

ANALISIS KERAGAMAN GENETIK KERBAU LOKAL (*Bubalus bubalis*) BERDASARKAN HAPLOTIPE DNA MITOKONDRIA

(Analysis of Genetic Diversity of Local Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Based on Mitochondrial DNA Haplotypes)

WIWIN TARWINANGSIH¹, A. FARAJALLAH,² C. SUMANTRI¹ dan E. ANDREAS¹

¹Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Mitochondrial DNA analysis is often used to study genetic diversity and phylogenetic relationships of the population through maternal inheritance pattern. This study aimed to identify the genetic variation among local buffaloes based on mtDNA. A total of 44 blood samples were collected from four provinces respectively, namely Central Java (10 heads), Nusa West-East (12 heads), North Sumatra (10 heads) and Banten (12 heads). MtDNA genome was extracted using phenol-chloroform protocol and amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cut with restriction enzymes (restriction fragment length polymorphisms/RFLP). Primers used in the Forward GCATACGCAATCTTACGATCA (AF22) and Revers GTAGCTGGACTTAACTGCAT (AF23). PCR products along the 1145 base pairs (bp) was cuted with four restriction enzymes, namely AluI HaeIII, HinfI and MspI. The results showed the existence of two mtDNA haplotypes. The first haplotype had a widespread distribution throughout the sampling area, whereas the second haplotype was only found in one sample of North Sumatra. Based on the presence or absence of the restriction sites of the two haplotypes, it was obtained the value of nucleotide diversity (π) of 0.17%. The calculation of genetic distance in the form of a dendrogram showed that the samples of buffalo which coming from Central Java, Nusa West-East and Banten were probably derived from a common ancestor ($D = 0.0000$). Similarly, samples of buffaloes from North Sumatra was closely related to the third area ($D = 0.0061$).

Key Words: MtDNA Genes, Buffalo, Bubalus Bubalis, PCR-RFLP

ABSTRAK

Analisis DNA mitokondria sering digunakan untuk mempelajari keragaman genetik populasi dan hubungan filogenetik melalui pola pewarisan maternal. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen *cyt-b* hingga daerah pengendali (*d-loop*) genom mitokondria kerbau lokal (*Bubalus bubalis*). Sebanyak 44 sampel darah dikoleksi dari empat provinsi yaitu masing-masing Jawa Tengah (10 ekor), Nusa Tenggara Barat (12 ekor), Sumatera Utara (10 ekor) dan Banten (12 ekor). Genom mtDNA diekstrak menggunakan *phenol-chloroform protocol* dan diamplifikasi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), dan *primer forward* yang digunakan GCATACGCAATCTTACGATCA (AF22) dan *Revers* GTAGCTGGACTTAACTGCAT (AF23). Produk PCR sepanjang 1145 pasang basa (pb) dipotong dengan enzim restriksi *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* dan *MspI* (*restriction fragment length polymorphisms/RFLP*). Hasil penelitian menunjukkan adanya dua haplotipe mtDNA. Haplotipe pertama memiliki pola penyebaran luas di seluruh wilayah pengambilan sampel, sedangkan haplotipe kedua hanya ditemukan pada satu sampel dari wilayah Sumatera Utara. Berdasarkan ada tidaknya situs restriksi dari dua haplotipe, diperoleh nilai keragaman nukleotida (π) sebesar 0,17%. Perhitungan jarak genetik dalam bentuk dendrogram menunjukkan bahwa sampel kerbau yang berasal dari Jawa Tengah, Nusa Tenggara Barat dan Banten diduga berasal dari nenek moyang yang sama ($D = 0,0000$). Begitu pula dengan sampel kerbau dari Sumatera Utara berkerabat dekat dengan ketiga wilayah tersebut ($D = 0,0061$).

Kata Kunci: Gen MtDNA, Kerbau, *Bubalus Bubalis*, PCR-RFLP

PENDAHULUAN

Populasi ternak kerbau pada tahun 2005 sebanyak 2.128.000 ekor dan pada tahun 2009 turun menjadi 2.046.000, dengan demikian selama kurun waktu 2004 – 2008 mengalami penurunan 3,85 % per tahun (DITJENNAK, 2009). Hasil studi keragaman genetik kerbau lumpur/swamp buffalo melalui indentifikasi keragaman gen hormon pertumbuhan diketahui sangat rendah seperti yang diamati pada gen GHRH|HaeIII (PRIMASARI *et al.*, 2009), gen Pit-1|HinfIII (MISRIANTI *et al.*, 2010), gen GH|AluI dan GHR|AluI (ANDREAS *et al.*, 2010). Keragaman gen mitokondria (mtDNA) digunakan untuk mempelajari keragaman genetik hewan dan hubungan sistematis pada berbagai tingkat hierarki (LAMB dan OSENTOSKI, 1995). Genom mitokondria memiliki ukuran yang relatif kecil yaitu ± 16 , kb dan memiliki laju evolusi yang cepat terutama pada daerah pengendali (*d-loop*), sehingga menimbulkan keragaman yang tinggi pada sekuen mtDNA intraspecies dan diwariskan secara maternal (AVISE, 1994). Untuk mengetahui keragaman genetik daerah pengendali mtDNA dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Informasi tentang keragaman mtDNA pada kerbau khususnya pada kerbau rawa di Indonesia masih sangat kurang, oleh karena itu tujuan dari penelitian ini untuk mengidentifikasi keragaman mtDNA pada beberapa populasi kerbau rawa di Indonesia.

MATERI DAN METODE

Ekstraksi DNA

Sampel darah kerbau yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 44 sampel yang dikumpulkan dari beberapa tempat di Indonesia, yaitu 10 sampel dari Jawa Tengah, 12 sampel dari Nusa Tenggara Barat, 10 sampel dari Sumatera Utara dan 12 sampel dari Banten. Sampel darah disimpan dalam alkohol 70% yang mengandung *etilendiamin tetraasetat* (EDTA) 1%. Isolasi DNA dilakukan menggunakan *Genomic DNA mini*

kit (Geneaid). Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *DNA mini kit Geneaid*

Amplifikasi mtDNA dengan Teknik Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Amplifikasi ruas daerah pengendali pada DNA mitokondria menggunakan pasangan primer sebagai berikut: AF22 5'-GCGTACGCAATCTTACGATCA-3' dan AF23 5'-GTAGCTGGACTTAACTGCAT-3' yang meliputi ruas bagian ujung 3' gen *cyt-b* sampai ke bagian daerah pengendali atau *d-loop*. Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan total volume sebanyak 25 μ l dengan komposisi sebagai berikut: sampel DNA template 2 μ l ditambah larutan premix 23 μ l yang terdiri dari primer 1 μ l, air destilata 16,35 μ l, 10 x *buffer* sebanyak 2,5 μ l, MgCl₂ 2 μ l, 2 mM dNTP 1 μ l, dan enzim *taq polymerase* Promega 0,15 μ l. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin TaKaRa *Thermal Cycler* dengan kondisi predenaturasi 94°C selama 5 menit yang kemudian diikuti dengan denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan (*annealing*) 58°C selama 2 menit dan pemanjangan (*elongation*) 72°C selama 2 menit yang diulang 30 kali. Amplicon dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* (AG|CT), *HaeIII* (GG|CC), *Hinf I* (G|ANTC), dan *MspI* (G|CGG). Kondisi reaksi pemotongan dilakukan dengan menambahkan 1 unit enzim restriksi pada 3 μ l amplicon dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama semalam.

Hasil PCR-RFLP dielektroforesis pada gel poliakrilamid 6% pada tegangan 180 V selama 60 menit dengan pewarnaan perak (TEGELSTORM, 1992). Penentuan genotipe dilakukan dengan cara menentukan ukuran panjang potongan DNA berdasarkan jarak migrasi pada gel poliakrilamid yang diacukan pada DNA ladder 100 base pair (Biorad).

Analisis data

Analisa data dilakukan dengan metode deskriptif berdasarkan parameter keragaman nukleotida (π), keragaman haplotipe (h), dan

jarak genetik antar populasi (NEI, 1987; NEI dan KUMAR, 2000). Hubungan kekerabatan dan perbedaan jarak genetik yang nyata diilustrasikan dalam bentuk dendrogram. Persamaan matematika keragaman nukleotida, keragaman haplotipe dan jarak genetik secara berturut-turut sebagai berikut:

$$\pi = \frac{(-\ln[S])}{b}$$

$$S = \frac{2\sum_{i<j} n_{ij}}{\sum_{i<j} n_i + \sum_{i<j} n_j}$$

- π : keragaman nukleotida
- S : peluang jika setiap haplotipe memiliki situs yang sama
- B : jumlah nukleotida setiap enzim
- n_{ij} : jumlah situs pada kedua haplotipe i dan j
- n_i : jumlah situs pada haplotipe i
- n_j : jumlah situs pada haplotipe j

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum X_i^2 \right)$$

- H : keragaman haplotipe
- N : jumlah sampel
- X_i : frekuensi haplotipe sampel ke-i

$$D = -\ln I$$

$$I = \frac{\sum_{i=1}^m (p_{ix} \times p_{iy})}{\sqrt{(\sum_{i=1}^m p_{ix}^2)(\sum_{i=1}^m p_{iy}^2)}}$$

- P_{ix} : frekuensi alel ke-i dari populasi X
- P_{iy} : frekuensi alel ke-i dari populasi Y
- D : jarak genetik

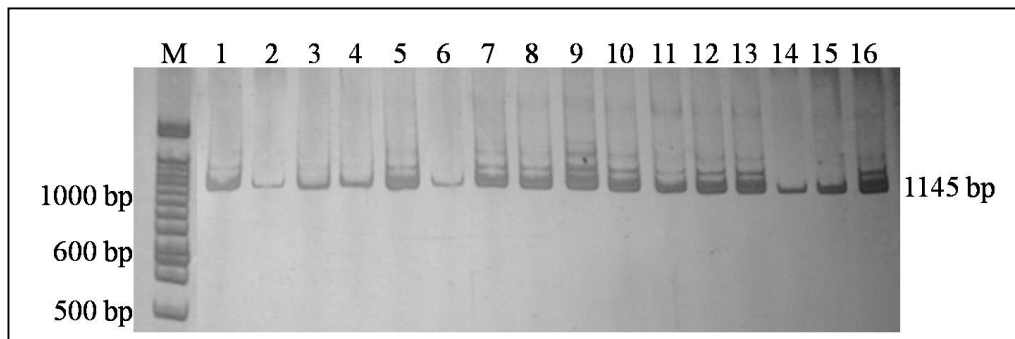
HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi ruas target

Hasil amplifikasi ruas pengendali (*d-loop*) mtDNA kerbau lokal (*Bubalus bubalis*) sepanjang 1145 pasang basa (pb) disajikan pada Gambar 1. Kerbau rawa (*Bubalus bubalis*) memiliki ukuran mtDNA sekitar 16359 pb (QIAN *et al.*, 2004). Panjang fragmen hasil amplifikasi dicocokkan dengan situs penempelan pasangan primer pada sekuen gen mtDNA *Bubalus bubalis* (GenBank No. Acc. AY702618). Produk amplifikasi dengan menggunakan pasangan primer yang digunakan meliputi ujung *cyt-b* sampai daerah *d-loop*. Ruas mtDNA target yang diamplifikasi adalah ruas pengontrol yang hipervariabel dan memiliki laju mutasi yang relatif cepat dibanding bagian lain di genom mitokondria.

Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism atau PCR-RFLP merupakan metode analisis lanjutan dari produk PCR. Metode PCR memanfaatkan perbedaan pola pemotongan enzim restriksi atau enzim pemotong yang berbeda pada tiap-tiap mikroorganisme. Enzim restriksi dapat memotong DNA secara spesifik dan terbatas pada situs yang dikenalnya (LEWIN, 1994). Analisis RFLP sering digunakan untuk mendeteksi lokasi genetik dalam kromosom



Gambar 1. Hasil amplifikasi daerah pengendali mtDNA (Kolom M: *Marker* (Penanda) 100 pb, Kolom 1 – 7: Pasangan primer AF22 dan AF23

yang menyandakan penyakit yang diturunkan (ORITA *et al.*, 1989) ataupun untuk mendeteksi adanya keragaman pada gen yang berhubungan dengan sifat ekonomis, seperti produksi dan kualitas susu (SUMANTRI *et al.*, 2004; SUMANTRI *et al.*, 2005). Hasil pemotongan menggunakan empat enzim restriksi, yaitu *AluI* (AG↓CT), *HaeIII* (GG↓CC), *HinfI* (G↓AnTC), dan *MspI* (C↓CGG) terhadap DNA hasil amplifikasi disajikan dalam Tabel 1.

Dari empat enzim yang digunakan menghasilkan tipe pemotongan yang monomorfik pada tiga situs pemotongan enzim (lokus) yaitu lokus *AluI*, lokus *HaeIII* dan lokus *MspI*, dan polimorfik pada lokus *HinfI*. Setiap pola situs pemotongan pada masing-masing lokus disebut haplotipe. Terdapat dua haplotipe kerbau yang ditemukan dari empat lokus yang diamati. Haplotipe pertama mewakili hampir semua wilayah, yaitu 43 sampel dari 44 sampel yang dianalisis, diantaranya 10 sampel dari Jawa Tengah, 12 sampel dari Nusa Tenggara Barat, 9 sampel

dari Sumatera Utara dan 10 sampel dari Banten. Haplotipe kedua hanya terdapat pada satu wilayah yaitu Sumatera Utara sebanyak satu sampel. Dengan kata lain, sebagian besar (97,73% dari sampel yang digunakan) ternak kerbau rawa pengamatan bersifat monomorfik berdasarkan lokus pengamatan yang digunakan dalam penelitian ini.

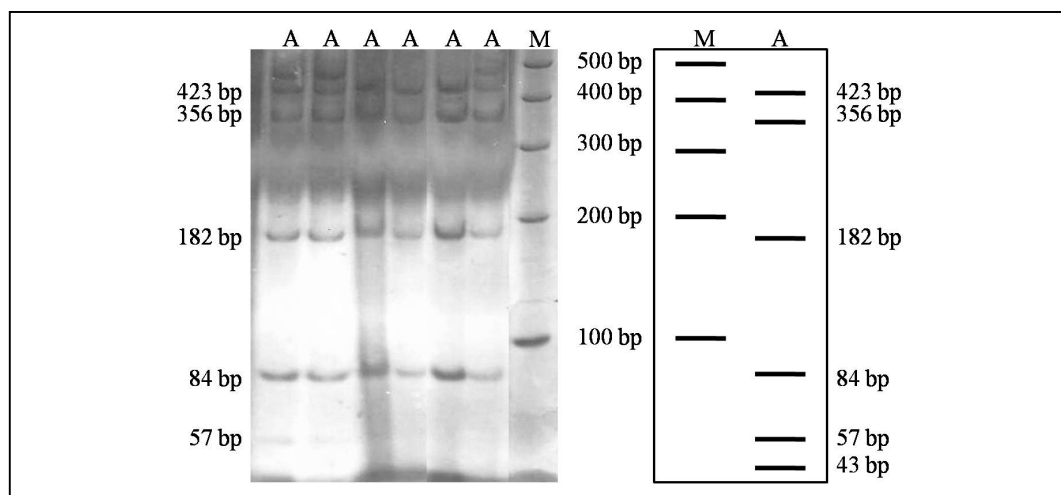
Enzim *AluI* menghasilkan pola pemotongan yang seragam, sehingga semua sampel pengamatan bergenotipe AA dengan 1 alel, yaitu alel A. Gambar 2 menunjukkan pola pemotongan mtDNA menggunakan enzim *AluI*. Pemotongan ini menghasilkan fragmen (potongan) berukuran 423, 356, 182, 84, 57 dan 43 pb.

Enzim *HaeIII* menghasilkan pola pemotongan yang seragam, sehingga semua sampel pengamatan bergenotipe AA dengan 1 alel, yaitu alel A. Pola pemotongan mtDNA menggunakan enzim *HaeIII* ditunjukkan oleh Gambar 3. Enzim ini menghasilkan fragmen berukuran 609, 151, 145, 126, 63, 41 dan 10 pb.

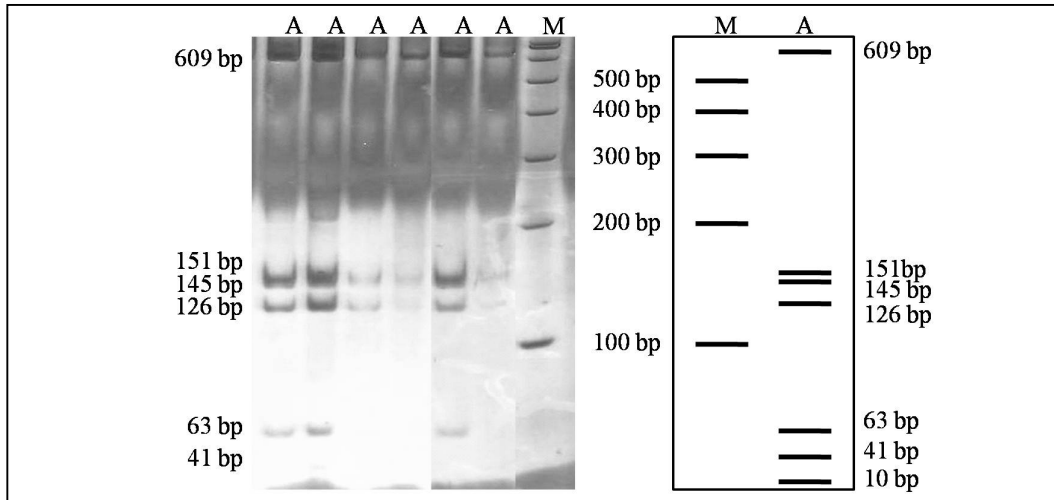
Tabel 1. Pola pemotongan enzim restriksi

Enzim pemotong				Haplotipe	Jumlah
<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MspI</i>		
A	A	A	A	AAAA	43
A	A	B	A	AABA	1

AluI Tipe A : 423, 356, 182, 84, 57, 43 pb; *HaeIII* Tipe A : 609, 151, 145, 126, 63, 41, 10 pb; *HinfI* Tipe A: 700, 382, 63 pb dan Tipe B: 700, 233,149, 63 pb; dan *MspI* Tipe A: 499, 260, 230, 123, 33 pb



Gambar 2. Pola migrasi PCR-RFLP menggunakan enzim *AluI*. A: 423, 356, 182, 84, 57 dan 43 pb



Gambar 3. Pola migrasi PCR-RFLP menggunakan enzim *HaeIII*. A: 609, 151, 145, 126, 63, 41 dan 10 pb

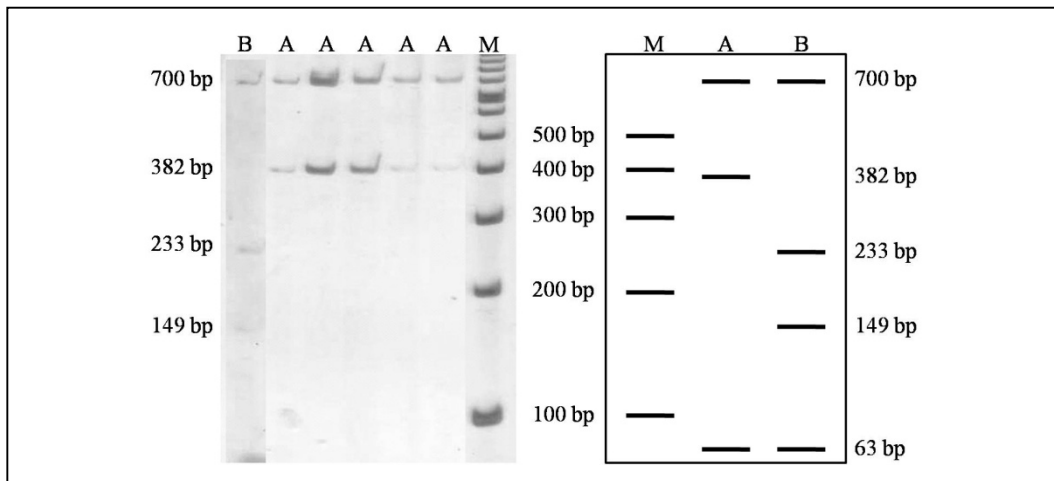
Enzim *HinfI* menghasilkan dua pola fragmen, fragmen pertama berukuran 700, 382 dan 63 pb yang dikenal sebagai alel A. Sedangkan fragmen kedua dikenal sebagai alel B berukuran 700, 233, 149 dan 63 pb (Gambar 4). Telah terjadi mutasi (delesi) pada fragmen kedua (Alel B) yaitu kehilangan basa pirimidin (T) pada posisi basa ke-152.

Enzim *MspI* menghasilkan fragmen yang seragaman, berukuran 490, 260, 230 dan 33 pb, yang dikenal sebagai alel A (Gambar 5). Mutasi (transversi) terjadi pada basa ke 625 dari daerah *control region* (CR), yaitu perubahan basa purin dari A menjadi G.

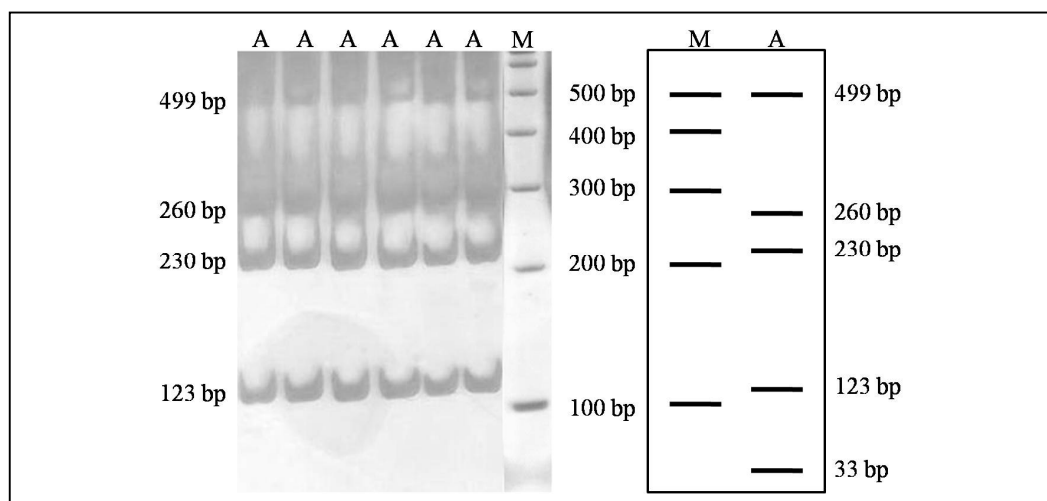
Keragaman Haplotipe (h) dan Nukleotida (π)

Tinggi rendahnya keragaman genetik, dapat diindikasikan dari jumlah maupun keragaman haplotipe (h) dan nukleotida (π). Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini teridentifikasi dua tipe komposit haplotipe.

Jumlah haplotipe mtDNA dan keragamannya pada masing-masing populasi disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.



Gambar 4. Pola migrasi PCR-RFLP menggunakan enzim *HinfI*. A: 700, 382 dan 63 pb, B: 700, 233, 149 dan 63 pb



Gambar 5. Pola migrasi PCR-RFLP menggunakan enzim *MspI*. A: 499, 260, 230, 123 dan 33 pb

Tabel 2. Haplotipe mtDNA masing-masing populasi

Lokasi/ Provinsi	Σ Sampel	Haplotipe (%)	
		AAAA	AABA
Jateng	10	100	0
NTB	12	100	0
Sumut	10	90	10
Banten	12	10	0

Haplotipe AAAA untuk enzim restriksi *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* dan *MspI* adalah Tipe A. Haplotipe AABA untuk enzim restriksi *AluI*, *HaeIII* dan *MspI* adalah Tipe A, sedangkan *HinfI* adalah Tipe B

Tabel 3. Keragaman haplotipe mtDNA *Bubalus bubalis* dari Jawa Tengah, Nusa Tenggara Barat, Sumatera Utara dan Banten

Asal Sampel	Nilai h	Σ Sampel	Σ Haplotipe
Jawa Tengah	0,0	10	1
Nusa Tenggara Barat	0,0	12	1
Sumatera Utara	0,2	10	2
Banten	0,0	12	1

Jumlah komposit haplotipe ternak kerbau yang dimiliki oleh masing-masing populasi hanya satu kecuali pada daerah Sumatera Utara memiliki dua komposit haplotipe. Distribusi

komposit haplotipe menunjukkan ciri khas kerbau rawa pada masing-masing lokasi. Secara keseluruhan, keragaman haplotipe (h) wilayah Jawa Tengah, Nusa Tenggara Barat dan Banten adalah 0,0 (seragam), sedangkan untuk wilayah Sumatera Utara memiliki nilai keragaman haplotipe (h) 0,2. Nilai keragaman haplotipe yang terdapat pada sampel kerbau dari Sumatera Utara tergolong rendah, sehingga dapat pula dikatakan keragaman genetik berdasarkan keragaman haplotipe sampel kerbau rawa lokal (*Bubalus bubalis*) pengamatan relatif rendah.

Berdasarkan ada tidaknya situs restriksi dari dua haplotipe, diperoleh nilai keragaman nukleotida (π) kerbau rawa pengamatan adalah 0,17%. Nilai ini relatif rendah jika dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilaporkan TANAKA *et al.* (1995) yang melakukan studi pola pemotongan DNA mitokondria pada kerbau rawa dan kerbau sungai menggunakan 15 enzim restriksi endonuklease. Lima tipe DNA mitokondria teridentifikasi yaitu tiga tipe pada kerbau lumpur dan dua tipe pada kerbau sungai. Keragaman nukleotida bervariasi dari 0,2 – 0,6% di dalam kelompok kerbau lumpur dan kerbau sungai dan bervariasi antara 1,9 – 2,4% antara kerbau lumpur dan kerbau sungai.

Jarak genetik

Keragaman genetik antar populasi dapat dicirikan dari jarak genetik. Jarak genetik

dalam klasifikasi atau pengelompokan ternak menggambarkan perbedaan nilai suatu ciri antara kelompok ternak yang dibandingkan. Semakin kecil nilai jarak genetik, semakin kecil pula keragaman antar populasi tersebut, demikian pula sebaliknya. Nilai jarak genetik disajikan dalam bentuk matriks seperti tertera pada Tabel 4, sedangkan ilustrasi dendrogram ditampilkan pada Gambar 6.

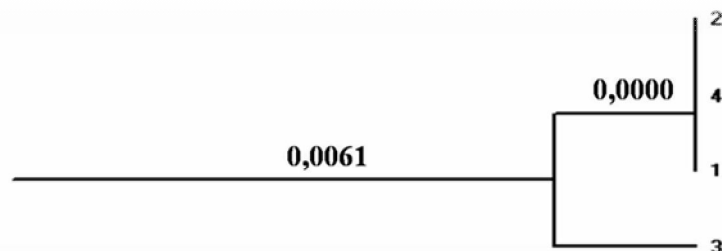
Tabel 4. Jarak genetik berdasarkan haplotipe

	Jateng	NTB	Sumut	Banten
Jateng	****	0,0000	0,0061	0,0000
NTB		****	0,0061	0,0000
Sumut			****	0,0061
Banten				****

Hasil analisis memperlihatkan adanya penstrukturan genetik sebagai gambaran pemisahan populasi menjadi dua unit populasi, yaitu unit populasi Jawa Tengah-Nusa Tenggara Barat-Banten, dan unit populasi Sumatera Utara (Gambar 6). Secara berturut-turut nilai jarak genetik kedua unit populasi tersebut adalah 0,0000 dan 0,0061 (Tabel 4). Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini ternyata sampel kerbau dari Jawa Tengah, Nusa Tenggara Barat dan Banten diduga memiliki genetik yang sama.

Ilustrasi dendrogram memberikan informasi kekerabatan keempat populasi daerah pengambilan sampel. Pola kekerabatan suatu

ternak diduga terjadi karena adanya penyebaran dan proses migrasi (*gene flow*). Hasil yang diperoleh berdasarkan penelitian mengenai karakteristik fenotipik kerbau Banten dan Sumatera Utara yang telah dilakukan oleh HIDAYAT (2007) menunjukkan bahwa jarak genetik dan pohon fenogram antara populasi kerbau Banten dan Sumatera Utara adalah terpisah, dengan jarak genetik dekat yaitu 0,172743. Begitu pula dengan populasi kerbau Jateng, secara genetik hubungan populasi Jateng dengan populasi Banten dan Sumatera Utara adalah dekat. Hal yang sama dinyatakan oleh MUKHERJEE *et al.* (1991) bahwa ternak kerbau di Asia Tenggara mempunyai fenotipe luar yang serupa dan hubungan jarak genetik kerbau rawa di Asia Tenggara tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Begitu pula AMANO *et al.* (1981) mengemukakan bahwa kerbau rawa di Jawa Barat, Sumatera Barat, Toraja dan Ujung Pandang mempunyai jarak genetik yang dekat, sementara itu kerbau rawa dan kerbau murray mempunyai jarak genetik yang jauh. Hasil analisis jarak genetik diperoleh hasil bahwa populasi kerbau rawa dan kerbau sungai di Indonesia mempunyai jarak genetik yang jauh, sehingga diasumsikan bahwa kerbau rawa dan kerbau sungai didomestikasi dari nenek moyang yang berbeda (AMANO *et al.* 1981). Begitu pula dengan penelitian yang dilakukan oleh TANAKA *et al.* (1995), berdasarkan pola pemotongan DNA mitokondria dengan dendrogram, memperlihatkan bahwa kelompok kerbau lumpur merupakan kelompok yang berbeda dengan kerbau sungai.



Gambar 6. Dendrogram populasi *Bubalus bubalis* wilayah Jawa Tengah (1), Nusa Tenggara Barat (2), Sumatera Utara (3) dan Banten (4)

KESIMPULAN

Keragaman genetik kerbau rawa lokal berdasarkan haplotipe dna mitokondria masih sangat rendah. Hasil pemotongan dengan empat enzim restriksi (*AluI*, *HaeIII*, *HinfI* dan *MspI*) ditemukan dua haplotipe mtDNA. Haplotipe pertama memiliki pola penyebaran luas di seluruh wilayah pengambilan sampel (Jawa Tengah, Nusa Tenggara Barat, Sumatera Utara dan Banten), sedangkan haplotipe kedua hanya ditemukan pada satu sampel dari wilayah Sumatera Utara. Berdasarkan ada tidaknya situs restriksi dari dua haplotipe, diperoleh nilai keragaman nukleotida (π) untuk kerbau pengamatan adalah 0,17%. Perhitungan jarak genetik dalam bentuk dendrogram menunjukkan bahwa sampel kerbau yang berasal dari Jawa Tengah, Nusa Tenggara Barat dan Banten diduga berasal dari nenek moyang yang sama ($D = 0,0000$). Begitu pula dengan kerbau lokal Sumatera Utara berkerabat dekat dengan ketiga wilayah tersebut ($D = 0,0061$).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Kementerian Pertanian Republik Indonesia, dengan program KKP3T, dengan no kontrak no.637/LB.620/I.1/2/2009. Ucapan terima kasih disampaikan juga pada Direktorat Jendral Peternakan Kementerian Pertanian yang telah memeberikan ijin pengambilan sampel data kerbau di di Provinsi Sumatra Utara, Banten, Jawa Tengah dan Nusa Tenggara Barat.

DAFTAR PUSTAKA

- AMANO, T., KATSUMATA, S. SUZUKI, K. NOZAWA. Y., KAWAMOTO, T. NAMIKAWA, H. MARTOJO, I.K. ABDULGANI and H. NADJIB. 1981. Morphological and Geneticals Survey of Water Buffaloes in Indonesia. The Origin and Phylogeny of Indonesia Native Livestock. Report by Grant-in-Aid for Overseas Scientific Survey No. 504353. pp. 31 – 54.
- ANDREAS, E., C. SUMANTRI, H. NURAINI, A. FARAJALLAH and A. ANGGRAENI. 2010. Identification of GH|*AluI* and GHR|*AluI* genes polymorphisms in Indonesian Buffalo. JITAA 35: 215 – 221.
- AUSUBEL, F.M., R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH and K. STRUHL. 2002. Short Protocol in Molecular Biology. 5th Edition. John Wiley, New York.
- AVISE, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.
- DITJENNAK. 2009. Statistik Peternakan 2009. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian RI, Jakarta.
- HIDAYAT, U. 2007. Karakteristik Fenotipik Kerbau Banten dan Sumatera Utara. Skripsi. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- LAMB, T. dan M.F. OSENTOSKI. 1995. Intraspecific phylogeography of the gopher tortoise, *Gopher polyphemus*: RFLP analysis of amplified mtDNA segments. Molecular Ecology 4: 709 – 718.
- MISRIANTI, R., C. SUMANTRI, and A. FARAJALLAH. 2010. Polymorphism identification of Pit-1 gene in Indonesian buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Holstein friesian cows. Med. Pet. 33: 131 – 136.
- MUKHERJEE, T.K., J.S.F. BAKER, S.G. TAN, O.S. SALVARAJ, J.M. PANADM, Y. YUSHARYATI and SREETARAM. 1991. Genetic relationships among population of swamp buffalo in Southeast Asia, Australia.
- NEI, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- NEI, M. dan S. KUMAR. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, United States.
- ORITA, M., H. IWAHANA, H. KANAZAWA, K. HAYASHI dan T. SEKIYA. 1989. Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. 86(8): 2766 – 2770.
- PRIMASARI, A., C. SUMANTRI and A. FARAJALLAH. 2009. Identification of Growth hormone Releasing Hormone gene in local buffalo (*Bubalus bubalis*). Fact of Animal Science, Bogor Agricultural University. The 1st International Seminar on Animal Industry. Page 37 – 41.
- QIAN, J.X., K.J. DONG, Y.J. HUANG, B.Z. YANG, M. HE, Z.J. LIU dan J. LI. 2004. (Unplubished). Hainan Medical College Laboratory, Chengxi Road, Haikou, Hainan, China.
- SUMANTRI, C., A. ANGGRAENI, R.R.A. MAHESWARI, K. DWIYANTO, A. FARAJALLAH dan B.

- BRAHMANTIYO. 2004. Frekuensi gen kappa-kasein (κ -kasein) pada sapi perah FH berdasarkan produksi susu di BPTU Baturaden. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2004. hlm. 175 – 182.
- SUMANTRI, C., A. ANGGRAENI, R.R.A. MAHESWARI, K. DWIYANTO dan A. FARAJALLAH. 2005. Pengaruh genotipe kappa-kasein terhadap kualitas susu pada sapi perah FH di BPTU Baturaden. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2005. hlm. 358 – 366.
- TANAKA, K., T. YAMAGATA, S. MASANGKAY, M. O. FARUQUE, SALUNDIK, S. S. MANSJOER, Y. KAWAMOTO and T. NAMIKAWA. 1995. Nucleotide diversity of mitochondrial DNA between the swamp and the river types of domestic water buffaloes, *Bubalus bubalis*, based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochemical Genetics* 33: 137 – 148.
- TEGELSTROM, H. 1992. Mitochondrial DNA in natural population: An improved routine for screening of genetic variation based on sensitive silver staining. *Electrophoresis*. 7: 226 – 229.