

Polimorfisme *MspI* pada Locus 2 Gen Hormon Pertumbuhan Sapi PO dan Pengaruhnya terhadap Capaian Berat Badan Harian

MspI polymorphism of bovine growth hormone gene on locus-2 and its effect on daily gain of body weight

SUTARNO^{1,*}, ARIS JUNAI², BAHARUDIN TAPPA³

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126.

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gajah Mada (UGM), Yogyakarta 55281.

³Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16002.

Diterima: 4 Januari 2005. Disetujui: 12 Pebruari 2005.

ABSTRACT

The objectives of the research were to identify growth hormone gene variation of Indonesian native cattle, PO cattle, and to know the effect of the variation on growth rate (daily gain) of the cattle. White blood cells were extracted from the samples of total blood by buffy coat method. DNA was then extracted from white blood cells using Wizard Genomic Purification kit. PCR-RFLP using *MspI* restriction enzyme was employed to detect polymorphic site on locus 2 of GH gen continued with sequencing for some representative genotypes. Phenotypic data of growth rate (daily gain) measured for 90 days, while sex and age were used as supporting phenotypic data. All data were then analysed statistically using Anova model implemented in JMP program from SAS. The result of the analysis indicated that *MspI* polymorphism affect growth rate significantly ($P=0.01$), in which *MspI* (+-) genotype resulted in best growth of PO cattle. Age and sex were also affect growth of the cattle.

© 2005 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: PO cattle, PCR-RFLP, GH gene, growth.

PENDAHULUAN

Pertumbuhan merupakan indikator terpenting dalam produksi daging pada sapi pedaging, sehingga memiliki nilai ekonomi penting dalam budidaya sapi pedaging. Sapi PO/ Peranakan Ongole/ Benggala merupakan salah satu sapi pedaging lokal Indonesia yang memiliki kelebihan berupa kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan Indonesia baik terhadap iklim, ketersediaan makanan alami, ketersediaan air dan juga ketahanan terhadap bakteri maupun parasit yang ada di lingkungan Indonesia. Meskipun sapi jenis ini mampu berkembang biak dengan baik di Indonesia, namun kualitas dan kuantitas produksinya masih kalah dengan sapi impor.

Peningkatan kualitas maupun kuantitas produksi daging bagi sapi lokal Indonesia akan lebih tepat bila dilakukan melalui seleksi yang tidak hanya berdasarkan pada penampakan luar (fenotip), melainkan melalui seleksi langsung pada tingkat DNA yang mengkodekan fenotip yang ingin diperbaiki kualitasnya. Peta DNA pada sapi (*bovine genome map*) yang dibuat berdasarkan marker pada aras DNA menggunakan teknik molekuler seperti RFLP, microsatellite, minisatellite, PCR-RFLP, PCR-SSCP dan RAPD telah memungkinkan untuk mengidentifikasi lokus-lokus gen yang bertanggung jawab terhadap variasi sifat yang memiliki nilai ekonomi penting (*quantitative trait loci*; disingkat QTL). Berdasarkan peta semacam inilah

muncul suatu pendekatan molekuler untuk melakukan pemuliaan hewan guna memperoleh suatu individu unggul. Teknik ini dikenal dengan *Marker Assisted Selection* (MAS), suatu pendekatan langsung untuk memperoleh hewan-hewan yang secara genetik superior. Efisiensi dari MAS dalam peningkatan kualitas hewan produksi tergantung pada beberapa faktor antara lain heritabilitas sifat yang akan ditingkatkan, proporsi varian sifat tambahan (*additive genetic variance*) yang disebabkan oleh marker dan ketepatan teknik seleksi. Namun demikian, Edwards dan Page (1994) serta Lande dan Thompson (1990) menyatakan bahwa peningkatan sifat genetik sampai 50% dapat dipastikan terjadi dengan MAS ini. Peningkatan ini terjadi karena lebih akuratnya teknik seleksi dengan MAS, dan pengurangan waktu seleksi antar generasi karena gen dapat diidentifikasi sejak awal kelahiran atau bahkan semasa masih dalam embryo.

Pertumbuhan sapi dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan faktor genetik. Faktor lingkungan meliputi: pakan, baik hijauan maupun konsentrat, air, iklim dan fasilitas pemeliharaan yang lain. Pengaruh pertumbuhan yang disebabkan faktor lingkungan ini tidak diturunkan kepada anakan. Sedangkan faktor genetik yang dikendalikan oleh gen akan diturunkan kepada keturunannya. Pertumbuhan dikendalikan oleh beberapa gen, baik yang pengaruhnya besar/utama (*major gene*) sampai yang pengaruhnya kecil (*minor gene*). Salah satu gen yang diduga merupakan gen utama dalam mempengaruhi pertumbuhan adalah gen pengkode hormon pertumbuhan yang mempengaruhi sekresi hormon pertumbuhan.

Sampai beberapa tahun yang lalu, seleksi untuk memperoleh bibit unggul umumnya dilakukan hanya berdasarkan penampakan luar (data fenotip). Individu yang

* Alamat korespondensi:

Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-663375
e-mail: ssutarno@mipa.uns.ac.id

memiliki fenotip baik dikawinkan dengan individu lain yang fenotipnya juga baik dengan harapan diperoleh keturunan yang fenotipnya baik. Namun demikian ternyata teknik ini kurang tepat. Keadaan lingkungan yang menguntungkan, misalnya faktor makanan, air dan pemeliharaan dapat menjadikan suatu individu memiliki penampakan luar yang baik, namun faktor ini tidak dapat diturunkan. Dengan demikian, perlu adanya seleksi yang didasarkan pada gen yang bertanggung jawab terhadap munculnya sifat fenotip yang diinginkan.

Hormon pertumbuhan pada sapi (*bovine growth hormone*) mempunyai peran utama pada pertumbuhan, laktasi dan perkembangan kelenjar susu (Cunningham, 1994; Hoj *et al.*, 1993). Gen hormon pertumbuhan sapi (*bovine growth hormone gene*) telah dipetakan terletak pada kromosom 19 dengan lokasi q26-qtr (Hediger *et al.*, 1990). Sekuen gen ini terdiri dari 1793 bp yang terbagi dalam lima ekson dan dipisahkan oleh 4 intron. Intron A, B, C dan D berturut-turut terdiri dari 248 bp, 227 bp, 227 bp dan 274 bp. Variasi gen pengkode hormon pertumbuhan telah dilaporkan pada sapi Eropa, misalnya sapi perah jenis Red Danish (Hoj *et al.*, 1993), sapi pedaging jenis Bavarian Simental (Schlee *et al.*, 1994a), serta sapi pedaging jenis Hereford dan Composite (Sutarno, 1998; Sutarno *et al.*, 1996).

Penelitian yang dilakukan pada sapi jenis Hereford dan Composit di Wokalup Research Station Australia Barat oleh Sutarno *et al.*, (1996) dan Sutarno (1998) menunjukkan bahwa variasi pada lokus gen hormon pertumbuhan secara signifikan berhubungan dengan terjadinya variasi rerata pertumbuhan. Sebelumnya, Schlee *et al.* (1994b) menemukan bahwa perbedaan genotip dari gen hormon pertumbuhan mempengaruhi konsentrasi sirkulasi hormon pertumbuhan dan IGF-I pada sapi Eropa jenis Simental. Rocha *et al.* (1991) juga telah menemukan hubungan signifikan antara allele hormon pertumbuhan dengan berat badan waktu lahir serta lebar punggung saat lahir pada sapi jenis Brahman. Meskipun variasi-variasi ini telah dilaporkan pada beberapa jenis sapi Eropa, sampai saat ini belum ada laporan mengenai terjadinya variasi gen pengkode hormon pertumbuhan pada sapi pedaging lokal Indonesia. Lebih jauh lagi, belum ada laporan mengenai pengaruh variasi gen ini terhadap sifat fenotip pertumbuhan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Sebanyak 114 sapi PO dari kelompok ternak sapi potong Ds Glinggo, Ds Samigaluh dan Ds Ringin, Kec. Kalibawang, Kab. Kulonprogo Yogyakarta dan Ds. Wolo, Kec. Penawangan, Kab. Grobogan digunakan dalam penelitian ini. Sampel darah diambil secara venepuncture, menggunakan venoject. Darah yang diperoleh dimasukkan ke dalam 50ml tabung reaksi berisi heparin yang berfungsi sebagai antikoagulan. Sepuluh mililiter darah ini di ambil dan disimpan pada suhu -70°C untuk referensi dikemudian hari, sedangkan sisanya digunakan langsung dalam penelitian ini untuk diekstrak sel darah putihnya.

Pemisahan sel darah putih dari sampel darah

Sel darah putih diekstrak menggunakan teknik Buffy coat. Total darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, dan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1500 g selama 15-20 menit. Buffy coat yang diperoleh kemudian diambil dengan menggunakan pipet,

dipindahkan ke dalam 20mL tabung sentrifus dan dipenuhi dengan larutan buffer TE1, dan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2000 g selama 10-15 menit. Pellet yang diperoleh kemudian diresuspensikan dalam 1mL bufer TE2, dan kemudian dipindahkan ke dalam tabung penyimpan (Nunc) untuk disimpan pada suhu -80°C sampai saat digunakan untuk proses selanjutnya.

Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi dari sel darah putih dengan menggunakan teknik Wizard Genomic Purification System (Promega, Madison USA).

PCR-RFLP

DNA yang diperoleh langsung digunakan untuk reaksi PCR yang dilakukan dalam mesin PCR (thermocycler Perkin Elmer 2400/ 9700). Reaksi ini digunakan untuk mengamplifikasi 2 gen hormon pertumbuhan. Reaksi dilakukan dalam suatu volume campuran sebanyak 25 μL yang berisi 200 μM dari masing-masing dNTPs, 2mM MgCl₂, 10x bufer dan 1,5 unit Taq DNA polymerase dalam 0.6ml tabung PCR.

Amplifikasi gen hormon pertumbuhan

Lokus 2 gen hormon pertumbuhan (GH-L2), yang terdiri dari 329bp meliputi Exon III dan IV diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer GH5/GH6 (Sutarno, 1998) dengan urutan oligonukleotida sebagai berikut:

GH5: 5'-CCCACGGGCAAGAATGAGGC-3'
GH6: 5'-TGAGGAAGTGCAGGGGCCCA-3'

Kondisi reaksi amplifikasi PCR adalah: satu tahap reaksi denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti dengan 30 siklus amplifikasi yang masing-masing siklus terdiri dari: *denaturasi* pada 94°C selama 45 detik, *annealing* pada 60°C selama 45 detik, dan *extension* pada 72°C selama 1 menit; diikuti dengan satu tahap polymerasi final pada 72°C selama 5 menit.

RFLP analisis

Hasil dari amplifikasi dengan menggunakan reaksi PCR langsung digunakan dalam reaksi digesti dengan menggunakan enzim restriksi. Fragmen dari gen hormon pertumbuhan lokus 2 gen hormon pertumbuhan hasil amplifikasi didigesti dengan menggunakan enzim *MspI* untuk mengidentifikasi situs polimorfisme *MspI*.

Sequensing

Beberapa tahap sebelum proses sekuensing dilakukan di Sub-lab Biologi, Lab Pusat MIPA UNS, kemudian tahap sekuensing dilakukan oleh *Eijkman Institute of Molecular Biology* Jakarta.

Pengambilan data fenotip

Data fenotip utama yang dikoleksi pada penelitian ini adalah berat badan (bobot) awal dan setelah hari ke 90 setelah pengambilan data fenotip pertama, sedangkan data fenotip pendukung adalah jenis kelamin dan umur.

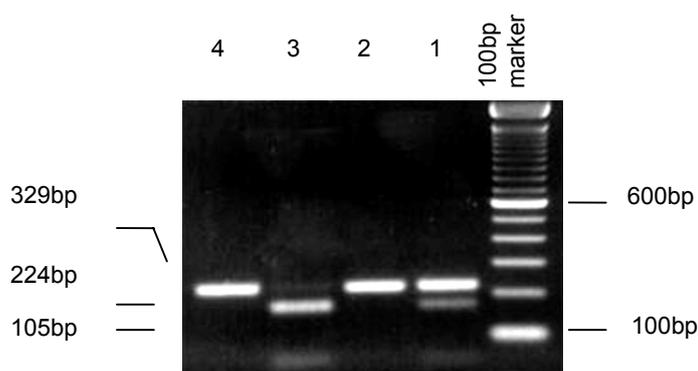
Analisis data

Analisis menyeluruh terhadap data-data genotip, fenotip dan data-data pendukung tersebut dilakukan dengan menggunakan model Anova:

$$Y_{ijklmn} = \mu + B_i + S_j + D_l + Y_m + G_n + e_{ijklmn}$$



Gambar 1. Hasil amplifikasi dengan PCR menggunakan primer GH-5 dan GH-6 untuk mengamplifikasi fragmen 329bp dari lokus II gen hormon pertumbuhan.



Gambar 2. Foto gel hasil elektrolisis terhadap hasil analisis PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *MspI* lokus 2 gen hormone pertumbuhan sapi PO yang diamplifikasi dengan PCR. Kolom 1 = *MspI* (+-), 2 = *MspI* (-), 3 = *MspI* (++) , dan 4 = Uncut.

Pada model tersebut μ adalah nilai rata-rata *least square*, B_i adalah efek dari perkawinan (*breed*), S_j adalah efek dari jenis kelamin (*sex*), D_i adalah efek dari umur, Y_m adalah tahun lahir (*year*), G_n adalah efek dari genotip (*genotype*) and e_{ijklmn} faktor kesalahan (*error*). Model ini diimplementasikan dalam suatu program JMP dari SAS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis PCR - RFLP (*genotype*)

Amplifikasi DNA menggunakan primer GH-5 dan GH-6 menghasilkan fragmen yang sangat spesifik sepanjang 329 bp lokus 2 gen hormon pertumbuhan (Gambar 1). Hasil RFLP menggunakan enzim restriksi *MspI* terdapat 3 genotipe yang diperoleh: *MspI* (++) , *MspI* (+-) dan *MspI* (--) (Gambar 2.).

Lokus-lokus gen hormon pertumbuhan hasil amplifikasi dengan menggunakan polymerase chain reaction kemudian digunakan dalam reaksi digesti menggunakan enzim restriksi (*restriction endonuclease*). Dalam melakukan

reaksi ini semua kondisi inkubasi yang diperlukan disesuaikan dengan petunjuk dari masing-masing producer enzim, dan semuanya diusahakan dalam kondisi yang optimal. Untuk mengetahui penyebab terjadinya polimorfisme ini, maka langkah selanjutnya dilakukan sekuensing, sehingga pasti *genotype* yang dimiliki oleh individu yang bersangkutan. Secara garis besar, *genotype*-*genotype* yang diperoleh dari analisis pola pemotongan oleh enzim restriksi *MspI* terhadap fragmen 329bp tersebut menghasilkan *allele* dan ukuran fragmen seperti ditunjukkan pada Table 1.

Tabel 1. Situs restriksi *MspI* pada fragmen 453 bp lokus 2 (GH L2) gen hormone pertumbuhan.

Enzim	Allele	Jumlah situs restriksi	Ukuran fragmen (bp)
<i>MspI</i>	<i>MspI</i> +	1	224,105
	<i>MspI</i> -	0	329

Variasi genetik di tingkat jenis atau varitas adalah sangat penting, karena pengetahuan tentang variasi genetik ini dalam penerapannya dapat dijadikan dasar dalam melakukan penyilangan. Polymorfisme pada situs restriksi oleh enzim *MspI* pada lokus 2 gen hormon pertumbuhan telah dilaporkan sebelumnya pada sapi penghasil susu (Hoj *et al.*, 1993; Lucy *et al.*, 1993; Schwerin *et al.*, 1995; Soller, 1994), Bavarian Simmental (Schlee *et al.*, 1994a) dan sapi India (Mitra *et al.*, 1995). Sutarno (1998; 2004b) menunjukkan terjadinya polymorfisme pada situs restriksi oleh enzim restriksi *AluI* yang disebabkan oleh adanya substitusi antara Leusin/Valin pada posisi 127 pada sapi Hereford, composit dan benggala. Sedangkan terjadinya polymorfisme *MspI* pada sapi Hereford dan composit disebabkan oleh adanya transisi C menjadi T pada posisi +837 (Sutarno, 1998).

Hasil sequencing

Sequencing terhadap berbagai genotipe (*MspI* (+/+), *MspI* (+/-) dan *MspI* (-/-), baik ke arah forward maupun backward dilakukan di *Eijkman Institute of Molecular Biology* Jakarta (Data lengkap pada Sutarno, 2004a).

Frekuensi gen dan genotip

Frekuensi gen yang dihitung berdasar prinsip keseimbangan Hardy-Weinberg diperoleh angka sebesar 0.74 untuk allele *MspI* (+), dan 0.26 untuk *MspI* (-). Berdasarkan hasil analisis ini menunjukkan bahwa frekuensi allele *MspI* (-) dalam populasi sapi PO sangat rendah (0.26). Penelitian terhadap 8 jenis sapi di Australia barat (Sutarno, 1998) menunjukkan adanya kemiripan dengan hasil penelitian ini, dimana sapi-sapi jenis Fresian, Simental, Charolais memiliki frekuensi allele *MspI* (-) yang rendah berkisar antara 0.1 – 0.2, sedangkan sapi Limousin memiliki frekuensi allele *MspI* (-) yang tinggi yaitu 0.46. Dalam penelitian ini diperoleh genotipe *MspI* (+/-) pada populasi sapi PO sebesar 50%, genotip *MspI* (--) sebesar 7%, sedangkan genotipe *MspI* (++) sebesar 43%. Penyebaran genotip ini ternyata sangat berarti dalam hubungannya dengan tingkat pertumbuhan.

Pengaruh *MspI* terhadap fenotip pertumbuhan

Hasil analisis statistik pengaruh polimorfisme *MspI* pada lokus 2 gen hormon pertumbuhan terhadap pertumbuhan sapi PO disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis statistik (menggunakan 2 model) pengaruh polimorfisme *MspI* pada lokus gen hormon pertumbuhan terhadap pertumbuhan (*daily gain*) sapi jenis PO ($\alpha = 0.05$). * berbeda secara signifikan.

Jenis sapi	Nilai signifikansi	
	Model I	Model II
Benggala	0.01*	0.003*

Dua model berbeda yang digunakan (model I dan II) menunjukkan bahwa *MspI* berpengaruh nyata pada pertumbuhan sapi jenis PO. Penemuan ini sejalan dengan hasil penelitian pada sapi composit dan Hereford (Sutarno, 1998).

Pengaruh umur dan jenis kelamin terhadap pertumbuhan

Hasil analisis statistik pengaruh data pendukung (umur dan jenis kelamin) terhadap *daily gain* sapi PO disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh umur dan jenis kelamin terhadap pertumbuhan (*daily gain*) sapi jenis PO ($\alpha = 0.05$). * berbeda secara signifikan.

Jenis sapi	Nilai signifikansi	
	Model I	Model II
Benggala		
Umur	0.000*	0.000*
Jenis kelamin	0.000*	0.010

Sesuai dengan hasil analisis pengaruh umur dan jenis kelamin terhadap *daily gain* sapi jenis PO ternyata dua variabel ini berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan. Berdasarkan hasil tersebut, untuk tujuan usaha penggemukan misalnya, perlu dipertimbangkan faktor umur serta jenis kelamin untuk mendapatkan hasil yang maksimal.

Uji lanjut genotip, umur dan jenis kelamin

Hasil analisis lanjut pengaruh *MspI* pada pertumbuhan menunjukkan bahwa genotip *MspI* (+/-) merupakan genotipe individu superior dalam pertumbuhan, memberikan nilai DG yang lebih besar dan berbeda secara signifikan ($P = 0.001$) dibandingkan dengan genotip lainnya. Penemuan ini memiliki arti yang sangat penting dalam seleksi sapi PO dalam rangka untuk memperoleh sapi yang unggul dalam produksi daging (pertumbuhan). Dengan penemuan ini dapat digunakan sebagai dasar dalam deteksi awal suatu bibit berdasarkan marken gen, apakah selanjutnya apabila bibit dipelihara dapat memberikan pertumbuhan yang baik atau tidak. Keputusan dini yang dapat diambil akan sangat berarti dalam menekan kerugian biaya pemeliharaan, yang berarti dapat memberikan keuntungan yang berarti bagi pengusaha. Penemuan ini juga dapat dijadikan dasar dalam perbaikan genetic populasi sapi PO, mengingat frekuensi gen *MspI* (-) terhitung sangat rendah dalam populasi sapi tersebut.

Uji lanjut terhadap hasil analisis data pendukung menunjukkan bahwa sapi PO jantan memberikan nilai rata-rata pertumbuhan harian (DG) yang lebih besar dan berbeda secara signifikan ($P = 0.000$) bila dibandingkan dengan sapi betina. Sedangkan untuk umur, diperoleh bahwa pada sapi Benggala yang berumur antara 18-27 bulan memberikan nilai DG yang lebih besar dan berbeda secara signifikan ($P = 0.001$) bila dibandingkan dengan sapi yang sama pada tingkat umur yang lainnya. Berdasarkan hal ini maka genotip bibit, ketepatan umur dan jenis kelamin perlu diperhatikan dalam memilih sapi bakalan untuk usaha penggemukan.

KESIMPULAN

Polimorfisme gen hormon pertumbuhan ditemukan pada sapi PO dengan menggunakan enzim *MspI*. Variasi *MspI* berpengaruh nyata pada pertumbuhan sapi PO yang mana individu bergenotipe *MspI* (+/-) merupakan individu yang unggul dalam pertumbuhan. Umur dan jenis kelamin juga berpengaruh pada pertumbuhan (berat capaian harian) sapi PO.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada Neo Indra Lelana SSi dan Agus Purwoko SSi yang telah membantu dalam pengambilan sampel dan kerja lab, dan pada Menristek RI yang telah mendanai penelitian RUT VIII ini. Publikasi ini merupakan bagian dari hasil penelitian yang didanai proyek RUT VIII.

DAFTAR PUSTAKA

- Cunningham, E.P. 1994. The use of bovine somatotropin in milk production - a review [Review]. *Irish Veterinary Journal* 47: 207-210.
- Edwards, M. D. and N. J. Page. 1994. Evaluation of marker assisted selection through computer simulation. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 376-382.
- Hediger, R., S.E. Johnson, W. Barendse, R.D. Drinkwater, S.S. Moore, and J. Hetzel. 1990. Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization. *Genomics* 8: 171-174.
- Hoj, S., M. Fredholm, N.J. Larsen, and V.H. Nielsen. 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Animal Genetics* 24: 91-96.
- Lande, R. and R. Thompson. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124, 743-756.
- Lucy, M.C., S.D. Hauser, P.J. Eppard, G.G. Krivi, and J.H. Clark. 1993. Variants of somatotropin in cattle - gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domestic Animal Endocrinology* 10: 325-333.
- Mitra, A., P. Schlee, C.R., Balakrishnan, and F. Pirchner. 1995. Polymorphisms at growth-hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *Journal of Animal Breeding and Genetics Zeitschrift fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 112: 71-74.
- Rocha, J.L., J.F. Baker, J.E. Womack, J.O. Sanders, and J.F. Taylor. 1991. Associations between RFLPs and quantitative traits in beef cattle. *Journal of Animal Science* 69 (suppl. 1): 201
- Schlee, P., R. Graml, O. Rottmann, and F. Pirchner. 1994a. Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of simmental bulls. *Journal of Animal Breeding and Genetics Zeitschrift fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 111: 253-256.
- Schlee, P., R. Graml, E. Schallenberger, D. Schams, O. Rottmann, A. Olbrichbludau, and F. Pirchner. 1994b. Growth hormone and insulin like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 497-500.
- Schwerin, M., G. Brockmann, J. Vanselow, and H.M. Seyfert. 1995. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement. *Archiv fur Tierzucht Archives of Animal Breeding* 38: 21-31.
- Soller, M. 1994. Marker assisted selection - an overview. *Animal Biotechnology* 5: 193-207
- Sutarno, A.J. Lymbery, R.C.A. Thompson, and J.M. Cummins. 1996. Associations between growth hormone genotypes and estimated breeding values for pre-weaning growth of beef cattle. *Proceedings of The 13th International Congress on Animal Reproduction*, Sydney June 30 - July 4, P26-19.
- Sutarno. 1998. Candidate gene marker for production traits in beef cattle. *In: Veterinary Biology*. Perth: Murdoch University.
- Sutarno. 2004a. *Seleksi untuk Memperoleh Sapi Pedaging Lokal Indonesia Jenis Benggala yang Unggul dalam Produksi Daging Melalui Teknologi Genetika Molekuler*. [Laporan Penelitian RUT]. Surakarta: Lemlit UNS.
- Sutarno. 2004b. Penyulihan asam amino leucine oleh valin pada posisi 127 gen penyandi hormon pertumbuhan dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan sapi benggala. *Jurnal Veteriner* 5 (1): 26-31.