]
T. bancanus (Gb)	[226]
T. syrichta (Gb)	[226]
T. spectrum 1	[226]
T. spectrum 2	[226]
T. spectrum 3	[226]
T. spectrum 5	[226]

Gambar 4. Urutan asam amino *ATP6* (226 aa) *Tarsius sp.*

Keterangan: (.): asam amino identik dengan asam amino paling atas



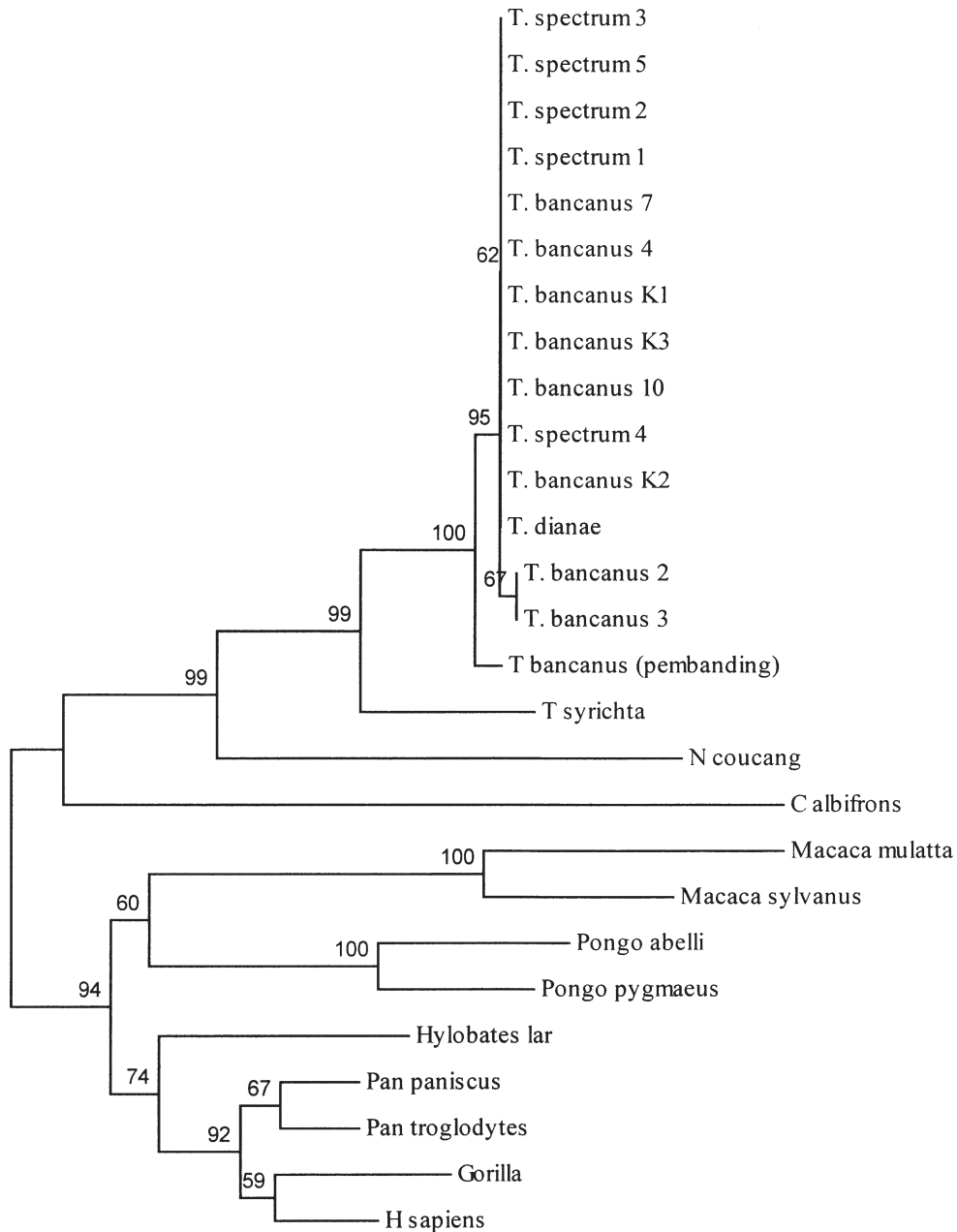
Gambar 5. Filogram menggunakan metode *Neighbor joining* dari nukleotida daerah gen *ATP6* (berukuran 681 nt) pada *Tarsius sp.* dan beberapa spesies primata lain

Jarak genetik berdasar sekuen nukleotida gen *ATP6* (681 nt) *Tarsius* pada penelitian ini paling kecil 0 %, paling besar 0,8% dan jarak genetik keseluruhan berdasarkan nukleotida pada penelitian ini adalah 0,2%. Apabila sampel *Tarsius* dibandingkan dengan *T. bancanus* dan *T. syrichta* (pembanding) rata-rata jarak genetik adalah berturut-turut 1% dan 2%.

Jarak genetik *Tarsius sp.* berdasar sekuen nukleotida gen *ATP6* pada penelitian ini adalah 0,2 %, sedangkan jarak genetik pada gen *COX2* (4,03%) (Widayanti *et al.*, 2010a), pada gen *Cyt b* (13,1%) (Widayanti *et al.*, 2006), pada gen *ATP8* (13,4%), pada gen *ND3* (0,1%) (Widayanti *et al.*, 2010b), dan jarak genetik pada daerah *D-loop* (2,3%) (Widayanti dan Solihin, 2007). Di antara keenam sekuen fragmen DNA ini yang paling

baik digunakan sebagai penanda genetik adalah gen *Cyt b* dan gen *ATP8*, walaupun pada tingkat asam amino gen *Cyt b* dan gen *ATP8* tersebut kurang memberikan hasil yang memuaskan. Oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian pada gen-gen lain yang kemungkinan dapat digunakan sebagai penanda genetik spesies-spesies *Tarsius*.

Analisis filogenetik pada penelitian ini menggunakan metode *Neighbor Joining*. Gambar 5 menyajikan filogram berdasar sekuen nukleotida gen *ATP6*. Filogram yang dihasilkan terlihat bahwa antara *T. spectrum*, *T. dianae* (asal Sulawesi), dan *T. bancanus* (asal Lampung, dan Kalimantan Barat) dengan *T. bancanus* dan *T. syrichta* pembanding berada dalam satu cabang, dan terbagi dalam dua sub



Gambar 6. Filogram menggunakan metode *Neighbor joining* dari asam amino *ATP6* (berukuran 226 aa) pada *Tarsius sp.* dan beberapa spesies primata lain

cabang. Sub cabang I membentuk dua sub sub cabang, yaitu sub sub cabang 1 terdiri dari *T. spectrum*, *T. dianae* (asal Sulawesi), dan *T. bancanus* (asal Lampung, dan Kalimantan Barat), sub sub cabang 2 terdiri dari *T. bancanus* pemanding. Pemisahan ini didukung oleh nilai *bootstrap* yang tinggi (98%). Adapun sub cabang II terdiri dari *T. syrichta*, yang didukung dengan nilai *bootstrap* 99%. Filogram berdasar sekuen asam amino (Gambar 6), terlihat sama seperti filogram berdasar sekuen nukleotida, bahwa semua *Tarsius* berada dalam

cabang yang sama, terbagi dalam dua sub cabang. Sub cabang 1 membentuk 2 sub sub cabang, yaitu sub sub cabang 1 terdiri dari *T. spectrum*, *T. dianae* (asal Sulawesi), dan *T. bancanus* (asal Lampung, dan Kalimantan Barat), sub sub cabang 2 terdiri dari *T. bancanus* pemanding dengan didukung nilai *bootstrap* yang tinggi (100%). Adapun sub cabang 2 terdiri dari *T. syrichta*, yang didukung dengan nilai *bootstrap* 99%. Kedua 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 dan asam amino yang sangat tinggi antara *Tarsius* asal Sulawesi, yaitu *T. spectrum* dan *T. diana* dan *T. bancanus* asal Lampung dan Kalimantan Barat.

SIMPULAN

Keragaman nukleotida dan asam amino gen ATP6 antara *T. Spectrum* asal Sulawesi Utara, *T. diana* asal Sulawesi Tengah, *T. bancanus* asal Lampung dan *T. bancanus* asal Kalimantan Barat adalah sangat kecil, yaitu hanya 0,4%. Jarak genetik keseluruhan antara *T. Spectrum* asal Sulawesi Utara, *T. diana* asal Sulawesi Tengah, *T. bancanus* asal Lampung dan *T. bancanus* asal Kalimantan Barat berdasar sekuen nukleotida gen ATP6 pada penelitian ini adalah 0,2 %, terkecil 0%, dan paling tinggi 0,8%.

Sekuen nukleotida dan asam amino gen ATP6 tidak dapat digunakan untuk membedakan antara *T. bancanus*, *T. diana* dan *T. spectrum*.

SARAN

Perlu penelitian lanjutan menggunakan gen penyandi lainnya dari DNA mitokondria untuk mendapatkan penanda genetik spesifik masing-masing *Tarsius* endemis Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada DIKTI melalui proyek penelitian Hibah Kompetensi tahun 2010 yang telah memberi dukungan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Forschler MI, Senar JC, Perret P, Bjorklund M. 2009. The species status of the Corsican finch *Carduelis Corsicana* assessed by three genetic markers with different rates of evolution. *Mol Phylogenet Evol.* 52(1):234-40.
- Groves C. 2001. Primate taxonomy. London :Smithsonian Inst Pr.
- Mursidin. 2008. *Tarsius* Di Taman Nasional Bantimurung, Sulawesi Selatan. *Tropika* 12(2): 30-31.
- Musser GG, dan 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.
- Niemitz C, Nietsch A, Warter S, Rumpler Y. 1991. *Tarsius diana*: A new primate species from Central Sulawesi (Indonesia). *Folia Primatol* 56:105-116.
- Reyes A, Gissi C, Pesole G, Saccone C. 1998. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals. *J Mol Biol Evol* 15: 957-966.
- 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. *J Mol Biol Evol.* 19:544-553.
- Shekelle M. 2003. Taxonomy and biogeography of Eastern Tarsiers. Doctoral thesis. St. Louis: Washington Univ.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.
- 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/ancestreea.html>.
- Widayanti R, Solihin DD, Sajuthi D, Perwitasari 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 DNA Mitokondria. *Biota* 12(3): 170-176.
- Widayanti R, Handayani NSH, dan Budiarsa IM. 2010a. Kajian molekular *Tarsius* sp. pada gen penyandi *Cytochrome Oxidase* sub-unit 2 (*COX2*) mitokondria. *Biota* 15(1): 98-106.
- Widayanti R, Handayani NSH, dan Budiarsa IM. 2010b. Kajian keragaman genetik gen penyandi *Dehydrogenase* Sub-unit 3 (*ND3*) mitokondria pada *Tarsius* sp.: Upaya Konservasi *Tarsius* sp. *Jurnal Veteriner* 12(1):26-33.
- Widayanti R. 2010. Kajian molekular *Tarsius* sp. pada gen penyandi *ATP synthase FO* sub-unit 8 (*ATP8*) mitokondria. *Media Kedokteran Hewan* 26(3):174-182.