



ORYZA

majalah ilmiah universitas mataram



Isi di dalam menjadi tanggung jawab penulis

PENDEKATAN BIOTEKNOLOGI MOLEKULER DALAM KONSERVASI IN-VITRO SUMBERDAYA GENETIK TERNAK

Maskur

Staf Pengajar Fakultas Peternakan Universitas Mataram

ABSTRACT

Conservation of animal genetic resources (AnGR) is important to recovery the lost or decreased genetic variability that leads to reduce fitness of population. If genetic diversity becomes low at many genes of a species, that species becomes increasingly at risk. If new pressures (such as environmental disasters) occur, a population with high genetic diversity has a greater chance of having at least some individuals with a genetic makeup that allows them to survive. Conservation of animal genetic resources includes in-situ and ex-situ programs. The choice of conservation methods and techniques depends on the objectives of the particular conservation effort, the breeding system and behaviour of the species. The use of molecular biotechnology tools will open new vistas in conservation of animal genetic resources. This paper reviews biotechnological approaches that could be harnessed in promoting conservation and sustainable use of bioresources.

Key word : Conservation, genetic resources, fitness, biotechnology, techniques.

PENDAHULUAN

Sumberdaya genetik ternak merupakan bagian dari keragaman hayati yang perlu dilestarikan. Sumberdaya genetik ternak harus dipandang sebagai sebuah asuransi masa depan, yang memiliki potensi penting untuk meningkatkan kehidupan sosial ekonomi pada saat ini atau pada masa yang akan datang. Sumberdaya genetik ternak disamping sebagai komponen dari keragaman hayati yang harus dilestarikan, juga sebagai sumber pangan yang diperlukan untuk memenuhi kebutuhan. Dalam konteks ketahanan pangan, perlu dilakukan upaya meningkatkan produktivitas ternak melalui *breeding* dimana sifat produksi yang terkait dengan nilai ekonomis lebih menonjol sehingga akan mempengaruhi dan mengancam eksistensi dari ternak lokal yang memiliki nilai ekonomis/produktivitas lebih rendah.

Di beberapa negara termasuk di Indonesia, praktek *breeding* dan hibridisasi/persilangan dilakukan dengan mengimpor ternak dengan produktivitas yang lebih tinggi untuk meningkatkan produktivitas ternak lokal. Konsekuensinya

adalah menurunnya keragaman hayati dan mengancam eksistensi sumberdaya genetik ter rak lokal. Berdasarkan hal tersebut, adalah sangat penting untuk menjaga keseimbangan praktek *breeding* dan hibridisasi dengan konservasi sumberdaya genetik ternak. Hibridisasi ternak lokal dengan ternak impor yang memiliki produktivitas lebih tinggi adalah faktor penting yang menyebabkan kepunahan/hilangnya informasi genetik yang ada pada ternak lokal (Oskam *et al.*, 2004). Seleksi dan adanya gen yang masuk dari populasi lain disamping berpengaruh secara ekonomis, juga dapat mengakibatkan hilangnya sifat tertentu pada individu yang mungkin lebih penting dan lebih bermanfaat dimasa yang akan datang. Pentingnya sumberdaya genetik lokal harus disadari oleh semua pihak sehingga konservasi genetik ini harus segera dilaksanakan.

Konservasi genetik adalah sebuah bidang interdisipliner yang bertujuan untuk mengaplikasikan metode-metode genetik untuk konservasi dan pemulihan keragaman hayati. Peneliti yang terlibat dalam konservasi genetik berasal dari berbagai bidang kajian meliputi genetika populasi, ekologi molekuler, biologi molekuler, biologi evolusi, dan sistematika. Keragaman genetik adalah satu dari tiga level mendasar dari keragaman hayati, disamping faktor genetik dan keragaman ekosistem. Konservasi variasi genetik penting untuk kesehatan populasi secara keseluruhan karena penurunan variasi genetik merupakan pertanda peningkatan level *inbreeding* dan penurunan kebugaran populasi. Makalah ini membahas mengenai konsep, teknik bioteknologi molekuler dan subjek dalam genom yang umumnya digunakan dalam melakukan konservasi *in-vitro* sumberdaya genetik ternak.

KERAGAMAN GENETIK DAN ARTI PENTING KERAGAMAN GENETIK

Keragaman genetik adalah jumlah *breed* dalam satu spesies dan sifat hubungan ekologi dalam ekosistem. 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 (Soysal, 2004). Keragaman genetik dapat diestimasi sebagai level rata-rata heterosigositas dalam populasi, jumlah alel per lokus dan persentase lokus polimorfik.

Jika keragaman genetik beberapa gen dalam satu spesies menurun/rendah, maka spesies tersebut sedang dalam masalah dan beresiko. Apabila ada tekanan (seperti kerusakan lingkungan) terjadi, sebuah populasi dengan keragaman genetik yang tinggi memiliki peluang/pilihan yang lebih besar untuk dapat bertahan. Jika keragaman genetik dalam populasi terlalu rendah, tidak ada individu yang memiliki

karakter yang dibutuhkan untuk menghadapi kondisi lingkungan yang baru, maka populasi dapat dengan tiba-tiba mengalami kepunahan.

Keragaman genetik suatu spesies selalu terbuka untuk perubahan. Tidak masalah berapa banyak varian sebuah gen terdapat dalam sebuah populasi saat ini, hanya varian yang dapat bertahan pada generasi selanjutnya yang dapat berkontribusi terhadap keragaman spesies pada masa yang akan datang. Sekali varian gen hilang, maka tidak akan pernah dapat dipulihkan kembali. Beberapa faktor yang berkontribusi terhadap terjadinya kepunahan (Haig, 1998 ; Frankham, 2005), yaitu : 1). *Inbreeding* yang mana dapat mereduksi kebugaran (*fitness*) populasi, 2). Akumulasi mutasi delesi, 3). Penurunan frekuensi heterosigot dalam sebuah populasi (*heterosigositas*), yang mana menurunkan abilitas spesies untuk menyesuaikan diri dan berhadapan dengan perubahan pada lingkungan, 4). Depresi *outbreeding*, 5). Fragmentasi populasi, 6). Ketidak pastian taksonomi, yang dapat mengarah pada reprioritisasi usaha konservasi, 7). *Genetic drift* sebagai proses utama dalam evolusi, disamping seleksi alam, dan 8). Unit manajemen dalam spesies

KONSEP DASAR KONSERVASI IN-VITRO SUMBER DAYA GENETIK

Konservasi sumberdaya genetik ternak memiliki arti sangat penting, yaitu ; untuk pemulihan kehilangan atau penurunan variasi genetik yang kemungkinan dapat mempengaruhi gen-gen spesifik atau informasi genetik yang penting. Strategi konservasi didesain dengan mempertimbangkan berbagai aspek, diantaranya adalah :1) mencegah kehilangan gen atau kombinasi gen yang kemungkinan memiliki kegunaan/manfaat, 2) mengambil keuntungan atau memanfaatkan heterosis, 3) memanfaatkan sumberdaya genetik yang ada sebagai asuransi masa depan, 4) memelihara dan memanfaatkan kearifan budaya lokal, dan 5) memanfaatkan/menggunakan material yang ada dalam berbagai bidang riset (Hiemstra, 2003).

Konservasi sumberdaya genetik ternak meliputi program *In-situ* dan *Ex-situ*. Konservasi *in-situ* sumberdaya genetik dilakukan dengan pemeliharaan ternak dalam rangka perlindungan/pelestarian pada habitat alaminya, sedangkan pada program *ex-situ* meliputi konservasi/pemeliharaan ternak pada habitat/tempat yang berbeda dengan habitat alaminya seperti *breeding farm* atau kebun binatang; dan konservasi *in-vitro*/penyimpanan material (*cryopreservasi*) dari ternak seperti gamet, embrio, sperma, jaringan atau sel dan DNA. Metode konservasi ini tentu akan menjadi lebih efektif dengan pendekatan baru dan kemajuan dalam biologi modern, khususnya dalam genetika molekuler dan bioteknologi (Mariante and Egito, 2002).

Penyimpanan material genetik (cryopreservation) memungkinkan suatu bangsa/breed dapat bertahan. Konservasi *in-vitro* adalah juga penting untuk mempertahankan struktur genetik dalam suatu populasi yang tidak dalam kondisi terancam kepunahan. Tujuan dari konservasi *in-vitro* sumberdaya genetik adalah penyimpanan informasi genetik dalam bentuk DNA atau jaringan beku yang dapat digunakan untuk mengisolasi DNA dan untuk preparasi pustaka genom (library). Material ini nantinya dapat digunakan untuk mengisolasi daerah-daerah tertentu dalam genom untuk berbagai keperluan. Konservasi *in-vitro* merupakan cara yang lebih murah untuk penyimpanan sumberdaya genetik ternak. Ini memungkinkan untuk menganalisis genom pada masa yang akan datang untuk spesies, breed dan individu tertentu (Kompan *et al.*, 2008).

Teknik *cryopreservation* memungkinkan penyimpanan sampel dalam jumlah banyak dalam jangka waktu yang cukup lama pada kontainer berukuran relatif kecil. Perkembangan teknologi yang semakin cepat memungkinkan untuk mengaplikasikan teknik cryopreservasi pada spesies-spesies yang berbeda seperti sapi, domba, unggas dan lain-lain (Dobrinisky, 2002). Peningkatan penting dalam teknik ekstraksi "embryonic stem cell" dan "germinative cell" dan teknik penyimpanannya menggambarkan bahwa teknik ini merupakan agenda penting pada masa yang akan datang. Laporan tentang produksi "germ cells" dari "embryonic stem cell" menunjukkan bahwa teknologi ini dapat digunakan dalam studi tentang konservasi pada masa yang akan datang. Pada masa yang akan datang, penggunaan sperma beku dalam pemulihan keragaman genetik populasi maupun ukuran populasi hanya memerlukan ternak betina dari populasi. Teknik *cryopreservasi* embrio dan sperma memungkinkan kita untuk mengembalikan individu-individu dari bangsa yang sudah hilang/punah (Wakayama, 2005).

Teknik kloning embrio juga dipakai dalam konservasi sumberdaya genetik ternak dengan berbagai tujuan. Perkembangan teknologi akan semakin meningkatkan aplikasi dari teknik ini. Beberapa peneliti cukup sukses dalam kloning menggunakan teknik transfer inti yang merupakan indikasi kemungkinan untuk memulihkan dan mencegah terjadinya kepunahan suatu spesies. Berdasarkan pertimbangan tersebut, beberapa perusahaan dan organisasi yang bergerak dalam bidang bioteknologi sudah membuat konstruksi bank sel dan jaringan (Wakayama, 2005).

TEKNIK GENETIKA MOLEKULER DALAM KONSERVASI IN-VITRO SUMBERDAYA GENETIK

Penelitian mengenai korelasi pilogenetik antara *breed* akan sangat membantu dalam mengidentifikasi prioritas dalam konservasi sumberdaya genetik

ternak (Reist-Martive *et al.*, 2003). Beberapa teknik genetika molekuler yang dapat digunakan untuk menganalisis variasi genetik antara *breed* dan antara individu dalam satu *breed*, yaitu : *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *microsatellite* atau *STR*, *Restricted Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Single Nucleotida Polymorphism* (SNP), *Single Sequence Conformation Polymorphism* (SSCP), *Mitochondrial DNA Sequence* (cytochrom b, cytochrom c oxidase I, ND1, ND3-4, ND5-6 dan D-loop), *ribosomal sub unit proteins* dan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) *loci sequences* (Shivaji *et al.*, 2003). Marker-marker ini dapat dipakai dalam studi mengenai konservasi yang bertujuan untuk mengidentifikasi *breed-breed* penting, jarak genetik, keragaman genetik dalam populasi (Hall, 2004), identifikasi *breed-breed* murni (wild type), perubahan-perubahan genetik individu yang terjadi akibat mutasi maupun persilangan (Maskur *et al.*, 2008).

Perbedaan utama teknik ini adalah pada perbedaan area dalam genom yang dijadikan sebagai target analisis. Informasi spesifik sangat diperlukan dalam menentukan teknik mana yang akan digunakan dan bagian mana dari genom yang akan dianalisis. Sebagai contoh, DNA mitokondria pada ternak memiliki kecepatan substitusi yang tinggi, yang membuatnya berguna untuk mengidentifikasi perbedaan antara individu. Akan tetapi, karena mtDNA berukuran kecil dengan pola pewarisan maternal membuat mtDNA tidak dapat membedakan individu dalam satu garis keturunan maternal. Situs lain dalam genom yang menjadi subjek dengan kecepatan mutasi yang tinggi yang juga sering digunakan adalah mikrosatellite atau *short tandem repeat locii* (Wayne, and Morin, 2004).

MIKROSATELIT (STR) DAN DNA MITOKONDRIA (mDNA) DALAM KONSERVASI IN-VITRO SUMBERDAYA GENETIK

Analisis DNA adalah sebuah alat yang berguna untuk mempelajari sifat genetik dari ternak. Analisis DNA juga dapat digunakan untuk identifikasi struktur keluarga dan populasi, serta menganalisis evolusi yang terjadi dan hubungan pilogenetik antara ternak. Ada 2 tipe utama DNA yang biasanya digunakan dalam konservasi genetik : DNA inti (nDNA) dan DNA mitokondria (mDNA). DNA inti merupakan molekul DNA berantai lurus (linier) dan ditemukan pada inti sel (nukleus) eukariot. Salah satu tipe dari DNA inti yang banyak digunakan untuk mengidentifikasi variasi genetik adalah mikrosatelit DNA. Sedangkan DNA mitokondria merupakan molekul DNA sirkuler dengan ukuran relatif kecil juga banyak digunakan dalam studi pilogenetik antara *breed* dan spesies.

A. Mikrosatelit-Short Tandem Repeat Loci

Mikrosatelit merupakan klas khusus dari *tandem repeat loci* yang terdiri dari suatu motif dengan 1 - 6 pasang basa berulang sampai lebih dari 100 kali. Beberapa *tandem repeat loci* yang sudah dipelajari menunjukkan kecepatan mutasi yang sangat luar biasa, dengan kecepatan minimal sampai 10^{-3} - 10^{-4} lokus/gamet/generasi (Dallas, 1992), sehingga susunan nukleotida pada lokus ini sangat bervariasi, baik yang lokasinya pada gen/berdekatan dengan gen maupun pada daerah lain yang belum teridentifikasi (Anonymous).

Variasi susunan nukleotida yang sangat tinggi dari lokus mikrosatelit ini dapat dibuktikan pada populasi keturunan pertama (F1) dari perkawinan silang antara dua bangsa ternak yang secara genetik berbeda jauh. Adanya kecenderungan bahwa mikrosatelit umumnya adalah *hypervariable*, membuat analisis segregasi dapat dilakukan pada keturunan dalam jumlah yang terbatas. Dengan menggunakan teknologi PCR, *microsatellite typing* dapat dilakukan dengan cara yang sederhana dan dapat diinterpretasikan dengan mudah. Karakteristik yang menarik dari lokus ini dan secara umum tersedia dalam jumlah yang besar pada genom, lokus ini memiliki kegunaan yang sangat potensial dalam analisis sidik jari DNA (Jeffreys and Pena, 1993), rekonstruksi pilogenetik manusia dan mahluk hidup lainnya (Bowcock *et al.*, 1994), dan dalam pembuatan peta fisik dan peta keterpautan gen (Todd *et al.*, 1991).

Pemetaan genom menggunakan alel mikrosatelit telah berhasil mengidentifikasi kromosom yang mengandung gen yang berpengaruh terhadap berbagai sifat kuantitatif dan kualitatif ternak, diantaranya adalah perkembangan tanduk (kromosom 1 ; 18), suatu penyakit pada sapi Brown Swiss (weaver, kromosom 4 ; 19), komposisi susu (lemak, protein dan volume cairan) dan kuantitas (total produksi) pada keturunan Holstein (kromosom 1, 6, 9, 10, 20, 21; 17, 40) (Campuzano *et al.*, 1996).

Dengan menggunakan teknologi PCR, marker mikrosatelit dapat digunakan untuk mengidentifikasi ternak atau embrio yang membawa alel untuk penyakit seperti *bovine leukocyte adhesion deficiency* (BLAD; 43) dan *bovine citrullinemia* (arginosuccinate synthetase deficiency; 11) pada sapi perah Holstein (Bishop *et al.*, 1995). Sexing embrio juga mengacu pada teknologi PCR yaitu memungkinkan untuk mengidentifikasi embrio jantan secara *in vitro* dari sel tunggal embrio (Thibier and Nibart, 1995).

B. DNA Mitokondria (mtDNA)

DNA mitokondria merupakan molekul DNA sirkuler yang terdapat dalam mitokondria sel eukariota. Ukuran DNA ini relatif kecil, yaitu sekitar 16 ribu

pasang basa dibandingkan dengan DNA inti sekitar 3 juta pasang basa pada inti sel manusia. Peta fisik dari DNA mitokondria dibagi dalam beberapa segmen, yaitu : Complex I genes (NADHdehydrogenase) ; Complex IV genes (cytochrome c oxidase) ; Complex III genes (ubiquinol : cytochrome c oxidoreductase) ; Complex V genes (ATP synthase) ; Ribosomal RNA genes dan Transfer RNA genes.

DNA mitokondria merupakan alat yang efisien untuk melakukan analisis genetika populasi karena memiliki karakteristik yang unik yaitu memiliki pola pewarisan maternal, perubahan evolusi dengan kecepatan yang tinggi, pewarisan tanpa rekombinasi, dan pewarisan haploid (Awise, 1994). Hutchison *et al.*, 1974. adalah yang pertama kali mendemonstrasikan pola pewarisan maternal mDNA pada mamalia. Mereka menganalisis transmisi mDNA dari tetua kepada keturunannya pada suatu persilangan resiprokal kuda dan keledai.

Displacement loop (D-loop)

Wilayah bukan pengkode pada mitokondria (displacement loop/D-loop) merupakan segmen DNA dengan evolusi yang sangat cepat dalam genom mitokondria (Saccone *et al.*, 1993). Walaupun domain utama dari D-loop menunjukkan kesamaan nukleotida yang cukup tinggi antara spesies yang berbeda dan menunjukkan indeks perbedaan yang sama dengan yang ditemukan pada gen mitokondria yang mengkode protein, wilayah disekeliling yang mengapit domain utama menunjukkan level kecepatan evolusi yang tinggi yang menghasilkan ukuran dan komposisi basa yang heterogen (Sbisà *et al.*, 1997).

Sbisà *et al.*, 1997 melaporkan bahwa D-loop memegang peranan penting dalam proses replikasi dan transkripsi DNA mitokondria ternak. Elemen yang mengontrol proses replikasi dan transkripsi pada genome mitokondria sapi sudah dipetakan pada daerah *D-loop* menggunakan teknik PCR dan RFLP. Ujung 5' pada struktur *D-loop* adalah heterogen pada sapi dan dipetakan pada dua posisi yang berbeda, dan frekuensi titik *Ori-r* pada kedua posisi sangat tergantung pada status pertumbuhan sel.

Heterogenitas mtDNA

Heterogenitas mtDNA disebabkan oleh kecepatan substitusi nukleotida mtDNA. Kecepatan substitusi basa pada mtDNA adalah lebih cepat dibandingkan dengan gen pengkode pada DNA inti. Data pada domba dan kambing menunjukkan bahwa kecepatan substitusi nukleotida pada DNA mitokondria adalah sekitar 10^8 per tahun dan sekitar 5 – 10 kali lebih cepat daripada gen inti, sedangkan pada babi adalah sekitar 2×10^8 per tahun (Sbisà *et al.*, 1997).

Johnson *et al.*, (2003) melakukan identifikasi heterogenitas mtDNA menggunakan teknik *PCR amplification* dan *Mitochondrial DNA Sequence* pada beberapa populasi ayam dan menunjukkan adanya heterogenitas antara populasi dan antara individu dalam satu populasi. Pada 160 ekor ayam ditemukan 40 variasi nukleotida diantara individu, 38 situs substitusi transisi dan dua situs merupakan delesi nukleotida tunggal. Dengan menggunakan teknik yang sama, Feulner *et al.*, (2004) melaporkan 36 variasi genetik pada 120 ekor *Carpathian red deer*, yang terdiri dari 31 substitusi transisi, 2 situs transversasi dan 3 delesi.

Selain untuk mengidentifikasi variasi antara individu dalam satu populasi maupun antara populasi, mtDNA juga digunakan untuk mempelajari homologi hubungan antara spesies, *breed* maupun individu. Kuhn *et al.*, (2005) melaporkan hubungan yang sangat dekat antara *Bos Ziegelberg* (Freising, Germany) yaitu sapi dari zaman Neolithic (7000 tahun yang lalu) dengan *breed-breed* modern seperti *Bos taurus*, *B. indicus*, *Banteng* (*B. javanicus*), *Gaur* (*B. gaurus*), *bison eropa* (*Bison bonasus*) dan *B. primigenius*.

KESIMPULAN

Keragaman genetik dalam populasi memiliki arti yang sangat penting dalam konservasi, hal ini menyangkut daya tahan suatu populasi dalam menghadapi tekanan atau perubahan lingkungan. Konservasi genetik disamping untuk mencegah terjadinya kepunahan adalah dalam rangka mempertahankan keragaman genetik suatu populasi. Secara biologis peningkatan keragaman genetik akan membantu pemulihan suatu ekosistem.

Konservasi *in-vitro* sumberdaya genetik adalah penyimpanan informasi genetik dalam bentuk DNA atau jaringan beku yang dapat digunakan untuk mengisolasi DNA dan untuk preparasi pustaka genom (library). Material ini nantinya dapat digunakan untuk mengisolasi daerah-daerah tertentu dalam genom untuk berbagai keperluan. Konservasi *in-vitro* ini memungkinkan untuk menganalisis genom pada masa yang akan datang untuk spesies, *breed* dan individu tertentu.

Teknologi baru dalam bioteknologi molekuler memiliki banyak implikasi terhadap masa depan konservasi genetik. Pada level molekuler, teknologi baru seperti penggunaan mikrosatelit dan mitokondria adalah yang terdepan dalam konservasi genetik. Teknik molekuler ini memiliki efek yang luas mulai dari klarifikasi hubungan taksonomi sampai pada penentuan individu yang terbaik yang akan diintroduksi dalam populasi untuk pemulihan (recovery) dengan menentukan kekerabatan. Konservasi suatu spesies memiliki implikasi ekonomi, sosial dan politis terhadap kehidupan manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aaltonen, L.A., P. Peltomaki, F.S., P.Sistonen, L. Pylkkanen, (1993).* Clues the Pathogenesis of Familial Colorectal Cancer. *Science* 260, 812-816.
- Avise JC (1994)* Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, London, pp 551.
- Bishop, M.D., Hawkins, G.A., & Keefer, C.L., 1995.* Use of DNA Markers In Animal Selection. *Theriogenologi*, 43 : 61 - 70.
- Bowcock, A.M., A. Ruth-Linarez, J. Tompohrde, E. Minch, Kidd, (1994).* High Resolution of Human Evolutionary Trees With Polymorphic Microsatellites. *Nature*, 368, 455-457.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Montos, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P.I., Di Donato, S., Mandel, J.L., Coccozza, S., Koenig, M. and Pandolfo, M. (1996).* Friedreich's Ataxia : Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion . *Science*, 271 : 1423 – 1427.
- Dallas, J.F., (1992).* Estimation of Microsatellite Mutation Rate in Recombinant Inbreed Strains in Mouse. *Mammal. Genome* 3, 452-456.
- Dobrinisky JR. 2002.* Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*.; 57 : 285-302.
- Feulner, PGD., Bielfeldt, W., Zachos, FE., Bradvarovic, J., Eckert, I., and Hartl, GB., 2004.* Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer). *Heredity* 93, 299–306. Nature Publishing Group.
- Frankham, R., 2005.* Ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. *Heredity* 95.183.
- Hall, S.S.G., 2004.* Livestock biodiversity: genetic resources for the farming of the future. Blackwell Publishing Company.
- Haig, SM. 1998.* Molecular Contributions to Conservation. *Ecology* 79.2 : 413-25
- Hiemstra S.J., 2003.* Guidelines for the constitution of national cryopreservation programmes for farm animals (FAO).
- Jeffreys, A.J., and Pena, S.D.J., (1993).* Brief Introduction to Human DNA Fingerprinting. In Pena, S.D.J., R. Chakraborty, J.T. Epplen, A.J. Jeffreys, (Eds). *DNA Fingerprinting : State of the Science*, Birkhauser Verlag, Basel.
- Johnson, J A., Toepfer, JE. and Dunn, PO., 2003.* Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented

- populations of greater prairie-chickens. *Molecular Ecology* 12, 3335-3347.
Blackwell Publishing Ltd.
- Kompan D., Salehar A., Cividini A., Simiè M., Dovè P., 2008. Ex-situ conservation of animal genetic resources in slovenia. *groblje* 3, si-1230.
- Kuhn, R., Ludt, C., Manhart, H., Peters, J., Neumair, E., & Rottmann, O., 2005. Close genetic relationship of early Neolithic cattle from Ziegelberg (Freising, Germany) with modern breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 122 (Suppl. 1) 36-44. Blackwell Verlag, Berlin
- Mariante Ada S, Egito AA. 2002. Animal genetic resources in Brazil : result of five centuries of natural selection. *Theriogenology*. Jan 1; 57 (1): 223-35.
- Maskur, Muladno, Tappa, B. dan Girindra, A. (2008). Identifikasi Genetik Menggunakan Marker Mikrosatelit Dan Hubungannya Dengan Sifat Kuantitatif Pada Sapi. *J. Media Peternakan, Fakultas Peternakan. IPB*
- Oskam A., Burrell A., Temel T., van Berkum S., Longworth, N. ve Vilchez, I.M. 2004. Turkey in the european union, consequences for agriculture, food, rural areas and structural policy. *Rural Areas and Structural Policy. Final Report. Wageningen University.*
- Reist-Marti S.B., Simianer H., Gibson J., Hanotte O. ve Rege J.E.O. Weitzman's. 2003. Approach and conservartion of breed diversity: an application to African cattle breeds. *Conservation Biology*; 17(5):1299-1311.
- Saccone C, Lanave C, Pesole G and Sbisà E (1993) Peculiar features and evolution of mitochondrial genome in mammals. In: DiMauro S and Wallace DC (eds) *Mitochondrial DNA in human pathology*. Raven Press, New York, NY.
- Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G and Saccone C (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205:125-140.
- Shivaji S, Kholkute SD, Verma SK, Gaur A, Umapathy G, Singh A, Sontakke S, Shailaja K, Reddy A, Monika S, Sivaram V, Jyotsna B, Bala S, Ahmed MS, Bala A, Chandrashekar BV, Gupta S, Prakash S, Singh L. 2003. Conservation of wild animals by assisted reproduction and molecular marker technology. *Indian J Exp Biol*; 41(7):710-723
- Todd, J.A., Hearne, C.M., McAleer, M.A., Love, J.M., Aitman, T.J., Cornell, R.J., (1991). Mouse Microsatellite. In *PCR : A Practical Approach* (Editors : McPherson, M.J., Quirke, P. And Taylor, G.R.) PP : 101 - 105. Oxford University Press.
- Thibier M. and Nibart M. (1995). The Sexing of Bovine Embryos in The Field, in *Theriogenology* 43 : 71 - 80.

Wakayama, S. Kishigami, N. Van Thuan, H. Ohta, T. Hikichi, E. Mizutani, R. Yanagimachi, and T. Wakayama. 2005. From The Cover: Propagation of an infertile hermaphrodite mouse lacking germ cells by using nuclear transfer and embryonic stem cell technology. PNAS ; 102 (1): 29 - 33.

Wayne, R; Morin, P. 2004. Conservation genetics in the new molecular age. The Ecological Society of America. Front Ecol. Environment 2.2:89-97.