

Kejadian Indel Simultan pada Intron 7 Gen *Branched-Chain α -Ketoacid Dehydrogenase E1a (BCKDHA)* pada Sapi Madura

(Simultaneous Indel of Intron 7 of *Branched-Chain α -Ketoacid Dehydrogenase E1a (BCKDHA)* Gene in Madura Cattle)

Asri Febriana, Achmad Farajallah*, Dyah Perwitasari

(Diterima Januari 2015/Disetujui April 2015)

ABSTRAK

Sapi Madura merupakan salah satu bangsa sapi lokal Indonesia yang berasal dari persilangan sapi Zebu (*Bos indicus*) dan banteng (*Bos javanicus*). *Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase* (BCKDH) adalah salah satu dari kompleks enzim utama yang ada di membran dalam mitokondria yang memetabolisme *branched chain amino acid* (BCAA), yaitu valin, leusin, dan isoleusin. Keragaman runutan nukleotida suatu gen sangat menentukan efisiensi dari enzim yang disandikannya. Tulisan ini bertujuan untuk mengidentifikasi variasi nukleotida yang terdapat pada ruas intron 7, ekson 8, dan intron 8 gen BCKDHA pada sapi Madura. Penelitian ini dilakukan terhadap tiga peruntukan sapi Madura, yaitu sapi karapan (balapan), sapi sonok (pajangan), dan sapi sayur (pedaging). Hasil analisis menunjukkan bahwa variasi pada intron lebih tinggi dibandingkan dengan ekson. Indel simultan ditemukan pada posisi basa ke-34 dan 68 pada sapi sonok. Selain itu, ditemukan varian C266T pada sapi pedaging. Variasi-varian tersebut tidak menyebabkan terjadinya perubahan asam amino yang signifikan. Tidak ada mutasi khusus pada ruas intron 7, ekson 8, dan intron 8 yang ditemukan pada peruntukan sapi Madura. Hal ini menunjukkan tidak adanya diferensiasi peruntukan sapi Madura dari sisi tekanan seleksi terhadap gen BCKDHA.

Kata kunci: gen BCKDHA, indel simultan, sapi Madura

ABSTRACT

Madura cattle is one of the Indonesian local cattle breeds derived from crossing between Zebu cattle (*Bos indicus*) and banteng (*Bos javanicus*). *Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase* (BCKDH) is one of the main enzyme complexes in the inner mitochondrial membrane that metabolizes *branched chain amino acid* (BCAA), ie valine, leucine, and isoleucine. The diversity of the nucleotide sequences of the genes largely determine the efficiency of enzyme encoded. This paper aimed to determine the nucleotide variation contained in section intron 7, exon 8, and intron 8 genes BCKDHA on Madura cattle. This study was conducted on three Madura cattle that used as bull race (karapan), beauty contest (sonok), and beef cattle. The analysis showed that the variation in intron higher than occurred in the exon. Simultaneous indel found at base position 34 and 68 in sonok cattle. In addition, the C266T variant found in beef cattle. These variants do not cause significant changes in *amino acids*. There was no specific mutation in intron 7, exon 8, and intron 8 were found in Madura cattle designation. This indicated the absence of differentiation Madura cattle designation of selection pressure of BCKDHA gene.

Keywords: BCKDHA gene, indel simultaneous, Madura cattle

PENDAHULUAN

Sapi Madura merupakan salah satu bangsa sapi lokal Indonesia yang berasal dari persilangan sapi Zebu (*Bos indicus*) dan banteng (*Bos javanicus*). Berdasarkan kearifan lokal Madura, sapi Madura dapat dikelompokkan menjadi 3 peruntukan, yaitu sapi karapan (balapan), sapi sonok (pajangan), dan sapi sayur (pedaging). Sapi karapan membutuhkan metabolisme energi yang tinggi untuk mendapatkan kekuatan fisik, kerja keras otot kerangka, dan emosional (*aggressive*). Sebaliknya, sapi sonok membutuhkan untuk menahan peregangannya otot kerangka dan emosi terkendali (*tamed*). Sapi yang tidak

memiliki sifat-sifat tersebut termasuk dalam sapi pedaging.

Sapi karapan dan sapi sonok yang diikutsertakan dalam perlombaan merupakan sapi pilihan dengan performa dan kondisi yang sangat baik. Performa dan kondisi tersebut dapat dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan, termasuk lingkungan pakan dan kesehatan. Pemanfaatan tradisi budi daya masyarakat Madura dalam pelaksanaan seleksi sapi yang memiliki performa yang sesuai dengan selera masyarakat perlu diperhatikan, apakah hal tersebut memengaruhi variasi gen yang terlibat dalam metabolisme energi. Karakterisasi terhadap gen yang terlibat dalam metabolisme energi perlu dilakukan untuk meningkatkan kualitas sapi Madura dalam skema pemuliaan hewan.

Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKDH) adalah salah satu dari kompleks enzim

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

* Penulis Korespondensi: E-mail: achamad@ipb.ac.id

utama yang ada di membran dalam mitokondria yang memetabolisme *branched chain amino acid* (BCAA), yaitu valin, leusin, dan isoleusin. Kompleks BCKDH terdiri atas subunit α dan β -*ketoacid dehydrogenase* (E1a dan E1b) dan dua subunit lainnya (Patel & Harris 1995). Subunit E1a pada sapi disandikan oleh gen *branched-chain α -ketoacid dehydrogenase E1a* (BCKDHA) yang berada pada kromosom 18, dengan panjang gen sekitar 20 kb, dan terdiri atas 9 ekson dan 8 intron (Elsik *et al.* 2009).

Keragaman runutan nukleotida suatu gen dapat ditemukan baik di *coding region* (daerah penyandi) maupun *non-coding region*. Keragaman atau variasi tersebut dapat memengaruhi fungsi atau ekspresi gen sehingga dapat mengakibatkan kondisi yang tidak diinginkan, seperti penyakit. Ibeagha-Awemu *et al.* (2008) menyebutkan bahwa dalam sebagian besar laporan, mutasi patologis yang ditemukan terjadi di daerah fungsional protein dan bersifat *conserved*. Selain itu, variasi yang ditemukan pada kedua daerah tersebut sangat memengaruhi proses pengolahan mRNA dan stabilitas produk protein.

Coding region merupakan bagian dari gen yang ditranskripsi dan diterjemahkan menjadi protein, sehingga perubahan pada daerah tersebut dapat memengaruhi fungsi gen dengan memengaruhi pola *splicing* mRNA atau dengan mengubah fungsi protein (Cartegni *et al.* 2002). *Non-coding region* sendiri mencakup daerah promotor, 5' dan 3' UTR (*untranslated regions*), dan intron. Variasi di wilayah ini dapat memengaruhi proses *splicing* gen, transkripsi, dan translasi. Dalam gen BCKDHA, ada ruas peptida transit yang disandikan oleh bagian ujung 5' ekson 1 dan ada ruas yang menyandikan polipeptida untuk membentuk struktur kuarterner dengan subunit lainnya (bagian ujung 3' ekson 1 dan ekson 2–9). Ruas ekson 8 berperan sebagai pengontrol residu asam amino,

apabila terjadi mutasi nukleotida pada ruas tersebut dan ruas sebelumnya, yaitu intron 7, apakah hal tersebut dapat memengaruhi asam amino yang disandikan dan efisiensi BCKDH dalam proses metabolisme BCAA. Tulisan ini bertujuan melaporkan variasi nukleotida yang terdapat pada ruas intron 7 dan ekson 8 gen BCKDHA pada sapi Madura.

METODE PENELITIAN

Sampel DNA yang digunakan adalah sampel darah sapi Madura yang dikoleksi berdasarkan peruntukan sapinya, yaitu sapi karapan diperoleh dari Kabupaten Sampang, serta sapi sonok dan sayur diperoleh dari Kabupaten Pamekasan (Gambar 1). Sampel darah diawetkan dalam alkohol absolut koleksi Dr. Achmad Farajallah. Umur sampel sapi yang digunakan dalam penelitian ini berbeda, umur sapi karapan dua tahun, sapi sonok tiga tahun, sedangkan umur sapi pedaging tidak diketahui. Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti protokol *extraction kit* yang digunakan, yaitu *Genomic DNA Mini Kit for Fresh Blood* (Geneaid). Amplifikasi ruas ekson 8 gen BCKDHA dilakukan menggunakan mesin PCR ESCO *Swift Maxi Thermal Cycler* dengan kondisi: predenaturasi 95 °C selama dua menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri atas denaturasi 95 °C selama 45 detik, penempelan primer 60 °C selama satu menit, pemanjangan DNA pada suhu 72 °C selama satu menit, dan diakhiri dengan pemanjangan DNA 72 °C selama lima menit. Primer AF511 (5'-GAATGGAAYGGAGGCCAGAG-3') dan AF512 (5'-CCCRGCCTCTCCMTTCTT-3') digunakan untuk mengamplifikasi 410 pb nukleotida ruas intron 7–8. Ruas intron 7 (termasuk primer AF511) terdiri atas 150 pb, ekson 8 172 pb, dan intron 8 (termasuk



Gambar 1 Lokasi pengambilan sampel di Pulau Madura, yaitu Sampang dan Pamekasan.

primer AF512) 88 pb (Gambar 2). Titik awal basa intron 7 setara dengan 921609–921759, 921760–921931 (ekson 8), dan 921932–922020 (intron 8) sekuens nukleotida GenBank (NW_001493616) berdasarkan posisi gen BCKDHA pada kromosom 18 *Bos taurus* (Elsik *et al.* 2009). Reaksi perunutan sekuens nukleotida menggunakan metode *sequencing big dye terminator* yang dilakukan oleh lembaga komersial jasa *sequencing*.

Perunutan DNA dilakukan dari dua arah, yaitu *forward* dan *reverse*. Runutan nukleotida yang diperoleh diedit dengan menggunakan program BioEdit versi 7.0.8.0 (Hall 1999) dan disejajarkan dengan runutan nukleotida gen BCKDHA pada *B. taurus* (NW_001493616). Proses pensejajaran (*alignment*) dilakukan secara manual menggunakan mata dan program MEGA6 (Tamura *et al.* 2013). Data yang dianalisis adalah sekuens nukleotida beserta primernya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

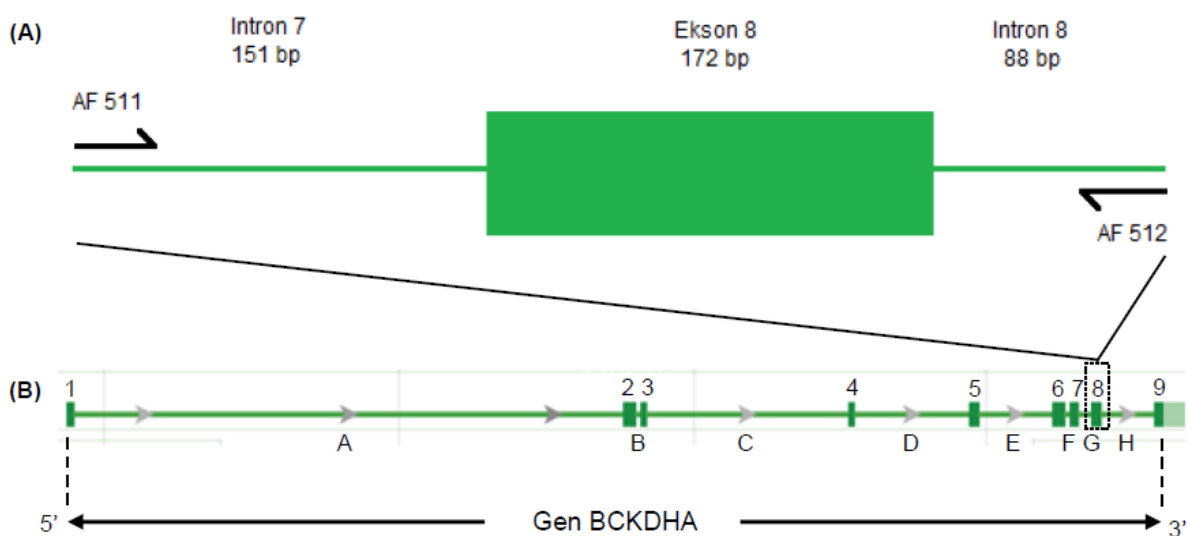
Perunutan Ruas Intron 7–8 Gen BCKDHA

Ruas intron 7–8 gen BCKDHA pada sapi Madura berhasil diamplifikasi menggunakan pasangan primer *forward* AF511 dan *reverse* AF512 dengan panjang amplicon sebesar 410 pb yang sesuai dengan desain primer. Hasil pensejajaran runutan nukleotida sapi Madura dari penelitian ini dibandingkan dengan runutan nukleotida gen BCKDHA pada *B. taurus* (NW_001493616). Panjang DNA hasil perunutan setelah diedit, diperoleh hasil sekuens sepanjang 410 pb sesuai dengan desain primer, dan hasil pensejajaran berganda (*multiple alignment*) diperoleh nilai *conserved* sebanyak 408 pb dan nilai *variable* sebanyak 2 pb yang terdiri atas insersi dan delesi dari 410 pb.

Varian Ruas Intron 7, Ekson 8, dan Intron 8 Gen BCKDHA

Sebagaimana gen-gen vital bagi metabolisme, nilai keragaman ruas-ruas ekson gen BCKDHA diperkirakan akan sangat rendah karena perubahan pada daerah tersebut dapat memengaruhi fungsi gen atau protein (Cartegni *et al.* 2002; Ibeagha-Awemu *et al.* 2008). Pada penelitian ini ditemukan variasi pada ruas-ruas intron lebih banyak dibandingkan dengan ruas ekson. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh variasi yang terdapat di intron berada di bagian dalam intron. Menurut Hare dan Palumbi (2003), bagian ujung 5' dan 3' intron yang berdekatan dengan ekson memiliki variasi rendah (*highly conserved*) dibandingkan dengan bagian dalam intron. Hasil pensejajaran nukleotida ruas intron 7, ekson 8, dan intron 8 dari sampel sapi karapan, sapi sonok, dan sapi pedaging terhadap *B. taurus* (NW_001493616) ditemukan tujuh varian pada ruas intron 7, sedangkan pada ekson 8 hanya ditemukan satu varian pada sapi pedaging (Tabel 1). Pada ruas intron 8 (88 pb dari total 906 pb) ditemukan dua varian yang berada pada posisi penempelan primer AF512.

Sapi karapan, pedaging, dan sonok alel 2 mengalami delesi basa G pada posisi basa ke-34, sedangkan pada posisi basa ke-68 ditemukan adanya insersi basa C pada sapi karapan dan pedaging, dan basa A pada sapi sonok. Varian G56A dan A61G pada ruas intron 7 serta C266T hanya ditemukan pada sapi pedaging. Varian T111C pada intron 7 dan T407C pada intron 8 hanya ditemukan pada sapi sonok. Varian T101C dan G120A ditemukan pada intron 7 sapi sonok dan pedaging. Varian G398T pada intron 8 ditemukan pada semua peruntukan sapi (Tabel 1). Tidak ditemukan varian pada bagian ujung 3' intron 7, hal ini dikarenakan situs nukleotida yang paling *conserved* berada di bagian ujung intron (Burge *et al.* 1999; Lynch 2006).



Gambar 2 Posisi penempelan primer AF511 dan AF512 (A). (B) Struktur gen BCKDHA berdasarkan sekuens genom sapi taurin (NW_001493616) yang terdapat di *GenBank* menunjukkan sembilan ekson (1–9) dan delapan intron (A–H; Elsik *et al.* 2009).

Tabel 1 Variasi nukleotida pada intron 7, ekson 8, dan intron 8 gen BCKDHA dari sampel sapi karapan, sonok, dan pedaging terhadap nukleotida gen BCKDHA *B. taurus* (NW1493616)

Bangsa	Intron 7							Ekson 8	Intron 8	
	3	5	6	6	1	1	1	2	3	4
	4	6	1	8	1	1	0	6	9	7
Sapi karapan	-	G	A	C	T	C	G	C	G/T	C
Sapi sonok alel 1	G	G	A	-	T/C	C/T	A/G	C	G/T	C/T
Sapi sonok alel 2	-	G	A	A	T/C	C/T	A/G	C	G/T	C/T
Sapi pedaging	-	G/A	A/G	C	T/C	C	A/G	C/T	G/T	C
<i>B. taurus</i> NW 001493616	G	G	A	-	T	T	G	C	G	C

Keterangan: Nomor posisi nukleotida dibaca secara vertikal di tiga baris pertama. Bagian yang dicetak tebal menunjukkan adanya variasi.

Sapi pedaging memiliki varian yang paling tinggi dibandingkan sapi lainnya, sedangkan sapi karapan memiliki varian yang paling rendah. Tingginya variasi pada sapi pedaging kemungkinan disebabkan oleh persilangan yang tidak terkontrol. Berdasarkan hasil wawancara dengan peternak di Pulau Madura, sapi karapan berasal dari Pulau Sapudi yang terletak di bagian timur Pulau Madura. Pulau Sapudi merupakan sentra sapi karapan di Pulau Madura dan terpilih sebagai wilayah konservasi bagi pemurnian plasma nutfah sapi Madura (Kutsiyah 2012). Sapi yang diperuntukan sebagai sapi karapan biasanya tidak dikawinkan selama menjadi sapi karapan. Namun, apabila sapi tersebut sudah tua atau tidak menang dalam pertandingan, maka sapi tersebut akan dijadikan sebagai sapi pedaging dan dikawinkan, begitu pula dengan sapi sonok, sehingga komposisi nukleotida yang terdapat pada sapi pedaging merupakan campuran dari ketiga peruntukan sapi madura.

Indel Simultan pada Intron 7 Gen BCKDHA

Peruntukan DNA (*sequencing*) dilakukan dari dua arah, yaitu *forward* dan *reverse*. Runutan nukleotida yang diperoleh diedit dengan menggunakan program BioEdit dan mata (manual). Puncak (*peak*) kromatogram yang saling tumpang tindih baik yang ditemukan pada urutan *forward* maupun *reverse* menunjukkan adanya varian nukleotida (Gambar 3). Namun pada ruas intron 7 sapi sonok, puncak kromatogram yang ditemukan pada basa ke-34 sampai 68 berbeda. Insersi dan delesi (indel) simultan yang terjadi pada sapi sonok menyebabkan munculnya dua alel, yaitu bentuk alternatif dari suatu lokus. Jika dibandingkan dengan runutan nukleotida gen BCKDHA pada *B. taurus* (NW_001493616), maka alel 1 memiliki urutan yang sama dengan *B. taurus*. Sedangkan pada alel 2 terdapat delesi basa G pada basa ke-34 dan insersi basa A pada basa ke-68 (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa terjadi heterozigositas pada sapi sonok.

Kesamaan runutan nukleotida alel 1 dengan *B. taurus* menunjukkan bahwa terdapat komponen genomik sapi taurin (*B. taurus*) pada sapi sonok. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Mohamad *et al.* (2009) yang menunjukkan bahwa berdasarkan penanda genetik molekuler kromosom Y (analisis paternal) terdapat komponen genomik sapi taurin pada sapi Madura. Sedangkan berdasarkan

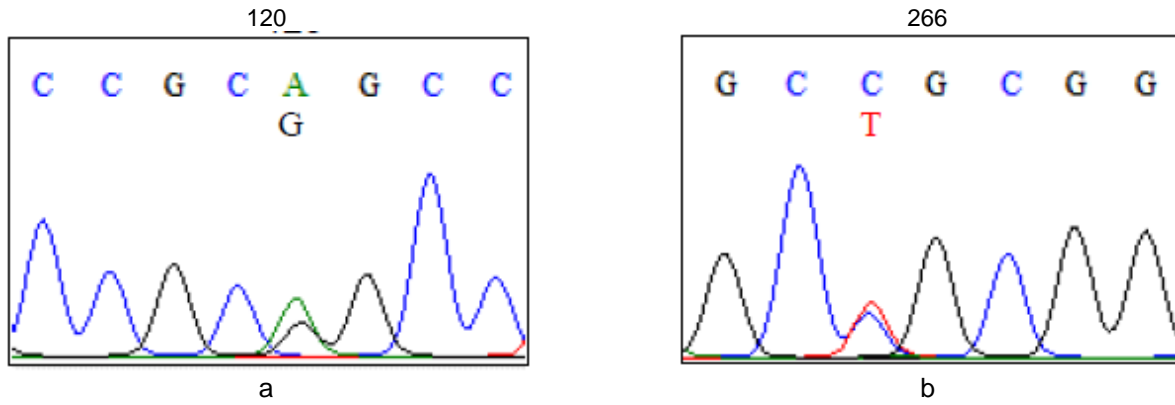
penanda genetik molekuler DNA mitokondria (analisis maternal) dan mikrosatelit (analisis autosomal) sapi Madura memiliki komposisi genetik yang sama dengan sapi Zebu (*B. indicus*) dan sapi Bali atau banteng (*B. javanicus*). Hal ini menunjukkan bahwa sapi Madura berasal dari dua moyang betina yang berbeda (Nijman *et al.* 2003; Mohamad *et al.* 2009; Firdhausi *et al.* 2010; Febriana *et al.* 2011), sehingga kemungkinan alel 2 berasal dari sapi Zebu atau sapi Bali.

Sapi Taurin yang pernah dimasukkan ke Pulau Madura sebagai pejantan antara lain, yaitu *Danish Red* dan persilangan antara *Shorthorn* dengan *Brahman* atau dikenal sebagai *Santa Gertrudis*. Bahkan sapi *Limousin* juga diperkenalkan sebagai pejantan unggul dalam upaya meningkatkan produktivitas sapi Madura. Persilangan antara sapi Taurin dengan sapi Madura berhasil dilakukan karena sapi Taurin yang disilangkan dengan sapi Madura memiliki komposisi genomik sapi Zebu (Soehadji 1993; Wijono & Setiadi 2004; Mohamad *et al.* 2009).

Translasi Protein Ekson 8 Gen BCKDHA

Translasi protein dilakukan dengan menggunakan program MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). Asam amino yang ditranslasikan berjumlah 57 asam amino. Berdasarkan translasi protein gen BCKDHA sapi Madura dengan *B. taurus* (NW_1493616), varian *C266T* pada posisi asam amino ke-39 pada sapi pedaging tidak menyebabkan terjadinya perubahan asam amino yang signifikan (Tabel 2). Varian lainnya tidak menyebabkan perubahan asam amino karena intron merupakan *non-coding region* atau sekuens nukleotida yang tidak ikut ditranslasikan (Allison 2007).

Varian yang ditemukan adalah salah satu akibat dari mutasi. *Point mutations* atau mutasi titik adalah mutasi yang terjadi hanya pada satu nukleotida atau bagian kecil dari gen. Mutasi titik dapat dibedakan berdasarkan tipe perubahan runutan nukleotida, yaitu delesi, insersi, substitusi (transisi dan transversi), kesalahan pembacaan (*proofreading errors*), dan perubahan struktur kimia pada basa (Paolella 1998). Mutasi substitusi merupakan peristiwa pergantian pasangan basa nitrogen pada suatu rantai polinukleotida yang berdampak pada perubahan kodon. Varian *C266T* berada pada posisi basa pertama, perubahan tersebut termasuk mutasi substitusi transisi. Transisi terjadi jika basa purin (adenin)



Gambar 3 Salah satu varian yang ditemukan pada ruas intron 7 A120G (A) dan ekson 8 C266T (B) pada sapi pedaging.

1. Sapi karapan	CCCCATT	GCCCCGTACCCCTCTGGCCTCCGTTCCATTCCCA	TCCT
2. Sapi sonok alel 1	CCCCATT	GCCCCGTACCCCTCTGGCCTCCGTTCCATTCCCA	TCCT
3. Sapi sonok alel 2	CCCCATT	GCCCCGTACCCCTCTGGCCTCCGTTCCATTCCCA	TCCT
4. Sapi pedaging	CCCCATT	GCCCCGTACCCCTCTGGCCTCCRTTCCRTTCCCA	TCCT
5. NW_001493616	CCCCATT	GCCCCGTACCCCTCTGGCCTCCGTTCCATTCCCA	TCCT

Gambar 4 Posisi indel simultan pada ruas intron 7 gen BCKDHA.

Tabel 2 Ringkasan hasil translasi protein ekson 8 gen BCKDHA pada sapi Madura

Bangsa	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5
	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4
Sapi karapan	S	R	G	W	W	D	D	E	Q	E	K	A	W	R	K	Q	S
Sapi sonok alel 1	S	R	G	W	W	D	D	E	Q	E	K	A	W	R	K	Q	S
Sapi sonok alel 2	S	R	G	W	W	D	D	E	Q	E	K	A	W	R	K	Q	S
Sapi pedaging	S	?	G	W	W	D	D	E	Q	E	K	A	W	R	K	Q	S
NW_001493616	S	R	G	W	W	D	D	E	Q	E	K	A	W	R	K	Q	S

Keterangan: Nomor posisi nukleotida dibaca secara vertikal di tiga baris pertama. Bagian yang dicetak tebal menunjukkan adanya variasi.

diganti dengan basa purin lain (guanin), atau basa pirimidin (sitosin) diganti dengan basa pirimidin lain (timin).

penelitian lanjutan mengenai kejadian indel simultan pada intron 7 maka diperlukan desain primer yang lebih spesifik yang hanya mengapit bagian tersebut.

KESIMPULAN

Peruntukan nukleotida ruas intron 7, ekson 8, dan intron 8 gen BCKDHA pada sapi Madura menunjukkan bahwa pada ruas intron 7 ditemukan 7 varian, pada ekson 8 hanya ditemukan satu varian pada sapi pedaging, dan pada intron 8 ditemukan dua varian. Indel simultan ditemukan pada posisi basa ke-34 dan 68 pada sapi sonok. Varian C266T yang ditemukan pada sapi pedaging tidak menyebabkan terjadinya perubahan asam amino yang signifikan. Tidak ada mutasi khusus pada ruas intron 7, ekson 8, dan intron 8 yang ditemukan pada peruntukan sapi Madura. Hal ini menunjukkan tidak adanya diferensiasi peruntukan sapi Madura dari sisi tekanan seleksi terhadap gen BCKDHA, variasi yang ditemukan tidak berkorelasi dengan metabolisme energi sapi Madura, dan kemungkinan terjadi persilangan yang tidak terkontrol antara sapi karapan, sapi sonok, dan sapi pedaging sehingga sapi pedaging memiliki varian yang paling tinggi dibandingkan sapi lainnya. Jika dilakukan

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ditjen Dikti, Kemendikbud yang telah mendanai penelitian ini melalui Dana BOPTN Institut Pertanian Bogor Tahun Anggaran 2014, serta Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Institut Pertanian Bogor atas arahannya. Penelitian ini merupakan bagian dari “Analisis Varian Gen Penyandi Kompleks Enzim *Branched-Chain Ketoacid Dehydrogenase* pada Sapi Madura”.

DAFTAR PUSTAKA

Allison LA. 2007. *Fundamental Molecular Biology*. Oxford (UK): Blackwell Publishing Ltd.

Burge CB, Tuschl T, Sharp PA. 1999. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes, in Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF (eds). *The RNA*

- world*, 2nd ed. Cold Spring Harbor (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*. 3(4): 285–298. <http://doi.org/bkpjvs>
- Elsik CG, Tellam RL, Worley KC, and 306 co-authors [Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium]. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*. 324(5926): 522–528. <http://doi.org/b3bzx5>
- Febriana A. 2011. Filogeni Berdasarkan Sekuens DNA Mitokondria Gen *Cytochrome Oxidase I* (Gen COI) pada Beberapa Bangsa Sapi Lokal Indonesia. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Firdhausi NF, Farajallah A, Perwitasari D. 2010. Asal usul sapi Madura berdasarkan penanda DNA mitokondria. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41(1): 95–98.
- Hare MP, Palumbi SR. 2003. High intron sequence conservation across three mammalian orders suggests functional constraints. *Molecular Biology and Evolution*. 20(6): 969–978. <http://doi.org/ck5pjg>
- Ibeagha-Awemu EM, Kgwatalala P, Ibeagha AE, Zhao X. 2008. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*. 19(4): 226–245. <http://doi.org/dmv9qk>
- Kutsiyah F. 2012. Analisis pembibitan sapi potong di pulau madura. *Wartazoa*. 22(3): 113–126.
- Lynch M. 2006. The origins of eukaryotic gene structure. *Molecular Biology and Evolution*. 23(2): 450–468. <http://doi.org/fb4pzz>
- Mohamad K, Olsson M, van Tol HTA, Mikko S, Vlamings BH, Andersson G, Rodriguez-Martinez H, Purwantara BE, Paling RW, Colenbrander B, Lenstra JA. 2009. On the origin of Indonesian cattle. *PLoS ONE*. 4(5): e5490. <http://doi.org/b65mtp>
- Nijman IJ, Otsen M, Verkaar ELC, de Ruitjer C, Hanekamp E, Ochieng JW, Shamshad S, Rege JEO, Hanotte O, Barwegen MW, Sulawati T, Lenstra JA. 2003. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP microsatellites. *Heredity*. 90: 10–16. <http://doi.org/c2grht>
- Paolella P. 1998. *Introduction to molecular biology*. Massachusetts (US): McGraw Hill Companies, Inc.
- Patel MS, Harris RA. 1995. Mammalian α -keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects [review]. *The FASEB Journal (The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology)*. 9(12): 1164–1172.
- Soehadji. 1993. Kebijakan pengembangan ternak potong di Indonesia tinjauan khusus sapi Madura. Di dalam: *Prosiding Pertemuan Ilmiah Hasil Penelitian dan Pengembangan Sapi Madura*. hlm 1–12.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725–2729. <http://doi.org/5v5>
- Wijono DB, Setiadi B. 2004. Potensi dan keragaman sumber daya genetik sapi madura. Di dalam: *Prosiding Lokakarya Nasional Sapi Potong*. hlm 42–52.