

Identifikasi Keragaman Genetik Gen Reseptor Hormon Pertumbuhan (GHR|Alu I) pada Sapi Bali

Identification of Genetic Diversity of Growth Hormone Receptor (GHR|Alu I) Gene in Bali Cattle

Zulkharnaim^a*, Jakaria^b, & R. R. Noor^b

^aProgram Studi Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

^bDepartemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

(Diterima 21-04-2010; disetujui 07-06-2010)

ABSTRACT

Growth hormone receptor (GHR) is one factor affecting animal growth. GHR is required by growth hormone (GH) to carry out its effects on target tissues. The objective of the study was to estimate genetic diversity of the GHR|AluI gene in bali, limousin, simmental and pesisir cattle. Genotyping was performed on 248 animals, including 162 bali, 21 limousin, 17 simmental and 48 pesisir. Single nucleotide polymorphisms (SNP) had been found in exon 10, coding for the cytoplasmic domain of GHR, which was located at position 81 bp (A/G) induced amino acid substitutions Ser/Gly. Genotype frequencies of bali cattle AA (0.988), GG (0.006) and AG (0.006) were evidenced for the GHR AluI monomorphism, but mostly different from limousin GG (0.667), AA (0.238) and AG (0.095), simmental AG (0.529), GG (0.471) and AA (0.000), pesisir AA (0.604), GG (0.375) and AG (0.021) were the evidence of polymorphism. Homozigosity (monomorphism) in bali cattle might be affected by adaptability in extreme environmental conditions such as poor nutrition and improper management practices. It also could be affected by natural selection and phenotype plasticity phenomena.

Key words: Bali cattle, GHR|Alu I, genetic diversity, PCR-RFLP, sequencing

PENDAHULUAN

Ternak sapi memberikan kontribusi cukup besar dalam penyediaan daging nasional. Berdasarkan produksi daging nasional 2008, kontribusi daging sapi mencapai lebih dari 352 ribu ton, yaitu sekitar 16,2% dari total produksi daging nasional dari beberapa komoditas ternak, dan menempati peringkat kedua setelah produksi daging unggas (Direktorat Jenderal Peternakan, 2009). Perannya yang sedemikian penting menjadi alasan mengapa produktivitas dan populasi sapi di Indonesia mendapat perhatian cukup besar dari pemerintah.

Sapi bali merupakan salah satu dari empat bangsa sapi lokal utama (aceh, pesisir, madura, dan bali) di Indonesia. Keunggulan sapi bali antara lain memiliki tingkat fertilitas tinggi (80%–82%), daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan baru, produksi karkas yang tinggi, heterosis positif tinggi pada persilangan (Noor *et al.*, 2001), dan memiliki daging berkualitas baik dengan kadar lemak rendah (Bugiwati, 2007). Beberapa sifat produksi dan reproduksi tersebut merupakan sifat ekonomis dan biologis penting yang dapat digunakan

sebagai indikator seleksi (Handiwirawan & Subandriyo, 2004).

Sapi bali memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan yang marjinal, hal tersebut berpengaruh terhadap pertumbuhan yang menunjukkan keragaman pada kondisi lingkungan yang berbeda. Salah satu faktor yang mempunyai peranan di dalam pertumbuhan suatu individu adalah gen hormon pertumbuhan (growth hormone/GH). Gen GH dibutuhkan untuk pertumbuhan jaringan, metabolisme lemak, pengaturan reproduksi, laktasi, pertumbuhan tubuh normal (Beauchemin *et al.*, 2006) dan sifat pertumbuhan pada sapi pedaging (Hale *et al.*, 2000). Faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan dari individu adalah gen reseptor hormon pertumbuhan (growth hormone receptor/GHR). Zhou & Jiang (2005) menyatakan bahwa pada tingkatan jaringan, aksi biologis dari gen GH dimediasi oleh gen GHR. Berdasarkan fungsi mediasi yang dimiliki oleh gen GHR maka keragaman pertumbuhan ternak sapi dapat juga diidentifikasi dari keragamannya.

Gen *bovine growth hormone receptor* (bGHR) disandikan sebagai gen tunggal dan terletak pada kromosom 20 (Lin *et al.*, 2009). *Single nucleotide polymorphism* (SNP) ditemukan pada ekson 10 pada posisi 257 pb (A/G) yang mengubah susunan asam amino serina menjadi

*Korespondensi:
e-mail: almaupa_anim@yahoo.co.id

glisina (Ge *et al.*, 2000). Hubungan antara keragaman gen GHR|*AluI* dan sifat pertumbuhan sapi telah dilakukan pada sifat *in vivo* dan karakteristik daging sapi Piedmontese (Di Stasio *et al.*, 2005), lemak karkas pada sapi *Bos taurus* (Tatsuda *et al.*, 2008), lemak intra muskular (Han *et al.*, 2009) dan komposisi otot (lemak intramuskular, protein dan kadar air) (Reardon *et al.*, 2010).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari keragaman gen reseptor hormon pertumbuhan (GHR)|*AluI* (lokus *AluI*) pada sapi bali. Informasi ini penting sebagai salah satu informasi dasar dalam rangka melengkapi kerangka kerja genetika molekuler dalam upaya perbaikan mutu genetik, strategi pengembangan dan penentuan kebijakan pengembangan sapi bali agar pemanfaatannya bisa berjalan secara berkelanjutan.

MATERI DAN METODE

Sampel DNA

Isolasi DNA dilakukan dari sampel darah menggunakan *genomic DNA mini kit Geneaid*. Sampel DNA yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 248 sampel. Sampel DNA tersebut diisolasi dari sampel darah dengan distribusi 162 sampel sapi bali (10 dari UP3 Bali dan 152 dari BIBD Bali). Sebagai pembanding, digunakan 21 sampel sapi limousin (BIB Singosari Malang), 17 sampel sapi simmental (BIB Singosari Malang), dan 48 sampel sapi pesisir (Kabupaten Pesisir Selatan).

Amplifikasi Fragmen Gen GHR|*AluI*

Amplifikasi gen GHR|*AluI* dengan mesin *thermal cycler* dilakukan menggunakan metode PCR. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi ruas gen GHR ekson 10 mengikuti Andreas (2010), dengan runutan primer *forward* 5'-CGCTTACTTCTGCGAGGTAGACGC-3' dan primer *reverse* 5'-GTCTGTGCTCACATAGCCAC-3'. Panjang fragmen hasil amplifikasi sepanjang 298 pb.

Komponen pereaksi yang digunakan untuk amplifikasi ruas gen GHR|*AluI* adalah 2 µl sampel DNA, masing-masing primer 0,5 pmol, campuran dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, *taq polymerase* (real taq) 0,1 unit dan bufernya dalam larutan total 25 µl. Proses amplifikasi dilakukan pada mesin *thermal cycler* (Eppendorf Type 5332) dengan kondisi mesin sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 5 menit, 35 siklus terdiri atas denaturasi pada suhu 94 °C selama 45 detik, penempelan primer pada suhu 60 °C selama 1 menit dan pemanjangan DNA baru pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik, dan pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit.

Identifikasi Keragaman Gen GHR|*AluI*

Identifikasi keragaman gen GHR|*AluI* dilakukan menggunakan metode *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) menggunakan enzim pemotong *AluI* (lokus GHR *AluI*) dengan situs pemotongan AG|CT. Produk PCR-RFLP divisualisasikan pada gel agarosa 2% (0,6 g agarosa/30 ml 0,5x TBE),

dilanjutkan dengan pewarnaan etidium bromida dan divisualisasikan pada UV transilluminator.

Analisis Data

Frekuensi alel dihitung menggunakan rumus Nei & Kumar (2000), dengan x_i adalah frekuensi alel ke- i , N_{ii} adalah jumlah individu bergenotipe A_iA_i , N_{ij} adalah jumlah individu bergenotipe A_iA_j dan N adalah jumlah total sampel.

$$x_i = \frac{(2N_{ii} + \sum_{j \neq i} N_{ij})}{2N}$$

Keseimbangan Hardy-Weinberg (H-W) diuji dengan uji khi-kuadrat (Kaps & Lamberson, 2004), dengan χ^2 adalah uji khi-kuadrat, *obs* adalah jumlah pengamatan genotipe ke- i , dan *exp* adalah jumlah harapan genotipe ke- i .

$$\chi^2 = \sum \frac{(obs - exp)^2}{exp}$$

Heterozigositas pengamatan (H_o) dihitung menggunakan rumus Weir (1996), dengan H_o adalah frekuensi heterozigositas pengamatan, N_{ij} adalah jumlah individu heterozigositas pada lokus ke-1 dan N adalah jumlah individu yang dianalisa.

$$H_o = \sum_{i \neq j} \frac{N_{ij}}{N}$$

Heterozigositas harapan (H_e) dan ragam heterozigositas harapan dihitung menggunakan rumus Weir (1996), dengan H_e adalah heterozigositas harapan, P_{ii} adalah frekuensi alel ke- i pada lokus 1 dan n adalah jumlah alel pada lokus ke-1.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_{ii}^2$$

$(V_{sl}(H_e))$ = ragam heterozigositas harapan dan x_i adalah frekuensi gen ke-1

$$V_{sl}(H_e) = \frac{2}{2n(2n-1)} \left\{ 2(2n-2) \left(\sum x_i^3 - \left(\sum x_i^2 \right)^2 \right) + \sum x_i^2 - \left(\sum x_i \right)^2 \right\}$$

Ragam (SE) heterozigositas harapan diperoleh dari =

$$\sqrt{V_{sl}(H_e)}$$

Tingkat informatif suatu alel dihitung menggunakan rumus *polymorphic informative content* (PIC) (Botstein *et al.*, 1980), dengan p_i adalah frekuensi alel ke- i dan n adalah jumlah alel per perinci (marker).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Hasil sekuens fragmen gen GHR|*AluI* sapi bali, limousin, simmental, dan pesisir dianalisa kesamaannya (homology) dengan sekuens yang terdapat di GenBank menggunakan perangkat lunak (software) komputer program *basic local alignment search tool* (BLAST) (McGinnis & Madden, 2004) [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST] yang bertujuan untuk memastikan bahwa sekuens yang dianalisa adalah gen GHR dan untuk mengetahui titik mutasi gen GHR|*AluI*.



Gambar 1. Produk PCR gen GHR|AluI (298 pb) pada sapi bali

Pohon kekerabatan (phylogenetic trees) dibuat berdasarkan frekuensi genotipe gen GHR|AluI menggunakan *software* komputer program MEGA 4 (molecular evolutionary genetic analysis) dengan metode UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) (Nei & Kumar, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

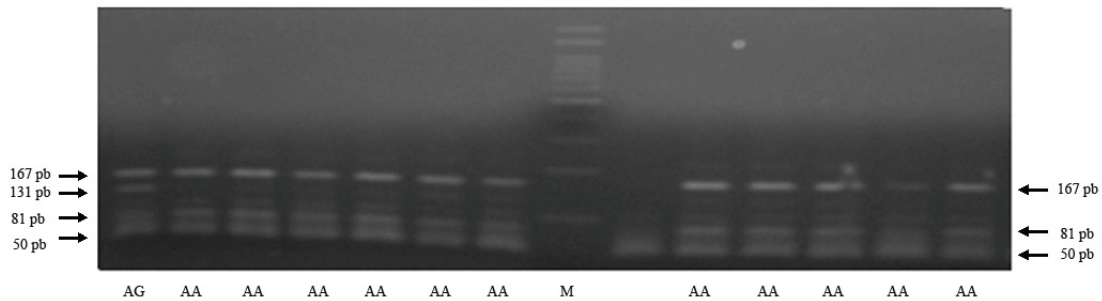
Analisis PCR-RFLP Gen GHR|AluI

Amplifikasi fragmen gen GHR|AluI yang dilakukan pada sapi bali, limousin, simmental, dan pesisir menunjukkan posisi gen GHR pada ekson 10 untuk fragmen gen GHR|AluI dengan produk PCR sepanjang

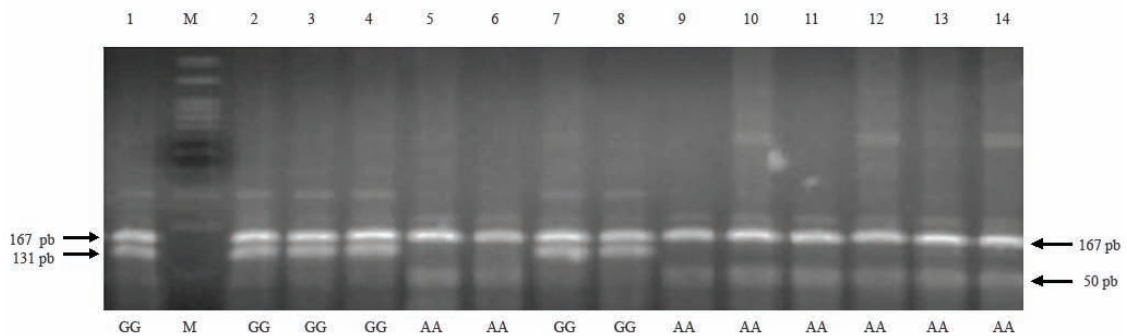
298 pb (Gambar 1). Hasil pemotongan fragmen gen GHR|AluI pada sapi bali, limousin, simmental, dan pesisir menghasilkan tiga genotipe, yaitu genotipe AA yang terpotong pada 167 pb, 81 pb dan 50 pb, genotipe GG pada 167 pb dan 131 pb, sedangkan genotipe AG pada 167 pb, 131 pb, 81 pb dan 50 pb (Gambar 2 dan Gambar 3). Mutasi pada gen GHR|AluI mengubah basa adenin (A) menjadi guanin (G) pada posisi 81 pb yang menyebabkan perubahan asam amino serina (AGC) menjadi glisina (GGC).

Keragaman Gen GHR|AluI

Perbedaan frekuensi genotipe gen GHR|AluI (Tabel 1) antara sapi bali, limousin, simmental, dan pesisir,



Gambar 2. Genotipe hasil pemotongan produk PCR gen GHR|AluI sapi bali
M (marker)= ladder 100 pb; AA= individu homozigot (167 pb, 81 pb dan 50 pb); AG= individu homozigot (167 pb, 131 pb, 81 pb, dan 50 pb)



Gambar 3. Genotipe hasil pemotongan produk PCR gen GHR|AluI pada sapi bali
M (marker)= ladder 100 pb; AA= individu homozigot (167 pb, 81 pb, dan 50 pb); GG= individu homozigot (167 pb dan 131 pb); 1,2,12,13,14= sapi limousin; 3,4,5,6= sapi simmental; 7,8,9,10,11= sapi pesisir.

Tabel 1. Frekuensi genotipe dan alel gen GHR|AluI pada sapi bali

Sapi	n	Genotipe			Alel	
		AA	AG	GG	A	G
Bali	162	0,988**	0,006**	0,006**	0,991	0,009
Limousin	21	0,238**	0,095**	0,667**	0,286	0,714
Simmental	17	0,000 ^{ns}	0,529 ^{ns}	0,471 ^{ns}	0,265	0,735
Pesisir	48	0,604**	0,021**	0,375**	0,615	0,385

Keterangan: n= jumlah individu. **) berbeda sangat nyata, ns tidak berbeda nyata ($P < 0,05$).

disebabkan oleh perbedaan bangsa sapi. Ekspresi genetik gen GHR|AluI tergantung pada bangsa ternak, frekuensi genotipe AA, AG dan GG pada sapi bali sebesar 0,988; 0,006; dan 0,006, hal ini disebabkan sapi bali termasuk ke dalam bangsa *Bos javanicus*. Frekuensi genotipe AA, AG dan GG pada sapi limousin sebesar 0,238; 0,095; dan 0,667, dan frekuensi genotipe AA, AG dan GG pada sapi simmental sebesar 0,000; 0,529; dan 0,471, kedua sapi tersebut termasuk ke dalam bangsa *Bos taurus*. Frekuensi genotipe AA, AG dan GG pada sapi pesisir sebagai sapi lokal selain sapi bali sebesar 0,604; 0,021; dan 0,375.

Keragaman frekuensi alel dan genotipe gen GHR|AluI (Tabel 1) pada sapi bali ditandai dengan frekuensi alel A dan genotipe AA yang tinggi, dan alel AG dan GG yang rendah. Hal tersebut berbeda dengan bangsa lainnya disebabkan sapi bali termasuk bangsa *Bos javanicus* dan berbeda dengan bangsa sapi lainnya (*Bos taurus* dan sapi Pesisir). Perbedaan bangsa *Bos javanicus* dan bangsa sapi lainnya dikemukakan juga oleh Kusdiantoro *et al.* (2009) yang mengungkapkan hubungan maternal sapi bali asli dari empat wilayah berbeda (Sulawesi, Bali, Sumatera Selatan, dan Sumatera Barat) dengan banteng ditinjau dari analisis DNA mitokondria (mt), kromosom Y (Y) dan mikrosatelit alel autosom (μ st), dan terpisah dari sapi lokal lainnya (sapi pesisir, aceh, dan madura) dan sapi-sapi zebu (*Bos indicus*). Tingginya frekuensi alel G pada *Bos taurus* (limousin dan simmental) dikemukakan juga oleh Di Stasio *et al.*, (2005) yang mengidentifikasi frekuensi alel gen GHR|AluI pada sapi piedmontese yang memiliki frekuensi alel G lebih tinggi (0,510) dibandingkan alel A (0,490).

Frekuensi alel A fragmen gen GHR|AluI yang tinggi 0,988 dan frekuensi alel G yang rendah (0,012) pada sapi bali (*Bos javanicus*) menunjukkan bahwa fragmen gen GHR|AluI bersifat monomorfik. Falconer & Mackay (1996) menyatakan bahwa sebuah lokus polimorfik ditandai dengan salah satu frekuensi alelnya kurang dari 0,99. Frekuensi alel A gen GHR|AluI sapi bali yang tinggi tersebut atau bersifat monomorfik memperjelas perbedaan sapi bali dengan sapi bangsa lainnya, sehingga menjadi informasi penting dalam pengambilan keputusan pengembangan sapi bali sebagai ternak lokal utama penghasil daging ke depan.

Frekuensi alel dan genotipe gen GHR|AluI pada sapi bali yang menunjukkan monomorfik disebabkan sapi bali merupakan ternak domestik daerah tropis Indonesia. Sapi bali sebagai hasil domestikasi langsung dari banteng *Bos banteng* (Namikawa *et al.*, 1980), telah

beradaptasi dengan lingkungan tropis sehingga pengaruh lingkungan berperan terhadap sifat produksinya. Proses adaptasi tersebut merupakan proses evolusi dan seleksi pada spesies ternak domestik.

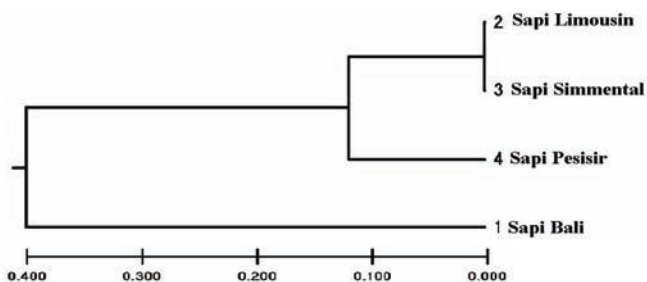
Kemampuan adaptasi sapi bali didapatkan dari seleksi alam dan berpengaruh terhadap sifat produksinya. Umumnya seleksi alam terpusat pada pembentukan individu-individu yang kuat dan tahan terhadap tantangan lingkungan alam sekitarnya. Hal tersebut mengakibatkan ternak hasil seleksi alam sifat produksinya (pertumbuhan) rendah disebabkan sifat yang diekspresikan terbatas hanya untuk mempertahankan hidupnya. Terkait kemampuan sapi Bali dalam mengekspresikan sifat yang dibutuhkan dalam bertahan hidup, sebuah fenomena variasi genetik pada individu berlaku. Fenomena kelenturan fenotipik sebagai hasil seleksi alam menyebabkan genotipe sapi bali cenderung kurang bervariasi (monomorfik). Noor (2002) menyatakan bahwa kemampuan suatu individu/genotipe untuk menampilkan lebih dari satu bentuk morfologi, status fisiologi dan/atau tingkah laku sebagai respon terhadap perubahan lingkungan disebut sebagai kelenturan fenotipik.

Hasil uji khi-kuadrat (χ^2) terhadap frekuensi genotipe gen GHR|AluI menunjukkan perbedaan antara rasio pengamatan dan rasio harapan atau terjadi keadaan ketidakseimbangan H-W pada populasi sapi bali, limousin dan pesisir, sedangkan keseimbangan H-W hanya terjadi pada populasi sapi simmental. Ketidakseimbangan H-W pada populasi sapi bali dan pesisir diduga disebabkan oleh seleksi alam yang terjadi dalam proses domestikasi sapi bali dan proses pembentukan sapi pesisir. Seleksi negatif yang terjadi pada sapi bali dan pesisir yakni pemotongan dan penjualan sapi-sapi yang mempunyai pertumbuhan yang baik oleh peternak juga diduga menjadi penyebab ketidakseimbangan H-W. Jakaria *et al.* (2007) menyatakan bahwa pada populasi sapi pesisir di Kabupaten Pesisir Selatan menunjukkan frekuensi genotipe tidak seimbang ($P < 0,01$) terhadap penciri PCR-RFLP GH|MspI dan GH|AluI. Hal ini berarti bahwa pada populasi sapi pesisir tidak terjadi kawin acak, adanya seleksi, mutasi, migrasi dan terjadi endogami.

Ketidakeimbangan H-W pada sapi limousin terjadi disebabkan ukuran populasi sampel yang kecil. Hal ini sesuai dengan pendapat Falconer & Mackay (1996) yang menyatakan bahwa ukuran populasi sampel juga mempengaruhi perubahan frekuensi genotipe dari generasi ke generasi. Menurut Vasconcellos *et al.* (2003), beberapa kejadian seperti akumulasi genotipe, populasi

Tabel 4. Jarak genetik berdasarkan gen GHR|AluI pada sapi bali

Bangsa sapi		1	2	3	4
Bali	[1]	0,000			
Limousin	[2]	0,497	0,000		
Simmental	[3]	0,527	0,001	0,000	
Pesisir	[4]	0,142	0,108	0,122	0,000



Gambar 5. Dendrogram pohon genetik berdasarkan gen GHR|AluI pada sapi bali

punyai hubungan yang jauh terhadap sapi *Bos taurus* (limousin dan simmental) dan sapi lokal lainnya (sapi pesisir). Sapi bali sebagai sapi lokal asli yang merupakan domestikasi langsung dari banteng liar (*Bos banteng*) (Namikawa *et al.*, 1980) dan merupakan hasil seleksi alam daerah tropis yang berbeda dengan bangsa sapi *Bos taurus* yang merupakan sapi daerah subtropis.

KESIMPULAN

Gen GHR|AluI pada sapi bali bersifat monomorfik dengan frekuensi alel A dan genotipe AA yang tinggi, sedangkan pada sapi limousin, simmental dan pesisir bersifat polimorfik. Nilai pendugaan heterozigositas dan PIC gen GHR|AluI pada sapi bali rendah disebabkan tingkat keragamannya yang rendah jika dibandingkan dengan sapi limousin, simmental, dan pesisir. Hasil sekuen gen GHR|AluI menunjukkan adanya mutasi basa adenin (A) menjadi guanin (G) pada posisi 81 pb (3338 pb Kode Akses. EF207442 *GenBank*). Berdasarkan pohon genetik gen GHR|AluI terdapat pemisahan yang jelas antara sapi bali, limousin, simmental, dan pesisir.

DAFTAR PUSTAKA

Andreas, E. 2010. Telaah kualitas daging serta identifikasi keragaman gen GH dan GHR pada kerbau. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Beauchemin, V. R., M. G. Thomas., D. E. Franke, & G. A. Silver. 2006. Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. *Genet. Mol. Res.* 5:438-447.

Bugiwati, S. R. A. 2007. Pertumbuhan dimensi tubuh pedet jantan sapi bali di Kabupaten Bone dan Barru Sulawesi Selatan. *J. Sains dan Tekno.* 7:103-108.

Botstein, D. R., L. White., M. Skolnik, & R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314.

Di Stasio, L., G. Destefanis., A. Brugiapaglia., A. Albera, & A. Rolando. 2005. Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationships with meat production and quality. *Anim. Genet.* 36:138-140.

Direktorat Jenderal Peternakan. 2009. Buku Statistik Peternakan Tahun 2008. Departemen Pertanian, Jakarta.

Falconer, D. S & T. F. C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. 4th. Ed. Longman Inc, New York.

Ge, W., M. E. Davis., H. C. Hines, & K. M. Irvin. 2000. Rapid communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. *J. Anim. Sci.* 78:2229-2230.

Hale, C.S., W. O. Herring, H. Shibuya, M. C. Lucy, D. B. Lubahn, D. H. Keisler, & G. S. Johnson. 2000. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of growth hormone receptor gene. *J. Anim. Sci.* 78:2099-2104.

Han, S. H., I. C. Cho, J. H. Kim, M. S. Ko, H. Y. Jeong, H. S. Oh, & S. S. Lee. 2009. A GHR polymorphism and its associations with carcass traits in Hanwoo cattle. *Genes & Genom.* 31:35-41.

Handiwirawan, E. & Subandriyo. 2004. Potensi dan keragaman sumberdaya genetik sapi Bali. *Wartazoa* 14:3.

Jakaria, D. Duryadi, R. R. Noor, B. Tappa, & H. Martojo. 2007. Evaluasi keragaman genetik gen hormon pertumbuhan sapi Pesisir Sumatera Barat menggunakan penciri PCR-RFLP. *Med. Pet.* 30:1-10.

Kaps, M. & W. R. Lamberson. 2004. Biostatistics for Animal Science. CABI Publishing, London.

Kusdiantoro, M., M. Olsson, H. T. A. van Tol, S. Mikko, B. H. Vlamings, G. Andersson, H. Rodriguez-Martinez, B. Purwantara, R. W. Paling, B. Colenbrander, & J. A. Lenstra. 2009. On the origin of Indonesian cattle. *Plos one* 4:e5490.

Lin, B. Z, S. Sasazaki, J. H. Lee, & H. Mannen. 2009. Genetic diversity of growth hormone receptor gene in cattle. *J. Anim. Sci.* 80:528-531

Marson, E. P., J. B. S. Ferraz, F. V. Meirelles, J. C. C. Balieiro, J. P. Eler, L. G. G. Figuerido, & G. B. Mourao. 2005. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. *Genet. Mol. Res.* 4:496-505.

McGinnis, S. & T. L. Madden. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools *Nucleic Acids Research.* 32:20-25.

Namikawa, T., J. Otsuka, & H. Martojo. 1980. Coat colour variations of Indonesian cattle. The origin and phylogeny of Indonesian native livestock (Part III): Morphological and genetically investigations on the interrelationship between domestic animals and their wild forms in Indonesia. *The Research Group of Overseas Scientific Survey* 31-34, p. 19-27.

Nei, M. & S. Kumar. 2000. Molecular Evolution And Phylogenetics. Oxford University press, New York.

Noor, R. R, A. Farajallah, & M. Karmita. 2001. Pengujian kemurnian sapi bali dengan analisis hemoglobin dengan metode isoelectric focusing. *Hayati* 8:107-111.

Noor, R. R. 2002. Genetika Ekologi. Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Ternak. Fakultas Peternakan, IPB.

Noor, R. R. 2008. Genetika Ternak. Penebar Swadaya, Jakarta.

Reardon, W., A. M. Mullen, T. Sweeney, & R. M. Hamill. 2010. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Sci.* (In Press).

Tatsuda, K., A. Oka, E. Iwamoto, Y. Kuroda, H. Takeshita, H. Kataoka, & S. Kouno. 2008. Relationship of the bovine growth hormone gene to carcass traits in Japanese black cattle. *J. of Anim. Breed. and Genet.* 125:45-49.

- Vasconcellos, L. P. M. K., D. T. Talhari, A. P. Pereira, L. L. Coutinho, & L. C. A. Regitano.** 2003. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. *Genet. Mol. Bio.* 26:133-137.
- Weir, B. S.** 1996. *Genetic Data Analysis : Method for Discrete Population Genetic Data*. Second ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA USA.
- Windelspecht, M.** 2007. *Genetics* 101. Greenwood Press, London
- Zhou, Y & H. Jiang.** 2005. Trait-associated sequence variation in the bovine growth hormone receptor 1A promoter does not affect promoter activity in vitro. *Anim. Genet.* 36:156-159.