

Hubungan Kekerabatan Sapi Aceh dengan Menggunakan Daerah *Displacement-loop*

(Relationship of aceh cattle using displacement-loop region)

Mohd. Agus Nashri Abdullah¹

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

ABSTRACT The aims of this study were to describe relationship of *D-loop* of mtDNA Aceh cattle which is useful database for conducting conservation programme. The whole blood samples were collected (8 samples for *D-loop* analysis) from four locations which were Aceh Besar, Pidie, North Aceh regencies and Banda Aceh city. Out group whole blood samples were collected from two samples from Bali cattles (Bali Island), Madura cattle (Madura Island), Pesisir cattle (West Sumatera) respectively and one sample from PO

cattle (West Java). Amplification of *D-loop* sequences of mtDNA with BIDLf and BIDLr primary have PCR product 980 bp. The Data were analyzed using Squint 1.02 and MEGA 4.0 programme. Result of analysis indicate that Aceh cattle have nearer relationship with zebu and there is items inset of genetik Bali cattle (*Bos javanicus*) at the end sequences start ke-354 situs up to 483, so that the origin Aceh cattle was from *Bos indicus* which have hybridization with *Bos javanicus*.

Key words: Aceh cattle, Displacement-loop, DNA, genetic

2008 Agripet : Vol (8) No. 2: 9-14

PENDAHULUAN

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 (catatan sejarah Aceh, catatan Marcopolo 1256 dan Ibnu Bathutah 1345; Mulyana, 1968; Putra, 2001; Abdullah *et al.*, 2008). 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).

Pada zaman penjajahan Belanda, sapi kecil yang banyak ditemukan di bagian barat Aceh, mirip dengan sapi Pesisir di Sumatera Barat, sedangkan sapi yang berukuran lebih besar diminati sebagai komoditas ekspor ke kawasan budaya Deli dan Medan. Beberapa

perusahaan Belanda juga menggunakan beberapa ekor sapi Aceh sebagai alat transportasi, khususnya di lokasi-lokasi yang memiliki rel kereta (Merkens, 1926).

Sapi Aceh merupakan salah satu sapi asli Indonesia (Martoyo, 2003). mempunyai daya tahan terhadap lingkungan yang buruk seperti krisis pakan, air dan pakan berserat tinggi, penyakit parasit, temperatur panas dan sistem pemeliharaan ekstensif tradisional (Abdullah *et al.*, 2007). Ketahanan ternak lokal terhadap lingkungan yang ekstrim telah diuji melalui hewan percobaan mencit (*Mus musculus*) oleh Abdullah *et al.* (2005). Ternak-ternak asli telah terbukti dapat beradaptasi dengan lingkungan dan iklim tropis, sehingga ternak-ternak inilah yang paling cocok untuk dipelihara dan dikembangkan di Indonesia, walaupun produksinya lebih rendah dari ternak impor (Noor, 2008).

Memasukkan bangsa sapi luar ke Aceh dan eksploitasi sapi Aceh melalui persilangan yang semakin luas dengan bangsa sapi eksotik yang dilakukan selama ini tanpa evaluasi, kontrol dan memperhitungkan arti penting sapi asli, dikhawatirkan dapat mengakibatkan erosi sumber daya genetiknya. Keadaan ini dapat mengancam keberadaan sapi lokal yang sangat

Corresponding author: agus_nashri@yahoo.com

adaptif terhadap kondisi setempat ini pada masa yang akan datang. Kekhawatiran ini dapat dilihat pada bukti sapi asli di Lithuania yang terancam punah (Malevičiūtė *et al.*, 2002) akibat persilangan membentuk bangsa sapi baru yang telah dilakukan. Beberapa sapi asli di negara India telah punah sebelum sapi ini diidentifikasi dan dimanfaatkan akibat persilangan yang meluas (Sodhi *et al.*, 2006). Bahkan di Jawa terdapat sapi Jawa (Merkens, 1926) yang telah punah akibat persilangan dengan sapi PO (Abdullah, 2008).

Sehubungan dengan hal tersebut di negara berkembang, banyak peneliti yang sedang melakukan karakterisasi ternak secara fenotipik termasuk juga mengkarakterisasi pada tingkat molekuler yang digunakan untuk dokumentasi produksi ternak, status dan pemanfaatannya (Sodhi *et al.*, 2006). Namun, sifat-sifat fenotipe dipengaruhi oleh lingkungan dan interaksi antara genetik dan lingkungan, sehingga pendekatan molekuler akan memberikan hasil yang lebih akurat.

Berdasarkan laporan terdahulu, penentuan daerah *Displacement-loop (D-loop)* DNA mitokondria (mtDNA) pada sapi dapat menunjukkan hibridisasi pada banteng dan sapi Madura (Nijman *et al.*, 2003). Daerah *D-loop* sangat baik digunakan untuk analisis keragaman hewan, baik di dalam spesies maupun antarspesies (Muladno, 2006). DNA mitokondria sudah terbukti merupakan suatu alat yang tangguh dalam analisis variasi dalam dan antarspesies, struktur populasi dan filogeni (Patricia *et al.*, 2002).

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian pada sapi Aceh mencakup daerah *D-loop* DNA mitokondria. Penentuan daerah *D-loop* merupakan salah satu metode yang mempunyai tingkat akurasi sangat tinggi dalam menggambarkan keragaman genetik, sehingga hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pertimbangan dan pengambilan kebijakan pelaksanaan program pelestarian plasma nutfah sapi Aceh secara tepat dan terarah, pengembangan dan pemanfaatannya secara berkelanjutan. Penelitian ini bertujuan menginventarisasi keragaman daerah *Displacement-loop* DNA mitokondria dalam populasi sapi Aceh.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan sapi Aceh di empat lokasi di Nanggroe Aceh Darussalam yang meliputi Kota Banda Aceh, Kabupaten Aceh Besar, Pidie dan Aceh Utara. Sebanyak 2 sampel darah sapi Aceh diambil dari masing-masing lokasi, sehingga keseluruhan sampel 8 ekor. Sampel darah sapi *outgroup* diambil dari 2 sampel masing-masing sapi Bali (P3Bali), Madura (Pulau Madura), Pesisir (Sumatera Barat) dan satu sampel sapi PO (Laboratorium Ternak Potong dan Kerja, Fapet, Institut Pertanian Bogor). Darah diawetkan dengan alkohol absolut (1:1) dan diisolasi DNANYA dengan menggunakan metode Sambrook *et al.* (1989) yang dikembangkan Duryadi (1997).

Bahan dan Peralatan yang Digunakan

Bahan-bahan pereaksi yang digunakan 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 yang digunakan untuk visualisasi DNA hasil isolasi dan produk PCR, yaitu: agarose standar, larutan TBE 1x, dan pewarna *ethidium bromide*. Bahan untuk pereaksi PCR *Core* digunakan dari *Promega*.

Peralatan utama digunakan mikro-sentrifus (*Eppendorf Centrifugse 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 ballace (AD HX 100)*; perangkat *Submarine Electrophoresis* dan *voltage/current regulator* (Kayaki PS100).

Primer Daerah D-loop DNA Mitokondria

Daerah *D-loop* DNA mitokondria diamplifikasi dengan menggunakan primer BIDL-F 5'-ACCCCCAAAGCTGAAGTTCT-3' dan BIDL-R 5'-GTGCCTTGCTTTGGGTAAAG-3', dengan panjang produk 980 bp. Primer tersebut didesain menggunakan *software Primer3* (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_ww

www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/AY126697) pada sekuen *D-loop* DNA mitokondria *Bos indicus* (sapi Nellore) *GenBank* (kode akses AY126697) dalam situs NCBI.

Amplifikasi PCR

Setiap pereaksi PCR daerah *D-loop* dibuat volume 50 µl dengan komposisi 5 µl 10x buffer PCR; 2,5 µl MgCl₂ (25 mM); 1 µl dNTP (40 mM); 0,25 µl *Taq Polymerase* (5 unit/µl) (Promega PCR Core System I no.cat.M7660, Madison, WI, USA); 1 µl *primer F* (20 picomol/ µl); 1 µl *primer R* (20 picomol/µl) (Amersham); 1-3 µl DNA total sebagai DNA cetakan (17,44-413,51 ng/µl); penambahan dH₂O (invitrogen) sampai volume 50 µl. Pencampuran selalu dilakukan penambahan akhir *Taq DNA Polymerase*.

Kondisi PCR daerah *D-loop*, yaitu pra PCR: denaturasi 94°C 2 menit; PCR: denaturasi 94°C 30 detik, *annealing* 59°C 45 detik, dan *elongasi* 72°C 1 menit 35 siklus; *extention* 72 °C 5 menit dan 4°C suhu penyimpanan.

Sekuensing produk PCR dari hasil amplifikasi daerah *D-loop* dilakukan di PT. Charoen Pokphand Indonesia, Tbk. Tabung *ependorf* berisi produk PCR dibawa dengan memasukkannya ke dalam kotak es *Marina Cooler* dan pendingin es *pack*.

Analisis Data

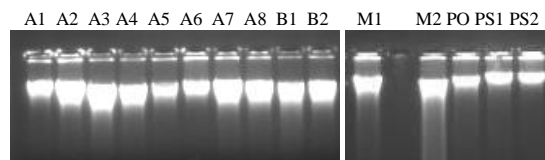
Analisis basa-basa nukleotida daerah *D-loop* sapi Aceh terhadap basa-basa nukleotida daerah *D-loop* sapi-sapi dari data *GenBank* sebagai pembanding, telah diambil dari situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan hanya memasukkan kode akses hasil pelacakan yang sesuai (*Bos indicus* atau *Bos taurus*).

Pensejajaran runutan basa nukleotida daerah *D-loop* digunakan program *Squint Alignment Editor* versi 1.02 (Goode dan Rodrigo, 2007) dan MEGA versi 4.0 *Beta Release* (Tamura *et al.*, 2007). Berdasarkan hitungan jarak genetik (D) 2-parameter Kimura (metode *bootstrapped Neighbor-Joining* 1000 kali ulangan) antarsapi penelitian, dibentuk pohon filogeni dengan program MEGA.

DNA Total

Limabelas DNA total sapi penelitian terdiri dari delapan sampel darah sapi Aceh, dua sampel darah masing-masing dari sapi Bali, Madura dan Pesisir, serta satu sampel

darah dari sapi PO. Semua DNA total hasil isolasi dielektroforesis pada gel agarose untuk menguji kualitas dan kuantitas DNA total yang diperoleh sebelum dilakukan amplifikasi PCR. DNA total hasil isolasi tersebut digunakan sebagai DNA cetakan untuk amplifikasi daerah *D-loop* dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil isolasi DNA total terdapat dalam Gambar 1.



Keterangan: lajur A1-A8 = DNA total sapi Aceh, lajur B1-B2 = DNA total sapi Bali, lajur M1-M2 = DNA total sapi Madura, lajur PO = DNA total sapi PO dan lajur PS1-PS2 = DNA total sapi Pesisir, konsentrasi berkisar 17,44-413,51 ng/µl

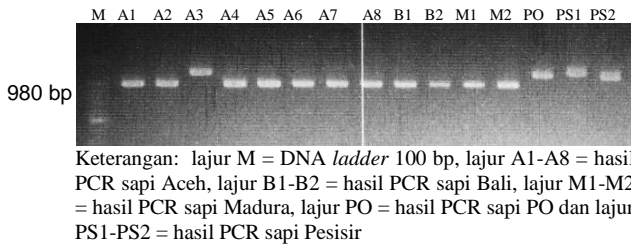
Gambar 1. Spektrofotometer DNA total sapi penelitian setelah dimigrasikan dalam gel agarose 1,2% pada tegangan 90 volt selama 30 menit

Amplifikasi Daerah D-LOOP

Amplifikasi daerah *D-loop* pada sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir dilakukan dengan menggunakan pasangan *primer* BIDLF dan BIDLR hasil desain sendiri berdasarkan basa sekuens *Bos indicus*. Berpedoman pada runutan genom utuh DNA mitokondria *Bos indicus* (sapi Nellore) dari *GenBank*, fragmen DNA sapi berukuran 980 bp tersebut hasil amplifikasi pasangan *primer* BIDLF dan BIDLR, terdiri atas 37 bp fragmen gen tRNA^{Pro} pada posisi basa 15758-15794, 913 bp fragmen utuh daerah *D-loop* pada posisi basa 15795-16341,1-366 dan 30 bp fragmen tRNA^{Phe} pada posisi basa 367-396.

Pasangan *primer* BIDLF dan BIDLR telah mengamplifikasi fragmen berukuran sekitar 980 bp yang menempel pada basa ke-30 sampai dengan 49 gen tRNA^{Pro} (15758-15777) untuk primer BIDLF dan basa ke-11 sampai dengan 30 gen tRNA^{Phe} (377-396) bagi primer BIDLR. Tampilan optimal fragmen hasil amplifikasi pasangan *primer* tersebut dengan menggunakan mesin PCR Perkin Elmer 2400 pada kondisi *annealing* 59°C selama 45 detik, terdapat dalam Gambar 2. Ada variasi ukuran fragmen yang teramplifikasi, yaitu pada sampel A3 (sapi Aceh 3), PO (sapi PO), PS1 dan PS2 (sapi Pesisir 1 dan 2) berbeda dibanding dengan hasil amplifikasi pada sampel lainnya

(±980 bp). Variasi ukuran fragmen DNA yang teramplifikasi tersebut disebabkan oleh ada penyisipan basa nukleotida.



Gambar 2. Hasil amplifikasi daerah *D-loop* dengan menggunakan pasangan primer BIDLf dan BIDLr setelah dimigrasikan dalam gel agarose 1,2% pada tegangan 90 volt selama 45 menit

Penentuan Daerah *D-LOOP* Parsial

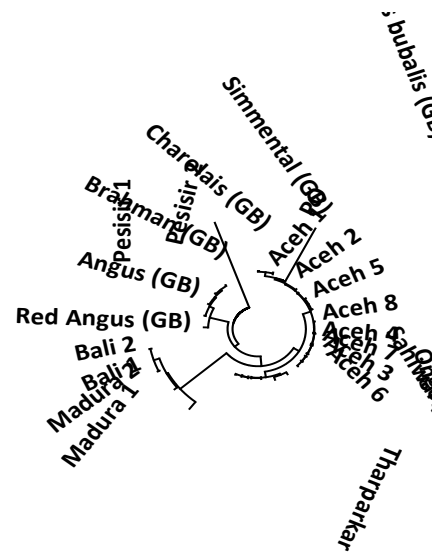
Setelah dilakukan sekuensing pada produk PCR dan optimasi pensejajaran dengan runutan genom *Bos indicus* dari GenBank (Nomor Akses AY126697; Miretti *et al.*, 2002) sebagai acuan, diperoleh ukuran parsial 479 bp daerah *D-loop* yang dapat dianalisis dari arah *forward*. Sebelum 479 bp dari arah BIDLf ada sepanjang 7 bp tidak jelas hasilnya. Ukuran sepanjang 427 bp arah primer BIDLr juga tidak dapat digunakan karena tidak jelas hasilnya.

Analisis keragaman runutan nukleotida dilakukan setelah runutan DNA sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir disejajarkan dengan acuan utama pada runutan nukleotida sapi *Bos indicus* (Nellore) dari GenBank (kode akses AY126697). Jumlah nukleotida dari semua contoh sapi penelitian adalah tidak sama setelah dilakukan perbandingan. Hal ini karena ada beberapa delesi dan insersi nukleotida pada sapi Aceh, Bali, Madura, PO, dan Pesisir. Terdapat perbedaan susunan basa nukleotida antara sapi Aceh dan sapi lokal Indonesia lainnya. Susunan basa nukleotida sapi Pesisir dan sapi Aceh memiliki persentase terkecil bila dibandingkan dengan *Bos indicus*. Sapi Aceh dibandingkan dengan sapi Bali, Madura dan PO memiliki perbedaan susunan basa nukleotida berkisar 21-23 %, sedangkan terhadap sapi Pesisir hanya 2,93%.

Kekerabatan Sapi Aceh

Ditinjau dari DNA mitokondria dengan analisis pada daerah *D-loop* parsial sapi Aceh, dapat ditunjukkan bahwa sapi Aceh mempun-

nyai hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan sapi-sapi zebu. Pengelompokan sapi Aceh, Pesisir dan PO terlihat berbeda secara riil dengan pengelompokan sapi Bali dan Madura (Gambar 3). Hubungan yang lebih dekat antara sapi Aceh dan Pesisir yang asal geografisnya berdekatan, mengindikasikan ada perbedaan yang lebih kecil di antara sapi Aceh dan sapi Pesisir dibanding dengan sapi PO yang asal pembentukannya di Pulau Jawa.



Gambar 3. Dendrogram *Neighbor-Joining* berdasarkan metode 2 parameter Kimura dari nukleotida daerah *D-loop* parsial (berukuran 479 nt) sapi Aceh, Bali, Madura, PO, Pesisir dan bangsa-bangsa sapi dari GenBank (GB) dengan pengolahan *bootstrap* 1000 ulangan

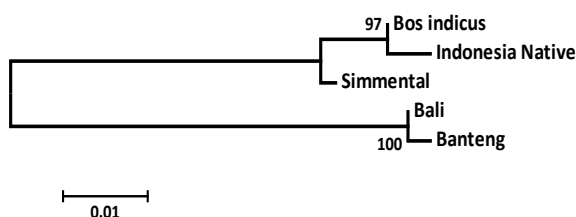
Sapi PO walaupun satu kelompok dengan sapi Aceh dan Pesisir, tetapi mempunyai susunan basa nukleotida yang sangat berbeda yaitu sebesar 21,34% terhadap sapi Aceh dan 8,95% terhadap sapi Pesisir. Hal ini menunjukkan hibridisasi yang dominan terjadi antara sapi Jawa betina dan sapi SO (Sumba Ongole) jantan yang menghasilkan sapi PO.

Kedekatan sapi Madura dengan sapi Bali (jarak genetik 0,0190) yang terpisah dari kelompok sapi Aceh menunjukkan hibridisasi yang dominan telah terjadi antara sapi Bali atau Banteng betina dengan sapi zebu jantan, sehingga sapi Madura berada satu klaster dengan sapi Bali. Menurut Nijman *et al.* (2003) sapi Madura mengandung materi genetik sapi

Bali yang telah mengalami hibridisasi dengan sapi zebu.

Pengelompokan sapi Aceh dengan sapi Pesisir dan PO dalam klaster sapi *Bos indicus* menunjukkan bahwa sapi Aceh, Pesisir dan PO adalah dari maternal zebu, sedangkan pengelompokan sapi Madura dalam klaster sapi Bali (*Bos javanicus*) menunjukkan bahwa sapi Madura bukan dari maternal zebu tetapi dari maternal Banteng. Basa-basa nukleotida daerah *D-loop* DNA mitokondria yang umum dijumpai pada sapi Aceh adalah basa-basa nukleotida dari sapi *Bos indicus*, namun pada bagian akhir sekuens mulai situs ke-354 sampai dengan 483 ditemukan sisipan-sisipan basa nukleotida dari sapi Bali.

Apabila dibandingkan dendogram filogeni daerah *D-loop* mtDNA parsial (479 bp) hasil penelitian ini dengan dendogram filogeni gen *cytochrome-b* mtDNA parsial (420 bp) yang diambil dari data *GenBank*, maka dapat diketahui bahwa posisi sapi Bali sangat dekat dan berada satu klaster dengan Banteng (*Bos javanicus*) (Gambar 4). Sapi Bali memiliki persamaan susunan basa nukleotida sebesar 99,76% dengan Banteng, namun sapi asli Indonesia yang tidak jelas disebutkan bangsa dan sumber pengambilan sampelnya masuk ke dalam klaster *Bos indicus*, berbeda dengan pengelompokan sapi Aceh, PO dan Pesisir dari analisis *D-loop* dalam penelitian ini. Sekuens parsial (420 bp) gen *cytochrome-b* dari *GenBank* untuk membentuk dendogram filogeni tersebut diambil dari Kikkawa *et al.* (2003) yang telah melakukan sekuensing parsial pada gen *cytochrome-b* sapi Bali (kode akses AB077314), sapi asli Indonesia (AB077313) dan Banteng (AB077315). Membentuk pohon filogeni dari gen *cytochrome-b*, juga telah diambil sekuens *Bos indicus* (Nellore, kode akses AY126697; Miretti *et al.* 2002) dan *Bos taurus* (Simmental, kode akses AY521055) dari *GenBank*.



Gambar 4. Dendrogram *Neighbor-Joining* berdasarkan metode 2 parameter Kimura

dari nukleotida gen *cytochrome-b* parsial (berukuran 420 nt) sapi dari *GenBank* dengan pengolahan bootstrap 1000 ulangan

KESIMPULAN

Sapi Aceh mempunyai hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan sapi-sapi zebu dan ada sisipan materi genetik sapi Bali (*Bos javanicus*) pada bagian akhir sekuensnya mulai situs ke-354 sampai dengan 483, sehingga spesies domestikasi dari sapi Aceh adalah *Bos indicus* yang telah mengalami hibridisasi dengan *Bos javanicus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A.N., Noor, R.R., Martojo, H., 2005. Kelenturan fenotipik sifat-sifat Produksi dan Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) sebagai respons terhadap air minum yang mengandung tingkat garam berbeda. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 30 (2): 63-74.
- Abdullah, M.A.N., Noor, R.R., Martojo, H., Solihin, D.D. dan Handiwirawan, E., 2007. Keragaman fenotipik sapi Aceh di Nanggroe Aceh Darussalam. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 32 (1) : 11-21.
- Abdullah, M.A.N., 2008. Karakterisasi Genetik sapi Aceh dengan Menggunakan Analisis Keragaman Fenotipik, Daerah D-loop DNA Mitokondria dan DNA Mikrosatelit. Disertasi, Institut Pertanian Bogor, Sekolah Pascasarjana, Bogor, Indonesia.
- Abdullah, M.A.N., Noor, R.R., Martojo, H. dan Solihin, D.D., 2008. Karakterisasi genetik sapi Aceh dengan menggunakan mikrosatelit. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 33 (3): 165-175.
- Duryadi, D., 1997. Isolasi dan Purifikasi Mitochondrion (mtDNA). Laboratorium Molekuler FMIPA. Biotrop, IPB, Bogor.
- Goode, M. and Rodrigo, A.G., 2007. Squint Alignment Editor (v.1.02): A multiple alignment program and editor., *Bioinformatics* 23:1553-1555 (www.Bioinformatics.org.nz) [5 Agustus 2007]

- Kikkawa, Y., Takada, T., Sutopo, Nomura, K., Namikawa, T., Yonekawa, H. and Amano, T., 2003. Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. *Anim. Genet.* 34 (2): 96-101.
- Malevičiūtė, J., Baltėnaitė, L. and Miceikienė, I., 2002. Domestic cattle breed diversity in Lithuania. ISSN 1392-2130. *Veterinarija Ir Zootechnika. T.* 20 (42): 87-91.
- 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. Veeartseijkundige Mededeeling. No. 51. Landsdrukkerij-Weltevreden, Nederland.
- 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.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2007. GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [28 Mai 2007].
- Nijman, I.J., Otsen, M., Verkaar, E.L.C., Ruijter, C.D., Hanekamp, E., Ochieng, J.W., Shamshad, S., Rege, J.E.O., Hanotte, O., Barwegen, M.W., Sulawati, T. and Lenstra, J.A., 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., 2008. Genetika Ternak. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Patricia, M.M, García, P.P. and Dulout F.N., 2002. Mitochondrial variability in the *D-loop* of four equine breeds shown by PCR-SSCP analysis. *Genet Mol Biol.* 25 (1): 1-7.
- Primer3. 2007. Primers3 (v.0.4.0) Pick Primers from a DNA Sequence. http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi [15 Pebruari 2007].
- Putra, L., 2001. Panglima Teuku Nyak Makam Pahlawan Dua Pusara. Titian Ilmu Insani, Bekasi.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sodhi, M., Mukesh, M., Prakash, B., Ahlawat, S.P.S. and Sobti, R.C., 2006. Microsatellite DNA typing for assessment of genetic variability in Tharparkar breed of Indian zebu (*Bos indicus*) cattle, a major breed of Rajasthan. *Genetics.* 85: 165–170.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Advance Access published May 7. Oxford University Press. Molecular Biology and Evolution 10.1093/molbev/msm092.