

UNIVERSITAS NEGERI MANADO, SULAWESI UTARA, INDONESIA

**Kajian Keragaman Asam Amino berdasarkan Sekuen Parsial Gen *cyt b*  
Pada Tarsius Sulawesi Utara**

**Study of Amino Acid Diversity based on Partial Sequence of the *cyt b* Gene  
On Tarsier North Sulawesi**

**Decky David Wemvrid Kamagi<sup>1\*</sup>, Sukmarayu P. Gedoan, dan Mariana Rengkuan**

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Negeri Manado

Kampus Unima di Tondano, Sulawesi Utara 95618, Indonesia

\*Korespondensi penulis e-mail: deckykamagi@unima.ac.id

Diterima 14 September 2021/Disetujui 2 November 2021

**ABSTRAK**

Keragaman nukleotida mitokondria pada populasi dan spesies secara luas digunakan pada kajian evolusioner dan hubungan kekerabatan. Keragaman komposisi nukleotida telah terbukti secara signifikan berhubungan erat dengan komposisi asam amino dalam protein. Penelitian bertujuan untuk mengkaji keragaman asam amino berdasarkan sekuen parsial gen *cyt b* pada tarsius Sulawesi Utara. Gen *cyt b* parsial beberapa spesies Tarsius tipe lokalitas Sulawesi Utara, diamplifikasi dan sekuensing dan selanjutnya sekuen parsial gen *cyt b* yang diperoleh diterjemahkan ke asam amino. Sekuen asam amino dari beberapa spesies Tarsius tipe lokalitas Sulawesi Utara kami jajarkan dengan asam amino homolog dari beberapa taksa berkerabat dari famili *Tarsiidae* yang diambil dari *GenBank*. Ekstraksi DNA total menggunakan *innuPREP DNA Micro kit*, dan amplifikasi gen *cyt b* menggunakan sepasang primer umum L 14841 dan H15149. Ukuran sekuen gen *cyt b* yang teramplifikasi mempunyai panjang 307 nt. Penerjemahan nukleotida ke asam amino mengikuti sistim *vertebrate mitochondrial translation code* melalui program MEGA5.2.2. Rekonstruksi pohon filogeni berdasarkan sekuen asam amino dilakukan melalui metode *maximum parsimony* (MP). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 11 situs beragam yang teridentifikasi. Situs-situs tersebut adalah situs 7, 11, 13, 14, 25, 28, 46, 50, 60, 75, dan 90. Perubahan Asam amino di situs-situs tersebut dapat dipergunakan sebagai marka molekuler antar spesies Tarsius. Topologi pohon menunjukkan bahwa Tarsius tipe lokalitas Sulawesi Utara bersekutu dengan kelompok *Tarsius tarsier* kompleks (Tarsius Sulawesi) dan terpisah dari kelompok *C. bancanus* dan *C. syrichta*.

Kata kunci: Nukleotida Gen *cyt b*, asam amino, *Tarsius* sp

**ABSTRACT**

Mitochondrial nucleotide diversity in populations and species is widely used in evolutionary and kinship studies. The diversity of nucleotide compositions has been shown to be significantly related to the amino acid composition of proteins. The aim of the study was to examine the diversity of amino acids based on the partial sequence of the *cyt b* gene in tarsiers of North Sulawesi. The partial *cyt b* gene of several species of Tarsier type locality North Sulawesi, was amplified and sequencing and then the partial sequence of the *cyt b* gene obtained was translated into amino acids. We have compared the amino acid sequences of several Tarsiers species of North Sulawesi locality to the homologous amino acids of several related taxa from the family *Tarsiidae* taken from *GenBank*. Extraction of total DNA using the *innuPREP DNA Micro kit*, and amplification of the *cyt b* gene using a pair of common primers L 14841 and H15149. The size of the amplified *cyt b* gene sequence was 307 nt in length. The translation of nucleotides into amino acids follows the *vertebrate mitochondrial translation code* system through the

MEGA5.2.2 program. Reconstruction of the phylogeny tree based on amino acid sequences was carried out using the maximum parsimony (MP) method. The results showed that there were 11 different sites identified. These sites are sites 7, 11, 13, 14, 25, 28, 46, 50, 60, 75, and 90. Amino acid changes at these sites can be used as molecular markers between Tarsier species. The tree topology shows that the Tarsius of North Sulawesi locality is allied with the complex Tarsier tarsier group (Sulawesi Tarsier) and separated from the *C. bancanus* and *C. syrichta* groups.

Keywords: Nucleotide *cyt b* gene, amino acids, *Tarsius* sp

## PENDAHULUAN

Keragaman genetik DNAmitokondria pada berbagai spesies secara luas digunakan untuk kajian kekerabatan dan evolusiner populasi. Kajian itu memanfaatkan beberapa fitur dari genom mitokondria, yaitu organisasinya yang sederhana, kurangnya rekombinasi, modus pewarisan pada banyak spesies mengikuti ibu. Pada hewan mutasi relatif tinggi daripada gen inti. Tingginya laju mutasi mtDNA melampaui DNA inti antara lain disebabkan oleh kecenderungan rusaknya sistem replikasi, kurang efisiensinya fungsi pengeditan dan tingginya tingkat *turn-over* (Brown *et al.* 1982). Gen *cyt b* merupakan salah satu gen penyandi protein pada mtDNA. Produk gen *cyt b* adalah sitokrom b (*cyt b*) yang merupakan sub unit katalitik sentral pada siklus Q. Gen *cyt b* mengandung kelompok karakter diskrit (masing-masing posisi basa pada kodon) yang memaparkan laju mutasi, sehingga dapat dipergunakan sebagai suatu penanda filogenetik (*marker phylogenetic*) (Forias *et al.* 2001).

Kajian pada nukleotida *cyt b* seperti jenis substitusi dasar yaitu transisi dan tranversi, variasi di antara situs misalnya posisi basa pada kodon, sampai kepada pergantian asam amino telah dilakukan pada beberapa populasi hewan (Irwin *et al.* 1991; Kocher *et al.* 1989). Studi terdahulu dari evolusi molekul *cyt b* menunjukkan bahwa domain ini secara fungsional berkembang dengan berbagai tingkat pergantian (*replacement*) asam amino (Irwin *et al.* 1991; Kocher *et al.* 1989; Griffiths 1997).

Salah satu aspek yang penting dalam kajian evolusi molekuler mamalia, adalah kejadian substitusi pada situs nonsinonim dan sinonim pada DNA (Smith & Hurst 1999). Substitusi pada situs nonsynonymous pada DNA menyebabkan penggantian asam amino, sementara substitusi sinonim pada DNA, asam amino tidak berubah. Telah diketahui bahwa pada region yang menyandikan asam amino pada gen, tingkat substitusi sinonim secara umum lebih besar daripada substitusi nonsinonim (Miyata *et al.* 1980). Beberapa kajian melaporkan adanya korelasi yang tinggi antara tingkat substitusi sinonim dan tingkat substitusi nonsinonim pada gen mamalia (Miyata *et al.* 1980; Smith & Hurst 1999). Pada DNA mitokondria vertebrata, divergensi pada situs sinonim antara spesies terjadi 5-50 kali lebih tinggi daripada genom inti (Irwin *et al.* 1991).

Singer dan Hickey (2000) menyatakan bahwa variasi dalam komposisi asam amino pada umumnya dipengaruhi oleh posisi basa pada kodon. Di pihak lain Schmitz *et al.* (2002), menyatakan bahwa variasi asam amino itu dipengaruhi oleh semua posisi basa pada kodon, bahkan oleh posisi basa ketiga dari kodon (*silent codon*). Walaupun substitusi sinonim (*silent substitution*) dapat terjadi akibat substitusi basa di posisi pertama pada kodon (karena regenerat/redundansi kode genetik), namun sebagian besar substitusi sinonim terjadi akibat substitusi basa diposisi ketiga pada kodon. Begitu pula substitusi non sinonim sebageian besar terjadi akibat substitusi basa di posisi pertama dan pertama pada kodon, walaupun dapat juga terjadi akibat substitusi basa di posisi ketiga pada kodon.

Irwin *et al.* (1991) mengemukakan bahwa peningkatan laju substitusi dari basa di posisi pertama pada kodon menyebabkan perubahan asam amino menjadi lebih besar daripada substitusi pada posisi kedua atau ketiga. Substitusi pada basa di posisi ketiga pada kodon umumnya bersifat diam (*silent*), sehingga pertukaran asam amino akan menjadi lebih kecil. Kocher *et al.*, (1989) mengemukakan bahwa walaupun basa di posisi ketiga pada kodon memiliki nilai substitusi yang tinggi, namun substitusi tersebut bersifat *saturation effect* yaitu perubahan basa nukleotida tidak diikuti dengan perubahan asam amino.

Parameter yang banyak digunakan untuk evolusi molekuler pada gen penyandi protein adalah rasio substitusi nonsinonim per substitusi sinonim. Rasio laju substitusi nonsinonim per substitusi sinonim ( $Ka/Ks$ ) (istilah lain  $dN/dS$ ) adalah suatu pengukuran tingkat evolusi dari sekuen gen. Kejadian

relatif substitusi nonsynonym dan substitusi sinonim digunakan untuk menunjukkan kekuatan tekanan selektif (Yang and Bielawski, 2000). Jika nilai rasio  $Ka/Ks$  yang diperoleh = 1, maka substitusi asam amino barangkali sebagian besar netral, jika  $Ka/Ks < 1$ , maka seleksi pemurnian (seleksi terhadap substitusi nonsinonim yang merusak) telah berlangsung, dan jika  $Ka/Ks > 1$ , maka seleksi telah menyebabkan beberapa substitusi asam amino. Penelitian bertujuan untuk mengkaji keragaman asam amino berdasarkan sekuen parsial gen *cyt b* pada tarsius Sulawesi Utara.

## BAHAN DAN METODE

### Pengambilan dan Perlakuan Sampel

Spesimen sampel yang digunakan adalah jaringan otot, yang diperoleh melalui *tail cut sampling*. Spesimen sampel hasil *tail cut sampling* disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ , dengan perlakuan alkohol 95%. Karena sulitnya memperoleh sampel, maka masing-masing spesies hanya terdiri 2 spesimen sampel.

### Ekstraksi DNA dan Amplifikasi Gen *cyt b*

DNA total diekstraksi menggunakan InnuPREP DNA micro Kit. Komponen dan kondisi PCR, telah dioptimasi sehingga gen *cyt b* dapat teramplifikasi. Primer yang digunakan adalah primer universal: L14841 dan H15149 (Kocher et al. 1989). Sebelum disekuensing produk PCR di purifikasi dan dielektroforesis pada gel agarosa 1.5%.

### Sekuensing Gen *cyt b*

Produk hasil amplifikasi dikirim ke perusahaan (*First BASE*, Laboratories Sdn. Bhd. Selangor, Malaysia) untuk disekuensing. Alat yang digunakan ABI PRISM 3730xl *Genetic Analyzer*. Biosystem USA.

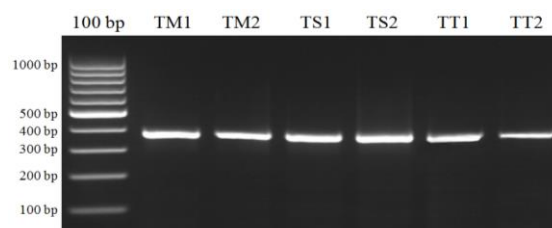
### Penerjemahan, Penjajaran Sekuen dan Analisis Data

Sekuen gen *cyt b* parsial dari *Tarsius sp.* Sulawesi Utara diterjemahkan menggunakan *vertebrate mitochondrial translation code* melalui melalui aplikasi software MEGA5.2.2. Sekuen asam amino Tarsius Sulawesi Utara diujarkan dengan sekuen asam amino homolog dari beberapa spesies Tarsius lain yang diambil dari GenBank menggunakan penjajar otomatis pada piranti lunak MEGA5.2.2. Data dianalisis menggunakan MEGA5.2.2. dan dnaSPv5. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen asam amino dibangun melalui metode *Maximum Parsimony* (MP). Data sekuens asam amino homolog yang di ambil dari GenBank terdiri dari sekuen asam amino beberapa spesies Tarsius dan aksesori, yaitu: *C. bancanus*, *C. syrichta*, *T. wallacei*, *T. dentatus*, *T. lariang* dan *T. dentatus* x *T. lariang*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi dan Amplifikasi Gen Target

DNA total dari enam sampel *Tarsius sp.* Sulawesi Utara berhasil diisolasi dan diamplifikasi. Hasil elektroforesis pada gel agarosa 1.5% menunjukkan gen *cyt b* yang teramplifikasi berukuran sampai 400 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Amplifikasi gen *cyt b* sampel Tarsius sp. Sulawesi utara pada gel agarosa 1.5%. Lanes: 100 bp sebagai marker, TM1 dan TM2 = *T. tarsier*, TS1 dan TS2 = *T. sangirensis*, TT1 dan TT2 = *T. tumpara*

### Lokasi Penempelan Primer dan Panjang Sekuen yang Diampifikasi

Primer L 14841 dan H 15149 mampu mengamplifikasi sekuen gen *cyt b* sampai dengan panjang 307 bp. Lokasi penempelan kedua primer L 14841 (33 bp) dan H 15149 (34 bp) di daerah gen *cyt b* terletak mulai dari sekuens nukleotida ke-61 ke arah hilir (*down stream*) untuk primer *forward* dan dari sekuens nukleotida ke-436 ke arah hulu (*up stream*) untuk primer *reverse*. Sekuen gen *cyt b* parsial yang

teramplifikasi terletak pada nukleotida ke-96 sampai ke-402 pada sekuen gen cyt b utuh atau terletak pada nukleotida ke-4265 sampai 14570 pada genom mtDNA utuh.

**Penjajaran Berganda Sekuen Asam Amino**

Sekuen gen cyt b yang teramplifikasi adalah dengan panjang 307 nt, akan tetapi yang diterjemahkan ke asam amino hanya terdiri 306 nt – kerangka bacaan dimulai dari basa kedua – sehingga menghasilkan 102 asam amino yang disandikan oleh 102 kodon. Hasil penjajaran berganda sekuen asam amino dari Tarsius Sulawesi utara –*T. sangirensis*, *T. tarsier*, *T. tumpara* – dan sekuen gen cyt b homolog dari beberapa spesies Tarsius dan aksesori yang diambil dari *GenBank* (Data lengkap tidak disertakan) menunjukkan situs kekal 89%, situs parsimoni informatif 11% dan situs beragam 11%. Analisis pada kodon sekuen asam amino ditemukan jumlah situs sinonim (S) adalah 76.42 dan situs non-sinonim (N) adalah 229.58. Jumlah total situs polimorfik pada situs sinonim adalah 69, situs non-sinonim adalah 9, sedangkan situs diam = 69. Rasio D (non-sinonim/sinonim) menurut Tajima = 4.3747. Asam amino pada 11 situs beragam ditunjukkan pada Tabel 1.

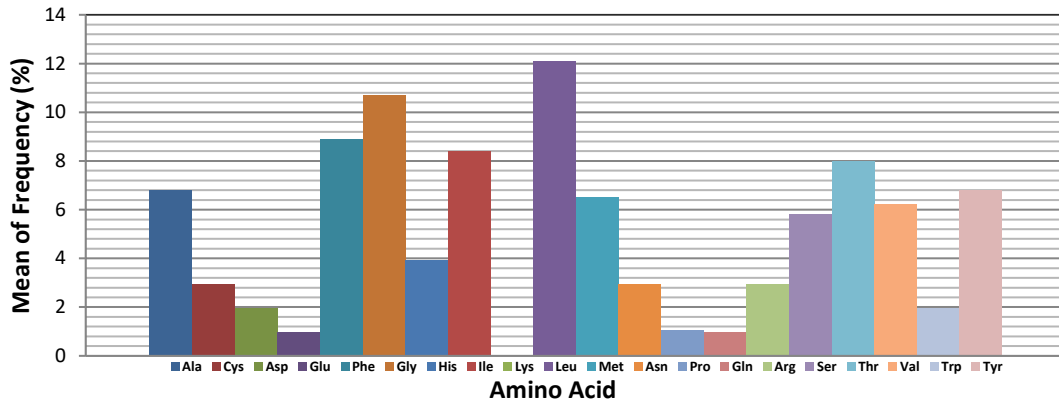
Tabel 1. Asam amino pada 11 situs beragam

No.	Sampel	Asam Amino Pada Situs										
		7	11	13	14	25	28	46	50	60	75	90
1.	C.bancanus (AF348159)	V	L	I	V	S	M	L	L	M	Y	T
2.	C.bancanus (AB011077)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3.	C.syrichtha (AB371090)	.	.	.	I	.	T	I	.	L	F	A
4.	C.syrichtha (NC012774)	.	.	.	I	.	T	I	.	L	F	A
5.	T.wallacei (HM115983)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
6.	T.wallacei (HM115984)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
7.	T.wallacei (HM115980)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
8.	T.wallacei (HM115979)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
9.	T.wallacei (HM115978)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
10.	T.wallacei (HM115977)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
11.	T.wallacei (HM115982)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
12.	T.dentatus (FJ614371)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
13.	T.dentatus (FJ614370)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
14.	T.dentatus (FJ614369)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
15.	T.dentatus (FJ614368)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
16.	T.dentatus (FJ614367)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
17.	T.dentatus (FJ614366)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
18.	T.dentatus x lariang (FJ614361)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
19.	T.dentatus x lariang (FJ614359)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
20.	T.dentatus x lariang (FJ614356)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
21.	T.lariang (FJ614363)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
22.	T.lariang (FJ614358)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
23.	T.lariang (FJ614357)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
24.	T.lariang (FJ614354)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
25.	T.lariang (FJ614353)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
26.	T.lariang (FJ614352)	I	V	.	I	.	V	I	M	I	.	A
27.	T.sangirensis (TS1)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
28.	T.sangirensis (TS2)	I	V	.	I	.	.	I	M	I	.	A
29.	T.tarsier (TM1)	I	M	.	I	.	.	I	M	I	.	A
30.	T.tarsier (TM2)	I	M	.	I	.	.	I	M	I	.	A
31.	T.tumpara (TT1)	I	V	V	I	P	.	I	M	I	.	A
32.	T.tumpara (TT2)	I	V	V	I	P	.	I	M	I	.	A

Keterangan: V = Valine, I = Isoleucine, M = Methionine, S = Serine, P = Proline, T = Threonine, L = Leucine, F = Phenylalanine, Y = Tyrosine, and A = Alanine.

**Komposisi Asam Amino**

Asam amino yang diterjemahkan berdasarkan fragmen sekuen gen cyt b sepanjang 306 nt pada spesies sampel penelitian maupun telah digabung dengan sekuen asam amino homolog beberapa spesies Tarsius yang diambil dari *GenBank*, menunjukkan bahwa frekuensi leusin dan glisin adalah yang paling tinggi. Sementara itu lysin tidak ditemukan di sepanjang sekuen asam amino. Proporsi asam amino yang sedikit adalah asam glutamat dan glutamin. Frekuensi leusin dan glisin pada setiap spesies adalah paling tinggi. Proporsi leusin pada *C. bancanus* dan *C. syrightha* adalah yang tertinggi yaitu masing-masing 14.71%, sedangkan pada spesies lainnya 11.76%. Glisin pada semua spesies masing-masing adalah 10.78%. Rata-rata frekuensi asam amino secara lengkap disajikan pada Gambar 2.

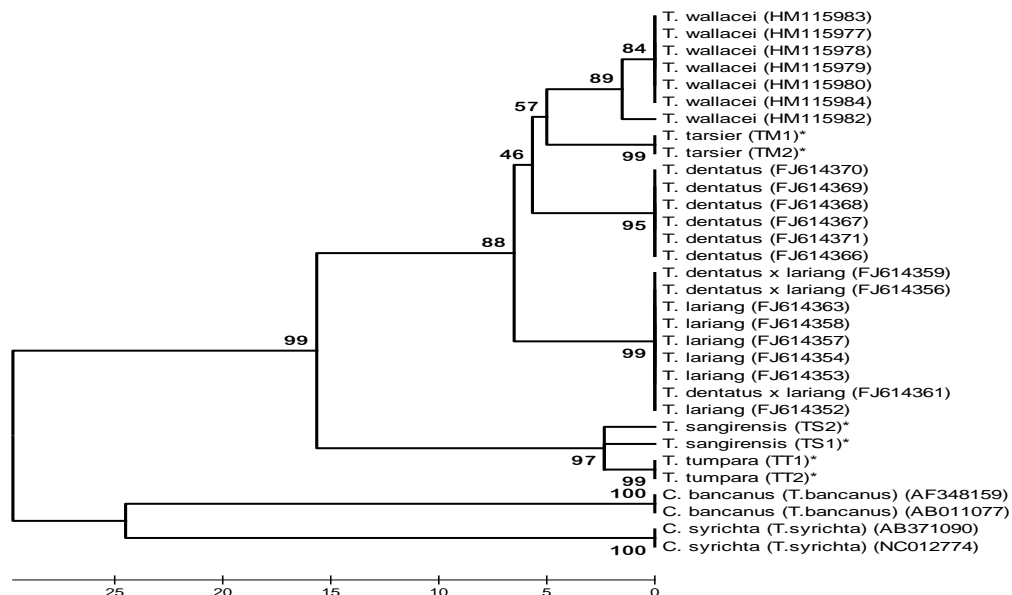


Gambar 2 Proporsi asam amino pada sekuen parsial gen *cyt b* *Tarsius sp*

Penggantian asam amino yang terdeteksi pada 11 situs kodon beragam yaitu situs nomor 7, 11, 13, 14, 25, 28, 46, 50, 60, 75 dan 90 (Tabel 1) dapat dijadikan asumsi untuk menjelaskan asal usul nenek moyang dan divergensi *Tarsius* di Sulawesi. Asumsi yang dapat dikemukakan berkaitan dengan nenek moyang dari *Tarsius* Sulawesi itu kemungkinan berasal dari salah satu dari kedua *C. bancanus* atau *C. syrichta*. Asumsi itu diperkuat oleh posisi *Tarsius* Sulawesi pada pohon yang dibangun berdasarkan sekuen asam amino.

**Pohon Filogenetik *Tarsius sp.* Berdasarkan Asam amino**

Pohon filogenetik menunjukkan bahwa pengelompokkan spesies terjadi kedalam dua clade utama yaitu: pertama, clade yang ditempati oleh *C. bancanus* dan *C. syrichta* dan kedua, clade yang ditempati spesies lainnya. Pada clade yang kedua, terbentuk lagi subclade dimana *T. sangirensis* dan *T. tumpara* membentuk subclade sendiri dan terpisah dengan subclade yang ditempati *Tarsius* tarsier kompleks lainnya, sedangkan *T. tarsier* berada pada satu subclade dengan *T. wallacei*. Berdasarkan topologi pohon tersebut diduga nenek moyang dari *Tarsius tarsier* kompleks (*Tarsius* Sulawesi) berasal dari clade *C. bancanus* atau *C. syrichta*.



Gambar 3 Pohon filogenetik yang dibangun berdasarkan asam amino Metode Statistik: Neighbor-Joining, Jumlah Ulangan Bootstrap 1000 kali dan Model Jones-Taylor-Thornton (JTT).

**Pembahasan**

**Substitusi dan Keragaman Asam Amino**

Frekuensi basa dan asam amino dalam mitokondria bervariasi antara spesies karena laju mutasi diantara basa tidak seimbang. Frekuensi basa yang paling bervariasi dari sekuens mtDNA adalah C dan

T (Gibson *et al.* 2005), sehingga tidak mengherankan hasil analisis keragaman asam amino pada fragmen gen *cyt b* pada *Tarsius sp.* menunjukkan kandungan leusin dengan frekuensi yang tinggi. Tingginya frekuensi leusin adalah disebabkan mereka disandikan oleh enam triplet berbeda dan beberapa diantara triplet tersebut substitusi basa di posisi pertama tidak menyebabkan penggantian asam amino, TTR↔CTR (Irwin *et al.* 1991).

Pada penjabaran sekuen sampel dimana ditemukan 73 situs kodon beragam, hanya 11 situs yang mengalami penggantian asam amino. Pada 11 situs yang mengalami penggantian asam amino tersebut sebagian besar karena substitusi basa di posisi pertama pada kodon. Pada situs kodon beragam akan tetapi tidak mengalami penggantian asam amino lebih banyak disebabkan oleh substitusi pada basa di posisi ketiga pada kodon. Pola substitusi basa yang diidentifikasi pada kodon gen *cyt b* parsial, menunjukkan bahwa substitusi paling banyak terjadi pada basa di posisi ketiga, diikuti di posisi pertama dan kedua. Fakta ini sejalan dengan yang dikemukakan Kocher *et al.* (1989) dan Farias *et al.* (2001) bahwa basa di posisi pertama dan kedua pada kodon gen *cyt b* memiliki nilai substitusi yang rendah atau kurang bervariasi antar individu dan sebaliknya basa di posisi ketiga pada kodon memiliki nilai substitusi yang tinggi, atau bervariasi antar individu. Namun demikian peningkatan laju substitusi basa di posisi pertama akan menyebabkan perubahan asam amino lebih meningkat daripada laju substitusi basa di posisi kedua atau ketiga (Irwin *et al.* 1991). Hal senada diungkapkan Schmitz *et al.* (2002) bahwa substitusi basa di posisi ketiga pada kodon tanpa menyebabkan perubahan asam amino karena substitusi itu bersifat diam atau *saturation effect*. Dengan kata lain kendala fungsional pada substitusi basa di posisi pertama dan kedua lebih kuat daripada substitusi basa di posisi ketiga (Moritz *et al.* 1987).

Pada mtDNA, kodon dapat berupa kodon sinonim dan non-sinonim. Kodon sinonim dapat berbeda dalam kandungan basa pada posisi pertama, kedua atau ketiga akan tetapi menyandikan asam amino yang sama. Sebagai contoh adalah asam amino arginin, leusin dan serin masing-masing disandikan oleh enam kodon berbeda. Kodon nonsinonim adalah kodon-kodon spesifik yang menyandikan satu asam amino. Perbedaan basa dapat terjadi pada situs kodon sinonim maupun nonsinonim, dan apabila hanya situs kodon sinonim berbeda di antara gen atau sekuen, maka susunan asam amino dalam protein identik, akan tetapi kalau situs kodon nonsinonim yang berubah maka susunan asam amino akan berbeda (Foster *et al.* 1997).

### **Penggantian Asam Amino**

Berdasarkan jenis asam amino yang terdeteksi di sebelas situs variabel, dua temuan penting dapat dikemukakan. Kedua temuan penting tersebut dibangun berdasarkan asumsi bahwa *C. bancanus* merupakan nenek moyang dari semua spesies *Tarsius* lain yang ditemukan di Sulawesi dan Filipina.

Temuan pertama adalah berkaitan dengan hubungan antara *Tarsius* Filipina dan semua spesies *Tarsius* Sulawesi. Berdasarkan jenis asam amino yang ditemukan di situs beragam yaitu situs nomor 14, 46 dan 90, mungkin itu dapat menunjukkan bahwa *C. syrichta* adalah nenek moyang dari semua spesies *Tarsius* Sulawesi. Temuan ini didukung juga oleh jenis asam amino yang ditemukan pada situs variabel nomor 13 dan 25. Di sisi lain temuan pertama ini dilemahkan oleh fakta yang berkaitan dengan jenis asam amino yang ditemukan di situs variabel nomor 38, 60 dan 75.

Temuan kedua berkaitan dengan jenis asli atau spesies yang menghasilkan semua spesies *Tarsius* Sulawesi sesudah kejadian memisahkan mereka dari *C. bancanus* atau dari *C. syrichta*. Apapun nenek moyang mereka, *C. bancanus* atau *C. syrichta*, semua spesies *Tarsius* Sulawesi diyakini berasal dari satu kelompok (setelah memisahkan dari *C. bancanus* atau *C. syrichta*). Ini bukti kedua berkaitan dengan jenis asam amino yang ditemukan di semua situs variabel terutama ditemukan di nomor 7, 11, 50 dan 60.

Sejarah geologi proto-Sulawesi telah memainkan peran penting dalam radiasi dan distribusi *Tarsius* di Sulawesi (Shekelle & Leksono 2004; Hall 2001; Merker *et al.* 2009). Nenek moyang dari *Tarsius* Sulawesi berpisah dari *C. bancanus* dan mencapai daratan Sulawesi diperkirakan di awal atau pertengahan Meosin atau berkisar 10 ma (Merker *et al.* 2009; Shekelle *et al.* 2010). Perkiraan itu didasarkan pada *elucidating* geologi Sulawesi dan bukti perbandingan jarak genetik sekuen 12S mtDNA dan umur dari crown *Tarsius*. Waktu spesiasi *Tarsius* kompleks diperkirakan berkisar antara 3.4 dan 11.1 ma, sedangkan nenek moyang *C. bancanus* diperkirakan antara 4.8 dan 18.6 ma (Shekelle *et*

al. 2010). Wilayah kepulauan sebelum berkoalisi menjadi pulau Sulawesi modern telah mengalami isolasi di masa-masa kemudian oleh karena munculnya daratan yang disebabkan oleh turunnya permukaan laut. Radiasi dan penyebaran *Tarsius* dipengaruhi oleh isolasi baik di pulau-pulau di kepulauan proto-Sulawesi maupun karena hambatan geografis dan biologis, yang memiliki potensi untuk memisahkan populasi, membentuk keragaman dan penyebaran spesies *Tarsius* di Sulawesi.

### **Pohon filogenetik**

Pohon filogenetik yang direkonstruksi berdasarkan asam amino dari sekuen parsial gen *cyt b* memperkuat fakta bahwa pengelompokan *Tarsius sp.* yang dikaji sesuai dengan klasifikasi berdasarkan bukti morfologi (Shekelle et al. 2008; Groves & Shekelle, 2010), bentuk akustik vokalisasi (Niemitz et al. 1991; Burton & Neitsch 2010), dan sebaran endemitas pada wilayah biogeografik masing-masing spesies (Shekelle & Leksono 2004; Shekelle et al. 2008; Groves & Shekelle 2010).

Klasifikasi awal genus *Tarsius* terdiri atas tiga spesies yaitu *Tarsius bancanus*, *Tarsius syrichta* dan *Tarsius spectrum*, masing-masing endemik di wilayah biogeografi yang berbeda (Hill 1955). Groves dan Shekelle (2010) telah merevisi genus dan spesies famili *Tarsiidae* yang semula merupakan genus monotipe, akan tetapi sekarang terdiri dari 3 genus, yaitu genus *Chepalopachus* untuk *Tarsius* barat dengan wilayah biogeografi Kalimantan dan Sumatera, *Carlito* untuk *Tarsius* Filipina dan *Tarsius* untuk *Tarsius* timur atau *Tarsius* Sulawesi atau dikenal sebagai *Tarsius tarsier* kompleks.

*T. sangirensis* dan *T. tumpara* terpisah dengan *Tarsius* Sulawesi lainnya, karena kedua spesies ini mendiami wilayah biogeografi yang terpisah dari daratan Sulawesi. Kedua spesies *T. sangirensis* dan *T. tumpara* mendiami wilayah biogeografi kepulauan yang dikenal sebagai rantai pulau Sangihe. *T. tumpara* mendiami pulau Siau dan *T. sangirensis* mendiami pulau Sangihe, dimana kedua pulau tersebut dibatasi laut dalam dengan jarak  $\pm 60$  mil. *T. tumpara* secara halus berbeda daripada *T. sangirensis*, namun keduanya berbeda secara mencolok daripada *Tarsius tarsier* kompleks dan ciri morfologis rambut ekor yang jarang dari *T. sangirensis* dan *T. tumpara* mendekati kondisi seperti *Tarsius* Filipina *T. syrichta*. Pengelompokan *T. sangirensis* dan *T. tumpara* dari kajian ini memberi dukungan pada hipotesis bahwa *T. tumpara* dan *T. sangirensis* adalah *sister-taxon* dan bersekutu dengan *T. tarsier*-kompleks (Shekelle et al. 2008; Groves & Shekelle 2010).

Pengelompokan *T. sangirensis* dan *T. tumpara* pada satu clade yang sama serta pengelompokan *T. tarsier* pada subclade besar bersama-sama dengan *T. wallacei*, *T. dentatus* dan *T. lariang* dari hasil kajian ini adalah sejalan dengan sebaran *Tarsius sp.* di Sulawesi, pertama berdasarkan hipotesis biogeografi hibrid *Tarsius* (Shekelle et al. 1998; Shekelle & Leksono 2004), yaitu adanya kesesuaian antara sebaran *Tarsius* dan kera Sulawesi; kedua, sebaran *Tarsius* Sulawesi berkaitan erat dengan sebaran bentuk vokalisasi (*duet song*). Sebaran bentuk vokalisasi *Tarsius* di Sulawesi bagian utara, tengah, tenggara, dan selatan sesuai dengan tipe lokalitas masing-masing spesies (Shekelle 2008); Burton & Nietsch 2010).

Berkaitan dengan analisis keragaman asam amino yang dikaji hanya berasal dari sekuen *cyt b* hanya sebatas 307 nt, maka informasi yang diperoleh menjadi terbatas. Bagaimanapun, hal ini telah memberikan informasi tentang keragaman asam amino dan hal ihwal yang berkaitan dengan itu. Hasil temuan dari kajian ini sesuai dengan beberapa temuan terdahulu dan untuk mendapatkan hasil yang lebih dapat diandalkan, hasil studi ini perlu diperiksa lagi oleh urutan gen *cyt b* secara keseluruhan, atau dibandingkan dengan aplikasi penanda genetik lain.

### **KESIMPULAN**

Asam amino di beberapa situs dari sekuen parsial gen *cyt b Tarsius sp.* telah mengalami penggantian di posisi pertama, baik pada kodon sinonim maupun non-sinonim. Penggantian asam amino di beberapa situs tersebut dapat dipergunakan sebagai marka molekuler antar spesies *Tarsius*. Posisi *Tarsius* Sulawesi Utara – *T. sangirensis*, *T. tumpara* dan *T. tarsier* – pada pohon filogenetik yang dibangun berdasarkan asam amino sejalan dengan klasifikasi berdasarkan morfologi, sebaran endemitas di wilayah biogeografi dan sebaran berdasarkan bentuk vokalisasi masing-masing spesies. Hasil penelitian ini menemukan bahwa *T. sangirensis*, *T. tumpara* dan *T. tarsier* adalah bersekutu dengan *Tarsius tarsier* kompleks (*Tarsius* Sulawesi) dan terpisah dari *C. bancanus* dan *C. syrichta*.



## DAFTAR PUSTAKA

- Bielawski JP, Gold JR. 1996. Unequal Synonymous Substitution Rates Within and Between Two Protein-Coding Mitochondrial Genes. *Mol. Biol. Evol.* 13(6):889-892.
- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC. 1982. Mitochondrial DNA sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution. *J. Mol. Evol.* 18:225-239.
- Burton JA, Nietsch A. 2010. Geographical Variation in Duet Songs of Sulawesi Tarsiers: Evidence for New Cryptic Species in South and Southeast Sulawesi. *Int J Primatol* 1007/s10764-010-9449-8. Springer Science+Business Media, LLC 2010.
- Castro JA, Picornell A, Ramon M. 1998. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *Int. Microbiol.* 1:327-332.
- Clayton DA. 2000. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction*, Vol. 15. (Suppl. 2), pp. 11-17.
- Forias IP, Orti G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A. 2001. The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *J. Mol. Evol.* 53:89-103.
- Foster PG, Jermin LS, Hickey DA. 1997. Nucleotide Composition Bias Affects Amino Acid Content in Proteins Coded by Animal Mitochondria. *J. Mol. Evol.* 44:282-288.
- Gibson A, Gowri-Shankar V, Higgs PG, Rattray M. 2005. A Comprehensive Analysis of Mammalian Mitochondrial Genome Base Composition and Improved Phylogenetic Methods. *Mol. Biol. Evol.* 22(2):251-264. 2005
- Groves C, Shekelle M, 2010. Genera and Species of Tarsiidae. *Int. J. Primatol.* 31:1071-1082.
- Hall R. 2001. Cenezoic reconstructions of SE Asia and the SW Pacific: changing patterns of land and sea. In metcale I., Smith, J.M.B. Morwood, M. and Davidson I.D. *Faunal and Floral migration in SE Asia-Australia*. A. A. Balkema (Swets and Zietlinger Publishers) Lisse, 35 - 36.
- Hill WCO. 1955. *Primates: Comparative Anatomy and Taxonomy. II. Haplorhini: Tarsioidea*. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. 1991. Evolution of Cytochrome *b* Gene Mammals. *J. Mol. Evol.* 32:128-144.
- Karanth KP, Lalji S, Collura RV, Beth SC. 2008. Molecular phylogeny and biogeography of langurs and leaf monkey of South Asia., *Mol. Phylogenet., Evol.*, 46:683-694.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of bases substitution trough comparative studies of nucleotide sequences, *J. Mol. Evol.* 16: 111 - 120.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC, 1989, Dynamics of mitokondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6196-6200.
- Kocher RD, Carleton KL. 1997. Base substitution in fish mitochondrial DNA: patters and rates. In Molecular systematics of Fish. Kocher, TD and Ca Stepien (Eds.). Academic Press: San Diego.
- Kondo R, Horay S, Satta Y, Takahata N. 1993. Evolution of hominid mitochondrial DNA with special reference to the silent substitution rate over the genome. *J. Mol. Evol.* 36:517-531.
- Li WH. 1993 Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J. Mol. Evol.* 36: 96-99.
- Matsui A, Rakotondraparany F, Munechika I, Hasegawa M, Horai S. 2009. Molecular phylogeny and evolution of prosimians based on complete sequences of mitochondrial DNAs. *J. Gene* 441 (1-2), 53-66.
- Merker S, Drillera C, Perwitasari-Farajallah D, Pamungkas J, Zischlera H. 2009. Elucidating Geological and Biological Processes Underlying the Diversification of Sulawesi Tarsiers. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073.PNAS.0900319106](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073.PNAS.0900319106).



- Merker S, Driller C, Dahruddin H, Wirdateti, Sinaga W, Farajallah DP, Shekelle M. 2010. *Tarsius wallacei*: A New Tarsier Species from Central Sulawesi Occupies a Discontinuous Range. *Int. J. Prim.* Vol. 31 (6):1107-1122.
- Miyata T, Yasunaga T. 1980. Molecular evolution of mRNA: a method for estimating evolutionary rates of synonymous and amino acid substitutions from homologous nucleotide sequences and its applications. *J. Mol. Evol.* 16:23–36.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.
- Nei M, Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the number of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3:418–426.
- 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. 2008. Distribution of Tarsiers Acoustic Forms, North and Central Sulawesi: with Notes on The Primary Taxonomy of Sulawesi's Tarsiers. *Primates of The Oriental Night* p.:35 – 50.
- Shekelle M, Leksono, 2004. Strategi Konservasi di Pulau Sulawesi dengan Menggunakan *Tarsius* sebagai Flagship Species. *Biota* Vol. IX (1): 1-10.
- Shekelle M, Meier R, Wahyu I, Wirdateti, Ting N. 2010. Molecular Phylogenetics and Chronometrics of Tarsiidae Based on 12S mtDNA Haplotypes: Evidence for Miocene Origins of Crown Tarsiers and Numerous Species within the Sulawesi Clade. *Int. J. Primatol.* DOI 10.1007/s10764-010-9457-8.
- Singer GAC, Hickey DA. 2000. Nucleotide Bias Causes a Genomewide Bias in the Amino Acid Composition of Proteins. *Mol. Biol. Evol.* 17(11):1581–1588.
- Smith NGC, Hurst. LD 1999. The Effect of Tandem Substitutions on the Correlation Between Synonymous and Nonsynonymous Rates in Rodents. *Genetics* 153: 1395–1402.
- Tamura K, Nei M. 1993 Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512–526.
- Widayanti R, Solihin DD, Sajuthi D, Perwitasari RRD. 2004, Kajian penanda genetik gen cytochrome B pada *Tarsius* sp., *J. Sain vet.* Vol. 24 No. 1. 2004.
- Yang Z, Yoder A. 1999. Estimation of the Transition/Transversion Rate Bias and Species Sampling. *J. Mol Evol* (1999) 48:274–283.

**Lampiran 1 Penjajaran Sekuen Asam Amino *Tarsius sp.***

1.	C.bancanus (AF348159)	FGSLGVCVLG LQIVTGLFLA MHYTSDTMTA FSSVTHICRD VNYGWLIRYL HANGASMFFM CLFMH	[ 65]
2.	C.bancanus (AB011077)	.....	[ 65]
3.	C.syrichtha (AB371090)	.....I.....T.....I.....L.....	[ 65]
4.	C.syrichtha (NC012774)	.....I.....T.....I.....L.....	[ 65]
5.	T.wallacei (HM115983)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
6.	T.wallacei (HM115984)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
7.	T.wallacei (HM115980)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
8.	T.wallacei (HM115979)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
9.	T.wallacei (HM115978)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
10.	T.wallacei (HM115977)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
11.	T.wallacei (HM115982)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
12.	T.dentatus (FJ614371)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
13.	T.dentatus (FJ614370)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
14.	T.dentatus (FJ614369)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
15.	T.dentatus (FJ614368)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
16.	T.dentatus (FJ614367)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
17.	T.dentatus (FJ614366)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
18.	T.dentatus x lariang (FJ614361)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
19.	T.dentatus x lariang (FJ614359)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
20.	T.dentatus x lariang (FJ614356)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
21.	T.lariang (FJ614363)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
22.	T.lariang (FJ614358)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
23.	T.lariang (FJ614357)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
24.	T.lariang (FJ614354)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
25.	T.lariang (FJ614353)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
26.	T.lariang (FJ614352)	.....I...V..I.....V.....I.....M.....I.....	[ 65]
27.	T.sangirensis (TS1)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
28.	T.sangirensis (TS2)	.....I...V..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
29.	T.tarsier (TM1)	.....I...M..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
30.	T.tarsier (TM2)	.....I...M..I.....I.....M.....I.....	[ 65]
31.	T.tumpara (TT1)	.....I...V..VI.....P.....I.....M.....I.....	[ 65]
32.	T.tumpara (TT2)	.....I...V..VI.....P.....I.....M.....I.....	[ 65]
1.	C.bancanus (AF348159)	VGRGLYYGSY TFLETWNIGI LLLFTVMATA FMGYVLP	[102]
2.	C.bancanus (AB011077)	.....	[102]
3.	C.syrichtha (AB371090)	.....F.....A.....	[102]
4.	C.syrichtha (NC012774)	.....F.....A.....	[102]
5.	T.wallacei (HM115983)	.....A.....	[102]
6.	T.wallacei (HM115984)	.....A.....	[102]
7.	T.wallacei (HM115980)	.....A.....	[102]
8.	T.wallacei (HM115979)	.....A.....	[102]
9.	T.wallacei (HM115978)	.....A.....	[102]
10.	T.wallacei (HM115977)	.....A.....	[102]
11.	T.wallacei (HM115982)	.....A.....	[102]
12.	T.dentatus (FJ614371)	.....A.....	[102]
13.	T.dentatus (FJ614370)	.....A.....	[102]
14.	T.dentatus (FJ614369)	.....A.....	[102]
15.	T.dentatus (FJ614368)	.....A.....	[102]
16.	T.dentatus (FJ614367)	.....A.....	[102]
17.	T.dentatus (FJ614366)	.....A.....	[102]
18.	T.dentatus x lariang (FJ614361)	.....A.....	[102]
19.	T.dentatus x lariang (FJ614359)	.....A.....	[102]
20.	T.dentatus x lariang (FJ614356)	.....A.....	[102]
21.	T.lariang (FJ614363)	.....A.....	[102]
22.	T.lariang (FJ614358)	.....A.....	[102]
23.	T.lariang (FJ614357)	.....A.....	[102]
24.	T.lariang (FJ614354)	.....A.....	[102]
25.	T.lariang (FJ614353)	.....A.....	[102]
26.	T.lariang (FJ614352)	.....A.....	[102]
27.	T.sangirensis (TS1)	.....A.....	[102]
28.	T.sangirensis (TS2)	.....A.....	[102]
29.	T.tarsier (TM1)	.....A.....	[102]
30.	T.tarsier (TM2)	.....A.....	[102]
31.	T.tumpara (TT1)	.....A.....	[102]
32.	T.tumpara (TT2)	.....A.....	[102]

Input Data File: C:\Users\User\Documents\A.meg  
 Number of sequences: 32 Number of sequences used: 32  
 Selected region: 2-307 Number of sites: 306  
 Total number of sites (excluding sites with gaps / missing data): 306

Number of codons analyzed: 102 ( 306 sites )  
 Genetic Code: mtDNA Mammals

Protein Coding, and Non-Coding Regions analyzed:  
 Number of protein coding regions (exons): 1  
 Number of noncoding regions (intronic and flanking regions): 0  
 Protein coding region, from site: 2 to 307

Nucleotide Diversity:  
 Synonymous sites. Number of sites: 76,42  
 Pi(s): 0,24633 Pi(s), Jukes & Cantor: 0,37546  
 Theta(s) / Number of mutations: n.a.  
 NonSynonymous sites. Number of sites: 229,58  
 Pi(a): 0,01109 Pi(a), Jukes & Cantor: 0,01130  
 Theta(a) / Number of mutations: n.a.

	Total Number of sites	
	SS, Synonymous sites.	NSS, NonSynonymous sites
C._bancanus_(T.banca)	SS: 77,33	NSS: 228,67
C._bancanus_(T.banca)	SS: 77,33	NSS: 228,67
C._syrichta_(T.syric)	SS: 77,33	NSS: 228,67
C._syrichta_(T.syric)	SS: 77,33	NSS: 228,67
T._wallacei_(HM11598)	SS: 75,67	NSS: 230,33
T._wallacei_(HM11598)	SS: 75,67	NSS: 230,33
T._wallacei_(HM11598)	SS: 75,67	NSS: 230,33
T._wallacei_(HM11597)	SS: 75,67	NSS: 230,33
T._wallacei_(HM11597)	SS: 75,67	NSS: 230,33
T._wallacei_(HM11597)	SS: 75,67	NSS: 230,33
T._wallacei_(HM11598)	SS: 75,67	NSS: 230,33
T._dentatus_(FJ61437)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_(FJ61437)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_(FJ61436)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_(FJ61436)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_(FJ61436)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_(FJ61436)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_(FJ61436)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_x_larian	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_x_larian	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._dentatus_x_larian	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._lariang_(FJ614363)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._lariang_(FJ614358)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._lariang_(FJ614357)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._lariang_(FJ614354)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._lariang_(FJ614353)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._lariang_(FJ614352)	SS: 77,00	NSS: 229,00
T._sangirensis_(TS1)	SS: 74,33	NSS: 231,67
T._sangirensis_(TS2)	SS: 74,33	NSS: 231,67
T._tarsier_(TM1)*	SS: 76,33	NSS: 229,67
T._tarsier_(TM2)*	SS: 76,33	NSS: 229,67
T._tumpara_(TT1)*	SS: 75,00	NSS: 231,00
T._tumpara_(TT2)*	SS: 75,00	NSS: 231,00