

Penanda Genetik Tarsius (*Tarsius* spp.) dengan Menggunakan Gen Cytochrome Oxidase I (COI) DNA Mitokondria (mtDNA) Melalui Metode Sekuensing (Genetic Marker on Tarsier (*Tarsius* spp.) using Cytochrome Oxidase I Gene (COI) of Mitochondrial DNA (mtDNA) through Sequencing Method)

Wirdateti¹, Sri Wijayanti Wulandari², & Paramita Cahyaningrum Kuswandi²

¹Pusat Penelitian Biologi-LIPI, ²Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta

Email: teti_mzb@yahoo.com

Memasukkan: Maret 2015 Diterima: Juni 2015

ABSTRACT

Tarsier (*Tarsius* spp.) are the smallest primates in the world. Currently there are 10 species, of which 9 species are distributed in Indonesia and 8 species of them are endemic to Sulawesi. Morphologically the Sulawesi species are almost similar. This research is aimed to identify the use of Cytochrome Oxidase I (COI) gene as a genetic marker on *Tarsius* spp. for conservation purposes. Sixteen individuals consisted of 10 *Tarsius bancanus*, 4 *Tarsius* sp., 1 *Tarsius wallacei*, and 1 *Tarsius sangirensis* were collected from various places and analysed using COI gene. The results showed there were 238 different sites of nucleotides and 159 sites of amino acids from the total amount of 838 bp. The genetic distance by Kimura-2 parameter showed the highest value was 26% while the lowest was 0%. The average genetic distance was 11,5%. Phylogenetic tree constructed by Neighbour-Joining method based on nucleotides sequence showed that the COI gene could be used as a genetic marker to differentiate among *Tarsius* spp. but could not be used as a clear marker for tarsiers in Sulawesi. Based on the analysis, there is a high value of genetic variation among *Tarsius* spp. with much lower genetic variation in Western Tarsier population compared to Eastern Tarsier.

Keyword: Genetic marker, tarsier, COI, DNA mitochondria, conservation

ABSTRAK

Tarsius (*Tarsius* spp.) merupakan primata terkecil di dunia. Saat ini terdapat 10 spesies tarsius, 9 spesies diantaranya tersebar di kepulauan Indonesia dan 8 spesies merupakan endemic Sulawesi. Hampir semua spesies tarsius Sulawesi memiliki kemiripan secara morfologi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fungsi gen *Cytochrome Oxidase I* (COI) DNA mitokondria (mtDNA) pada *Tarsius* spp. sebagai penanda genetik. Penelitian menggunakan enam belas individu terdiri dari 10 *Tarsius bancanus*, 4 *Tarsius* sp., *Tarsius wallacei*, dan *Tarsius sangirensis* yang dikoleksi dari berbagai daerah menggunakan gen COI. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan nukleotida sebanyak 238 situs serta asam amino sebanyak 159 situs dari total keseluruhan 838 pasang basa (pb). Jarak genetik yang dihitung menggunakan Kimura-2 parameter model menunjukkan nilai tertinggi sebesar 26,2% dan terendah sebesar 0%. Rata-rata jarak genetik sebesar 11,5%. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* yang berdasar pada nukleotida dan asam amino gen COI dapat membedakan antara *Tarsius* spp. (*T. bancanus*, *Tarsius spectrum*, *Tarsius wallacei*, *Tarsius* sp., dan *Tarsius sangirensis*), namun tidak dapat digunakan sebagai penanda secara jelas pada tarsius Sulawesi. Berdasarkan analisa terdapat nilai variasi genetik tinggi diantara *Tarsius* spp. dimana populasi tarsius barat memiliki variasi genetik jauh lebih rendah dibanding tarsius timur.

Kata Kunci: Penanda genetik, tarsius, COI, DNA mitokondria, konservasi

PENDAHULUAN

Tarsius merupakan spesies primata terkecil di dunia dan nocturnal yang tersebar di Pulau Sumatera, Sulawesi dan sekitarnya, Kalimantan dan kepulauan Filipina. Tarsius yang tersebar di pulau Sulawesi dan sekitarnya merupakan satwa endemik Sulawesi. Semua spesies tarsius adalah dilindungi dan termasuk Appendik II di dalam daftar CITES, sementara status pada IUCN termasuk dalam

kategori rentan (*vulnerable*) pada *T. dentatus (dianae)*, *T. tarsier* dan *T. bancanus*; data deficient (*T. pumilus*, *T.*, *T. lariang*); endangered (*T. sangirensis* dan *T. pelengensis*); critical endangered pada *T. tumpara*. Populasi masing-masing spesies tarsius cenderung menurun (The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. (www.iucnredlist.org). Downloaded on 24 March 2015). Pemanfaatan tarsius banyak digunakan sebagai hewan peliharaan karena ukuran tubuhnya yang

kecil dengan berat tubuh ± 120 gram serta mempunyai bola mata yang besar dan memiliki panjang ekor jauh melebihi panjang tubuh dengan sekitar dua pertiga tubuh (Bennet *et al.* 1995). Disamping itu di beberapa daerah sebaran, tarsius juga diburu untuk dimakan dan bahan pencampur minuman. Secara morfologi spesiesspesies tarsius dibedakan dari pola rambut ekor, ukuran tubuh, bentuk wajah, dan warna rambut. Berdasarkan rambut ekor perbedaan jelas terlihat antara tarsius wilayah barat (*T. bancanus*) dengan tarsius timur yang tersebar di pulau Sulawesi dan sekitarnya. Sedangkan antar spesies tarsius timur dibedakan ukuran tubuh, bentuk wajah, rambut ekor dan warna rambut tubuh (Merker & Groves 2006; Shekelle 2008; Merker *et al.* 2010). Disamping perbedaan tersebut vokalisasi juga membedakan antar spesiesspesies tarsius yang disebut *duet call* (Shekelle *et al.*, 2008).

Namun perbedaan antar tarsius tersebut sangat sulit dilakukan dengan kasat mata secara visual untuk keperluan identifikasi dan konservasi baik *in situ* maupun *ex situ* untuk tujuan pelestarian. Oleh karena itu, diperlukan pengujian secara molekuler untuk mengetahui penanda genetik dengan menggunakan cytochrome oxidase I (COI) DNA mitokondria pada tarsius. Penanda genetik adalah sepotong material genetik (umumnya DNA) yang dapat dengan mudah diidentifikasi untuk membedakan antar sel, individu, populasi, atau spesies. Pada penelitian digunakan penanda genetik DNA mitokondria (mtDNA) (NFGEL & GRCP 2006). Analisis molekuler menggunakan mtDNA banyak digunakan para ahli taksonomi untuk mengkaji evolusi baik mikro maupun makro. DNA mitokondria sangat potensial untuk studi filogenetik hewan baik interspesies maupun intraspesies (McMillen-Jackson & Bert 2004).

Beberapa penelitian untuk mengkaji penanda genetik pada tarsius telah dilakukan dengan target gen yang berbeda-beda, diantaranya penggunaan gen ND3, *Cytochrome b* dan ND6, tetapi hasil belum menunjukkan penanda yang jelas antara tarsius Sulawesi (Widayanti *et al.* 2011; 2012). Penggunaan gen COI sebagai penanda genetik disebabkan karena ukuran dan strukturnya yang tetap dari masa ke masa (*highly conserved*) dan pada banyak

penelitian menunjukkan hasil yang memuaskan sebagai penanda genetik. COI juga merupakan subunit terbesar dari tiga subunit *cytochrome oxidase* serta merupakan salah satu gen terbesar yang mengkode protein pada genom mitokondria (Lunt *et al.* 1996). Gen COI sebagai penanda sudah banyak dilakukan pada serangga dan ikan sebagai barcode di dalam identifikasi spesies (Shokralla *et al.* 2014). Penelitian molekuler lain dengan menggunakan penanda genetik COI telah dilakukan juga pada mollusca, yaitu pada *Crassostrea angulata* (Foighil *et al.* 1998), pada 18 spesies Bovidae (YanSen *et al.* 2010), pada berbagai macam invertebrata (Folmer *et al.* 1994), pada kukang (Somura *et al.* 2012), pada insekta (Lunt *et al.* 1996) dan juga pada beberapa ordo mamalia (Tobe *et al.* 2010). Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi yang dapat digunakan di dalam manajemen konservasi baik *in situ* maupun *ex situ* dan membantu di dalam pelestarian tarsius.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel penelitian tarsius berupa jaringan (hati, jantung, dan daging) serta rambut dan dipreservasi dengan ethanol absolut. Sampel berasal dari koleksi di alam (Kalimantan, Palembang, Sulawesi) dan penangkaran. Jumlah sampel penelitian adalah sebanyak 16 sampel yang terdiri dari 10 *Tarsius bancanus*, 1 *Tarsius wallacei*, 4 *Tarsius sp.*, dan 1 *Tarsius sangirensis*.

Ekstraksi DNA menggunakan Phenol-chloroform mengikuti metode Sambrook *et al.* (1989). Kira-kira 30 mg jaringan dihaluskan pada tube 1.5 ml dan dilarutkan di dalam extraction buffer 500ul yang terdiri dari 1M Tris-Cl pH 8.0, 5M NaCl, 0.5M EDTA pH8.0 dan 10%SDS dan untuk rambut sekitar 5-10 helai rambut dimasukkan kedalam tube dan ditambahkan 500ul extrantion buffer. Kemudian ke dalam masing-masing tube tersebut ditambahkan 10 ul Proteinase K (20mg/ml), selanjutnya sampel diinkubasi semalam pada suhu 60°C. Tahap purifikasi menggunakan Phenol-Chloroform dan precipitasi dengan Etanol absolut. DNA yang diperoleh dilarutkan di dalam ddH₂O atau MilliQ water.

Tabel 1. Lokasi Sampel Penelitian

No.	No. Sampel	Nama Spesies	Daerah Asal
1.	TAR.01(TBG)	<i>Tarsius bancanus</i>	Sumatera(Penangkarang)
2.	TAR.02(TBE)	<i>Tarsius bancanus</i>	Sumatera(Penangkarang)
3.	TAR.03(TSpA)	<i>Tarsius sp.1</i>	Tangkoko, Sulawesi Utara
4.	TAR.05((TBN)	<i>Tarsius bancanus</i>	Sumatera(Penangkarang)
5.	TAR.06(TBG)	<i>Tarsius bancanus</i>	Sumatera(Penangkarang)
6.	TAR.07(TSpF)	<i>Tarsius sp.2</i>	Selayar, Sulawesi Selatan
7.	TAR.09(TWB)	<i>Tarsius wallacei</i>	Palu, Sulawesi Tengah
8.	TAR.10(TSpL))	<i>Tarsius sp.3</i>	Toli-toli, Sulawesi Tengah
9.	TAR.11(TSpI)	<i>Tarsius sp.4</i>	Mamuju, Sulawesi Barat
10.	TAR.13(TBH)	<i>Tarsius bancanus</i>	Kal. Tengah
11.	TAR.14(TBE)	<i>Tarsius bancanus</i>	Sumatera(Penangkarang)
12.	TAR.15(TBJ)	<i>Tarsius bancanus</i>	Sumatera(Penangkarang)
13.	TAR.16(TBC)	<i>Tarsius bancanus</i>	Meratus, Kalimantan
14.	TAR.17(TBH)	<i>Tarsius bancanus</i>	Kalimantan Tengah
15.	TAR.20(TBM)	<i>Tarsius bancanus</i>	Air Luwak, Sumatera
16.	TAR.24(TBSnK)	<i>Tarsius sangirensis</i>	Pulau Talaud, Sulawesi

Amplifikasi PCR menggunakan sepasang primer specific COI dengan letter sekuen COI R: GAGGGTGACGGGCGGTGTGT dan COI F: 5'-GGGGTTTCGGCAACTGA CTA-3'. Primer dirancang mengikuti sekuen mitokondria *T. bancanus* dari GeneBank dengan assession number NC_002811.1. PCR menggunakan Ready mix PCR dari KAPA Biosystem. Volume PCR dibentuk di dalam 30 ul reaksi terdiri dari 17ul mix PCR, 2.5ul 2.5pmol/ul primer F dan R, 1 ul DNA template konsentrasi 50ng/ul dan sisanya MQ. Kondisi amplifikasi pada PCR adalah 96°C, 4m denaturasi awal; 40cycles (denaturasi 96°C 30s, annealing 56°C 30s, extension 72°C 1m) dan extention 72°C, 10m. Hasil PCR kemudian di cek pada 2% agarose gel dan menggunakan Marker 100 bp, dan selanjutnya disekuen menggunakan primer forward di First Base Company.

Sekuen gen COI dari semua sampel diedit dengan menggunakan perangkat lunak BioEdit (Hall 1999) kemudian di jajarkan (*aligned*) menggunakan program Clustal X (Larkin *et al.* 2007). Sebelum analisa semua hasil sekuen di blast pada NCBI program untuk menghindari adanya sampel terkontaminasi dan untuk mengetahui tingkat homologi similaritas sekuen dengan genus *Tarsius* (*Tarsius* spp.). Analisa data menggunakan Program MEGA version 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Analisis jarak genetik (*d*) menggunakan model *kimura-2 parameter* dan

analisis filogeni menggunakan metode *Neighbour-Joining* dengan 1000 kali pengulangan (Saitou & Nei 1987) yang terdapat pada program MEGA 6. Analisa data berdasarkan nukleotida, dan asam amino, jarak genetik (*d*), komposisi DNA penanda. Sebagai pembanding untuk mengetahui posisi sampel digunakan sekuen GeneBank yaitu *Tarsius syrichta* yang diambil dari *GenBank* dengan nomor referensi NC_012774.1, *Tarsius bancanus* (NC_002811.1), *Tarsius* (NC_024053.1), *Tarsius larium* (NC_024051.1) dan *Tarsius diana* (NC_024052.1)

HASIL

Variasi situs nukleotida

Panjang nukleotida hasil sekuensing dari amplifikasi gen COI adalah sepanjang 900-1100 bp, sedangkan panjang keseluruhan gen COI mtDNA pada *Tarsius* spp. sepanjang 1542 bp (Schmitz *et al.* 2002). Analisa dilakukan dengan metode Kimura 2-parameter pada program MEGA 6.0, ditemukan 238 situs nukleotida yang berbeda (*variable sites*). Dari variasi situs tersebut diperoleh 13 haplotipe dari 16 sampel tarsius yang terdiri dari 7 haplotipe *T. bancanus*, dan 6 haplotipe lainnya dari populasi tarsius asal Sulawesi (Tabel 3). Pola mutasi sekuen pada Tabel 3 menunjukkan perbedaan jelas antara tarsius yang berasal dari Indonesia bagian barat (*Tarsius bancanus*) dengan tarsius

yang berasal dari Indonesia bagian timur (*Tarsius sp.*, *Tarsius wallacei*, dan *Tarsius sangirensis*) melalui sekuen haplotipenya. Beberapa contoh sekuen atau basa penanda pada populasi sampel penelitian ini antara lain adalah pada tarsius barat dimana terdapat sekuen nukleotida CCAAC pada posisi 13, 20, 22, 25, 31, sekuen GAGTGG pada posisi 59, 64, 65, 67, 70, 73, sekuen CACTATTA pada posisi 281, 287, 288, 291, 293, 294, 297, dan 299 yang tidak dimiliki oleh tarsius timur. Haplotipe *T. bancanus* memiliki pola yang sama di dalam urutan nukleotida, hanya terdapat perbedaan 1-2 nukleotida antar haplotipe dan didominasi oleh kejadian transisi yaitu dari Timin (T) ke Cytosin (C) atau sebaliknya. Sementara pada populasi tarsius timur yang terdiri dari beberapa spesies (*tarsius-complex*) memiliki perbedaan nukleotida yang cukup bervariasi di antara haplotipe. Perbedaan nukleotida diantara haplotipe tersebut cukup tinggi yaitu sekitar 18 – 121 nukleotida (Tabel 2.).

Berdasarkan perbedaan asam amino sebagai penanda dapat dilihat pada Tabel 4. Terdapat 14 haplotipe yaitu 8 haplotipe dari tarsius barat dan 6 haplotipe tarsius timur mewakili sampel yang digunakan. Dapat dilihat pola susunan asam amino pada masing-masing haplotipe antara tarsius barat dengan tarsius timur yang menunjukkan perbedaan jelas. Beberapa di antaranya adalah pada tarsius barat terdapat sekuen asam amino TTTL pada posisi 7, 8, 9, 11, sekuen YLSS pada posisi 15, 17, 20, 22, sekuen SPNL pada posisi 76, 78, 81, 84, dan sekuen SPYYY pada posisi 91, 94, 96, 98, dan 100 yang tidak dimiliki oleh tarsius timur. Perbedaan terlihat pada posisi 57, yaitu asam amino serin (S) dimiliki oleh semua tarsius timur dan tidak dimiliki oleh tarsius barat.

Tabel 2. Matriks perbedaan nukleotida *Tarsius sp.*

No.	1	2	3	4
1	–			
2	18	–		
3	45	45	–	
4	25	29	44	–

Keterangan: (1) TAR.03 Tangkoko (2) TAR.07 Selayar (3) TAR.10 Toli-toli (4) TAR.11 Mamuju

Begitu juga pada posisi 158 dimana seluruh tarsius timur mempunyai asam amino histidine (H) sedangkan seluruh tarsius barat memiliki asam amino prolin (P). Penanda tersebut menunjukkan perbedaan yang jelas (spesifik) antara populasi tarsius barat dan tarsius timur.

Keragaman antar spesies

Perbedaan nukleotida dalam spesies dan antar spesies menggambarkan tingkat keragaman genetik berdasarkan jarak genetik (d) dan keragaman nukleotida (π). Pada populasi tarsius barat (*T. bancanus*) memiliki jarak genetik sebesar 0,0025 dengan jumlah 10 individu, dan keragaman nukleotida sebesar 0,0024. Tingkat keragaman tersebut sangat kecil dibandingkan dengan tingkat keragaman genetik pada tarsius timur yang terdiri dari beberapa spesies. Konsisten dengan nilai keragaman genetik yang tinggi, variasi haplotipe populasi tarsius timur juga tinggi. Hal ini dapat dilihat dari data bahwa satu haplotipe hanya dimiliki oleh satu individu (Tabel 3). Jarak genetik keseluruhan dari populasi tarsius timur cukup tinggi, yaitu 0,0805 dan 0,073935. Pada penelitian ini persentase rata-rata jarak genetik berdasarkan sekuen nukleotida adalah 11,5% dan berdasar sekuen asam amino adalah 34,2%.

Pohon Filogenetik

Rekonstruksi pohon filogenetik difokuskan hanya untuk melihat posisi masing-masing spesies tarsius terhadap spesies tarsius yang lain (Gambar 1). Rekonstruksi pohon filogenetik dibuat berdasarkan sekuen nukleotida dengan metode *Neighbour-Joining* (NJ) dan sebagai pembanding menggunakan sekuen gen GenBank (NCBI).

Pada rekonstruksi pohon filogenetik di atas dengan *bootstrap* 1000 membentuk tiga kelompok yaitu tarsius barat mewakili satu spesies *T. bancanus* dan tarsius timur yang terdiri dari beberapa spesies serta *T. syrichta* sebagai pembanding.

PEMBAHASAN

Variasi situs nukleotida

Variasi nukleotida pada situs yang berbeda baik secara substitusi maupun delesi basa

Tabel 3. Sebaran haplotipe berdasarkan variasi situs nukleotida

N	Haplotipe	Sekuen									
		11111	1111111111	1222222222	2222222222	2222222233	33333333				
		1222334444	5666777777	8899900235	6666777889	9001112223	3455556677	8889999900	01122222		
		3025170349	9457034689	2424709194	0149258470	9281470691	3214573923	1781347912	8141367		
1	TSp.A	TTGCTCAACT	AGGAAAGACC	AGTTAAACTT	TCGAATAATT	TTTCCTACTG	TGACCAACAC	ATCTCCCT	GCGGACA		
2	TB.E	CCAAC..TAC	GA.TGG..T	T..CT..CC	CT.GGCT.G.	CC.TT..TC	CATTT.G.C.	CACTATTA.C	A.A..T.		
2	TB.G	CCAAC..TAC	GA.TGG..T	T..CT..CC	CT.GGCT.G.	CC.TT..TC	CATTT.G.C.	CACTATTA.C	ATA..T.		
1	TSp.F	..A.C....C	.A.....	C...CC...CA.T.....C....	A.....		
1	TB.N	CCAAC..TAC	GA.TGG..T	T..CT..CC	CT.GGCT.G.	CC.TT..TC	CATTT.G.C.	CACTATTA.C	A.A..T.		
1	TB.J	CCAAC..TAC	GA.TGG..T	T.A.CT..CC	CT.GGCT.G.	CC.TT..TC	CATTT.G.C.	CACTATTA.C	A.A..T.		
1	TSp.I	..A.C....	..AA...G..C.	C.....	..AT....AC....	A...G..		
1	TW.B	..CA..TG...	..A.....	...C..G...	C.....	...TT.G...	..T..G..TC....	A...G..		
1	TSp.L	..A..T..T.	..A.....	...C.....	C.....	...TT....	...T...TC....	A.A.G..		
2	TB.C	CCAAC..TAC	GA.TGG..T	T..CT..CC	CT.GGCT.G.	CC.TT..TC	CATTT.G.C.	CACTATTA.C	A.A..T.		
1	TB.H	CCAAC..TAC	GA.TGG..T	T..CT..CC	CT.GTCT.G.	.C.TT..TC	CATTT.G.C.	CACTATTA.	A.A..T.		
1	TB.M	CCAAC..TAC	GA.TGG..T	T..CT..CC	CT.GGCT.G.	CC.TT..TC	CATTT.G.C.	CACTATTA.C	A.A..T.		
1	TSp.K	..A..T....	..A...T.GT	.C.C.T.A.A.	C.C...T...	...TT...A	...T...TC....	A...G..		
		3333333333	3333333333	4444444444	4444444444	4444444444	4455555555	5555555555	5555555		
		3334455555	6667778899	0001112222	3334444556	6667778889	9900111233	3444555566	6666777		
		5681402369	2351473925	1783790258	1570689581	4680131891	4769158468	9235134501	3589056		
1	TSp.A	ACATCTTACA	CTCCTCATT	CTTTTAT	TGACTTTT	CTACTATCT	TGAGTGTACT	AATCTTCTT	CTTTTCC		
2	TB.E	TT..TC.TT.	..T.CT.C.	TCCC.C.CC.	G..T..CT.	T..T.C.T.	AGA.CCCT.	G..T.CTC.	..C...		
2	TB.G	TT..TC.TT.	..T.CT.C.	TCCC..CC.	G..T..CT.	T..T.C.T.	AGA.CCCT.	G..T.CTC.	..C...		
1	TSp.FTC.C....T.		
1	TB.N	TT..TC.TT.	..T.CT.C.	TCCC..CC.	G..T..CT.	T..T.C.T.	AGA.CCCT.	G..T.CTC.	..C...		
1	TB.J	TT..TC.TT.	..T.CT.C.	TCCC..CC.	G..T..CT.	T..T.C.T.	AGA.CCCT.	G..T.CTC.	..C...		
1	TSp.IT.C..CA.....C....	T...T.		
1	TW.B	TT.C.....	T..T.T....	...C.C....	..C.....	T..T....CT....T.		
1	TSp.L	TT.C.....	...TG...	...C.C..C	..T...G.	...T....C...T.C...T.		
2	TB.C	TT..TC.TT.	..T.CT.C.	TCCC..CC.	G..T..CT.	T..T.C.T.	AGA.CCCT.	G..T.CTC.	..C...		
1	TB.H	TT..TC.TT.	..T.CT.C.	TCCC.C.CC.	G..T..CT.	T..T.C.T.	AGA.CCCT.	G..T.CTC.	..C...		
1	TB.M	TT..TC.TT.	..T.CT.C.	TCCC.C.CC.	G..T..CT.	T..T.C.T.	AGA.CCCT.	G..T.CTC.	..C...		
1	TSp.K	TT.C.....	...T....	...C.C..CT....C	...T....T.C...T.		
		5555556666	6666666666	6666666677	7777777777	7777777777	7777777777	7778888888	8888888		
		8889990002	2333455566	7889999000	0111122223	3344444555	5666677788	8890000111	2223333		
		3570693680	3259746925	0672568013	4016901362	5736789058	9145703602	3510389289	1491356		
2	TSp.A	TTTAAAGGTC	TCCATAATAA	TATTAGTGTT	CATTTATTTC	GACCCTTTTC	GTTCAATCTA	GTTTTCTTTT	CTTGCCA		
2	TB.E	...G.....	..T...TC..	TCC..GAC	T.....C.T	.C.T..A.CA	AC.GC.TCT	CAC...CC	T...AAC		
1	TB.G	...G.....	..T...TC..	TCC..GAC	T.....C.T	.C.T..A.CA	AC.GC.TCT	CAC...CC	T...AAC		
1	TSp.F	..C.....CG.....	...C..C.C....AC			
1	TB.N	...G.....	..T...TC..	TCC..GAC	T.....C.T	.C.T..A.CA	AC.GC.TCT	CAC...CC	T...AAC		
1	TB.J	...G.....	..T...TC..	TCC..GAC	T.....C.T	.C.T..A.CA	AC.GC.TCT	CAC...CC	T...AAC		
1	TSp.I	..C.....G.....	...C..C.C....AC			
1	TW.B	..CC...C.	CT..C.....AC	.G.....	GT.....	..T...T.	..C....C.AC		
2	TSp.L	..CT.G....	...C.....	...AC	.G.....	GT.....	..T...T.	..C....C.AC		
1	TB.C	...G.....	..T...TC..	TCC..GAC	T.....C.T	.C.T..A.CA	AC.GC.TCT	CAC...CC	T...AAC		
1	TB.H	...G.....	..T...TC..	TCC..GAC	T.....C.T	.C.T..A.CA	AC.GC.TCT	CAC...CC	T...AAC		
1	TB.M	...G.....	..T...TC..	TCC..AAC	T.....C.T	.C.T..A.CA	AC.GC.TCT	CAC...CC	T...AAC		
1	TSp.K	..CT.....	...C.....	...AC	.GA.....	.G.....	A..T.....	T.....C.	...AAC		

Keterangan: TSp (Tarsius sp.); TB (Tarsius bancanus); TW (Tarsius); TSp (Tarsius sangirensis). Huruf capital di belakang titik menerangkan haplotipe

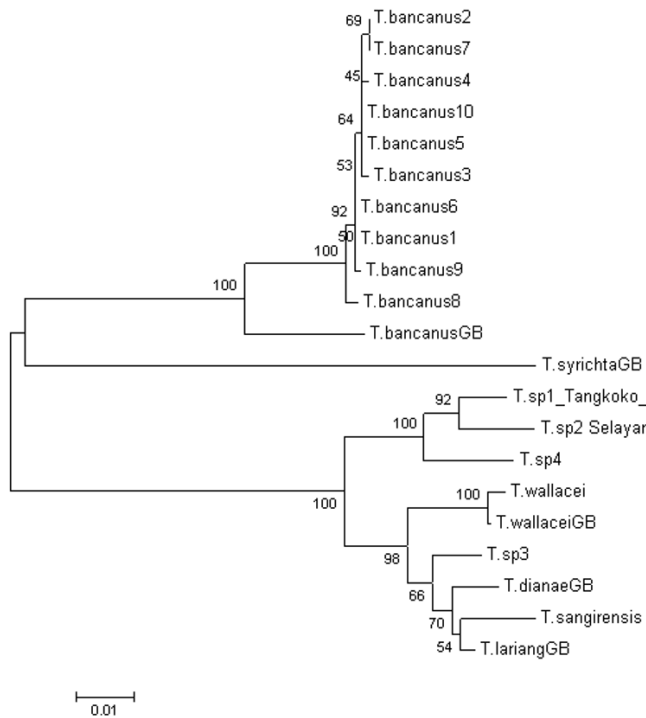
memberikan perbedaan diantara individu baik dalam spesies maupun antar spesies. Pada penelitian ini perbedaan nukleotida terkecil pada *T. bancanus* yaitu 1-2 nukleotida sementara pada tarsius Sulawesi perbedaan nukleotida terkecil antara *Tarsius* sp. yang berasal dari Tangkoko, Mamuju dan Selayar yaitu sekitar 18-29 nukleotida dan dimungkinkan adalah spesies sama yaitu *Tarsius tarsier*. *Tarsius tarsier* adalah sinonim dari *T. spectrum* yang tersebar di wilayah bagian Utara (Sulut) dan bagian Selatan Sulawesi (Nowak 1999; Gursky 1999; 2007;

Shekelle 2008a). Sedangkan *Tarsius* sp. dari Toli-toli memiliki perbedaan genetik dengan *Tarsius* sp. lainnya sekitar 43-45 nukleotida dan spesies tersebut dimungkinkan *Tarsius dentatus* (*T. diana*) yang tersebar di Sulawesi Tengah (Nowak 1999; Shekelle 2008a; 2008b). *Tarsius wallacei* memiliki perbedaan nukleotida dengan *T. diana* lebih kecil (28 nukleotida) dibandingkan dengan *T. tarsier* dan *T. sangirensis* yaitu sekitar 49-56 nukleotida. Kecilnya perbedaan diantara dua spesies ini dikarenakan wilayah persebaran yang sangat dekat yaitu *T. diana* tersebar di daerah Toli-toli sementara *T.wallacei* tersebar di

Tabel 4. Jenis Haplotipe Berdasarkan Sekuen Asam Amino

N	Haplotipe	Sekuen									
		11111122	2222333334	4555555666	6677777788	8889999900	11	1111111111	1111111111	11111111	11111111
		7891345702	4678123471	7245789034	7801346814	5680146801	0000011111	1122222223	33333344	33333344	
1	TSp.A	IAPFPPTFNG	SNRMLSTTKR	SSSSSIFNCY	YYYHYKPLSH	PYYPYQFFSL	RSQESQYYLT	ITQPSTLPEI	LSTIFDFL		
1	TW.B	TT..SA...SP..E.	..P.....	...Y.E....	L.C....S..	Q..G...FP.	...L.I.L..S.S.		
2	TB.C	TTTL..YLSS	G.WL..PS..	PPL.GVLYG.	HH.Y..SPNL	L.C.SPYYYP	Q...LL.F.I	TM..F.PL.T	..ITS..S		
1	TB.E	TTTL..YLSS	G.WL..PS..	PPL.GVLYG.	HH.Y..SPNL	L.C.SPYYYP	Q...LL.F.I	TM..F.PL.T	..ITS..S		
2	TSp.F	.T.L...L.SP.....	..P..LL.HN.L.....	L.....S..	Q.....C..F.....S.		
1	TB.G	TTTL..YLSS	G.WL..PS..	PPL.GVLYG.	HH.Y..SPNL	L.C.SPYYYP	Q...LL.F.I	TM..F.PL.T	..ITS..S		
1	TB.H	TTTL..YLSS	G.WL..PS..	PPL.GVLYG.	HH.Y..SPNL	L.C.SPYYYP	Q...LL.F.I	TM..F.PL.T	..ITS..S		
1	TSp.I	.T.L.....N	.D.....	P.P.....H	..NY.....S..	Q..G..C..	.M.....S.		
1	TB.J	TTTL..YLSS	G.WL..PS..	PPL.GVLYG.	HH.Y..SPNL	L.C.SPYYYP	Q...LL.F.I	TM..F.PL.T	..ITS..S		
1	TSp.K	.T..S...S	..KWI.P.S.S	..PT...Y.	...Y.....	L.L....S..	Q..G...FP.L..S.S.		
1	TSp.L	.T..S.I..SP....	..P.....	...Y.....	L.L....S..	Q..G...FP.LG.S.S.		
1	TB.M	TTTL..YLSS	G.WL..PS..	PPL.GVLYG.	HH.Y..SPNL	L.C.SPYYYP	Q...LL.F.I	TM..F.PL.T	..ITS..S		
1	TB.N	TTTL..YLSS	G.WL..PS..	PPL.GVLYG.	HH.Y..SPNL	L.C.SPYYYP	Q...LL.F.I	TM..F.PL.T	..ITS..S		
1	TB.O	TTTL..YLSS	G.WL..PS..	PPL.GVLYG.	HH.Y..SPNL	L.C.SPYYYP	Q...LL.F.I	TM..F.PL.T	..ITS..S		
		1111111111	1111111111	1111111111	1111222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	
		4444555555	6666677777	7888888999	9999000111	1222233333	3344444555	5555666677	77777		
		4679023578	3456901235	9245789023	5679378126	9024912345	7901689024	5789247801	34589		
1	TSp.A	LYTLFPDASH	TILGNRSGME	PLAFVSLFPI	YLQEMTLPL	QVKSHMEVVS	DLLYDSSFLV	VQVSLMLSM	LTMPH		
1	TW.B	.S.....VF.	.T.....	..V.....LT	..SP.T.SL.PT.	G...GF....	...LP...TT		
2	TB.C	R.M.SL.VFP	I..ESH.ATA	L.VSA..S.T	...G....L	LA..LT.GTL	...A.FYPE	AP.LPHT..T	PI.HT		
1	TB.E	R.M.SL.VFP	I..ESH.ATA	L.VSA..S.T	...G....L	LA..LT.GTL	...A.FYPE	AP.LPHT..T	PI.HT		
2	TSp.FP.....L	.S..T.....G.....	..P.....	..A.....TT		
1	TB.G	R.M.SL.VFP	I..ESH.ATA	L.VSA..S.T	...G....L	LA..LT.GTL	...A.FYPE	AP.LPHT..T	PI.HT		
1	TB.H	R.M.SL.VFP	I..ESH.ATA	L.VSA..S.T	...G....L	LA..LT.GTL	...A.FYPE	AP.LPHT..T	PI.HT		
1	TSp.IF.	..T...L....	..V.A...LT	..SL.....PT.	G...G.....TT		
1	TB.J	R.M.SL.VFP	I..ESH.ATA	L.VSA..S.T	...G....L	LA..LT.GTL	...A.FYPE	AP.LPHT..T	PI.HT		
1	TSp.KF.	..T...L....	..V.A...LT	..SL.....PT.	G...G.....TT		
1	TSp.LF.	..T...L....	..V.A...LT	..SL.....PT.	G...G.....TT		
1	TB.M	R.M.SL.VFP	I..ESH.ATA	L.VSA..S.T	...G....L	LA..LT.GTL	...A.FYPE	AP.LPHT..T	PI.HT		
1	TB.N	R.M.SL.VFP	I..ESH.ATA	L.VSA..S.T	...G....L	LA..LT.GTL	...A.FYPE	AP.LPHT..T	PI.HT		
1	TB.O	R.M.SL.VFP	I..ESH.ATA	L.VSA..S.T	...G....L	LA..LT.GTL	...A.FYPE	AP.LPHT..T	PI.HT		

Keterangan: TSp (*Tarsius sp.*); TB (*Tarsius bancanus*); TW (*Tarsius*); TSn (*Tarsius sangirensis*). Huruf kapital di belakang titik menerangkan Haplotipe.



Gambar 1. Rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida gen COI pada *Tarsius* spp.

hutan sekunder di Uwemanje, Sulawesi Tengah yang dimungkinkan kedua spesies berkerabat dekat (Merker & Driller 2009; Merker *et al.* 2010).

Berdasarkan komposisi asam amino, pada populasi tarsius barat hanya terdapat 1 dan 2 perbedaan asam amino diantara individu, sehingga penanda asam amino pada populasi *Tarsius bancanus* antara Kalimantan dan Sumatera tidak dapat memberikan informasi pada gen COI. Pada populasi tarsius timur yang terdiri dari beberapa spesies menunjukkan perbedaan asam amino cukup tinggi yaitu 17 sampai dengan 73 perbedaan antar spesies. Perbedaan terendah adalah 17 asam amino antara *Tarsius* sp.1 (TAR03) dengan *Tarsius* sp.2 (TAR07) yaitu dari Tangkoko dan Selayar, dimungkinkan kedua individu tersebut adalah spesies yang sama yaitu *Tarsius tarsier*. Jumlah individu yang terbatas pada masing-masing spesies dari tarsius timur menyebabkan informasi dari sekuen pembeda kurang informatif.

Keragaman antar spesies

Tinggi rendahnya keragaman genetik dapat diindikasikan dari jumlah maupun keragaman haplotipe dan nukleotida (Tarwinangsih *et al.* 2011). Perbedaan nukleotida dapat menunjukkan tingkat keragaman genetik dalam spesies yang sama. Perbedaan nukleotida antar individu dalam populasi dan antar spesies ditunjukkan oleh variasi situs dalam jumlah kecil hingga besar. Pada spesies *Tarsius bancanus* diduga mengalami penurunan keragaman genetik karena hasil analisis pada penelitian ini menunjukkan tingkat homologi yang tinggi antar individu serta dapat dikatakan sedang menuju populasi monomorf. Hal ini dapat terjadi dikarenakan tingkat eksploitasi tarsius barat jauh lebih tinggi dari pada tarsius timur sehingga tingkat terjadinya *inbreeding* pun lebih tinggi. Sebaliknya pada tarsius yang berasal dari Sulawesi, perbedaan nukleotida cenderung tinggi karena beberapa individu adalah dari spesies berbeda dan dimungkinkan pada spesies yang sama pun memiliki keragaman genetik yang tinggi. Studi menyatakan bahwa tarsius secara garis besar terpisah menjadi tiga kategori, yaitu Tarsius Barat (*Sundaland*), Tarsius Filipina (*Greater Mindanao*), dan Tarsius Timur (daerah Sulawesi dan pulau-pulau di sekitarnya (Hill 1955;

Niemitz 1984; Musser & Dagosto 1987). Terpisahinya tarsius secara geografis berdampak pada perbedaan genotip dan fenotipnya. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan jarak genetik antara *Tarsius bancanus* dan tarsius asal Sulawesi yang mayoritas berada pada nilai di atas 16%. Jarak genetik terkecil ditunjukkan antar *Tarsius bancanus*, yaitu 0%. Hal ini menunjukkan: 1) bahwa *Tarsius bancanus* asal Sumatera dan Kalimantan berasal dari wilayah geografi yang sama di masa lalu (*Sundaland*); 2) bahwa gen COI tidak dapat membedakan antara *Tarsius bancanus* asal Sumatera dan Kalimantan. Jarak genetik pada umumnya meningkat seiring dengan hirarki taksonomi dari populasi dalam spesies hingga ke spesies. Hal tersebut dapat terlihat rata-rata jarak genetik pada lalat buah (*Drosophilla willistoni*) meningkat dari populasi yang terisolasi secara geografis ($d = 0,03$), sub-spesies ($d = 0,23$), dan berbeda spesies ($d = 1,21$) (Coyne & Orr 2004 dalam Frankham *et al.* 2010).

Jarak genetik tertinggi antara *Tarsius bancanus* dengan *tarsius timur* yaitu sebesar 18%. Sementara jarak genetik antara tarsius timur dengan dengan *Tarsius syrichta* sebagai *outgroup* sebesar 21%. Hal ini konsisten dengan penelitian-penelitian sejenis dengan menggunakan penyandi gen mtDNA bahwa *Tarsius bancanus* (Tarsius barat), *Tarsius syrichta* (Tarsius Filipina), dan *Tarsius spectrum* (Tarsius timur) berbeda secara molekuler. Rataan jarak genetik berdasarkan gen *NADH Dehydrogenase Sub-unit 6* pada *Tarsius* sp. yang dilakukan oleh Widayanti *et al.* (2013) adalah sebesar 16,3%. Rataan jarak genetik berdasarkan sekuen gen *ATP Synthase FO Sub-unit 6 (ATP6)* pada *Tarsius* sp. menunjukkan hasil sebesar 0,2% (Widayanti *et al.* 2012). Rataan jarak genetik berdasarkan gen penyandi *Dehydrogenase Sub-unit 3 (ND3)* pada *Tarsius* sp. oleh Widayanti *et al.* (2012) menunjukkan nilai sebesar 0,01%. Penelitian serupa oleh Bakaa dkk. (2013) pada sekuen gen *Cytochrome Oxidase Sub-unit I (COI)* menunjukkan hasil rerata jarak genetik sebesar 8,3%. Jarak genetik berdasarkan sekuen gen *NADH Dehydrogenase Sub-unit 4L (ND4L)* yang dilakukan oleh Widayanti dan Susmiati (2012) menunjukkan nilai sebesar 0,1%.

Filogeni

Pohon filogeni yang digunakan untuk mengetahui posisi dari masing-masing spesies membentuk tiga kelompok (Gambar 1.). Kelompok pertama adalah *Tarsius bancanus* dengan dua sub-cabang, yaitu sub-cabang dengan *T. bancanus* GenBank dan sub-cabang yang merepresentasikan *Tarsius bancanus* yang dipakai dalam penelitian. *T. syrichta* merupakan kelompok terpisah dari kedua tarsius barat dan timur. Pengelompokan tersebut memberikan nilai bootstrap tinggi, yaitu 100%. Bootstrap dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan cabang. Nilai bootstrap pada pohon filogenetik di atas termasuk dalam kategori stabil karena suatu cabang dikatakan stabil jika nilai bootstrap di atas 95% dan dikatakan tidak stabil jika nilai bootstrap berada di bawah 70% (Osawa *et al* 2004). Berdasarkan jarak genetik pohon filogenetik, dapat dilihat bahwa *Tarsius syrichta* lebih dekat kekerabatannya dengan *Tarsius bancanus* dari pada *Tarsius tarsier-complex*. Hal ini didukung oleh pendapat Gillespie & Clague (2009) bahwa Pulau Jawa, Sumatera, Kalimantan, Semenanjung Malaysia, dan Filipina sebelumnya tergabung menjadi satu daratan, yaitu *Sundaland* atau *Sunda Shelf*. Tidak ada catatan yang menunjukkan bahwa Pulau Sulawesi pernah tergabung bersama dengan pulau-pulau di bagian barat Indonesia sehingga memperkuat hasil penelitian bahwa *Tarsius syrichta* yang berasal dari Filipina lebih dekat hubungan kekerabatannya dengan *Tarsius bancanus* yang berasal dari Sumatera dan Kalimantan dari pada *Tarsius tarsier-complex* yang berasal dari Sulawesi. Cabang ketiga adalah *Tarsius tarsier-complex* (tarsius timur) yang membentuk sub-cabang. Sub-cabang meliputi 3 spesies *Tarsius* sp. dimungkinkan *T. tarsier*, dan sub-cabang yang meliputi *T. sp3*, *T. diana*, *T. larian*, dan *T. sangirensis*. Spesies pada sub cabang terakhir kecuali *T. sangirensis* adalah tersebar di wilayah Sulawesi Tengah dan menunjukkan pada cabang pohon yang sama. Perbedaan signifikan antara tarsius barat dan tarsius timur diperkuat dengan pemisahan jenis primata antara Sundaland dengan garis Wallace dimana 27 spesies primata termasuk dua spesies primata yaitu

Tarsius bancanus dan *Nycticebus coucang* (*non-catarhine*) pada Sundaland tidak tersebar di wilayah wallacea yang terbentuk antara Sundaland dengan Sahulland (Harrison *et al.* 2006). Tebing curam dasar laut membatasi batas timur Tanah Sunda yang sama dengan batas garis Wallace (Tomascik *et al.* 1996). Pemisahan oceanic tersebut berperan secara signifikan didalam pembentukan fauna endemik yang tinggi di wallacea termasuk Sulawesi yang merupakan hotspot terbesar untuk habitat terestrial (Myers *et al.* 2000 dan Whitten *et al.* 1997 dalam Campbell *et al.* 2007).

KESIMPULAN DAN SARAN

Gen COI dapat digunakan sebagai penanda genetik terutama antara Tarsius Barat dan Tarsius Timur baik berdasarkan sekuen nukleotida maupun asam amino, namun tidak dapat secara jelas digunakan sebagai penanda untuk membedakan spesies tarsius yang berada di Sulawesi (Tarsius Timur). Keragaman genetic tarsius barat lebih rendah dari tarsius timur yang terdiri dari beberapa spesies.

Diperlukan penelitian lanjutan terutama untuk tarsius Sulawesi dengan penambahan spesies dan jumlah sampel masing-masing spesies. Dengan demikian hasil pengujian dapat memberikan hasil yang baik dan akurat untuk seluruh spesies tarsius Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakaa, A. 2013. Kajian Keragaman Genetik Gen *Cytochrome Oxidase SubUnit 1 (COXI) Tarsius* sp. Sebagai Upaya Penentuan Asal Usul *Tarsius* sp. Tesis: Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta
- Bennet, BT., RA. Christian & R. Henrickson. 1995. *Nonhuman Primates in Biomedical Research*. California: Academic Press Inc.
- Campbell, P., AS. Putnam, C. Bonney, R. Bilgin, JC. Morales, TH. Kunz & LA. Ruedas. 2007. Constrating patterns of genetic differentiation between endemic and widespread species of fruit bats

- (Chiroptera: Pteropodidae) in Sulawesi, Indonesia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 474-482.
- CITES. 2013. *The CITES Appendices I CITES*. <http://www.cites.org/eng/app/index.php>. Diunduh pada tanggal 21 Februari 2014 pukul 11.26 WIB
- Frankham, R., DB. Jonathan & AB. David. 2010. *Introduction to Conservation Genetic*. Cambridge. Books. p377
- Foighil, DO., PM. Gaffney, AE. Wilbur & TJ. Hilbish. 1998. Mitochondrial Cytochrome Oxidase I Gene Sequences Support an Asian Origin for the Portuguese Oyster *Crassostrea angulata*. Springer-Verlag. *Marine Biology* 131:497-503.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. New Jersey: Rutgers University. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5), 294-299.
- Gillespie, G., Rosemary & AD. Clague. 2009. *Encyclopedias of The Natural World: Encyclopedia of Islands*. University of California Press. California.
- Gursky, S. 1999. *The Nonhuman Primates. The Tarsiidae: Taxonomy, Behaviour, and Conservation Status*. Mayfield Publishing Company. California
- Gursky, S. 2007. *The Spectral Tarsier*. Pearson Education, Inc. New Jersey.
- Hall, TA. 1999. BioEdit; a User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98
- Harrison, T., J. Kringbaum & J. Manser. 2006. Primate Biogeography and ecology on the Sunda Shelf Islands: A Paleontological and Zooarchaeological perspective. *Primate Biogeography*. Springer. New York. Pp 331-371
- Hill, WC.1955. *Primates. Haplorhini, Tarsoidea*. New York: Interscience.
- IUCN. 2015. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Download on 24 March 2015.
- Larkin, MA., G. Blackshields, NP. Brown, R. Chenna, PA. McGettingan, H. McWilliam, F. Valentin, IM. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, JD. Thompson, TJ. Gibson & DG. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Lunt, DH., DX. Zhang, JM. Szymura & GM. Hewitt. 1996. The Insect Cytochrome Oxidase I gene: Evolutionary Patterns and Conserved Primers for Phylogenetic Studies. University of East Anglia: Norwich. *Insect Molecular Biology* 5(3): 153-165.
- McMillen-Jackson, L. Anne & TM. Bert. 2004. Genetic Diversity in the mtDNA Control Region and Population Structure in the Pink Shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. Florida: Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Marine Institute. *Journal of Crustacean Biology*, 24(1): 101-109.
- Merker, S. & CP. Groves. 2006. *Tarsius lariang*: A New Primate Species from Western Central Sulawesi. *International Journal of Primatology* 27 (2): 465-466
- Merker, S., C. Driller, D. Perwitasari-Farajallah, J. Pamungkas & H. Zischler. 2009. Elucidating geological and biological processes underlying the diversification of Sulawesi tarsiers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106(21): 8459-8464
- Merker, S., C. Driller, H. Dahrudin, Wirdateti, D. Perwitasari-F, W. Sinaga & M. Shekelle. 2010. *Tarsius*: A New Tarsier Species From Central Sulawesi Occupies a Dicontinuous Range. *International Journal of Primatology*. 31: 1107-1122.
- Musser, G. & Dagosto. 1987. The Identity of *Tarsius pumilus*, a Pygmy Species Endemic to Montane Mossy Forest of Central Sulawesi. *American Museum Novitates*. 2867: 1-53.
- NFGEL (National Forest Genetics Laboratory) dan GRCP (Genetic Resources Conservation Program). 2006. *Genetic Marker*. California: USA. dendrome.ucdavis.edu/ctgn/files/Vol_05_print.pdf (Diunduh 3 Februari 2014, pukul 18.16 WIB)
- Niemitz, C. 1984. *Biology of Tarsiers*. Gustav Fischer. Stuttgart.
- Nowak & M. Ronald. 1999. *Walker's Mammals of the World*. Volume I. John Hopkins University Press. Baltimore.
- Osawa, S., S. Zhi-Hui & Y. Imura. 2004. Molecular

- Phylogeny and Evolution of Carabid Ground Beetles. Springer-Verlag Tokyo: SNP Best-set Typesetter Ltd.
- Widayanti, R., NSN. Handayani & IM. Budiarsa. 2011. Keragaman Genetik Gen Penyandi Dehydrogenase Sub-unit 3 Mitokondria pada Monyet Hantu (*Tarsius sp.*). *Jurnal Veteriner*. 12 (1): 26-33.
- Widayanti, R & T. Susmiati. 2012. Studi keragaman genetic *Tarsius* sp. Sulawesi berdasarkan sekuen gen NADH Dehydrogenase Sub-Unit 4L (ND4L). *Jurnal Kedokteran Hewan* 6(2): 105-111
- Widayanti R., NSN. Handayani & H. Wijayanto. 2012. Keragaman Genetik Sekuen Gen ATP Synthase FO Subunit 6 Monyet Hantu (*Tarsius* sp.) Indonesia. *Jurnal Veteriner* 13 (4): 358-370.
- Saitou, N & M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
- Schmitz, J., M. Ohme & H. Zischler. 2002. The Complete Mitochondrial Sequence of *Tarsius bancanus*: Evidence an Extensive Nucleotide Compositional Plasticity of Primate Mitochondrial DNA. Göttingen: German Primate Center. *Molecular Biology and Evolution*. 19(4):544-553.
- Shekelle, M., C. Groves, S. Merker, & J. Supriatna. 2008. *Tarsius tumpara*: A New Tarsier Species from Siau Island, North Sulawesi. Bogor: Indonesia. *Primate Conservation*. (23): 55-64.
- Shekelle^a, M. 2008. Distribution and Biogeography of *Tarsius*. LIPI Press. *Primates of The Oriental Night*. LIPI Press. *Primates of The Oriental* (Shekelle *et al.* eds):13-28.
- Shekelle^b, M. 2008. Distribution of Tarsier Acoustic Forms, North and Central Sulawesi: With Notes on The Primary Taxonomy of Sulawesi's Tarsier. Bogor: *Night* (Shekelle *et al.* eds). LIPI Press. *Primates of The Oriental* : 35-50.
- Shokralla, S., FG. Joel, N. Hamid, HJ. Daniel, H. Winnie & H. Mehrdad. 2014. Next generation DNA barcoding: using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources*. 14: 892-901.
- Somura, H., H. Hori & Y. Manome. 2012.. Sequence Analysis of Mitochondrial DNAs of 12S rRNA, 16S rRNA, and Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) Regions in Slow Lorises (Genus *Nycticebus*) May Contribute to Improved Identification of Confiscated Specimens. *International Scholarly Research Network ISRN Zoology*.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. *MEGA 6*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biological Evolution*. 30(12): 2725-9.
- Tobe, S.S., AC. Kitchener & AM. Linacre. 2010. Reconstructing mammalian phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase subunit 1 Mitochondrial Genes. *Plos one*. 5(11): e14156.
- Tarwinangsih, W., A. Fajarallah, C. Sumantri & E. Andreas. 2011. Analisis Keragaman Genetik Kerbau Lokal (*Bubalus bubalis*) Berdasarkan Haplotipe DNA Mitokondria. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner* . Puslitbangnak, Deptan: 59-67.
- Tomascik, T., JA. Mah, A. Nontji & MK. Moosa. (1996). *The Ecology of the Indonesian Seas – Part One*. Hong Kong: Periplus Editions Ltd. hlm. 580–581
- YanSen, C., L. Zhang, FJ. Shen, WP. Zhang, R. Hou, BS. Yue, J. Li, & ZH. Zhang 2010. DNA Barcoding of 18 Species of Bovidae. *Chinese Science Bulletin*. 56(2): 164-168.