

## Kajian Penanda Genetik *Tarsius bancanus* dan *Tarsius spectrum* dengan Sekuen *D-Loop* Parsial DNA Mitokondria

### Study on Genetic marker in *Tarsius bancanus* and *Tarsius spectrum* Using Mitochondrial DNA *D-loop* Partial Sequences

Rini Widayanti<sup>1\*</sup>, Dedi Duryadi Solihin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta  
E-mail: riniwida@yahoo.co.uk \*Penulis untuk korespondensi

<sup>2</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor

#### Abstract

The objective of this research was to study the specific genetic marker on *D-loop* region of *Tarsius bancanus* and *Tarsius spectrum*. The sequencing of PCR product using primer DLTARPROF on *D-loop* resulted in base sequence of 270 nts. Result of *D-loop* fragments sequencing was put on multiple alignment with other primates from Genbank with the aid of software Genetyc-Win Version 3.0 and Clustal W, and was analyzed using MEGA program version 3.1. The genetic distance was based on nucleotide *D-loop*, the smallest genetic distance was 0% and the biggest was 11.8% and the average was 2.3%. The phylogenetic tree using neighbor Joining Method based on some nucleotide sequence on *D-loop* region could not be used to differentiate between *Tarsius bancanus* and *Tarsius spectrum*.

**Key words:** *Tarsius*, *D-loop*, sequencing, mt-DNA, genetic

Diterima: 21 Maret 2007, disetujui: 03 Agustus 2007

#### Pendahuluan

*Tarsius* merupakan primata endemik Indonesia yang keberadaannya semakin memprihatinkan. Di Indonesia, berdasar data morfologi yang didukung vokalisasi dikenal ada 7 spesies tarsius, yaitu *T. bancanus* (di Sumatra dan Kalimantan), *T. spectrum*, *T. diana*, *T. pumilus*, *T. sangiriensis* dan *T. pelengensis* (di Sulawesi) (Musser & Dagosto, 1987; Groves, 2001; Shekelle, 2003). Upaya pelestarian satwa ini telah dilakukan dengan adanya peraturan pemerintah mengenai larangan untuk berburu dan usaha konservasi baik secara *in situ* maupun *ex situ*. Informasi genetik pada tarsius sampai saat ini masih sangat kurang, sedangkan informasi ini sangat dibutuhkan untuk tujuan konservasi. Suatu kenyataan, bahwa tarsius banyak diperdagangkan secara ilegal baik di dalam maupun ke luar negeri dan tidak sedikit tarsius

hasil tangkapan ini yang gagal diperdagangkan pada saat pemeriksaan. Oleh karena satwa ini secara morfologis sulit dibedakan, maka upaya pengembalian tarsius ke habitatnya (hasil konservasi *ex situ* atau hasil penangkapan liar) merupakan problem tersendiri. Upaya untuk menanggulangi masalah tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan penanda genetik untuk masing-masing spesies tarsius (secara morfologi antara *T. spectrum* dan *T. bancanus* mempunyai perbedaan cukup jelas, terutama pada ekor dan bulu tubuh, kecuali antar spesies dari Sulawesi, sulit dibedakan oleh masyarakat awam).

*D-loop* merupakan lokasi *non-coding* pada mt-DNA yang mempunyai laju mutasi tinggi, sehingga sering digunakan untuk meneliti hubungan antarspesies dan intra spesies (terutama populasi). Menurut Sbisà *et al.*, (1997) yang diacu dalam Randi dan Lucchini (1998), lokasi *D-loop* dibagi menjadi

3 domain, domain 1 (berbatasan dengan tRNA<sup>Pro</sup>) bersifat variatif, domain 2 (tengah) bersifat kekal dan domain 3 bersifat variatif. Tujuan penelitian ini adalah melihat adanya keragaman genetik pada daerah *D-loop* parsial dari *T. bancanus* dan *T. spectrum*.

## Metode Penelitian

### Bahan DNA

Dalam penelitian ini digunakan 2 contoh *Tarsius spectrum* asal Tangkoko, Batuangus, Sulawesi Utara, 2 contoh *T. spectrum* dari Air Madidi, Sulawesi Utara dan 8 contoh *Tarsius bancanus* asal Lampung, Sumatra Selatan.

Primer amplifikasi *D-loop* parsial yaitu DLTARPROF 5' CTGGCATTCTCCATAAACT 3' dan DLTARBFR 5' GTTGCTGATTTCACGGAG GAAG 3'.

### Ekstraksi DNA

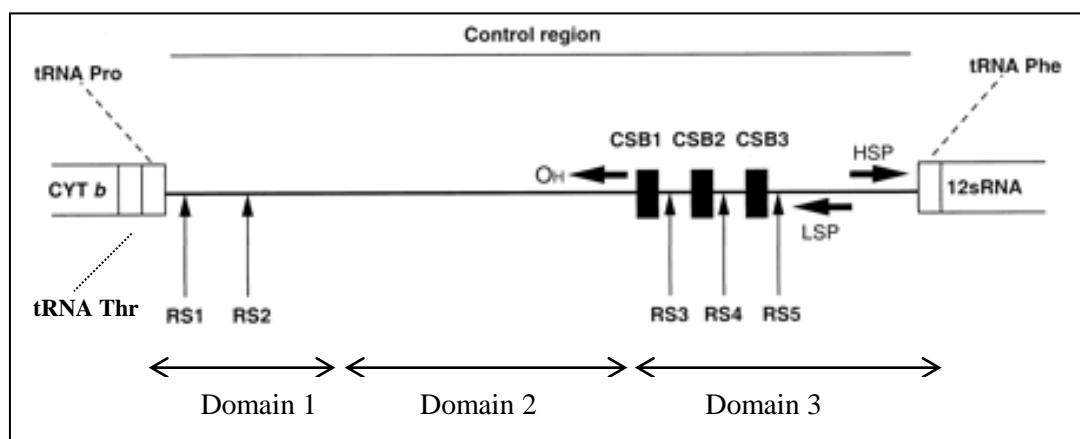
DNA total diekstraksi dari otot. Preparasi contoh otot mengikuti metode Duryadi (1993). Setiap otot (50-100mg) secara terpisah digerus dalam larutan STES {1% (W/V) SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,1 M EDTA, pH 8,0; 0,2 M NaCl}. Selanjutnya ditambah dengan *digestion buffer* (larutan STES + 0,5 mg/ml Proteinase

K) sebanyak 500 ul, kemudian diinkubasi pada penangas air suhu 55°C selama  $\pm$  16 jam atau semalam.

Purifikasi DNA Total mengikuti Sambrook *et al.*, (1989) dimodifikasi Duryadi (1993), yaitu dengan penambahan Phenol: cloroform: Isoamil-Alkohol (25:24:1). DNA kemudian dipresipitasi dengan alkohol absolut dan dicuci menggunakan alkohol 70%.

### Amplifikasi DNA dengan PCR

Komposisi 50  $\mu$ l campuran pereaksi PCR terdiri dari 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U Taq polimerase (Bio lab) beserta bufernya. Amplifikasi DNA dengan PCR menggunakan mesin GeneAmp<sup>®</sup>PCR system 2400 (Perkin Elmer), dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 2 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, 55°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. Skema dari *D-loop* beserta bagiannya disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Skema organisasi daerah kontrol mt-DNA (*D-Loop*) pada mamalia. CSB1, CSB2, CSB3: blok runtuhan pendek bersifat kekal; OH: titik awal replikasi untai H; HSP: promotor replikasi untai H; LSP: promotor transkripsi untai L; RS1-RS5: lokasi runtuhan kopi berulang pada spesies yang berbeda (Savolainen *et al.*, 2000)

## Penentuan sekuen nukleotida

Produk PCR hasil amplifikasi dimurnikan menggunakan *GFX Column purification kit* (Amersham, USA). Reaksi untuk sekuensing *D-loop* parsial menggunakan larutan pereaksi *Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham, USA) dengan mesin *GeneAmp<sup>R</sup> PCR system 2400* (Perkin Elmer). Kondisi untuk reaksi sekuensing adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 2 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik, 55°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 nukleotida menggunakan alat sequenser DNA otomatis *ALFexpress II* (Amersham pharmacia biotech), pada kondisi 1500 V, arus listrik 60mA, daya 25 W, suhu 55°C, selama 700 menit.

## Analisis Data

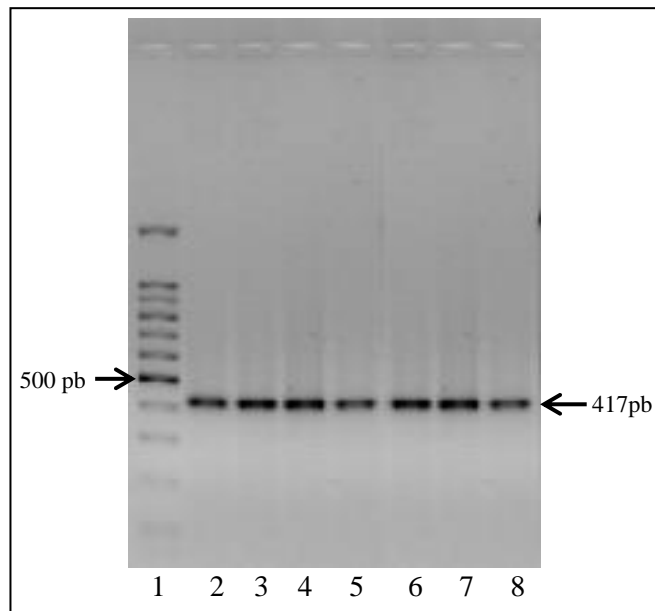
Penjajaran berganda homologi sekuen nukleotida *D-loop* dianalisis dengan bantuan perangkat lunak Genetyx-Win versi 3.0 dan Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

Analisis filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi 3.1 (Kumar *et al.*, 2001) dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* dengan 1000 kali pengulangan. Sebagai spesies pembandingan digunakan *T. bancanus* (Nomor akses NC\_002811), *Nycticebus coucang* (NC\_002765), *Lemur catta* (NC\_004025), *Cebus albifrons* (NC\_002763), *Lagothrix lagotricha* (AF 213965), *Macaca sylvanus* (NC\_002764), *Pan paniscus* (NC\_001644), *Gorilla gorilla* (NC\_001645), *Homo sapiens* (NC\_001807).

## Hasil dan Pembahasan

### Amplifikasi *D-loop* parsial

Amplifikasi daerah *D-loop* parsial pada *Tarsius* sp. menggunakan pasangan primer DLTARPROF dan DLTARBFR menghasilkan fragmen DNA berukuran 417 pb. Profil DNA hasil amplifikasi primer tersebut disajikan pada Gambar 2. Fragmen DNA tersebut berdasarkan runutan genom mtDNA *T. bancanus* (Schmitz *et al.*, 2002) terdiri dari 27 pb fragmen gen tRNA<sup>Pro</sup> dan 390 pb fragmen *D-loop*.



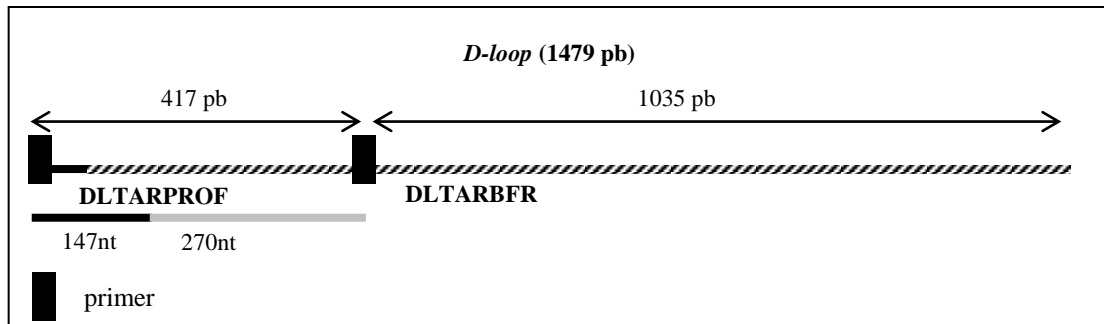
**Gambar 2.** Profil DNA *Tarsius* sp. hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer DLTARPROF-DLTARBFR. Keterangan: lajur 1. DNA penanda 100pb (Promega), lajur 2-8 DNA hasil amplifikasi menggunakan primer DLTARPROF- DLTARBFR

**Penentuan sekuen nukleotida *D-loop* parsial**

Fragmen DNA *D-loop* parsial sepanjang 417 pb hasil amplifikasi primer DLTARPROF dan DLTARBFR setelah dilakukan sekuensing DNA menggunakan primer DLTARPROF dan disejajarkan dengan runutan genom *T. bancanus* dari *Genbank* diperoleh 270 sekuen nukleotida yang dapat dianalisis. Bagian yang tidak terbaca adalah sebanyak 147 basa, yaitu terletak pada ujung 5' primer DLTARPROF (Gambar 3).

Nukleotida beragam beserta sitususnya dari *Tarsius* sp. disajikan pada Tabel 1. Data lengkap sekuen 270 nt daerah *D-loop* parsial dapat dilihat dalam Widayanti (2006). Hasil perbandingan ke 270 nukleotida terhadap nukleotida *T. bancanus* asal Malaysia (*Genbank*) ditemukan sebanyak 31 nukleotida dikategorikan sebagai situs beragam. Akan tetapi dari hasil penelitian yang dibandingkan terdapat 6 situs nukleotida beragam. Rata-rata rasio transisi terhadap transversi adalah 3,128.

Jarak genetik yang dihitung menggunakan model 2 parameter Kimura ditemukan nilai paling kecil adalah 0%, nilai paling besar 11,8% dengan rata-rata 2,3%. Adanya situs beragam yang sangat kecil antara *T. bancanus* dan *T. spectrum* hasil penelitian serta tidak adanya perbedaan dari ke 4 *T. spectrum* yang berasal dari Tangkoko dan Air Madidi (0%) dan juga terhadap *T. bancanus* 1, 2, 4, dan 6 (0%), hal ini menunjukkan bahwa daerah *D-loop* merupakan daerah yang memiliki tingkat kemiripan yang sangat tinggi. Di dalam populasi *T. bancanus* pada penelitian ini ada perbedaan namun sangat kecil sekali. Tingkat kemiripan yang sangat tinggi ini sama seperti penelitian yang dilakukan Shimada (2004), bahwa pada daerah *D-loop* domain I (605 nt) dari simpanse di Afrika tidak dapat untuk membedakan spesies simpanse yang hidup di daerah gunung Nimba dan Bossou, Afrika Barat.



**Gambar 3.** Skema daerah *D-loop* dan sebagian daerah hasil sekuensing DNA (Berukuran 270 nt) yang dipakai untuk analisis keragaman genetik pada *Tarsius* sp.

**Tabel 1.** Nukleotida beragam pada daerah *D-loop* parsial *T. bancanus*, *T. spectrum* hasil penelitian dan *T. bancanus* asal Malaysia (*Genbank*)

	31 situs nukleotida beragam (dari 270)
T_banc1	CCCCTTCTAATTCGGTCAACTATCGTTTCCT
T_banc2	.....
T_banc3	..T.....C.....T...C.....
T_banc4	.....
T_banc5	.....C.....T...C.....A.
T_banc6	..T.....
T_banc7	.T.....
T_banc8	.T.....
T_spec1	.....
T_spec2	.....
T_spec3	.....
T_spec4	.....
T_banc*	T.TTCCTCGCCCAACAAGGT.GCTACCCT.A

Hasil penelitian ini sangat berbeda dengan sifat *D-loop* yang memiliki laju mutasi tinggi, yang dapat digunakan untuk membedakan pada tingkat populasi, terutama pada domain I dan III. Fragmen *D-loop* hasil penelitian (270 nt) menurut skema organisasi daerah *D-loop* (Savolainen *et al.*, 2000) terletak pada domain 1, tetapi fragmen DNA tersebut sangat kekal pada *T. bancanus* (Sumatra) dan *T. spectrum*. Keadaan ini sangat berbeda dengan pendapat Sbisá *et al.*, (1997), bahwa daerah *D-loop* dibagi menjadi 3 domain, domain 1 (berbatasan dengan tRNA<sup>Pro</sup>) bersifat variatif, domain 2 (tengah) bersifat kekal dan domain 3 bersifat variatif. Menurut Hoelzel *et al.*, (1994), di daerah *D-loop* ditemukan 5 posisi susunan urutan berulang (*repetitive sequence*, RS) 1 sampai dengan 5, RS1, dan RS2 berada pada ujung 5' *D-loop* sedangkan RS3, RS4, dan RS5 berada pada ujung 3' dari *D-loop*. Menurut Schmitz *et al.*, (2002), pada *T. bancanus* ditemukan runutan berulang pada posisi RS3 sebanyak 22 pb dengan pengulangan bervariasi dari 4 - 15, sedangkan menurut Fumagalli *et al.*, (1996); Wilkinson dan Chapman (1991) ukuran panjang nukleotida *D-loop* bervariasi karena duplikasi atau delesi dari urutan berulang. Jadi, kemungkinan daerah yang memiliki nukleotida bervariasi pada tarsius terletak di posisi RS3 yang terletak pada domain 3.

Adanya perbedaan yang cukup besar antara *T. bancanus* dan *T. spectrum* (hasil penelitian) terhadap *T. bancanus* pembanding, hal ini kemungkinan karena perbedaan letak geografis, iklim, asal usul, dan lamanya waktu pemisahan. Menurut Darlington (1966), tarsius di Sulawesi merupakan salah satu mamalia Kalimantan yang distribusinya sampai ke pulau Sulawesi. Untuk mendapatkan gambaran hasil yang lebih baik seharusnya juga dibandingkan dengan sekuen DNA *T. bancanus* asal Kalimantan. Namun, karena keterbatasan dalam memperoleh sampel maka pada penelitian ini tidak ada pembanding tarsius asal Kalimantan.

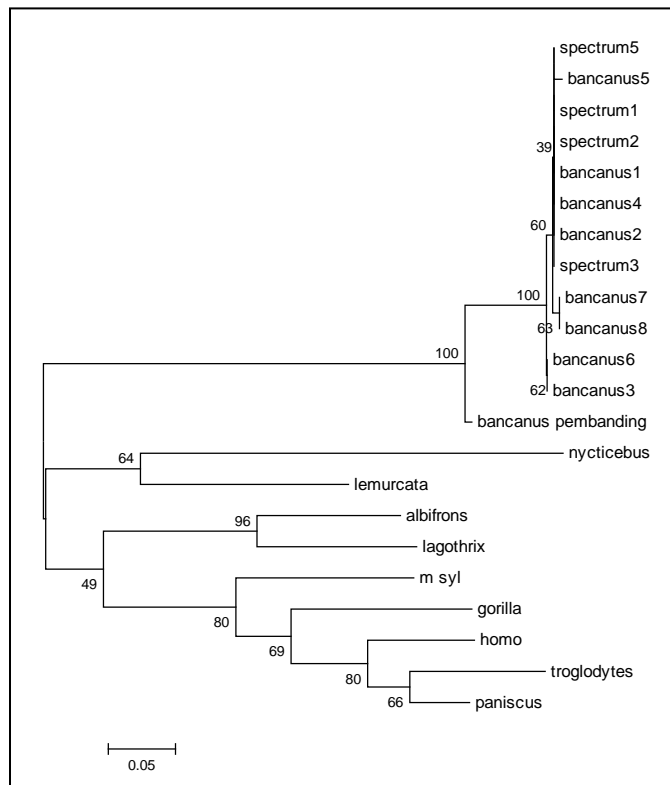
#### **Hubungan kekerabatan *Tarsius* sp. berdasar sekuen nukleotida *D-loop* parsial**

Analisis hubungan kekerabatan antar contoh tarsius dilakukan terhadap 270 nukleotida yang menyusun *D-loop* parsial

dengan spesies primata lain yang diambil dari *Genbank* dipakai sebagai pembanding. Gambar 4 menyajikan filogram berdasar sekuen nukleotida daerah *D-loop* parsial. Pada penelitian ini hanya dilakukan penjajaran nukleotida *D-loop* parsial sebesar 270 nt karena keterbatasan data sekuen nukleotida *T. spectrum*. Apabila dilakukan penjajaran nukleotida di bagian lain *D-loop* tidak menutup kemungkinan menyebabkan pergeseran pola filogram tarsius.

Hasil analisis filogenetik menggunakan metode NJ ini menempatkan kedua spesies tarsius hasil penelitian berada terpisah dengan *T. bancanus* pembanding dan pengelompokan ini didukung oleh nilai bootstrap 100%. Sedangkan *T. bancanus* (Sumatera) dan *T. spectrum* berada dalam satu kelompok dan pengelompokan ini didukung oleh nilai bootstrap 100%. Hasil ini juga didukung oleh jarak genetik yang sangat kecil (0,5%) antara *T. spectrum* dan *T. bancanus* (Sumatera). Hal ini menunjukkan bahwa daerah *D-loop* mempunyai homologi yang sangat tinggi pada *T. bancanus* dan *T. spectrum*. Hal ini sama seperti penelitian yang dilakukan Shimada (2004), bahwa pada daerah *D-loop* region I (605 nt) simpanse di Afrika tidak dapat untuk membedakan spesies simpanse tersebut.

Menurut Napier dan Napier (1983), berdasar morfologi, tarsius masih menjadi perdebatan apakah masuk subordo Prosimian (kelompok primata kecil) atau intermedier (di pertengahan) antara subordo Anthrogoidea (kelompok primata besar) dan Prosimian. Sedangkan menurut Groves (2001), primata dibagi menjadi subordo Strepsirrhini (sebelumnya Prosimian) dan subordo Haplorrhini (sebelumnya Anthrogoidea), tarsius masuk ke dalam subordo Haplorrhini. Hasil analisis filogenetik ke 270 nukleotida daerah *D-loop* parsial pada penelitian ini mengelompokkan *Tarsius* sp. masuk ke dalam sub ordo Haplorrhini (anthrogoidea), seperti pengelompokan *Tarsius* sp. yang dilakukan oleh Groves (2001) yaitu berdasar data morfologi dan Ross *et al.*, (1998) berdasar data 291 karakter morfologi.



**Gambar 4.** Filogram menggunakan metode *Neighbor joining* dari nukleotida lokasi *D-loop* parsial (berukuran 270 nt) *Tarsius* sp. dengan spesies primata lain

## Kesimpulan dan Saran

### Kesimpulan

Sekuen nukleotida DNA pada daerah *D-loop* parsial tidak dapat digunakan untuk membedakan interspesies, antara *T. bancanus* dan *T. spectrum*. Namun demikian sekuen nukleotida *D-loop* dapat digunakan untuk mengelompokkan tarsius ke dalam kelompok Haplorrhini.

### Saran

Perlu penelitian lebih lanjut pada lokasi *D-loop* region III untuk lebih memantapkan hubungan kekerabatan antar tarsius.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Dr. Saroyo, Dr. Drs. Yulius Duma, Msi dan Dr. Hengki Johannes Kiroh yang telah membantu dalam memperoleh sampel tarsius.

## Daftar Pustaka

- Darlington, P.J. 1966. *Zoogeography: The geographical distribution of animals*. John Wiley. New York. 488-490.
- Duryadi, D. 1993. Role possible du comportement dans l'évolution de Deux Souris *Mus macedonicus* et *Mus spicilequus* en Europe Centrale. *Thesis Doctorat*. France: Montpellier, Univ. Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc.
- Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L. and Hausser, J. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Mol. Biol. Evol.* 13: 31-46.
- Groves, C. 2001. *Primate Taxonomy*. Smithsonian Inst Pr. London.
- Hoelzel, A.R., Lopez, J.V., Dover, G.A. and O' Brien, S.J. 1994. Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *J. Mol. Evol.* 39: 191-199.

- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. 2001. *Molecular evolutionary genetics analysis version 2.0*. Pennsylvania State Univ. Inst of Molecular Evolutionary genetics.
- Musser, G.G. and 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, J.R. and Napier, P.H. 1983. *The natural history of the primates*. British Museum (Natural History). Cromwell Road. London.
- Randi, E. and Lucchini, V. 1998. Organization and evolution of mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *J. Mol. Evol.* 47: 449-462.
- Ross, C., Williams, B. and Kay, R.F. 1998. Phylogenetic analysis of anthropoid relationships. *J. Human Evol.* 35: 221-306.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Pr. New York.
- Savolainen, P., Arvestad, L. and Lunderberg, J. 2000. mtDNA tandem repeats in domestic dogs and wolves: Mutation mechanism studied by analysis of the sequence of imperfect repeats. *J. Mol. Evol.* 12: 474-488.
- Sbisa, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G. and Saccone, C. 1997. Mammalian mitochondrial *D-loop* region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205: 125-140.
- Schmitz, J., Ohme, M. and 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 Univ.
- Shimada, M.K. 2004. Mitochondrial DNA genealogy of chimpanzees in the Nimba mountains and Bossou, West Africa. *Am. J. Primatol* 64: 261-275.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and 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.
- Wilkinson, G.S. and Chapman, A.M. 1991. Length and sequence variation in evening bat *D-loop* mtDNA. *Genetics* 128: 607-617.
- Widayanti, R. 2006. Kajian penanda genetik gen cytochrome b dan daerah D-loop pada *Tarsius* sp. *Disertasi*. Bogor: Program Studi Primatologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.