

# IDENTIFIKASI PENANDA GENETIK DAERAH *D-LOOP* PADA SAPI ACEH [*Genetics Marker Identification of Aceh Cattle Using D-Loop Region Analysis*]

M.A.N. Abdullah, R.R. Noor<sup>1</sup>, dan E. Handiwirawan<sup>2</sup>

Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>1</sup>Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor

Received January 17, 2008; Accepted February 04, 2008

## ABSTRAK

Penelitian yang bertujuan untuk mengkarakterisasi keragaman daerah *D-loop* mtDNA yang berguna sebagai *database* dalam pelaksanaan program konservasi sapi Aceh telah dilakukan. Pengumpulan sampel darah (8 sampel untuk analisis *D-loop*) dilakukan di empat lokasi yaitu Kota Banda Aceh, Kabupaten Aceh Besar, Pidie dan Aceh Utara. Sampel pembandingan telah diambil 2 sampel masing-masing sapi Bali (Pulau Bali), Madura (Pulau Madura), Pesisir (Sumatera Barat) dan satu sampel sapi PO (Jawa Barat). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen daerah *D-loop* mtDNA adalah BIDLf dan BIDLR dengan panjang produk 980 bp dan panjang sekuen yang dapat dianalisis 479 bp. Data sekuen *D-loop* disejajarkan berganda dengan sekuen acuan *Bos indicus* dari *GenBank* menggunakan program Squint 1.02 dan dianalisis dengan program MEGA4. Hasil analisis *D-loop* mtDNA dengan sekuen acuan *Bos indicus*, ada 27 situs beragam pada sapi Aceh. Penanda ini dapat digunakan untuk membedakan dan pengelompokan sapi lokal Indonesia di mana sapi Aceh satu klaster dengan sapi Pesisir dan PO, mempunyai jarak genetik yang lebih dekat dengan sapi *Bos indicus*, sedangkan sapi Bali dan Madura membentuk klaster sendiri.

*Kata kunci: Sapi Aceh, DNA, Mitokondria, D-Loop*

## ABSTRACT

The aims of this study were to describe the genetic variation of D-loop of mtDNA 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), and 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 had PCR product 980 bp length and sequences length which could be analyzed 479 bp. The Data were analyzed using Squint 1.02 and MEGA4.0 programme. The result of D-loop mtDNA analysis as showed that there were 27 sites of variance in Aceh cattle. This marker can be used to differentiate and subdivide of Indonesia local cattle, and indicated that Aceh cattle had the same cluster as Pesisir cattle where PO cattle comes into their group, has closer genetic distance to *Bos indicus*, while Bali and Madura cattle had the same cluster.

*Keywords: Aceh cattle, DNA, Mitochondrial, D-loop*

## PENDAHULUAN

Sapi Aceh merupakan satu dari empat bangsa sapi asli Indonesia (Aceh, Pesisir, Madura dan Bali). Sapi Sumba-Ongole dan Java-Ongole (PO) juga dianggap sebagai bangsa sapi lokal Indonesia (Martoyo, 2003; Dahlanuddin et al., 2003). Ternak-ternak asli telah

terbukti dapat beradaptasi dengan lingkungan lokal termasuk makanan, ketersediaan air, iklim dan penyakit. Dengan demikian, ternak-ternak inilah yang paling cocok untuk dipelihara dan dikembangkan di Indonesia, walaupun produksinya lebih rendah dari ternak impor (Noor 2004).

Sapi Bali diketahui merupakan hasil domestikasi

langsung dari banteng liar (MacHugh, 1996; Verkaar et al., 2002; Martojo, 2003; Kikkawa et al., 2003; Hardjosubroto, 2004), mempunyai ciri-ciri fisik yang hanya mengalami perubahan kecil dibandingkan dengan leluhur liarnya (Handiwirawan dan Subandriyo, 2004). Sapi asli lain merupakan hibridisasi banteng termasuk sapi luar yang masuk ke Indonesia dan telah cukup lama berada di Indonesia sehingga berkembang biak sesuai dengan lingkungannya. Sapi Indonesia telah mengalami seleksi alam dengan berbagai tekanan iklim tropis basah, pengaruh interaksi genetik dan lingkungan dan telah teradaptasi terhadap wilayah seperti pakan berkualitas rendah dengan segala penyakit dan ektoparasit lokal yang ada di wilayah tersebut, sehingga telah memunculkan fenotipe-fenotipe baru yaitu yang dimiliki sapi Aceh, Pesisir, Madura, Bali, SO dan PO.

Sapi Aceh merupakan bangsa sapi tipe kecil yang ditemukan khusus di daerah Aceh. Sapi ini resisten terhadap temperatur tinggi sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan (ILRI, 1995). Ketahanan ternak lokal terhadap lingkungan yang ekstrim telah diuji melalui hewan percobaan mencit (*Mus musculus*) oleh Abdullah et al. (2005) bahwa, mencit liar yang telah teradaptasi lingkungan dengan segala perubahan yang ada mempunyai gen pengatur daya produksi dan reproduksi yang lebih unggul terhadap stres lingkungan dibanding mencit laboratorium. Pengujian tersebut mendukung pendapat Noor (2004) bahwa, ternak-ternak asli telah terbukti dapat beradaptasi dengan lingkungan dan iklim tropis. Dengan demikian, ternak-ternak inilah yang paling cocok untuk dipelihara dan dikembangkan di Indonesia, walaupun produksinya lebih rendah dari ternak impor.

Eksplorasi 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, sehingga mengancam keberadaan sapi ini pada masa yang akan datang. Kehilangan gen-gen penting pada ternak asli yang telah teradaptasi dengan kondisi lingkungan setempat akan sulit bahkan tidak akan dapat digantikan. Kekhawatiran ini dapat dilihat pada bukti sapi-sapi asli di negara India yang telah punah sebelum sapi itu diidentifikasi dan dimanfaatkan akibat persilangan yang meluas seperti dilaporkan Sodhi et al. (2006). FAO (2000) sudah memperingatkan

sebelumnya bahwa, ternak yang mempunyai risiko untuk punah terdapat di negara-negara yang sedang berkembang akibat permintaan pasar yang baru, persilangan, pergantian breed dan kegiatan mekanisasi pertanian.

Sehubungan dengan hal tersebut di negara berkembang, banyak peneliti yang sedang melakukan karakterisasi ternak secara fenotipik termasuk pada tingkat molekuler yang digunakan untuk dokumentasi produksi ternak, status dan pemanfaatannya (Sodhi et al., 2006). Berdasarkan laporan terdahulu, penentuan daerah D-loop mtDNA pada sapi dapat menunjukkan hibridisasi pada banteng dan sapi Madura (Nijman et al., 2003). DNA mitokondria adalah penanda berdasarkan silsilah maternal (haploid) yang pada sapi dapat menunjukkan sejarah kewanannya (Ascunce et al., 2007). Penelitian Edwards et al. (2007) pada daerah D-loop (control region) DNA mitokondria beberapa bangsa sapi, telah dapat diungkapkan bahwa nenek moyang sapi-sapi di Eropa berasal dari Syria, kemudian menyebar ke seluruh Eropa.

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian pada sapi Aceh mencakup inventarisasi sumber daya genetiknya melalui analisis DNA mitokondria pada daerah D-loop. Metode ini dapat digunakan karena tingkat akurasi sangat tinggi dalam menggambarkan keragaman genetik. Dengan demikian, hasil penelitian ini diharapkan dapat melengkapi database pada sapi Aceh untuk digunakan sebagai dasar pengambilan kebijakan guna menerapkan keputusan yang lebih tepat dan terarah dalam upaya pelestarian, pengembangan dan pemanfaatannya secara berkelanjutan.

## 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 out group 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 mikrosentrifus (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'-ACCCCAAAGCTGAAGTTCT-3' dan BIDL-R 5'-GTGCCTTGCTTTGGGTTAAG-3', dengan panjang produk 980 bp (Tabel 1). Primer tersebut didesain menggunakan software Primer3 ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) pada sekuen D-loop DNA mitokondria Bos indicus (sapi Nellore) GenBank yang diakses bebas di internet (kode akses AY126697) pada situs NCBI.

### Amplifikasi PCR

Setiap pereaksi PCR daerah D-loop dibuat volume 50 µl dengan komposisi 5 µl 10x buffer PCR; 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (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 dH<sub>2</sub>O (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 eppendorf 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) antar sapi penelitian, dibentuk pohon filogeni dengan program MEGA.

Tabel 1. Urutan Basa dan Suhu Penempelan *Primer* untuk Mengamplifikasi Daerah *D-loop* Sapi Penelitian

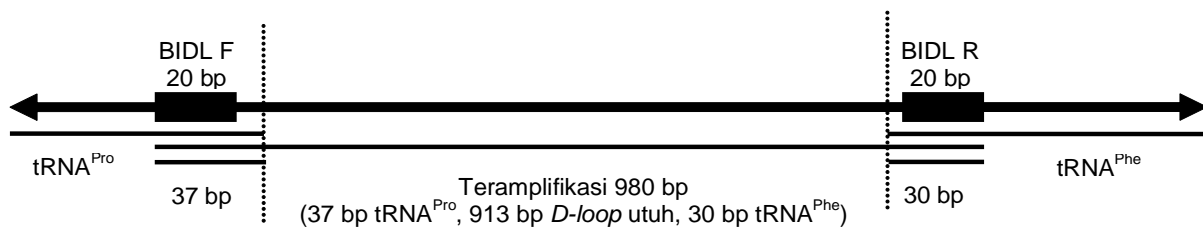
<i>Primer</i>	Sekuen	Suhu <i>annealing</i>	Panjang Produk
BIDL-F	5'-ACCCCAAAGCTGAAGTTCT-3'	59°C	980 bp
BIDL-R	5'-GTGCCTTGCTTTGGGTTAAG-3'		

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Amplifikasi Daerah D-loop

Amplifikasi daerah D-loop pada sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir dilakukan dengan menggunakan pasangan primer BIDL F dan BIDL R hasil desain sendiri berdasarkan basa sekuen *Bos indicus*. Fragmen DNA sapi hasil amplifikasi pasangan primer tersebut, terdiri atas 37 bp fragmen gen tRNA<sup>Pro</sup> pada posisi basa ke-30 sampai dengan 66 (15758-15794), 913 bp fragmen utuh daerah D-loop pada posisi basa ke-1 sampai dengan 913 (15795-16341,1-366) dan 30 bp fragmen tRNA<sup>Phe</sup> pada posisi basa ke-1 sampai dengan 30 (367-396). Sketsa letak penempelan pasangan primer BIDL F dan BIDL R pada daerah D-loop sapi penelitian terdapat pada Ilustrasi 1.

Pasangan primer BIDL F dan BIDL R yang



Ilustrasi 1. Sketsa Letak Penempelan *Primer* BIDL F dan BIDL R untuk Mengamplifikasi Fragmen Daerah *D-loop* Sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir

mengamplifikasi fragmen berukuran sekitar 980 bp masing-masing menempel pada basa ke-30 sampai dengan 49 gen tRNA<sup>Pro</sup> (15758-15777) untuk primer BIDL F dan basa ke-11 sampai dengan 30 gen tRNA<sup>Phe</sup> (377-396) bagi primer BIDL R. 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 Ilustrasi 2.

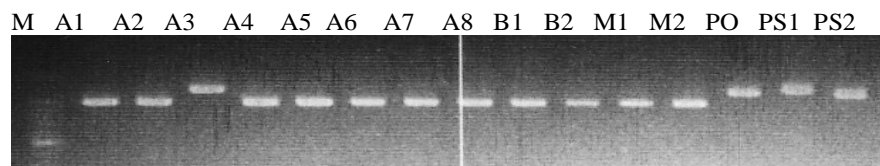
Keberhasilan amplifikasi daerah D-loop khususnya sangat ditentukan oleh kondisi penempelan primer pada DNA genom selain faktor-faktor bahan pereaksi PCR dan mesin PCR yang digunakan. Ada variasi ukuran fragmen yang teramplifikasi, yaitu pada sampel A3 (sapi Aceh 3), PO (sapi PO), PS1 dan PS2 (sapi Pesisir 1 dan 2). Variasi ukuran fragmen DNA yang teramplifikasi tersebut karena ada penyisipan (insersi) basa nukleotida, sehingga mempunyai ukuran fragmen yang lebih panjang.

### Keragaman Runutan Nukleotida

Setelah dilakukan sekuensing pada produk PCR dan optimasi pensejajaran dengan runutan genom *Bos indicus* dari GenBank (kode akses AY126697; Miretti et al., 2002) sebagai acuan, diperoleh ukuran parsial

479 bp daerah D-loop yang dapat dianalisis. Ukuran sepanjang 434 bp tidak dapat digunakan karena ada beberapa basa yang tidak diketahui yaitu terletak pada arah primer '5 BIDL F sepanjang 7 bp dan ke arah primer '3 BIDL R sepanjang 427 bp.

Analisis keragaman runutan nukleotida dilakukan setelah runutan DNA sapi Aceh, Bali, Madura, PO



Keterangan: lajur M = DNA ladder 100 bp, lajur A1-A8 = hasil PCR sapi Aceh, lajur B1-B2 = hasil PCR sapi Bali, lajur M1-M2 = hasil PCR sapi Madura, lajur PO = hasil PCR sapi PO dan lajur PS1-PS2 = hasil PCR sapi Pesisir

Ilustrasi 2. Hasil Amplifikasi Daerah *D-loop* dengan Menggunakan Pasangan *Primer* BIDL F dan BIDL R setelah Dimigrasikan dalam Gel Agarose 1,2% pada Tegangan 90 volt selama 45 Menit

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.

Berdasarkan ukuran runutan nukleotida parsial sepanjang 479 bp yang dapat dianalisis, hasil pensejajaran runutan nukleotida sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir dengan acuan runutan nukleotida *Bos indicus* (sapi Nellore) dari GenBank, maka rataan komposisi nukleotidanya dapat dilihat pada Tabel 2.

berkerabat dekat.

Perbedaan nukleotida antara sapi Aceh dan sapi *Bos indicus* dari GenBank pada situs NCBI (kode akses AY126697, AY378137, L27732, AY378135 dan DQ166132) yaitu T = 0,02%; C = 0,29%; A = 0,52%; dan G = 0,81%. Perbedaan rataan komposisi nukleotida yang lebih besar ditemukan antara sapi Aceh dan *Bos taurus* (kode akses AF409058, Y676858, AY676871, DQ520591, AY521119) yaitu T = 1,16 %; C = 0,57%; A = 0,58%; dan kecuali G = 0,07%. Perbedaan jumlah rataan komposisi nukleotida A+T dan C+G antara sapi Aceh terhadap *Bos indicus* masing-masing yaitu 0,55% dan 0,52% serta jumlah perbedaan rataan komposisi nukleotida

Tabel 2. Rataan Komposisi Nukleotida Daerah *D-loop* Parsial Sapi Aceh, Bali, Madura, PO dan Pesisir setelah Disejajarkan dengan Komposisi Nukleotida Acuan *Bos indicus* dari GenBank (ukuran 479 bp)

Bangsa sapi	n	T	C	A	G	A + T	C + G
Aceh	8	26,84	23,35	36,48	13,31	63,31	36,66
Bali	2	26,20	24,00	37,40	12,40	63,60	36,40
Madura	2	26,30	24,50	36,20	13,00	62,50	37,50
PO	1	25,50	26,30	32,30	16,00	57,80	42,30
Pesisir	2	26,35	23,65	36,85	13,15	63,20	36,80
<i>Bos indicus</i>	5	26,86	23,64	37,00	12,50	63,86	36,14
<i>Bos taurus</i>	5	28,00	22,78	35,90	13,38	63,90	36,16

Keterangan: komposisi dalam persen, n = jumlah sampel, sapi PO hanya satu sampel teramplifikasi

Jumlah rataan komposisi nukleotida A+T pada sapi Aceh, Bali, Madura dan Pesisir, masing-masing adalah 63,31%; 63,60%; 62,50; dan 63,20%. Sedangkan sapi PO mempunyai jumlah komposisi nukleotida A+T paling rendah (57,80%). Jumlah rataan komposisi nukleotida C+G pada sapi Aceh, Bali, Madura dan Pesisir masing-masing adalah 36,66%; 36,40%; 37,50; dan 36,80%, sedangkan sapi PO mempunyai jumlah rataan komposisi nukleotida C+G yang tertinggi yaitu sebesar 42,30%. Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan komposisi basa-basa nukleotida (materi genetik) yang dimiliki sapi Aceh terhadap sapi Bali, Madura, PO dan Pesisir. Besarnya perbedaan tersebut ditunjukkan melalui persamaan atau perbedaan susunan basa-basa nukleotida (termasuk insersi dan delesi) antara sapi Aceh dan sapi pembandingan dengan acuan *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%. Hal ini menunjukkan bahwa sapi Aceh dan sapi Pesisir

A+T dan C+G antara sapi Aceh terhadap *Bos taurus* masing-masing 0,59% dan 0,50%. Sehingga, apabila dibandingkan rataan komposisi nukleotida antara sapi Aceh dan sapi *Bos indicus* terhadap *Bos taurus* dari GenBank, maka rataan komposisi nukleotida antara sapi Aceh dan *Bos indicus* lebih rendah perbedaannya.

Nukleotida A daerah *D-loop* mempunyai frekuensi tertinggi pada sapi penelitian dengan urutan mulai tertinggi sampai terendah berturut-turut yaitu sapi Bali (0,374), Pesisir (0,369), Aceh (0,365), Madura (0,361) dan PO (0,323) (Ilustrasi 3). Nukleotida G mempunyai frekuensi terendah pada sapi penelitian dengan urutan tertinggi (0,160) ditemukan pada sapi PO, sapi Madura 0,131; frekuensi yang sama (0,128) pada sapi Aceh dan Pesisir serta frekuensi terendah ditemukan pada sapi Bali (0,124). Sapi Aceh mempunyai frekuensi nukleotida T tertinggi (0,270); sapi Pesisir 0,267; sapi Madura 0,264; sapi Bali 0,262; dan terendah ditemukan pada sapi PO (0,255). Frekuensi nukleotida C tertinggi ditemukan pada sapi PO (0,263), sapi Bali dan Madura masing-masing adalah

#Bos_indicus_(GB)	TT-AA-TATA	G---TTCCAT	AAATGCAAAG	AGCCTTATCA	GTATTAAATT	TATCAAAAAT	[ 60]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 60]
#Bali_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 60]
#Madura_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 60]
#PO	..C.GC..G	..GGG.A..--	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 60]
#Pesisir_1	..A-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 60]
#Bos_indicus_(GB)	CCCAATAACT	CAACACAGAA	TTTGCACCCT	AACCAAATAT	TAC---AAAC	ACCACTAGCT	[120]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[120]
#Bali_1	TT...C.G..	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[120]
#Madura_1	TT...C.G..	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[120]
#PO	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[120]
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[120]
#Bos_indicus_(GB)	AACATAACAC	--GCCC---A	-TACA-CA-G	-ACC-----	-----	-ACAGA--AT	[180]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[180]
#Bali_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[180]
#Madura_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[180]
#PO	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[180]
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[180]
#Bos_indicus_(GB)	GAAT-TACCC	AGG--CA---	----AGAGGT	AAT--GTACA	TAACATTAAT	GT-AATAAAG	[240]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[240]
#Bali_1	T...G...A-T	..A.TA...TAA	TATT-.T..	..AA...T...	..-..-..-.	..-..-..-.	[240]
#Madura_1	T...G...A-T	..A.TA...TAA	TATT-.T..	..AA...T...	..-..-..-.	..-..-..-.	[240]
#PO	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[240]
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[240]
#Bos_indicus_(GB)	ACATGATATG	TATATAGTAC	ATTAAATTAT	ATACCCCATG	CATATAAGCA	AGTACATG-A	[300]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[300]
#Bali_1	..A.....	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[300]
#Madura_1	..A.....	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[300]
#PO	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[300]
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[300]
#Bos_indicus_(GB)	T-CTCTATA-	A-TAGTACAT	AATACATACA	AT---T-AT	TAATGTACA	TAG-TACATT	[360]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[360]
#Bali_1	AA...C...A	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[360]
#Madura_1	A...C...G	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[360]
#PO	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[360]
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[360]
#Bos_indicus_(GB)	-ATA-TCAAA	TCCAT--CCT	CAACAACATA	TCT-ACTA-T	ATACCCCTTC	CAC---TAGA	[420]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[420]
#Bali_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[420]
#Madura_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[420]
#PO	T...A...C..	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[420]
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[420]
#Bos_indicus_(GB)	-TCACGAG-C	TT-AATTA--	-CCATG--CC	GCGTG-AAAC	C--AGCAACC	CGC--TAAGC	[480]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[480]
#Bali_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[480]
#Madura_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[480]
#PO	A..C...G..	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[480]
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[480]
#Bos_indicus_(GB)	AGA-G-GAT-	-CCCTCTTCT	--CGCTCCGG	G--CCCATAG	ACCGTGGGGG	T-----CG	[540]
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[540]
#Bali_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[540]
#Madura_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[540]
#PO	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[540]
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[540]
#Bos_indicus_(GB)	CTATTT-AA-	TGAATTTT--	ACCAGGC--A	TCT--GGTTC	TTT	[ 583]	
#Aceh_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 583]	
#Bali_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 583]	
#Madura_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 583]	
#PO	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 583]	
#Pesisir_1	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	..-..-..-.	[ 583]	

Keterangan: Hanya sebagian data optimasi pensejajaran yang ditampilkan. Titik menunjukkan kesamaan basa, tanda strip menunjukkan penyisipan atau delesi untuk mengoptimalkan pensejajaran. Daerah *D-loop Bos indicus* utuh dari *GenBank* sepanjang 913 bp, yang dapat dianalisis 479 bp. Ruas ini setara dengan posisi 15802 sampai dengan 16280 dari runutan lengkap mtDNA sapi *Bos indicus* dari *GenBank*.

Ilustrasi 4. Pensejajaran Berganda Nukleotida Dari Daerah *D-loop* Parsial Sapi Aceh, Bali, Madura, PO, Pesisir dan *Bos indicus* (Nellore) dari *GenBank* (AY126697)

0,240 dan 0,244; dan frekuensi yang sama (0,236) ditemukan pada sapi Aceh dan Pesisir.

Hasil perbandingan basa nukleotida berukuran 479 nt pada sapi Aceh dan sapi *Bos indicus* (Nellore) dari GenBank, menunjukkan situs beragam sebanyak 27 basa nukleotida. Sebagian data optimasi ditampilkan dalam Ilustrasi 4. Keragaman yang terjadi mulai di daerah pertengahan (sekitar domain ke dua) sekuen basa nukleotida D-loop, yaitu mulai situs 267 dan tidak ditemukan situs yang beragam pada permulaan sekuen (dekat dengan tRNA<sup>Pro</sup>) yaitu menuju ke arah primer BIDLf. Rata-rata nilai rasio transisi (substitusi purin dengan purin atau pirimidin dengan pirimidin) terhadap transversi (perubahan dari purin ke pirimidin atau sebaliknya) pada sapi Aceh adalah 1,13% (purin) dan 1,86% (pirimidin) dengan nilai bias keseluruhan (R) = 0,533. Sebanyak 126 situs segregasi ditemukan dalam populasi sapi penelitian dan khusus dalam kelompok sapi Aceh ditemukan sembilan situs segregasi.

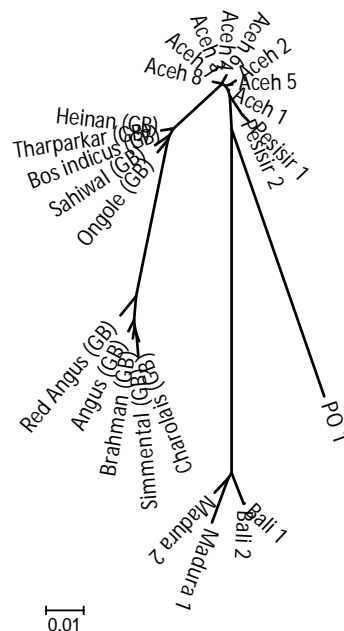
Susunan basa nukleotida yang beragam pada daerah D-loop DNA mitokondria sapi Aceh menunjukkan terjadinya mutasi. Menurut Ishida et al. (1992), dari bagian-bagian fragmen mtDNA, daerah control region atau dikenal dengan D-loop merupakan daerah yang paling hipervariabel, mempunyai laju kecepatan mutasi 10 kali lebih cepat dibandingkan

dengan daerah mtDNA lainnya.

### Hubungan Kekerabatan Sapi Aceh

Hubungan kekerabatan antara sapi Aceh dan sapi Bali, Madura, PO, Pesisir, dan *Bos indicus* yang diambil dari GenBank sebagai pembandingan, dilakukan pada sekuen sepanjang 479 nukleotida yang menyusun D-loop parsial. Pengelompokan sapi lokal berdasarkan jarak genetik dengan metode Neighbor-Joining (Saitou dan Nei, 1987) dalam program Mega 4.0 (Tamura et al., 2007). Pohon yang optimal mempunyai jumlah panjang cabang 0,78645673. Persentase pengulangan pohon di mana kelompok bangsa sapi yang berhubungan diklasterkan bersama-sama dalam uji bootstrap (1000 kali pengulangan) (Felsenstein, 1985). Jarak genetik dihitung dengan metode 2 parameter Kimura (Kimura, 1980) dan di dalam unit-unit dari banyaknya substitusi basa per lokasi. Semua posisi yang mengandung data-data senjang (gab) dan data hilang dieliminasi dari dataset (opsi penghapusan lengkap). Hasilnya menunjukkan, populasi sapi lokal yang diteliti terbagi ke dalam dua posisi yang berbeda yaitu sapi Aceh, Pesisir dan PO berada dalam satu posisi yang sama, sedangkan sapi Bali dan Madura berada pada posisi yang kedua (Ilustrasi 5).

Sapi Pesisir dan sapi PO dikelompokkan dengan



Ilustrasi 5. Dendrogram *Neighbor-Joining* Berdasarkan Metode 2 Parameter Kimura dari Nukleotida Daerah *D-Loop* Parsial (Berukuran 479 Bp) Sapi Aceh, Bali, Madura, PO, Pesisir dan Bangsa-Bangsa Sapi dari *Genbank* (GB) Dengan Pengolahan *Bootstrap* 1000 Ulangan

sapi Aceh karena kedekatan genetik yang dimilikinya. Pola dendrogram sapi Aceh cenderung beragam dan sapi Pesisir yang masuk ke dalam kelompok sapi Aceh cenderung memperlihatkan satu kelompok sendiri. Pengelompokan sapi Aceh, Pesisir dan PO terlihat berbeda secara riil dengan pengelompokan sapi Bali dan Madura. Sapi PO walaupun satu kelompok dengan sapi Aceh dan Pesisir, tetapi mempunyai susunan basa nukleotida yang sangat berbeda yaitu sebanyak 102 situs (21,34%) terhadap sapi Aceh dan 46 situs (8,95%) terhadap sapi Pesisir.

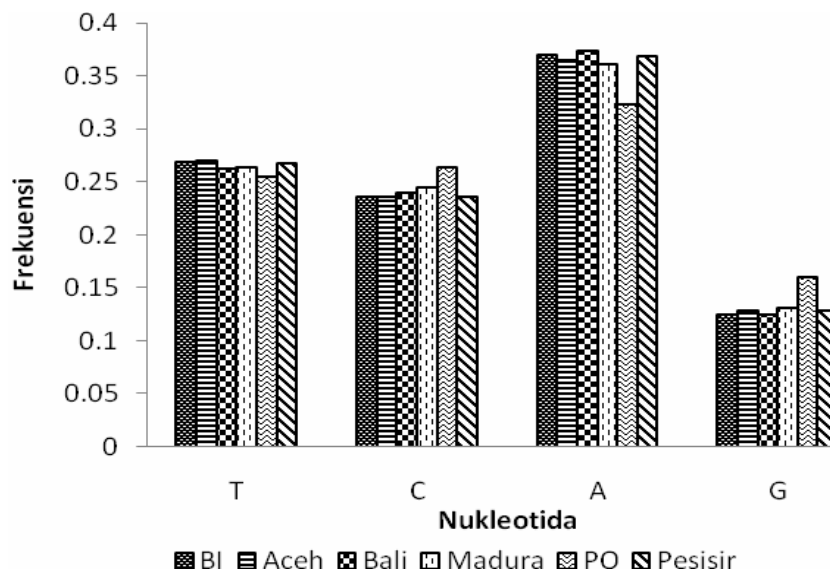
Persamaan susunan basa nukleotida sapi Aceh dan *Bos indicus* adalah sebesar 94,36% dan terhadap *Bos taurus* sebesar 88,52%, sehingga sapi Aceh dekat dengan sapi *Bos indicus*. Hal ini membuktikan bahwa sapi Aceh adalah dari maternal zebu. Hubungan kekerabatan sapi Aceh dengan sapi *Bos indicus* berdasarkan analisis daerah D-loop mtDNA menunjukkan hibridisasi yang dominan telah terjadi antara sapi zebu betina dengan banteng jantan. Menurut Nozawa (1979), pusat gen sapi zebu (*Bos indicus*) ada di India.

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa, pengklasteran sapi Aceh, Pesisir dan PO yang berada satu kelompok dengan sapi-sapi *Bos indicus* dari India dengan nilai bootstrap 83%, terpisah terhadap sapi-sapi *Bos taurus* dari Eropa dengan nilai bootstrap 84%.

Ini berarti bahwa, sapi Aceh, Pesisir dan PO dikelompokkan dengan sapi *Bos indicus* (zebu) dalam uji bootstrap 1000 kali ulangan dengan peluang 83% akan memperlihatkan hasil (posisi) yang sama. Pemisahan pengelompokan sapi golongan zebu ini terhadap sapi *Bos taurus* akan memperlihatkan hasil yang sama pada 1000 kali ulangan dengan peluang yang tinggi (84%).

Berdasarkan dendrogram, terlihat bahwa sapi PO masuk ke dalam kelompok sapi Aceh, jauh terpisah dengan sapi Bali dan Madura yang mempunyai asal geografis yang lebih dekat. Sapi PO mempunyai runutan nukleotida delesi dan insersi pada sekuen D-loop mtDNA parsial yang dianalisis. Disamping itu, Sapi PO mempunyai frekuensi komposisi nukleotidanya yang unik (perbedaan yang lebih besar terhadap frekuensi nukleotida sapi lain) seperti dalam Ilustrasi 3. Perbedaan posisi sapi PO dalam kluster sapi Aceh yang mempunyai cabang lebih panjang (menjorok keluar) kemungkinan karena pengaruh maternal sapi PO yang berasal dari sapi Jawa. Menurut Merkens (1926), sapi Jawa terdapat di Jawa dengan karakteristik tertentu yang merupakan campuran berbagai bangsa sapi.

Kelompok sapi Aceh yang mempunyai jarak genetik yang lebih jauh dengan sapi Madura dibandingkan terhadap sapi Bali karena kelompok sapi Aceh



Ilustrasi 3. Frekuensi Nukleotida Daerah *D-Loop* Parsial Berukuran 479 bp Pada Sapi Aceh, Bali, Madura, PO, Pesisir dan *Bos Indicus* (Nellore) dari *Genbank*



mempunyai perbedaan susunan basa nukleotida D-loop sebesar 22,38% (107 situs) terhadap sapi Bali dan 23,01% (110 situs) terhadap sapi Madura. Perbedaan sapi Aceh terhadap sapi Bali karena sapi Bali merupakan turunan langsung dari Bos banteng seperti yang telah dibuktikan Kikkawa et al. (2003) pada gen cytochrome-b parsial (420 bp) sapi Bali dan Verkaar et al. (2003) yang melakukan analisis paternal (kromosom Y) sapi Bali menggunakan teknik PCR-RFLP dengan enzim BfaI. Sedangkan perbedaan sapi Aceh terhadap sapi Madura terjadi karena maternal sapi Madura bukan dari sapi zebu tetapi berasal dari sapi Bali (Bos banteng), hal ini terbukti dari hasil analisis persamaan susunan basa nukleotida antara sapi Madura dan sapi Bali yaitu sebesar 97,07%. Hasil ini juga sejalan dengan Nijman et al. (2003) yang menyatakan bahwa, sapi Madura mengandung materi genetik sapi Bali yang telah mengalami hibridisasi dengan sapi zebu.

### KESIMPULAN

Berdasarkan runutan daerah D-loop DNA mitokondria, sapi Aceh berada satu kelompok dengan sapi Pesisir dan PO serta berkerabat dekat dengan bangsa-bangsa sapi Bos indicus, sedangkan sapi Bali dan Madura membentuk kelompok sendiri yang terpisah dari Bos indicus dan Bos taurus. Susunan basa nukleotida daerah D-loop mtDNA sapi Aceh berbeda terhadap susunan basa nukleotida daerah D-loop mtDNA sapi lokal lain dengan urutan perbedaan mulai terkecil sampai terbesar yaitu terhadap sapi Pesisir, PO, Bali, Madura, dan runutan DNA daerah D-loop dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan dan pengelompokan sapi lokal Indonesia. Sapi Aceh mempunyai persamaan susunan basa nukleotida sebesar 94,36% terhadap susunan basa nukleotida Bos indicus, sehingga garis maternal sapi Aceh berasal dari zebu (Bos indicus).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan sebagian dari penelitian sapi Aceh yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Nomor : 019/SP2H/PP/DP2M/III/2007 Tanggal 29 Maret 2007. Ucapan terima kasih

disampaikan pada Departemen Pendidikan Nasional, melalui Direktorat Jenderal Pendidikan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A.N., R.R. Noor dan H. Martojo. 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.
- Ascunce M.S., A. Kitchen, R. Peter, Schmidt, M. Michael, Miyamoto and J.C. Mulligan. 2007. An unusual pattern of ancient mitochondrial DNA haplogroups in Northern African cattle. *Zoological Studies.* 46 (1): 123-125.
- Dahlanuddin D.V., Tien, J.B. Liang and D.B. Adams. 2003. An exploration of risk factors for bovine spongiform encephalopathy in ruminant production system in the tropics. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22: 271-281.
- Duryadi D. 1997. Isolasi dan Purifikasi Mitochondrion (mtDNA). Laboratorium Molekuler FMIPA. Biotrop, IPB, Bogor.
- Edwards C.J., R. Bollongino, A. Scheu, A. Chamberlain, A. Tresset, J.D. Vigne, J.F. Baird, G. Larson, S.Y.W Ho, T.H. Heupink, B. Shapiro, A.R. Freeman, M.G. Thomas, R.M. Arbogast, B. Arndt, L. Bartosiewicz, N. Benecke, M. Budja, L. Chaix, A.M. Choyke, E. Coqueugniot, H.J. Döhle, H. Göldner, S. Hartz, D. Helmer, B. Herzig, H. Hongo, M. Mashkour, M. Özdoğan, E. Pucher, G. Roth, S. Schade-Lindig, U. Schmölcke, R.J. Schulting, E. Stephan, H.P. Uerpmann, I. Vörös, B. Voytek, D.G. Bradley, J. Burger. 2007. Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proc. R. Soc. B.* 274: 1377-1385.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity. 3<sup>rd</sup> Ed. FAO, Rome.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783-791.
- Goode M. and A.G. Rodrigo. 2007. Squint Alignment Editor (v.1.02): A multiple alignment program and editor., *Bioinformatics* 23:1553-1555

- ([www.Bioinformatics.org.nz](http://www.Bioinformatics.org.nz)) [5 Agustus 2007].
- Handiwirawan E. dan Subandriyo. 2004. Potensi keragaman sumberdaya genetik sapi Bali. *Wartazoa*. 14 (3): 107-115.
- Hardjosubroto W. 2004. Alternatif kebijakan pengelolaan berkelanjutan sumberdaya genetik sapi potong lokal dalam sistem perbibitan ternak lokal. *Wartazoa*. 14 (3): 93-97.
- ILRI (International Livestock Research Institute). 1995. Global Agenda for Livestock Research. Proceedings of the Consultation for the South-East Asia Region. 10–13 May 1995 IRRI, Los Banos, The Philippines.
- Ishida N., T. Hasegawa, K. Takeda, M. Sakagami, A. Onishi, S. Inumaru, M. Komatsu and H. Mukoyama. 1994. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Anim. Genet.* 25: 215-221.
- Kikkawa Y., T. Takada, Sutopo, K. Nomura, T. Namikawa, H. Yonekawa and T. Amano. 2003. Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. *Anim. Genet.* 34 (2): 96-101.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- MacHugh D.E. 1996. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle [theses]. Department of Genetics. Trinity College, Univ. Dublin.
- Martojo H. 2003. Indigenous Bali Cattle: The Best Suited Cattle Breed for Sustainable Small Farms in Indonesia. Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Fac. Anim. Sci., Bogor Agric. Univ., Indonesia.
- Merkens J. 1926. De Paarden en Runderteelt in Nederlandsch Indie. *Veeartsenijkundige Mededeeling*. No. 51. Landsdrukkerij-Weltevreden, Nederland.
- Miretti M.M., H.A. Pereira jr., M.A. Poli, E.P.B. Contel and J.A. Ferro. 2002. African-derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): evidence of a new taurine mitochondrial lineage. *Heredity*. 93 (5): 323-30.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2007. GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [28 Mei 2007].
- Nijman I.J., M. Otsen, E.L.C. Verkaar, C.D. Ruijter, E. Hanekamp, J.W. Ochieng, S. Shamshad, J.E.O. Rege, O. Hanotte, M.W. Barwegen, T. Sulawati and J.A. Lenstra. 2003. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity*. 90: 10-16.
- Noor RR. 2004. *Genetika Ternak*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Nozawa K. 1979. Phylogenetics studies on the native domestic animals in East and Southeast Asia. Proc. Workshop Animals Genetics Resources in Asia and Oceania. Tsakuba, 3-7 September 1979. Tsukuba: Society for the Advancement of Breeding Researches in Asia and Oceania (SABRAO) 23-43.
- 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](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) [15 Pebruari 2007].
- Saitou N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sodhi M., M. Mukesh, B. Prakash, S.P.S Ahlawat and R.C. Sobti. 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., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 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.
- Verkaar E.L.C., I.J. Nijman, K. Boutaga and J.A. Lenstra. 2002. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.* 60: 365–369.
- Verkaar E.L.C., H. Vervaecke, C. Roden, L.R. Mendoza, M.W. Barwegen, T. Susilawati, I.J. Nijman and J.A. Lenstra. 2003. Paternally inherited markers in bovine hybrid populations. *Heredity*. 91: 565–569.