

ANALISIS SEKUENS *D-LOOP* DNA MITOKONDRIA SAPI BALI DAN BANTENG DIBANDINGKAN DENGAN BANGSA SAPI LAIN DI DUNIA

ANAK AGUNG NGURAH GEDE DWINA WISESA¹,
TJOK GEDE OKA PEMAYUN², I GUSTI NGURAH KADE MAHARDIKA¹

¹)Lab Biomedik, ²) Lab Reproduksi,

Indonesian Biodiversity Research Center

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

E-mail: wisesa89@gmail.com

ABSTRACT

The result of this study indicates the D-loop of mtDNA of bali cattle is homologous with *banteng*. Two haplotypes can be identified. The sequence is different from that of *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus*, and *Bos gaurus*. Further research needs to be done with a representative sample for the entire population in Bali by targeting more than one locus. In addition, the effective population size of bali cattle needs to be known to improve the genetic quality of bali cattle.

Key word: Bali cattle (*Bos sondaicus*), *banteng*, *D-loop* mitochondrial DNA, sequences.

PENDAHULUAN

Sapi bali (*Bos sondaicus*) adalah jenis sapi asli Indonesia yang diduga dari keturunan banteng yang sudah didomestikasi dan merupakan plasma nutfah ternak asli Indonesia (Wibisono, 2010). Sapi bali juga mudah beradaptasi di lingkungan yang buruk dan tidak selektif terhadap makanan. Selain itu, sapi bali cepat beranak, jinak, mudah dikendalikan dan memiliki daya cerna terhadap makanan serat yang baik (Batan, 2006). Melihat perkembangannya sapi bali akan menjadi sapi potong utama di Indonesia.

Penelitian-penelitian yang telah dilakukan oleh para ahli sebelumnya membuktikan bahwa sapi bali mengalami penurunan kualitas (Feradis, 2009). Fakta ini ditunjukkan dengan tidak optimalnya fungsi reproduksi sapi bali seperti *calving interval* yang panjang, tingginya kejadian *silent heat* (estrus tenang) dan estrus *post partum* yang panjang (Nitis *et al.*, 1999).

Dari segi lain, hubungan kekerabatan sapi bali dengan banteng mulai dipertanyakan. Dari penelitian yang dilakukan oleh Nijman *et al.* (2003) menyebutkan bahwa sekuens sapi bali yang ada di Malaysia hampir identik (99,5%) dengan sapi zebu. Sementara, sapi madura hampir identik (99,7%) dengan banteng. Namun Mohamad *et al.* (2009) mengatakan bahwa, dari 3 pulau yang berbeda di Indonesia, sapi bali asli memiliki sekuen DNA mitokondria yang sama dengan banteng.

Sampai saat ini data sekuens DNA mitokondria sapi bali dan banteng masih sangat terbatas. Data keragaman genetik sapi bali sebagai sumber bibit sapi bali asli juga tidak tersedia di *Genbank*. Informasi genetik yang diperoleh dari sapi bali yang ditanam saat ini dibandingkan dengan sekuens genetik banteng akan membuktikan bahwa sapi bali memang benar berasal dari banteng.

Untuk memperoleh informasi genetik sapi bali, penelitian dilakukan pada fragmen DNA mitokondria (*mtDNA*). Analisis *mtDNA* dapat digunakan untuk mengetahui variabilitas genetik suatu populasi, karena analisis *mtDNA* lebih sensitif dibandingkan dengan analisis protein yang sudah banyak dilakukan (Iguchi *et al.* dalam Suwarminiwati, 2008).

Berdasarkan dari pertimbangan diatas, penelitian ini direncanakan untuk mengungkap struktur genetik sapi bali dan banteng dan hubungannya dengan *breed* sapi lain di dunia (*Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus* dan *Bos gaurus*) yang diperoleh dari *Genbank*. Penelitian ini dilakukan dengan cara analisis DNA mitokondria dengan teknik molekuler *PCR-Sequencing*.

METODE DAN METODE

Pengambilan Sampel Darah Sapi Bali

Sampel darah sapi diambil sebanyak 4 ml. Pengambilan sampel darah sapi dilakukan pada bagian leher tepatnya di vena jugularis externa dengan menggunakan jarum dan ditampung pada tabung *venoject* yang mengandung lithium heparin sebagai

antikoagulan. Pengambilan sampel darah sapi bali ini merupakan material yang akan digunakan untuk isolasi DNA.

Pengambilan Sampel Hati Sapi Bali

Sampel hati sapi bali diambil sebanyak 10 gram. Sampel hati yang telah diambil dimasukkan ke tabung *eppendorf*. Pengambilan sampel hati sapi bali ini merupakan material yang akan digunakan untuk isolasi DNA.

Pengambilan Sampel Feses Banteng

Sampel feses banteng diambil sebanyak 100 gram. Sampel feses banteng diambil yang paling segar. Sampel feses yang telah diambil dimasukkan ke tabung yang berisi ethanol. Pengambilan sampel feses banteng ini merupakan material yang akan digunakan untuk isolasi DNA.

Pemisahan Sel Darah Putih Sapi Bali

Darah sapi diambil 1 ml, dimasukkan kedalam tabung *eppendorf* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 2000-3000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan aquabidest dan dihomogenkan dengan cara mengocok membentuk angka delapan. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 2000-3000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang, sedangkan endapannya (berupa lendir) disimpan didalam freezer untuk selanjutnya digunakan untuk isolasi DNA.

Cara Ekstraksi DNA dari Sel Darah Putih dan Hati Sapi Bali dan Feses Banteng

Sel darah putih yang tadi diisolasi dipanaskan pada suhu 100⁰C selama 5 menit kemudian dihomogenkan dengan mikropastel. Sedangkan untuk hati dan feses diambil 0,1 gram dan kemudian digerus dengan mikropastel. Masing-masing ditambahkan dengan 180 µl *digestion buffer* dan dihomogenkan kembali dengan mikropastel. Setelah homogen, 20 µl protein K ditambahkan ke dalamnya, kemudian diinkubasikan selama 1-4 jam dalam suhu 55⁰C dan sesekali divorteks lalu disentrifugasi dengan kecepatan maksimum (14.000 rpm) selama 3 menit. Supernatannya diambil dan dimasukkan ke tabung baru dan tambahkan 20 µl RNase A, kemudian divorteks dan diinkubasi selama 2 menit. Sebanyak 200 µl *binding buffer* ditambahkan kedalam tabung dan kemudian divorteks. Selanjutnya, sebanyak

200 µl ethanol ditambahkan dan isinya dipindahkan ke spin collum. Setelah itu, spin collum disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang keluar (flow) dibuang, kemudian tabung dipindahkan ke spin collum baru. Sebanyak 500 µl *wash buffer* 1 lalu ditambahkan ke dalam spin dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Flow dibuang dan 500 µl *wash buffer* 2 ditambahkan kedalamnya dan disentrifugasi dengan kecepatan maksimum (14.000 rpm) selama 3 menit. Flownya dibuang, dan dipindahkan ke tabung 1,5 ml, kemudian ditambahkan dengan 150 µl *elution buffer*. Campuran diinkubasikan selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, dan selanjutnya disimpan dalam suhu -20°C sampai dipergunakan lebih lanjut.

PCR dan Sekuensing

Teknik PCR pada penelitian ini menggunakan metode *Kit invitrogen*. Teknik PCR dilakukan dengan *Taq DNA polimerase (invitrogen)*. PCR dilakukan dalam kondisi 0,2 mM dNTP, 1,6 mM MgSO_4 , dengan *buffer* yang disediakan oleh produsen. Ke dalam tabung PCR dengan volume 200 µl dimasukkan 1-3 µl DNA yang telah diisolasi dan ditambahkan dengan 0,3 µM dari masing-masing primer. Setelah penambahan enzim, tabung PCR dimasukkan ke dalam *Personal Thermal Cycler MJ Mini BIO-RAD*. Tabung PCR dimasukkan setelah *thermocycler* mencapai suhu 95°C . Mesin penyiklus panas diprogram dengan kondisi 95°C selama 7 menit. Kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus dalam kondisi 95°C selama 30 detik, kemudian 55°C selama 40 detik, sesuai dengan primer yang digunakan dan elongasi pada suhu 72°C selama 1,5 menit. Untuk memperoleh fragmen yang sempurna, inkubasi akhir pada 72°C dilakukan selama 10 menit. Setelah PCR, 25% dari volume produk ditambahkan dengan 1-2 µl *loading dye (Bromphenol-blue dan Cycline Cyanol)* dan selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 1% yang telah diisi *etidium bromide* dengan konsentrasi 25 µg/ml bersama dengan *marker* 100 bp DNA Ladder (*invitrogen*) dengan tegangan 100 V selama 30 menit. Visualisasi DNA dilakukan dengan UV dan didokumentasikan dengan kamera dan film Polaroid.

Setiap produk PCR dianalisis menggunakan reaksi sekuensing rantai tunggal (*single-stranded sequencing reaction*) dan dianalisis dengan menggunakan *automated cycle sequencing* di Lembaga Eijkman, Jakarta.

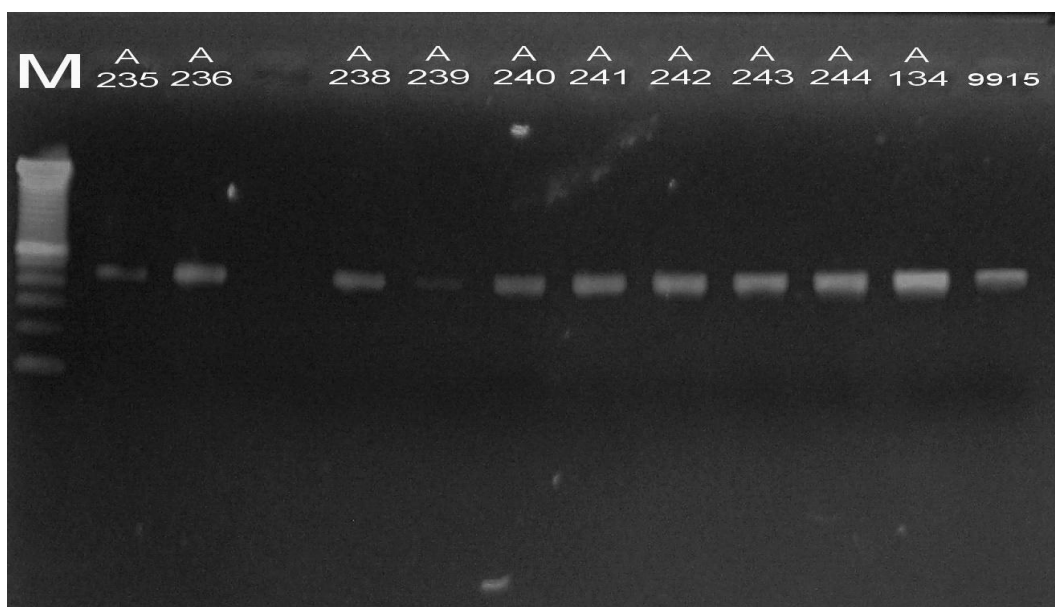
Analisis Data

Sekuen diurutkan (*aligned*) menggunakan *Clustal W* dalam program MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011^b). Hasil sekuen daerah *mtDNA D-loop* setiap haplotipe dibandingkan dengan sekuen jenis sapi *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus* dan *Bos gaurus* yang diunduh dari *GenBank*. Semua analisis genetik dilakukan dengan program MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Daerah *D-loop* DNA Mitokondria

Lima belas sampel fragmen *D-loop* DNA mitokondria (*mtDNA*) dapat diekstraksi dengan baik dari sel darah putih 4 ekor sapi bali, dari hati 9 ekor sapi bali dan dari feses 2 ekor banteng. Seluruh *mtDNA D-loop* sapi bali dan banteng yang diuji tersebut dapat diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer BovmtFP 5'-CATCTAAAACGGTCCATTCTTTCCTC-3' dan BovmtBP 5'-ACTCATCTAGGCATTTTCAGT-3' yang didisain di Laboratorium Biomedik FKH UNUD. Panjang produk PCR yang diamplifikasi adalah sekitar 500 bp. Hasil elektroforesis produk PCR disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 1.1 Elektroforesis Produk PCR dengan Gel Agarose 1% yang Telah Diwarnai *Etidium Bromide* dengan *Marker* 100 bp DNA *Ladder* (*invitrogen*).

Setelah produk PCR disequen dihasilkan sekuen *mtDNA D-loop* sapi bali dan banteng sepanjang 341 bp. Dari sekuen tersebut terlihat ada satu titik polimorfik (*polymorphic site*) dari dua haplotipe sapi bali yang diperoleh pada sekuen nomor 332 (Tabel 1.1). Haplotipe 1 memiliki sekuen C (citosin) sedangkan haplotipe 2 memiliki sekuen G (guanin) pada posisi 332. Sekuen DNA yang diperoleh dari penelitian ini telah diregistrasi di *GenBank* dengan nomor akses JQ 002668-JQ 002670

Tabel 1.1 Sekuens Titik Polimorfik *MtDNA D-loop* Sapi Bali, Banteng, *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus*, dan *Bos gaurus*. Penomoran berdasarkan posisi pada panjang basa 500 bp.

SEKUENS	1 1 1 1 1	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 3 3 3 3 3
	2 2 8 9 4 5 5 7 8	0 0 0 1 1 2 2 5 5 6	7 8 8 9 0 0 2 2 3
	4 8 9 6 9 6 3 8 2 6	5 6 7 2 3 8 9 2 9 5	6 0 1 5 4 9 5 9 2
9274 Sobangan	CCCTCGGGCT	CATACTTTTG	CGAACTGAC
9276 Sobangan G
A243 RPH
A240 RPH G
9915 Banteng
B. javanicus Gbk	TAT. . AAA. .	ATATTC. . AA	T. CT. CA. .
B. taurus M382 Gbk	TAT. . . . A. C	ATAC. . C. AA	. ACT. CA. .
B. indicus XX8 Gbk	TATC. . . A. C	ATAC. . C. AA	. ACT. CA. .
B. gaurus 410064 Gbk	TAT. T. AAT. . . .	CT. . C. A T. AG.

Keterangan: Penomoran titik polimorfik dibaca dari atas ke bawah

Konstruksi Pohon Filogeni

Konstruksi pohon filogeni berfungsi untuk melihat hubungan kekerabatan antar sapi bali dengan banteng, *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus*, dan *Bos gaurus*. Hasil konstruksi pohon filogeni disajikan pada Gambar 1.2 Sedangkan matriks jarak genetiknya ditampilkan dalam Tabel 1.2

Dari Gambar 1.2 dan Tabel 1.2 dapat dilihat bahwa sapi bali memiliki genetik yang sama atau hampir sama dengan banteng (jarak genetik sapi bali H1 dengan banteng adalah 0,000 sedangkan jarak genetik sapi bali H2 dengan banteng adalah 0,003). Namun sangat jauh dengan *Bos taurus* (jarak genetik 0,052), *Bos indicus*

(jarak genetik 0,055), *Bos javanicus* (jarak genetik 0,058) dan *Bos gaurus* (jarak genetik 0,043) yang diakses melalui *Genbank*.

Tabel 1.2 Matriks Jarak Genetik *MtDNA D-Loop* Sapi Bali Haplotipe 1 dan 2, Banteng, *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus*, dan *Bos gaurus*.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
[1]								
[2]	0.003							
[3]	0.000	0.003						
[4]	0.003	0.000	0.003					
[5]	0.000	0.003	0.000	0.003				
[6]	0.058	0.061	0.058	0.061	0.058			
[7]	0.052	0.055	0.052	0.055	0.052	0.027		
[8]	0.055	0.058	0.055	0.058	0.055	0.030	0.003	
[9]	0.043	0.046	0.043	0.046	0.043	0.049	0.052	0.055

Keterangan:

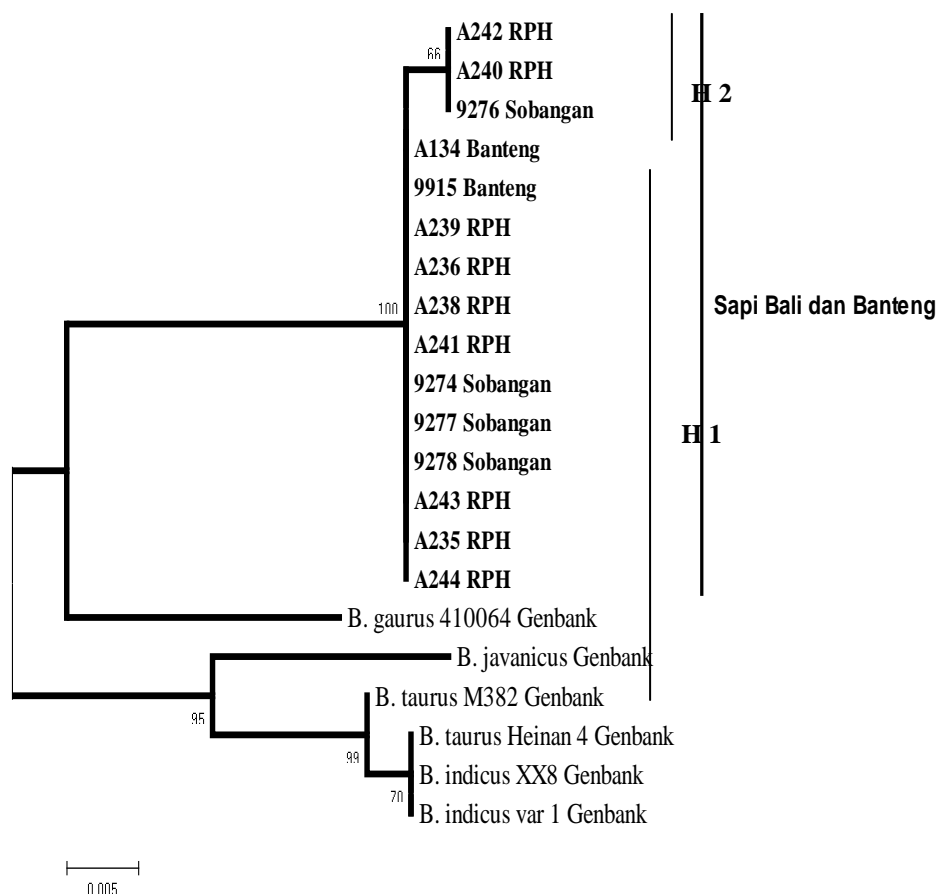
[1] 9274 Sobangan, [2] 9276 Sobangan, [3] A243 RPH, [4] A240 RPH, [5] 9915 Banteng, [6] *B. javanicus* *Genbank* (Acc no: FJ 997262), [7] *B. taurus* M382 *Genbank* (Acc no. AB 117092), [8] *B. indicus* XX8 *Genbank* (Acc no. EF 524185), [9] *B. gaurus* 410064 *Genbank* (Acc no. GU 324988).

Analisis jarak genetik menunjukkan seberapa besar adanya perbedaan genetik pada dua haplotipe yang berbeda. Hasil analisis menunjukkan jarak genetik yang paling dekat adalah 0,000. Nilai ini menunjukkan bahwa dari 1000 pasang basa, tidak satupun terdapat pasangan basa yang berbeda. Jarak genetik 0,000 tersebut terdapat antara nomor satu (9274 Sobangan) dengan nomor tiga (A243 RPH), nomor satu (9274 Sobangan) dengan nomor lima (9915 Banteng), nomor dua (9276 Sobangan) dengan nomor empat (A240 RPH), dan antara nomor tiga (A243 RPH) dengan nomor lima (9915 Banteng). Haplotipe yang ditemukan pada penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi dua *cluster*. Grup haplotipe pertama yaitu nomor satu (9274 Sobangan), nomor tiga (A243 RPH), dan nomor lima (9915 Banteng). Grup haplotipe kedua yaitu nomor dua (9276 Sobangan), nomor empat (A240 RPH).

Jarak genetik sapi bali dan banteng yang telah dianalisis, dibandingkan juga dengan jarak genetik *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus*, dan *Bos gaurus* yang diakses melalui *Genbank* dan ditampilkan pada Gambar 1.2 dalam pohon asal-usul.

Gambar 1.2 menunjukkan bahwa terdapat dua haplotipe yang berbeda pada sampel yang dianalisis. Grup haplotipe pertama adalah A235 RPH, A236 RPH, A238 RPH, A239 RPH, A241 RPH, A243 RPH, A244 RPH, A134 Banteng, 9915 Banteng, 9274 Sobangan, 9277 Sobangan, 9278 Sobangan. Sedangkan Grup haplotipe kedua yaitu A242 RPH, A240 RPH dan 9276 Sobangan.

Dari gambar pohon filogeni, terlihat bahwa sapi bali haplotipe 1 dan banteng berada pada *clade* yang sama (*monophyly*), dengan nilai *bootstrap* 100%. Namun sekuens *Bos javanicus* yang diakses dari *Genbank* berada pada *cluster* yang berbeda. Sekuens *Bos javanicus* yang diakses dari *Genbank* memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan *Bos taurus* dibandingkan dengan sapi bali. Dari pohon asal-usul tersebut, juga dapat dilihat bahwa hubungan kekerabatan sapi bali dan banteng lebih dekat dengan *Bos gaurus* dibandingkan dengan *Bos taurus*, *Bos indicus* dan *Bos javanicus* karena terletak pada *cluster* yang sama dengan nilai jarak genetik yaitu 0,043.



Gambar 1.2 Pohon Asal-Usul *MtDNA D-Loop* Sapi Bali Haplotipe 1 dan 2, Banteng, *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus*, dan *Bos gaurus*. Huruf yang dicetak tebal merupakan data primer sedangkan huruf yang tidak dicetak tebal merupakan data sekunder yang diakses melalui *Genbank*. H1 merupakan haplotipe 1. Sedangkan H2 merupakan haplotipe 2.

PEMBAHASAN

Tiga belas fragmen DNA mitokondria sapi bali dan dua dari banteng dapat diamplifikasi dengan baik menggunakan teknik PCR. Panjang produk PCR yang dapat diamplifikasi sekitar 500 bp.

Hasil analisis dari sekuens *mtDNA D-loop* menunjukkan hanya ada satu titik polimorfik (*polymorphic site*) dari dua haplotipe sapi bali yang diperoleh. Hal ini berbeda dengan pernyataan Ratnayani *et al.* (2007) yang menyatakan DNA mitokondria memiliki laju mutasi yang sangat tinggi. Lebih lanjut disebutkan *mtDNA*

mempunyai laju polimorfisme yang tinggi dengan laju evolusinya sekitar lima sampai sepuluh kali lebih cepat dari DNA inti.

Namun demikian, laju mutasi yang cepat dengan jumlah populasi yang terbatas pada sapi bali kemungkinan telah terjadi mutasi balik ke tipe asalnya. Menurut Elrod and Stansfield (2007) perubahan sekuen nukleotida dapat kembali menjadi sekuens awalnya yang disebut dengan mutasi balik (*back mutation*). Situs polimorfik pada daerah *D-loop* tidak menyebabkan perubahan fenotipik karena *D-loop* merupakan daerah *non-coding* yang tidak terekspresikan. Daerah ini hanya berperan dalam regulasi dan inisiasi dari replikasi dan transkripsi dari *mtDNA* (Boore, 1999).

Disini juga terlihat sapi bali yang ada di Bali memiliki keragaman genetik yang sangat rendah. Hal ini dapat diketahui dari keragaman haplotipe sapi bali pada penelitian ini yang rendah. Selain itu, keragaman haplotipe yang rendah mungkin terjadi karena *founder effect* atau terjadi mungkin karena proses pemisahan sapi bali dari populasi awal. *Founder effect* terjadi karena penurunan ukuran populasi yang ekstrim (Slatkin, 2004).

Dari Gambar 1.2 terlihat sapi bali haplotipe 1 memiliki gen *MtDNA D-loop* yang sama dengan banteng (jarak genetik 0,000) yang dipelihara di Alas Purwo dengan nilai *bootstrap* 100%. Sedangkan sapi bali haplotipe 2 memiliki gen *MtDNA D-loop* yang hampir sama dengan banteng (jarak genetik 0,003). Hal ini sejalan dengan pernyataan dari Mohamad *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa sapi bali memiliki gen DNA mitokondria yang sama dengan banteng.

Hasil pengujian dengan metode *bootstrapping* yang ditampilkan dalam setiap percabangan filogeni pada Gambar 1.2 menunjukkan cabang filogeni dari sapi bali haplotipe 2 memiliki nilai *bootstrap* 66 yang artinya 66% dari 1000 replikasi sapi bali tersebut memiliki kekerabatan dan menunjukkan gambar yang sama. Sedangkan pada sapi bali haplotipe 1 memiliki nilai *bootstrap* 100%.

Cabang pada pohon filogeni mewakili hubungan antar unit yang menggambarkan hubungan keturunan dengan leluhur, sedangkan panjang cabang menggambarkan jumlah perubahan evolusioner yang terjadi antara dua nodus (Li and Graur, 1991).

Analisis pohon filogeni ini menunjukkan bahwa penanda molekuler *MtDNA D-loop* dengan primer BovmtFP yang mewakili nukleotida 500 bp dapat

digunakan sebagai penanda genetik yang menunjukkan hubungan kekerabatan yang sangat dekat antara sapi bali dan banteng. Namun, perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan primer yang mengamplifikasi bagian lain dari *mtDNA* atau menggunakan analisis DNA inti untuk menjustifikasi hasil dari penelitian ini.

KESIMPULAN

Sekuens *D-loop* DNA mitokondria sapi bali haplotipe 1 sama dengan banteng sedangkan sekuens *D-loop* DNA mitokondria sapi bali haplotipe 2 hampir sama dengan banteng. Sekuens *D-loop* DNA mitokondria sapi bali berbeda dengan sekuens *D-loop* DNA mitokondria *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus*, dan *Bos gaurus* yang diakses melalui *Genbank*.

SARAN

Perlu dilakukannya penelitian lanjutan agar hasil yang didapat lebih lengkap dengan sampel yang representative untuk seluruh populasi di Bali dengan menargetkan lebih dari satu lokus genetik. Selain itu, jumlah populasi efektif sapi bali perlu segera diketahui.

DAFTAR PUSTAKA

- Batan, I W. 2006. Sapi Bali dan Penyakitnya. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Denpasar.
- Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27 (8): 1767-1780.
- Elrod, S. and Stansfield, W. 2007. Genetika. (Damaring Tyas W. Pentj). Jakarta: Erlangga
- Feradis. 2009. Peranan Teknologi Inseminasi Buatan dalam Peningkatan Mutu dan Produktivitas Ternak. Badan Penelitian dan Pengembangan Provinsi Riau. Riau. Vol. IX No. 2.
- Li, W. and D. Graur. 1991. *Fundamental of Moleculer Evolution*. Sinauer Associates Inc. Sunderland.
- Mohamad, K., Olsson, M., van Tol, H.T.A., Mikko, S., Vlamings, B.H., Andersson, G., Martinez, H.R., Purwantara, B., Paling, R.W., Colenbrander, B., and Lenstra, J. A. 2009. On the Origin of Indonesia Cattle. *PLoS ONE* 4(5): e5490.

- Nijman, I. J., Otsen, M., Verkaar, E. L. C., Ruijter, C. de., 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.
- Nitis, I.M., Lana, K., Sukanten, W., Putra, S., Pemayun, T.G.O. 1999. Growth and Reproductive Performance of Bali Heifer in The Three Strata Forage System. Department of Nutrition and Tropical Forage Science, Udayana University, Denpasar, Bali, Indonesia.
- Ratnayani, K., I N. Wirajana dan A. A. I. A. M. Laksmiwati. 2007. Analisis Variasi Nukleotida Daerah *D-loop* DNA Mitokondria pada Satu Individu Suku Bali Normal. *Jurnal Kimia* 1(1):7-14
- Slatkin, M. 2004. A Population-Genetic Test of Founder Effects and Implications for Ashkenazi Jewish Disease. Department of Integrative Biology, University of California Berkeley. *Am. J. Hum. Genet.* 75:282-293
- Suwarminiwati, I G. A. A. 2008. Keragaman Genetik Abalon (*Haliotis asinina*) di Lokasi Pantai yang Berbeda di Bali Melalui Analisis DNA Mitokondria. Program Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 10.1093/molbev/msr121.
- Wibisono, A.W. 2010. Sapi Bali. <http://duniasapi.com/id/edufarming/43-sapi-bali.html>. Diakses tanggal 14 April 2011.