

The Characterization of Beta Chain Fibrinogen (FGB) Gene From Maleo (Macrocephalon Maleo S. Muller 1846) Tuva Village Gumbasa Sub-District Sigi Regency Central Sulawesi

*Zakiah Zulfitri Syam, I Made Budiarsa, & Astija

Pendidikan Sains Program Magister/Pascasarjana – Universitas Tadulako, Palu – Indonesia 94119

Email corresponding author: zakiahsyam@gmail.com

Article History

Received 05 September 2019

Revised 09 October 2019

Accepted 29 November 2019

Keywords:

Characterization, maleo,
Macrocephalon, FGB gene

Abstract

The FGB gene is a gene that plays a role in synthesizing b-fibrinogen proteins and is often used as a molecular marker because it is useful for studying bird phylogenetics. The purpose of this study was to describe the character sequences of the FGB gene in Maleo birds (Macrocephalon maleo S. Muller 1864). This study uses laboratory exploratory methods. Alignment is done using the MEGA6 program (Clustal W). Phylogeny trees are constructed based on the Neighbor-Joining algorithm and the Juke-Cantor evolution model of the MEGA6 program. The sample in this study was 0.3 ml of blood from Maleo birds and members of the Megapodiidae group species used as a comparison. The results of this study indicate the length of the FGB 576 bp sequence and was identified with a base composition of 32.2% A, 30.4% T, 17.0% C and 20.3% G. Nucleotide composition of the sequence of Adenine-rich FGB genes. Analysis of the FGB gene sequence phylogeny tree produced a tree topology that was quite good and had the power to split at the interspecies level and place the maleo bird in its own line compared to other Megapoda genera.

doi: 10.22487/j25490192.2019.v3.i2.pp.94-100

Pendahuluan

Daratan Sulawesi memegang peranan penting dalam sejarah alam karena merupakan pulau terbesar di kawasan Wallacea (Suroyo, 2011). Sebagai pulau terbesar, Sulawesi dipandang dapat mewakili keanekaragaman hayati sehingga menjadi kawasan penting dalam berbagai penelitian biogeografi dan kepentingan konservasi biologi karena tingkat endemisitas spesiesnya yang tinggi terutama spesies burung (Sumarto & Tallei, 2010). Coates (2000) melaporkan bahwa 244 jenis burung penetap yang ditemukan di pulau Sulawesi ada 41 jenis burung endemik. Salah satu burung endemik dan terkenal di Sulawesi adalah burung Maleo (*Macrocephalon maleo*).

Burung maleo merupakan salah satu burung endemik yang jumlah populasinya mengalami penurunan yang tajam sehingga tindakan penyelamatan perlu dilakukan (Sugianto, 2010). Hilangnya habitat alami disebabkan karena kegiatan penebangan hutan (logging), perburuan telur dan dagingnya serta faktor predator alami turut mempengaruhi keberadaan spesies ini (Ahmad, 2014). Sehubungan dengan masalah tersebut perlu

dilakukan tindakan untuk membantu melestarikan populasi burung Maleo melalui konservasi baik secara in situ maupun ex situ (Yuriadi, 2009).

Dalam upaya konservasi burung Maleo secara in situ dibutuhkan informasi genetik karena informasi tersebut memiliki kontribusi penting dalam taksonomi dan kegiatan konservasi (Supriatna dkk, 2008). Informasi data genetik suatu spesies dapat dijadikan landasan untuk tujuan konservasi dimasa mendatang berupa database genetik yang dapat dijadikan sebagai pedoman konservasi (Budiarsa, 2013). Pemahaman dan informasi karakter genetik burung tersebut di alam melalui serangkaian kegiatan penelitian adalah salah satu bentuk dukungan upaya konservasi burung Maleo.

Hasil penelitian dan kajian tersebut selanjutnya dapat dijadikan acuan dalam pengelolaan dan pengembangan penangkaran burung oleh pihak-pihak yang berkompeten, berguna untuk identifikasi spesies, analisis distribusi genetik, evaluasi hubungan habitat, pemantauan perubahan variabilitas genetik dan investigasi kemungkinan respon adaptasi terhadap perubahan iklim (Hamid, dkk., 2016). Informasi karakter dari

sekuen gen fibrinogen beta chain (FGB) pada burung Maleo masih sangat terbatas, Sehingga penelitian perlu dilakukan untuk melengkapi data genetik burung Maleo selanjutnya informai tersbut dapat digunakan sebagai panduan dalam konservasi.

Metode dan Material

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif eksploratif. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan pendekatan molekuler dan teknik bioinformatika secara deskriptif kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui informasi mengenai karakter sekuen gen FGB pada burung Maleo. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei 2018 sampai September. Sampel darah burung maleo diambil di penangkaran Saluki Desa Tuva Kecamatan Gumbasa, Kabupaten Sigi, Sulawesi Tengah. Lokasi ini adalah kawasan Taman Nasional Lore Lindu (TNLL) dan merupakan habitat alami burung maleo.

Jenis data penelitian adalah kualitatif data primer yang dikumpulkan secara langsung dari hasil analisis sequencing gen FGB. Data sekunder adalah data sekuen gen FGB yang diunduh dari GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) sebagai data pembandingan dan data pendukung lainnya yang diperoleh dari artikel ilmiah, jurnal, dan buku serta referensi lainnya yang mendukung penelitian ini.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600 dengan kondisi sebagai berikut: 3 menit pre-denaturasi pada suhu 94 °C, diikuti dengan 35 siklus antara lain 40 detik denaturasi pada suhu 94 °C, 30 detik annealing pada suhu 52 °C, 45 detik perpanjangan pada suhu 72 °C diikuti dengan perpanjangan waktu terakhir selama 7 menit pada suhu 72 °C. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen Amplifikasi fragmen FGB menggunakan primer universal dengan sekuen sebagai berikut: Fib5 (Forward):

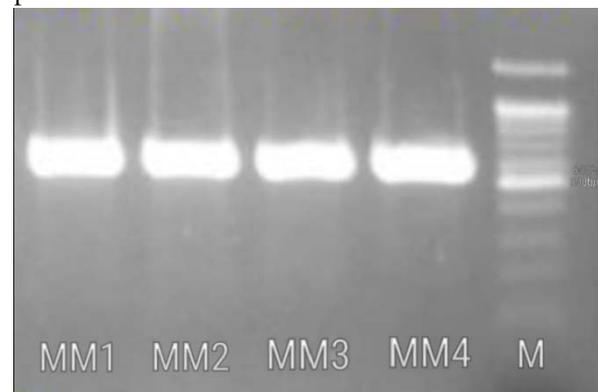
5"CGCCATACAGAGTATACTGTGACAT3"
 dan
 (Reverse):5"GCCATCCTGGCGATTCTGAA3"
 (Kimball, dkk. 2009).

Dalam penelitian ini data sekuen yang diperoleh dan data dari NCBI akan dianalisis menggunakan program software Clustal W. Data sekuen gen FGB famili Megapodiidae dari International Database (DNA Data Bank of Japan dan NCBI) diedit dengan program MEGA6 dan digunakan sebagai pembandingan dengan burung Maleo untuk di alignment dengan program Clustal W. Kemudian data sekuen dianalisis menggunakan program MEGA6 untuk mengkarakterisasi genetiknya.

Hasil dan Pembahasan

Amplifikasi Sekuen Gen Fibrinogen Beta Chain (FGB)

Visualisasi DNA hasil amplifikasi menggunakan primer Forward Fib5 dan Reverse Fib 6 disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi DNA sekuen gen FGB hasil amplifikasi berukuran 576bp.

Ket M = Marker (promega)

MM (1-4) = pita sampel burung Maleo

Amplifikasi daerah gen FGB pada sampel penelitian burung Maleo menggunakan primer forward Fib5 dan primer reverse Fib6 menghasilkan pita DNA tunggal berukuran 576 bp. Ukuran pita DNA yang diperoleh sesuai dengan penjelasan Birks dan Edwards (2002) yaitu ukuran nukleotida pada Gallus gallus adalah sebesar ±500 bp. Visualisasi DNA hasil amplifikasi pada Gambar 1. memperlihatkan pita FGB tampak tebal dan dapat teramplifikasi dengan baik hal ini menunjukkan kondisi PCR yang optimal tercapai sehingga proses PCR dapat berlangsung dengan baik dan dapat diproses pada tahap selanjutnya yaitu sequencing. Hasil analisis BLAST dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis BLAST perbandingan sekuen gen Fibrinogen Beta Chain (FGB) pada burung maleo dengan pembandingan dari GenBank

No.	Pembandingan (<i>GenBank</i>)	Acc. Number	Homologi	E-value	Query
1	<i>Macrocephalon maleo</i>	KF833727.1	99%	0.0	100%
2	<i>Aepyodius arfakianus</i>	KF833699.1	92%	0.0	100%
3	<i>Aepyodius bruijnii</i>	KF833700.1	92%	0.0	100%
4	<i>Alectura lathami</i>	KF833720.1	92%	0.0	100%
5	<i>Eulipoa wallacei</i>	KF833750.1	96%	0.0	100%
6	<i>Leipoa ocellata</i>	KF833729.1	91%	0.0	100%
7	<i>Megapodius decollatus</i>	KF833701.1	96%	0.0	100%
8	<i>Numida meleagris</i>	KF833703.1	97%	0.0	100%
9	<i>Megapodius forstenii</i>	KF833706.1	96%	0.0	100%
10	<i>Megapodius geelvinkianus</i>	KF833712.1	96%	0.0	100%
11	<i>Megapodius laperouse</i>	KF833714.1	97%	0.0	100%
12	<i>Megapodius layardi</i>	KF833725.1	96%	0.0	100%
13	<i>Megapodius reinwardt</i>	KF833739.1	96%	0.0	100%
14	<i>Megapodius tenimberensi</i>	KF833747.1	95%	0.0	100%
15	<i>Megapodius pritchardii</i>	KF833733.1	96%	0.0	100%
16	<i>Megapodius freycinet</i>	KF833708.1	96%	0.0	100%
17	<i>Talegalla fuscirostris</i>	KF833711.1	93%	0.0	100%
18	<i>Talegalla jobiensis</i>	KF833713.1	93%	0.0	100%

Nukleotida burung Maleo pada penelitian ini berukuran 576 bp jika disejajarkan dengan burung Maleo GenBank merujuk pada data yang terdapat pada Tabel 1, diperoleh nilai homologi tertinggi gen FGB burung Maleo dengan tingkat kesamaan (homologi) yaitu 99%. Hal ini menunjukkan bahwa benar sampel dalam penelitian adalah identik dengan burung Maleo dari GenBank karena memiliki kekerabatan yang sangat dekat. Nilai homologi pada kisaran 90%-96% yang terjadi pada

sampel penelitian dengan pembandingan dari GenBank menunjukkan kekerabatan yang dekat antara spesies sampel penelitian dengan spesies pembandingan tersebut.

Komposisi Nukleotida

Hasil analisis basa nukleotida menggunakan software MEGA6 pada sekuen gen FGB burung Maleo dan beberapa spesies anggota famili Megapodiidae disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi basa nukleotida burung maleo dan beberapa spesies anggota famili Megapodiidae dengan menggunakan software MEGA6.

No.	Sampel dan Kode Akses <i>GenBank</i>	Kandungan Basa Nitrogen				T+A (%)	G+C (%)	Total Basa (bp)
		T	C	A	G			
1	<i>Macrocephalon maleo</i>	30,6	16,6	32,4	20,3	63,0	37,0	576
2	<i>Maleo1</i>	30,4	17,0	32,2	20,3	62,6	37,4	576
3	<i>Maleo2</i>	30,4	17,0	32,2	20,3	62,6	37,4	576
4	<i>Aepyodius arfakianus</i>	29,8	16,6	32,6	21,0	62,4	37,6	576
5	<i>Aepyodius bruijnii</i>	30,1	16,8	32,1	21,0	62,2	37,8	576
6	<i>Alectura lathami</i>	30,2	16,4	32,2	21,2	62,5	37,5	576
7	<i>Eulipoa wallacei</i>	30,4	17,7	30,4	21,6	60,7	39,3	576
8	<i>Leipoa ocellata</i>	29,9	16,9	32,6	20,7	62,4	37,6	576
9	<i>Megapodius decollates</i>	31,0	16,3	32,7	20,0	63,7	36,3	576
10	<i>Numida meleagris</i>	31,6	17,1	34,1	17,2	65,7	34,3	576
11	<i>Megapodius forstenii</i>	30,6	16,1	32,9	20,3	63,6	36,4	576
12	<i>Megapodius geelvinkianus</i>	30,4	20,4	27,9	21,3	58,3	41,7	576
13	<i>Megapodius laperouse</i>	30,6	16,5	32,4	20,5	63,0	37,0	576
14	<i>Megapodius layardi</i>	31,0	15,8	32,8	20,6	63,0	37,0	576
15	<i>Megapodius reinwardt</i>	30,5	16,3	32,9	20,3	63,4	36,6	576
16	<i>Megapodius tenimberensi</i>	30,5	17,0	32,3	20,2	62,8	37,2	576

17	<i>Megapodius pritchardii</i>	31,0	16,1	32,7	20,1	63,7	36,3	576
18	<i>Megapodius freycinet</i>	31,0	16,3	32,7	20,0	63,7	36,6	576
19	<i>Talegalla fuscirostris</i>	31,0	16,0	30,7	22,2	61,7	38,3	576
20	<i>Talegalla jobiensis</i>	29,5	17,3	30,4	22,9	59,9	40,1	576
	Rata-rata	31,0	16,8	32,3	20,0	63,4	36,6	

Ket. : Basa Nukleotida

= T (Timin), C (Sitosin), A (Adenin) dan G (Guanin)

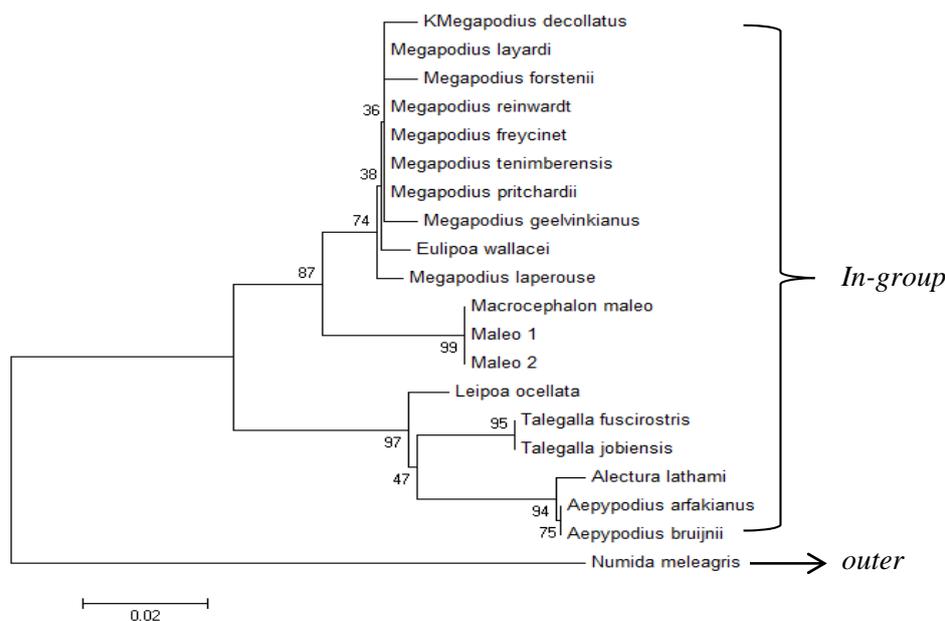
Ket. : Basa Nukleotida = T (Timin), C (Sitosin), A (Adenin) dan G (Guanin).

Berdasarkan Tabel 2 Komposisi A+T paling rendah ditemukan pada *Megapodius geelvinkianus* (58,3%) dan *Talegalla jobiensis* (59,9%) dan paling tinggi pada *Numida meleagris* (65,7%). Sebaliknya, kandungan G+C paling tinggi pada *Megapodius geelvinkianus* (41,7%) dan *Talegalla jobiensis* (40,1%) dan paling rendah pada *Numida meleagris* (34,3%). Menurut Chalikian dkk. (1999), kandungan A+T dan G+C menunjukkan tingkat kestabilan antar ikatan untai heliks ganda DNA. Kandungan G+C yang tinggi memiliki interaksi

antar untai yang kuat karena G+C memiliki ikatan hidrogen rangkap tiga, sedangkan kandungan A+T yang tinggi memiliki interaksi antar untai yang rendah karena A+T memiliki ikatan hidrogen rangkap dua.

Rekonstruksi Pohon Filogenetik

Rekonstruksi pohon filogenetik gen FGB menggunakan software MEGA6 dari beberapa spesies anggota famili Megapodiidae dapat dilihat pada Gambar 2.



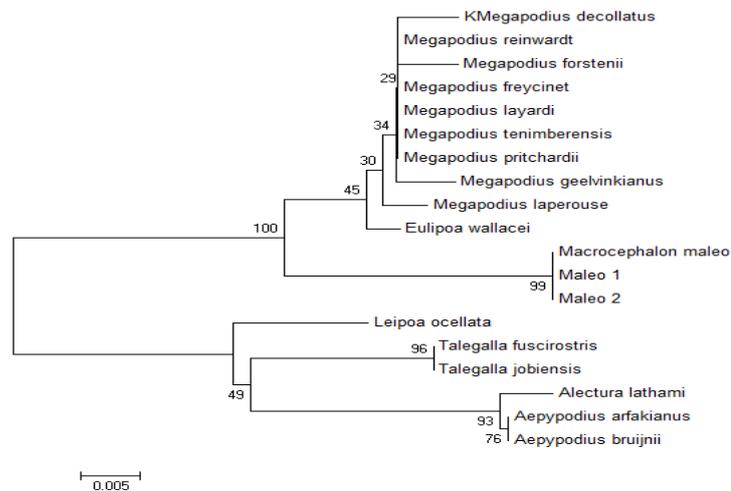
Gambar 2. Pohon filogenetik berdasarkan gen FGB antara burung Maleo dan beberapa spesies pembandingan Megapoda dengan kelompok outgroup menggunakan Neighbor-Joining dan model Juke-Cantor.

Dari **Gambar 2**, terlihat bahwa *Numida meleagris* tampak memisah dengan clade ingroup Megapodiidae karena jauh kekerabatannya dan merupakan kelompok outgroup yang berperan untuk menyempurnakan topologi pohon filogeni. Sedangkan Genus *Megapodius*, *Macrocephalon*, *Eulipoa*, *Leipoa*, *Talegalla*, *Alectura* dan *Aepyodius* bergabung membentuk clade tersendiri karena merupakan ingroup Megapoda.

Kestabilan pohon filogenetik dapat diuji kembali dengan rekonstruksi tanpa adanya outgroup yang disajikan dalam Gambar 3.

Fibrinogen adalah protein yang terlibat dalam pembekuan darah yang terdiri dari dua sub-unit yakni sub-unit α dan sub-unit β . Fibrinogen sub-unit β memiliki delapan ekson dan tujuh intron. Terdapat salinan tunggal setiap gen kedua sub-unit fibrinogen pada genom vertebrata bahkan pada

vertebrata primitif sekalipun (Prychitko & Moore, 1997).



Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan gen FGB antara burung Maleo dan beberapa spesies pembanding Megapode tanpa outgroup menggunakan Neighbor-Joining dan model Juke-Cantor.

Ini yang menjadi landasan pemilihan sekuen gen FGB dalam penelitian ini karena gen β -fibrinogen dapat digunakan dalam kajian karakter genetik burung.

Visualisasi hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 1, dimana pada gambar tersebut terlihat hasil amplifikasi sampel terbentuk pola pita (band) yang baik, hal ini menunjukkan bahwa suhu annealing ini sesuai dengan primer yang diberikan sehingga proses amplifikasi PCR berhasil hal ini dibuktikan pada gambar terlihat telah terbentuk pita tunggal dengan ketebalan pita yang berbentuk sangat tebal. Ketebalan tersebut menandakan konsentrasi yang tinggi dari proses pemurnian. Penebalan dimulai dari tingkat 500bp hingga mendekati 600bp dan jika dianalisis panjang sekuen tersebut sebesar 576bp.

Pada penelitian ini diperoleh hasil BLAST sekuen gen FGB dari sampel burung Maleo menunjukkan kekerabatan yang tinggi atau sangat dekat dengan burung Maleo yang berasal dari GenBank hal ini ditunjukkan dengan perolehan nilai homologi 99%. Hal ini menunjukkan bahwa sekuen gen yang diteliti dalam penelitian ini identik dan perbedaan nukleotida sampel dengan anggota Megapodia lainnya bisa digambarkan pada hasil analisis BLAST sekuen gen FGB dari hasil yang diperoleh, 1% ketidakcocokan karena ada basa nitrogen yang berbeda antara sampel dan burung Maleo dari GenBank yakni pada basa Nitrogen yang ke5 pada sampel terjadi mutasi titik yakni

delesi. Tetapi karena gen FGB merupakan intron yang tidak menghasilkan asam amino maka hal ini tidaklah berpengaruh dalam pembentukan asam amino.

Dari data komposisi nukleotida disajikan pada Tabel 2 yang diolah dengan software MEGA6 terlihat bahwa baik burung Maleo sampel maupun burung Maleo dari GenBank memiliki komposisi basa nukleotida selisih perbedaan 0,2 - 0,4%. Adapun runutan frekuensi komposisi nukleotida yang berukuran 576 bp antara lain kandungan Adenin 32,2%, Timin 30,4%, Citosin 17,0% dan Guanin 20,3%. Gen FGB pada burung maleo yang diperoleh kaya akan kandungan Adenin dan miskin akan kandungan Citosin. Perbandingan kandungan basa A+T (62,6 %) pada gen FGB burung maleo lebih tinggi dibandingkan kandungan G+Cnya (37,4 %). Hasil tersebut sesuai pendapat Dimcheff dkk. (2002) dan Uddin dkk. (2015) bahwa Aves memiliki komposisi kandungan basa A+T lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan G+Cnya pada gen FGB. Untuk beberapa anggota Megapoda yang lain, proporsi basanya tidak jauh berbeda dengan proporsi basa pada burung Maleo sampel, hal ini berarti bahwa probabilitas substitusi nukleotida gen FGB cenderung seragam.

Filogenetik direkonstruksi menggunakan software MEGA6 model menggunakan metode Neighbor-Joining model Juke-Cantor dengan Bootstrap 1000x ulangan terhadap runutan nukleotida dan asam amino dari gabungan data

sampel dan data spesies lain yang didownload dari Genbank. Pada pohon filogenetik 2 terlihat gen FGB burung Maleo sampel dan burung maleo GenBank membentuk cabang tersendiri begitu pula dengan spesies pembanding membentuk cabang tersendiri. Nilai bootstrap ditunjukkan pada angka yang terletak pada cabang-cabang pohon filogenetik. Menurut Zein dan Sulandari (2008) nilai bootstrap menjadi tolak ukur penentu tingkat kepercayaan pohon filogeni.

Berdasarkan hasil pohon filogenetik yang diperoleh menggambarkan bahwa sampel burung Maleo penelitian dan burung Maleo dari GenBank berada dalam satu clade dengan nilai bootstrap 99%, hal ini menunjukkan burung Maleo ini identik. Jika dibandingkan dengan kelompok ingroupnya, kedua sampel penelitian memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan kelompok genus *Megapodius*.

Dari analisis pohon filogenetik, kelompok outgroup yang terdiri dari *Numida meleagris* yang berkerabat sangat jauh dengan kedua sampel penelitian terpisah dalam percabangan pohon filogenetiknya. Penggunaan kelompok outgroup dalam penentuan pohon filogeni bertujuan untuk menyempurnakan topologi pohon filogeni. Hal ini dilihat dari memisahkannya clade antara ingroup dan outgroup. Pohon filogeni direkonstruksi kembali untuk melihat kestabilan topologi pohon filogeni berdasarkan gen FGB dengan tidak melibatkan kelompok outgroup dan pohon filogeni yang dihasilkan tetap stabil, hal ini ditunjukkan dengan tidak berubahnya susunan clade pohon filogeninya yang membagi dua kelompok besar. Kelompok besar 1 terdiri atas genus *Megapodius*, *Eulipoa* dan *Macrocephalon*; dan kelompok besar 2 terdiri dari genus *Leipoa*, *Talegalla*, *Alectura* dan *Aepyodius*. Berdasarkan rekonstruksi pohon filogenetik tanpa outgroup pada Gambar 4.5, maka tampak bahwa burung Maleo memiliki hubungan kekerabatan genetik paling dekat secara genetis dengan Genus *Eulipoa* dan *Megapodius* yang data-nya berasal dari Genbank meskipun berbeda cluster dengan nilai bootstrap 45%, nilai ini disebabkan karena panjang intron hasil amplifikasi spesies-spesies tersebut tidak sama meskipun mereka sama-sama tergolong dalam *Megapodia*. Demikian pula dengan genus *Leipoa*, *Talegalla*, *Alectura* dan *Aepyodius* yang terletak pada cluster yang jauh berbeda dengan genus *Macrocephalon*. Hal ini menunjukkan hubungan kekerabatan yang jauh secara genetis sekalipun berada dalam tingkat famili yang sama. Adapun

pada penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya karena dari hasil yang diperoleh terdapat perbedaan komposisi basa nitrogen sampel burung Maleo di Desa Tuva dengan komposisi basa nitrogen dari GenBank. serta analisis filogenetik gen FGB antara burung Maleo dan beberapa spesies pembanding *Megapode* menggunakan metode Neighbor-Joining dan model Juke-Cantor.

Kesimpulan

Karakter gen FGB pada burung maleo memiliki ukuran sekuen gen 576bp. Runutan frekuensi komposisi nukleotida Adenin 32,2%, Timin 30,4%, Cytosin 17,0% dan Guanin 20,3%. Gen FGB pada burung maleo yang diperoleh kaya akan kandungan Adenin dan miskin akan kandungan Cytosin. Perbandingan kandungan basa A+T (62,6%) : G+C (37,4%). Hasil pohon filogenetik terdiri atas 2 kelompok besar. Kelompok besar 1 terdiri atas genus *Megapodius*, *Eulipoa* dan *Macrocephalon*; dan kelompok besar 2 terdiri dari genus *Leipoa*, *Talegalla*, *Alectura* dan *Aepyodius*.

Terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

References

- Aditya, Y. (2012). Implementasi Model Ahmad, Z. (2014). Strategi seleksi tempat bertelur burung mamoa (*Eulipoa wallacei* gray, 1860) di kecamatan Galela.
- Arikunto, S. (1996). Prosedur penelitian suatu pendekatan praktek. Jakarta: Rineka Cipta.
- Astuti, D. (2011). Variasi gen mitokondria cytochrome b pada dua jenis burung kakatua putih (*catua alba* dan *C. moluccensis*). *Jurnal Biologi Indonesia*, 7(2), 263-276.
- Birks, SM & Edwar. (2002). Phylogeny of the megapodes (aves: megapodiidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23,408-421.
- Budiarsa, I. M. (2013). Karakter gen cytochrome (cyt-b) sebagai marker filogenetik burung Maleo (*Macrocephalon maleo*) di habitat alami. Makalah disajikan dalam Prosiding Seminar Nasional Sains dan Matematika II, Universitas Tadulako, Palu 23 November

- Budiarsa, I. M. (2011). Diversitas genetik dan filogeni burung Maleo (Macrocephalon maleo) Berdasarkan Sekuen Gen RDPI Nukleus dan Gen ND2 Mitokondria. Disertasi. Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Budiarsa, I. M., Artama, I. W. T., Sembiring, L., & Situmorang, J. (2009). Diversitas genetik burung Maleo (Macrocephalon maleo) berdasarkan Intron Satu gen Rhodopsin Nukleus (RDP1). Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA, 1-5
- Coates, B. J., Bishop, K. D. & Gardner, D. (2000). Panduan lapangan burung-burung di Kawasan Wallacea (Sulawesi, Maluku dan Nusa Tenggara). Kartikasari SN, Tapilaku MD, Rini D, penerjemah; Bogor: Birdlife Indonesia Programmed dan Dove Publication. Terjemahan dari: A Guide to the Bird of Wallacea (Sulawesi, the Mollucas and the Lesser Sunda Island, Indonesia).
- Dimcheff, D. E., Drovetsi S. V & Mindell, D. P (2002). Phylogeny of tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12s gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24, 203-215
- Fatchiyah. (2006). *Gel elektroforesis*. Ph.D. Thesis. Laboratorium Sentral Biologi Molekuler dan Seluler. Departemen Biologi, Universitas Brawijaya, Malang.
- Glazko, G. V., & Nei, M. (2002). Estimation of divergence times for major lineages of primate species. *Molecular Biology and Evolution*, 20(3), 424-434.
- Harris, B.R., Birks, M.S., & Leach, D.A. (2014). Incubator birds: biogeographical origins and evolution of underground nesting in megapodes (Galliformes: Megapodiidae). *Journal of Biogeography*, 41, 2045-2056
- Isaksson, J., Acharya, S., Barman, J., Cheruku, P. & Chattopadhyaya, J. (2004). "Single-stranded adenine-rich DNA and RNA retain structural characteristics of their respective double-stranded conformations and show directional differences in stacking pattern". *Biochemistry*, 43(51), 15996-6010
- Kimball, R. T., Braun, E. L., Barker, F. K., Bowie, R. C. K., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Hackett, S. J., Han, K. L., Harsman, J., Torres, V. H., Holsnagel, W., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Reddy, S., Sheldon, F. H., Smith, J. V., Witt, C. C., & Yuri, T. (2009). A well-tasted set of primers to amplify region spread across the avian genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50. 654-660.
- Passarge, E. (2007). Color atlas of genetics 3rd edition revised and updated. Germany: Institute of Human Genetics, University Hospital Essen. Thieme.
- Prychitko & Moore. (1997). The utility of DNA sequences of an intron from the b-fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(2), 193-204.
- Prychitko & Moore. (2000). Comparative evolution or the mitochondrial cytochrome b gene and nuclear β -fibrinogen intron 7 in woodpeckers. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 17(7), 1101-1111.
- Saroyo. (2011). Konsumsi mamalia, burung, dan reptil liar pada masyarakat sulawesi utara dan aspek konservasinya. *Jurnal Bioslogos*, 1(1), 2-31.
- Sergio, L. P., Johnson., K.P., D. H. Clayton, K.P. & Baker, A.J. (2007). Mitochondrial and nuclear dna sequences support a cretaceous origin of columbiformes and a dispersal-driven radiation in the paleogene. *Journal of Society of Systematic Biologist*, 56(4), 656-672.
- Sugianto. (2010). Keanekaragaman hayati taman nasional Rawa Aopa Watumohai. DIPA. Tatangge.
- Sulandari, S. & Zein, M. S. A. (2008). Karakterisasi molekuler ayam adat Indonesia berdasarkan mitokondria DNA Pemindahan (D-Loop) urutan. *Hayati Journal of Biosciences*, 15(4), 145-154.
- Supriatna J., Indrawan, M. dan Primarck R.B., (2008). *Biologi konservasi. edisi kedua (Revisi)*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Toha, A. H. A., Widodo, N., Hakim, L., & Sumitro, S. B. (2016). Panduan dasar analisis

- data genetik untuk publikasi. *Marine Biodiversity of Raja Ampat Island*. Universitas Papua & Universitas Brawijaya.
- Uddin, A., Mazumder, T. H., Choudhury, M. N. & Chakraborty, S. (2015). Codon bias and gene expression of mitochondrial ND2 gene in chordates. *Bioinformation*, 11(8), 407-412.
- Yuriadi. (2009). Kajian molekuler daerah d-loop parsial deoxyribonucleic acid (DNA) mitokondria kuda (*equus caballus*) dari priangan. *Jurnal Sains Veteriner*, 27(2), 67-74.
- Zein, S. A. & Sulandari, S. (2008). Keragaman genetik ayam lombok berdasarkan sekuen d-loop DNA Mitokondria. *Jurnal Zoo Indonesia*. 12(4), 308-314.