

**ANALISIS FILOGENI SAPI BALI BERDASARKAN GEN
*SEX DETERMINING REGION-Y (SRY)***

***Phylogenetic Analysis of Bali Cattle Based on Sex-Determining
Region Y (SRY) Gene***

Slamet Diah Volkandari*¹, Endang Tri Margawati¹, dan Indriawati¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Jl. Raya Bogor km 46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat 16911

*Penulis untuk korespondensi: volkandari@gmail.com

ABSTRACT

Bali cattle is one of the indigenous beef cattle from Indonesia that spread almost throughout of Indonesia. Decreasing of performance and abnormal color in Bali cattle can easily now be found. The purpose of this study was to study genetic variation and phylogenetic analysis of Bali cattle from several locations in Indonesia based on paternal origin. Three of Bali cattle blood samples (Bali/1; Riau/1 and Bima West Nusa Tenggara/1) and one (1) hair tail sample of Banteng from Taman Safari Prigen 2 Malang were used in this study. DNA was extracted by High Salt method for blood sample and DNA extraction KIT for hair tail sample. DNA concentration was measured by spectrophotometer. A 325 bp fragment of *Sex-Determining Region Y (SRY)* gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Sequence was analyzed by using BioEdit ver 7.0 software (to see the genetic variation) and MEGA 5.0 (phylogenetic tree construction, *Neighborjoining tree*, bootstraps 1,000x) in Bali cattle. Result showed that phylogenetic tree based on *SRY* gene found that Bali cattle (Bali, Riau and Bima NTB) have 99% similarity sequences with Banteng and *Bison bonasus* (AY079142.3) was at different group. This finding can be used as early information for conservation of Bali cattle in the future.

Keywords: Bali cattle, paternal origin, phylogenetic analysis, *SRY* gene

ABSTRAK

Sapi Bali merupakan salah satu sapi potong asli Indonesia yang telah menyebar hampir diseluruh wilayah Indonesia. Penurunan performans dan penyimpangan warna sapi Bali telah banyak dijumpai. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari variasi genetik dan analisis filogeni sapi Bali dari beberapa lokasi di Indonesia berdasarkan jalur paternal. Sebanyak tiga (3) sampel darah sapi Bali asal Bali (1), Riau (1), Bima NTB (1) dan satu (1) sampel bulu ekor Banteng asal Taman Safari Indonesia 2 Prigen Malang digunakan dalam penelitian ini. Ekstraksi DNA menggunakan metode garam pekat untuk sampel darah sedangkan sampel bulu ekor menggunakan Ekstraksi DNA KIT. Fragmen DNA gen *Sex-Determining Region Y (SRY)* sebesar 325 pb diamplifikasi menggunakan metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dengan suhu *annealing* 60 °C dan 35 siklus. Hasil sekuesing dianalisis menggunakan *software* BioEdit versi 7.0 untuk mengetahui variasi genetik dan MEGA5.0 untuk konstruk pohon filogeni sapi Bali (*Neighborjoining tree*, *bootstraps* 1,000x). Hasil analisis konstruk pohon filogenetik

berdasarkan gen *SRY* menunjukkan bahwa sapi Bali asal Bali, Riau, dan Bima NTB mempunyai kemiripan sekuens sama (99%) dengan Banteng dan berbeda grup dengan *Bison bonasus* (AY079142.3) berdasarkan gen *SRY* (jalur paternal). Hasil studi awal ini dapat digunakan sebagai informasi dalam konservasi Sapi Bali kedepannya.

Kata kunci: analisis filogeni, gen *SRY*, jalur paternal, sapi Bali

PENDAHULUAN

Sapi Bali merupakan sapi asli Indonesia yang telah menyebar hampir di seluruh wilayah Indonesia. Sapi Bali didomestikasikan dari Banteng sekitar 3,500 tahun sebelum masehi (Mohammad *et al.*, 2009). Sapi Bali dikenal sebagai salah satu *gene pool* sapi potong di Asia Tenggara yang berpotensi dalam produksi dan kualitas daging (Margawati *et al.*, 2015). Menurut Handiwirawan dan Subandriyo (2004) sapi Bali mempunyai performa baik dalam reproduksi, produksi daging/karkas dan pemanfaatan pakan kualitas rendah. Produktivitas sapi Bali telah mengalami penurunan terutama ukuran tubuh sapi. Populasi sapi Bali bibit di NTB mempunyai ukuran tubuh lebih kecil pada tahun 2006 (Arman *et al.*, 2006) dibanding tahun 1993 (Dwipa & Sarwono, 1993) dimana dalam waktu 13 tahun (1993-2006) telah terjadi penurunan panjang badan sekitar 8%, tinggi gumba 3%, dan lingkaran dada 3%. Soekardono *et al.* (2009) melaporkan bahwa berat badan dan ukuran tubuh sapi Bali di Lombok lebih kecil dibanding daerah Sumbawa dan NTB.

Secara kualitatif, penyimpangan warna pada sapi Bali telah banyak ditemukan seperti di Kupang NTT (Tabun *et al.*, 2012); di Lombok NTB (Soekardono *et al.*, 2009), Kalimantan Selatan (Lindell, 2013); di Lombok Barat (Sudrana *et al.*, 2014); di Desa Taro, Gianyar (Margawati *et al.*, 2015), di BPTU-HPT Sapi Bali Puluhan Bali (Margawati *et al.*, 2016). Habibi (2006), melaporkan bahwa penyimpangan warna sapi Bali di pemotongan Hewan Denpasar ditemukan sebesar 18.3%. Penurunan dan penyimpangan warna pada sapi Bali tersebut diduga dikarenakan adanya *inbreeding* pada populasi sapi Bali yang ada (Lindell, 2013). Tekanan demografi berkontribusi terhadap turunnya performans pada sapi (Sharma *et al.*, 2015). Studi keragaman secara molekuler dapat mengetahui variasi genetik yang penting dalam kegiatan *breeding* dan konservasi (Barcaccia *et al.*, 2013).

Gen *Sex Determining Region-Y (SRY)* dikenal sebagai salah satu gen yang digunakan dalam analisis keragaman genetik berdasarkan jalur paternal (Syed-Shabthar *et al.*, 2013). Gen *SRY* berlokasi di kromosom Y dan bertanggungjawab terhadap penentuan jenis kelamin pada hewan (Sinclair *et al.*, 1990). Penelitian keragaman genetik dengan gen *SRY* telah dilakukan di beberapa komoditas yaitu sapi ((Verkaar *et al.*, 2003; Mohamad *et al.*, 2009; Syed-Shabthar *et al.*, 2013), dan kambing (Rout *et al.*, 2012).

Sampai saat ini, penelitian gen *SRY* pada sapi Bali telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Mohamad *et al.* (2009) menggunakan sampel sapi Bali asal Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Bengkulu, Kendari Sulawesi, dan Denpasar Bali sedangkan Winaya *et al.* (2011) menggunakan sampel asal Bali dan BBIB Singosari. Sehingga untuk melengkapi informasi genetik sapi Bali maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari variasi genetik dan filogeni gen *SRY*

sapi Bali dari beberapa lokasi di Indonesia (Riau, Bali dan Bima NTB) berdasarkan jalur paternal.

BAHAN DAN METODE

Sampel

Sebanyak tiga (3) sampel sapi Bali jantan yang berasal dari pulau Bali, Riau, dan Bima NTB serta satu (1) sampel Banteng jantan asal TSI 2 Prigen Malang Jawa Timur digunakan dalam penelitian ini. Sampel darah diambil sebanyak 10 mililiter melalui *vena caudalis* dan disimpan dalam vacuntainer yang mengandung K₃EDTA (antikoagulan). Khusus untuk sampel Banteng, sampel diambil dari folikel rambut ekor sebanyak 20 helai dan disimpan dalam amplop yang telah diberi label.

Ekstraksi dan Kuantifikasi DNA

Ekstraksi sampel darah menggunakan metode garam pekat (*high salt methods*) menurut Montgomery dan Sise (1990) sedangkan untuk sampel folikel rambut, ekstraksi DNA menggunakan KIT Isolasi DNA (gSYNC™ DNA Extraction Kit) (Geneaid). Konsentrasi DNA dan kemurnian setiap sampel diukur menggunakan Spektrofotometer (Gene Quant Pro, Amsterdam). Sampel DNA dipersiapkan pada konsentrasi 50 ng/μL.

Amplifikasi Gen *SRY* dan Sekuensing

Amplifikasi gen *SRY* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan sepasang primer (F: 5'-TGGGATACGAGTGGAAAAGG-3' dan R: 5'-TTTGTCCAG CTGCTGTGATG-3'). Total volume PCR sebesar 20 μL yang terdiri dari 10 μL PCR Master Mix (Green Taq, ThermoScientific), 2 μL primer (10 pmol/μL) untuk *Forward* dan *Reverse*, 4 μL *Destilated Water* (DDW) dan 2 μL DNA *template* (50ng/μL). Mesin *thermal cycler Gradient* (Eppendorf, Germany) digunakan dalam amplifikasi gen *SRY* dengan program pre-denaturasi 95 °C selama 5 menit, denaturasi 92 °C selama 1 menit, annealing 60 °C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 1 menit dan final ekstensi 72 °C selama 7 menit dengan 35 siklus (Hartatik *et al.*, 2014). Produk PCR divisualisasi dengan gel agarose 2% dan diwarnai menggunakan *Ethidium bromide* (EtBr). Fragmen DNA dicek menggunakan UV Transilluminator (MajorScience, California USA). Sebanyak 30 μL produk PCR gen *SRY* dikirim ke 1st BASE (Malaysia) untuk dilakukan sekuensing.

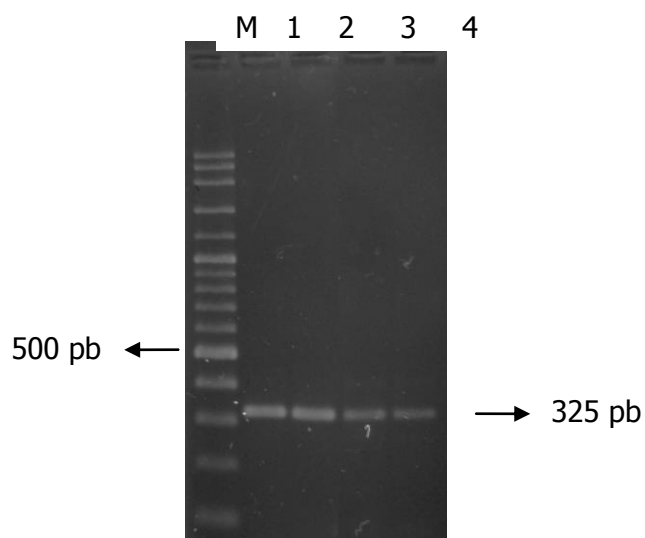
Analisis Sekuens dan Konstruksi Pohon Filogeni

Hasil sekuensing di-*alignment* menggunakan *software* BioEdit versi 7.0 (Hall, 1999) sedangkan pohon filogeni dikonstruksi menggunakan *software* MEGA 5.0 (Neighbourjoining, *bootstraps* 1000x) (Tamura *et al.*, 2011). Sekuens *Bison bonasus* (AY079142.3) sebagai sekuens pembanding. Kesamaan sekuens (*Sequence similarity*) dianalisis menggunakan BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman dan hubungan genetik pada sapi penting sebagai sumber informasi dasar dalam program *breeding* sapi. Secara molekuler, marker

mitokondria DNA dan Y-Chromosome sering digunakan dalam analisis. Penelitian Gou *et al.* (2010), menggunakan gen *SRY* dalam menentukan asal (origin) dan keragaman genetik Gayal Yunan dan beberapa bangsa sapi Yunan (Diqing, Nujiang dan Wenshan). Gen *Sex-Determining Region Y (SRY)* merupakan salah satu gen dari Y-Chromosome. Produk PCR gen *SRY* sapi Bali dan Banteng sebesar 325 pb telah berhasil teramplifikasi (Gambar 1) dan sesuai dengan prediksi ukuran fragmen berdasarkan GenBank EU294189.1 (*Bos taurus*) (Gambar 2).



Gambar 1. Visualisasi produk PCR gen *SRY* pada sapi Bali dan Banteng. M=Marker (100 pb); 1= Sapi Bali asal pulau Bali; 2= Sapi Bali asal Riau; 3= Sapi Bali asal Bima NTB; dan 4= Banteng asal TSI2 Prigen Malang



Gambar 2. Posisi primer gen *SRY*(325 pb) berdasarkan GenBank EU294189.1 (*Bos taurus*)

Runtutan sekuens gen *SRY* sapi Bali dari tiga lokasi dan Banteng dibanding dengan *Bison bonasus* dapat dilihat pada Gambar 3. Terdapat enam (6) lokasi basa yang berbeda. Perbedaan sekuens basa antara sapi Bali dan Banteng diperoleh pada lokasi 252-253 dimana sekuens basa GC hanya terdapat pada sampel Banteng dan AC pada ketiga sampel sapi Bali. Perbedaan basa tersebut diperkuat dengan hasil analisis filogeni gen *SRY* (*Neighborjoining*, 1.000x *bostraps*). Hasil analisis menunjukkan bahwa sapi Bali asal Riau, Bali dan Bima NTB berada dalam satu grup besar dengan Banteng namun berbeda grup dengan *Bison bobanus* (AY079142.3) (Gambar 4). Hasil tersebut juga didukung oleh hasil analisis *similarity sequens* (Tabel 1).

	10	20	30	40	50
Banteng	AGACTACTAG	CCATACACCG	AGACAAACAC	CCGGGCTATA	AATATCGACC
BIMA NTB	AGACTACTAG	CCATACACCG	AGACAAACAC	CCGGGCTATA	AATATCGACC
Riau	AGACTACTAG	CCATACACCG	AGACAAACAC	CCGGGCTATA	AATATCGACC
Bali	AGACTACTAG	CCATACACCG	AGACAAACAC	CCGGGCTATA	AATATCGACC
Bison bonasus	AGACTACTAG	CCATACACCG	AGACAAATAC	CCGGGCTATA	AATATCGACC

	60	70	80	90	100
Banteng	TCGTCCGAGA	GCCAAGAGGC	CACAGAAATC	GCTTCCTGCA	GACTCTTCAA
BIMA NTB	TCGTCCGAGA	GCCAAGAGGC	CACAGAAATC	GCTTCCTGCA	GACTCTTCAA
Riau	TCGTCCGAGA	GCCAAGAGGC	CACAGAAATC	GCTTCCTGCA	GACTCTTCAA
Bali	TCGTCCGAGA	GCCAAGAGGC	CACAGAAATC	GCTTCCTGCA	GACTCTTCAA
Bison bonasus	TCGTCCGAGA	GCCAAGAGGC	CACAGAAATC	GCTTCCTGCA	GACTCTTCAA

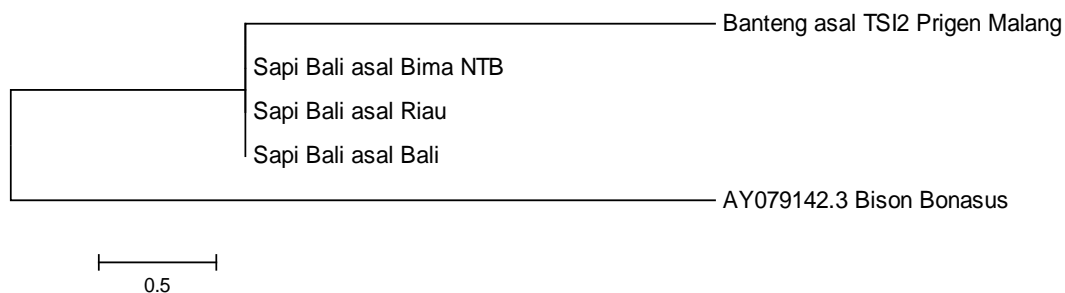
	110	120	130	140	150
Banteng	TACTATGCAA	CCCGATGCAT	GTAGAGACAT	TGCACCCCTT	CACATACAGG
BIMA NTB	TACTATGCAA	CCCGATGCAT	GTAGAGACAT	TGCACCCCTT	CACATACAGG
Riau	TACTATGCAA	CCCGATGCAT	GTAGAGACAT	TGCACCCCTT	CACATACAGG
Bali	TACTATGCAA	CCCGATGCAT	GTAGAGACAT	TGCACCCCTT	CACATACAGG
Bison bonasus	TACTATGCAA	CCCGATGCAT	GTAGAGACAT	TGCACCCCTT	CACATACAGG

	160	170	180	190	200
Banteng	GATGGTTGTG	CCAAGACCAC	ATACTCACAA	ATGGAAAGCC	AATTAAGCCG
BIMA NTB	GATGGTTGTG	CCAAGACCAC	ATACTCACAA	ATGGAAAGCC	AATTAAGCCG
Riau	GATGGTTGTG	CCAAGACCAC	ATACTCACAA	ATGGAAAGCC	AATTAAGCCG
Bali	GATGGTTGTG	CCAAGACCAC	ATACTCACAA	ATGGAAAGCC	AATTAAGCCG
Bison bonasus	GATGGTTGTG	CCAAGACCAC	ATACTCACAG	ATGGAAAGCC	AATTAAGCCG

	210	220	230	240	250
Banteng	GTCACAGTCC	GTGATCATAA	CCAATTCACT	CCTGCAAAAAG	GAGCATCACA
BIMA NTB	GTCACAGTCC	GTGATCATAA	CCAATTCACT	CCTGCAAAAAG	GAGCATCACA
Riau	GTCACAGTCC	GTGATCATAA	CCAATTCACT	CCTGCAAAAAG	GAGCATCACA
Bali	GTCACAGTCC	GTGATCATAA	CCAATTCACT	CCTGCAAAAAG	GAGCATCACA
Bison bonasus	GTCACAGTCC	GTGATCATAA	CCAATTCACT	CCTGCAAAAAG	GAGCATCACA

	260				
Banteng	GCGCCTGGAC	AAAA			
BIMA NTB	GCGCCTGGAC	AAAA			
Riau	GCGCCTGGAC	AAAA			
Bali	GCGCCTGGAC	AAAA			
Bison bonasus	GCGCCTGGAC	AAGC			

Gambar 3. Sekuen *alignent* gen *SRY* sapi Bali dengan pembandingan Banteng (264 pb)



Gambar 4. Filogeni sapi Bali berdasarkan gen *SRY* menggunakan Neighborjoining *bootstraps* 1000x

Tabel 1. *Similarity* atau kesamaan sekuens gen *SRY* sapi Bali dengan Banteng sebagai pembandingan

No.	Sampel	Asal	Kesamaan sekuens (%)
1	Sapi Bali	Pulau Bali	99
2	Sapi Bali	Riau	99
3	Sapi Bali	Bima NTB	99
4	<i>Bison bonasus</i>	AY079142.3	98

Hasil analisis pada penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya. Mohamad *et al.* (2009) melaporkan bahwa sapi Bali asal Sumatera Selatan diduga keturunan Banteng jantan berdasarkan *Y-chromosome*. Sedangkan penelitian lainnya, Winaya *et al.* (2011), sapi Bali di BBIB Singosari mempunyai jarak genetik dekat dengan sapi Bali asal Baturiti Bali. Margawati *et al.* (2017) menggunakan marker mitokondrial DNA gen *cytochrome b* (jalur maternal) menginformasikan bahwa sapi Bali dari beberapa lokasi (Riau, Kalimantan Selatan, Puluhan Bali, Nusa Penida Bali, Mataram NTB dan Bima NTB) mempunyai kesamaan sekuens 98-99% dengan Banteng asal TSI2 Prigen Malang.

Informasi keragaman genetik pada sapi Bali guna sebagai informasi dasar dalam proses seleksi, program *breeding*, dan konservasi untuk masa mendatang. Menjaga kemurnian dan keaslian sapi Bali penting sebagai langkah awal mencegah kehilangan sumber genetik asli Indonesia.

KESIMPULAN

Sapi Bali asal Bali, Riau, dan Bima NTB mempunyai kemiripan sekuens sama (99%) dengan Banteng dan berbeda grup dengan *Bison bonasus* (AY079142.3) berdasarkan gen *SRY* (jalur paternal). Hasil studi awal ini dapat digunakan sebagai informasi dalam konservasi Sapi Bali ke depannya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA TEMATIK LIPI 2016. Peneliti mengucapkan terima kasih kepada M. Ridwan dan E.A. Tauhid untuk bantuan dalam pengambilan sampel dan analisis di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Barcaccia, G., M. Felicetti, G. Galla, S. Capornaccio, K. Cappelli, E. Albertini, L. Buttazzoni, C. Pieramati, M. Silvestrelli, A.V. Supplizi. 2013. Molecular analysis of genetic diversity, population structure and inbreeding level of the Italian Lipizzan horse. *Livest. Sci.* 151(2-3):124-133.
- Dwipa, I.B., B.J. Sarwono. 1993. Musim dan bobot badan sapi Bali yang diantarpulaukan dari Pulau Lombok. *Jurnal Penelitian Unram.* 1:1-10.
- Eriksson, A. 2014. Increasing the knowledge of Bali cattle management - The key to maintain genetic variation and improve animal welfare. Bachelor Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. Swedia.
- Gou, X., Y. Wang, S. Yang, W. Deng, H. Mao. 2010. Genetic diversity and origin of Gayal and cattle in Yunnan revealed by mtDNA control region and *SRY* gene sequence variation. *J. Anim. Genet.* 127(2):154-160.
- Habibi, S. 2006. Identifikasi variasi genetik sapi bali di propinsi Bali melalui pendekatan analisis isoenzim. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequences Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Handiwirawan, E., Subandriyo. 2004. Potensi dan keragaman genetik sapi Bali. *Wartazoa.* 14(3):107-115.
- Hartatik, T., T.S.M. Widi, S.D. Volkandari, D. Maharani, Sumadi. 2014. Analysis of DNA polymorphism in *SRY* gene of Madura cattle populations. *Procedia Enviromental Sciences.* 20:365-369.
- Lindell, I.C. 2013. Phenotyping of Bali cattle and interviewing farmers in Indonesia-a minor field study. Bachelor Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Swedia.
- Margawati, E.T., Indriawati, S.D. Volkandari, M. Ridwan. 2015. Identification of pure breed Bali Cattle by using molecular approach. P. 426-431. *In Proceedings of the 6th International Seminar on Tropical Animal Production.* October 20-22, Yogyakarta. Indonesia.
- Margawati, E.T., Indriawati, S.D. Volkandari, M. Ridwan. 2016. Penyusunan arsitektur genetik sapi bali dengan pendekatan kuantitatif dan analisis DNA. Laporan Akhir DIPA TEMATIK 2016. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.
- Margawati, E.T., S.D. Volkandari, Indriawati, M. Ridwan. 2017. Genetic Diversity of Bali cattle from several locations in Indonesia Based on mitochondrial DNA-cytochrome b gene. P. 769-774. *In Proceedings of the 7th International Seminar on Tropical Animal Production.* September 12-14, Yogyakarta. Indonesia.
- Mohammad, K., M. Olsson, H.T.A. van Tol, S. Mikko, B.H. Vlamings, G. Andersson, H. Rodriguez-Martinez, B. Purwantara, R.W. Paling, B. Colenbrander, J.A. Lenstra. 2009. On the origin of Indonesian cattle. *PlosOne.* 4(5):5490.
- Montgomery, G.W., J.A. Sise. 1990. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zeal J. AgrRes.* 33:437-441.

- Rout, P.K., K. Thangraj, A. Mandal, R. Roy. 2012. Genetic variation and populations structure in Jamunapari goats using microsatellites, mitochondrial DNA and Milk protein genes. *The Scientific World Journal*. 1-7.
- Sharma, R., A. Kishore, M. Mukesh, S. Ahlawat, A. Maitra, A.K. Pandey, M.S. Tantia. 2015. Genetic diversity and relationship of Indian cattle inferred from microsatellite and mitochondrial DNA markers. *BMC Genet*. 16:73.
- Sinclair, A.H., P. Berta, M.S. Palmer, J.R. Hawkins, B.L. Griffiths, M.J. Smith, J.W. Foster, A.M. Frischauf, R. Lovell-Badge, P.N. Goodfellow. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to conserved DNA-binding motif. *Nat*. 346:240-244.
- Soekardono, C., Arman, L.M. Kasivcp. 2009. Identifikasi grade sapi Bali betina bibit dan koefisien reproduksi sapi betina di Provinsi Nusa Tenggara Barat. *Buletin Peternakan*. 33(2):74-80.
- Sudrana, I.P., Lestari, R. Jan, T. Rozy, L.M. Kasip. 2014. Pola warna menyimpang pada sapi Bali di kabupaten Lombok Barat. *Jurnal Penelitian UNRAM*. 18(1):54-63.
- Syed-Shabthar, S.M.F., M.K.A. Roali, N.A.A. Mohd-Zin, S.M.N. Romaino, Z.A. Fazly-Ann, M.C. Mahani, O. Abas-Mazni, R. Zainuddin, S. Yaanakop, B.M. Md-Zain. 2013. The molecular phylogenetic signature of Bali cattle revealed by maternal and paternal markers. *Miol.Biol*. 40:5165-5176.
- Tabun, A.C., T. Hartatik, Sumadi. 2012. Studi pola warna bulu terhadap performan sapi bali di peternakan rakyat kecamatan Sulamu Kabupaten Kupang *In Seminar Nasional PERIPI*. Bogor.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol.Biol.Evol*. 28:2731-2739.
- Winaya, A., I.D. Rahayu, M. Amin, Herliantin. 2011. The genetic variation of Bali cattle (*Bos javanicus*) based on sex related Y chromosome gene. *Anim.Prod*. 13(3):150-155.
- Verkaar, E.L.C., H. Vervaecke, C. Roden, L. Romero Mendoza, M.W. Barwegen, T. Susilawati, I.J. Nijman, J.A. Lenstra. 2003. Paternally inherited markers in bovine hybrid populations. *Heredity*. 91:565-569.