

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Gen Sitokrom b dari Delapan Species Burung

The Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of Mitochondrial Cytochrome b Gene of Eight Birds Species

D.A. Wibowo, W.E. Prasetyaningtyas dan I. Djuwita*

Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

*Korespondensi: E-mail: djuwitawiryadi@yahoo.com

Abstract

The aim of this research is to study the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of eight species local birds of the cytochrome b mitochondrial DNA fragment. The results gained from this study is expected to be used as basic information for tissue birds species recognition. Eight bird tissues collected from Bogor area were preserved in 4,5 M NaCl containing 25% DMSO. DNA were isolated using ammonium acetat precipitation. Universal oligonucleotide cytochrome b primers L14841/H15149 were used for amplification of the mitochondrial cytochrome b DNA fragment using Polymerase Chain Reaction (PCR) method, followed by determination of the PCR product by electrophoresis. The amplicon were digested using restriction enzymes Hinf I (2,5 unit) and Rsa I (20 unit) for 2 and 6 hours, respectively. The calculation of the DNA amplicon and restriction fragment is done by measuring the distance between sample DNA migration with the DNA ladder in 2% agarose gel. The results showed that eight local birds species have 359 bp amplicon, and have different Hinf I restriction fragment size, except between scaly-breasted munia and streaked weaver, and also have different Rsa I restriction fragment size except streaked weaver and javan turtle dove, and also chicken and yellow-vented bulbul. In conclusion, universal oligonucleotide cytochrome b primer followed by digestion with Hinf I and Rsa I restriction enzymes can be used for the eight birds species recognition.

Keywords: cytochrome b, mitochondrial DNA, Hinf I, Rsa I, birds

Pendahuluan

Indonesia mempunyai 1.359 jenis burung yang merupakan 17% dari jumlah total spesies burung di seluruh dunia. Namun, menurut data *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) red list of threatened species* (Anonim 2008) telah menunjukkan bahwa Indonesia mempunyai 133 jenis burung terancam punah, sehingga kondisi ini telah menyebabkan Indonesia masuk ke peringkat dua negara yang mempunyai burung terancam punah di dunia. Penurunan populasi dan peningkatan status keterancaman punah burung liar disebabkan oleh adanya degradasi habitat akibat *illegal logging* yang mengakibatkan eksploitasi terhadap populasi

burung secara tidak langsung, konversi lahan serta adanya perburuan liar dengan meningkatnya permintaan pasar (Shannaz *et al.* 1995).

Hasil survei oleh Burung Indonesia pada tahun 2007 terhadap 1.781 sampel di Jawa dan Bali burung merupakan satwa yang paling banyak dipelihara (35,7%) (Moehayat 2008); dan sebanyak 58,5% merupakan jenis burung hasil tangkapan dari alam. Disamping itu, ribuan ekor dari ratusan jenis burung telah diperdagangkan, termasuk yang dalam kategori dilindungi (Iskandar 2000).

Diantara jenis burung asli Indonesia yang banyak dipelihara diantaranya adalah cucak

kutilang (*Pycnonotus aurigaster*) dan merbah cerucuk (*Pycnonotus goiavier*), sedangkan yang sering diperdagangkan adalah bondol peking (*Lonchura punctulata*) dan bondol jawa (*Lonchura leucogastroides*) (Iskandar 2000). Sementara, kelompok burung yang paling banyak diminati di pasar global adalah bondol, pipit dan gelatik, sedangkan jenis yang diekspor terbanyak adalah jenis bondol *Lonchura spp* (Soehartono dan Mardiasuti 2003). Menurut SNI 01-7209-2006, beberapa jenis burung non apendiks CITES yang diperdagangkan adalah bondol jawa, bondol peking, cucak kutilang, dan merbah cerucuk (BSN 2006).

Ancaman terhadap kelestarian satwa burung yang berasal dari Indonesia harus ditekan serendah mungkin melalui kegiatan konservasi sehingga keanekaragaman hayati Indonesia dapat dipertahankan. Kondisi ini memerlukan suatu langkah penegakan hukum terkait dengan produk-produk perdagangan ilegal satwa tersebut supaya kelestarian di alam tetap terjaga. Namun, penegakan hukum sering mengalami kendala ketika morfologi satwa liar sudah tidak terlacak.

Salah satu cara untuk mengetahui spesies adalah dengan teknik molekuler, yaitu dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) berdasarkan daerah sitokrom b dari DNA mitokondria. Sejauh ini, identifikasi burung asli Indonesia secara molekuler dengan menggunakan gen sitokrom b DNA mitokondria belum pernah dilakukan kecuali pada ayam dan itik (Partis *et al.* 2000; Amin 2005).

Metode PCR-RFLP berdasarkan DNA gen sitokrom b dari mitokondria sudah digunakan secara luas untuk melakukan identifikasi spesies mamalia (Malisa *et al.* 2005; Pfeiffer *et al.* 2004), identifikasi kekerabatan ikan (Farias *et al.* 2001), serta identifikasi kekerabatan burung (Leeton *et al.* 1994; Dodge *et al.* 1995; Desmon *et al.* 2001; Zink & Blackwell 1998; Monteros & Cracraft 1997; Klicka *et al.* 2001). Selain menggunakan sitokrom b dari DNA mitokondria, data molekuler burung juga sudah pernah diidentifikasi pada burung elang dengan menggunakan daerah 12S rRNA mtDNA (Nobata *et al.* 2007).

Metode PCR-RFLP sudah sering digunakan untuk mengetahui data molekuler hewan (Pfeiffer *et al.* 2004). Metode PCR-RFLP dapat digunakan untuk melakukan identifikasi terhadap sampel biologi yang tidak dikenal (Prusak *et al.* 2005), produk-produk perburuan satwa liar (Malisa *et al.* 2005) yang banyak beredar di pasar-pasar dan produk hewan yang digunakan sebagai pakan ternak (Martin *et al.* 2007) yang banyak mengalami kesulitan identifikasi karena morfologi dari hewan sudah hilang. Selain itu, metode PCR-RFLP juga digunakan untuk analisis filogeni (Shen *et al.* 1999). Keunggulan metode PCR-RFLP untuk mengetahui data molekuler spesies burung adalah metode PCR-RFLP membutuhkan waktu yang singkat dan tidak mahal daripada sekuensing DNA, walaupun teknik PCR-RFLP dalam mendeteksi pasangan basa hanya pada daerah tertentu (Pfeiffer *et al.* 2004; Fajardo *et al.* 2006 diacu dalam Nobata *et al.* 2007).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan identifikasi delapan spesies burung lokal berdasarkan perbedaan fragmen restriksi gen sitokrom b mitokondria melalui metode PCR-RFLP.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pendidikan dan Layanan Terpadu Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Pengumpulan Sampel

Sampel jaringan tubuh (jaringan otot) delapan burung lokal yaitu cucak kutilang (*Pycnonotus aurigaster*), merbah cerucuk (*Pycnonotus goiavier*), manyar jambul (*Ploceus manyar*), bondol jawa (*Lonchura leucogastroides*), bondol peking (*Lonchura punctulata*), dederuk jawa (*Streptopelia bitorquata*), ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*), dan itik (*Anas sp*) didapatkan dari pedagang burung di sekitar Bogor. Sampel dipreservasi di dalam larutan DMSO 25% dan NaCl 4,5 M dan disimpan di dalam refrigerator.

Ekstraksi DNA Genom dari Jaringan Otot

Sampel jaringan otot yang sudah dipreservasi dan diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi jaringan presipitasi ammonium asetat

(Sambrook *et al.* 1982). Sebanyak 100mg jaringan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung ependorf kemudian dihancurkan hingga halus dengan penumbuk, kemudian dilarutkan dalam larutan lysis buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 25 mM, NaCl 100 mM, Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 0,5%; pH 8) sebanyak 500 µl dan diinkubasi dengan menggunakan penangas air selama 1 jam pada suhu 55 °C. Kemudian larutan tersebut ditambahkan 6 µl proteinase-K (10 mg/ml) dan diinkubasi kembali selama 3 jam. Sebanyak 3 µl larutan RNAase (20 mg/ml) ditambahkan dan dicampur sampai merata, dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Larutan disimpan dalam es selama 30 menit, kemudian disentrifuse pada kecepatan 9000 g selama 30 menit.

Supernatan ditempatkan pada tabung ependorf baru, kemudian ditambahkan 500 µl ammonium acetate 5 M dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 20 detik pada kecepatan maksimum dan didiamkan selama kurang lebih 10 menit pada suhu ruang, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm, suhu 4 °C selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung ependorf baru yang sudah diisi dengan larutan isopropanol absolut sebanyak 600 µl, dihomogenkan dan disimpan pada suhu ruang selama satu malam sampai terbentuk pelet DNA. Kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 rpm, suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang tersisa ditambahkan 500 µl alkohol 70% dingin, dihomogenkan, kemudian disentrifus pada kecepatan 13.000–16.000 g, selama 1 menit. Supernatan (sisa alkohol) dibuang secara hati-hati supaya pelet tidak terbawa. Pelet dikeringkan pada suhu kamar atau pada suhu 75 °C selama 5 menit. Setelah pelet kering, ditambahkan ddH₂O sebanyak 30-50 µl dan didiamkan semalam atau diinkubasi pada suhu 60 °C selama 3 menit atau 55 °C selama 20-30 menit.

Amplifikasi Fragmen DNA Mitokondria dengan Metode PCR

Kedalam tabung PCR volume 250 µl, secara berurutan dimasukkan aquabidestilata (ddH₂O) 16,55 µl, buffer 10X sebanyak 2,5 µl, dNTP 2mM, primer universal sitokrom b

L14841/H15149: Forward dan reverse, yakni 5'CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA3' -5'CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA3' (Kocher *et al.* 1989) masing-masing 100 µM, DNA template 1 µg dan taq polymerase Applied Biosystem GeneAmp® sebanyak 1 Unit, sehingga total volume adalah 25 µl. Proses amplifikasi dilakukan menggunakan GeneAmp® PCR System 9700 dengan program denaturasi awal 94 °C selama 90 detik, denaturasi akhir 94 °C selama 45 detik, annealing 53 °C selama 45 detik, extension 72 °C selama 90 detik dan ekstension akhir 72 °C selama 10 menit, selama 35 siklus.

Pemotongan Fragmen DNA dengan Enzim Restriksi Hinf I dan Rsa I

Untuk pemotongan amplicon dengan enzim *Hinf I*, kedalam tabung 250 µl berturut-turut dimasukkan ddH₂O sebanyak 12,25 µl, larutan buffer sebanyak 2,5 µl, enzim *Hinf I* sebanyak 0,25 µl (mengandung 2,5 unit), serta DNA amplicon hasil PCR sebanyak 10 µl, sehingga volume total dalam adalah 25 µl. Sedangkan untuk pemotongan DNA dengan *Rsa I* secara berurutan dimasukkan ddH₂O sebanyak 10,5 µl, larutan buffer sebanyak 2,5 µl, enzim *Rsa I* sebanyak 2 µl (2 unit), serta DNA amplicon hasil PCR sebanyak 10 µl sehingga volume total adalah 25 µl. Campuran larutan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam untuk pemotongan dengan *Hinf I* dan selama 6 jam untuk pemotongan dengan *Rsa I*.

Pembacaan Hasil Menggunakan Elektroforesis

Elektroforesis hasil PCR dan pemotongan amplicon dengan enzim *Hinf I* dan *Rsa I* dilakukan dengan menggunakan gel agarose (dalam larutan Tris Asetat EDTA/TAE) dengan masing-masing konsentrasi agarose 1,5% dan 2,0% dan untuk pembacaan hasil dilihat diatas ultraviolet transluminator. Untuk mengetahui ukuran berat molekul setiap fragmen, dilakukan pengukuran migrasi fragmen baik fragmen DNA ladder maupun sampel, kemudian diplot pada kertas Semi-Log (Sambrook *et al.* 1982).

Penghitungan Ukuran Fragmen Restriksi

DNA sampel yang tampak diatas UV transluminator difoto dan diukur jarak

migrasinya dengan menggunakan kertas Semi-Log (One Cycle Semi-Log). Langkah pertama dalam pengukuran DNA sampel adalah menentukan sumbu y untuk berat molekul (pasangan basa atau pb untuk berat molekul DNA) serta sumbu x untuk jarak migrasi DNA (dalam cm). Setelah itu, migrasi DNA ladder pada foto/gambar diukur kemudian diplot pada kertas Semi-Log sehingga terbentuk garis lurus/garis miring. Langkah berikutnya adalah pengukuran migrasi DNA setiap sampel atau fragmen restriksi setiap sampel kemudian diplot pada kertas Semi-Log sehingga dapat diketahui berat molekul (pb) DNA setiap sampel atau fragmen restriksi setiap sampel (Sambrook *et al.* 1982).

Hasil dan Pembahasan

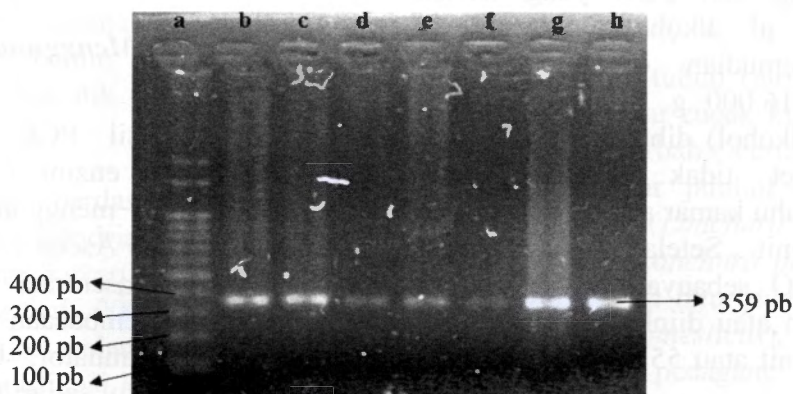
Hasil amplifikasi fragmen sitokrom b DNA mitokondria dari delapan jenis burung lokal yaitu ayam kampung, bondol jawa, bondol peking, cucak kutilang, merbah cerucuk, manyar jambul, dederuk jawa dan itik dengan menggunakan primer universal L1484/H15149 (Kocher *et al.* 1989) melalui metode Polymerase Chain Reaction (PCR) menghasilkan fragmen DNA (amplikon) dengan ukuran yang sama sebesar 359 pasangan basa (pb) (Gambar 1).

Amplikon sitokrom b DNA mitokondria (*cyt b* mtDNA) dari delapan spesies burung lokal dipotong dengan menggunakan dua enzim

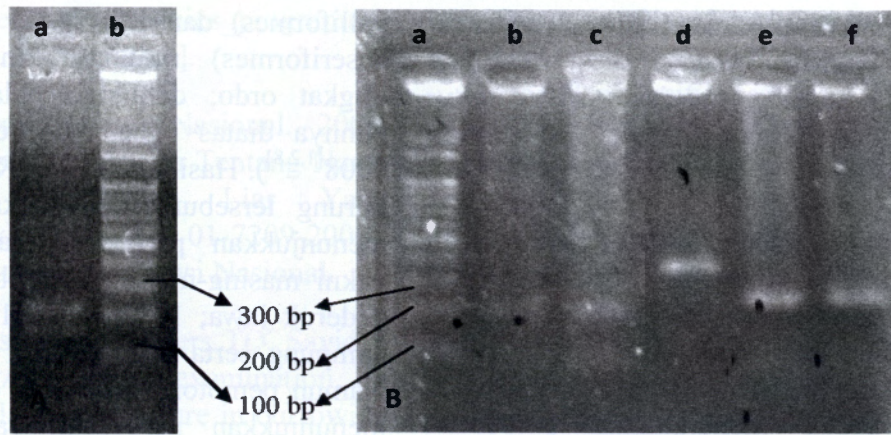
restriksi endonuklease *Hinf* I dan *Rsa* I masing-masing menghasilkan 2 fragmen yang berukuran lebih kecil (Gambar 2). Semua amplikon dari delapan sampel jaringan tubuh burung lokal dapat dipotong menjadi 2 fragmen dengan menggunakan enzim restriksi endonuklease *Hinf* I dan *Rsa* I; yang menunjukkan bahwa kedua enzim restriksi endonuklease tersebut menemukan situs pemotongan pada amplikon tersebut, kecuali pada amplikon itik (*Anas domestica*) dimana enzim restriksi endonuklease *Rsa* I tidak dapat menemukan situs pemotongan.

Ukuran fragmen restriksi yang dihasilkan melalui pemotongan amplikon sitokrom b dari DNA mitokondria dari delapan spesies burung lokal dengan menggunakan enzim *Hinf* I dan *Rsa* I mempunyai persamaan dan perbedaan (Tabel 2). Perbedaan dan persamaan ukuran fragmen restriksi disebabkan oleh perbedaan dan persamaan urutan pasangan basa pada daerah sitokrom b DNA mitokondria masing-masing spesies burung.

Menurut The Bay Science Foundation (2008^[3,4]), delapan jenis burung lokal (cucak kutilang, merbah cerucuk, manyar jambul, bondol jawa, bondol peking, dederuk jawa, ayam kampung dan itik) masuk ke dalam kelas aves, namun berbeda pada tingkat ordo, genus dan spesies.



Gambar 1. Hasil elektroforesis fragmen DNA ladder dan hasil amplifikasi PCR (amplikon). (a) DNA ladder; (b) bondol jawa; (c) bondol peking; (d) merbah cerucuk; (e) cucak kutilang, (f) dederuk jawa; (g) manyar jambul, dan (h) itik.



Gambar 2. Contoh hasil elektroforesis amplicon yang telah dipotong dengan enzim restriksi. A. (a) Fragmen restriksi amplicon ayam kampung yang dipotong dengan *Rsa I*, yaitu masing-masing berukuran 200 dan 159 pb, dan (b) DNA ladder. B. (a) DNA ladder, (b) fragmen amplicon bondol jawa, dan (c) bondol peking hasil pemotongan amplicon dengan *Rsa I*; (d) amplicon bondol peking; (e-f) fragmen restriksi amplicon bondol peking dan manyar hasil pemotongan dengan *Hinf I* menghasilkan fragmen berukuran 255 p dan 104 pb.

Tabel 2. Ukuran fragmen-fragmen hasil PCR dan pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi *Hinf I* dan *Rsa I*

No.	Spesies	Ukuran Amplicon (pb)	<i>Hinf I</i>		<i>Rsa I</i>	
			Fragmen 1 (pb)	Fragmen 2 (pb)	Fragmen 1 (pb)	Fragmen 2 (pb)
1.	Cucak kutilang (<i>Pycnonotus aurigaster</i>)	359	300	59	209	150
2.	Merbah cerucuk (<i>Pycnonotus goiavier</i>)	359	183	176	200	159
3.	Manyar jambul (<i>Ploceus manyar</i>)	359	255	104	197	162
4.	Bondol jawa (<i>Lonchura leucogastroides</i>)	359	243	116	189	170
5.	Bondol peking (<i>Lonchura punctulata</i>)	359	255	104	182	177
6.	Dederuk jawa (<i>Streptopelia bitorquata</i>)	359	271	88	197	162
7.	Ayam kampung (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	359	198	161	200	159
8.	Itik (<i>Anas domesticus</i>)	359	231	128	359	0

Burung merbah cerucuk dengan burung cucak kutilang berada pada ordo, famili pycnonotidae dan genus pycnonotus yang sama, namun berbeda di tingkat species. Burung merbah

cerucuk mempunyai nama spesies *Pycnonotus goiavier* sedangkan burung cucak kutilang mempunyai nama spesies *Pycnonotus aurigaster* (The Bay Science Foundation 2008^[6,7]).

Secara morfologi, cucak kutilang dan merbah cerucuk memiliki banyak persamaan dan sedikit perbedaan, yakni di bagian kepala dan kaki (Mackinnon 1990). Dari hasil analisis PCR-RFLP tampak bahwa cucak kutilang dan merbah cerucuk menunjukkan perbedaan ukuran fragmen baik yang dipotong dengan enzim *Hinf*I maupun *Rsa* I.

Namun demikian, perbedaan yang paling nyata adalah hasil pemotongan dengan enzim *Hinf* I, yakni pada cucak kutilang menghasilkan fragmen 300 pb dan 59 pb, sangat berbeda dengan pada merbah cerucuk yang menghasilkan fragmen 183 pb dan 176 pb. Sementara hasil pemotongan dengan enzim *Rsa* I, masing-masing fragmen hanya menunjukkan sedikit perbedaan yakni 9 pb.

Demikian pula pada bondol jawa (*Lonchura leucogastroides*) dan bondol peking (*Lonchura punctulata*) yang berbeda di tingkat species; hasil analisis PCR-RFLP menggunakan enzim *Hinf* I menunjukkan perbedaan ukuran fragmen yang sangat nyata, yakni pada bondol jawa menghasilkan fragmen 243 pb dan 116 pb; sedangkan bondol peking menghasilkan 255 pb dan 104 pb. Sementara hasil pemotongan dengan enzim *Rsa* I hanya menunjukkan perbedaan 7 pb.

Bondol peking (*Lonchura punctulata*) dan manyar jambul (*Ploceus manyar*) mempunyai persamaan taksonomi sampai tingkat famili (The Bay Science Foundation 2008^[3,4,5]) yaitu passeridae. Hasil analisis PCR-RFLP menggunakan enzim *Hinf* I menunjukkan bahwa keduanya memiliki ukuran fragmen yang sama yakni 255 pb dan 104 pb. Sedangkan hasil pemotongan menggunakan enzim *Rsa* I menunjukkan perbedaan yang nyata yakni 182 pb dan 177 pb pada bondol peking serta 197pb dan 162 pb pada manyar jambul.

Burung lainnya seperti dederuk jawa (*Streptopelia bitorquata*; ordo galliformes), ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*; ordo

galliformes) dan itik (*Anas domesticus*; ordo anseriformes) masing-masing berbeda pada tingkat ordo; demikian pula dengan burung lainnya diatas (The Bay Science Foundation 2008^[1,2,8]). Hasil analisis PCR-RFLP dari ketiga burung tersebut menggunakan enzim *Hinf* I menunjukkan perbedaan yang sangat nyata yakni masing-masing 271 pb dan 88 pb pada dederuk jawa; 198 pb dan 161 pb pada ayam kampung serta 231 pb dan 128 pb pada itik. Namun pemotongan dengan enzim *Rsa* I tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antara dederuk jawa dan ayam kampung; bahkan pada itik tidak terdapat situs pemotongan enzim *Rsa* I. Disamping itu, dederuk jawa memiliki situs pemotongan *Rsa* I yang sama dengan manyar jambul; sementara ukuran fragmen ayam kampung sama dengan merbah cerucuk.

Kesimpulan dan Saran

Dari hasil analisis PCR-RFLP kedelapan burung sampel menunjukkan bahwa pemotongan dengan enzim *Hinf* I menunjukkan perbedaan ukuran fragmen yang nyata, kecuali pada bondol peking dan manyar jawa. Namun demikian, keduanya dapat dibedakan menggunakan enzim *Rsa* I. Sedangkan pemotongan dengan enzim *Rsa* I lebih banyak menunjukkan persamaan atau menunjukkan perbedaan ukuran fragmen yang kurang nyata. Metode PCR dengan menggunakan primer universal sitokrom b serta pemotongan fragmen dengan enzim restriksi *Hinf* I dan atau *Rsa* I dapat digunakan untuk mengenali delapan jenis burung lokal.

Untuk itu disarankan perlunya dilakukan identifikasi pada spesies burung lainnya dengan metode yang sama. Hal ini dapat digunakan untuk mendukung upaya konservasi burung lokal.

Daftar Pustaka

- Amin M. 2005. Keragaman sekuens asam amino gen partial cytochrome-b pada famili anatidae. [http://lib.atmajaya.ac.id/default.aspx?tabID=112 &src=k&id=7187](http://lib.atmajaya.ac.id/default.aspx?tabID=112&src=k&id=7187). [1 Mar 2009].
- Anonim. 2008. Birds on the IUCN red list. <http://www.birdlife.org/action/>

- science/species/global_species_programme/red_list.html. [9 Agu 2008].
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2006. Standar Nasional Indonesia Tentang Nama Tumbuhan dan Satwa Liar Yang Diperdagangkan (SNI 01-7209-2006). Jakarta : Badan Standardisasi Nasional.
- Desmond MJ, Parsons TJ, Powers TO, Savidge JA. 2001. An initial examination of mitochondrial DNA structure in burrowing owl populations. *Journal of Raptor Research* 35(4):274-281.
- Dodge AG, Fry AJ, Blackwell RC, Zink RM. 1995. Comparison of phylogenesis derived from two molecular data sets in the avian genera pipilo and spizella. *The Wilson Buletin* 107(4):641 - 654.
- Farias IP, Orti G, sampai I, Schneider H, Meyer A. 2001. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution* 53:89-103.
- Iskandar J. 2000. Perdagangan hidupan liar makin mencolok. Tajuk Warta Kehati Edisi Oktober November.
- Klicka J, Fry AJ, Zink RM, Thompson CW. 2001. A cytochrome-b perspective on Passerina bunting relationships. *The Auk* 118(3):611-623.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 86:6196-6200.
- Leeton PRJ, Christidis L, Westerman M, Boles WE. 1994. Molecular phylogenetic affinities of the night parrot (*Geopsittacus occidentalis*) and the ground parrot (*Pezoporus wallicus*). *The Auk* 111(4):833-843.
- Mackinnon J. 1990. *Field Guide To The Birds Of Java And Bali*. Yogyakarta: Gajah Mada University press.
- Malisa A, Gwakisa P, Balthazary S, Wasser S, Mutayoba B. 2005. Species and gender differentiation between and among domestic and wild animals using mitochondrial and sex-linked DNA markers. *African Journal of Biotechnology* 4(11):1269-1274.
- Martin I, Garcia T, Fajardo V, Calleja IL, Hernandez PE, Gonzalez I, Martin R. 2007. Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Science* 75:120-127.
- Moehayat P. 2008. Triliunan rupiah beredar dalam hobi burung kicauan. burung Indonesia. http://www.burung.org/detail_txt.php?op=article&id=48 [23 Okt 2008].
- Monteros AEDL, Cracraft J. 1997. Intergeneric relationships of the new world jays inferred from cytochrome b gene sequences. *The Condor* 99:490-502.
- Nobata S, Asakawa C, Shinozawa T. 2007. A preliminary study of PCR-RFLP for spesies identification among the falconiformes of Japan. *Ornithological Sciences* 6:43-46.
- Partis L, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T, Murby J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science* 54:369-376.
- Pfeiffer I, Burger J, Brenig B. 2004. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genetics* 5:30.
- Prusak B, Grzybowski T, Bednarek J. 2005. Cytochrome b gene (cytb) in analysis of anonymous biological traces and its application in veterinary diagnostics and animal conservation. *Animal Science Papers and Reports* 23(4):229-236.

- Sambrook J, Fritsch FF, Maniatis T. 1982. *Molecular Cloning A. Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shannaz J, Jepson P, Rudyanto. 1995. *Burung-Burung Terancam Punah Di Indonesia*. PHPA/BirdLife International-Indonesia Programme.
- Shen XJ, Kimura M, Iwasawa A, Nakamura T. 1999. PCR-RFLP analysis of cytochrome b (Cyt b) inheritance in the wild-type strain and laboratory population of Japanese quail. *Research Bulletin of The Faculty of Agriculture, Gifu University* (64):13 - 20.
- Soehartono T, Mardiasuti A. 2003. *Pelaksanaan Konvensi CITES di Indonesia*. Japan International Cooperation Agency (JICA). Jakarta.
- The Bay Science Foundation. 2008^[1]. *Anas platyrhynchos domesticus*. http://zipcodeco.com/key/Animalia/Anas_Genus.asp. [1 Mar 2009].
- The Bay Science Foundation. 2008^[2]. *Gallus gallus domesticus* (Chicken). http://zipcodeco.com/key/Animalia/Gallus_Genus.asp. [1 Mar 2009].
- The Bay Science Foundation. 2008^[3]. *Lonchura leucogastroides*. http://zipcodeco.com/key/Animalia/Lonchura_Genus.asp. [1 Mar 2009].
- The Bay Science Foundation. 2008^[4]. *Lonchura punctulata* (Scaly-Breasted Munia). http://zipcodeco.com/key/Animalia/Lonchura_Genus.asp. [1 Mar 2009].
- The Bay Science Foundation. 2008^[5]. *Ploceus manyar* (Streaked Weaver). http://zipcodeco.com/key/Animalia/Ploceus_Genus.asp. [1 Mar 2009].
- The Bay Science Foundation. 2008^[6]. *Pycnonotus aurigaster*. http://zipcodeco.com/key/Animalia/Pycnonotus_Genus.asp. [1 Mar 2009].
- The Bay Science Foundation. 2008^[7]. *Pycnonotus goiavier*. http://zipcodeco.com/key/Animalia/Pycnonotus_Genus.asp. [1 Mar 2009].
- The Bay Science Foundation. 2008^[8]. *Streptopelia bitorquata* (Island Collared-Dove, Javanese Turtle-Dove). http://zipcodeco.com/key/Animalia/Streptopelia_Genus.asp. [1 Mar 2009].
- Zink RM, Blackwell RC. 1998. Molecular systematics of the scaled quail complex (genus *callipepla*). *The Auk* 115(2):394-403.