

# KARAKTERISASI GENETIK SAPI ACEH DENGAN MENGGUNAKAN DNA MIKROSATELIT

[*Genetics Characterization of Aceh Cattle Utilizing Microsatellite DNA Analyses*]

M.A.N. Abdullah<sup>1</sup>, R.R. Noor<sup>2</sup>, H. Martojo<sup>2</sup>, dan D.D. Solihin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>2</sup>Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>3</sup>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor

*Received April 30, 2008; Accepted June 16, 2008*

## ABSTRAK

Penelitian bertujuan mengkarakterisasi keragaman genetik dengan menggunakan DNA mikrosatelit yang berguna sebagai *database* dalam program pelestarian plasma nutfah sapi Aceh, pengembangan dan pemanfaatannya secara berkelanjutan. Pengumpulan sampel darah dari 160 ekor sapi Aceh di Provinsi Nanggroe Aceh Darussalam telah diambil masing-masing 40 sampel dari Kota Banda Aceh, Kabupaten Aceh Besar, Pidie dan Aceh Utara. Sampel pembanding telah diambil 10 sampel sapi Bali (Pulau Bali), dua sampel masing-masing sapi Madura (Pulau Madura), PO (Jawa Barat) dan Pesisir (Sumatera Barat). Enambelas lokus digunakan untuk genotiping mikrosatelit. Data ukuran-ukuran alel mikrosatelit dianalisis dengan menggunakan program *Minitab* 14.13, *Mega4* dan *Arlequin* 3.11 serta perangkat lunak *Excel*. Hasil analisis alel-alel mikrosatelit menunjukkan bahwa rata-rata jumlah alel setiap lokus adalah  $10,25 \pm 2,07$ . Persentase heterozigositas sapi Aceh lebih tinggi dibandingkan sapi Bali, tetapi lebih rendah dibandingkan dengan sapi Madura, PO dan Pesisir. Berdasarkan analisis alel mikrosatelit, pohon filogeni menunjukkan sapi Aceh satu kluster dengan sapi PO dan membentuk percabangan pohon filogeni dengan sapi Pesisir dan Madura.

*Kata kunci: Sapi Aceh, Alel, DNA, Mikrosatelit*

## ABSTRACT

The aims of this study were to describe the variation of microsatellite alleles of Aceh cattle. The blood samples (160 samples) were collected from Aceh Besar, Pidie, North Aceh district and Banda Aceh city. For the outgroup comparison, the blood samples were collected from 10 Bali cattle, two samples of each collected from Madura, PO and Pesisir cattle. Sixteen markers were used for genotyping microsatellite DNA. The molecular data were analyzed using *Minitab* 14.13, *Mega4* and *Arlequin* 3.11 and *Excel* software. The result of microsatellite analyses showed that the averages allele number per locus was  $10,25 \pm 2,07$ . The percentage of the heterozygosity of Aceh cattle was higher than those of Bali Cattle, but lower compared to those of Madura, PO and Pesisir cattle. Based on the microsatellite alleles analyses, the Aceh cattle were in the same cluster as PO cattle and were in the same branch of the phylogeny tree as Pesisir and Madura cattle.

*Keywords: Aceh cattle, Allele, DNA, Microsatellite*

## PENDAHULUAN

Sapi asli Indonesia secara genetik dan fenotipik umumnya merupakan: (1) turunan dari Banteng (*Bos javanicus*) yang telah didomestikasi dan dapat pula (2) berasal dari hasil silangan sapi asli Indonesia dengan sapi eksotik yang kemudian mengalami

domestikasi serta adaptasi lokal. Kelompok sapi yang termasuk dalam kategori pertama adalah sapi Bali karena sapi Bali diketahui merupakan hasil domestikasi langsung dari Banteng (MacHugh, 1996; Martojo, 2003; Hardjosubroto, 2004). Kelompok sapi yang kedua adalah sapi Madura karena menurut Payne dan Rollinson (1976); Nijman *et al.* (2003);

Verkaar *et al.* (2003) merupakan hasil silangan Banteng atau sapi Bali dengan sapi zebu yang telah berlangsung kurang lebih 1.500 tahun yang lalu, walaupun hal tersebut tidak terdokumentasi dengan baik secara prinsip pemuliaan (tanpa recording yang jelas). Kedua pengelompokan itu secara genetik telah terbukti dengan menggunakan marker genetik DNA mitokondria (D-loop dan cytochrome-b) dan DNA inti (Mikrosatelit dan AFLP) (Nijman *et al.*, 2003). Kemungkinan yang ketiga adalah sapi eksotik yang telah menetap di Indonesia dalam kurun waktu lama (impor dan perdagangan) dan dapat berkembang biak dengan baik (mampu beradaptasi pada lingkungan setempat). Salah satu yang termasuk dalam kelompok ini adalah sapi Ongole India yang masuk ke Pulau Sumba sehingga menjadi sapi SO dan kemudian sapi ini menurut Hardjosubroto (2004) disebarkan ke Pulau Jawa dan terjadi persilangan dengan sapi Jawa sehingga terbentuk bangsa sapi baru (PO).

Sapi Aceh pada mulanya diduga dimasukkan oleh pedagang India pada masa kerajaan Islam pertama di Peureulak yang terbentuk tahun 847 M (225 H), karena pada masa itu sudah terjalin hubungan kerja sama antarnegara dan perdagangan bebas di Aceh terutama lada yang ingin dikuasai seluruhnya oleh pedagang-pedagang dari Mesir, Parsi, dan Gujarat (catatan sejarah Aceh, catatan Marcopolo 1256 dan Ibnu Bathuthah 1345; Mulyana, 1968; Putra, 2001). Hal ini telah dijelaskan pula oleh Merkens (1926) bahwa, perdagangan yang ramai sudah lama terjalin antara Aceh dengan Malaka. Pedagang Arab, Cina serta India yang datang ke Aceh, mereka membawa barang-barang dagangan dan khususnya imigran India ini sudah dikenal membawa sapi-sapi dari India ke Aceh. Pada abad ke-19 telah menjadi kebiasaan mengimpor ternak melalui Selat Malaka, khususnya ke Pidie dan Aceh Timur Laut (Peureulak).

Kemungkinan sapi-sapi di Aceh mengalami persilangan dengan Banteng yang ada di Sumatera seperti dikemukakan Merkens (1926), namun tidak pernah diverifikasi dan diungkapkan melalui analisis genom, khususnya DNA inti. Beberapa sapi tersebut berkembang dan menyebar ke pesisir barat Aceh hingga ke wilayah pantai Sumatera Barat. Keadaan wilayah pesisir barat tersebut memiliki keadaan pakan terbatas dan kualitas nutrisi rendah sehingga telah turut menyeleksi ragam sapi yang hidup di daerah ini yaitu kebanyakan sapi berukuran kecil ( $\pm 150$  kg) yang dapat

bertahan hidup dengan baik (ILRI, 1995).

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian pada sapi Aceh mencakup inventarisasi sumber daya genetiknya dengan menggunakan penanda genetik. Sekarang ini, di antara beberapa penanda molekuler yang digunakan untuk mengkarakterisasi genetik, mikrosatelit merupakan penanda yang paling disukai. Hal ini karena penanda tersebut bersifat polimorfik dan sangat informatif, kelimpahannya di dalam genom inti relatif besar, dan dapat diamplifikasi melalui PCR. Penanda ini telah digunakan untuk menjelaskan pola migrasi dan domestikasi pada sapi eropa (Loftus *et al.*, 1994; Bruford *et al.*, 2003) dan untuk karakterisasi populasi-populasi ternak sapi dari turunan *Bos indicus* dan *Bos taurus* (Moore *et al.*, 1992; Beja-Pereira *et al.*, 2003). Machado *et al.* (2003) menggunakan lokus-lokus mikrosatelit untuk mengevaluasi keanekaragaman genetik dalam masing-masing bangsa sapi dan perbedaan genetik di antara setiap bangsa. Penanda genetik mikrosatelit dapat memberikan informasi-informasi penting sehingga dapat dibuat keputusan mengenai konservasi pada ternak sapi (Sunnucks, 2000; Sodhi *et al.*, 2006).

Hasil penelitian ini merupakan pelengkap database pada sapi Aceh yang dapat digunakan sebagai dasar pengambilan kebijakan guna menerapkan keputusan yang lebih tepat dan terarah dalam program pelestarian plasma nutfah sapi Aceh, pengembangan dan pemanfaatannya secara berkelanjutan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji keragaman DNA mikrosatelit populasi sapi Aceh.

## MATERI DAN METODE

### Materi Penelitian

DNA total diperoleh dari isolasi sampel darah sapi yang dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) Institut Pertanian Bogor. Genotiping mikrosatelit dilakukan di Laboratorium Molekuler dan Genetik Husdjursgenetik, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Swedia.

Materi penelitian ini adalah sapi Aceh di empat lokasi di Provinsi Nanggroe Aceh Darussalam yang meliputi Kota Banda Aceh, Kabupaten Aceh Besar, Pidie dan Aceh Utara. Sebanyak 40 sampel darah sapi Aceh diambil dari masing-masing lokasi, sehingga keseluruhannya berjumlah 160 sampel. Sampel darah

sapi outgroup sebagai pembanding diambil dari 10 sampel sapi Bali (P3Bali), dua sampel masing-masing sapi Madura (Pulau Madura), PO (Laboratorium Ternak Potong dan Kerja, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor) dan Pesisir (Sumatera Barat). Darah diawetkan dengan alkohol absolut (1:1) dan DNAny diisolasi dengan menggunakan metode Sambrook *et al.* (1989) yang dikembangkan Duryadi (1997).

### Bahan dan Peralatan yang Digunakan

Bahan-bahan pereaksi untuk isolasi DNA, yaitu lysis buffer, digestion buffer, rinse buffer, larutan phenol, larutan chloroform Iso Amyl Alcohol (CIAA), etanol absolut, etanol 70%, larutan TE 1x, larutan TBE 10x. Bahan-bahan untuk visualisasi DNA hasil isolasi, yaitu agarose standar, larutan TBE 1x, dan pewarna ethidium bromide. Bahan pereaksi untuk PCR digunakan dari Applied Biosystems, Taq polymerase Gold, Buffer tanpa MgCl<sub>2</sub>, 20 mM dNTP, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, primer M13 oligo (20 mM M13 FAM, 20 mM M13 PET, 20 mM M13 NED, 20 mM M13 VIC), 20 µM primer F dan R.

Peralatan utama digunakan mikrosentrifus (Eppendorf Centrifuge 5415 C); tungku pemanas (Sybron Thermolyne Nuova II Hot plate); vortex (Maxi Mix Thermolyne 37600 Mixer); waterbath (Grand Incubator); kamera pengamatan Mitsubishi video Copy Processor model P91E CB dilengkapi monitor (UVI Tec); vacuum dryer (Centri Vap Concentrator, Labconco); magnetic stirrer (Mg 78); electronic ballance (AD HX 100); perangkat Submarine Electrophoresis dan voltage/current regulator (Kayaki PS100); NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer; GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems; ABI Applied Biosystems HITACHI 3100 Genetic Analyzer; DNA Engine Gradient Cyler, MJ Research PTC 200 Peltier Thermal Cyler.

### Primer Mikrosatelit

Penelitian ini menggunakan 16 lokus mikrosatelit (BM1818, INRA005, CSRM60, BM2113, HEL5, HEL9, HEL13, INRA63, INRA35, HEL1, ETH225, ETH10, CSSM66, BM1824, ILSTS006 dan ILSTS005) sebagai penanda molekul. Penanda-penanda tersebut dipilih berdasarkan yang direkomendasikan dalam Bishop *et al.* (1994), Vaiman

*et al.* (1994) dan Sodhi *et al.* (2006) karena dapat menunjukkan polimorfisme pada sapi.

### Amplifikasi Lokus Mikrosatelit

Mikrosatelit diamplifikasi melalui Polymerase Chain Reaction (PCR). Setiap pereaksi PCR dibuat volume 10 µl dengan komposisi 1 µl 1x buffer PCR; 1 µl MgCl<sub>2</sub> (20 mM); 0,2 µl dNTP (20 mM); 0,1 µl primer F (20 µM); 0,5 µl primer R (20 µM); 0,5 µl primer M13 oligo (FAM, VIC, PET atau NED); 0,2 µl Taq Polymerase (0,25 U) (ABI Applied Biosystems); 4,5 µl dH<sub>2</sub>O; dan 2 µl DNA total (5 ng/µl; kemurnian berkisar 1,39-1,95 dan konsentrasi 6,66-3245,8 ng/µl). Pencampuran selalu dilakukan penambahan akhir Taq DNA Polymerase.

Kondisi PCR yaitu meliputi pra PCR: denaturasi 95°C 10 menit, dilanjutkan dengan 14 siklus langkah denaturasi pada 95°C 30 detik, 30 detik annealing 65-52 °C (-1°C/siklus) hingga tercapai temperatur primer yang optimal 'touchdown cycle profile', dan langkah elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik. Amplifikasi terakhir terdiri atas 30 siklus langkah denaturasi 95°C 30 detik; 30 detik annealing pada suhu primer optimal 52°C; 30 detik elongasi 72°C; 7 menit ekstensi akhir 72°C dan suhu penyimpanan 4°C. Ukuran-ukuran alel yang diperoleh diketahui melalui analisis dengan program GeneMapper versi 4.0 dan hasil-hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabulasi data sheet Excel.

### Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan program Arlequin versi 3.11 (Excoffier *et al.*, 2006) berdasarkan petunjuk Krafur *et al.* (2005), dukungan program Minitab versi 4.13 (Moore, 2004) dan data sheet Excel. Frekuensi-frekuensi alel, heterozigositas yang dihitung secara langsung dan heterozigositas harapan Hardy-Weinberg dihitung untuk masing-masing penanda sapi penelitian berbasis data frekuensi. Frekuensi alel setiap lokus mikrosatelit dihitung dengan rumus Nei (Nei, 1987; Nei dan Kumar, 2000), yaitu:

$$x_i = (2n_{ii} + \sum_{j \neq i} n_{ij}) / (2n)$$

Keterangan:  $x_i$  merupakan frekuensi alel ke-i suatu lokus;  $n_{ii}$  adalah jumlah individu bergenotipe homozigot alel ke-i;  $n_{ij}$  adalah jumlah individu

bergenotipe heterozigot alel ke-i; n adalah jumlah individu sampel; i dan j adalah jenis alel yang ditemukan pada suatu lokus.

Heterozigositas hitung (observed) diperoleh dari persamaan berikut:

$$H = 2n(1 - \sum_i x_i^2) / (2n)$$

Keterangan:  $x_i$  merupakan jumlah masing-masing heterozigot pada lokus i; n adalah jumlah individu yang teramati.

Heterozigositas harapan (expected) Hardy-Weinberg diperoleh dari frekuensi-frekuensi alel yang teramati:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} (1 - \sum_{i=1}^k p_i^2)$$

Keterangan: n adalah jumlah kopi gen di dalam sampel, k adalah jumlah haplotipe, dan  $p_i$  adalah frekuensi sampel dari haplotipe ke-i. (Nei 1987; Excoffier *et al.* 2006).

Data matriks jarak genetik hasil Arlequin selanjutnya digunakan untuk membuat pohon filogeni dengan menggunakan metode Neighbor-Joining dalam software program Phylip (Phylogeny Inference Package) versi 3.67 dengan aplikasi Neighbor exe dari petunjuk Felsenstein (2007), hasilnya berbentuk file outtree. Pembacaan dan pengaturan file outtree hasil dari analisis program tersebut digunakan software program MEGA versi 4.0 Beta Release (Tamura *et al.*, 2007) dengan pilihan Root on Mid-point di submenu View.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Amplifikasi Mikrosatelit

Hasil amplifikasi DNA mikrosatelit dianalisis dengan menggunakan program GeneMapper 4.0 setelah proses elektroforesis dalam mesin Applied Biosystems HITACHI 3100 Genetic Analyzer dengan ladder LIZ size Standard 500. Angka pada ordinat X-axis merupakan ukuran alel dalam pasang basa (basepairs) dan angka pada ordinat Y-axis merupakan sinyal warna (label/dye) yang menunjukkan ketinggian peak yaitu intensitas fluoresen dan menunjukkan konsentrasi hasil amplifikasi (Ilustrasi 1).

Semua marker mikrosatelit yang dipergunakan (BM1818, INRA005, CSRM60, BM2113, HEL5, HEL9, HEL13, INRA63, INRA35, HEL1, ETH225,

ETH10, CSSM66, BM1824, ILSTS006, dan ILSTS005) berhasil teramplifikasi, kecuali lokus HEL5 yang tidak teramplifikasi pada sapi Madura (dua sampel yang digunakan). Ukuran-ukuran alel yang diperoleh dari produk PCR bervariasi dari yang terendah 101 pb pada lokus CSRM60 sampai tertinggi 321 pb pada lokus ILSTS006. Penggunaan primer BM1818 relatif lebih sedikit (71,6%) dapat teramplifikasi dibanding penggunaan primer lain, dan penggunaan primer ILSTS005 berhasil mengamplifikasi hampir seluruh sampel yang digunakan (99,4%).

Ada beberapa sampel yang tidak dapat teramplifikasi dalam penelitian ini dengan penggunaan primer BM1818, INRA005, CSRM60, BM2113, HEL5, HEL9, HEL13, INRA63, INRA35, HEL1, ETH225, ETH10, CSSM66, BM1824, ILSTS006, dan ILSTS005, karena kemungkinan beberapa sapi penelitian terdapat null allele seperti dilaporkan dalam penelitian Sodhi *et al.* (2006). Null allele adalah alel-alel yang secara konsisten tidak teramplifikasi selama PCR, sehingga tidak dapat dideteksi pada saat penggenotipan individu (Steven dan Taper, 2006). Null allele pada lokus mikrosatelit tidak dapat divisualisasikan karena ada mutasi dalam sekuens pengapit yang berkomplemen dengan primer sehingga lokus ini tidak dapat teramplifikasi (Lehmann *et al.*, 1996).

### Alel dan Lokus Polimorfik

Pengukuran keragaman genetik 160 sampel sapi Aceh dengan menggunakan 16 lokus mikrosatelit, menunjukkan semua lokus pada sapi Aceh adalah polimorfik, sedangkan lokus HEL9 dan HEL1 adalah monomorfik pada sapi Bali (satu alel dengan frekuensi 95%). Lokus INRA005, CSRM60, HEL13, INRA35 dan HEL1 adalah monomorfik pada sapi Madura dan lokus HEL5 masing-masing monomorfik pada sapi PO dan Pesisir. Apabila digunakan sampel sapi Madura, PO dan Pesisir yang lebih banyak, maka kemungkinan tidak ada monomorfik pada lokus-lokus tersebut.

Frekuensi alel tertentu yang lebih besar atau sama dengan 0,95, maka alel tersebut digolongkan monomorfik (Hartl, 1988). Penelitian terdahulu didapatkan hasil bahwa, alel pada lokus HEL9 adalah monomorfik pada sapi Bali, yaitu seluruh sapi Bali bergenotipe AA (Winaya, 2000; Noor *et al.*, 2000). Demikian juga dalam penelitian Handiwirawan *et al.*

(2003) pada lokus HEL9, alel A merupakan alel dengan frekuensi sangat tinggi yaitu 92,9%, sehingga lokus HEL9 sebagai lokus dengan alel yang spesifik terfiksasi pada alel ini pada sapi Bali. Hasil penelitian Sarbaini (2004) pada sapi Pesisir dengan penggunaan enam lokus mikrosatelit, ditemukan empat lokus

(38,41%) dengan rata-rata  $3,94 \pm 1,53$  ditemukan pada sapi Bali, 26 alel (15,85%) dengan rata-rata  $1,31 \pm 1,08$  ditemukan pada sapi Madura, 43 alel (26,22%) dengan rata-rata  $2,63 \pm 1,03$  ditemukan pada sapi PO dan 41 alel (25,00%) dengan rata-rata  $2,50 \pm 1,10$  ditemukan pada sapi Pesisir (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah Alel Masing-Masing Lokus Mikrosatelit pada Sapi Aceh, Bali, Madura, PO, dan Pesisir

Lokus	Jumlah alel	Sapi				
		Aceh (160)	Bali (10)	Madura (2)	PO (2)	Pesisir (2)
BM1818	12	11	7	2	4	2
INRA005	7	6	2	1	4	4
CSRM60	13	12	5	1	2	2
BM2113	10	8	5	2	3	4
HEL5	10	10	4	0	1	1
HEL9	13	13	2	3	4	4
HEL13	8	8	3	1	2	2
INRA63	8	7	4	2	3	2
INRA35	10	10	2	1	3	2
HEL1	8	7	2	1	2	2
ETH225	12	12	4	2	2	2
ETH10	8	8	4	2	2	3
CSSM66	13	10	6	2	3	4
BM1824	10	7	5	2	3	2
ILSTS006	13	12	5	2	2	2
ILSTS005	9	7	3	2	3	3
Total alel	164	148	63	26	43	41
Kisaran JA	7-13	6-13	2-7	0-3	1-4	1-4
PLP	-	1,00	1,00	0,69	0,94	0,94
Rataan JAPL	10,25	9,25	3,94	1,31	2,63	2,50
SD	2,08	2,27	1,53	1,08	1,03	1,10
KK	20,92	24,49	38,76	44,23	32,49	37,62

Keterangan : JA = jumlah alel; PLP = proporsi lokus polimorfik; JAPL = jumlah alel per lokus; SD = standar deviasi; KK = koefisien keragaman; ( ) = jumlah sampel

(ETH225, HEL9, INRA037 dan ILSTS006) menunjukkan alel-alel khas (diagnostik) pada dua subpopulasi (Pesisir Selatan dan Padang Pariaman). Satu lokus (ETH3) menghasilkan alel khas hanya pada subpopulasi Padang Pariaman dan lokus lain (BM2113) tidak menghasilkan alel khas pada kedua subpopulasi.

Sebanyak 164 alel mikrosatelit ditemukan dari total 176 sampel sapi, yang diukur keragamannya dengan 16 lokus mikrosatelit (BM1818, INRA005, CSRM60, BM2113, HEL5, HEL9, HEL13, INRA63, INRA35, HEL1, ETH225, ETH10, CSSM66, BM1824, ILSTS006, dan ILSTS005). Sejumlah 148 alel (90,24%) ditemukan dalam populasi sapi Aceh dengan rata-rata  $9,25 \pm 2,27$  yang merupakan jumlah alel tertinggi, dan pada kelompok sapi pembandingan sebanyak 63 alel

Jumlah alel dalam populasi sapi Aceh berkisar antara enam alel pada lokus INRA005 sampai 13 alel pada lokus HEL9 yang merupakan jumlah alel tertinggi, sedangkan sapi Bali memiliki jumlah alel terendah pada empat lokus (INRA005, HEL9, INRA35 dan HEL1) yaitu masing-masing dua alel, dan jumlah alel tertinggi (tujuh alel) ditemukan pada lokus BM1818. HEL5 merupakan lokus yang sangat sedikit bisa teramplifikasi pada sapi Bali yaitu hanya 50%, dan tidak ada sampel yang teramplifikasi pada sapi Madura pada lokus tersebut.

Fenomena rata-rata jumlah alel yang tinggi pada sapi Aceh karena variasi genetik sapi Aceh pada lokus-lokus mikrosatelit tersebut sangat beragam, yaitu mempunyai rata-rata keragaman gen pada semua lokus  $0,6014 \pm 0,3384$ . Keragaman yang tinggi pada lokus-

lokus mikrosatelit ini dipengaruhi oleh tingkat mutasinya. Menurut Muladno (2006), DNA mikrosatelit memiliki laju perubahan basa nukleotida tinggi yang disebabkan adanya perubahan jumlah ulangan dari urutan basa bergandengan mencapai  $10^3$ /gamet/generasi. Laju perubahan mikrosatelit dipengaruhi oleh motifnya. Mikrosatelit dengan motif dinukleotida memiliki laju mutasi 1,5-2 kali lebih cepat dibandingkan dengan motif tetra-nukleotida.

Ada 16 alel mikrosatelit (9,76%) dari 16 lokus yang dipergunakan tidak ditemukan pada sapi Aceh, tetapi terdapat pada sapi Bali yaitu satu alel masing-masing ditemukan pada lokus BM1818 (ukuran 270 bp), CSRM60 (ukuran 114 bp), INRA63 (ukuran 192 bp) dan ILSTS006 (ukuran 297 bp), dua alel pada lokus BM2113 masing-masing berukuran 140 dan 148 bp, tiga alel pada lokus CSSM66 (ukuran 191, 193 dan 209 bp) dan tiga alel pada lokus BM1824 (ukuran 207, 209 dan 211 bp). Tiga alel mikrosatelit lainnya (1,83%) yaitu alel F pada lokus INRA005 dengan ukuran 161 bp hanya dimiliki sapi Pesisir, alel B pada lokus INRA35 dengan ukuran 119 bp hanya dimiliki sapi Madura dan alel C pada lokus ILSTS005 dengan ukuran 194 bp ditemukan pada dua bangsa sapi (Bali dan Madura). Sebanyak enambelas alel mikrosatelit tersebut spesifik hanya terdapat pada sapi pembandingan.

Disamping itu, dari empat sapi pembandingan yang digunakan dalam penelitian ini, ada beberapa alel (berkisar 1-6) hanya terdapat pada sapi Aceh dengan frekuensi yang relatif kecil. Diduga alel-alel tersebut merupakan alel mutasi sebagai akibat proses replication slippage yang menghasilkan rangkaian yang lebih panjang (Levinson dan Gutman, 1987; Riwantoro, 2005). Kemungkinan lain adalah ada aliran gen dari bangsa-bangsa sapi lain yang masuk ke dalam populasi sapi Aceh.

### **Variasi Genetik dan Keseimbangan Hardy-Weinberg**

Jumlah rata-rata total alel per lokus dalam penelitian ini adalah  $10,25 \pm 2,08$ . Lokus yang paling informatif (heterozigositas yang dihitung secara langsung dengan nilai tertinggi) adalah BM2113 (88%) dan lokus yang paling tidak informatif (heterozigositas yang dihitung secara langsung dengan nilai terendah) adalah HEL5 (15%) (Tabel 2). Lokus HEL5 pada sapi Madura, PO dan Pesisir tidak ada informasi, tetapi dapat

menunjukkan heterozigositas pada sapi Aceh sebesar 35% dan sapi Bali 40%. Primer-primer yang sangat informatif dapat dipergunakan untuk penilaian pejantan-pejantan sapi penelitian, seperti yang dinyatakan Machado *et al.* (2003) yang melakukan penelitian pada empat bangsa sapi (Gyr, Nellore, Guzarat dan Holstein). Primer-primer yang paling informatif (BMS1237, BMS1126 dan BMS518) merupakan kandidat yang baik untuk pengujian pejantan terkait dengan nilai heterozigositas hitungnya yang tinggi, jumlah alel yang besar dan frekuensi alelnya yang terdistribusi secara baik.

Lokus HEL9 menunjukkan heterozigositas sangat tinggi (82%) pada sapi Aceh dan sangat rendah pada sapi Bali (10%), sedangkan pada sapi Madura memiliki heterozigositas sebesar 50% dan 100% pada masing-masing sapi PO dan Pesisir. Lokus-lokus yang menampilkan heterozigositas yang sangat kecil pada sapi Bali yaitu HEL9 dan HEL1 (10%), INRA 63 (20%) dan INRA005 (22%). Lokus INRA35 menunjukkan tidak ada heterozigositas pada sapi Bali dan Pesisir, tetapi ada heterozigositas pada sapi Aceh (60%) dan PO (50%). Semua primer yang dipergunakan dapat menunjukkan heterozigositas pada sapi lokal, kecuali INRA35 pada sapi Bali dan Pesisir, ETH10 pada sapi PO dan INRA35, HEL1 pada sapi Pesisir.

Rata-rata heterozigositas yang dihitung secara langsung untuk keenambelas lokus adalah 60% dan heterozigositas harapan Hardy-Weinberg adalah 63%. Sebagian besar lokus, heterozigositas hitung langsung dan heterozigositas Hardy-Weinberg menunjukkan nilai-nilai yang serupa meskipun ada sedikit lokus yang menunjukkan heterozigositas hitung langsungnya lebih kecil daripada heterozigositas harapan pada sapi-sapi penelitian.

Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) diujikan pada setiap lokus dengan menggunakan pengujian dari gabungan alel-alel secara tidak acak di dalam masing-masing individu diploid berdasarkan analisis program Arlequin (Tabel 2). Tujuh lokus pada sapi Aceh (BM2113, HEL5, INRA35, HEL1, ETH10, ILSTS006, ILSTS005) menunjukkan adanya deviasi terhadap keseimbangan hukum Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ). Pada sapi Aceh, sebagian kecil lokus (tujuh lokus) menunjukkan kemungkinan keseimbangan Hardy-Weinberg yang sangat rendah. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa di dalam populasi sapi Aceh,

Tabel 2. Heterozigositas Masing-masing Locus Mikrosatelit pada Sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir

Lokus	Aceh		Bali		Madura		PO		Pesisir		Rataan	
	H <sup>hit</sup>	H <sup>h-w</sup>	H <sup>hit</sup>	P	H <sup>hit</sup>	P	H <sup>hit</sup>	P	H <sup>hit</sup>	P	H <sup>hit</sup>	H <sup>h-w</sup>
BMI18	0,7091	0,7121	0,8000	0,34	1,0000	0,6667	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5000	0,5000
INRA005	0,7029	0,7304	0,2222	0,34	-	-	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5850
CSR60	0,7394	0,7909	0,7778	1,00	-	-	0,5000	0,5000	0,5000	1,0000	1,0000	0,6193
BM2113	0,6972	0,8147	0,7000	0,00*	1,0000	0,6667	1,0000	0,8333	1,0000	1,0000	1,0000	0,6034
HEL5	0,3497	0,6996	0,4000	0,00*	-	-	-	-	-	-	-	0,8794
HEL9	0,8170	0,8354	0,83	0,83	0,5000	0,8333	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2866
HEL13	0,5513	0,5818	0,7000	0,42	-	-	0,5000	0,5000	0,5000	1,0000	0,5000	0,7537
INRA63	0,5762	0,6089	0,60	0,00*	1,0000	0,6667	1,0000	0,8333	0,34	1,0000	0,6667	0,4458
INRA35	0,6043	0,7538	0,0000	0,05*	-	-	0,5000	0,8333	0,34	0,0000	0,6667	0,6772
HEL1	0,2885	0,3054	0,1000	1,00	-	-	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,6667	0,4887
ETH225	0,5669	0,5887	0,9000	0,66	1,0000	0,6667	1,0000	0,5000	1,0000	0,5000	0,5000	0,4144
ETH10	0,7133	0,7118	0,4000	0,11	1,0000	0,6667	1,0000	0,6667	0,33	1,0000	0,8333	0,6016
CSSM66	0,7320	0,7450	0,6000	0,25	1,0000	0,6667	1,0000	0,8333	1,0000	1,0000	1,0000	0,6227
BMI824	0,6224	0,6430	0,5556	0,57	0,5000	0,5000	0,5000	0,8333	0,33	0,5000	0,5000	0,7052
ILST006	0,5645	0,7568	0,9000	0,25	1,0000	0,6667	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8664
ILST005	0,7170	0,7628	0,5000	0,39	1,0000	0,6667	1,0000	0,8333	1,0000	0,5000	0,5000	0,6312
Rataan	0,6220	0,6901	0,4910	0,5761	0,9000	0,6667	1,0000	0,7333	0,8111	0,6667	0,7444	0,5976
SD	0,1415	0,1278	0,2985	0,2462	0,2108	0,07857	0,3200	0,1880	0,3619	0,2170	0,2170	0,2227
												0,1516

sampel-sampel terpilih menunjukkan populasi yang tidak lagi berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg. Hal ini kemungkinan karena adanya transportasi ternak yang dapat terjadi pertukaran ternak antarlokasi peternakan lokal sampai ke tingkat kabupaten, sehingga terjadi aliran gen. Lebih umum terjadi, karena sapi Aceh digembalakan, sehingga perkawinan dengan sapi lain dapat saja terjadi di lapangan. Disamping itu, ada kemungkinan telah terjadi seleksi negatif dalam populasi sapi Aceh, yaitu sapi-sapi yang berukuran besar dijual peternak dan hanya tinggal sapi-sapi yang berukuran kecil yang berada dalam populasi dan mendapat kesempatan berkembang biak.

Penggunaan sampel yang terbatas pada sapi Bali menunjukkan deviasi terhadap keseimbangan Hardy-Weinberg pada lokus INRA63 dan INRA35. Hal ini mungkin terkait dengan pengambilan sampel, sehingga sebagian besar lokus menunjukkan keseimbangan.

Pembagian populasi sapi Aceh menjadi sub-sub populasi (Kota Banda Aceh, Kabupaten Aceh Besar, Pidie, dan Aceh Utara), maka berdasarkan hasil Amova dari analisis Arlequin 3.11 pada DNA mikrosatelit, sapi Aceh mengalami inbreeding dengan nilai koefisien inbreeding yang tergolong tinggi yaitu sebesar 0,11. Hal ini terjadi kemungkinan salah satu penyebabnya adalah penggunaan pejantan yang sama secara terus-menerus oleh peternak karena peternak sapi Aceh semakin sulit mendapatkan pejantan Aceh murni akibat banyak sapi Aceh yang telah disilangkan. Menurut Richard dan Thorpe (2000), inbreeding yang terjadi di dalam populasi kecil menyebabkan pengurangan heterozigositas dan peningkatan frekuensi abnormalitas resesif.

Rataan heterozigositas genetik pada 16 lokus dari kelima sapi lokal yaitu masing-masing sapi Aceh  $0,622 \pm 0,142$ ; Bali  $0,491 \pm 0,299$ ; Madura  $0,900 \pm 0,211$ ; PO  $0,733 \pm 0,320$ ; dan Pesisir  $0,667 \pm 0,362$ . Keragaman heterozigositas dalam populasi sapi Aceh lebih tinggi dibanding dengan keragaman heterozigositas sapi Bali, dan cuplikan sampel terbatas (dua sampel) pada sapi PO, Madura dan Pesisir menunjukkan keragaman heterozigositas yang lebih tinggi. Heterozigositas yang tinggi dalam populasi sapi Aceh menunjukkan bahwa sapi ini mengandung alel-alel sapi lain atau alel mutasi dengan frekuensi rendah. Hal ini dimungkinkan karena program inseminasi

buatan yang diterapkan di Aceh telah menimbulkan segregasi gen-gen sapi lain yang beragam dan meluas dalam populasi sapi Aceh dan dapat juga karena belum ada seleksi yang dilakukan.

### Jarak Genetik Sapi Aceh dan Sapi Outgroup

Berdasarkan perhitungan nilai jarak genetik pada sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir, maka nilai

berturut-turut yaitu PO, Pesisir, Madura dan Bali. Hasil perhitungan tersebut diperkuat dengan dendogram jarak genetik hasil analisis DNA mikrosatelit (Ilustrasi 2).

Sapi Aceh memiliki kluster yang sama dengan sapi PO pada jarak genetik 0,0272 dan membentuk percabangan dengan sapi Pesisir dari Sumatera Barat.

Tabel 3. Matriks Jarak Genetik Nei yang Diperoleh dari Frekuensi-frekuensi Alel Pada 16 Lokus Mikrosatelit Sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir

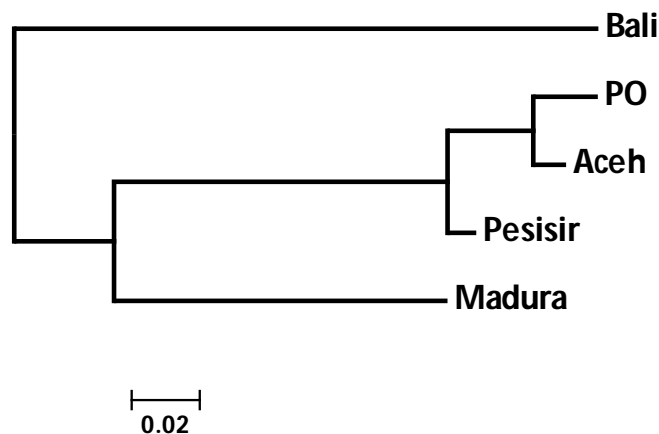
	Aceh	Bali	Madura	PO	Pesisir
Aceh	0,0000				
Bali	0,3004	0,0000			
Madura	0,2416	0,2973	0,0000		
PO	0,0272	0,3202	0,2793	0,0000	
Pesisir	0,0516	0,3590	0,1498	0,0417	0,0000

jarak genetik terkecil adalah antara sapi Aceh terhadap sapi PO yaitu sebesar 0,0272 dan nilai jarak genetik tertinggi adalah antara sapi Bali dan sapi Pesisir yaitu sebesar 0,3590 (Tabel 3).

Matriks jarak genetik Nei, menunjukkan bahwa sapi Aceh merupakan sapi yang berbeda dengan sapi lokal lain: 0,3004 kedekatannya dengan sapi Bali; 0,2416 kedekatannya dengan sapi Madura; 0,0272 kedekatannya dengan sapi PO; dan 0,0516 kedekatannya dengan sapi Pesisir. Hasil yang didapatkan ini menunjukkan bahwa sapi Aceh mempunyai jarak genetik yang lebih dekat dengan sapi PO dibanding dengan sapi Pesisir, Madura dan Bali. Urutan hubungan jarak genetik yang terdekat hingga terjauh antara sapi Aceh dan sapi pembandingan

Sapi Madura, mempunyai jarak genetik yang lebih jauh dengan sapi Bali (0,2973), sehingga dikelompokkan bersama sapi Pesisir, Aceh dan PO dengan jarak genetik masing-masing 0,1498; 0,2416 dan 0,2793. Hasil yang ditemukan ini menunjukkan bahwa sapi Aceh, PO, Pesisir dan Madura mengandung materi genetik sapi zebu, sedangkan sapi Bali mempunyai kluster sendiri yang terpisah dari pengelompokan sapi tersebut. Menurut Martojo (2003), sapi Bali merupakan hasil domestikasi langsung dari Banteng (*Bos javanicus*, *Bos banteng*, *Bos sondaicus*).

Berdasarkan DNA mikrosatelit menunjukkan sapi PO telah diketahui merupakan turunan dari *Bos indicus*. Ada alel-alel mikrosatelit yang dimiliki sapi PO juga dimiliki sapi Aceh dengan frekuensi yang



Ilustrasi 2. Dendogram Pohon Filogeni Berdasarkan Metode *Neighbor-Joining* dari Data Jarak Genetik Nei Pada Sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir



umumnya tinggi, namun tidak dimiliki oleh sapi Bali. Ada alel-alel yang dimiliki sapi Bali juga dimiliki sapi Aceh dengan frekuensi yang umumnya rendah, tetapi tidak dimiliki oleh sapi PO. Hal ini menunjukkan bahwa ancestor sapi Aceh adalah dominan dari *Bos indicus* dan telah terjadi introgresi alel-alel dari sapi Bali ke dalam materi genetik sapi Aceh. Locus-lokus yang menunjukkan adanya alel-alel yang dimiliki sapi PO juga ditemukan pada sapi Aceh yaitu BM1818 (alel B 274 bp); INRA005 (alel C 157 bp, G 163 bp); BM2113 (alel H 156 bp); HEL9 (alel E 171 bp, K 183 bp); HEL13 (alel C 199 bp); INRA35 (alel B 119 bp); ETH10 (alel C 228 bp); CSSM66 (alel D 197 bp, K 213 bp); BM1824 (alel E 202 bp, J 212 bp); ILSTS006 (alel E 305 bp); ILSTS005 (alel H 204 bp). Locus-lokus yang menunjukkan ada alel-alel yang dimiliki sapi Bali juga ditemukan pada sapi Aceh yaitu BM1818 (alel H 286 bp, J 290 bp); INRA005 (alel A 153 bp); CSRM60 (alel D 110 bp, G 116 bp); BM2113 (alel B 142 bp); HEL5 (alel F 180 bp, G 182 bp); HEL13 (alel D 201 bp, F 205 bp, G 207 bp); INRA63 (alel D 198 bp); dan INRA35 (alel C 121 bp).

### KESIMPULAN

Berdasarkan DNA mikrosatelit, sapi Aceh memiliki derajat heterozigositas yang tinggi. Urutan kedekatan genetik sapi Aceh dengan sapi lokal lain adalah PO, Pesisir, Madura dan Bali, dengan pohon filogeni menunjukkan sapi Aceh memiliki klaster yang sama dengan sapi PO dan Pesisir serta satu kelompok dengan sapi Madura, sedangkan sapi Bali mempunyai klaster sendiri yang terpisah dari pengelompokan keempat sapi tersebut. Berdasarkan kesamaan genetiknya maka sapi Aceh dekat dengan sapi PO, Pesisir dan Madura tetapi untuk alel-alel tertentu berbeda dengan sapi Bali.

### DAFTAR PUSTAKA

- Beja-Pereira, A., P. Alexandrino, I. Bessa, Y. Carretero, S. Dunner, N. Ferrand, J. Jordana, D. Laloe, K. Moazami-Goudarzi, A. Sanchez and J. Cañon. 2003. Genetic characterization of Southwestern European Bovine breeds: A historical and Biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Heredity*. 94 (3): 243-250.
- Bishop, MD., S.M. Kappes, J.W. Keele, R.T. Stone, I.F. Sunden, G.A. Hawkin, S.S. Toldo, R. Fries, M.D. Grosz, J. Voo and C.W. Beattie. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. 136: 619-639.
- Bruford, M.W., D.G. Bradley and G. Luikart. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet*. 4: 900-910.
- Duryadi, D. 1997. Isolasi dan Purifikasi Mitochondrion (mtDNA). Laboratorium Molekuler FMIPA. Biotrop, IPB, Bogor.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2006. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland.
- Felsenstein, J. 2007. *Phylip (Phylogeny Inference Package) version 3.67*. University of Washington.
- Handiwirawan, E., R.R. Noor, Muladno and L. Schüler. 2003. The use of HEL9 and INRA035 microsatellites as specific markers for Bali cattle. *Arch Tierz, Dummerstorf*. 46 (6): 503-512.
- Hardjosubroto, W. 2004. Alternatif kebijakan pengelolaan berkelanjutan sumberdaya genetik sapi potong lokal dalam sistem perbibitan ternak lokal. *Wartazoa*. 14 (3): 93-97.
- Hartl, D.L. 1988. *A Primer of Population Genetic*. 2<sup>nd</sup> Ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- [ILRI] International Livestock Research Institute. 1995. *Global Agenda for Livestock Research. Proceedings of the Consultation for the South-East Asia Region. 10–13 May 1995 IRRI, Los Banos, The Philippines*.
- Krafsur, E.S., M.A Cummings, M.A., J.G. Marquez and J.D. Nason. 2005. Geographic differentiation in the house fly estimated by microsatellite and mitochondrial variation. *Heredity*. 96 (5): 502-512.
- Lehmann, T., W.A. Hawley and F.H. Collins. 1996. An evolution of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics*. 144 : 1155-1163.
- Levinson, G. and G.A. Gutman. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol*. 4: 203-221.
- Loftus, R.T., D.E. MacHugh, D.G. Bradley, P.M. Sharp and P. Cunningham. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 91: 2757-2761.
- Machado, M.A., I. Schuster, M.L. Martinez and A.L.

- Campos. 2003. Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. *R Bras Zootec.* 32 (1): 93-98.
- MacHugh, D.E. 1996. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. Theses. Department of Genetics. Trinity College, University of Dublin.
- Martojo, H. 2003. Indigenous Bali Cattle: The Best Suited Cattle Breed for Sustainable Small Farms in Indonesia. Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Animal Science, Bogor Agricultural University, Indonesia.
- Merkens, J. 1926. De Paarden en Runderteelt in Nederlandsch Indie. *Veeartsenijkundige Mededeeling.* No. 51. Landsdrukkerij-Weltevreden, Nederland.
- Moore, S.S., W. Barendse, K.T. Berger, S.M. Armitage and D.J.S. Hetzel. 1992. Bovine and ovine DNA microsatellites from the EMBL and GenBank databases. *Anim Genet.* 23: 463-467.
- Moore, J. 2004. Minitab Release 14.13 Statistical Software. Minitab Inc., USA.
- Muladno. 2006. Aplikasi Teknologi Molekuler dalam Upaya Peningkatan Produktivitas Hewan. Pelatihan Teknik Diagnostik Molekuler untuk Peningkatan Produksi Peternakan dan Perikanan di Kawasan Timur Indonesia. Kerjasama Pusat Studi Ilmu Hayati, Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat Institut Pertanian Bogor dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas, Bogor.
- Mulyana, S. 1968. Runtuhnya Kerajaan Hindu Jawa dan Timbulnya Negara-negara Islam di Nusantara. Bharata, Jakarta.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press. Inc. USA.
- Nijman, I.J., M. Otsen, E.L.C. Verkaar, C.D. Ruijter, E. Hanekamp, J.W. Ochieng, S. Shamshad, J.E.O. Rege, O. Hanotte, M.W. Barwegen, T. Sulawati and J.A. Lenstra. 2003. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity.* 90: 10-16.
- Noor, R.R., Muladno, B. Benyamin, Z. Hedah dan Herliantini. 2000. Uji kemurnian sapi Bali melalui protein, DNA mikrosatelit, struktur bulu dan kromosom. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor dan Balai Inseminasi Buatan Singosari. Bogor.
- Payne, W.J.A. and D.H.L Rollinson. 1976. Madura cattle. *Z Tierzüch Züchtsbiol.* 93: 89-100.
- Putra L. 2001. Panglima Teuku Nyak Makam Pahlawan Dua Pusara. Titian Ilmu Insani, Bekasi.
- Richard, M. and R.S. Thorpe. 2000. Highly polymorphic microsatellites in the lacertid *Gallotia galloti* from the western Canary Islands. *Mol Ecol.* 9: 1919-1952.
- Riwantoro. 2005. Konservasi plasma nutfah Domba Garut dan strategi pengembangannya secara berkelanjutan. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Sekolah Pascasarjana. Program Studi Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarbaini. 2004. Kajian keragaman karakter eksternal dan DNA mikrosatelit sapi Pesisir di Sumatera Barat. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Sekolah Pascasarjana. Program Studi Ilmu Ternak.
- Sodhi, M., M. Mukesh, B. Prakash, S.P.S Ahlawat and R.C. Sobti. 2006. Microsatellite DNA typing for assessment of genetic variability in Tharparkar breed of Indian zebu (*Bos indicus*) cattle, a major breed of Rajasthan. *J Genet.* 85: 165-170.
- Steven, T.K. and M.L. Taper. 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics.* DOI 10.1007/s10592-006-9134-9: 1-5.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers from population biology. *Trends Ecol Evol.* 15: 199-203.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Advance Access published May 7. Oxford University Press. *Mol Biol Evol* 10.1093/molbev/msm092.
- Vaiman, D.D., Melcier, K. Moazami-Goudarzi, A. Eggen, R. Ciampolini, A. Lepingle, R. Veimala, J. Kaukinen, S.L. Varvio, P. Martin, H. Lev?ziel and G. Gu?rin. 1994. A Set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome.* 5: 288-297.
- Verkaar, E.L.C., H. Vervaecke, C. Roden, L. Romero,

- Mendoza, M.W. Barwegen, T. Susilawati, I.J. Nijman and J.A. Lenstra. 2003. Paternally inherited markers in bovine hybrid populations. *Heredity*. 91: 565–569.
- Winaya, A. 2000. Penggunaan penanda molekuler mikrosatelit untuk deteksi polimorfisme dan analisis filogenetik genom sapi. Thesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Sekolah Pascasarjana. Program Studi Bioteknologi.