

Variasi Genetik Orangutan Kalimantan Timur Berdasarkan DNA Mitokhondria

Genetic variations of East Kalimantan Orangutan based on D-Loop mitochondria DNA

DIDIK PRASETYO^{1,✉}, JITO SUGARDJITO²

¹Fakultas Biologi Universitas Nasional, Jakarta 12520

²Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia – Bogor

Diterima: 10 Juli 2007. Disetujui: 28 Agustus 2007.

ABSTRACT

Analysis of the variation of D-Loop mtDNA of East Kalimantan orangutan was done to provided the genetic information data from endangered species in order to support their population conservation efforts. The reason using mtDNA in this research is caused by higher level of mutation (5 – 10 times) when compared with nuclear DNA and it enable to transmit via maternal transmission without experience in recombination. From the analysis conducted on 38 samples resulting eight types of haplotype that is A, B, C, D, E, G, H and I haplotype. Level of variation of the haplotype at East Kutai district was more uniform when compared by variation in Kutai district. From the paternal analysis had been got three cluster with the nearer among cluster IADG and cluster EH compared by cluster BC. Dissociation time between haplotype are 250.000-400.000 years ago, and known the population of East Kalimantan orangutan separated from Sumatran orangutan (X97708) since 1.158.300 years ago.

© 2007 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: , D-Loop mtDNA, East Kalimantan

PENDAHULUAN

Orangutan adalah kera besar yang bersifat arboreal , frugivorus , seksual dimorfik dan hidup semi soliter (Galdikas, 1978, MacKinnon, 1974, Rodman, 1973). Saat ini penyebaran orangutan hanya terbatas pada pulau Borneo dan Sumatera (Groves, 2001). Penyebaran di Borneo tersebar di seluruh pulau tetapi tidak merata, sedangkan di Sumatra hanya terdapat di bagian utara pulau. Secara taksonomi orangutan dipisahkan menjadi dua jenis yaitu *Pongo pygmaeus* yang terdapat di Borneo dan *Pongo abelii* yang tersebar di Sumatera (Groves, 2001). Untuk populasi orangutan Borneo diketahui bahwa terdapat 3 anak jenis yang penyebarannya dipisahkan oleh tiga buah sungai besar (Groves, 2001).

Kondisi populasi orangutan pada dua puluh tahun terakhir ini mengalami penurunan yang drastis, perkiraan jumlah populasi yang ada antara 30.000 sampai 40.000 orangutan di Borneo dan 7.000 sampai sembilan ribu individu yang tersebar di Sumatera (Meijaard, 2001). Degradasi dan hilangnya habitat merupakan faktor utama penurunan populasi orangutan, selain faktor perburuan. Selain mempengaruhi keberadaan populasi orangutan, terpisah-pisahnya habitat tersebut menyebabkan hutan seperti pulau-pulau kecil sehingga menimbulkan suatu jarak lebar yang dapat berfungsi sebagai penghalang hubungan antara populasi-populasi yang tersisa. Akibatnya dapat menyebabkan

terpecahnya populasi-populasi orangutan Borneo. Apabila keadaan ini dibiarkan berlarut-larut, dalam masa mendatang dikhawatirkan akan timbul perkawinan kerabat dekat yang dapat lama kelamaan dapat menyebabkan kepunahan lokal karena penurunan kualitas genetiknya (Yeager, 1999). Dalam rangka upaya untuk menghindari penurunan kualitas genetik ini perlu dilakukan analisis genetika molekuler. Survei genetik secara lebih terinci menggunakan DNA mitokhondria dapat digunakan untuk mengetahui luasnya penyebaran genetika orangutan, dan aliran gen secara keseluruhan dalam setiap pulau, termasuk pengukuran variasi genetik pada masing-masing populasi orangutan.

Pembahasan dan penerapan analisis genetika molekuler telah banyak dilakukan dalam usaha memetakan genetika orangutan. Analisis dermatoglifi ujung jari tangan orangutan (Boestani, 1993), analisis variasi kromosom orangutan (de Boer dan Seunez, 1982), analisis mtDNA (Xu dan Arnason, 1996; Muir *et al*, 2000; Zhi *et al*, 1996) dan analisis variasi D-loop mtDNA orangutan Kalimantan (Kristin *et al*, 2001; Zhi *et al*, 1996), merupakan upaya-upaya yang dilakukan untuk melengkapi informasi data genetik, sehingga dapat membantu upaya konservasi populasi orangutan.

Dalam konservasi orangutan, analisis variasi DNA mitokhondria (mtDNA) merupakan alat yang banyak digunakan dalam rekonstruksi hubungan filogenetik antar jenis atau antar populasi dalam jenis yang sama, penentuan unit taksonomi dan identifikasi jenis. Hal ini dikarenakan mtDNA merupakan organel sel yang memiliki laju mutasi yang lebih tinggi (5-10 kali) bila dibandingkan dengan DNA inti, selain itu mtDNA ditransmisikan melalui garis maternal antar generasi tanpa mengalami rekombinasi, sehingga seluruh molekul

✉ Alamat Korespondensi:

Jl. KH. Wahid Hasyim No. 51/74 Medan
Telp. +62-61-4514360 Fax. +62-61-4514749
Email : dik_ape@yahoo.com

dapat dianggap sebagai satu unit genetik tunggal yang memiliki banyak alel (Sudoyo, 1995). Dalam mempelajari jenis yang berkerabat dekat, penggunaan sekuen nukleotida daerah pengontrol mtDNA (D-Loop) dapat memberikan resolusi yang baik, hal ini disebabkan D-loop mtDNA mengandung berbagai sekuen yang memiliki laju mutasi 4-5 kali lebih cepat bila dibandingkan bagian mtDNA lainnya (Horai *et al*, 1993).

Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kekerabatan dan jarak pemisahan yang terjadi pada orangutan Borneo yang terdapat di Kalimantan Timur dengan menggunakan analisis daerah pengontrol DNA mitokondria (D-loop mtDNA). Melalui pendekatan dengan cara ini dapat ditentukan variasi dan sebaran genetik yang terjadi pada masing-masing lokasi, serta tingkat kekerabatan dan waktu pemisahan antar variasi genetik. Dari hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan solusi yang tepat dalam upaya pelepasan orangutan ke alam berdasarkan upaya konservasi genetik orangutan Borneo khususnya di wilayah Kalimantan Timur.

BAHAN DAN METODE

Area Studi

Penelitian dilakukan dengan menganalisis sampel orangutan Borneo yang terdapat di Kalimantan Timur dan sedang dalam proses peliaran di Pusat Rehabilitasi Wanariset Samboja. Sampel darah orangutan yang dianalisis berasal dari individu-individu sitaan atau tangkapan dari penduduk yang telah diketahui secara pasti daerah asal tangkapannya. Dari 38 sampel orangutan yang dianalisis diketahui berasal dari 10 lokasi di wilayah Kalimantan Timur, diantaranya berasal dari daerah Bengalon, Muara Wahau, Sangatta, Sangkulirang, Menamang, Sebulu, Sepaku, Berau, Tanah Grogot, Teluk Pandan (Gambar 1). Analisis sampel dan pengolahan data dilakukan di Laboratorium Genetika, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong, Jawa Barat.

Persiapan Sampel

Jenis sampel yang digunakan dalam penelitian adalah darah orangutan sebanyak 200 ul yang ditambahkan alkohol 70 % sebanyak 1 ml. Sampel diterima dari Wanariset samboja dalam kondisi dingin dan dikemas dalam tabung plastik khusus, untuk menghindari kerusakan dan kontaminasi sampel. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metoda Phenol-Chloroform Jeanpierre (1987) yang dikombinasikan oleh T. Okayama (*personal communication*). Proses denaturasi menggunakan bahan SDS 10 %, Proteinase K 10 mg/ml dan buffer TEN. Tahap presipitasi etanol menggunakan bahan NaCl 5 M 0,05 kali volume sampel dan larutan Etanol 100 % sebanyak 2,5 kali volume sampel. Tahap penyimpanan DNA dilakukan dalam *milliQ water*.

Amplifikasi DNA

Prosedur yang digunakan menurut Stephen (1996) yang dioptimalisasi. Adapun bahan yang digunakan adalah dNTP, Primer ORC 1 L = AGT ACT GAC CCA TTT CTA ACG GCC T, Primer ORC 3 H = TAT GGG TGC TCC GGT TCC AGC GGC C dan *Taq polymerase* DNA. Proses denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 54°C selama 30 detik, dan pemanjangan untai DNA pada

72 °C selama 60 detik, dalam 40 siklus.

Purifikasi Hasil PCR

Merupakan proses penghilangan sisa garam (*desalting*), buffer (*buffer exchange*), pembuangan sisa sampingan dari *dye labelled dideoxynucleotides* pada saat reaksi sekuensing dan pembuangan sisa primer. Prosedur yang dilakukan menurut Hillis (1996). Bahan yang digunakan adalah *microSpin S-400 HR Columns*.

Cycle sequencing

Prosedur dilakukan menurut Sanger *et al* (1977) dengan menggunakan primer Cy5 ORC 4 H GGG GTG CTC CCG TTC CAG CGG CCC GC dan *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit* ATGC. Proses denaturasi pada 95°C selama 30 detik, pemanjangan untai pada 60°C selama 30 detik dalam 25 siklus.

DNA Sequencing

Prosedur dilakukan menurut metode Sanger *et al* (1977), dengan menggunakan alat ALF express Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech). Bahan yang digunakan adalah gel elektroforesis polyacrylamide dalam TBE, zat pendenaturasi, dan inisiator UV.

Analisis Data

Pengeditan basa nukleotida yang didapatkan dari hasil sekuensing dilakukan secara manual yang didasarkan pada sekuen basa pembandingan. Untuk memastikan bahwa hasil sekuen tersebut berasal dari sampel orangutan Borneo, maka hasil sekuen dianalisis dengan program BLAST dari bank gen NCBI.

Hasil proses pengeditan dilanjutkan ke tahap alignment dengan menggunakan program CLUSTAL X versi 1.8 sehingga didapatkan perbedaan dan persamaan basa antar sampel. Untuk mengetahui perbedaan antar haplotipe yang didapat telah digunakan analisis PHYLIP (dnadist) dengan uji Kimura dua parameter. Dalam analisis kekerabatan antar haplotipe telah digunakan program TreeView 3.1. Sebagai spesies pembandingan dalam analisis kekerabatan digunakan individu orangutan Sumatera (X97708) (Xu dan Arnason (1996).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari analisis sekuensing terhadap 38 sampel orangutan dapat diidentifikasi masing-masing sampel menghasilkan 347 pasangan basa spesifik dari basa-basa nukleotida daerah pengontrol (D-loop) mtDNA. dengan 8 haplotipe yang membedakan antar individu-individu sampel, yaitu haplotipe A, B, C, D, E, G, H, dan I (Gambar 3).

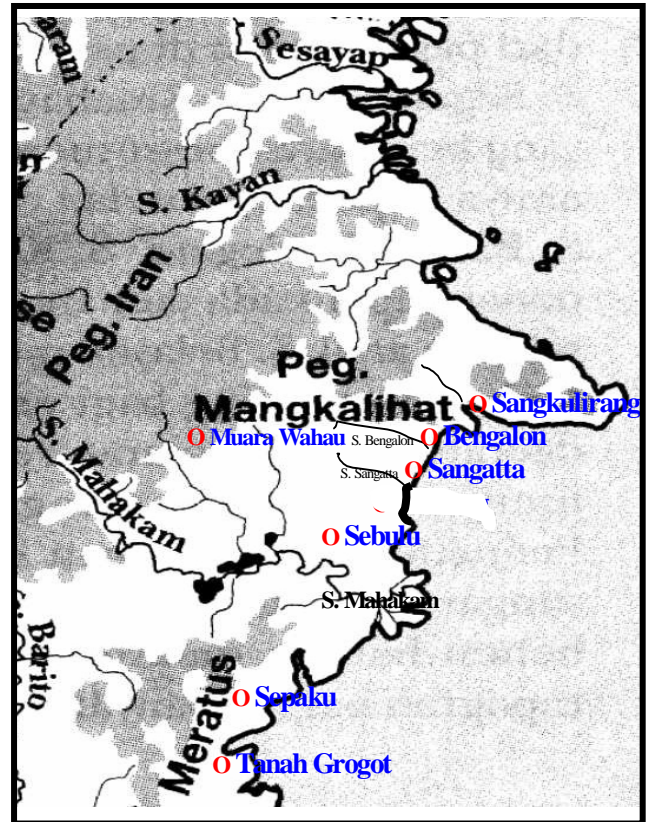
Sebaran haplotipe yang dihasilkan didominasi oleh haplotipe A dengan 16 individu; haplotipe B dimiliki oleh 11 individu; haplotipe CEH masing-masing dengan 1 individu; haplotipe D dengan 4 individu; dan haplotipe GI masing-masing dengan 2 individu (Tabel 1). Dari data tersebut dapat dilihat bahwa haplotipe A dan B adalah haplotipe yang banyak dimiliki oleh individu orangutan Borneo dari Kalimantan Timur. Namun, hal tersebut tidak terjadi pada haplotipe CDEGHI yang hanya dimiliki oleh individu tertentu. Untuk melihat secara lengkap tentang sebaran haplotipe dari individu orangutan yang telah diperiksa dapat ditemukan pada tabel 1.

Tabel 1. Sebaran haplotipe pada masing-masing individu sampel.

Kode	Nama orangutan	Jenis kelamin	Kecamatan	Asal sampel (Kabupaten)	Haplotipe
OU 1	Caroline	Betina	Bengalon	Kutai Timur	A
OU 2	Pungky	Betina	Bengalon	Kutai Timur	A
OU 3	Roslian	Betina	Bengalon	Kutai Timur	A
OU 4	Bondan	Jantan	Berau	Berau	A
OU 5	Belinda	Betina	Menamang	Kutai	B
OU 6	Fika	Jantan	Menamang	Kutai	B
OU 7	Imut	Betina	Menamang	Kutai	B
OU 8	Arman	Jantan	Muara Wahau	Kutai Timur	B
OU 9	George	Betina	Muara Wahau	Kutai Timur	A
OU 10	Kepit	Jantan	Muara Wahau	Kutai Timur	A
OU 11	Luhau	Jantan	Muara Wahau	Kutai Timur	B
OU 12	Maidhuri	Betina	Muara Wahau	Kutai Timur	B
OU 13	Miki	Betina	Muara Wahau	Kutai Timur	A
OU 14	Rangga	Jantan	Muara Wahau	Kutai Timur	A
OU 15	Acong	Betina	Sangatta	Kutai Timur	A
OU 16	Ego	Jantan	Sangatta	Kutai Timur	A
OU 17	Gavin	Betina	Sangatta	Kutai Timur	I
OU 18	Itang	Betina	Sangatta	Kutai Timur	A
OU 19	Jamur	Jantan	Sangatta	Kutai Timur	B
OU 20	Jushua	Jantan	Sangatta	Kutai Timur	A
OU 21	Kunti	Betina	Sangatta	Kutai Timur	A
OU 22	Pongi	Jantan	Sangatta	Kutai Timur	I
OU 23	Sarmi	Betina	Sangatta	Kutai Timur	A
OU 24	Yondri	Jantan	Sangatta	Kutai Timur	B
OU 25	Kent	Jantan	Sangkulirang	Kutai Timur	A
OU 26	Adun	Jantan	Sebulu	Kutai	G
OU 27	Claire	Betina	Sebulu	Kutai	D
OU 28	Gauri	Jantan	Sebulu	Kutai	D
OU 29	Janine	Betina	Sebulu	Kutai	G
OU 30	Jay	Jantan	Sebulu	Kutai	H
OU 31	Petak 63	Betina	Sebulu	Kutai	C
OU 32	Saskia	Betina	Sebulu	Kutai	E
OU 33	Victor	Jantan	Sebulu	Kutai	B
OU 34	Rajuli	Jantan	Sepaku	Pasir	A
OU 35	Ganing	Jantan	Tanah Grogot	Pasir	D
OU 36	Sherina	Betina	Tanah Grogot	Pasir	D
OU 37	Abel	Betina	Teluk Pandan	Kutai Timur	B
OU 38	Nian	Jantan	Teluk Pandan	Kutai Timur	B

Tabel 2. Sebaran haplotipe berdasarkan lokasi dan jumlah individu.

Lokasi sampel	Haplotipe	Jumlah individu	Jumlah sampel
Bengalon, Kabupaten Kutai Timur	A	3	3
Muara Wahau, Kabupaten Kutai Timur	A	4	7
	B	3	
Sangatta, Kabupaten Kutai Timur	I	2	10
	A	6	
	B	2	
Sangkulirang, Kabupaten Kutai Timur	A	1	1
Teluk Pandan, Kabupaten Kutai Timur	B	2	2
Menamang, Kabupaten Kutai	B	3	3
Sebulu, Kabupaten Kutai	B	1	8
	C	1	
	D	2	
	E	1	
	G	2	
	H	1	
Sepaku, Kabupaten Pasir	A	1	1
Tanah Grogot, Kabupaten Pasir	D	2	2
Berau, Kabupaten Berau	A	1	1

**Gambar 1.** Lokasi sebaran sampel orangutan

Sebaran haplotipe berdasarkan lokasi asal individu orangutan dapat dikelompokkan menjadi 4 lokasi besar yaitu:

1. Kabupaten Kutai Timur yang terdiri dari daerah Bengalon, Muara Wahau, Sangatta, Sangkulirang;
2. Kabupaten Kutai yang mencakup daerah Menamang, Sebulu;
3. Kabupaten Pasir dengan cakupan wilayah Sepaku dan Tanah Grogot;
4. Kabupaten Berau

Pada gambar 1 dapat dilihat sebaran haplotipe asal individu orangutan. Dari lokasi tersebut dapat dilihat Kabupaten Kutai Timur memiliki 3 haplotipe dari 23 individu sampel yaitu haplotipe A, B, dan haplotipe I dengan jumlah individu terbanyak pada haplotipe A = 14 individu, haplotipe B = 7 individu dan haplotipe I sebanyak 2 individu. Sedangkan pada Kabupaten Kutai, dari 11 individu yang dianalisis terdapat 6 haplotipe yaitu haplotipe B, C, D, E, G, dan H. Sebaran haplotipe yang terjadi pada daerah ini terlihat merata yaitu antara 1 sampai 2 individu pada tiap haplotipe. Untuk Kabupaten Berau terdapat haplotipe A, Kabupaten Pasir dengan haplotipe D dan A, Bontang memiliki haplotipe B. Secara rinci sebaran haplotipe ini dapat dilihat pada (Tabel 2).

Analisis perbedaan anatar haplotipe dengan menggunakan metode Kimura dua parameter didapatkan hasil persentase perbedaan anatar haplotipe dengan kisaran 0,29 % - 3,87 % (Tabel 3). Hal ini didukung oleh penelitian yang telah dilakukan Warren dengan kawan-kawan (2001) terhadap gen D-Loop mtDNA dengan mendapatkan besar perbedaan antar haplotipe orangutan Kalimantan Timur sebesar 1,9 % dan menurut Xu dan Arnason (1996) besar perbedaan gen D-Loop orangutan Kalimantan Timur adalah 1,4 %.

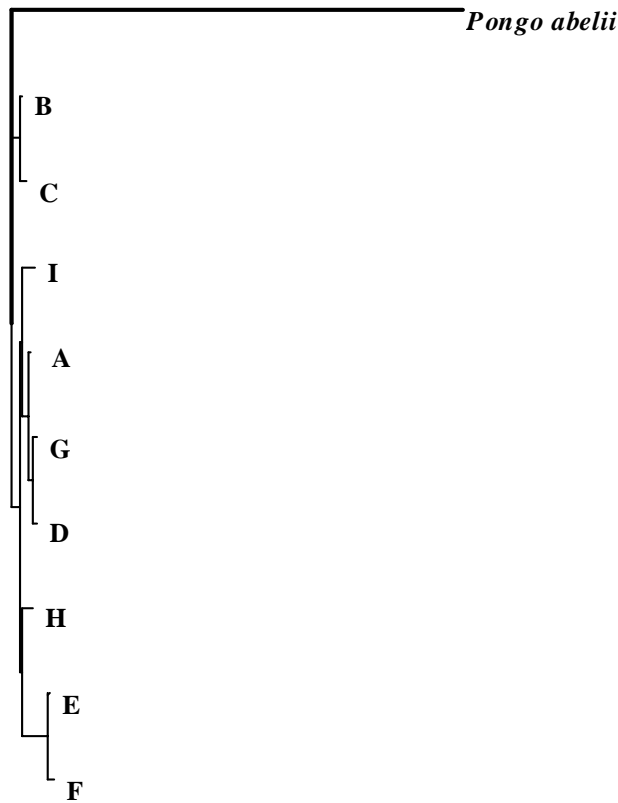
Table 3. Persentase perbedaan antar haplotipe orangutan Kalimantan Timur.

Haplotipe	D	G	A	I	B	C	H	E
D	-	0.29	0.29	1.46	2.06	2.36	1.47	2.66
G		-	0.87	2.05	2.65	2.95	1.76	2.95
A			-	1.16	1.76	2.06	1.46	2.65
I				-	2.35	2.65	1.46	2.65
B					-	0.29	2.06	3.26
C						-	2.36	3.56
H							-	1.76
E								-

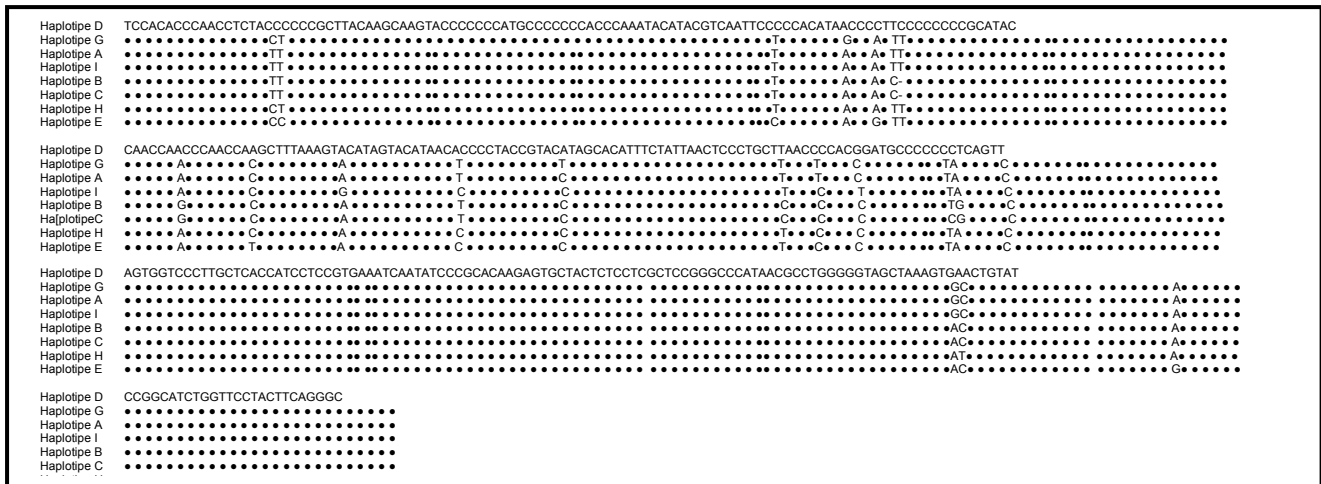
Analisis kekerabatan pohon filogeni antar haplotipe orangutan Kalimantan Timur memperlihatkan tiga kluster yang berbeda (Gambar 2) yaitu kluster EH, IADG, dan BC. Dari ketiga kluster ini dapat diketahui kelompok EH berkerabat dekat dengan kelompok IADG, dan kedua kelompok tersebut (EHIADG) memiliki kekerabatan yang dekat dengan kelompok BC.

Dari hasil sebaran haplotipe-haplotipe tersebut, pada Kabupaten Kutai Timur dapat diindikasikan terjadi penurunan keragaman genetik yang dilihat dari jumlah haplotipe pada 23 individu sample. Hal ini terjadi sebaliknya pada individu sample asal Kabupaten Kutai yang memiliki keragaman genetik yang lebih tinggi dengan banyak ditemukan variasi haplotipe dari 11 individu sample. Rendahnya variasi haplotipe yang terjadi pada Kabupaten Kutai Timur disebabkan rendahnya tingkat perkawinan silang antar individu antar lokasi yang memiliki haplotipe berbeda sebagai akibat dari letak geografis yang terisolasi. Keterisolasian ini disebabkan oleh adanya penghalang alami yang menghambat proses hubungan orangutan dari Kutai Timur dengan daerah yang lain. Bentangan pegunungan Mangkalihat dan pegunungan Iran yang memiliki ketinggian 1300-2500 m merupakan factor penghambat penyebaran orangutan di kawasan ini. Seperti diketahui habitat yang paling sesuai untuk orangutan Borneo adalah habitat hutan dengan ketinggian 0 – 600 meter dpl. Daerah dengan ketinggian di atas 1500 meter tidak sesuai atau sangat jarang ditempati oleh orangutan (MacKinnon, 1974). Selain itu belahan sungai Bengalon, sungai Sangatta dan sungai Wahau juga dapat dianggap sebagai factor yang memisahkan beberapa bagian di Kutai Timur, sehingga mempengaruhi laju aliran gen antar populasi orangutan Borneo dari Kabupaten Kutai Timur (MacKinnon *et al*, 2000).

Kondisi ini berbeda dengan yang terjadi pada Kabupaten Kutai. Kawasan ini merupakan daerah yang memungkinkan penyebaran orangutan Borneo ke daerah luar Kutai dengan lebih mudah. Tidak adanya penghalang alam yang ekstrim memungkinkan aliran gen antar populasi dapat terjadi dengan baik. Bentangan pegunungan Meratus hanya menjadi penghambat penyebaran orangutan ke wilayah Kalimantan Selatan dan Kalimantan Tengah. Sungai Mahakam juga dapat dianggap sebagai penghalang bagi penyebaran orangutan Kabupaten Kutai ke kawasan Kabupaten Pasir (MacKinnon, 2000). Dilihat dari kondisi tersebut bahaya akan kepunahan jenis dapat diperkirakan terjadi lebih awal pada populasi orangutan di kawasan



Gambar 2. Kekerabatan antar haplotipe orangutan Kalimantan Timur



Gambar 3. Hasil analisis haplotipe pada seluruh sampel

Kabupaten Kutai Timur dibandingkan dengan populasi orangutan di Kabupaten Kutai, apabila tidak terjadi pertukaran gen antar individu dari populasi yang berbeda.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan mengenai kekerabatan orangutan Kalimantan Timur berdasarkan DNA mitokondria, dapat disimpulkan bahwa terdapat 8 tipe haplotipe dari 39 sampel orangutan Kalimantan Timur yang dianalisis dengan sebaran haplotipe pada Kabupaten Kutai Timur lebih sedikit apabila dibandingkan dengan Kabupaten Kutai. Dari analisis kekerabatan antar haplotipe didapatkan tiga *cluster* haplotipe orangutan Kalimantan Timur yaitu *cluster* IADG, EH dan BC. Dengan *Cluster* IADG memiliki kekerabatan lebih dekat dengan *cluster* EH dibandingkan dengan *cluster* BC.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Toshinao Okayama Phd., DR. Jito Sugarjito, Citrakasih M. Nente, Drh, Yeremiah R. Camin, Drs, Msi selaku pembimbing penelitian. Selain itu kepada Kepala Puslit Biologi Ibu Siti N. Prijono, Sri Sulandari Msc, Ir. Mohammad Zein, Msi, Maharadatunkamsi, MSc, Wirdateti Msi, Kundar, sebagai staff di Laboratorium Genetika Cibinong, saya mengucapkan banyak terima kasih. Dan seluruh pihak yang membantu dalam penelitian ini,

DAFTAR PUSTAKA

- Amason U., X. Xu and A. Gullberg. 1996. Comparison between the complete mitochondrial DNA sequences of human and common chimpanzee. *J Mol Evol.* 42: 145-152.
- Boestani, A. 1993. Perbedaan jumlah dan pola sulur ujung jari tangan pada orangutan Kalimantan dan orangutan Sumatera. Skripsi S1 Fakultas Biologi, Universitas Nasional, Jakarta.
- Brown, W.M. 1980. Polymorphisms in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3605-3609.
- de Boer, L.E.M., and H.N. Seuanes. 1982. The chromosomes of the orangutan and their relevance to the conservation of the species. In: de Boer, L.E.M. (ed) *The orangutan its biology and conservation*. Dr. W. Junk. The Hague. 135-170.
- Delgado, R., and C.P. van Schaik. 2000. The behavioral ecology and conservation of the orangutan (*Pongo pygmaeus*) = a tale of two islands. *Evolutionary anthropology*, Cambridge University Press, Wiley. Liss. Inc. 503-520.
- Galdikas, B.M.F. 1978. *Adaptasi Orangutan di Suaka Tanjung Puting Kalimantan Tengah*. Universitas California, Los Angeles.
- Goodall, J. 1996. *The pictorial guide to the living primates*. Pogonias Press, East Hasupton, New York.
- Groves, C.P. 2001. *Primate Taxonomy*. Smithsonian Institution Press. Washington and London.
- Hillis D.M., and C. Moritz. 1996. *Molecular systematic*. Second edition. Sinauer Associates. Inc. publishers Sunderland, Massachusetts. USA.
- Horai S., R. Kondo, Y. Nakagawa-Hattori, S. Hayashi, S. Sonada and K. Tajimaas. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol.* 10: 23-47.
- Horai S., K. Hayasaka, R. Kondo, K. Tsugane and N. Takahata. 1995. Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (2), 532-536.
- Jeanpiere, M. 1987. A Rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucl. Acid. Res.* 25: 9611.
- Warren KS, et al. 2001. Speciation and intrasubspecific variation of Bornean orangutans, *Pongo pygmaeus*. *Mol. Biol. Evol* 18(4) : 472-480.
- Li, W.H., and D. Gruur. 1991. *Fundamental of molecular evolution*. Sinauer Associates, inc. publishers. Sunderland Massachusetts, USA.
- MacKinnon J, et al. 2000. *Ekologi Kalimantan*. Seri buku lapangan III. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Maple, T.L. 1980. *Orangutan Behavior*. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Meijaard, E., H.D. Rijksen, dan S.N. Kartikasari. 2001. *Diambang kepunahan! Kondisi orangutan liar di awal abad ke-21*. The gibbon foundation. Jakarta.
- Moritz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation = a critical review. *Mol. Evol.* 3: 401-411.
- Moritz C., T.E. Dowling, and W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance for population biology and systematic, annual review ecology system. 18: 269-292.
- Muir C.C., B.M.F. Galdikas and A.T. Beckenbach. 2000. mtDNA sequences diversity of orangutans from the islands of Borneo and Sumatera. *J. Mol. Evol.* 51: 471-480.
- Murray JK, et al. 1997. *Biokimia Harper*. Edisi ke 5. EGC pers, Jakarta.
- Prasetyo D., J. Sugarjito, T. Okayama, & C.M. Nente. 2002. Genetic differentiation of orangutan populations in Kalimantan. Seminar aktivitas penelitian program konservasi keanekaragaman hayati. Pusat penelitian Biologi LIPI-JICA-DitJen PKA. Bogor.
- Robert W. M., Jack W. Sites, Jr., Donald G and C.H. Haufler. 1990. *Proteins : Isozyme electrophoresis. Molecular techniques*. Sinauer Associates. Inc. publishers Sunderland, Massachusetts. USA.
- Rodman, P.S. 1973. *Synecology of Bornean Primates*. Phd Dissertation, Harvard University.
- Ryder, O.A., and L.G. Chemnick. 1993. Chromosomal and mitochondrial DNA variation in orangutan. *J. hered.* 84: 405-409.
- Sanger F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463.
- Stephen, R.P. 1996. *Nucleic Acids II : The Polymerase Chain Reaction. Molecular Systematic II*. Sinauer Associates. Inc. publishers Sunderland, Massachusetts. USA.
- Sudoyo, H. 1995. *Mutasi DNA mitokondria sebagai penyebab kelainan genetika*. Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Supriatna, J. 1998. *Penerapan teknologi genetika molekuler dalam upaya konservasi satwa langka, studi kasus metapopulasi Owa Jawa (Hylobates moloch)*. Kantor menteri negara riset dan teknologi dewan riset nasional.
- Supriatna, J., dan W. Hendras. 2000. *Panduan Lapangan Primata Indonesia*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- van Schaik C.P., R.O. Deaner, and M.Y. Merrill. 1999. The conditions for tool-use in primates = implications for the evolution of material culture. *J Hum Evol* 36: 719-741.
- Xu, X., and U. Amason. 1996. The Mitochondrial DNA Molecule of Sumatran Orangutan and A Molecular Proposal for Two (Bornean and Sumatran) Species of Orangutan. *J.mol.evol.* 43 (5), 431-437.
- Yeager, C. 1999. *Rencana Aksi Orangutan*. WWF Indonesia.
- Zhi L., W.B. Karesh, D.N. Janczewski, H.F. Taylor, D. Sajuthi, F. Gombek, M. Andau, J.S. Martenson and S.J. O'Brien. 1996. Genomic differentiation among natural populations of orangutan (*Pongo pygmaeus*), research papers vol 6 no. 10: 1326-1336.