

Karakterisasi Ekson 4 Gen DRD4 pada Ayam Arab Tiara G15 dengan Tingkah Laku *Feather Pecking*

(Characterization of the 4th Exon of DRD4 Gene in Arab Tiara G15 Chicken Breed with Feather Pecking Behaviors)

Achmad Farajallah¹, Pristina Tuti Wijayanti¹, Achmad Alfiyan¹, Maria Ulfah^{2*}

(Diterima September 2023/Disetujui Mei 2024)

ABSTRAK

Feather pecking (FP) merupakan suatu kelainan perilaku yang ditemukan pada ayam, yang dapat berakibat fatal. Berbagai faktor, termasuk faktor genetik seperti gen DRD4, telah dilaporkan memengaruhi perilaku FP. Ayam Arab TIARA G15 merupakan varietas ayam petelur yang telah diseleksi berdasarkan perilaku FP, tetapi seleksi genetik yang berkaitan dengan FP belum dilaksanakan. Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi ruas ekson 4 gen DRD4 pada ayam arab *golden red* TIARA G15 dan mengonfirmasi potensinya sebagai penanda genetik FP. Sampel ayam TIARA G15 (30 individu) dalam penelitian ini terdibagi menjadi tiga kelompok: *high feather pecking* (HFP) ($n = 10$), *low feather pecking* (LFP) ($n = 10$), dan kelompok kontrol ($n = 10$). Total genom dari sampel darah setiap individu ayam diekstraksi menggunakan kit ekstraksi DNA. Ruas ekson 4 gen DRD4 diamplifikasi menggunakan pasangan primer MU140-141. Amplikon sampel ayam dari kelompok yang sama digabungkan ke dalam 1 tabung reaksi (*pooling method*), kemudian disekuens menggunakan metode Sanger. Hasil sekuensnya dianalisis ragam nukleotidanya menggunakan program MEGA6. Panjang sekuens nukleotida dari setiap kelompok ayam yang diperoleh adalah 642 pb, dengan bagian intron 3 (parsial) sepanjang 55 pb, exon 4 202 pb, dan 3'UTR (parsial) 385 pb. Berdasarkan analisis ragam nukleotida, tidak ditemukan ragam nukleotida pada area intron 3, ekson 4, dan 3'UTR pada ketiga kelompok ayam arab *golden red* TIARA G15 tersebut. Berhubung tidak ditemukan ragam nukleotida pada ketiga kelompok ayam tersebut, ruas ekson 4 gen DRD4 tidak dapat digunakan untuk menyeleksi perilaku FP.

Kata kunci: ayam arab, DRD4, *feather pecking*, *golden red*

ABSTRACT

Feather pecking (FP) is a potentially fatal behavioral disorder in chickens. Various factors, including genetics such as DRD4 gene, affected this behavior. The Arab TIARA G15 chicken is a laying hen breed selected based on FP behavior. However, genetic selection linked to this FP as not yet been conducted. This study aimed to characterize the 4th exon of the DRD4 gene in Arab golden red TIARA G15 chickens and confirm its potential as an FP genetic marker. The study used 30 TIARA G15 chickens that were divided into three groups: high feather pecking (HFP) ($n = 10$), low feather pecking (LFP) ($n = 10$), and control ($n = 10$). The DNA extraction kit extracted total genomic DNA from each blood sample. The 4th exon of the DRD4 gene was amplified using primer pairs MU140-141. Amplicons from samples within a group were pooled in a single tube and sequenced using the Sanger method. The sequencing results were analyzed for nucleotide variation using MEGA6 software. Nucleotide sequences obtained from each group were 642 bp, consisting of partial intron 3 (55 bp), full-length exon 4 (202 bp), and partial 3'UTR (385 bp). None of the three groups of Arab golden red TIARA G15 chickens were found to have any nucleotide variants in the partial intron 3, full-length exon 4, and 3'UTR regions of the DRD4 gene. Consequently, selecting the full-length exon 4 of the DRD4 gene for FP behavior was not feasible.

Keywords: arab chicken, DRD4, *feather pecking*, *golden red*

PENDAHULUAN

Feather pecking (FP) merupakan perilaku mematok, mencabut, bahkan memakan bulu antar-individu.

Perilaku ini dapat ditemukan pada ayam, baik ayam hutan maupun pun domestik, yang mengakibatkan cedera hingga kematian. Perilaku ini menjadi momok pada peternak ayam domestik di berbagai galur karena dapat menurunkan produktivitas ayam. FP dilaporkan sebagai suatu gangguan tingkah laku yang serius pada ayam petelur (Savory 1995). Berdasarkan frekuensinya, FP dikelompokkan menjadi 2, yakni *low feather pecking*/FP ringan (LFP) dan *high feather pecking*/FP berat (HFP) (Keeling *et al.* 2004). Faktor genetik,

¹ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

² Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, IPB University, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

* Penulis Korespondensi: Email: mulfah@apps.ipb.ac.id

lingkungan, serta interaksi di antara kedua faktor tersebut dilaporkan berkontribusi dalam perilaku ini (van Hierden *et al.* 2002). Untuk faktor genetik, gen-gen yang terlibat dalam sistem dopaminergik dan serotonergik dilaporkan memengaruhi perilaku tersebut (van Hierden *et al.* 2002, Kjaer *et al.* 2004). Gen dopamin reseptor D4 (DRD4) adalah gen yang terlibat dalam sistem dopaminergik dan dilaporkan berperan dalam FP (Flisikowski *et al.* 2009).

Gen DRD4 pada ayam terletak pada kromosom ke-5 dan memiliki 4 ekson. Gen ini menyandikan protein D4 dopamin reseptor yang diketahui ekspresinya terkonsentrasi pada otak bagian korteks frontalis dan bertanggung jawab dalam pengaturan kadar dopamin. Penelitian Kjaer *et al.* (2004) menunjukkan bahwa kadar dopamin pada otak ayam berkaitan dengan perilaku FP sehingga protein D4 dopamin reseptor ini memiliki andil. Protein D4 dopamin reseptor juga dilaporkan berkaitan dengan temperamen pada burung (Gillingham *et al.* 2012). Polimorfisme pada sekuen gen DRD4 dilaporkan berkontribusi dalam perilaku FP pada ayam (Flisikowski *et al.* 2009; Komiyama *et al.* 2014).

Ayam arab *golden red* merupakan salah satu ayam lokal Indonesia dengan tingkat produksi telur yang tinggi, dengan jumlah telur mencapai 300 butir/ekor/tahun (Sabrina 2016). Tingginya tingkat produksi telur membuat ayam arab *golden red* menjadi salah satu galur ayam yang penting dalam produksi telur di Indonesia. FP merupakan salah satu faktor utama yang dipertimbangkan dalam pemilihan bibit ayam petelur karena dibawa oleh perilaku ini. Ayam TIARA G15 merupakan ayam hasil seleksi dari populasi ayam arab *golden red* berdasarkan perilaku FP, tetapi genetiknya belum diseleksi. Oleh karena itu, penelitian ini dimaksudkan untuk mengkarakterisasi gen DRD4, yakni gen yang diduga berkaitan dengan perilaku FP, bagian ruas ekson 4-nya pada ayam tiara G15, serta mengonfirmasi potensi dari ruas ekson 4 gen DRD4 sebagai penanda genetik FP.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari–April 2016, di Laboratorium Molekuler bagian Fungsi Hayati dan Perilaku Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan di Laboratorium Genetika Molekuler Ternak, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

Material Penelitian

Sampel hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam arab *golden red* TIARA G15 sebanyak 30

individu betina. Ayam TIARA G15 merupakan ayam hasil seleksi dari populasi ayam arab generasi ke-15, koleksi Dr. Maria Ulfah, seperti, MscAgr, Fakultas Peternakan IPB. Ketiga puluh sampel ayam dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan perilaku FP, yakni HFP (10 individu), LFP (10 individu), dan kontrol (tidak mengalami seleksi FP) (10 individu). Setiap ayam diambil sampel darahnya sebagai sumber bahan genetik.

Ekstraksi Total Genom Ayam TIARA G15

Sebanyak 100 µL sampel darah utuh dari setiap ayam diekstraksi total genomnya menggunakan kit ekstraksi DNA komersial *Blood DNA Isolation Kit* (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan). Ekstraksi mengikuti protokol yang tertera pada kit tersebut. Total genom yang didapatkan kemudian disimpan dalam *freezer* bersuhu -20°C.

Amplifikasi dan Sekuensing Ekson 4 Gen DRD4

Ruas ekson ke-4 gen *DRD4* diamplifikasi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan mesin *Thermocycler ESCO Swift Maxi* dan pasangan primer *forward* MU140 (5'-GAGATGGTAGCTCTGCATTCG) dan primer *reverse* MU141 (5'-ATCTCAAGACCTCCCAGCAA) (Flisikowski *et al.* 2009). Volume reaksi PCR yang digunakan adalah 25 µL dengan komposisi DNA templat (5-220 ng); air suling steril; 1 mM MgCl₂; 0,2 mg/mL BSA; 0,5 pmol primer *forward* MU140; 0,5 pmol primer *reverse* MU141; dan *Dream Taq Green Master Mix* (*Thermo Scientific*). Proses PCR dilakukan dengan tahapan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, penganelan pada suhu 60°C selama 20 detik, pemanjangan pada suhu 72°C selama 30 detik, dan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Tahapan denaturasi penganelan dan pemanjangan diulang sebanyak 35 siklus. Amplikon kemudian dimigrasikan pada gel agarosa dan divisualisasi menggunakan etidium bromida (EtBr). Amplikon dari kelompok yang sama (LFP/HFP/Kontrol) dengan kualitas pita DNA yang baik (tunggal dan tebal) digabungkan ke dalam 1 tabung reaksi 1,5 mL (*pooling method*) untuk kemudian dikirim ke perusahaan jasa sekuensing *1st base* untuk sekuensing menggunakan metode Sanger (Sanger *et al.* 1977).

Analisis

Hasil sekuensing dari 3 *pooling* sampel disunting menggunakan program *BioEdit* dan selanjutnya disejajarkan (*alignment*) menggunakan MUSCLE dengan program MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). Sekuens gen DRD4 ayam pada penelitian ini saling disejajarkan dengan sekuen *Gallus gallus domesticus* GenBank no aksesinya FJ217173, AB699025, AB699022, AB699014, AB699005, AB699021, dan AB699017.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Panjang sekuens nukleotida dari setiap kelompok sampel (LFP, HFP, dan kontrol) yang didapatkan adalah 642 pb (Gambar 1). Sekuens nukleotida tersebut meliputi ruas intron 3 (*partial*) sebanyak 55 pb, ekson 4 (*whole length*) 202 pb, dan 3' UTR (*partial*) 385 pb dari gen *DRD4* (Gambar 2). Hasil penyejajaran menunjukkan, daerah yang saling tumpang tindih pada sekuens nukleotida ketiga kelompok sampel ayam TIARA G15 tersebut identik (tidak ada keragaman). Ragam nukleotida hanya ditemukan pada sekuens nukleotida gen *DRD4* dari ayam-ayam referensi dan tersebar baik pada ruas intron 3, ekson 4, dan 3' UTR (Tabel 1). Ragam pada ruas ekson 4 yang ditemukan pada ayam

Totenko membuat asam amino yang disandikan pada kodon terkait berubah, dari arginina menjadi lisina.

Tidak ditemukannya ragam nukleotida pada bagian intron 3 (*partial*), ekson 4 (*full length*), dan 3' UTR (*partial*) antarkelompok FP dari ayam TIARA G15 pada penelitian ini, berbeda dengan temuan sebelumnya pada ayam petelur (Flisikowski *et al.* 2009) dan ayam petarung, serta ayam pesuara dan ornamental (Komiyama *et al.* 2014) (Tabel 1). Ragam nukleotida pada sekuens DNA sampel ayam petelur dari Flisikowski *et al.* (2009), yang sejajar dengan sekuens DNA sampel ayam TIARA G15, ditemukan pada bagian intron 3 dan juga 3' UTR. Dua varian nukleotida, yakni C11T dan C43T ditemukan pada bagian intron 3 dan 1 varian nukleotida, yakni T342C terdapat pada 3' UTR (Tabel 1). Ragam nukleotida pada

```

Primer Forward (MU140)
GAGATGGTAGCTCTGCATTCC

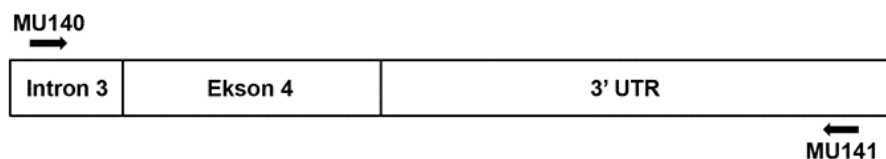
TTAACTCCAACCCCTTTTGAACACAACGCTTCTCTCTTTAATCTTCTCCT 50
Intron 3> -----
GCCAGGTGCTTTCTCTCTCTGCTGGACACCATTTTTGTGGTCCACATTA 100
-----I-----Ekson4>-----
CAAGGGCTCTCTGCAAGTCCTGCACCATTCCCACTCAAGTCACCAGCATC 150
-----
GTCACCTGGCTGGGTTACGTCAACAGCGCTGTCAACCCCATCATTACAC 200
-----
TGTTTTCAACGCCGAGTTCAGGAACCTTCTCCGCAAAGTCTTGCACTCTT 250
-----
CTGCTGAGCTCACTGGAAGTGGAGGGAATGACCAGGATAACTTTTTGTAT 300
-----I--3' UTR>-----
AGTTCATTAAGATCTATTTCTGCCTAAGGTTTGCTGCTTTGTTGGGGA 350
-----
GGAGGGAAGGAGTAAAGATTGTTCCAGGATGGCAGCTCCAGGATGGTGGT 400
-----
TCCCAGCCCTCTGTCTCCACTGTGAGGAGTTACAGGTGAGTGCAGTGGTT 450
-----
ACGGCTTGGATACTCCCCCACTGGAAGCTGCAGGCGTAGCCACTTCTTT 500
-----
AACACTTGGTGTGCTTGACGTAGACATCAAGAGACCCCAAGACTGCGGAT 550
-----
ATTGCACAAGTGGCAGACTTCTGACTAATGATTTTCATGCAGGGCTGTTG 600
-----
CTTTCCAAGGGCAATTGTTTGCTTAGAAATAAAGAAGAC 642
-----

TTGCTGGGAGGTCTTGAGAT
Primer Reverse (MU141)

```

AFLFCWTPFFVWHITRALCKSCTIPTQVT SIVTWLGYVNSAVNPIIYTVFNAEFRNFF
RKVLHSSA

Gambar 1 Sekuens nukleotida gen *DRD4* pada ayam arab *golden red* TIARA G15 yang yang teramplifikasi oleh pasangan primer MU140-141.



Gambar 2 Skema ruas pada gen *DRD4* yang teramplifikasi menggunakan pasangan primer MU140-141.

sekuens DNA sampel ayam petarung serta pesuara dan ornamental dari Komiyama *et al.* (2014), yang sejajar dengan sekuens DNA sampel ayam TIARA G15, ditemukan pada intron 3 dan ekson 4. Tiga varian nukleotida ditemukan di bagian intron 3, yaitu C1T dalam keadaan heterozigot pada ayam Koeyoshi dan C1T dalam keadaan homozigot pada ayam Shamo, C26T pada ayam Katsura-chabo, dan C43T pada ayam Katsura-chabo, Koeyoshi, Shamo, dan Totenko (Tabel 1). Satu varian nukleotida ditemukan pada ekson 4, yakni G221A dalam keadaan heterozigot pada ayam Totenko (Tabel 2). Ragam yang terdapat pada ekson 4 di ayam Totenko menyebabkan perubahan asam amino yang dikodekan oleh triplet kodon yang terkait (arginina berubah menjadi lisina). Perbedaan temuan ini dengan temuan sebelumnya diduga karena ada perbedaan program seleksi yang diterapkan oleh peternak pada setiap trah (*breed*) ayam. Ayam TIARA G15 mengalami

seleksi khusus untuk menghasilkan telur (petelur). Ayam Katsura-chabo dan Shamo diseleksi untuk menjadi ayam petarung. Ayam Koeyoshi diseleksi untuk menghasilkan suara kokok yang panjang (pesuara) dan petarung, ayam Totenko dibentuk sebagai ayam pesuara dan ornamental (hias).

Seleksi merupakan proses memilih individu-individu yang memiliki gen terbaik untuk bereproduksi, sedangkan individu lain yang tidak memenuhi kriteria seleksi tidak diberi kesempatan bereproduksi sehingga generasi berikutnya memiliki gen-gen yang lebih diinginkan (Noor 2004). Seleksi dikelompokkan menjadi seleksi alam dan seleksi buatan. Seleksi alam mengandalkan kemampuan adaptasi individu terhadap lingkungan. Seleksi buatan ditandai oleh peran manusia yang dominan dalam menentukan individu yang boleh bereproduksi berdasarkan sifat-sifat yang sesuai dengan keinginan dan kebutuhan manusia. Seleksi yang lebih

Tabel 1 Ragam nukleotida ruas intron 3, ekson 4, dan 3'UTR gen DRD4

Organisme	Sumber	Tujuan pemeliharaan	Posisi nukleotida varian					
			Intron 3				Ekson 4	3' UTR
			1	11	26	43	221	342
Tiara kontrol		Penghasil telur	C	C	C	C	G	T
Tiara low-FP	Penelitian ini	Penghasil telur	C	C	C	C	G	T
Tiara high-FP		Penghasil telur	C	C	C	C	G	T
<i>Gallus gallus domesticus</i> (FJ217173) tipe liar		Flisikowski <i>et al.</i> 2009	Penghasil telur	C	C	C	C	G
<i>Gallus gallus domesticus</i> (FJ217173) mutan	Flisikowski <i>et al.</i> 2009	Penghasil telur	C	T	C	T	G	C
Katsura-chabo (AB699025)	Komiyama <i>et al.</i> 2014	Petarung	C	C	T	T	G	T
Kawachi-yakko (AB699022)	Komiyama <i>et al.</i> 2014	Petarung	C	C	C	C	G	T
Koeyoshi (AB699014)	Komiyama <i>et al.</i> 2014	Pesuara dan ornamental	C/T	C	C	T	G	T
Shamo (AB699005)	Komiyama <i>et al.</i> 2014	Petarung	T	C	C	T	G	T
Tomaru (AB699021)	Komiyama <i>et al.</i> 2014	Pesuara dan ornamental	C	C	C	C	G	T
Totenko (AB699017)	Komiyama <i>et al.</i> 2014	Pesuara dan ornamental	C	C	C	T	A/G	T

Keterangan: Bagian yang dicetak tebal menunjukkan keberadaan ragam.

Tabel 2 Perubahan asam amino pada ekson 4 gen DRD4 beberapa trah (*breed*) ayam

Organisme	Jenis asam amino yang tersandikan (asam amino ke-56)
Tiara kontrol	Arg
Tiara <i>low</i> -FP	Arg
Tiara <i>high</i> -FP	Arg
<i>Gallus gallus domesticus</i> (FJ217173) tipe liar	Arg
<i>Gallus gallus domesticus</i> (FJ217173) mutan	Arg
Katsura-chabo (AB699025)	Arg
Kawachi-yakko (AB699022)	Arg
Koeyoshi (AB699014)	Arg
Shamo (AB699005)	Arg
Tomaru (AB699021)	Arg
Totenko (AB699017)	Lys

Keterangan: Arg = Arginina dan Lys = Lisina.

dominan terjadi pada ayam adalah seleksi buatan, yaitu seleksi oleh manusia dengan arah seleksi untuk menghasilkan ayam dengan tujuan khusus. Kami menduga ada keterkaitan antara seleksi buatan pada ayam TIARA G15 dengan tidak ditemukannya ragam nukleotida pada ekson 4 gen DRD4 ayam TIARA G15 (Gambar 3). Menurut Nozawa (1980), hewan yang melakukan *inbreeding* dan diseleksi secara buatan memiliki variabilitas genetik yang rendah. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ketiga daerah yang teramplifikasi intron 3 (*partial*), ekson 4 (*full-length*), dan 3'UTR (*partial*) tidak dapat mencirikan perilaku FP dari ketiga kelompok sampel ayam arab *golden red* TIARA G15 (HFP, LFP, dan kontrol) yang teramati dari tidak ada ragam nukelotida.

KESIMPULAN

Ruas intron 3 (*partial*), ekson 4 (*full length*), dan 3' UTR (*partial*) gen DRD4 pada ayam arab *golden red* TIARA G15 kelompok LFP, HFP, dan kontrol memiliki komposisi nukleotida yang identik. Dengan demikian, ruas ini tidak dapat digunakan sebagai media seleksi secara genetik untuk perilaku FP pada ayam arab *golden red* TIARA G15. Untuk kajian selanjutnya, dibutuhkan pengeksplorasian pada ruas lain dari gen DRD4.

DAFTAR PUSTAKA

- Flisikowski K, Schwarzenbacher H, Wysocki M, Weigend S, Preisinger R, Kjaer JB, Fries R. 2009. Variation in neighbouring genes of the dopaminergic and serotonergic systems affects feather pecking behaviour of laying hens. *Animal Genetics*. 40(2): 192-199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01821.x>
- Gillingham MAF, Bechet A, Geraci J, Wattier R, Dubreuil C, Cezilly F. 2012. Genetic polymorphism in dopamine receptor D4 is associated with early body condition in a large population of greater flamingos, *Phoenicopterus roseus*. *Molecular Ecology*. 21(16): 4024-4037. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05669.x>
- Keeling L, Andersson L, Schutz KE, Kerje S, Fredriksson R, Carlborg O, Cornwallis CK, Pizzari T, Jensen P. 2004. Chicken genomics: feather pecking and victim pigmentation. *Nature*. 431(7009): 645–646. <https://doi.org/10.1038/431645a>
- Kjaer JB, Hjarvard BM, Jensen KH, Hansen-moller J, Naesbye LO. 2004. Effects of haloperidol, a dopamine D2 receptor antagonist, on feather pecking behaviour in laying hens. *Applied Animal Behaviour Science*. 86(1–2): 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.11.009>
- Komiyama T, Iwama H, Osada N, Nakamura Y, Kobayashi H, Tateno Y, Gojobori T. 2014. Dopamine receptor genes and evolutionary differentiation in the domestication of fighting cocks and long-crowing chickens. *PLoS ONE*. 9(7): e101778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101778>
- Nozawa K. 1980. Phylogenetic studies on the native domestic animal in East and Southeast Asia. In: *SABRAO Workshop on Animal Genetic Resources in Asia and Oceania*. Tropical Agriculture Research Center Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Tokyo.
- Sabrina F. 2016. Kualitas telur ayam arab golden red (parent stock) pada periode puncak produksi pertama. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(12): 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Savory CJ. 1995. Feather pecking and cannibalism. *World's Poultry Science Journal*. 51(2): 215–219. <https://doi.org/10.1079/wps19950016>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Van Hierden YM, Korte SM, Ruesink EW, Van Reenen CG, Engel B, Kortebooms GA, Koolhaas JM, Blokhuis HJ. 2002. Adrenocortical reactivity and central serotonin and dopamine turnover in young chicks from a high and low feather-pecking line of laying hens. *Physiology & Behavior*. 75(5): 653–659. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00667-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00667-4)