

KAJIAN DIVERSITI GENETIKA *Tarsius* sp. ASAL INDONESIA MENURUT URUTAN GEN NADH DEHIDROGENASE SUBUNIT 4 (ND4)

The Study of Genetic Diversity of Tarsius sp. Origin from Indonesia based on NADH Dehydrogenase Subunit 4 (ND4) Gene Sequences

Herrialfian¹, Rini Widayanti², Hery Wijayanto³, dan Jalaluddin⁴

¹Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Bagian Mikroskop Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁴Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: alfian.meurah@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengkaji keragaman genetik gen penyandi ND4 pada *Tarsius bancanus*, *T. b. borneanus*, *T. diana* dan *T. spectrum* dan untuk penegakan taksonominya. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) diisolasi dari biopsi jaringan masing-masing spesies *Tarsius* dengan cara diekstraksi untuk digunakan sebagai DNA cetakan dalam proses amplifikasi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Primer yang digunakan dalam penelitian ini didesain untuk mengamplifikasi gen ND4 dan dilanjutkan dengan elektroforesis. Produk PCR hasil amplifikasi yang telah dimurnikan, selanjutnya dipergunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi penentuan runutan nukleotida. Runutan nukleotida gen ND4 hasil pengurutan dilakukan penjumlahan berganda dengan primata lain yang diambil dari *Genbank* menggunakan *Clustal W*. Selain berdasarkan runutan nukleotida, gen ND4 dianalisis berdasarkan runutan asam amino dari basa-basa yang diterjemahkan mengikuti *vertebrate mitochondrial translation code* yang ada pada program MEGA versi 4.1. Konstruksi pohon filogenetika menggunakan metode *neighbor joining*. Hasil penelitian menunjukkan dari 1378 nukleotida ditemukan 119 situs yang bersifat beragam. Jarak genetika berdasarkan nukleotida gen ND4 yang dihitung menggunakan model dua parameter Kimura, terdapat nilai paling kecil 0,6%, nilai terbesar 13%, dan nilai rata-rata sebesar 6,1%. Filogram berdasarkan hasil runutan nukleotida gen ND4 yang menggunakan metode *neighbor joining*, dapat mengidentifikasi dan membedakan percabangan antar spesies *Tarsius*.

Kata kunci: *Tarsius* sp., gen ND4, nukleotida, penanda spesifik, urutan DNA

ABSTRACT

The aim of the study was to assess the genetic diversity ND4 coding genes in *Tarsius bancanus*, *T. b. borneanus*, *T. diana*, and *T. spectrum*, and to reconfirm the taxonomy of *Tarsius* sp. *Deoxyribonucleotides* (DNA) specimens were isolated from tissue biopsy of each species of *Tarsius* using DNA extraction method then used for DNA template in the amplification process by means of *polymerase chain reaction* (PCR). Primers used in this study were designed specifically to amplify ND4 gene. The PCR result was then run for electrophoresis. PCR amplification results were then purified and used as template DNA for the reaction determination sequences of nucleotide. Sequences of ND4 nucleotide gene were blasted with other primates' genes from *Genbank* using *Clustal W*. Furthermore, ND4 gene was analyzed based on amino acids sequence that were translated using *Vertebrate mitochondrial translation code* MEGA program software version 4.1 and phylogenetic tree were create using *Neighbor Joining* method. The results showed that 119 nucleotides sites out of 1378 were diverse. Genetic distance based on ND4 gene nucleotide that was calculated using Kimura two-parameter model shown the smallest value was 0.6%, while the largest value was 13%, and the average value is 6.1%. The phylogram based on the result of nucleotide sequence of ND4 genes using the *Neighbor Joining* method is useful for *Tarsius* sp. identification and distinguishing between species of *Tarsius* branch.

Key words: *Tarsius* sp., ND4 genes, nucleotide, specific markers, DNA sequence

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki kekayaan keanekaragaman hayati flora dan fauna yang melimpah dengan beragam manfaat. Fauna atau satwa liar ini ada yang tergolong langka sehingga memerlukan penanganan khusus, terutama terkait pelestariannya (Farida *et al.*, 2008). *Tarsius* sp. termasuk ke dalam kelompok primata yang mempunyai keunikan filogenetika yang sangat menarik dan menjadi perdebatan kontroversial selama beberapa dekade yang lalu. *Tarsius* sp. merupakan hewan *nocturnal faunivores* kecil yang terdapat di hutan tropis Asia Tenggara, termasuk Indonesia (Merker *et al.*, 2009).

Tarsius sp. dilindungi berdasarkan Peraturan Perlindungan Satwa Liar No. 266 tahun 1931, Undang-undang No. 5 tahun 1990, SK Menteri Kehutanan No. 301/Kpts-11/1991, dan Peraturan Pemerintah No. 7

Tahun 1999 (Supriatna, 2008). Sejak 6 Oktober 2008, *International Union for Conservation Nature and Natural Resources* (IUCN) menetapkan status konservasi *Tarsius bancanus* (*T. bancanus*) dari pulau Belitung adalah terancam punah atau *endangered* (EN) (Yustian *et al.*, 2009). Spesies *Tarsius* di pulau Sulawesi dan sekitarnya, menurut IUCN juga berstatus terancam punah (Shekelle dan Leksono, 2004). Menurut Mittermeier *et al.* (2009) spesies *T. tumpara* merupakan salah satu spesies yang termasuk ke dalam kategori satwa yang berstatus konservasi *critically endangered* (CR) atau sangat terancam punah (kritis).

Dalam upaya mengetahui asal-usul yang pasti dari *Tarsius* sp. di Indonesia dan mengetahui keragaman sumber daya genetiknya maka perlu penelaahan satwa ini lebih rinci terutama dengan pemakaian beberapa teknik modern yang telah berkembang pesat (Widayanti *et al.*, 2006). Penemuan mtDNA sebagai

marker molekuler pada akhir tahun 1970-an, dan ditemukan teknologi *polymerase chain reaction* (PCR) beberapa tahun berikutnya, merupakan kombinasi yang sangat mendukung analisis filogenetika (Zhang dan Hewitt, 1996). Schmitz *et al.* (2002) telah melakukan kajian molekuler untuk mendapatkan gambaran yang lebih menentukan ciri khas evolusi mtDNA primata, dengan membandingkan keseluruhan genom mitokondria *T. bancanus* dengan primata dan mamalia nonprimata yang lain.

Runutan nukleotida gen NADH dehidrogenase subunit 4 (ND4) dari genom mitokondria sangat efektif dalam menguji kesesuaian dan memperkirakan filogeni organisme. Gen ND4 dapat menentukan hubungan filogenetika antara *T. syrichta* dan spesies primata lainnya telah dilaporkan oleh Hayasaka *et al.* (1988), kekerabatan antar spesies monyet daun dari China (*Rhinopithecus*) (Wang *et al.*, 1997), dan antar spesies pada famili *hylobatidae* (gibbon) (Takacs *et al.*, 2005). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengkaji keragaman genetika gen ND4 pada *T. bancanus*, *T. b. borneanus*, *T. diana*, dan *T. spectrum*, dan untuk penegakan taksonominya.

MATERI DAN METODE

Tarsius sp. yang digunakan sebagai sampel sebanyak tiga *T. bancanus* berasal dari Lampung, tiga *T. b. borneanus* dari Kalimantan Barat, satu *T. spectrum* dari Sulawesi Utara dan satu *T. diana* asal Sulawesi Tengah.

Isolasi, Amplifikasi, Elektroforesis, dan Penentuan Runutan DNA

Total DNA diekstraksi dari biopsi jaringan dengan menggunakan kit QIAamp® DNA *tissue* produksi Qiagen. Total DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi dengan metode PCR mengikuti Sambrook dan Russell (2001). Primer yang digunakan dalam penelitian ini didesain berdasarkan *database* dari *Genbank*, yang selanjutnya dianalisis menggunakan *software primer3.online*. Urutan basa dan suhu penempelan primer untuk mengamplifikasi fragmen gen ND4 disajikan dalam Tabel 1.

Kemudian dilanjutkan dengan proses elektroforesis menggunakan gel *agarose* dilakukan untuk melihat hasil PCR. Produk PCR hasil amplifikasi yang telah dimurnikan, selanjutnya digunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi penentuan runutan nukleotida.

Analisis Data

Penjajaran berganda homologi runutan nukleotida gen ND4 dianalisis dengan bantuan *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1997). Selain berdasarkan runutan nukleotida, gen ND4 dianalisis berdasarkan runutan asam amino dari basa-basa yang diterjemahkan, mengikuti *vertebrate mitochondrial translation code* yang ada dalam program MEGA versi 4.1 Runutan asam amino sinonimus dianalisis secara manual berdasarkan runutan triplet kodon yang mengalami mutasi. Analisis jarak genetika menggunakan perangkat lunak MEGA versi 4.1 (Kumar *et al.*, 2001) dengan metode dua-parameter Kimura, dan analisis filogeni menggunakan metode *bootstrapped neighbor-joining* dengan 1000 kali pengulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

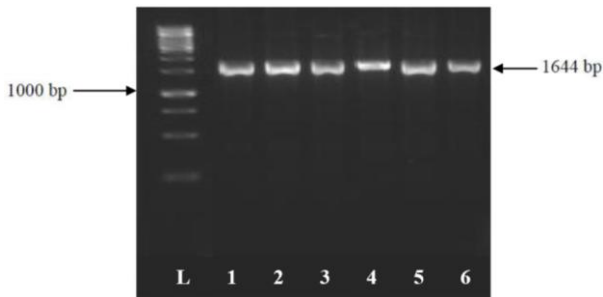
Amplifikasi daerah gen ND4 mtDNA pada *T. bancanus*, *T. b. borneanus*, *T. spectrum*, dan *T. diana*, yang berukuran 1.378 bp menggunakan primer ND4P1F, ND4P1R, ND4P2F, ND4P2R, ND4P3F, ND4P3R/P4R, dan ND4P4F. Ukuran panjang gen ND4 ini sesuai dengan Schmitz *et al.* (2002) berdasarkan runutan genom DNA mitokondria *T. bancanus*.

Gambaran DNA *Tarsius* sp. hasil amplifikasi gen ND4 dengan primer ND4P4F dan ND4P4R disajikan pada Gambar 1, sedangkan Gambaran DNA *Tarsius* sp. hasil amplifikasi dengan primer ND4P1F, ND4P1R, ND4P2F, ND4P2R, ND4P3F, ND4P3R, dan ND4P4F disajikan pada Gambar 2.

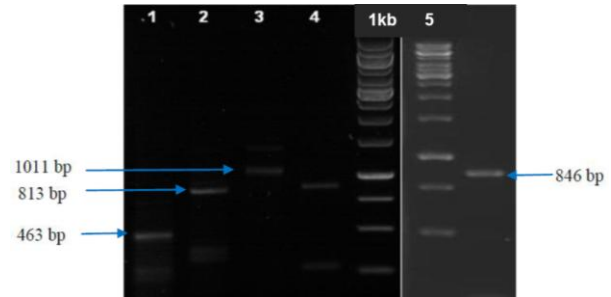
Primer ND4P1F, ND4P1R, ND4P2F, ND4P2R, ND4P3F, ND4P3R/P4R, dan ND4P4F yang dirancang berdasarkan runutan genom mtDNA *T. bancanus* (Schmitz *et al.*, 2002) berhasil mengamplifikasi DNA sepanjang 1828 bp, terdiri dari daerah gen ND4L sepanjang 277 bp (7 bp *overlap*), gen ND4 sepanjang 1.378 bp, gen tRNA^{His} 69 bp, gen tRNA^{Ser} 60 bp, gen tRNA^{Leu} 52 bp. Skema letak penempelan primer ND4P1F, ND4P1R, ND4P2F, ND4P2R, ND4P3F,

Tabel 1. Urutan basa dan suhu penempelan primer untuk mengamplifikasi gen ND4 *Tarsius* sp.

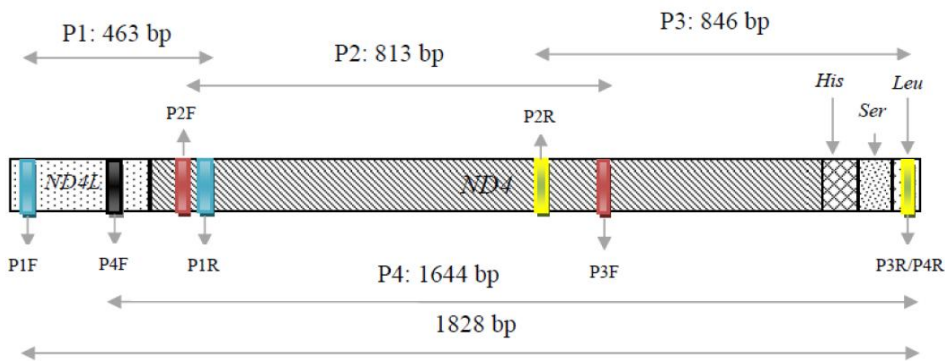
Target	Primer		Ta (°C)	Jumlah Basa
	Urutan Basa			
ND4 (P1) 463 bp	(F) 5'-ACC TCT TCC TCG CTT TCC TC-3'	(R) 5'-GGG GTG TTG ATA GGG AGT CA-3'	57° C	20 20
ND4 (P2) 813 bp	(F) 5'-ACC CTT TCC CTC CTA AAC CA-3'	(R) 5'-AGC TTC ATG GGG TTT GAA TG-3'	55° C	20 20
ND4 (P3) 846 bp	(F) 5'-CTC GGG GGA TAC GGA ATA AT-3'	(R) 5'-CAC CAA TTT TTC GGC TCC TA-3'	55° C	20 20
ND4 (P4) 1644 bp	(F) 5'-CTG CGA AGC AGC TGT AGG AT-3'	(R) 5'-CAC CAA TTT TTC GGC TCC TA-3'	56° C	20 20



Gambar 1. Gambaran DNA *Tarsius* sp. hasil amplifikasi dengan primer ND4P4F dan ND4P4R (L: DNA ladder 100 bp; Lajur 1, 2, dan 3: DNA *T. b. borneanus* hasil amplifikasi dengan primer ND4P4F- P4R (1644 bp); Lajur 4, 5, dan 6: DNA *T. bancanus* hasil amplifikasi dengan primer ND4P4F- P4R, 1644 bp)



Gambar 2. Gambaran DNA *Tarsius* sp. hasil amplifikasi dengan primer ND4P1F, ND4P1R, ND4P2F, ND4P2R, ND4P3F, ND4P3R, dan ND4P4F (Lajur 1, 2, dan 5 adalah DNA *T. spectrum* hasil amplifikasi dengan primer masing-masing sebagai berikut: ND4P1F- P1R, 463 bp; ND4P2F - P2R (813 bp), dan ND4P3F- P3R (846 bp). Lajur 3 dan 4 adalah DNA *T. diana*e hasil amplifikasi dengan primer masing-masing sebagai berikut: ND4P4F- P2R (1011 bp), dan ND4P3F- P3R, 846 bp)



Gambar 3. Skema letak penempelan primer ND4P1F, ND4P1R, ND4P2F, ND4P2R, ND4P3F, ND4P3R/P4R, dan ND4P4F serta daerah gen ND4 yang diamplifikasinya

ND4P3R/P4R, dan ND4P4F serta daerah gen ND4 yang diamplifikasinya disajikan pada Gambar 3.

Hasil penjarangan berganda runutan nukleotida gen ND4 pada *Tarsius* sp. hasil penelitian dan *T. bancanus* (Genbank) yang digunakan sebagai pembandingan didapatkan nukleotida yang berbeda. Matriks perbedaan nukleotida pada gen *ND4* *Tarsius* sp. dan jarak genetika nukleotidanya disajikan pada Tabel 2. Perbedaan nukleotida tertinggi terdapat antara *T. bancanus* (Genbank) dan *T. spectrum* yaitu 160 nukleotida (13%), dan yang terendah adalah 8 nukleotida (0,6%) terdapat antara *T. bancanus* dan *T. b. borneanus*. Perbedaan nukleotida rata-rata antar *Tarsius* sp. hasil penelitian dan *T. bancanus* (Genbank) sebagai pembandingan adalah 78,5 nukleotida (6,1%).

Tabel 2. Matriks perbedaan nukleotida pada gen *ND4* *Tarsius* sp. (di bawah diagonal) dan jarak genetika nukleotidanya (di atas diagonal) menggunakan metode dua-parameter Kimura pada program MEGA versi 4.1

No.	1	2	3	4	5	6
1		0,068	0,067	0,130	0,067	0,211
2	88		0,006	0,087	0,010	0,199
3	86	8		0,087	0,010	0,200
4	160	112	112		0,080	0,232
5	87	14	14	104		0,203
6	244	233	234	266	237	

1. *T. bancanus* (Genbank), 2. *T. bancanus*, 3. *T. b. borneanus*, 4. *T. spectrum*, 5. *T. diana*e, 6. *T. syrichta* (Genbank)

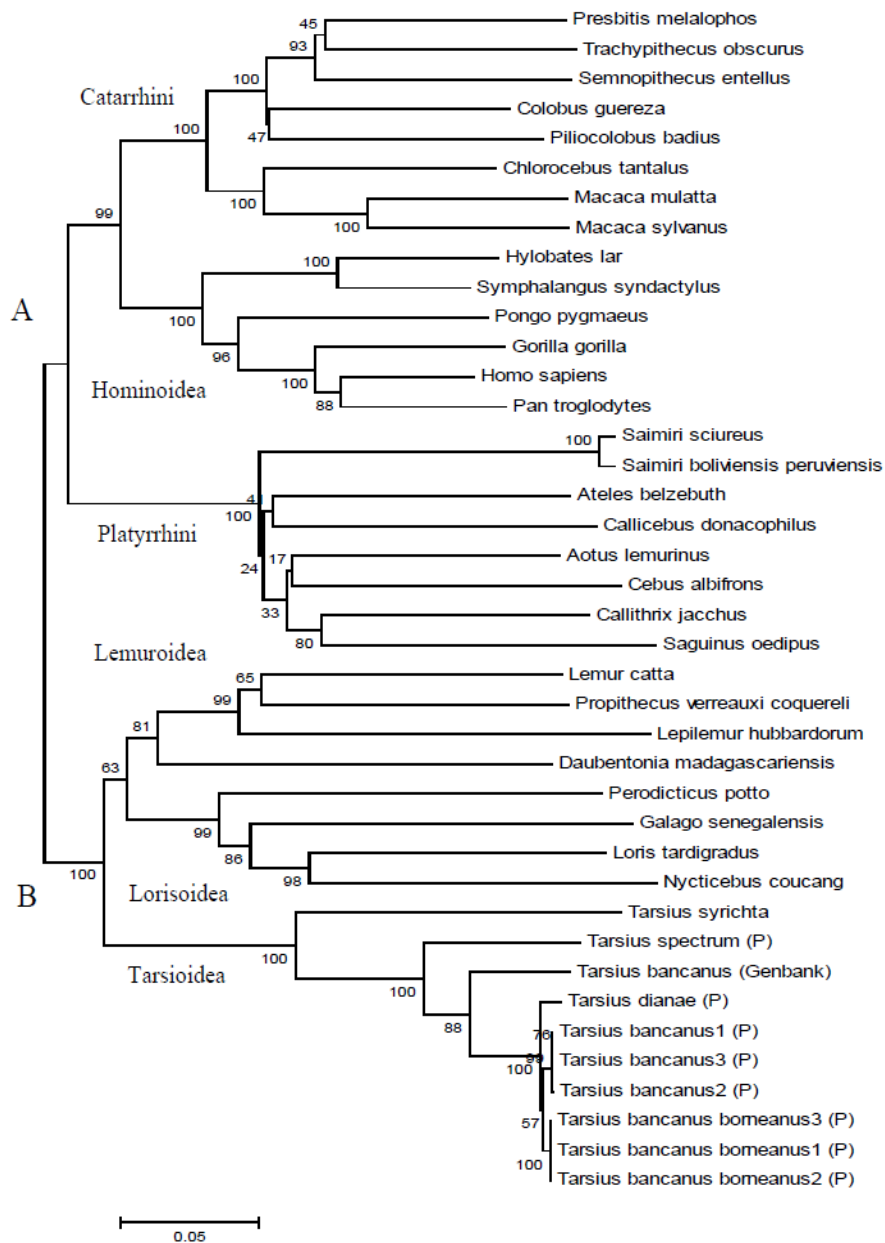
Rata-rata komposisi nukleotida diperoleh basa T(U) 30%, C 27%, A 33,3%, dan G 9,7%, serta A+T (63,3%) lebih banyak daripada G+C (36,7%). Data ini didukung oleh penelitian Li dan Zhang (2005) bahwa komposisi basa mtDNA hewan menunjukkan basa G paling sedikit jumlahnya diantara semua basa nukleotida, yaitu G= 4,5-18,2%, A= 25,9-45,4%, C= 24,5-34,5%, dan T= 20,7-31,5%. Keragaman pada komposisi nukleotida biasanya teramati pada posisi kodon sinonimus. Namun jika perubahan pada posisi kodon sinonimus dan nonsinonimus dipengaruhi oleh variasi komposisi pada tingkat nukleotida, maka protein akan mengubah komposisi asam aminonya. Komposisi asam amino pada primata yang lebih tinggi tingkatannya, mempunyai kecenderungan lebih besar terhadap asam amino yang basa kodonnya G+C, sedangkan *Tarsius* dan *Loris* cenderung seperti nonprimata, komposisi asam amino yang basa kodonnya A+T (Schmitz *et al.*, 2002).

Basa nukleotida gen *ND4* *Tarsius* sp. hasil penelitian sebanyak 1378 nukleotida, ditemukan 119 situs nukleotida yang bersifat beragam, sedangkan jika dilakukan perbandingan dengan *T. bancanus* (Genbank), ditemukan 184 situs nukleotida yang bersifat beragam. Keragaman sebanyak 119 situs nukleotida tersebut paling sering terjadi substitusi pada basa ketiga dari *triplet* kodon yaitu sebanyak 76 kali; basa kesatu dari *triplet* kodon sebanyak 34 kali; basa kesatu dan ketiga

triplet kodon sebanyak 9 kali; basa kedua *triplet* kodon sebanyak 9 kali; dan basa kesatu, kedua, ketiga dari *triplet* kodon sebanyak 2 kali. Analisis terhadap 459 asam amino ditemukan 305 asam amino kekal (nukleotida tidak mengalami substitusi), 115 asam amino sinonimus (nukleotida mengalami substitusi namun asam aminonya tetap), dan 39 asam amino non sinonimus (nukleotida dan asam aminonya berubah). Cracraft dan Helm-Bychowski (1991) menyatakan bahwa kecepatan transisi pada mtDNA vertebrata lebih tinggi daripada transversi, dan adanya perubahan komposisi basa atau substitusi pada kodon posisi ketiga lebih umum terjadi dibandingkan posisi pertama dan kedua.

Hubungan kekerabatan antar *Tarsius* sp. dapat dianalisis dengan menggunakan metode *neighbor joining* terhadap 1378 basa nukleotida yang menyusun gen ND4. Data runutan nukleotida spesies pembandingan

diambil dari Genbank. Filogram dari nukleotida gen ND4 *Tarsius* sp. dan beberapa spesies primata lain disajikan pada Gambar 3. Filogram yang dihasilkan dari nukleotida gen ND4 menggambarkan antara *T. spectrum*, *T. bancanus* (Genbank), *T. diana*, *T. bancanus*, dan *T. b. borneanus* membentuk cabang yang terpisah, yang membedakan hanya dukungan nilai *bootstrap*-nya. Percabangan antara *T. spectrum* dan spesies *Tarsius* lain (*T. bancanus* (Genbank), *T. diana*, *T. bancanus*, dan *T. b. borneanus*) didukung oleh nilai *bootstrap* (100%). Berdasarkan nukleotida *T. bancanus* (Genbank) terpisah dengan *T. diana*, *T. bancanus*, dan *T. b. borneanus* didukung oleh nilai *bootstrap* (88%). Percabangan antara *T. diana* dan *T. bancanus* dan *T. b. borneanus* didukung oleh nilai *bootstrap* (100%), serta antara *T. bancanus* dan *T. b. borneanus* didukung oleh nilai *bootstrap* (57%).



Gambar 3. Filogram menggunakan metode *Neighbor joining* dari nukleotida gen ND4 (1378 nt) *Tarsius* sp. dan beberapa spesies primata lain (A= Haplorhini, B= Strepsirhini)

Berdasarkan analisis filogram di atas menunjukkan bahwa *T. diana* lebih dekat kekerabatan dengan *T. bancanus* terutama *T. b. borneanus*, dibandingkan dengan *T. spectrum*. Hal ini sesuai dengan pendapat Hall (2001) bahwa penyebaran spesies *Tarsius* di pulau Sulawesi berasal dari Kalimantan melalui daratan penyeberangan di Selat Makassar, dan bahwa pulau Sulawesi pada masa Miosen (20-5 juta tahun yang lalu) sampai dengan Pleistosen (1 juta tahun yang lalu) merupakan bagian dari Sundaland, Australia, dan bagian yang timbul dari dasar laut. *Tarsius* Sulawesi terpisah dari spesies *Tarsius* Sundaland dan menyebar ke Sulawesi Selatan atau Barat pada 11 juta tahun yang lalu melalui suatu daratan penghubung (Merker *et al.*, 2009). Kemungkinan *T. diana* menyebar dari Kalimantan ke Sulawesi lebih terakhir (mendekati masa pemisahan Sulawesi dari Sundaland) dibandingkan *T. spectrum* yang terlebih dahulu tersebar di Sulawesi.

Menurut Napier dan Napier (1983) berdasarkan morfologi, sampai saat ini *Tarsius* masih menjadi perdebatan termasuk subordo prosimian (kelompok primata kecil) atau intermediet (di pertengahan) antara subordo anthropoidea (kelompok primata besar) dan prosimian (Strepsirhini) karena menunjukkan ciri-ciri di antara keduanya. Ciri-ciri yang sama dengan prosimian adalah *nocturnal*, mata besar, telinga dapat digerakkan, mempunyai "toilet claw" pada jari kaki kedua dan ketiga, serta mandibula tersusun dari dua tulang. Ciri-ciri yang sama dengan anthropoidea tanpa permukaan rhinarium yang jelas, tanpa "dental comb", cermin hidung kering, gigi seri bawah menghadap ke atas, dan plasenta hemokorial. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini, filogram berdasar urutan nukleotida ND4 menempatkan *Tarsius* sp. ke dalam subordo prosimian (Strepsirhini). Hasil ini sama seperti penelitian yang telah dilakukan Widayanti *et al.* (2006) dengan menggunakan gen Cyt b, dan Musser dan Dagosto (1987) berdasarkan data morfologi. Hasil ini berbeda dengan pendapat Groves (1998) yang secara morfologi spesies *Tarsius* masuk ke dalam subordo Haplorhini.

Hubungan filogenetika dari spesies *Tarsius* meninggalkan ketidakjelasan. Berdasarkan data fosil berupa gigi dan hubungan pengaturan saraf primitif dari spesies *Tarsius* hidup, dinyatakan *Tarsius* sp. termasuk dalam subordo Prosimii (Lemur dan Loris). Data molekuler dan perbandingan anatomi, *Tarsius* sp. termasuk ke dalam Anthropoidea dan bersubordo Haplorhini. Ada beberapa kemungkinan hubungan kekerabatan *Tarsius* sp. Di dalam kelompok primata, yaitu pertama, *Tarsius* sp. berkerabat dekat dengan lemur dan loris, dan karenanya primata terbagi ke dalam prosimii (Loris, Lemur, dan *Tarsius* sp.) dan anthropoidea (Platyrrhini, monyet dunia baru dan Catarrhini, monyet dunia lama). Kedua, membentuk tiga garis keturunan, yaitu *Tarsius* sp., Loris + Lemur, dan Anthropoidea. Ketiga, membentuk dua cabang yaitu Strepsirhini (Lemur, Loris) dan Haplorhini (*Tarsius* sp. dan Anthropoidea) (Shoshani *et al.*, 1996). Berdasarkan 3 kemungkinan pengelompokan ordo primata tersebut, maka *Tarsius* sp. pada penelitian ini

termasuk dalam kelompok pertama, yaitu spesies *Tarsius* berkerabat dekat dengan famili Lemuridae dan Lorisidae, subordo Prosimii (Strepsirhini).

KESIMPULAN

Urutan gen ND4 *Tarsius* sp. terdapat keragaman pada basa nukleotida dan asam aminonya. Urutan gen ND4 *Tarsius* sp. dapat dijadikan sebagai penanda genetika dan dapat digunakan untuk menegakkan taksonominya.

DAFTAR PUSTAKA

- Cracraft, J. and K. Helm-Bychowski. 1991. Parsimony and Phylogenetic Inference Using DNA Sequences: Some Methodological Strategies. In **Phylogenetic Analysis of DNA Sequences**. M. Miyamoto and J. Cracraft (Eds.), Oxford Univ. Press, New York.
- Farida, W.R., K.K. Wardani, A.S. Tjakraadidjaja, dan D. Diapari. 2008. Konsumsi dan penggunaan pakan pada *Tarsius (Tarsius bancanus)* betina di penangkaran. **Biodiversitas**. 9(2):148-151.
- Groves, C. 1998. Systematics of tarsiers and lorises. **Primates**. 39(1):13-27.
- Hall, R. 2001. Cenozoic Reconstructions of SE Asia and the SW Pacific: Changing Patterns of Land and Sea. In **Faunal and Floral Migrations and Evolution in SE Asia-Australia**. Metcalfe I., J.M.B. Smith, M. Morwood, and I.D. Davidson (Eds.). A.A. Swets and Zeitlinger, Lisse.
- Hayasaka, K., T. Gojobori, and S. Horai. 1988. Molecular phylogeny and evolution of primate mitochondrial DNA. **Mol. Biol. Evol.** 5(6): 626-644.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. **Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 2.0**. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University, Pennsylvania.
- Li, Q. and Y. Zhang. 2005. Phylogenetic relationships of the macaques (Cercopithecidae: *Macaca*), inferred from mitochondrial DNA sequences. **Biochem. Gen.** 43:375-386.
- Merker, S., C. Driller, D. Perwitasari-Farajallah, J. Pamungkas, and H. Zischler. 2009. Elucidating geological and biological processes underlying the diversification of Sulawesi tarsiers. **PNAS**. 106(21):8459-8464.
- Mittermeier, R.A., J. Wallis, A.B. Rylands, J.U. Ganzhorn, J.F. Oates, E.A. Williamson, E. Palacios, E.W. Heymann, M.C.M. Kierulff, L. Yongcheng, J. Supriatna, C. Roos, S. Walker, L. Cortes-Ortiz, and C. Schwitzer. 2009. Primates in peril: The world's 25 most endangered primates 2008-2010. **Primate Conservation**. (24):1-57.
- Musser, G.G. and M. Dagosto. 1987. The identity of *Tarsius pumilus*, a pygmy species endemic to the montane mossy of Central Sulawesi. **Am. Museum. Novitates**. 2867:1-53.
- Napier, J.R. and P.H. Napier. 1983. **The Natural History of the Primates**. British Museum (Natural History). Cromwell Road, London.
- Sambrook, J. and D.W. Russel. 2001. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schmitz, J., M. Ohme, and H. Zischler. 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. dan S.M. Leksono. 2004. Strategi konservasi di pulau Sulawesi dengan menggunakan *Tarsius* sebagai flagship spesies. **Biota**. IX(1):1-10.
- Shoshani, J., C.P. Groves, E.L. Simons, and G.F. Gunnell. 1996. Primate phylogeny: morphological vs molecular results. **Mol. Phylogenet. Evol.** 5:102-154.
- Supriatna, J. 2008. **Melestarikan Alam Indonesia**. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Takacs, Z., J.C. Morales, T. Geissmann, and D.J. Melnick. 2005. A complete species-level phylogeny of the *Hylobatidae* based on

- mitochondrial ND3-ND4 gene sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** 36:456-467.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1997. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, Position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Res.** 22:4673-4680.
- Wang, W., M.R.J. Forstner, Y. Zhang, Z. Liu, Y. Wei, H. Huang, H. Hu, Y. Xie, D. Wu, and D.J. Melnick. 1997. A Phylogeny of Chinese leaf monkeys using mitochondrial ND3-ND4 gene sequences. **Int. J. Primatol.** 18(3):305-320.
- Widayanti, R., D.D. Solihin, D. Sajuthi, dan D. Perwita. 2006. Kajian penanda genetik gen *Cytochrome B* pada *Tarsius sp.* **J. Sain Vet.** 24(1):1-8.
- Yustian, I., S. Merker, dan M. Muehlenberg. 2009. Luas daerah jelajah dan estimasi kepadatan populasi *Tarsius bancanus saltator* di pulau Belitung. **J. Biol. Indon.** 5(4):411-421.
- Zhang, D. and G.M. Hewitt. 1996. Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. **Tree.** 11(6):247-251.