

Identifikasi Keragaman Genetik Gen Growth Hormon Receptor Dengan Enzim Restriksi Mbo Ii (Ghr|Mbo Ii) pada Sapi Bali

(Polymorphism of Growth Hormone Receptor Gene with Restriction Enzyme MBO II (GHR/MBO II) in Bali Cattle)

Nurul Huda¹⁾, Made Sriasih²⁾, Maskur³⁾

¹⁾Program Magister Manajemen Sumberdaya Peternakan, Universitas Mataram

²⁾Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Peternakan, Universitas Mataram,.

³⁾Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Ternak, Fakultas Peternakan
Universitas Mataram

Email: young_nh@yahoo.com

Diterima : 10 Maret 2015/ Disetujui: 20 Mei 2015

ABSTRACT

Growth Hormone Receptor (GHR) gene is a member of the super family cytokine/hematopoietin receptor. GHR plays a role in mediating the biological activity of growth hormone on target cells that lead to the affection of the nature of growth in beef cattle carcasses and the nature of milk production in dairy cows. This study was designed to identify the genetic diversity of GHR genes exon 10 in Bali cattle. Genotype variation of gene candidates was identified using PCR-RFLP technique. The results showed that mutation at position of 755bp exon 10 of GHR gene as determined by Maskur (2012) can be identified using MBO II restriction enzymes at position of 125bp or at position of 282bp base nucleotides caused by transition mutation of C/T and substitution of amino acid threonine to isoleucine. Genotype identification of GHR gene exon 10 resulted in three individual genotypes in Bali cattle population namely CC, TT and CT with frequency of 0.1931; 0.5455 and 0.2614 respectively. The result of X^2 test and heterozygosity observation as well as heterozygosity expectation indicate that the genotype distribution on Bali cattle population in this study were not in Hardy-Weinberg equilibrium (Hardy-Weinberg Equilibrium/ HWE). The value of GHR|MBO II gene Polymorphic Informative Content was 0.342051, might be used for genetic identifier, and was quite informative as gene identifier for linkage analysis in the population.

Keywords: growth hormone receptor, PCR-RFLP, MBO II, Bali cattle

PENDAHULUAN

Penciri DNA dikembangkan untuk mendeteksi sifat unggul seekor ternak dalam waktu yang relatif lebih cepat dan dalam skala laboratorium yang lebih akurat. Sifat-sifat produksi pada ternak seperti performan pertumbuhan, kualitas dan kuantitas karkas, merupakan sifat yang memiliki nilai ekonomis penting pada ternak yang berada dibawah kontrol beberapa gen. Gen *Growth Hormone* (GH), *Growth Hormone Receptor* (GHR), *insulin-like growth factor I* (IGF-I), *Leptin*, dan *Pit-1* merupakan

kelompok gen yang mengontrol sifat pertumbuhan pada ternak sapi potong (Ho and Hoffman, 1993). Pertumbuhan merupakan suatu proses deposisi, pemindahsubstansi sel-sel, serta peningkatan ukuran dan jumlah sel pada tingkat dan titik berbeda dalam suatu waktu tertentu yang dipengaruhi oleh gen-gen pertumbuhan (Lawrence dan Fowler, 2002).

Gen *Growth Hormone Receptor* (GHR) merupakan anggota dari super family reseptor cytokine/haemato-poietin. Famili dari reseptor ini terdiri dari prolactin, erythropoietin, interferons, dan interleukins 3-7 (Carter-Su *et al.*,

1997). Gen GHR pada sapi dipetakan sebagai gen tunggal yang terletak pada kromosom 20 (Moody *et al.*, 1995), terdiri atas 10 ekson dan 9 intron, dengan panjang 25.688 bp (Lucy *et al.*, 1998; Jiang dan Lucy, 2001).

GHR memiliki fungsi memediasi aktivitas biologi hormon pertumbuhan pada sel target (Rotwein *et al.*, 1994; Argetsinger dan Carter-Su, 1996), yang mempengaruhi sifat pertumbuhan karkas pada sapi pedaging dan sifat produksi susu pada sapi perah. Mutasi pada gen GHR dapat menyebabkan keterlambatan pertumbuhan pada manusia yang dikenal sebagai *GH resistance* atau *GH insensitif* (Rosenbloom *et al.*, 1997). Oleh karena fungsinya yang penting, gen GH dan GHR merupakan kandidat gen untuk program *Marker Assisted Selection* atau penanda genetik untuk pertumbuhan, karkas dan produksi susu pada ternak khususnya pada sapi (Beauchemin *et al.*, 2006).

Keragaman gen GHR diharapkan dapat dijadikan sebagai informasi dasar sebagai gen mayor yang mempengaruhi tingkat produksi ternak. Keragaman genetik mengacu pada variasi dalam level gen individu (polimorfisme) dalam sebuah spesies dan adanya sebuah mekanisme dalam populasi untuk menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan (Soy-sal, 2004). Disamping itu polimorfisme gen dapat digunakan sebagai alat untuk mengelompokkan dan mempelajari kekerabatan antar bangsa (Liefers *et al.*, 2005).

Keragaman genetik fragmen gen GHR|*AluI* pada *exon 10* telah diidentifikasi pada beberapa sapi pedaging/ potong. Ge *et al.* (2000) mengidentifikasi *single nucleotide polymorphism* (SNP) fragmen gen GHR|*AluI* sapi Angus, yang berlokasi pada posisi 76 (T/C), 200 (G/A), 229 (T/C) dan 257 (A/G) bp. Sementara Maskur *et al.* (2012), melaporkan dua SNP baru pada *exon 10* gen GHR pada sapi Bali yang disebabkan oleh mutasi substitusi Timin dengan Sitosin (T/C) pada posisi basa 702 bp dan transisi Sitosin dengan Timin (C/T) pada posisi 755 bp.

Keragaman genetik sapi Bali akibat adanya mutasi pada *exon 10* gen GHR tersebut menarik untuk dikaji mengingat informasi ini menjadi penting karena besar manfaatnya untuk program pemuliaan.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan sampel darah sapi Bali yang diambil dari kelompok peternak sapi bantuan JICA dan ACIAR di Kabupaten Lombok Barat, Kabupaten Lombok Tengah dan Kabupaten Lombok Timur yang dipelihara secara intensif. Sampel darah sapi Bali yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Imuno-biologi Fakultas MIPA Universitas Mataram. Sampel darah yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 88 sampel darah sapi Bali terdiri dari 49 sampel darah jantan dan 39 sampel darah betina.

Ekstraksi DNA genom

Ekstraksi DNA genome dilakukan mengikuti petunjuk Sambrook *et al.* (1989) yang dimodifikasi oleh Maskur *et al.* (2014) dengan menggunakan buffer lisis sel untuk mendegradasi dinding sel dan fenol-kloroform untuk mendegradasi protein dan lemak kemudian dipresipitasi menggunakan etanol absolut. Proses berikutnya adalah pemurnian menggunakan RNase.

Polymerase chain reaction (PCR)

Komposisi reaksi PCR dikondisikan pada volume reaksi 15 μ L terdiri atas 100 ng DNA, 2 x Taq Master Mix (Taq DNA Polymerase 0,05 μ M, 2x vibuffer A, 0,4 mM dNTP dan 3 mM $MgCl_2$), 10 pmol/ μ L primer F, 10 pmol/ μ L primer R, 50 mM $MgCl_2$, ddH₂O pH 7 dengan menggunakan sekuen nukleotida pengapit forward dan reverse primer masing-masing F:5'-GCTAACTTCATCGTGGACAAC '3R:5'-TATGGCATGATTTTGTTT AG'3. Amplifikasi dilakukan selama 35 siklus dengan denaturasi awal pada suhu 94° C selama 5 menit, diikuti 35 siklus berikutnya masing 94° C x 15

detik, suhu annealing 56°C x 45 detik. Satu siklus ekstensi awal pada suhu 72°C x 1 menit, kemudian diakhiri satu siklus berikutnya pada 70°C selama 10 menit dengan menggunakan mesin PCR (SensoQuest, Germany). Produk PCR di elektroforesis pada gel agarose 1.5%, kemudian divisualisasi pada UV transiluminator.

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RLFP).

Produk PCR yang diperoleh dari masing-masing gen target dianalisis menggunakan RFLP melalui pemo-tongan menggunakan enzim restriksi MBOII. Adapun komponen reaksi dalam pemotongan fragmen gen hasil amplifikasi PCR terdiri dari 10 µl DNA produk PCR ditambah 0,5 µL enzim restriksi MBOII (0,25 U); 1,5 µL buffer enzim (10x) dan 3 µL ddH₂O, sampai volume produk PCR – RLFP 15 µL. Selanjutnya n inkubasi selama 16 jam pada suhu 37° C.

Genotyping kandidat gen

Elektroforesis dilakukan dengan gel agarose pada konsentrasi 2% dan dijalankan pada tegangan 100 volt selama 30 - 45 menit. Hasil elektroforesis diamati dan difoto dengan bantuan UV trans iluminator (Alpha Imager). Penentuan posisi pita DNA pada gel agarose dilakukan secara manual.

Ukuran dan jumlah dari alel yang muncul pada gel ditentukan berdasarkan asumsi bahwa semua pita DNA dengan laju migrasi yang sama adalah homolog. Alel T adalah SNP dengan nukleotida T (terpotong enzim MBO II), sedangkan alel C adalah SNP dengan nukleotida C (tidak terpotong enzim MBO II).

Analisis data

Frekuensi genotipe dan alel dihi-tung dengan menggunakan rumus Nei dan Kumar (2000). Frekuensi Alel dapat dihitung dengan cara:

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

Keterangan :

- X_i = frekuensi alel ke-i,
- n_{ii} = jumlah sampel dengan genotipe ii,
- n_{ij} = jumlah sampel dengan genotipe ij,
- N = Jumlah individu sampel.

Frekuensi genotype dapat dihitung dengan cara :

$$x_i = \frac{\sum_{i=1}^n ni}{N}$$

Keterangan :

- X_i = Frekuensi genotif ke i
- n_i = Jumlah individu bergenotipe i
- N = jumlah individu sampel

Keseimbangan Hardy Weinberg diuji dengan uji Khi-Kuadrat (Hartl & Clark 1997)

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

Keterangan:

- χ^2 = uji Chi- Kuadrat
- Obs = jumlah pengamatan genotip ke-i
- Exp = jumlah harapan genotip ke-i

Heterozigositas pengamatan (H_o), heterozigositas harapan (H_e) dan standar eror heterozigositas harapan (Weirs 1996)

Frekuensi Heterozigositas Pengamatan:

$$H_o = \sum_{i \neq j} \frac{N_{1ij}}{N}$$

Keterangan:

- H_o = frekuensi heterozigositas pengamatan
- N_{1ij} = jumlah individu heterozigositas pada lokus ke-1
- N = jumlah individu yang dianalisis

Heterozigositas Harapan:

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

Keterangan:

- H_e = heterozigasitas harapan
- P_{1i} = frekuensi alel ke I pada lokus 1

n = jumlah alel pada lokus ke-1

Tingkat informasi suatu alel dihitung dengan pendekatan nilai *polymorphic informative content* (PIC) :

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

Keterangan

P_i = frekuensi alel ke i

n = jumlah alel per perinci (marker)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produk PCR berukuran sekitar 342 bp (Gambar 1), berada pada posisi exon 10 gen *GHR*. Berdasarkan Hasil penjajaran sekuen yang dilakukan oleh Maskur *et al.* (2012) menggunakan program BioEdit dan Mega4 terindikasi adanya mutasi baru pada exon 10 gen GH (Gambar 2). Hasil identifikasi sekuen DNA menunjukkan ruas gen *GHR* yang diamplifikasi terdapat dua situs pemotongan MBO II yaitu pada posisi 38 bp dan 125 bp exon 10 bovine *Growth Hormone Receptor* (Gen Bank Kode Akses AF140284) seperti terlihat pada Gambar 3 dan menghasilkan dua alel, yaitu alel C (*uncut*) dan alel T (*cut*). Alel C tidak terpotong dengan dengan MBO II, menghasilkan satu fragmen DNA berukuran 342 bp sedangkan alel T terpotong pada situs pemotongan MBO II, menghasilkan tiga fragmen DNAbesukuran panjang 217 bp, 125 bp dan 87 bp.

Fragmen gen *GHR*|MBO II menghasilkan tiga macam genotipe, yaitu fragmen yang tidak terpotong dikenal dengan genotipe CC, fragmen yang terpotong menjadi tiga pita dikenal dengan genotipe TT, dan fragmen gabungan (empat pita) dikenal dengan genotipe CT (Gambar 4.).

Mutasi transisi pada basa 755 bp yang dilaporkan oleh Maskur (2012) berhasil diidentifikasi dengan menggunakan enzim restriksi MBO II dimana basa C (Cytosin) diubah menjadi T (Timin) pada posisi 125 bp gen *GHR* exon 10 atau pada posisi basa nukleotida 282 bp sesuai sekuen *GHR* di *Gen*

Bank (Kode Akses AF140284). Posisi mutasi transisi C/T dan substitusi asam amino pada ekson 10 gen *GHR* dapat dilihat pada Gambar 5.

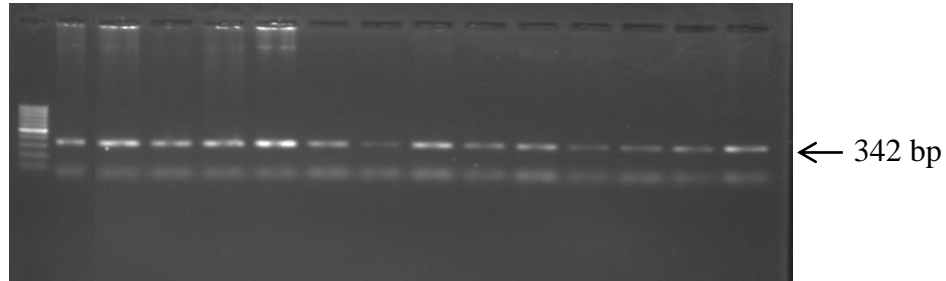
Mutasi transisi C/T yang dilaporkan oleh Maskur (2012) pada posisi 282 bp merupakan mutasi titik (*point mutation*) mengubah sekuen nukleotida pada kodon 44 exon 10 yaitu ACC yang menyandikan asam amino *threonin* menjadi AUC yang menyandikan asam amino *Isoleucine*. Menurut Windelspecht (2007) mutasi transisi ini terjadi karena adanya substitusi antara satu basa purin (Adenin) dengan basa Purin lainnya (Guanin) atau antara satu basa Pirimidin (Timin) dengan basa Pirimidin lainnya (Sitosin).

Frekuensi alel dan genotipe gen *GHR- MBO II*

Mutasi transisi C/T pada pada exon 10 menghasilkan dua alel yaitu C dan T dengan distribusi frekuensi alel T lebih besar dibandingkan alel C yaitu masing-masing 0,6761 dan 0,3239 (Tabel 1).

Alel C merupakan alel minor dengan frekuensi yang lebih rendah dari alel T. Identifikasi genotipe menggunakan teknik PCR-RFLP gen *GHR* exon 10 menghasilkan tiga genotipe individu dalam populasi sapi Bali yaitu CC, TT dan CT dengan frekuensi masing-masing 0,1931; 0,5455 dan 0,2614.

Hasil uji X^2 menunjukkan bahwa distribusi genotipe tidak berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg Equilibrium/HWE). Frekuensi genotipe pada lokus gen *GHR* exon 10 menunjukkan ketidakseimbangan (X^2 hitung > X^2 tabel), Tabel 2. menunjukkan hasil pengukuran indeks genetik dari populasi sapi Bali yang meliputi heterozigositas pengamatan (H_o), heterozigositas harapan (H_e), Standart Error dan *Polymorphic Information Contents* (PIC). Nilai heterozigositas pengamatan (H_o) sebesar 0,261 lebih rendah dibandingkan nilai heterozigositas harapan (H_e). Perbedaan antara nilai H_o dan H_e bahwa telah terjadi ketidakseimbangan Hardy-Weinberg yaitu perubahan frekuensi gen yang

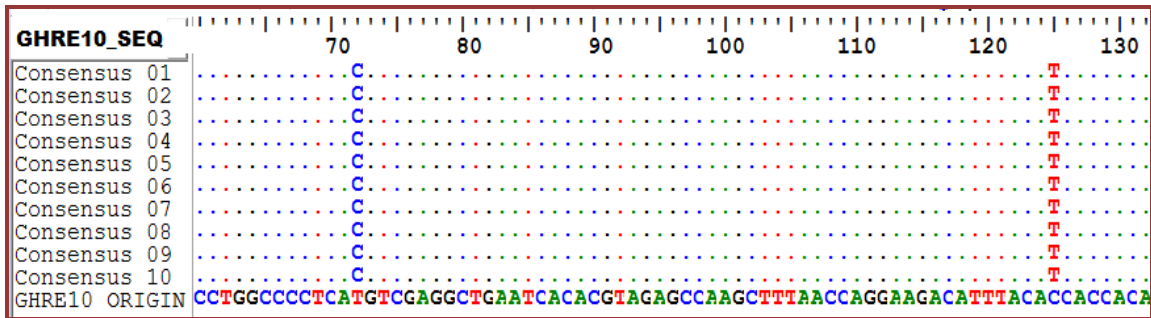


Gambar 1. Visualisasi Hasil Amplifikasi Ruas Gen GHR|MBO II pada Gel Agarose 1,5%

```

1 acagctcagc aatccaagtt cattggcaa cattgatttt tatgcccagg taagcgacat
61 tacaccagca ggaaatgtgg tcctttcccc aggccaaaag aataagactg ggaaccccca
121 gtgtgacacg caccagaag tggtcacacc ctgccaagct aacttcacg tggacaacgc
181 ttacttctgc gaggtagacg ccaaaaagta cattgcctg gccctcatg tcgaggctga
241 atcacacgta gagccaagct ttaaccaggaagacattttac atcaccacag aaagccttac
301 cactacagct gggaggtcgg ggacagcaga acatggtcca agttctgaga tacctgtccc
361 agattatacc ttcattcata tagtacagtc ttcacagggc ctcgtactca atgcgactgc
421 cctgccttg cctgacaaa agtttctctc atcatgtggc tatgtgagca cagaccaact
481 gaacaaaatc atgccatagc ttttcttga tttcctatga gctaccnnt tgatgggnca
541 g
    
```

Gambar 2. Penjajaran sekuen DNA exon 10 gen *GHR*.



Gambar 3. Fragmen Gen GHR|MBO II di dasarkan pada Sekuens Gen GHR di Gen Bank (Kode Akses AF140284)

Ket :Posisi Primer (forward dan Reverse) bergaris bawah dan berwarna hijau Situs pemotongan enzim MBO II (cetak tebal dan diblok abu)

Tabel 1. Frekuensi alel dan genotipe gen *GHR- MBO II* pada sapi Bali

Gen	N	Frekuensi alel		Frekuensi Genotipe			X ² (HWE)	X ² (0,05)
		C	T	CC	TT	CT		
GHR	88	0,3239	0,6761	0,1931	0,5455	0,2614	14,307*	5,991

Keterangan : * = X² hitung > X² tabel (0,05)

TGC	CAA	GCT	AAC	TTC	ATC	GTG	GAC	AAC	GCT	TAC	TTC	TGC	GAG
GTA	GAC	GCC	AAA	AAG	TAC	ATT	GCC	CTG	GCC	CCT	CAT	GTC	GAG
GCT	GAA	TCA	CAC	GTA	GAG	CCA	AGC	TTT	AAC	CAG	GAA	GAC	ATT
TAC	ACT	ACC	ACA	GAA	AGC	CTT	ACC	ACT	ACA	GCT	GGG	AGG	TCG
GGG	ACA	GCA	GAA	CAT	GTT	CCA	AGT	TCT	GAG	ATA	CCT	GTC	CCA
GAT	TAT	ACC	TTC	ATT	CAT	ATA	GTA	CAG	TCT	TCA	CAG	GGC	CTC
GTA	CTC	AAT	GCG	ACT	GCC	CTG	CCC	TTG	CCT	GAC	AAA	GAG	TTT
CTC	TCA	TCA	TGT	GGC	TAT	GTG	AGC	ACA	GAC	CAA	CTG	AAC	AAA
ATC	ATG	CCA	TAG	CTT	TTC	TTT	GAT	TTC	CTA	TGA	GCT	ACC	CNN

Gambar 5. Posisi mutasi transisi C/T dan substitusi asam amino pada exon 10 gen GHR

Ket: Pada posisi basa nukleotida 282 bp terjadi perubahan basa C (Cytosin) menjadi T (timin) yang merubah asam amino *Threonin* menjadi *Isoleusine*

Tabel 2. Pendugaan nilai heterosigositas dan PIC Gen *GHR- MBO II*

Gen	H _o	H _e	Se	PIC
<i>GHR</i>	0,261	0,4380	0,0006	0,342051

cukup besar dari generasi ke generasi lainnya yang mungkin disebabkan oleh adanya seleksi, migrasi, mutasi dan *genetic drift* (Noor, 2008). Pernyataan ini didukung oleh Tambasco *et al.*(2003), yang menyatakan bahwa perbedaan yang kontras antara nilai heterozigositas hasil pengamatan dengan heterozigositas harapan merupakan indikator ketidak-seimbangan genotip dalam populasi. Sementara Machado *et al.* (2003) menyatakan bahwa jika nilai heterozigositas pengamatan (H_o = 0,080) lebih rendah dibandingkan nilai heterozigositas harapan (H_e=0.290) dapat menjadi indikasi adanya seleksi yang intensif dan kemungkinan terjadinya perkawinan dalam kelompok/ endogami.

Seleksi yang dilakukan secara tidak langsung telah mendorong terjadinya akumulasi genotip homozigote TT pada gen dalam populasi sapi Bali. Hal ini dapat dijelaskan dimana sampel penelitian ini diambil pada kelompok-kelompok peternakan semi komersial yang intensif.

Berdasarkan klasifikasi PIC, analisis nilai PIC terhadap penciri PCR-RFLP fragmen gen

GHR|MBO II pada sapi Bali yang disajikan pada Tabel 3. menunjukkan polimorfisme gen *GHR*-pada populasi sapi Bali berada pada level sedang dengan nilai PIC0,342051. Berdasarkan nilai PIC tersebut, gen *GHR* memiliki keragaman genetik sedang sebagai penciri genetik pada sapi Bali, fragmen gen *GHR| MBO II* bersifat cukup informatif sebagai gen penciri untuk analisis keterpautan dalam populasi.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan penelitian yang di-lakukan, dapat disimpulkan bahwa fragmen gen *GHR|MBO II* pada sapi Bali bersifat polimorfik dan telah terjadi ketidakseimbangan Hardy-Weinberg. Terjadi mutasi pada populasi sapi Bali dalam penelitian ini yaitu pada posisi 755 bp dan berhasil diidentifikasi pada situs *MBO II* dimana basa C (Cytosin) menjadi T (Timin) dan mengubah asam amino threonine (ACC) menjadi asam amino Isoleucine (AUC). Nilai

Polymorphic Informative Content gen GHR|MBO II pada sapi Bali termasuk kategori sedang sehingga memiliki keragaman genetik sedang dan dapat digunakan sebagai sebagai penciri genetik serta bersifat cukup informatif sebagai gen penciri untuk analisis keterpautan dalam populasi.

Saran

Masih perlu dilakukan penelitian mengenai gen-gen kandidat pengontrol sifat pertumbuhan pada sapi Bali untuk mendapatkan kandidat gen yang dapat dijadikan sebagai penciri sifat tersebut sehingga nantinya dapat digunakan dalam proses seleksi dengan melakukan sequencing terkait gen-gen pengontrol pertumbuhan.

DAFTAR PUSTAKA

- Argetsinger, L. S., and C. Carter-Su. 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiology Review*. 76:1089–1107.
- Beauchemin, V. R., M. G. Thomas, D. E. Franke and G. A. Silver. 2006. Valuation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. *Genetic Molecular Research*. 5: 438-447.
- Carter-Su, C., Anthony P. J. King, Lisa S. Smit, Joyce A. Vander Kuur, Lawrence S. Argetsinger, George S. Campbell, and Weihua Huo. 1997. Molecular Mechanisms of Growth Hormone Action. *Journal Animal Science* 75:1-10.
- Ge, W., M. E. Davis, H. C. Hines and K. M. Irvin. 2000. Rapid Communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. *Journal Animal Science*. 78:2229–2230.
- Hartl, D. L. and A. G. Clark. 1997. *Principle of Population Genetic*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ho, K. K. Y., and D. M. Hoffman. 1993. Aging and growth hormone. *Hormonal Research*, 40:80–86.
- Jiang, H. and M. C. Lucy. 2001. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effect on translation efficiency. *Gene*. 265: 45-53.
- Lawrence, T.L.J., and V.R. Fowler. 2002. *Growth of Farm Animals*. Walling Ford: CABI International. New York. USA.
- Liefers S.C., R.F. Veerkamp, M.F.W. Te Pas, C. Delavaud, Y. Chilliard, M. Platje, and T. Van der Lende. 2005. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. *Animal Genetics*. 36 : 111 - 118.
- Lucy, M. C., G. S. Johnson, H. Shibuya, C. K. Boyd, and W.O.Herring. 1998. Rapid communication: Polymorphic (GT) microsatellite in the bovine somatotropin receptor gene promoter. *Journal Animal Science* 76: 2209-2210.
- Machado M.B.B, M.M.Alencar, A.P.Pereira and H.N.Oliveira. 2003. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genetic Molecular Biology*. 26: 259-265.
- Maskur, Cece Sumantri, Eddie Gurnadi dan Muladno, 2012. Asosiasi Polimorfisma Nukleotida Tunggal Gen Growth Hormone Receptor (GHR) dengan Sifat Produksi pada Sapi Bali. *Jurnal Penelitian Universitas Mataram*. 2 (15).
- Maskur, Rodiah, and C. Arman. 2014. Association of a novel single nucleotide polymorphism in growth hormone receptor gene with production traits in Bali cattle. *Italian Journal of Animal Science* 2014; 13:3461
- Moody, D.E., D. Pomp, W. Barendse, and J.E.Womack. 1995. Assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. *Animal Genetics*. 26: 341-343.

- Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular Evolution and Physiologenetics. Oxford University Press, New York.
- Noor, R. R. 2008. Genetika Ternak. Edisi ke-4. Penebar Swadaya, Jakarta. 34
- Rosenbloom, A. L., R. G. Rosenfeld and J. Guevara-Aguirre. 1997. Growth hormone insensitivity. Pediatric Clinic. North Am. 44:423–442.
- Rotwein, P., A. M. Gronowski, and M. J. Thomas. 1994. Rapid nuclear actions of growth hormone. Hormonal Research. 42:170–175.
- Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. CSH Laboratory Press. USA.
- Soysal M. 2004. Understanding genetic variation regional capacity building training. Workshop on the Corversation and Management of Animal Genetic Resources. Department of Animal Sciences Faculty of Agriculture, Trakya University, TekirdaTurkiye.
- Tambasco DD, Paz CCP, Tambasco-Studart M, Pereira AP, Alencar MM, Freitas AR, Coutinho LL, Packer IU and Regitano LCA .2003. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses Bos taurus X Bos indicus. Journal Animal Breeding Genetic. 120:51-56.
- Weir, B. S. 1996. Genetic Data Analysis II : Method for Discrete Population GeneticData. 2nd edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. USA.35
- Windelspecht, M. 2007. Genetics 101. 1st Ed. Greenwood Press, London.