

Analisis Sekuen DNA Mitokondria Cytochrome Oxidase I (COI) mtDNA Pada Kukang Indonesia (*Nycticebus* spp) sebagai Penanda Guna Pengembangan Identifikasi Spesies
(Analysis on Mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase I (COI) Sequences of Indonesia Slow Lories (*Nycticebus* spp) as Marker to Improve Identification of Species)

Wiradateti¹, Eka Indriana², & Handayani²

¹Pusat Penelitian Biologi-LIPI

²Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam AS-Syafi'iyah

Email: teti_mzb@yahoo.com

Memasukkan: Agustus 2015, Diterima: November 2015

ABSTRACT

Slow lorises are small size primates of the genus *Nycticebus* that are in endangered status. Habitat pressure and high trade as pet animals has made the population decline both quantitatively and qualitatively, therefore it is necessary to save the slow lorises through conservation action. Morphologically, the individuals are difficult to be distinguished among the species, therefore making much harder in identification for conservation purposes such as from confiscated individuals. Therefore molecular marker is needed through mitochondrial DNA using COI gene sequences analysis is needed for identification. This study used 24 samples of slow lorises consisted of 2 from Kalimantan, 9 from Java and 13 from Sumatra. The result indicated that in the 660 bp there were 62 variable sites with 15 haplotypes: 4 haplotypes of *N. javanicus*, 9 haplotypes *N. coucang*, and 2 haplotypes *N. menagensis*. Based on nucleotide variations at specific sites, it was formed haplotype differences among species. The average genetic distance between species showed that Kalimantan population were closer to the population of Sumatra ($d= 0.042 \pm 0.006$) compared with Java population ($d= 0.059 \pm 0.009$), whereas the genetic distance within population showed the population of Java had low diversity ($d= 0.002$) with a mean nucleotide differences 2.6. Thus Javan slow loris (*N. javanicus*) should be conserved.

Keywords: *Nycticebus* spp., molecular, COI, conservation, marker

ABSTRAK

Kukang merupakan satwa primata dari genus *Nycticebus* yang terancam punah. Tekanan habitat dan tingginya perdagangan kukang merupakan penyebab utama penurunan populasi kukang baik kualitas maupun kuantitas, sehingga perlu dilakukan penyelamatan kukang melalui konservasi. Morfologi spesies kukang yang sulit dibedakan secara visual merupakan kendala di dalam manajemen konservasi maupun di dalam identifikasi dari hewan sitaan. Untuk itu perlu diketahui penciri DNA dari masing-masing spesies untuk genom DNA mitokondria (mtDNA). Penelitian menggunakan 24 sampel kukang yaitu 2 dari Kalimantan, 9 dari Jawa dan 13 dari Sumatera. Hasil analisis pada 660 pasang basa (pb) COI menunjukkan adanya variasi pada 62 situs dengan 15 haplotipe; 4 haplotipe *N. javanicus*, 9 haplotipe *N. coucang*, dan 2 haplotipe pada *N. menagensis*. Berdasarkan variasi nukleotida pada situs tertentu membentuk perbedaan haplotipe yang memberikan perbedaan spesifik diantara spesies. Rata-rata jarak genetik populasi Kalimantan lebih dekat dengan Sumatera ($d=0.042\pm 0.006$) dibandingkan dengan populasi Jawa ($d=0.059\pm 0.009$). Individu-individu dalam populasi Jawa memiliki jarak genetik yang rendah ($d=0.002$) dengan rata-rata perbedaan 2,6 nukleotida. Dengan demikian kukang Jawa (*N. javanicus*) perlu lebih diperhatikan untuk konservasinya.

Kata Kunci: *Nycticebus* spp., molekular, COI, konservasi, penciri

PENDAHULUAN

Kukang (*Nycticebus* spp) merupakan satwa primata nokturnal, arboreal, soliter, dan monogami yang secara umum tersebar di seluruh Asia. Genus *Nycticebus* memiliki lima spesies yaitu *N. bengalensis*, *N. pygmaeus*, *N. coucang*, *N. menagensis*, dan *N. javanicus* (Nekaris & Nijman 2007). Tiga diantaranya

hidup di Indonesia, yaitu kukang Sumatera (*N. coucang*), kukang Kalimantan (*N. menagensis*), dan kukang Jawa (*N. javanicus*). Sebelumnya hanya dikenal dua spesies loris yaitu *N. coucang* dipertimbangkan sebagai *low risk* yang tersebar dari India Utara, Filipina dan sampai Indonesia dan spesies yang lebih terancam adalah *N. pygmaeus* tersebar mulai dari Laos, Kamboja, Vietnam dan Cina

(Brandon-Jones *et al.* 2004). Revisi taksonomi telah dilakukan tentang keragaman ekstrim pada genus *Nycticebus* dalam hal morfologi tengkorak, variasi genetik, ukuran tubuh, tanda wajah, gigi, dan warna rambut yang pada saat ini diakui menjadi beberapa spesies yaitu *N. bengalensis*, *N. coucang*, *N. javanicus*, *N. menagensis*, *N. pygmaeus* (Groves 1971, 1998; Chen *et al.* 2006; Groves & Maryanto 2008) dan keragaman tersebut dijelaskan lebih lanjut dalam pengaturan taksonomi (Nekaris & Jave 2007). Semua spesies kukang pada saat ini telah diklasifikasikan sebagai spesies *critical endangered*, *endangered* dan rentan terutama karena kehilangan habitat, pemanfaatan dan diburu untuk hewan kesayangan (*pet*) dan untuk pengobatan (Nekaris *et al.* 2013; Ratajszczak 1998; Nekaris & Nijman 2007). Kukang adalah spesies primata dilindungi tetapi paling sering ditemukan di pasar burung (Malone *et al.* 2002; Webber & Nekaris, 2004 dalam Nekaris *et al.* 2008). Data investigasi perdagangan satwa liar dilindungi yang dilakukan ProFauna Indonesia pada tahun 2002 mencatat bahwa lebih dari 5000 individu kukang telah diselundupkan dari Sumatera ke Jawa melalui Lampung (ProFauna Indonesia 2007; BKSDA 2013: komunikasi pribadi). Keberadaan kukang Jawa di pasar perdagangan satwa telah tergantikan oleh kukang Sumatera dan Kalimantan hingga 75% (CITES 2006). Tingginya angka perdagangan kukang diduga berkaitan langsung dengan penurunan jumlahnya di alam.

Permasalahan muncul ketika hewan hasil sitaan perlu diklasifikasikan ke dalam setiap spesies dan selanjutnya didistribusikan ke kebun binatang dan pusat rehabilitasi untuk perlindungan lebih lanjut. Hal ini tidak mudah bagi orang awam untuk mengklasifikasi kukang atas dasar tampilan warna rambut, fisik dan fitur aurikularis (*pola strip*) yaitu fitur penting dalam klasifikasi terutama antara *N. coucang* dan *N. menagensis* dan spesies lainnya di Kalimantan (Munds *et al.* 2013). Meskipun identifikasi berdasarkan pengukuran tengkorak atau craniodental sudah dilaporkan (Groves 1998; Groves & Maryanto 2008)) tetapi pengukuran *in vivo* ini praktis sulit dilakukan. Oleh karena itu, perlu menemukan metode yang relatif sederhana dan lebih akurat untuk identifikasi berbagai spesies untuk dieksplorasi, salah satunya adalah melalui analisis DNA. Kemajuan terbaru dalam analisis genetik berdasarkan DNA adalah menggunakan

mitokondria DNA yang cocok digunakan untuk analisis pada tingkat spesies dan telah dilakukan pada berbagai target gen (Masters *et al.* 2007; Chen *et al.* 2006; Roos *et al.* 2004).

Gen penyandi dalam genom mtDNA di antaranya adalah Gen *cytochrome oxidase* subunit I (CO 1). CO 1 telah dipilih menjadi salah satu gen yang sekuennya digunakan dalam *barcoding*. Gen ini mempunyai sifat-sifat yang memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam menentukan identitas spesies pada hampir semua binatang tingkat tinggi. Gen CO 1 memiliki banyak kelebihan untuk mempelajari karakteristik genetik karena sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuennya, serta banyak bagian yang bersifat *conserve* (lestari) sehingga dapat digunakan sebagai DNA *barcoding* pada sebagian besar spesies (Hebert *et al.* 2003). Gen CO 1 juga dapat digunakan untuk merekonstruksi filogenetik pada cabang evolusi tingkat spesies (Palumbi 1996). Selain itu susunan asam amino dari protein yang disandi gen CO 1 jarang mengalami substitusi sehingga gen CO 1 bersifat stabil dan dapat digunakan sebagai penanda analisis filogeni, namun basa-basa pada *triple* kodonnya masih berubah dan bersifat *silent* yaitu perubahan basa yang tidak merubah jenis asam amino (Lynch & Jarrell 1993 dalam Herlina 2013). Penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi masing-masing spesies kukang terutama hasil sitaan yang sulit diidentifikasi melalui mitokondria DNA *Cytochrome Oxidase I* (COI).

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 kukang yang berasal dari Kalimantan (2 ekor), Sumatera (13 ekor) dan Jawa (9 ekor). Material genetik yang digunakan berupa 16 sampel jaringan (hati, dan daging), 4 sampel rambut dan 4 sampel darah (Table 1).

Total DNA diperoleh dengan tahapan ekstraksi dari material genetik sesuai jenis sampel.

Untuk sampel jaringan dan darah, ekstraksi menggunakan Qiagen Kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit) dengan tahapan sesuai prosedur. Ekstraksi pada sampel rambut menggunakan protocol phenol chloroform (Sambrook *et al.*

1989) dan dimodifikasi dengan penambahan proteinase K (PK), karena pada rambut mengandung ikatan chitin protein tinggi. DNA yang dihasilkan dilarutkan dengan TE buffer.

Amplifikasi gen cytochrome oxidase I (COI) pada mitokondrial DNA (mtDNA) menggunakan primer spesifik untuk COI yang dirancang berdasarkan sekuen COI *Nycticebus coucang* pada data GeneBank NCBI nomor GQ259903.1. Sekuen nukleotida primer adalah COI_KK_F1 5'-TCTTCCAGTTCTCGCAGCAG-3' dan COI-KK-R1 5'GTAGCGTCGTGGTATCCCTG dengan panjang sekitar 727 bp. PCR dibentuk dalam 30 ul menggunakan PCR mix KAPA (KK5701 KAPA2G Robust HotStart ReadyMix). Mix PCR mengandung 17ul KAPA, masing-masing 1,8ul primer, template DNA 1-2ul dan ditambah MQ sampai mencapai volume 30ul. Kondisi PCR adalah sebagai berikut: denaturasi 98°C selama 30 detik, diikuti sebanyak 35 siklus dengan denaturasi 98°C selama 10 detik, penempelan primer (*annealing*) 62°C selama 10 detik, perpanjangan (*elongation*) 72°C selama 1 menit 20 detik dan diikuti elongasi 72°C selama 10 menit. Sekuen nukleotida hasil amplifikasi dilakukan di *Firstbase Company*, Singapore menggunakan forward and reverse primer. Posisi gen yang digunakan sebagai penanda

pada penelitian ini terletak pada posisi sekitar 554 bp dari bagian kiri dan 200bp dari bagian kanan gen COI atau sekitar separuh panjang gen target. Skema posisi gen yang teramplifikasi terlihat pada Gambar 1.

Semua data sekuen sebelum dianalisa dilakukan *blast (similarity)* dengan data BankGene pada NCBI program. Blast dilakukan untuk mengetahui sekuen pada spesies atau genus yang sama dan tidak terjadi kontaminasi pada sampel penelitian. Sekuen nukleotida gen COI diedit menggunakan *BioEdit software* (Hall 1999) kemudian di jajarkan (*aligned*) menggunakan program *Chustal X* (Larkin *et al.* 2007). Analisa data menggunakan Program MEGA version 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Parameter sebagai penanda menggunakan haplotipe, variable sites berdasarkan nukleotida, jarak genetik (*d*) model *kimura-two parameter*, dan asam amino serta komposisi sekuen nukleotida. Untuk mengetahui posisi sampel penelitian digunakan analisis filogeni menggunakan metode *Neighbour-Joining* dengan 1000 kali pengulangan (Saitou & Nei 1987) pada program MEGA 6. Sebagai data pembanding digunakan sekuen GeneBank dari *Nycticebus coucang* dengan nomor referensi AJ309867.1, *Nycticebus javanicus* GQ259900.1., *N. menagensis* GQ259901.1, *N. pygmaeus* GQ259902.1, dan *N. bengalensis* GQ259899.1.

HASIL

Amplifikasi DNA

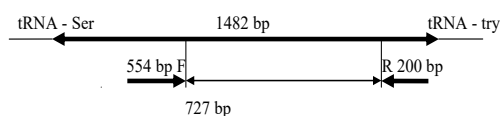
Panjang gen COI teramplifikasi menggunakan primer spesifik sekitar 727 bp (Gambar 2.). Panjang gen target dari COI pada *Nycticebus javanicus* adalah 1482 bp (Somura *et al.* 2012) dan pada *Nycticebus coucang* sekitar 1541 bp (Arnason *et al.* 2000).

Analisis Data Variasi nukleotida

Hasil sekuensing dari 24 sampel kukang penelitian adalah sekitar 660 sampai dengan 690 bp, dan untuk analisa menggunakan sepanjang 660 bp sehingga semua sampel dapat dianalisis. Analisa data menggunakan program MEGA 6.0 menunjukkan terdapat 62 situs bervariasi (mengalami substitusi basa). Akumulasi perbedaan basa pada 24 individu memberikan 15 haplotipe (Table. 2) yang dapat menggambarkan perbedaan basa diantara spesies kukang dan keragaman dalam populasi. Haplotipe tersebut tersebar sebanyak empat

Tabel 1. Sampel yang digunakan dalam penelitian.

Spesies	N	Lokasi	Kode Sampel
<i>N. menagensis</i>	2	Kalimantan	MER; KALTG
<i>N. coucang</i>	13	Sumatera	IAR; IAR 1; LAMP; SUM 1; SUM 2; SUM 3; SUM 4; SUM 5; SUM 6; MER 1; PAL 1; SUME; HAL 3;
<i>N. javanicus</i>	9	Jawa	HAL; HAL 1; HAL 2; TAS; TAS I; CIA; GAR; LAMP 1; SUM



Gambar 1. Skema posisi gen COI teramplifikasi menggunakan spesifik primer F dan R

haplotipe pada *N. javanicus* dari 9 individu; dua haplotipe *N. menagensis* dari dua individu dan sembilan haplotipe *N. coucang* dari 13 individu. Pola substitusi basa dari masing-masing haplotipe dapat menunjukkan perbedaan spesifik diantara ke tiga spesies (Tabel 2.).

Jarak genetik

Jarak genetik dalam populasi dan antar populasi dianalisa menggunakan *Pairwise Distance* dengan model *Kimura Two Parameter*. Hasil analisis sekuen DNA kukang sepanjang 660bp memberikan jarak genetik (d) terendah adalah 0% (0,000) dan tertinggi adalah 6,5% (0,065) dengan rata-rata jarak keseluruhan populasi $0,034 \pm 0,005$. Untuk masing-masing spesies, jarak genetik pada populasi *N.*

coucang $d = 0.013 \pm 0.003$, *N. javanicus* $d = 0.004 \pm 0.002$, *N. menagensis* $d = 0.018 \pm 0.005$. Jarak genetik antar spesies menunjukkan bahwa *N. coucang* lebih dekat dengan *N. menagensis* ($d=0.042 \pm 0.006$) dibanding *N. javanicus* ($d=0.053 \pm 0.008$), sedangkan jarak genetik lebih tinggi adalah antara *N. javanicus* dengan *N. menagensis* $d=0.059 \pm 0.009$. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh nilai keragaman nukleotida (π) yaitu antara populasi Sumatera dan Kalimantan ($\pi=0.004 \pm 0.002$), Sumatera-Jawa ($\pi=0.022 \pm 0.004$), Jawa-Kalimantan ($\pi=0.023 \pm 0.005$).

Variasi Asam Amino

Analisis asam amino menggunakan MEGA dengan panjang 660 bp nukleotida terdapat 220 asam amino. Analisis berdasarkan *variabel sites* tersebut hanya terdapat 1 asam amino yang berbeda seperti pada Tabel 3.

Pada tabel diatas terlihat bahwa dari 220 asam amino hanya ditemukan satu asam amino yang berbeda diantara individu yaitu dari asam amino Leusin (L) ke asam amino Prolin (P). Asam amino tersebut tidak menunjukkan spesifik pada masing-masing spesies karena dimiliki oleh ketiga spesies, sehingga translate asam amino pada gen COI untuk ke tiga spesies kukang dalam penelitian ini tidak efektif digunakan sebagai penciri dari masing-masing spesies.

Hasil analisa sekuen nukleotida yang digunakan sebagai penciri spesies pada penelitian ini dapat



Gambar 2. Panjang gen COI teramplifikasi sekitar 727 bp dari sampel penelitian
Keterangan: No. 1.....12 = sampel penelitian. M = Marker 100 bp ladder

Tabel 2. Haplotipe berdasarkan variasi nukleotida pada 24 individu kukang

Haplo tipe	Sampel	n	Variasi Haplotipe							
			1111111	222222233	333333334	444444444	555556666	66]		
			22335667	7782467789	1223445733	4556899990	2335677789	0246701334	55]	
			2347691032	5876751705	9257098969	5479736792	0053814738	4234198062	15]	
A	Kalimantan	1	TAGGGTTATC	CTCTGAGGTT	AGCCGATTTCG	CCACGCCAC	CTTTGCTAAA	TCTTCGTTA	TC	
B	Jawa	2	...A.CCGCT	.C..AG...C	.ATTA...A.	TT.T.TT.GT	AC..ATCGG.	C.CC.A..C.	..	
C	Jawa	1	...A.C.GCT	.C..AG...C	.ATTA.C.A.	TT.T.TT.GT	AC..ATCGG.	C.CC.A..CG	..	
D	Sumatera	3	...AAC....	...AGA..C	G...AG.C.A	TT..A..TGT	..A..TCG.T	.T..TA.C..	CT	
E	Jawa	4	...A.C.GCT	.C..AG...C	.ATTA...A.	TT.T.TT.GT	AC..ATCGG.	C.CC.A..C.	..	
F	Sumatera	1	CT.AAC....	...AG...C	G...A..C.A	TTG.....G.	...C.TCG.TATC..	.T	
G	Jawa	2	CT.A.C.GCT	.C..AG...C	.ATTA...A.	TT.T.TT.GT	AC..ATCGG.	C.CC.A..C.	..	
H	Sumatera	1	...AAC....	...AG...C	GA..A..C.A	TTG.....G.	...C.TCG.TTATC..	.T	
I	Sumatera	1	...AAC...T	...AG...C	G...A..C.A	TTG.....G.	...C.TCG.TTATC..	.T	
J	Sumatera	1	CT.AAC...T	...AG...C	G...A..C.A	TTG.....G.	...C.TCG.TTATC..	.T	
K	Sumatera	1	...AAC....	...AGA..C	G...AG.C.A	TT..A..TGT	..A..TCGGT	.T..TA.C..	CT	
L	Sumatera	3	CT.AAC....	...AGA..C	G...AG.C.A	TT..A..TGT	..A..TCG.T	.T..TA.C..	CT	
M	Sumatera	1	...AAC....	..T.AGA..C	G...AG.C.A	TT..A..TGT	..A..TCG.T	.T..TA.C..	CT	
N	Sumatera	1	...AAC....	...AG...C	G...A..C.A	TTG.....G.	...C.TCG.TTATC..	.T	
O	Kalimantan	1	CTA.....T..C..AC.....A.T..A.....T.....A....							

dilihat dari perbedaan nukleotida dalam bentuk haplotipe, jarak genetik dan asam amino yang terbentuk. Pada penelitian ini menunjukkan perbedaan nukleotida antara haplotipe *N. menagensis* dengan *N. javanicus* berkisar 32 – 35 basa yang didominasi oleh substitusi transisi sebesar 91.42% dan substitusi transversi sebesar 8.53%. Transversi terjadi antara basa Adenin (A) ke Timin (T) dan sebaliknya. Antara haplotipe *N. menagensis* dengan *N. coucang* terdapat perbedaan nukleotida berkisar 21 – 33 basa, didominasi oleh substitusi transisi sebesar 90.91% dan kejadian tranversi sekitar tiga situs 9.09% yaitu dari A ke T. Sedangkan perbedaan nukleotida pada haplotipe *N. coucang* dengan *N. javanicus* berkisar 28–36 basa yang didominasi oleh substitusi transisi sebesar 88.88% dan kejadian transversi sebanyak 4 situs 11.80% (Table 2.). Index transisi dan tranversi pada masing-masing spesies menurut persamaan Tajima (1989)

adalah 10.21%, 8.00% dan 6.59%.

PEMBAHASAN

Panjang nukleotida dari COI teramplifikasi menggunakan primer spesifik sekitar 727 bp. Panjang gen target dari COI pada *Nycticebus javanicus* adalah 1482 bp (Somura *et al.* 2012) dan pada *Nycticebus coucang* sekitar 1541 bp (Arnason *et al.* 2000). Dengan demikian analisa sekuen yang dilakukan tidak keseluruhan panjang COI pada kukang. Berdasarkan perbedaan nukleotida menunjukkan antara spesies *N. coucang* dengan *N. menagensis* sekitar 4.10%, antara *N. coucang* dengan *N. javanicus* 4.85% dan *N. menagensis* dengan *N. javanicus* 5.15%. Hasil ini menunjukkan perbedaan basa nukleotida tertinggi adalah antara *N. menagensis* dengan *N. javanicus* dan yang terendah adalah antara *N. menagensis* dengan *N. coucang*. Dari penelitian lain pada mamalia menunjukkan perbedaan nukleotida pada 147 spesies kelelawar sekitar 0-11.79% (Clare *et al.* 2011), dan pada primata antara 5 spesies *Tarsius* (*Tarsius* spp.) memberikan perbedaan nukleotida sebesar 0 – 18% (Wirdateti dkk. 2015).

Berdasarkan morfologi terdapat perbedaan yang jelas antara *N. javanicus* dengan *N. coucang* dan *N. menagensis* berdasarkan ukuran craniometri (Groves & Maryanto 2008). Secara morfologi antara *N.coucang* dengan *N. menagensis* terlihat kemiripan terutama pada pola strip pada kepala dan punggung serta warna rambut tubuh. Hal ini didukung secara geografis bahwa antara Kalimantan dan Sumatera terpisah sekitar ~ 1.5 – 1.7 Ma dimana pola pemisahan pada kukang Kalimantan, Sumatera dan Jawa secara biografi sama dengan pola pemisahan orang utan pada puncak phase dingin sekitar ~ 1.8 Ma saat air laut turun ± 100 m dimana orang utan Kalimantan berbeda dengan Sumatera dan Jawa baik secara morfologi, genetik dan perilaku. Orang utan Jawa dan Asia Tenggara lainnya mengalami kepunahan diperkirakan sekitar akhir Pleistocen atau sekitar ~ 1.8 Ma akhir (Ryder & Chemnick 1993, Zhi *et al.* 1996; Brandon- Jones *et al.* 2004 dalam Harisson *et al.* 2006). Hasil penelitian ini berdasarkan komposisi perbedaan basa (haplotipe) juga jelas menunjukkan perbedaan diantara spesies, sehingga daerah gen COI pada penelitian dapat dirujuk sebagai penanda molekular pada spesies *Nycticebus* dan mendukung penelitian secara

Tabel 3. Perbedaan asam amino gen CO I dengan panjang sekuen nukleotida 660bp dari 24 sampel penelitian.

Sampel	Asam Amino site	
	[1]	Keterangan
NC_COI_MER	L	KALIMANTAN
NJ_COI_GAR	.	JAWA
NJ_COI_CIA	.	JAWA
NC_COI_LAMP	.	SUMATERA
NJ_COI_HAL1	.	JAWA
NC_COI_IAR	P	SUMATERA
NJ_COI_SUM	.	JAWA
NJ_COI_hAL	P	JAWA
NC_COI_SUME	.	SUMATERA
NJ_COI_TAS1	P	JAWA
NC_COI_SUM3	.	SUMATERA
NC_COI_SUM4	P	SUMATERA
NJ_COI_LAMP1	.	JAWA
NC_COI_IAR1	.	SUMATERA
NC_COI_SUM6	.	SUAMATERA
NJ_COI_TAS	.	JAWA
NJ_COI_HAL2	.	JAWA
NC_COI_MER1	P	SUMATERA
NC_COI_SUM5	.	SUMATERA
NC_COI_PAL1	P	SUAMTERA
NC_COI_HAL3	P	SUMATERA
NC_COI_SUM2	.	SUMATERA
NC_COI_SUM1	.	SUMATERA
NM_COI_Kaltg	P	KALIMANTAN

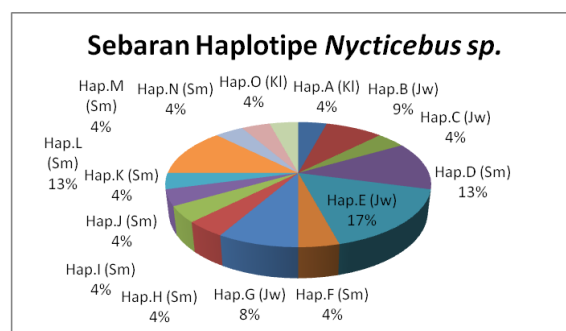
taksonomi.

Tipe haplotipe yang berbeda pada masing-masing pulau (Jawa, Kalimantan dan Sumatera) dapat digunakan sebagai acuan dalam mengidentifikasi individu kukang. Semakin beragam tipe komposit haplotipe pada satu populasi akan semakin tinggi tingkat keragaman genetik dan begitu juga sebaliknya (Smith & Chesser 1981 dalam Akbar *et al.* 2014). Tipe haplotipe pada kukang jawa memiliki ciri khas pada urutan basa nukleotida yaitu, G (Guanin) pada posisi 60, C (Sitosin) pada posisi 63 dan 78, T (Timin) pada posisi 396 dan A (Adenin) pada posisi 420. Posisi basa tersebut berbeda dengan kukang Sumatera dan Kalimantan yaitu berturut turut A, T, C, secara transisi dan C posisi situs 396 mengalami substitusi transversi. Tipe haplotipe pada kukang Sumatera memiliki ciri khas pada urutan basa nukleotida yaitu, G (Guanin) pada posisi 219 dan T (Timin) pada posisi 498 dst. Perbedaan posisi basa nukleotida seperti ini tidak ditemukan pada tipe haplotipe kukang Jawa dan kukang Kalimantan. Tipe haplotipe pada kukang Kalimantan memiliki ciri khas pada urutan basa nukleotida yaitu, G (Guanin) pada posisi 147, A (Adenin) pada posisi 165, T (Timin) pada posisi 195 dan C (Sitosin) pada posisi 345 (Tabel.2). Perbedaan posisi basa nukleotida seperti ini tidak ditemukan pada tipe haplotipe kukang Jawa dan kukang Sumatera. Hal ini mengindikasikan bahwa COI dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies kukang dilihat dari tipe haplotipe berdasarkan substitusi basa nukleotida pada masing-masing wilayah (Jawa, Kalimantan dan Sumatera). Apabila dilihat dari tipe substitusi, penggunaan COI pada spesies mamalia menunjukkan rerata laju substitusi pasangan basa yang sama (sinonim) lebih tinggi dari pada Cyt b (*Gorilla gorilla* dengan *Gorilla g. gorilla*), sedangkan rerata laju substitusi non sinonim adalah lebih besar pada cyt b dari pada COI (*Cervus nippon centralis* dengan *C.n. yesoensis*), hal ini menunjukkan bahwa gen cyt b lebih conserve dari pada COI pada mamalia (Tobe *et al.* 2010).

Persentase sebaran haplotipe dari masing-masing spesies pada penelitian dapat dilihat pada diagram dibawah (Gambar. 3). Populasi Sumatera (*N. coucang*) memiliki 9 haplotipe dari 13 individu dengan persentase tertinggi

pada haplotipe D dan L sebesar 13% yaitu masing-masing tiga individu. Pada populasi Jawa memiliki empat haplotipe dari 9 individu dengan persentase tertinggi pada haplotipe E sebesar 17% yaitu 4 individu dan haplotipe B dan G sebesar 9% dan 8%. Sedangkan Kalimantan dua haplotipe dari dua individu. Berdasarkan hasil tersebut diatas dari tiga spesies genus *Nycticebus* di Indonesia menunjukkan bahwa *N. javanicus* memiliki tingkat keragaman rendah dimana 9 individu memiliki susunan nukleotida yang hampir sama. Perbedaan nukleotida pada populasi *N. javanicus* sangat kecil yaitu rata-rata 2.6 basa nukleotida dibandingkan dengan spesies *N. coucang* yaitu perbedaan sekitar 7.14 basa dan *N. menagensis* 12 basa. Nilai tersebut menunjukkan bahwa variasi genetik pada populasi kukang jawa adalah rendah dan mengindikasikan bahwa populasi kukang jawa cenderung menurun baik secara kualitas maupun kuantitas, dan keragaman genetik kukang jawa jauh lebih rendah dari kukang Sumatera dan Kalimantan. Kondisi penurunan kualitas kukang jawa (*N. javanicus*) tersebut telah tercantum di dalam IUCN yang dikategorikan sebagai spesies *critical endangered* (Nekaris *et al.* 2013).

Jarak genetik dapat menggambarkan kedekatan antar spesies ataupun dalam populasi dan juga digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu (Handayani 2011). Pada penelitian ini jarak genetik antara *N.coucang* dengan *N. menagensis* ($d=0.042\pm 0.006$) atau 4.2%, *N. coucang* dengan *N. javanicus* ($d=0.053\pm 0.008$) atau 5.3% dan antara *N. javanicus* dengan *N. menagensis* ($d=0.059\pm 0.009$) atau 5.9%. Hasil ini menunjukkan bahwa populasi Sumatera dan Kalimantan lebih dekat dibandingkan dengan Sumatera dan Jawa atau Jawa dengan Kalimantan.



Gambar 3. Sebaran haplotipe kukang (*Nycticebus* spp) menggunakan variabel site.

Keterangan: Kl = Kalimantan ; Sm = Sumatera , Jw = Jawa

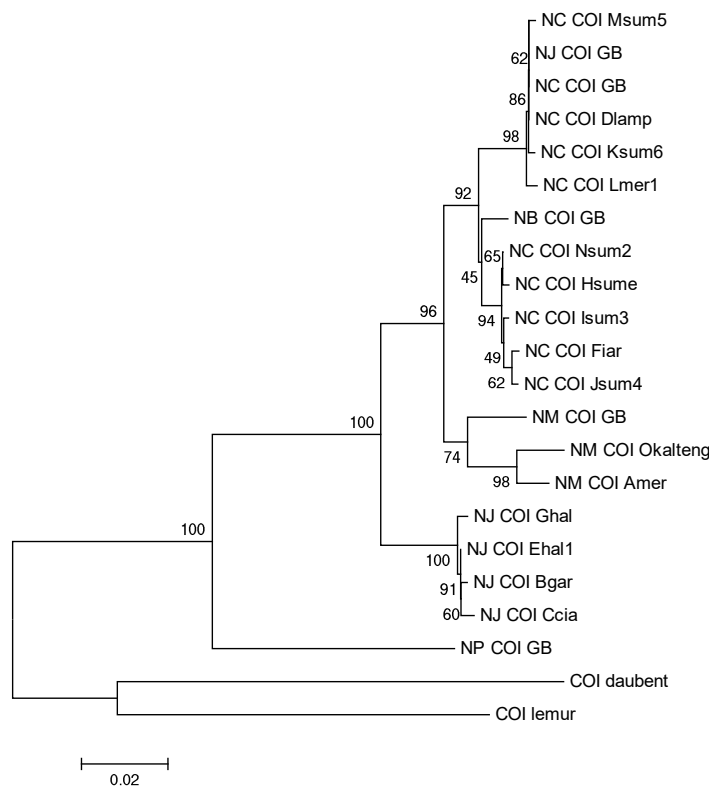
Hubungan yang dekat antara kedua spesies tersebut juga terlihat dari analisa gen 12S rRNA, 16S rRNA dan COI dimana jarak genetik antara *N. coucang* dengan *N. menagensis* $d= 0.023$ adalah lebih rendah dari *N. coucang* dengan *N. javanicus* $d= 0.027$ (Somura *et al.* 2013). Individu-individu yang memiliki nilai jarak genetik semakin rendah mengindikasikan bahwa individu-individu tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang semakin dekat dan jarak genetiknya tinggi maka memiliki hubungan kekerabatan yang jauh. (Putri 2013). Menurut Stevan Merker (pers.com) bahwa perbedaan nukleotida dan jarak genetik sebesar 3% antar populasi adalah merupakan spesies terpisah, dengan demikian nilai tersebut diatas memperkuat bahwa ketiga populasi merupakan spesies terpisah, dimana sebelumnya hanya satu spesies yaitu *N. coucang* dengan tiga anak jenis *N.c.coucang*, *N.c. javanicus* dan *N.c.menagensis* (Groves 1971; 2001).

Perbedaan berdasarkan komposisi asam amino pada ketiga spesies *Nycticebus* ini tidak memberikan karakter yang berbeda. Dari 220 asam amino yang terbentuk hanya terdapat satu posisi asam amino yang berbeda yaitu dari Leusin (L) ke Prolin (P), tetapi ketiga spesies juga memiliki asam amino tersebut, sehingga tidak ada pembeda spesifik dari komposisi asam amino meskipun terdapat perbedaan nukleotida pada jajaran sekuen. Kejadian ini menunjukkan adanya mutasi sinonimus di jajaran sekuen, dimana substitusi nukleotida dengan nukleotida lain tidak menghasilkan perbedaan asam amino. Menurut Graur (2003), mutasi sinonimus tidak selalu dapat disamakan dengan *silent mutation*, meskipun mayoritas mutasi sinonimus tidak menimbulkan efek pada tingkat asam amino (*silent*), mutasi sinonimus dapat menyebabkan timbulnya situs pemutusan baru (*splicing site*) atau merubah situs pemutusan yang sudah ada. Hal ini dapat menyebabkan posisi intron bergeser menjadi ekson, atau sebaliknya yang akibatnya terjadi perbedaan pada hasil sintesis polipeptida. Selain itu susunan asam amino dari protein yang disandi gen COI jarang mengalami substitusi sehingga gen CO I bersifat stabil dan dapat digunakan sebagai penanda analisis filogeni, namun basa-basa pada *triple* kodonnya masih berubah dan bersifat *silent* yaitu perubahan basa yang tidak merubah jenis asam

amino (Lynch & Jarrell 1993 *dalam* Herlina 2013). Dengan demikian asam amino di dalam identifikasi kukang menggunakan COI pada posisi gen target penelitian ini tidak dapat digunakan sebagai indikator pembeda diantara spesies kukang Indonesia karena tidak memberikan penciri spesifik.

Untuk melihat hubungan dari masing-masing spesies dapat digambarkan dengan menggunakan pohon filogeni. Pohon filogeni dibentuk berdasarkan haplotipe masing-masing spesies dari perbedaan nukleotida dengan perbandingan sekuen genus *Nycticebus* GeneBank menggunakan *Neighbor joining* dengan Kimura's two parameter model (Gambar 4.). Sebagai *out group* adalah *Lemur catta* dan *Daubentonia madagascariensis* dari sekuen GeneBank (NCBI). Analisis pohon filogeni digunakan karena dapat menggambarkan hubungan kekerabatan yang tepat antara organisme (Li & Graur 1991).

Pohon diagram matrix menunjukkan pengelompokan antar spesies berdasarkan haplotipe dengan nilai bootstrap 92-100%. Pengelompokan dan percabangan yang terbentuk didukung dengan nilai *bootstrap* tinggi yang menentukan kestabilan dari pembentukan kelompok. Pengelompokan dan kedekatan masing-masing individu dalam populasi dan antar spesies tersebut didukung oleh nilai jarak genetik dan perbedaan nukleotida pada penelitian ini. Nilai *bootstrap* diatas 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). Pada pohon menunjukkan bahwa populasi kukang Sumatera terpisah menjadi dua kelompok dengan kestabilan yang cukup tinggi nilai *bootstrap* 98%, tetapi berdasarkan haplotipe tidak menunjukkan perbedaan nukleotida yang significant dan demikian juga halnya dengan asam amino tidak menunjukkan perbedaan. Menurut Poutyoud Lauren (pers. com) hal ini bisa terjadi karena adanya perbedaan geografi di pulau Sumatera antara Sumatera bagian Utara, Timur dan bagian Selatan yang dapat mempegaruhi genetik. Penggunaan sekuen perbandingan dari Genebank tampaknya tidak semua dapat digunakan sebagai indikator, seperti terlihat pada gambar bahwa sekuen *N. javanicus* mengelompok pada spesies *N. coucang* demikian juga dengan sekuen *N. bengalensis*. Hal yang sama juga terlihat dari



Gambar 4. Hubungan antar spesies digambarkan menggunakan *Neighbor joining* dengan *Kimura's two parameter model*.

Keterangan: NC = *N. coucang*; NM = *N. menagensis*; NJ = *N. javanicus*

diagram matrix hasil penelitian Somura *et al.* (2012).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa, gen COI dapat digunakan sebagai penciri antar spesies kukang di Indonesia berdasarkan perbedaan nukleotida atau haplotipe, dan persentase jarak genetik tetapi tidak dari asam amino. Parameter tersebut juga dapat menunjukkan tingkat keragaman dan status spesies kukang di alam, dimana populasi kukang jawa (*N. javanicus*) menuju keragaman genetik rendah yang ditunjukkan dengan kecilnya perbedaan nukelotida diantara individu yaitu rata-rata 2.6 basa dan jarak genetik $d=0.004\pm 0.002$. Dengan demikian perlu perhatian yang khusus terhadap management konservasi kukang jawa.

DAFTAR PUSTAKA

Akbar, N., NP. Zaman & HH. Madduppa. 2014.

Keragaman genetik ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) dari dua populasi di Laut Maluku, Indonesia. *Depik* 3(1): 65-73.

Arnason, U., A. Gullberg, AS. Burguete, & A. Janke. 2000. Molecular estimates of primate divergences and new hypotheses for primate dispersal and the origin of modern humans. *Hereditas* 133:217–228.

Brandon-Jones, D., AA. Eudey, & T. Geissmann. 2004. Asian primate classification. *International Journal Primatology* 25(1):97–164.

Chen, JH., D. Pan, & CP. Groves. 2006. Molecular phylogeny of *Nycticebus* inferred from mitochondrial genes. *International Journal Primatology* 27(4):1187–1200.

Clare, EL., BK. Lim., MB. Fenton & PDN. Hebert. 2011. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. *PloS One* 6(7): e22648. Doi: 10.1371/journal.pone. 0022648.

Graur, D. 2003. *Single-base Mutation*. Nature Encyclopedia of The Human Genome / © 2003 Macmillan Publishers Ltd, Nature

- Publishing Group.
- Groves, CP. 1971. Systematics of the genus *Nycticebus*. *Proceedings of the 3rd International Congress of Primatology, Zurich 1970* 1. Basel: Karger. pp. 44–53.
- Groves, CP. 2001. *Primate Taxonomy*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Groves, CP. 1998. Systematics of tarsiers and lorises. *Primates* 39:13–27.
- Groves CP & I. Maryanto. 2008. Craniometry of slow lorises (Genus *Nycticebus*) of insular Southeast Asia, *Primates of The Oriental Night*, pp. 116–122.
- Handayani, M., DD. Solihin, & HS. Alikodra. 2011. Analisis DNA Mitokondria Badak Sumatera dalam konservasi genetik. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. Seminar Nasional VIII Pendidikan Biologi, UNS Solo. 439-444.
- 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. Krigbaum & J. Manser. 2006. *Primate Biogeography and Ecology on the Sunda shelf Islands: A palaeontological and Zooarchaeological Perspective*, Chapter Twelve, edited by Shawn M. Lehman and John G. Fleagle. Springer, New York, 2006. 345-349.
- Hebert, PDN., S. Ratnasingham & JR. de Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proceedings of the Royal Society B*. 270(1): S96–S99.
- Herlina. 2013. *Karakteristik gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) pada kerang bulu (Anadara antiquilata Linn.) asal Perairan Panimbang dan Bojonegara, Provinsi Banten* (Skripsi). Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. IPB.
- 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.
- Li, W.-H. and D. Graur (1991) *Fundamentals of Molecular Evolution*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Malone N, AR. Purnama, & M. Wedana 2002. Assessment of the sale of primates at Indonesian bird markets. *Asian Primates* 8:7–11.
- Masters JC., M. Boniotto, S. Crovella, C. Roos, L. Pozzi & M. Delpero. 2007. Phylogenetic relationships among the lorisidea as indicated by craniodental morphology and mitochondrial sequence data. *American Journal of Primatology*, 69(1): 6–15.
- Munds RA., KAI. Nekaris & SM. Ford. 2013. Taxonomy of Bornean slow loris, with new species *Nycticebus kayan* (Primates, Lorisidae). *American Journal of Primatology* 75: 46-56.
- Nekaris, KAI., & S. Jave. 2007. Unexpected diversity within the Javan slow loris trade: implications for slow loris taxonomy. *Contrib Zool* 76:187–196.
- Nekaris, KAI., & V. Nijman. 2007. CITES proposal highlights threat to nocturnal primates (*Nycticebus*: Lorisidae). *Folia Primatol* 78:211–214.
- Nekaris, KAI., M. Shekelle, Wirdateti, EJ. Rode & V. Nijman. 2013. *Nycticebus javanicus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. Downloaded on 1 March 2015.
- Osawa, S., Z. Su, & Y. Imura. 2004. *Molecular Phylogeny and Evolution of Carabid Ground Beetles*. Springer-Verlag Tokyo: SNP Best-set Typesetter Ltd.
- Palumbi, SR. 1996. *Nucleic acids II: the polymerase chain reaction*. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) *Molecular systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, p 205–248 Q
- Pro Fauna Indonesia. 2007. The trafficking of kukang or slow lorises (*Nycticebus coucang*) in Indonesia . www.profauna.or.id (20 April 2007).
- Putri, R. 2013. *Identifikasi keragaman gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) DNA Mitokondria pada ayam lokal Indonesia* (Skripsi). Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan. IPB.
- Ratajszczak, R. 1998. Taxonomy, distribution and status of the lesser slow loris *Nycticebus*

- pygmaeus* and their implications for captive management. *Folia Primatol* 69:171–174.
- Roos, C., J. Schmitz & H. Zischler. 2004. Primate jumping genes elucidate strepsirrhine phylogeny, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(29): 10650–10654.
- Saitou, N & M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425.
- Sambrook, J., EF. Fritschi & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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 Zoology*.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 (3): 585–95
- 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): 2725–2729.
- Tobe, SS., AC. Kitchener, & AMT. Linacre. 2010. Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. *PLoS ONE* 5(11): e14156. doi:10.1371/journal.pone.0014156.
- Webber, C., & KAI. Nekaris. 2004. Survey of primates and other mammals in markets of Indonesia, with an analysis of conditions and health of the animals. *Folia Primatol* 75:60.
- Wirdateti, SW. Wulandari., & PC. Kuswandi. 2015. Penanda genetik tarsius (*Tarsius* spp.) dengan menggunakan gen *Cytochrome Oxidase I* (COI) DNA Mitokondria (mtDNA) melalui metode sekuensing. *Jurnal Biologi Indonesia* 11(2): 275-284.