

Analisis Filogenetik Burung Maleo (*Macrocephalon maleo*) Berdasarkan Sekuen Intron Satu Gen Rhodopsin (RDP1) Nukleus

Phylogenetic Analysis of the Maleo (*Macrocephalon maleo*) based on the First Intron of Rhodopsin (RDP1) Nuclear Gene Sequences

I Made Budiarsa^{1,3*}, I Wayan Tunas Artama², Langkah Sembiring³, dan Jesmandt Situmorang³

¹Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tadulako

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

³Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

E-mail: budiarsa_imade@yahoo.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

The phylogenetic relationships of the maleo (*Macrocephalon maleo*) were analyzed based on the first intron of rhodopsin nuclear gene sequence data obtained from 15 individuals, along with those of 22 individuals taken from GenBank. The phylogenetic trees were reconstructed by Neighbor-Joining (NJ) method. Results indicated that 956 bp of RDP1 sequence, 414 (43.4%) sites were variable and 317 (33.2%) sites were phylogenetically-informative. The base composition for all species analyzed in this research were as follows: T 25.3%, C 26.3%, A 18.5%, and G 29.9%. Analysis of RDP1 sequence produced trees that were remarkably well resolved and had topologies at the marga level. The phylogenetic analysis showed that maleo was monophyly of *Macrocephalon* and closely related to *Aepyodius*, *Talegalla*, *Leipoa* and *Alectura*.

Key words: *Macrocephalon maleo*, phylogenetic, genetic diversity, RDP1

Abstrak

Analisis filogenetik maleo (*Macrocephalon maleo*) telah dilakukan berdasarkan sekuen intron satu gen rhodopsin. Sekuen RDP1 diperoleh dari 15 individu maleo dan 22 individu lainnya diperoleh dari GenBank. Pohon filogenetik dikonstruksi berdasarkan algoritma Neighbor-joining. Hasil analisis menunjukkan sekuen gen RDP1 sepanjang 956bp memiliki 414 (43,4%) daerah variatif dan 317 (33,2%) merupakan daerah informatif. Komposisi basa untuk seluruh jenis yang disertakan dalam analisis ini adalah T 25,3%, C 26,3%, A 18,5% dan G 29,9%. Analisis berdasarkan sekuen gen RDP1 menghasilkan pohon yang memilah dengan baik dan memiliki topologi pada tingkat marga. Analisis filogenetik menunjukkan burung maleo merupakan monofili dari Marga *Macrocephalon* dan berkerabat dekat Marga *Aepyodius*, *Talegalla*, *Leipoa* dan Marga *Alectura*

Kata kunci: *Macrocephalon maleo*, filogenetik, diversitas genetik, RDP1

Diterima: 02 November 2009, disetujui: 16 April 2010

Pendahuluan

Burung maleo (*Macrocephalon maleo*) merupakan salah satu burung endemik Sulawesi yang dilindungi. Burung ini menggunakan panas bumi (*geothermal heat*) dan panas sinar matahari (*solar radiation*) untuk mengeringkan telurnya (Jones *et al.*, 1995). Perbedaan strategi inkubasi telur yang unik, menarik untuk dipelajari dalam

rangka menggali informasi tentang diversitas genetik dan hubungan kekerabatan. Diversitas genetik memiliki keterkaitan dengan viabilitas dan kualitas populasi (Gugurli *et al.*, 2008; Zein, 2007; Frankham *et al.*, 2002). Oleh karena itu faktor genetik harus dipertimbangkan di dalam tindakan konservasi.

Berkembangnya teknologi biologi molekular dan terungkapnya urutan DNA

organisme, penelitian diarahkan pada pendugaan pohon filogenetik untuk menarik kesimpulan mengenai hubungan antar populasi atau jenis (Marks *et al.*, 2007; Price *et al.*, 2005; Moyle dan Marks, 2006; Lovette dan Rubenstein, 2007). Analisis ini mampu memberikan pemahaman tentang identitas suatu individu antar taksa sehingga konsep ini merupakan kerangka penting di dalam memahami biodiversitas (Faith *et al.*, 2004). Analisis filogenetik dilakukan berdasarkan atas pemikiran bahwa organisme merupakan entitas dinamis dan memiliki perbedaan susunan nukleotida. Perbedaan tersebut dapat digunakan untuk mempelajari diversitas genetik dan hubungan kekerabatan organisme.

Perkembangan penggunaan sejumlah penanda molekular yang cepat dan didukung oleh praktik-praktik dalam pelestarian satwa langka, menyebabkan penanda molekular lebih efektif dibandingkan dengan penanda fenotip. Penanda molekular yang telah digunakan di dalam filogenetika burung, khususnya burung dari anggota kelompok Megapoda, adalah gen RDP1. Penggunaan sejumlah ekson nukleus telah dilaporkan bahwa urutan basa pada gen ini berubah sangat lambat untuk kebanyakan perbandingan di tingkat jenis atau marga (Groth dan Barrowclough, 1999; Lovette dan Bermingham, 2000). Intron nukleus berpotensi mengisi kekurangan ini, karena relatif lebih cepat berubah dan mudah amplifikasinya (Slade *et al.*, 1994; Prytchitko dan Moore, 1997; Fujita *et al.*, 2004).

Penelitian ini bertujuan mengetahui diversitas genetik dan hubungan kekerabatan burung maleo untuk digunakan sebagai dasar dalam tindakan konservasi.

Metode Penelitian

Sampel Darah

Sampel darah dari 15 ekor burung maleo diperoleh dari dua habitat yang berbeda, yaitu Tanjung Matop, Batui (Bakiriang) untuk mewakili habitat bertelur pesisir pantai (*coastal nesting grounds*), dan Desa Pakuli, Saluki mewakili habitat bertelur di hutan (*in land nesting grounds*). Tempat tersebut merupakan lokasi penting dan mewakili *nesting ground* burung

maleo di Sulawesi. Darah diambil dari vena sayap sebanyak 0,1–0,2 ml menggunakan alat suntik, kemudian dipindahkan ke dalam tabung koleksi darah berisi EDTA, kemudian disimpan didalam boks es selama di lapangan.

Isolasi DNA

Total DNA darah diisolasi dengan mengikuti protokol *Qiamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) kemudian disimpan pada suhu -20°C . Kualitas DNA diperiksa dengan cara dimigrasikan pada gel agarose 1,2% menggunakan buffer 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM asam borat dan 2 mM EDTA, pH 8,0). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ($\lambda = 300 \text{ nm}$).

Amplifikasi Intron Satu Gen Rhodopsin (RDP1) dengan Teknik PCR

Amplifikasi DNA mengikuti protokol PCR Kit (Takara Ex TaqTM), DNA total hasil ekstraksi di amplifikasi di dalam 50 μl volume reaksi menggunakan *Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600* dengan kondisi sebagai berikut: 5 menit pre-denaturasi pada suhu 95°C , diikuti dengan 35 siklus, 35 detik denaturasi pada suhu 94°C , 30 detik *annealing* pada suhu 52°C selama 30 detik, perpanjangan pada suhu 72°C diikuti perpanjangan waktu terakhir selama 7 menit pada suhu 72°C . Primer yang digunakan adalah : RDP.U1 (F) 5'-GTAACAGGGTGCTACATCG A-3' dan RDP.L1 (R) 5'-ACAGACCACCACA TATCGTT-3' (Birks dan Edwards, 2002).

Sequencing DNA

Purifikasi DNA hasil amplifikasi (produk PCR) menggunakan *QiaQuick PCR Purification Kit* (Qiagen, USA). Produk PCR digunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi penentuan urutan nukleotida, menggunakan *ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, USA) sistem 4 kapiler mengikuti protokol BigDye v.3.1. *Cycle Sequencing Kit*. Primer yang digunakan dalam proses sekuensing adalah: RDP.U1 (F) 5'-GTAACAGGGTGCTA CATCGA – 3' dan RDP.L1 (R) 5'- ACAGACC ACCACATATCG T – 3' (Birks dan Edwards, 2002).

Analisis Data

Sekuen DNA dari anggota populasi yang dikaji dan sekuen DNA jenis yang diperoleh dari

data bases internasional DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) digunakan sebagai dasar untuk mengonstruksi pohon filogenetik (Tabel 1). Analisis ini menyertakan 37 individu dari 17 jenis termasuk 5 individu kelompok luar (*out-group*).

Multiple alignment dilakukan dengan Program Clustal-X (Thomson *et al.*, 1997). *Phylogenetic tree* dikonstruksi menggunakan program Phylip (*Phylogeny Tree Inference Package*) (Felsenstein, 1993) dengan algoritme Neighbor-Joining (NJ) (Saitou dan Nei, 1987; Nei dan Kumar, 2000). Nilai similaritas dan jumlah nukleotida yang berbeda dilihat dengan menggunakan program *Phydit* (Chun, 1999; Sembiring, 2002).

Hasil dan Pembahasan

Karakter Intron Satu Gen Rhodopsin (RDP1)

Kondisi optimal amplifikasi gen RDP1 adalah 5 menit pre-denaturasi pada suhu 95°C, diikuti dengan 35 siklus, 35 detik denaturasi pada suhu 94°C, 30 detik *annealing* pada suhu 52°C selama 30 detik, *elongasi* pada suhu 72°C diikuti dengan post-*elongasi* selama 7 menit pada suhu 72°C. Primer RDP1 mengamplifikasi satu segmen tunggal untuk individu yang dikaji, fragmen ini mencakup 7bp urutan pengapit dari ekson 1 dan 42bp dari ekson 2.

Fragmen gen RDP1 pada analisis ini memiliki panjang yang bervariasi yaitu 807bp pada maleo, 814bp *Alectura lathami*, 816bp *Dendrogapus obscurus* dan 906bp pada *Alecturis chukar*. *Multiple alignment* gen RDP1 menunjukkan adanya celah berkisar antara 1–10bp pada burung maleo, sedangkan pada anggota Megapoda yang lain (*in-group*) dan jenis *out group* menunjukkan celah yang lebih banyak dan terkonsentrasi pada nukleotida nomer 480–708.

Fragmen gen RDP1 sepanjang 956bp (termasuk indel) menunjukkan 414 (43,4%) daerah variabel dan 317 (33,2%) daerah informatif (Tabel 2). Persentase dan karakter daerah informatif pada penelitian ini serupa dengan penelitian sebelumnya yaitu intron R 35 (Fujita *et al.*, 2004), ovomucoid (Armstrong *et al.*, 2001), dan β -fibrinogen (Prychitko dan Moore, 1997). Persamaan karakter gen tersebut

diatas meliputi proporsi komposisi basa dan heterogenitas yang rendah. Rata-rata frekuensi basa untuk gen RDP1 relatif tidak bias (29,6% G, 26,3% C, 25,3% T dan 18,5% A), atau kaya A-T seperti yang telah dilaporkan untuk intron β -fibrinogen 7 (Prychiko dan Moore, 1997) dan intron satu gen rhodopsin (Lovette dan Rubenstein, 2007).

Analisis Filogenetik berdasarkan Gen RDP1

Karakter sekuen gen RDP1 menghasilkan pohon yang memilah dengan baik dan memiliki topologi pada tingkat marga. Signal filogenetik gen RDP1 untuk perbandingan di tingkat jenis masih lemah dan hanya beberapa cabang mendapat dukungan *bootstrap*>70%. Konsisten dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan signal intron nukleus memiliki topologi pada tingkat marga dan famili (Armstrong *et al.*, 2001; Baker, 2004; Shapiro dan Dumbacher, 2001). Kemampuan pilah penanda molekular dipengaruhi oleh adanya perbedaan tingkat substitusi, yang berpotensi menghasilkan signal filogenetik yang berbeda (Bull *et al.*, 1993; Chippindale dan Wiens, 1994). Intron nukleus memiliki tingkat substitusi lebih lambat dan signal filogenetik lebih lemah untuk pemisahan jenis dari pada DNA mitokondria (Birks dan Edwards, 2002). Johnson dan Clayton (2000) melaporkan bahwa intron berubah 5–10 lebih lambat dari mtDNA.

Analisis filogenetik menunjukkan, burung maleo merupakan monofili marga *Macrocephalon* dengan dukungan nilai *bootstrap* tinggi (100%). Berbeda dengan dukungan pada tingkat jenis, untuk beberapa cabang didukung oleh nilai *bootstrap* kurang dari 50%. Perbedaan habitat dan strategi inkubasi burung maleo dalam analisis ini tidak menunjukkan sebagai jenis terpisah, hal tersebut ditunjukkan dengan tetap bergabungnya burung maleo asal pantai (*Macrocephalon maleo* L) dengan burung maleo asal hutan (*Macrocephalon maleo* S/P) pada *clades* sama (Gambar 1).

Pengelompokan tersebut mengindikasikan bahwa individu yang dibandingkan memiliki jarak genetik kecil atau signal filogenetik gen RDP1 lemah, yang dipertegas dengan nilai similaritas antara 98,77–100%. Secara terpisah, kelompok luar tidak disertakan dalam analisis ini untuk menguji kestabilan topologi pohon

kelompok dalam (*in-group*). Analisis Neighbor-Joining menunjukkan topologi pohon yang dihasilkan identik dengan topologi yang mengikutsertakan kelompok luar (Gambar 2).

Analisis filogenetik, burung maleo memiliki hubungan dekat dengan Marga *Aepyodius*, *Talegalla*, *Leipoa*, *Alectura* yang didukung oleh nilai bootstrap 63% dengan nilai similaritas antara 93,11–95,57. Jenis dari Marga *Macrocephalon* dalam analisis ini membentuk kelompok monofili dengan Marga *Alectura*, *Aepyodius*, *Leipoa*, dan *Talegalla*, untuk perbandingan antarmarga kelompok tersebut mendukung status taksonomi *Macrocephalon*

saat ini sebagai marga yang terpisah dari Marga *Megapodius*. Hubungan filogenetik burung maleo yang dikemukakan di sini konsisten dengan hasil penelitian tentang hubungan Marga *Macrocephalon* maleo dengan Marga *Aepyodius*, *Alectura*, *Talegalla* dan Marga *Leipoa* (Birks dan Edwards, 2002); hubungan *Macrocephalon* maleo dengan Marga *Alectura* berdasarkan data morfologis (Dyke, 2003); *Macrocephalon* maleo dengan Marga *Talegalla* dan *Leipoa* (Mey, 1999), tetapi berbeda dengan hasil penelitian data morfologis yang dilaporkan oleh Brom dan Dekker, (1992).

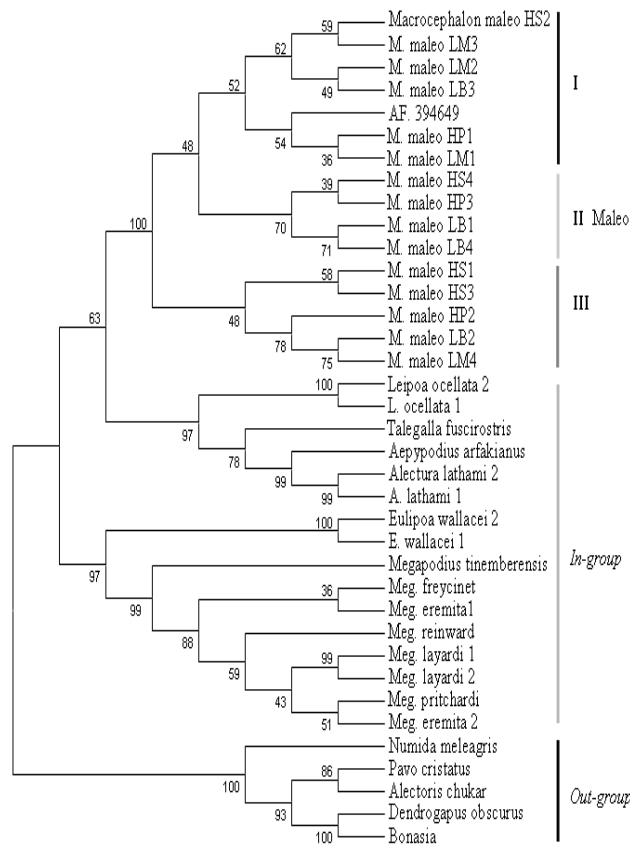
Tabel 1. Jenis dan nomer akses sekuen gen RDP1 dari DNA Data Bank of Japan.

No	Marga /Jenis	Nama umum	Nomer akses gen RDP1
<i>In-group</i>			
1	<i>Eulipoa wallacei</i> 1	Moluccan megapode	AF 394650
2	<i>Eulipoa wallacei</i> 2	Moluccan megapode	AF 394651
3	<i>Aepyodius arfakianus</i>	Warttled brush-turkey	AF 394645
4	<i>Leipoa ocellata</i> 1	Malleefowl	AF 394646
5	<i>Leipoa ocellata</i> 2	Malleefowl	AF 394647
6	<i>Megapodius layardi</i> 1	Vanuatu megapode	AF 394656
7	<i>Megapodius layardi</i> 2	Vanuatu megapode	AF 394657
8	<i>Megapodius tenimberensis</i>	Tanimbar megapode	AF 394659
9	<i>Megapodius reinwardt</i>	Orange-footed megapode	AF 394655
10	<i>Talegalla fuscirostris</i>	Black-billed talegalla	AF 394648
11	<i>Macrocephalon maleo</i>	Maleo	AF 394649
12	<i>Megapodius eremita</i> 1	Melanesian megapode	AF 394652
13	<i>Megapodius eremita</i> 2	Melanesian megapode	AF 394653
14	<i>Megapodius freycinet</i>	Dusky megapode	AF 394654
15	<i>Alectura lathamii</i> 1	Australian brush-turkey	AF 394643
16	<i>Alectura lathamii</i> 2	Australian brush-turkey	AF 394644
17	<i>Megapodius pritchardii</i>	Polynesian megapode	AF 394658
<i>Out-group</i>			
1	<i>Alecturis chukar</i>	Chukar partridge	AF 394641
2	<i>Bonasa bonasia</i>	Hazel grouse	AF 394639
3	<i>Pavo cristatus</i>	Common peafowl	AF 394640
4	<i>Numida meleagris</i>	Helmeted guineafowl	AF 394642
5	<i>Dendrogapus obscurus</i>	Blue grouse	AF 394638

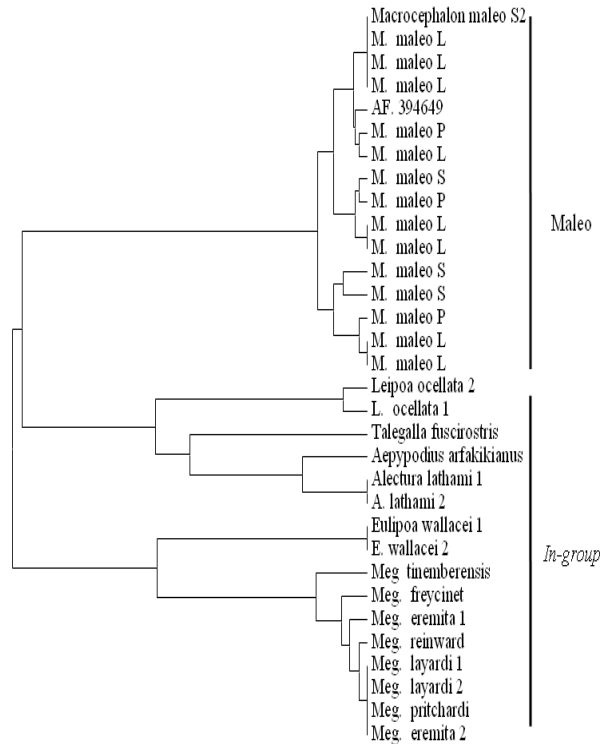
Tabel 2. Karakter intron satu gen rhodopsin (RDP1) nukleus.

Gen	Total Basa	Jenis	Daerah Variatif	Daerah Variatif (%)	Daerah Informatif	Daerah Informatif (%)	Komposisi basa (%)			
							T	C	A	G
RDP1	807	Maleo	12	1,6	10	1,24	25,0	26,9	18,2	29,8
	956	In-group	114	11,9	96	10,0	25,6	26,2	18,5	29,7
	956	Total	414	43,3	317	33,2	25,3	26,3	18,5	29,6

Analisis Filogenetik Burung Maleo (*Macrocephalon maleo*)



Gambar 1. Pohon filogenetik yang dikonstruksi berdasarkan algoritme Neighbor-Joining (Saitou dan Nei, 1987), yang menunjukkan hubungan filogenetik maleo atas dasar sekuen intron satu gen rhodopsin.



Gambar 2. Pohon filogenetik maleo (tanpa out-group) yang dikonstruksi berdasarkan algoritme Neighbor-Joining berdasarkan sekuen intron satu gen rhodopsin.

Simpulan dan Saran

Simpulan

Berdasarkan karakteristik gen RDP1, dapat disimpulkan bahwa burung maleo merupakan monofili dari Marga *Macrocephalon* dan berkerabat dekat dengan Marga *Aepyodius*, *Alectura*, *Talegalla*, dan *Leipoa*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai karakter genetik burung maleo dan sebaiknya dilakukan setiap generasi untuk mendapatkan informasi yang akurat tentang dinamika populasi satwa ini. Data/informasi tersebut selanjutnya dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan di dalam mengatasi permasalahan konservasi maleo.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. Jesmandt Situmorang, M.Sc., Prof. Dr. Drh. Wayan T Artama dan Drs. Langkah Sembiring, M.Sc., Ph.D. yang telah memberikan arahan, bimbingan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan naskah ini. Direktorat Jendral PHKA atas izin masuk kawasan penelitian dan fasilitas bantuan biaya penelitian melalui anggaran tahun 2007.

Daftar Pustaka

- Armstrong, M.H., Braun, E.L. dan Kimball, R.T. 2001. Phylogenetic Utility of Avian Ovomuroid Intron G: a Comparison of Nuclear and Mitochondrial Phylogenies in Galliformes. *Auk*, 118: 799–804.
- Baker, F.K. 2004. Monophyly and Relationships of Wrens (Aves: Troglodytidae): a Congruence Analysis of Heterogeneous Mitochondrial and Nuclear DNA Sequence Data. *Mol. Phylogenet and Evol.*, 31: 486–504.
- Birks, S.M. dan Edwards, S.V. 2002. A Phylogeny of Megapodes (Aves: Megapodiidae) Based on Nuclear and Mitochondrial DNA Sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 23: 408–421.
- Brom, T.G. dan Dekker, R.W.R.J. 1992. Current Studies on Megapode Phylogeny. In: Dekker, R.W.R.J. and Jones, D.N. (Eds.), Proceedings of the First International Megapode Symposium Christchurch, New Zealand, December 1990, vol. 278. National Natuurhistorisch Museum, Leiden, pp. 7–7.
- Bull, J.J., Huelsenbeck, J.P., Cunningham, C.W., Swofford, D.L. dan Waddell, P.J. 1993. Partitioning and Combining Data in Phylogenetic Analysis. *Syst. Biol.*, 42: 384–397.
- Chippindale, P.T. dan Wiens, J.J. 1994. Weighting, Partitioning, and Combining Characters in Phylogenetic Analysis. *Syst. Biol.*, 43: 278–287.
- Chun, J. 1999. *Phylogenetic Editor (Phydit)*. Windows Editor.
- Dyke, J.G. 2003. The Phylogenetic Position of Gallinuloides Eastman (Ave: Galliformes) from the Tertiary of North America. *Zootaxa*, 199: 1–10.
- Faith, D.P., Reid, C.A.M. dan Hunter, J. 2004. Integrating Phylogenetic Diversity, Complementarity, and Endemism for Conservation Assessment. *Conserv. Biol.*, 18: 255–261.
- Felsenstein, J. 1993. *Phylogeny Inference Package version 3.5c*. Distributed by the Author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Frankham, R., Ballou, J.D. dan Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. 617 p.
- Fujita, M.K., Engstrom, T.N., Starkey, D.E. dan Shaffer, H.B. 2004. Turtle Phylogeny Insights from a Novel Nuclear Intron. *Mol. Phylogenet and Evol.*, 31: 1031–1040.
- Groth, J.G. dan Barrowclough, G.F. 1999. Basal Divergences in Birds and the Phylogenetic Utility of The Nuclear RAG-1 gene. *Mol. Phylogenet and Evol.*, 5: 368–382.
- Gugerli, F., Englisch, T., Niklfeld, H., Tribsch, A., Mirek, Z., Ronikier, M., Zimmermann, N.E., Holderegger, R. dan Taberlet, P. 2008. Relationships among Levels of Biodiversity and The Relevance of Intraspecific Diversity in Conservation – a Project Synopsis. *Evol and Syst*, 10: 259–281.
- Johnson, K.P. dan Clayton, D.H. 2000. Nuclear and Mitochondrial Genes Contain Similar Phylogenetic Signal for Pigeons and Doves (Aves: Columbiformes). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 14: 141–151.
- Jones, D., Dekker, R.W.R.J. dan Roselaar, C.S. 1995. The Megapodes. Oxford University Press, Oxford.
- Lovette, I.J. dan Bermingham, E. 2000. Variation in Songbirds: Molecular Evolution, Phylogenetic Implications, and Comparisons with Mitochondrial Differentiation. *Mol. Biol. and Evol.*, 17: 1569–1577.

- Lovette, I.J. dan Rubenstein, D.R. 2007. A Comprehensive Molecular Phylogeny of the Starlings (Aves: Sturnidae) and Mockingbirds (Aves: Mimidae): Congruent mtDNA and Nuclear Trees for a Cosmopolitan Avian Radiation. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44: 1031–1056.
- Marks, B.D., Weckstein, J.D. dan Moyle, R.G. 2007. Molecular Phylogenetics of the Bee-eaters (Aves: Meropidae) Based on Nuclear and Mitochondrial DNA Sequence Data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 45: 23–32.
- Mey, E. 1999. Phylogenetic Relationships of the Megapodiidae as Indicated by Their Ischnoceran, in Particular Gonioidid, Chewing Lice (Insecta: Phthiraptera). In: Dekker, R.W.R.J., Jones, D.N., Benshemesh, J. (Eds.). *Proceedings of the Third International Megapode Symposium*, Nhill, Australia, December 1997, vol. Nationaal Natuurhistorisch Museum, Leiden. Pp.23–36.
- Moyle, R.G. dan Marks, B.D. 2006. Phylogenetic Relationships of the Bulbuls (Aves: Pycnonotidae) Based on Mitochondrial and Nuclear DNA Sequence Data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 40: 687–695.
- Nei, M. dan Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press.
- Price, J.J., Johnson, K.P., Bush, S.E. dan Clayton, D.H. 2005. Phylogenetic Relationships of the Papuan Swiftlet *Aerodramus Papuensis* and Implications for the Evolution of Avian Echolocation. *Ibis*, 147: 790–796.
- Prychitko, T.M. dan Moore, W.S. 2000. Comparative Evolution of the Mitochondrial Cytochrome *b* Gene and Nuclear β -fibrinogen Intron 7 in Woodpeckers. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 1101–1111.
- Saitou, N. dan Nei, M. 1987. The Neighbor Joining Method: A new Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- Sanderson, M.J. dan Shaffer, H.B. 2002. Troubleshooting Molecular Phylogenetic Analyses. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 33: 49–72.
- Sembiring, L. 2002. *Sistematika Molekular*, Petunjuk Praktikum. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta.
- Shapiro, L.H. dan Dumbacher, J.P. 2001. Adenylate Kinase Intron 5: a New Nuclear Locus for Avian Systematics. *Auk*, 118: 248–255.
- Slade, R.W., Moritz, C. dan Heidemen, A. 1994. Multiple Nuclear Gene Phylogenies: Application to Pinnipeds and Comparison with a Mitochondrial DNA Gene Phylogeny. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 341–356.
- Thomson, J.D., Gibson, T.J., Flewiak, F., Jeanmougin, F. dan Higgins, D.G. 1997. The ClustalX Windows Interface: *Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tool*. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 4876–4882.
- Zein, M.S.A. 2007. Keragaman Daerah Control DNA Mitokondria Rusa Timor (*Cervus timorensis timorensis*) di Pulau Timor, Alor dan Pantar. *Biota*, 12 (3): 138–144.