

Profil Reseptor *Gonadotropini Releasing Hormone* (GnRH) dari Hipotalamus Sapi

The Profiling of Hypothalamus Gonadotropin Releasing Hormone (GrRH) Receptor Form Cow

Irma Dian Nurani, Claude Mona Airin², Pudji Astuti², Khrisdiana Putri³, Bambang Sutrisno⁴

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁴Departemen Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Email: nurani_vet07@yahoo.com

Naskah diterima: 26 Nopember 2019, direvisi: 1 Juni 2020, disetujui: 30 Juli 2020

Abstract

Gonadotropine Releasing Hormone (GnRH) is one of the recommended hormones to overcome ovulation problems and it can increase pregnancy rate so that it is used in government programs to increase cattle population in Indonesia, although the results are not yet optimal. Hormone and receptor compatibility is the main key to successful hormone application while data on the composition of the Indonesian cow GnRH receptors is not yet known. The purpose of this study was to obtain the composition of GnRH receptors cattle in Indonesia and compare them to the GenBank sequence reference so that is known whether genetic diversity occurs at GnRH receptors cattle in Indonesia. Samples in the form of 3 female cow hypothalamus stored at -80°C temperature freezer. The methods used are mRNA isolation, cDNA synthesis, amplification of GnRH gene using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) process by Promoter F and Exon 1 R primers and then electrophoresis and sent for sequencing. Sequencing product were further aligned with the reference sequences of *Bos Taurus* GnRHR mRNA GenBank using the MEGA X program. The results of the analysis found the presence of *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* in the coding region of 1st cow position 38(A> T), 261(C > T), 342(C >T), 411(C>T) and 495(C > T) and 2nd cow positions 261(C>T). Changes in amino acids were also detected in 1st cow position 13 (H> L). The presence of SNP was found to indicate genomic variation between individuals at GnRH receptors cattle in Indonesia.

Key words: *Bos Taurus*; GnRH; receptors; hypothalamus

Abstrak

Gonadotropine Releasing Hormone (GnRH) adalah salah satu hormon yang direkomendasikan untuk mengatasi masalah ovulasi serta mampu meningkatkan tingkat kebuntingan sehingga dipakai dalam program pemerintah untuk meningkatkan populasi sapi di Indonesia, walaupun demikian hasilnya belum optimal. Kesesuaian hormon dan reseptor adalah kunci utama keberhasilan aplikasi hormon, sedangkan data tentang susunan reseptor GnRH sapi Indonesia belum diketahui. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan susunan reseptor GnRH sapi di Indonesia dan membandingkannya dengan sekuens referensi GenBank sehingga diketahui apakah keragaman genetik terjadi pada reseptor GnRH sapi di Indonesia. Sampel berupa 3 hipotalamus sapi betina yang disimpan dalam suhu -80°C. Metode yang digunakan adalah isolasi mRNA, sintesis cDNA, amplifikasi gen GnRHR dengan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer Promotor F dan Exon 1 R kemudian dilakukan elektroforesis dan dikirimkan untuk sekuensing. Produk sekuensing disejajarkan berganda dengan sekuens referensi *Bos Taurus* GnRHR mRNA GenBank menggunakan program MEGA X.

Hasil analisis ditemukan adanya *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada *coding region* yaitu sapi 1 posisi 38(A>T), 261(C>T), 342(C>T), 411(C>T) dan 495(C>T) dan sapi 2 posisi 261(C>T). Perubahan asam amino juga terdeteksi pada sapi 1 posisi 13 H>L. Adanya SNP yang ditemukan mengindikasikan adanya variasi genom antar individu pada reseptor GnRH sapi di Indonesia.

Kata kunci : Bos Taurus; GnRH; hipotalamus; reseptor

Pendahuluan

Di Indonesia berbagai manipulasi hormonal dilakukan untuk memicu terjadinya estrus, salah satu caranya yaitu dengan penyuntikan *Gonadotrophine releasing hormone* (GnRH). Hal ini menjadi sangat penting ketika aplikasi hormonal dijadikan sarana untuk mendukung keberhasilan program pemerintah secara nasional yaitu program swasembada daging sapi untuk memenuhi kebutuhan masyarakat terhadap daging sapi. Program ini pada awalnya diharapkan tercapai pada tahun 2010 kemudian direvisi menjadi menjadi tahun 2014. Karena belum memenuhi target, pemerintah memperpanjang program dengan harapan mampu memenuhi kecukupan daging sapi tahun pada tahun 2026. Kendala utama dalam pengembangan sapi adalah masih rendahnya laju peningkatan populasi. Hal ini terutama disebabkan kekurangan dan ketidakseimbangan hormonal sehingga terjadi anestrus atau berahi tenang dan estrus tidak disertai ovulasi setelah melahirkan (Afriani *et al.*, 2014).

Persilangan sapi dilakukan dilakukan untuk meningkatkan produktivitas ternak Indonesia. Program persilangan ini dilakukan melalui sistem perkawinan inseminasi buatan (IB) dan menghasilkan banyak sapi persilangan populer antarlain sapi Limpo (Limousin dengan Peranakan Ongole) dan Simpo (Simmental dengan Peranakan Ongole) (Agung *et al.*, 2017; Trifena *et al.*, 2011). Sapi hasil silangan menunjukkan kinerja yang lebih baik dibanding sapi lokal, sehingga banyak disenangi oleh peternak, namun perlu diketahui bahwa setiap bangsa sapi memiliki keunggulan dan kekurangan yang terkadang bisa membawa risiko yang kurang menguntungkan (de Carvalho *et al.*, 2010). Keragaman genetik menimbulkan variasi genom antar individu, apabila sampai terjadi mutasi maka perubahan genetik (gen atau kromosom) akan diturunkan kepada generasi selanjutnya (Aisah *et al.*, 2015).

Apabila mutasi terjadi pada reseptor GnRH, maka dapat menyebabkan gangguan aksi GnRH sehingga penggunaan GnRH menjadi tidak efektif (Beat *et al.*, 2012).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan *copy* sekuen DNA. Teknik ini menggunakan metode enzimatik yang diperantarai primer. Prinsip dasar PCR adalah pelipatgandaan sekuen DNA menggunakan enzim spesifik yang dikenal dengan polimerase. Polimerase adalah enzim yang mampu menggabungkan DNA cetakan tunggal, membentuk untaian molekul DNA yang panjang. Enzim ini membutuhkan primer serta DNA cetakan seperti nukleotida yang terdiri dari empat basa yaitu Adenine (A), Thymine (T), Cytosine (C) dan Guanine (G). Reaksi amplifikasi ini dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan yang berantai ganda menjadi rantai tunggal, kemudian suhu diturunkan sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada DNA cetakan yang berantai tunggal. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya sebagai cetakan bagi reaksi polimerase berikutnya Metode PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA atau RNA. Untuk mengamplifikasi RNA, proses PCR didahului dengan *reverse transcriptase* terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul *complementary DNA* (*cDNA*). Molekul *cDNA* tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Proses PCR untuk mengamplifikasi RNA dikenal dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Hewajuli dan Dharmayanti, 2014).

Aplikasi GnRH untuk gertak birahi tidak selalu berhasil. Sapi hasil persilangan di Indonesia semakin banyak jumlahnya dan data tentang susunan reseptor GnRH sapi Indonesia belum tersedia. Oleh karena itu, perlu dilakukan

pemetaan terhadap susunan reseptor GnRH sapi di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan susunan reseptor GnRH sapi di Indonesia dan membandingkannya dengan referensi reseptor GnRH GenBank sehingga diketahui apakah keragaman genetik terjadi pada reseptor GnRH sapi di Indonesia. Adanya penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk menjadi sarana evaluasi penyebab kegagalan aplikasi GnRH untuk gertak birahi, menjadi masukan bagi pemerintah agar mampu menentukan langkah yang tepat sehingga terapi hormon GnRH lebih tepat sasaran dan membuka penelitian-penelitian selanjutnya tentang hormon GnRH sehingga memberikan dukungan bagi kemajuan bidang endokrinologi reproduksi.

Materi dan Metode

Semua metode di dalam penelitian ini telah mendapat persetujuan oleh Komisi Ethical Clearance LPPT-UGM dengan No. Sertifikat 00006/04/LPPT/II/2018.

Desain Penelitian

Alat dan Bahan. Alat yang akan digunakan adalah gergaji, sarung tangan, timbangan, micropipet, tube rak, freezer, microwave, vortex mixer (Thermo Scientific), sentrifus (Mini spin Eppendorf), Thermal cycler (Bio Rad T 100), mesin elektroforesis (Mupid® Exu Advance), alat pencetak agar (plat dan sisir pencetak sumuran), gel documentation system (Wisedoc). Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu 3 otak sapi betina yang didapat dari Rumah Potong Hewan, kertas aluminium foil, filter tips 10µL, 100µL, 200µL, 1000µL (Tarsons), microcentrifuge tube (0,2 dan 1,5 mL), 100µL PCR tube, 1,5 ml Rnase Dnase free-tube, Chloroform, Ethanol 70%, RNAeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), Buffer RLT (Qiagen), Go Taq® Flexi DNA polimerase (Promega), ExcelRT™ Reverse Transcription Kit II (Smobio), RNase DNase free water, UltraPure™ Agarose Low Melting Point Agarose (Thermo Fishers), ExactMark 100bp DNA ladder (100 – 1.500 bp) (1st base), FloroSafe DNA stain (1st base), Platinum Taq DNA Polimerase (Thermo Fisher), TrackIT DNA Loading Buffer (Thermo Fisher) UltraPure™ TBE 10X (Thermo Fisher).

Koleksi Sampel. Sampel berupa tiga otak sapi betina tidak produktif yang didapatkan dari Rumah Potong Hewan Giwangan Kota Yogyakarta dan telah dilakukan perizinan terlebih dahulu dari Dinas Pertanian dan Pangan Kota Yogyakarta untuk mendapatkan akses sampling. Sampel disimpan dalam freezer bersuhu -80°C sampai dilakukan pengujian berikutnya.

Isolasi mRNA. mRNA total diekstraksi dari hipotalamus yang telah di *thawing* sebelumnya sebanyak 25 mg. Prosedur yang digunakan untuk isolasi mRNA dilakukan berdasarkan petunjuk RNeasy® Lipid Tissue Qiagen. Total mRNA yang telah dikoleksi akan diubah menjadi cDNA agar dapat digunakan sebagai cetakan proses amplifikasi dengan metode PCR.

Sintesis cDNA. Sintesis cDNA dilakukan menggunakan reagen ExcelRT™ Reverse Transcription Kit II (Smobio). cDNA hasil sintesis disimpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi cDNA dengan teknik PCR. Hasil isolasi cDNA digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi menggunakan teknik PCR. Pereaksi PCR menggunakan Go Taq® Flexi DNA polimerase (Promega) dengan komposisi total 50µl untuk masing masing sampel yang terdiri dari Green Buffer 10µl, MgCL₂ 6µl, dNTPs 8µl, DEPC 17,75µl, primer forward 2µl, primer reverse 2µl, Go Taq polimerase 0,25µl, dan template cDNA 4µl sehingga volume satu reaksi adalah 50µl. Kondisi PCR untuk amplifikasi fragmen DNA adalah predenaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* atau proses penempelan primer pada suhu 61°C selama 60 detik, *elongation* atau proses pemanjangan pada suhu 72°C selama 60 detik dan *post elongation* yaitu fase untuk memastikan pemanjangan sempurna pada suhu 72°C selama 10 menit. Reaksi denaturasi, *annealing*, dan *elongation* dalam mesin PCR dilakukan sebanyak 30 kali. Produk PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarosa 1,5% dengan menggunakan 1X TBE dalam mesin elektroforesis. Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV setelah gel diwarnai dengan *florosafe* (1st base). Penanda DNA dengan ukuran 100 bp digunakan sebagai petunjuk berat molekul.

Sekuensing DNA. Sekuensing produk PCR dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida dikirim ke PT. Indolab Utama. Sampel dan primer yang disiapkan untuk dikirim masing masing 20µl dengan konsentrasi sampel DNA minimal 20ng/µl dan konsentrasi primer minimal 10 pmol. Setelah dikirim, selanjutnya analisis dilakukan oleh PT Macrogen Korea dengan metode Sanger (metode terminasi rantai). Kondisi untuk reaksi sekuensing yaitu predenaturasi predenaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* atau proses penempelan primer pada suhu 61°C selama 60 detik, *elongation* atau proses pemanjangan pada suhu 72°C selama 60 detik dan *post elongation* yaitu fase untuk memastikan pemanjangan sempurna pada suhu 72°C selama 10 menit. Reaksi denaturasi, *annealing*, dan *elongation* dilakukan sebanyak 30 kali.

Analisis Data. Hasil sequensing dianalisa menggunakan Software MEGA X. Analisis mutasi reseptor GnRH dilakukan berdasarkan perubahan sekuens nukleotida dan asam amino sampel dibandingkan dengan sequense referensi yang tersedia di GenBank.

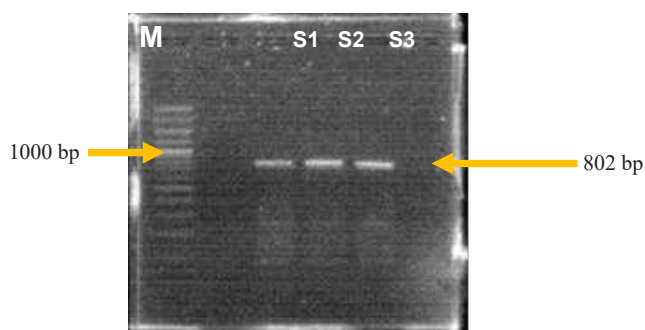
Hasil dan Pembahasan

Amplifikasi Gen Bovine GnRHR dengan Teknik PCR

Amplifikasi gen Bovine GnRHR menggunakan primer Promotor F dan Exon1. Primer yang digunakan disajikan dalam Tabel 1.

Gen Bovine GnRHR berhasil diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer Promotor F dan Exon 1 R. Produk yang dihasilkan dari visualisasi elektroforesis menggunakan gel agarose disajikan pada Gambar 1.

Pita yang tampak dari visualisasi elektroforesis menunjukkan ukuran produk yang dihasilkan dari proses amplifikasi PCR. Gambar 1 menunjukkan



Gambar 1. Elektroforesis hasil amplifikasi gen Bovine GnRHR menggunakan primer Promotor F dan Exon1 R. Marker DNA ladder (M), Sapi 1 (S1), Sapi 2 (S2), Sapi 3 (S3).

bahwa Sapi 1 (S1), Sapi 2 (S2), dan Sapi 3 (S3) menghasilkan panjang produk berukuran kurang lebih 802 *basepair* (bp). Hal ini menunjukkan bahwa panjang produk yang dihasilkan telah sesuai dengan Liron *et al* (2011).

Analisis Sekuen Nukleotida dengan Program Mega X

Setelah dilakukan proses sekuensing, dan dianalisis dengan program Mega X maka hasil yang diperoleh disajikan dalam Tabel 2 dan Tabel 3.

Data Tabel 2 menunjukkan bahwa pada sapi pertama mengalami 5 perubahan nukleotida yaitu 38(A>T), 261(C>T), 342 (C>T), 411 (C>T) dan 495 (C>T). Pada sapi 2 hanya mengalami perubahan nukleotida pada posisi 261 (C>T), sedangkan sapi 3 tidak mengalami perubahan nukleotida. Perubahan yang ditemukan menuntut dilakukannya analisis lebih lanjut untuk mengidentifikasi adanya perubahan asam amino. Data perubahan asam amino dapat dilihat dari Tabel 3.

Data Tabel 3 menunjukkan adanya perubahan asam amino ditemukan pada sapi 1 dengan asam amino urutan ke 13 yaitu asam amino histidin menjadi asam amino leusin. Pola perubahan

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen bovine GnRHR mencakup wilayah gen penyandi protein dari GnRHR

Primer	Sekuen Primer	Posisi pada sekuen referensi	Wilayah Gen	Estimasi panjang produk
GnRHR-Prom-F	5'-ACCAgGCCATCTgCTgAgA-3'	884723 to 884705	Promoter, 5'UTR	802 bp
GnRHR-E1-R	5'-CTgTggTCCAgCAAATgC-3'	883922 to 883941	and exon 1	

* Sekuen referensi : *Bos taurus* chromosome 6 genomic contig (NW_001495209.1/ Bt6_WGA699_4).

Tabel 2. Lokasi perubahan nukleotida sapi sampel dengan sekuens referensi GenBank. Nukleotida yang diberi penanda warna kuning merupakan nukleotida yang berbeda dengan referensi

Sampel	Urutan sekuen nukleotida*				
	38	261	342	411	495
Referensi (Bos taurus GNRHR mRNA NM 177514.2:80-1066)	A	C	C	C	C
Sapi 1	T	T	T	T	T
Sapi 2	A	T	C	C	C
Sapi 3	A	C	C	C	C

Keterangan : *Bos taurus GNRHR mRNA NM 177514.2:80-1066

Tabel 3. Lokasi perubahan asam amino sapi sampel dengan sekuens referensi GenBank. Sapi 1 menunjukkan asam amino

yang tidak homolog dengan referensi (*highlight* kuning).

Urutan sekuen asam amino	13
Referensi (Bos taurus GNRHR mRNA NM 177514.2:80-1066)	H
Sapi 1	L
Sapi 2	H
Sapi 3	H

nukleotida pada sapi 1 dan sapi 2 dibandingkan dengan sekuens referensi GenBank Bos taurus GnRHR mRNA menunjukkan adanya *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) di dalam susunan genetik reseptor GnRH. *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) merupakan perubahan susunan basa nukleotida tunggal pada lokus genetik tertentu dari urutan DNA individu yang menyebabkan adanya variasi genetik di antara anggota spesies (Lonnetti *et al.*, 2016). Hal ini dimungkinkan karena adanya transisi, transversi, delesi, atau insersi. Transisi merupakan perubahan basa purin yang digantikan oleh basa purin, dan basa pirimidin digantikan oleh basa pirimidin, sedangkan transversi merupakan perubahan basa purin digantikan basa pirimidin dan basa pirimidin digantikan oleh basa purin (Putri dan Syubbanul, 2018). Pada sapi 1 posisi 38 (A>T) mengalami transversi karena basa Purin (A) digantikan oleh basa Pirimidin (T) sedangkan posisi 261 (C>T), 342 (C>T), 411 (C>T) dan 495 (C>T) mengalami transisi karena basa Pirimidin (C) digantikan oleh basa Pirimidin (T). Begitu pula dengan sapi 2 posisi 261 (C>T) mengalami transisi.

Hasil dari penjajaran berganda tidak ditemukan variasi gen pada wilayah *upstream*, artinya seluruh variasi nukleotida yang ditemukan terdapat pada wilayah exon 1. Menurut Lonetti

et al (2016), SNP dapat ditemukan baik pada *coding region* maupun *non coding region* sekuens DNA, apabila berada pada *non coding region* maka mayoritas SNP tidak memiliki konsekuensi biologis sedangkan hanya sebagian kecil SNP yang terletak pada *coding region* akan memiliki dampak fungsional yang signifikan. Putri dan Syubbanul (2018) juga menambahkan bahwa SNP yang terletak pada *coding region* memiliki peluang untuk mempengaruhi fungsi gen karena dapat mengubah urutan asam amino dan mempengaruhi struktur protein sehingga menyebabkan gangguan monogenik resesif maupun dominan.

Melalui data analisis perubahan protein, walaupun adanya SNP yang ditemukan pada *coding region* mampu mengubah 1 macam jenis protein, namun belum dapat disimpulkan apakah perubahan asam amino tersebut merupakan mutasi karena masih harus dilakukan penelitian lebih lanjut. Hal ini didukung oleh Sadewa (2015) yang menyatakan bahwa adanya SNP berbeda dengan variasi genetik akibat mutasi titik (*point mutation*) yang bersifat patologis, karena variasi SNP dapat pula ditemukan pada individu normal.

Kesimpulan

Setelah membandingkan susunan nukleotida reseptor GnRH sapi dengan sekuens referensi GenBank Bos Taurus GNRHR mRNA diidentifikasi adanya *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) pada sapi 1 posisi 38(A>T), 261(C>T), 342(C>T), 411(C>T) dan 495(C>T) serta sapi 2 posisi 261(C>T). Perubahan asam amino ditemukan pada sapi 1 urutan ke 13(H>L). Adanya *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) yang ditemukan merupakan petunjuk keragaman genetik yang terjadi pada susunan reseptor GnRH sapi di Indonesia

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Drs. Sugeng Darmanto selaku Kepala Dinas Pertanian dan Pangan Kota Yogyakarta yang telah memberikan izin dan akses pengambilan sampel di RPH Giwangan Kota Yogyakarta dan drh. Herjuno Ari yang telah membantu selama penelitian berlangsung.

Daftar Pustaka

- Afriani, T., Jaswandi., Defrinaldi., dan Y.E.Satria. (2014). Pengaruh Waktu Pemberian Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) terhadap Jumlah Korpus Luteum dan Kecepatan Timbulnya Berahi pada Sapi Pesisir. *Jurnal Peternakan Indonesia* 1. 6(3) : 2-3.
- Agung, P.P., Saiful, A., Widya, P.B.P., dan Syahrudin, S. (2017). Keragaman gen *Growth Hormone* (GH) pada beberapa rumpun sapi lokal Indonesia. *Pros Sem Nas Masy Biodin Indon*. 3(3) : 304-308.
- Aisah, I., Edi, K., Ema, C., dan Nurul, U. (2015). Representasi Mutasi Kode Genetik Standar Berdasarkan Basa Nukleotida. *Jurnal Matematika Integritif*. (11)1: 25 – 34.
- Beate, K., Neulen, J., de Roux, N., dan Karges, W. (2012). Genetics of Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism: Role of GnRH Receptor and Other Genes. *International Journal of Endocrinology*. (10): 1-3.
- De, Carvalho., Mateus, da C., Soeparno., dan Nono, N. (2010). Pertumbuhan dan Produksi Karkas Sapi Peranakan Ongole dan Simental Peranakan Ongole Jantan yang Dipelihara secara Feedlot. *Buletin Peternakan*. 34(1): 38-46
- Hewajuli dan Dharmayanti. (2014). *Perkembangan Teknologi Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction dalam Mengidentifikasi Genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases*. Bogor. *Balai Besar Penelitian Veteriner* : 16-17.
- Liron, J.P., A. Prando., M.V. Ripoli., A. Rogberg-Munoz., D.M. Posik., A. Baldo., P. Peral Gracia., dan G. Giovambattista. (2011). Characterization and validation of bovine Gonadotrophin Releasing Hormone receptor (GnRHr) Polymorphisms. Argentina : *Elsevier*. 1-5.
- Lonneti, Annalisa., Maria Chiara Fontana., Giovanni Martinelli., dan Iliaria Iacobucci. (2016). Single Nucleotide Polymorphisms as Genomic Markers for High-Throughput Pharmacogenomic Studies. In *Microarray Technology* . New York : *Humana Press*. 143.
- Putri, Alfin., dan Syubbanul Wathon. (2018). Aplikasi Single Nucleotide Polymorphism (SNP) dalam Studi Farmakogenomik untuk Pengembangan Obat. *Bio Trends* 9(2) : 69-70.
- Sadewa, AH. (2015). Peran Single Nucleotide Polymorphisms (Snps) Pada Metabolisme Mikronutrien Dan Enzim Antioksi dan Sebagai Predisposisi Terhadap Kanker, *Prosiding Anual Scientific Meetng*, 1-11.
- Trifena., I Gede, S.B., dan Tety, H. (2011). Perubahan Fenotip Sapi Peranakan Ongole, Simpo, dan Limpo pada Keturunan Pertama dan Keturunan Kedua (Backcross). *Buletin Peternakan*. 35(1): 11-16.