

KAJIAN PENANDA GENETIK GEN CYTOCHROME B PADA *Tarsius* sp.

STUDY OF GENETIC MARKER ON CYTOCHROME B GENE OF *Tarsius* sp.

Rini Widayanti¹, Dedy Duryadi Solihin², Dondin Sajuthi³, R.R. Dyah Perwitasari^{2,3}

¹Fak. Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16144

³Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16151

ABSTRAK

Tarsius merupakan salah satu satwa endemik Indonesia yang keberadaannya mulai memprihatinkan. Konservasi sebagai salah satu cara untuk pelestarian satwa ini akan lebih terarah dan berhasil guna apabila karakteristik dan keragaman sumber genetiknya diketahui dengan pasti. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji penanda genetik spesifik gen *cyt b* pada *Tarsius* sp. Pengurutan hasil PCR menggunakan primer H15149 pada gen *cyt b* didapatkan urutan basa sebesar 276 pb (menyandi 92 asam amino). Fragmen *cyt b* hasil pengurutan disejajarkan berganda dengan primata lain dari data *Genbank* dengan bantuan perangkat lunak Genetyx-Win versi 3.0 dan Clustal W, kemudian dianalisis dengan menggunakan program MEGA versi 3.1. Dari hasil analisis diperoleh 14 situs asam amino yang berbeda. *Tarsius diana*e memiliki 12 situs asam amino (asam amino ke 2, 6, 9, 22, 23, 29, 39, 41, 42, 45, 55 dan 85), *T. spectrum* memiliki 7 situs asam amino (asam amino ke 2, 6, 9, 41, 45, 55 dan 85) dan *T. bancanus* memiliki 2 situs asam amino (ke 23 dan 45) yang dapat digunakan sebagai penanda genetik. Lima asam amino unik ditemukan pada *T. diana*e, yaitu pada situs asam amino ke 6 (valina), ke 22 (alanina), ke 29 (alanina), ke 39 (serina) dan ke 42 (valina). Jarak genetik berdasar nukleotida *cyt b* yang dihitung menggunakan model 2 parameter Kimura ditemukan nilai paling kecil sebesar 0,7%, nilai paling besar 22,3% dan rata-rata 13,1%. Filogram menggunakan metode *neighbor joining* berdasar hasil urutan nukleotida dan asam amino *cyt b* tersebut dapat dijadikan pembeda masing-masing spesies *Tarsius*.

Kata kunci: *Tarsius* sp., gen *cyt b*, asam amino, urutan DNA

ABSTRACT

Tarsius is an endemic species in Indonesia that is threatened. Conservation of this species would yield better results if its genetic make up and diversity were determined. The objective of this research was to study the specific genetic marker on *cyt b* gene of *Tarsius* sp. Sequencing of PCR product using primer H15149 on *cyt b* gene yielded base sequence of 276 bp (coding 92 amino acids). Multiple alignment was carried out using Genetyc-Win Version 3.0 and Clustal W and analyzed using MEGA program Version 3.1. Fourteen different amino acid sites were found. *Tarsius diana*e had 12 amino acid sites (amino acid no. 2, 6, 9, 22, 23, 29, 39, 41, 42, 45, 55 and 85), *T. spectrum* had 7 amino acid sites (amino acid no. 2, 6, 9, 41, 45, 55 and 85) and *T. bancanus* had 2 amino acid sites (amino acid no. 23 and 45) which can be used as genetic marker. Five unique amino acids were found on *T. diana*e, such as amino acid site: 6 (valine), 22 (alanin), 29 (alanin), 39 (serin) and site 42 (valine). The genetic distance based on Kimura 2-parameter model ranged between 0,7% and 22,3%, with averaged of 13.1%. The phylogram using Neighbor Joining method based on the sequence of nucleotide and amino acid of *cyt b* revealed differentiation among *Tarsius*.

Key words: *Tarsius* sp., *cyt b* gene, amino acid, DNA sequence

PENDAHULUAN

Tarsius atau disebut monyet hantu, merupakan salah satu satwa endemik Indonesia yang memiliki daya tarik tersendiri karena memiliki bola mata yang besar, tubuh sangat kecil (± 150 g) dan warna menarik sehingga berpeluang untuk dijadikan hewan kesayangan di masa mendatang dan dapat dijadikan komoditi ekspor. 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. Usaha yang telah dilakukan untuk pelestarian satwa ini adalah dengan dikeluarkannya Peraturan Pemerintah tahun 1931 sebagai satwa yang dilindungi dan melalui program pelestarian satwa baik secara *in situ* maupun *ex situ*. Strategi pelestarian *Tarsius* sp. dan pemanfaatannya akan lebih terarah dan berhasil guna apabila karakteristik dan keragaman sumber genetiknya diketahui dengan pasti. Informasi mengenai karakteristik genom satwa ini masih terbatas sehingga perlu dilakukan penelitian dasar yang dapat mendukung kemudahan penggalian informasi lebih mendalam.

Sistematika berdasar morfologi yang didukung vokalisasi, menyatakan bahwa genus *Tarsius* dibagi menjadi 5 spesies yaitu *Tarsius bancanus* (Sumatera dan Kalimantan), *T. spectrum*, *T. diana*, *T. pumilus* (Sulawesi) dan *T. syrichta* (Filipina) (Musser dan Dagosto, 1987). Lebih lanjut menurut Shekelle (2003), bahwa di Sulawesi saat ini terdapat 16 populasi *Tarsius* yang kemungkinan dapat menjadi spesies sendiri. Lima populasi sudah diberi nama spesies (*T. spectrum*, *T. diana*, *T. pumilus*, *T. sangiriensis* dan *T. pelengensis*) oleh Groves (2001), dan 11 lainnya masih perlu pemberian nama untuk keperluan pelestariannya.

Analisis genom mitokondria secara utuh berupa urutan lengkap dari DNA telah dilakukan pada *T. bancanus* (Schmitz *et al.*, 2002), sehingga terbuka kesempatan untuk mengkaji penanda genetik untuk setiap gen maupun daerah bukan gen (*non coding*).

Sitokrom b merupakan salah satu gen penyandi protein di dalam genom mitokondria yang banyak digunakan untuk meneliti hubungan spesies dari genus atau famili yang sama (Kocher *et al.* 1989, Randi 1996 dan Ozawa *et al.* 1997). Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji penanda genetik DNA pada gen *cyt b* dari *T. bancanus*, *T. spectrum* dan *T. diana*.

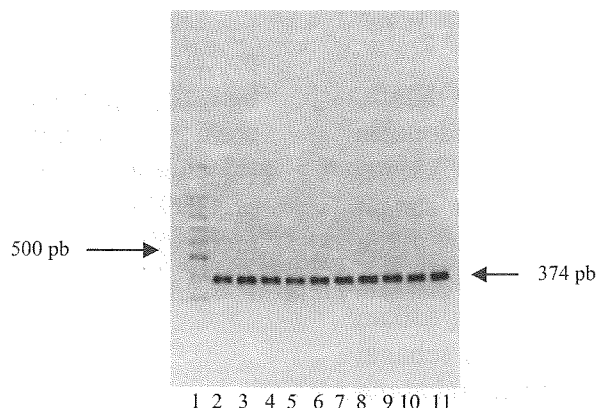
MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan lima contoh otot *T. spectrum* asal Tangkoko-Batuangus, Sulawesi Utara dan empat contoh otot *T. spectrum* asal Air Madidi, Sulawesi Utara; Satu contoh otot *T. diana* asal Kamarora, Sulawesi Tengah dan 8 contoh otot *T. bancanus* diperoleh dari Lampung-Sumatera.

Primer untuk amplifikasi gen *cyt b* parsial yaitu L14841 (5'AAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3') dan H15149 (5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3')(Kocher *et al.*, 1989).

Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dipersiapkan dari otot dengan larutan digesti {1% (W/V) SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,1 M EDTA, pH 8,0; 0,2 M NaCl; 0,5 mg/ml Proteinase K} semalam pada suhu 55°C (Duryadi, 1993). Purifikasi DNA Total mengikuti Sambrook *et al.* (1989) dimodifikasi Duryadi (1993), yaitu dengan penambahan fenol, kloroform/isoamilalkohol [24:1 (vol/vol)]. Setelah itu DNA dipresipitasi dengan alkohol absolut dan dicuci menggunakan alkohol 70%.

Polymerase Chain Reaction (PCR). Komposisi 50 μ l campuran pereaksi PCR terdiri dari MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 10 mM, DNA cetakan 100-300 ng, masing-masing primer 100 pmol dan *Taq polymerase* (Bio lab, England) 2 unit beserta bufernya. Amplifikasi PCR fragmen *cyt b* menggunakan mesin *GeneAmp^R PCR system 2400* (Perkin Elmer, USA), dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 2 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu 60°C



Gambar 1. Profil fragmen DNA *Tarsius* sp. hasil amplifikasi PCR menggunakan primer L14841 dan H15149
 Keterangan: (1) DNA penanda 100 pb (Promega), (2-5) *T. bancanus*; (6-10) *T. spectrum*; (11) *T. diana*e

selama 45 detik, pemanjangan pada 72°C selama 1 menit. Amplifikasi dilakukan selama 35 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada 72°C (Widayanti, 2006).

Penentuan runutan DNA. Produk PCR hasil amplifikasi dimurnikan dengan menggunakan *GFX Column purification kit* (Amersham, USA), selanjutnya digunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi perunutan nukleotida. Perunutan gen *cyt b* menggunakan primer H15149. Urutan nukleotida gen *cyt b* parsial diperoleh dengan menggunakan alat perunut DNA otomatis *ABI Prism* versi 3.4.1

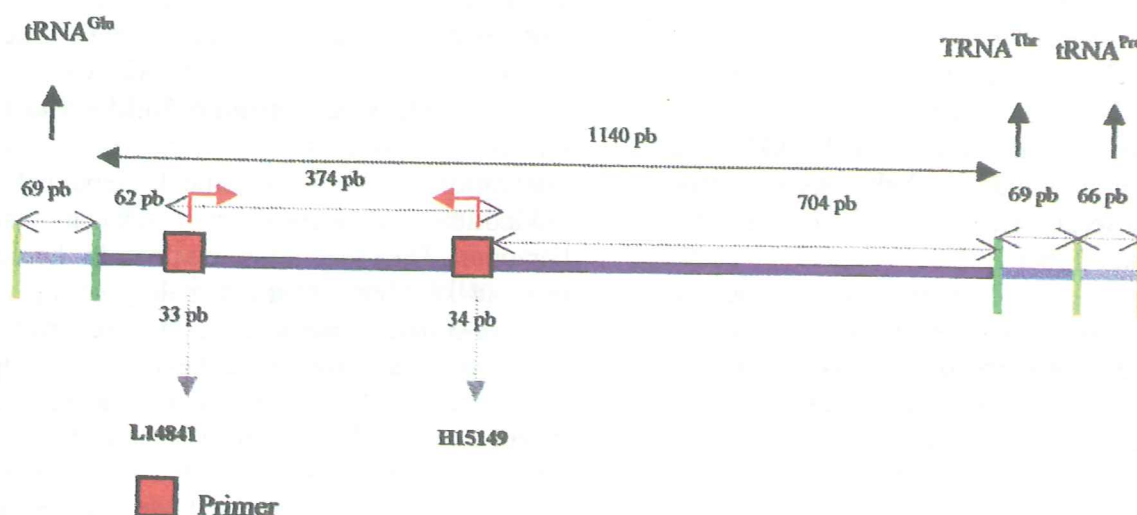
(USA).

Analisis Data. Penjajaran berganda runutan nukleotida gen penyandi *cyt b* dianalisis dengan bantuan perangkat lunak Genetyx-Win versi 3.0 dan Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Selain berdasarkan urutan nukleotida, gen penyandi *cyt b* dianalisis berdasarkan asam amino dari runutan nukleotida yang diterjemahkan mengikuti *vertebrate mitochondrial translation code* yang ada dalam MEGA versi 3.1. Sebagai spesies pembandingan digunakan data runutan DNA dari Genbank *T. bancanus* (Nomor akses NC_002811), *Nycticebus coucang*

Tabel 1. Asam amino beragam pada sebagian *cyt b* *T. bancanus*, *T. spectrum*, *T. diana*e hasil penelitian dan *T. bancanus* asal Malaysia (Genbank)

aa ke	(39)	(43)	(46)	(59)	(60)	(66)	(76)	(78)	(79)	(82)	(92)	(115)	(126)	(129)**
Nama	2	6	9	22	23	29	39	41	42	45	55	78	85	92***
T.banc*	V	L	V	T	M	V	G	L	I	L	M	I	T	M
T.banc3	T	.	.	I	.	M	.	V	.	I
T.banc4	T	.	.	I	.	M	.	V	.	I
T.banc5	.	I	I	.	T	.	.	I	.	M
T.banc8	T	M
T.spec3	I	I	I	I	.	I	I	.	A	.
T.spec4	I	M	I	I	.	M	I	.	A	.
T.spec5	I	M	I	I	.	M	I	.	A	.
T.spec6	I	M	I	I	.	I	I	.	A	I
T.spec7	I	T	I	I	.	I	I	.	A	.
T.spec8	I	T	I	I	.	I	I	.	A	.
T.spec9	I	M	I	I	.	M	I	.	A	.
T.dianae	I	V	I	A	T	A	S	I	V	M	I	.	A	.

• Genbank, : **situs asam amino dimulai dari ujung 5' *cyt b* utuh, *** situs asam amino *cyt b* yang diteliti



Gambar 2. Skema letak penempelan primer L14841 dan H15149 untuk mengamplifikasi daerah gen *cyt b* pada *Tarsius* sp.

(NC_002765), *Lemur catta* (NC_004025), *Cebus albifrons* (NC_002763), *Macaca sylvanus* (NC_002764), *M. mulatta* (NC_005943), *Hylobates lar* (NC_002082), *Pan paniscus* (NC_001644), *Pan troglodytes* (NC_001643), *Gorilla gorilla* (NC_001645), *Homo sapiens* (NC_001807).

Analisis filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi 3.1 dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* dengan 1000 kali pengulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Daerah Gen *cyt b*.

Amplifikasi daerah gen Sitokrom b mtDNA pada *Tarsius* menggunakan primer L14841 dan

H15149 menghasilkan fragmen DNA berukuran 374 pb. Profil DNA hasil amplifikasi gen *Cyt b* disajikan pada Gambar 1.

Fragmen DNA sepanjang 374 pb (gen *cyt b* parsial) *Tarsius* sp. tersebut disejajarkan (*alignment*) dengan genom mtDNA *T. bancanus* (Schmitz *et al.* 2002) menunjukkan bahwa letak fragmen ini di dalam gen *cyt b* berdekatan dengan gen tRNA^{Glu} (basa ke 63 dari ujung 5' gen *cyt b* sampai basa ke 436) (Gambar 2).

Penentuan Runutan Nukleotida. Hasil penentuan urutan fragmen DNA sitokrom b parsial sepanjang 374 pb menggunakan primer H15149 diperoleh 276 nukleotida (nt) (basa ke 112 sampai ke 387 dari ujung 5' gen *cyt b* utuh) yang dapat terbaca dengan baik. Fragmen ini

Tabel 2. Situs asam amino yang berbeda antar spesies *Tarsius* (di bawah diagonal), jarak genetik dengan metoda kimura 2 parameter (di atas diagonal)

	<i>T. bancanus</i> *	<i>T. bancanus</i>	<i>T. spectrum</i>	<i>T. diana</i>
<i>T. bancanus</i> *	-	0.047	0.081	0.140
<i>T. bancanus</i>	23, 45	-	0.086	0.115
<i>T. spectrum</i>	2, 6, 9, 41, 45, 55, 85	2, 6, 9, 23, 55, 85	-	0.076
<i>T. diana</i>	2, 6, 9, 22, 23, 29, 39, 41, 42, 45, 55, 85	2, 6, 9, 29, 39, 41, 42, 45, 55, 85	6, 22, 23, 29, 39, 42	-

* Genbank

0,3%, dan transversi paling kecil adalah 0% juga pada basa kedua dari triplet kodon. Rata-rata rasio transisi terhadap transversi adalah 3,68. Rasio tersebut sesuai dengan pendapat Kocher *et al.* (1989), bahwa substitusi nukleotida pada tingkat spesies sebagian besar adalah transisi sedangkan pada tingkat genus adalah transversi.

Analisis hubungan kekerabatan antar contoh *Tarsius* dilakukan terhadap 276 nukleotida yang menyusun sebagian gen *cyt b* dan terhadap 92 aa sebagai hasil translasi dari nukleotida tersebut. Gambar 4 dan 5 menyajikan filogram berturut-turut berdasar nukleotida gen *cyt b* parsial dan aa *cyt b* parsial dengan pembandingan spesies primata lain yang diambil dari *Genbank*. Filogram yang dihasilkan dari nukleotida gen *cyt b* parsial terlihat bahwa *T. spectrum*, *T. diana* dan *T. bancanus* membentuk cabang tersendiri, hal ini didukung oleh nilai *bootstrap* yang tinggi (97%). Berdasarkan filogram (Gambar 3 & 4) tersebut menunjukkan bahwa hasil yang didapat sama dengan pembagian spesies *Tarsius* berdasar morfologi dan vokalisasi (Musser dan Dagosto 1987; Niemitz *et al.*, 1991). Pembentukan kelompok tersendiri antara *T. spectrum* dan *T. diana* juga sesuai dengan hipotesis hibrid biogeografi (biologi dan geologi) Sulawesi (Shekelle dan Leksono, 2004). Berdasar hipotesis tersebut, sebaran zoogeografik berdasar data geologi untuk *T. diana* berasal dari daratan Asia dan daerah sebaran *T. spectrum* (Tangkoko dan Air Madidi) merupakan daratan yang timbul dari dasar lautan. Berdasar data biologi, sebaran (distribusi) *Tarsius* di Sulawesi, *T. diana* dan *T. spectrum* juga mempunyai distribusi yang berbeda. Dengan demikian, divergensi kedua spesies ini mengikuti spesiasi allopatrik.

Pada percabangan *T. spectrum* terlihat adanya 2 kelompok yang terdiri dari *T. spectrum* 3, 6, 4 dan 8 dan kelompok lain yang terdiri dari *T. spectrum* 5, 7 dan 9. Adanya kelompok yang terdiri dari *T. spectrum* 3 dan 4 (Air Madidi) dengan *T. spectrum* 6 dan 8 (Tangkoko) menunjukkan bahwa *T. spectrum* yang berasal dari Tangkoko dan Air Madidi pada penelitian ini tidak dapat dibedakan.

Keadaan ini sesuai dengan hipotesis biogeografi (Shekelle, 2003) yaitu, berdasar sebaran *Tarsius* kedua *T. spectrum* (berasal dari Air Madidi dan Tangkoko) ini memang berasal dari daerah distribusi yang sama dan jarak antara Tangkoko dan Air Madidi tidak jauh (\pm 40 km). Berdasar sejarah geologi, kedua populasi ini juga dari daratan yang berasal sama yaitu dari dasar lautan sehingga berasal dari populasi asal yang sama (Hall, 2001).

Menurut Napier dan Napier (1983), berdasar morfologi, *Tarsius* masih menjadi perdebatan apakah masuk sub ordo prosimian (kelompok primata kecil) atau intermedier (di pertengahan) antara subordo anthropoidea (kelompok primata besar) dan prosimian. Hal ini karena *Tarsius* menunjukkan ciri-ciri diantara kedua sub ordo tersebut. 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 tanpa rhinarium telanjang, tanpa *dental comb*, cermin hidung kering, gigi seri bawah menghadap ke atas, dan plasenta hemochorial. Sedangkan menurut Groves (2001), primata dibagi menjadi subordo Strepsirrhini (sebelumnya Prosimian) dan subordo Haplorrhini (sebelumnya Anthropoidea), yang mana *Tarsius* masuk ke dalam subordo Haplorrhini. Namun dari hasil yang diperoleh pada penelitian ini, kedua filogram mengelompokkan *Tarsius* ke dalam sub ordo Prosimian (Strepsirrhini). Untuk lebih memperjelas pengelompokan *Tarsius* di dalam klasifikasi primata, mungkin perlu penelitian lebih lanjut pada gen *cyt b* utuh dan pada daerah D-loop.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Urutan gen *cyt b* pada basa ke 112 sampai dengan basa ke 387 dapat dijadikan penanda genetik untuk identifikasi antar spesies *Tarsius*.
2. *Tarsius diana* memiliki 12 situs asam amino (asam amino ke 2, 6, 9, 22, 23, 29, 39, 41, 42, 45, 55, dan 85) dan 5 situs diantaranya merupakan asam amino unik {situs asam amino ke 6 (V), ke 22 (A), ke

29 (A), ke 39 (S) dan ke 42 (V)}, *T. spectrum* memiliki 7 situs asam amino (asam amino ke 2, 6, 9, 41, 45, 55 dan 85) dan *T. bancanus* memiliki 2 situs asam amino (asam amino ke 23 dan 45) yang dapat digunakan sebagai penanda genetik pada *Tarsius*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Sebagian penelitian dibiayai dari beasiswa BPPS, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi dan bantuan penelitian dari Universitas Gadjah Mada. Terima kasih juga penulis tujukan kepada Dr. Saroyo, Drs. Yulius Duma, MSi dan Dr. Hengki Johannis Kiroh yang telah banyak membantu dalam pengambilan sampel *Tarsius* di Air Madidi dan Tangkoko (Sulawesi Utara) dan Kamarora (Sulawesi Tengah).

DAFTAR PUSTAKA

- Duryadi, D. 1993. *Role possible du comportement dans l'evolution de Deux Souris Mus macedonicus et Mus spicilequus en Europe Centrale*. Thesis Doctorat. France: Montpellier, Univ. Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc.
- Groves, C. 2001. *Primate taxonomy*. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press.
- Hall, R. 2001. Cenozoic reconstructions of SE Asia and the SW Pacific: Changing patterns of land and sea. In *faunal and floral migrations and evolution in SE Asia-Australia*. Lisse: Swets and Zeitlinger. 35-56.
- Kocher, TD, Thomas, WK, Meyer, A, Edwards SV, Paabo, S, Villablanca FX and Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:6196-6200.
- Musser, G.G dan Dagosto, M. 1987. The identity of *Tarsius pumilus*, a pygmy species endemic to the montane mossy of Central Sulawesi. *Am. Mus. Nov.* 2867: 1-53.
- Napier, J.R dan Napier, P.H. 1983. *The natural history of the primates*. British Museum (Natural History). Cromwell Road. London.
- Niemitz, C, Nietsch, A, Warter, S, Rumppler Y. 1991. *Tarsius diana*: A New primate species from Central Sulawesi (Indonesia). *Folia Primatol.* 56:105-116.
- Ozawa, T, Hayashi, S, Mikhelson, VM. 1997. Phylogenetic position of mammoth and Steller's Sea Cow within *Tethytheria* demonstrated by mitochondrial DNA sequences. *J. Mol. Evol.* 44: 406-413.
- Randi, E. 1996. A Mitochondrial cytochrome b phylogeny of the *Alectoris* partridges [abstrak]. Di dalam. *J. Mol. Phyl. Evol.* 6.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- 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. 2003. *Taxonomy and biogeography of Eastern Tarsiers*. Doctoral thesis. St. Louis: Washington University.
- Shekelle, M, Leksono, SM. 2004. Strategi konservasi di pulau Sulawesi dengan menggunakan *Tarsius* sebagai flagship spesies. *Biota*. 9:1-10.

Thompson, J.D, Higgins, D.G, Gibson, T.J. 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.

Widayanti, R. 2006. *Kajian penanda genetik gen cytochrome b dan daerah D-loop pada Tarsius sp.* [Disertasi]. Bogor: Program Studi Primatologi, Institut Pertanian Bogor.