

Analisis DNA Mikrosatelit untuk Identifikasi Paternitas pada Beruk (*Macaca nemestrina*) di Penangkaran Pusat Studi Satwa Primata IPB

[MICROSATELLITE DNA ANALYSIS FOR PATERNITY IDENTIFICATION OF PIG TAILED MACAQUES (*Macaca nemestrina*) IN A CAPTIVE BREEDING COLONY AT THE PRIMATE RESEARCH CENTER IPB]

Novita Anggraeni¹, Ellis Dwi Ayuningsih¹, Dyah Perwitasari-Farajallah^{1,2} Joko Pamungkas¹

¹Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat-IPB

²Departemen Biologi, FMIPA IPB

The increase of population number of pigtailed macaque in Bogor Agricultural University captive breeding facility, was the reason to conduct the research of paternity using microsatellite DNA analysis. Paternity data will be used for determination of *Macaca nemestrina* colony management. Based on the paternity analysis results showed that in the Koral A, male (No. 6742) is a breeder for offspring (100%), these male is sub-ordinate in that group. Meanwhile, in the Koral B, male (No. 6180) is an breeder for the siblings in that group (92%) this is dominant male, and another male (No. 6747) is 8% of breeder for the existing siblings. On the other hands the heterozygosity analysis showed that there were ten allele had been detected in locus D1S548, seven alleles in locus D5S820, and six alleles in locus D2S1777 and D3S1768. The amplicon of locus D1S548, D3S1768, D5S820, D12S1777 are 180-232 bp, 150-178, 189-217, 153-174, respectively. The Heterozygosity per locus (h) was 0,5168 for D3S1768, D12S1777 and 0,5934 for D1S548. And the average Heterozygosity per all loci detected was 0.5399.

Key words: microsatellite DNA, paternity, beruk, Macaca nemestrina

Pendahuluan

Beruk (*Macaca nemestrina*) tersebar pada area yang cukup luas, meliputi Indonesia, Malaysia, Thailand serta Cina. Ancaman utama keberadaan beruk adalah penangkapan satwa ini dari habitat alaminya, terutama di Sumatera, untuk diperdagangkan dalam jumlah yang cukup besar. Ancaman lainnya adalah pengurangan habitat yang terus terjadi. Beruk telah kehilangan sekitar 49% dari habitatnya, yang semula seluas 354.115 km² menjadi hanya sekitar 179.140 km², sehingga beruk diklasifikasikan sebagai satwa primata yang rentan dalam daftar IUCN, dan dimasukkan ke dalam Appendix II CITES (Supriatna *et al.* 2000).

Pusat Studi Satwa Primata-Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat-Institut Pertanian Bogor (PSSP LPPM-IPB) memiliki penangkaran eks-situ beruk yang digunakan untuk membiakan. Hewan dikandangkan secara berkelompok dalam kandang kelompok koral masing-masing berukuran 15x8x3 m, dengan rasio jantan dan betina 1 berbanding 9. Kisaran berat

badan jantan (15kg) dan betina (11kg). Seluruh prosedur penggunaan hewan telah memperoleh persetujuan dari Komisi Pengawas Kesejahteraan dan Penggunaan Hewan Penelitian (KPKPH) PSSP LPPM-IPB dengan no. #08-B03-IR. Hewan-hewan ini termasuk dalam kategori *Specific Pathogenic Free* (SPF), yang bebas dari tuberkulosis, *Simian Retrovirus* (SRV), *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV), *Human T-lymphotropic virus* (HTLV) serta *Herpes Simplex Virus* (HSV). Kondisi pengandangan memberi kesempatan hewan bersosialisasi dan melakukan tingkah laku alami. Kandang berada di luar ruangan (outdoor), memiliki area tertutup (1/3 area kandang) untuk melindungi hewan dari hujan, panas serta gangguan cuaca lain.

Pengayaan kandang yang baik memberikan kesempatan kepada individu-individu di kandang koral tersebut dapat berkembangbiak. Kelimpahan populasi pada kedua kandang, berdampak pada keragaman genetik dalam populasi tersebut.

Genetika telah menjadi bagian utama dari penelitian tentang satwa primata. Data genetika

yang berhubungan dengan primata digunakan dalam penelitian biomedis (Vandeberg *et al.* 1997), rekonstruksi hubungan kekerabatan antar spesies primata (Disotell, 1996) dan dalam studi variasi populasi serta struktur genetik (Nozawa *et al.* 1982). Uji paternitas menggunakan penanda genetik, menjadi penting dalam studi perilaku primata dan demografi (Inoue *et al.* 1993). Dalam hal ini, beruk adalah salah satu spesies primata yang telah banyak dipelajari.

Beruk juga sering digunakan sebagai salah satu hewan percobaan dalam penelitian biomedik, seperti halnya monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*). Beruk digunakan sebagai hewan model dalam studi infeksi HIV AIDS (Joag *et al.* 1997), *infant development* (Heath-Lange *et al.* 1999), neurobiologi komparatif (Preuss *et al.* 1998), dan *bone biology* (OTT *et al.* 1997).

Keragaman genetik suatu populasi dapat didekati melalui polimorfisme mikrosatelit (Muladno 2000). Mikrosatelit dikenal juga sebagai *Simple Sequence Repeats* (SSRs) atau *Simple Tandem Repeats* (STRs) merupakan runutan nukleotida pendek sederhana (khususnya di-, tri- dan tetranukleotida) yang terulang secara berurutan dalam genom eukariot (Avisé 1994). Mikrosatelit telah digunakan secara luas sebagai penanda dalam dunia genetika molekuler. Beberapa karakter mikrosatelit, seperti memiliki variabilitas yang tinggi, kemudahan untuk membedakan genotipe melalui ukuran jumlah motif dan mudah didekati melalui teknik PCR, menjadikan mikrosatelit sebagai penanda molekul yang baik untuk mempelajari struktur genetik suatu populasi (Wandia 2003). Selain itu, mikrosatelit dapat digunakan dalam uji paternitas (Smith *et al.* 2000). Mikrosatelit terdapat melimpah dalam genom dan mudah ditemukan, oleh karena itu digunakan dalam pemetaan genom (Weber 1990). Mikrosatelit juga digunakan sebagai penciri genetik (Lehmann *et al.* 1996) atau dapat digunakan sebagai penanda yang ideal untuk mengukur tingkat keragaman populasi karena memiliki jumlah alel yang tinggi, serta ekspresi pola pitanya kodominan sehingga dengan mudah dapat membedakan individu homozigot. Lokus mikrosatelit dengan motif tetranukleotida akan lebih mudah dibedakan jenis alelnya melalui teknik elektroforesis (Valdes *et al.* 1993).

Dalam hubungannya dengan kegunaan mikrosatelit dalam uji paternitas, beberapa

penelitian primata banyak memanfaatkan mikrosatelit untuk berbagai macam tujuan. Kanthaswamy *et al.* (2006) memilih lokus mikrosatelit dengan motif tetranukleotida dalam pembuatan strategi manajemen genetik standar untuk koloni *Macaca mulata* di berbagai Pusat Penelitian Primata di Amerika. Meier *et al.* (2000) melakukan penelitian untuk menentukan paternitas karakteristik genetik dan sosial yang berkorelasi dengan ukuran kelompok simpanse yang dikandangkan. Chambers *et al.* (2004) menggunakan penanda mikrosatelit manusia untuk amplifikasi sampel non-invasif yang berasal dari *Hylobates lar*. Keane *et al.* (1997) melakukan identifikasi variasi genetik dengan menggunakan lokus mikrosatelit untuk tujuan analisis paternitas pada *Macaca sinica* di Polonnaruwa, Srilanka.

Berdasarkan informasi diatas, dianggap perlu meneliti analisis DNA mikrosatelit untuk identifikasi paternitas pada beruk, yang berada pada kandang koloni di fasilitas hewan PSSP-IPB. Hasil dari penelitian ini diharapkan akan membentuk suatu data paternitas yang baik, sehingga berguna dalam penentuan manajemen koloni beruk.

Materi dan Metode

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beruk, yang berada di 2 koral. Koral A terdiri dari 2 jantan dan 20 betina dan koral B terdiri dari 2 jantan dan 12 betina, yang berasal dari Fasilitas Penangkaran PSSP-IPB. Beruk disedasi dengan Ketamin HCl 10-15 mg/kg bobot badan, darah diambil melalui vena femoralis dengan alat suntik \pm 3,5 ml, kemudian disimpan dalam tabung EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid). Darah disentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit dan akan terbentuk tiga lapisan plasma, *buffy coat* (sel darah putih) dan sel darah merah.

Analisis ragam. Sampel yang digunakan untuk analisis keragaman, berasal dari 4 jantan dan 32 betina dari koral A dan B.

Ekstraksi DNA. DNA diekstraksi dari *buffy coat*, dengan mengacu pada metode penelitian yang digunakan oleh Kan *et al.* (1997) dengan beberapa modifikasi. *Buffy coat* yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml, kemudian dicuci dengan NaCl 0,2% dan 1mM EDTA lalu dikocok hingga tercampur merata tanpa ada endapan di

dasar tabung lagi. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit. Pencucian dilanjutkan yaitu dengan memasukkan NaCl 0,9% dan 1mM EDTA ke dalam tabung dan diputar kembali dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit. Sel darah putih yang sudah dicuci, ditambah 300 µl 1x STE (Sodium Tris-EDTA), 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) dan 40 µl 10% SDS (Sodiumdodesilsulfate). Campuran ini dikocok pelan-pelan selama 2 jam pada suhu 55°C. DNA dimurnikan dengan metode fenol-kloroform, yaitu dengan menambahkan 40 µl 5M NaCl, 450 µl kloroform iso amil alkohol (24:1) dan 450 µl fenol (saturasi dengan 1M Tris-HCl, pH 8.0), kemudian diputar perlahan pada suhu 27°C menggunakan rotator selama satu jam. Proses ekstraksi dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. DNA dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 40 µl 5M NaCl dan 800 µl etanol absolut yang berfungsi untuk mengendapkan DNA. Campuran diinkubasi selama semalam minimal tiga jam pada suhu -20°C. Pada endapan yang dihasilkan dilakukan pencucian dengan menambahkan 800 µl 70% etanol, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit, setelah itu etanol dibuang dan diuapkan dengan menggunakan pompa vakum. DNA kemudian dilarutkan dengan 80 µl 80% larutan penyangga TE (10⁻² M Tris, 10⁻³ M EDTA pH 8.0).

Amplifikasi Mikrosatelit. Suhu *annealing* untuk primer D1S548 dan D3S1768 sebesar 50 °C, suhu *annealing* untuk primer D5S820 adalah 55 °C, dan untuk primer D12S1777 sebesar 48 °C. Amplifikasi lokus mikrosatelit menggunakan empat pasang primer manusia dengan motif

tetranukleotida (Tabel 1). Primer ini sudah digunakan pada penelitian sebelumnya pada monyet ekor panjang (Perwitasari-Farajallah *et al.* 2004).

Reaksi PCR dilakukan menurut Sambrook *et al.* (1989) yang telah dimodifikasi yaitu melakukan pencampuran yang merata dengan volume reaksi 25 µl, yang terdiri dari campuran Green Master Mix (Promega) 12,5 µl, pasangan primer 1 µl (pengenceran 1000 Pmol/ µl), air steril 5,5 µl dan 5 µl template DNA. Amplifikasi mikrosatelit DNA dilakukan dengan mesin Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem). Siklus amplifikasi sebanyak 30 siklus; dengan kondisi : denaturasi selama 40 detik pada suhu 94 °C, penempelan primer pada suhu 50-55 °C selama 50 detik, dan pemanjangan pada suhu 71 °C selama 60 detik, kemudian diikuti dengan pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit.

Untuk penentuan alel, hasil amplifikasi dipisahkan secara elektroforesis dengan gel poliakrilamid 15% pada voltase 160 V selama 35 menit. Pita dimunculkan dengan pewarnaan perak dan ukuran alel dihitung dengan menggunakan ukuran standar DNA 100 pb (Promega).

Analisis Paternitas. Sampel yang digunakan untuk analisis, berasal dari Koral A yaitu 2 jantan dan 10 ekor betina (serta anakannya) dan Koral B berasal dari 2 jantan dan 11 ekor betina (serta anakannya). Betina yang lain tidak dianalisis, karena anakan tidak diketahui (sampel tidak ada). Identifikasi paternitas diketahui melalui alel yang diwariskan dari induk kepada anak, yang ditentukan berdasarkan migrasi pita dari setiap lokus.

Tabel 1 Deskripsi lokus mikrosatelit

Lokus	Motif Pengulangan	Urutan (5 ¹ -----3 ¹)
D1S548	Tetra	F = GAACTCATTGGCAAAGGAA R = GCCTCTTTGTTGCAGTGATT
D12S1777	Tetra	F = TCCCAAGTAAAGCATTGAG R = GTATGTAGGTAGGGAGGCAGG
D3S1768	Tetra	F = GGTTGCTGCCAAAGATTAGA R = CACTGTGATTTGCTGTTGGA
D5S820	Tetra	F = ATTGCATGGCAACTCTTCTC R = GTTCTTCAGGGAAACAGAACC

Hasil dan Pembahasan

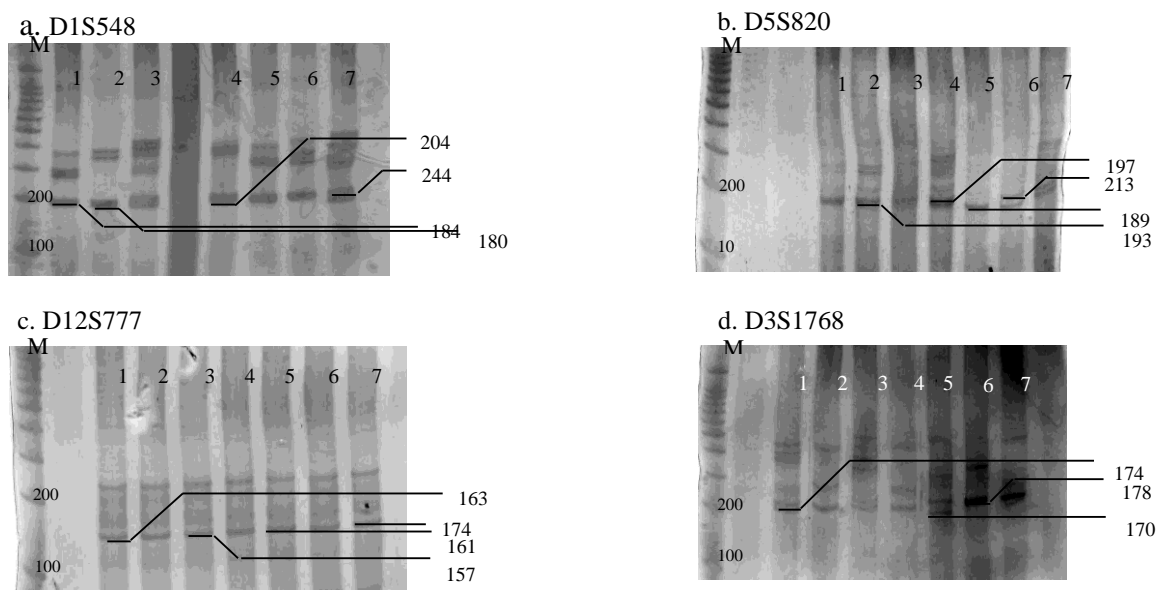
Variasi Mikrosatelit. Jumlah sampel yang berhasil diamplifikasi pada lokus D1S548, D5S820 dan D3S1768 sebanyak masing-masing 19 sampel (90,47%), lokus D12S1777 sebanyak 15 sampel (71,42%). Dua sampel untuk lokus D1S548, D5S820, D3S1768 dan 7 sampel untuk lokus D12S1777 tidak teramplifikasi. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh primer yang tidak menempel pada daerah komplemennya atau juga bisa disebabkan pencampuran bahan PCR yang kurang sempurna. Kondisi suhu penempelan (*annealing*) juga sangat menentukan baik tidaknya proses amplifikasi. Suhu *annealing* yang tepat dapat ditentukan setelah dilakukan proses PCR optimasi (Taylor *et al.* 1998). Pola pita DNA mikrosatelit pada lokus D1S548, D5S820, D12S1777 dan lokus D3S1768 disajikan pada Gambar 1.

Semua lokus bersifat polimorf. Lokus dinyatakan polimorfik jika jumlah alel bersama dalam populasi pada lokus tersebut lebih dari satu, dengan frekuensi alel yang paling umum kurang atau sama dengan 0,95 (Wandia, 2007). Ukuran pita 150- 232 pasangan basa (pb), dengan uraian masing-masing lokus D1S548 180-232, lokus D5S820 189-217, lokus D2S1777 153-174 dan lokus D3S1768 150-178. Jumlah alel pada setiap lokus bervariasi dari enam pada lokus D3S1768 dan D12S1777 hingga sepuluh pada lokus D1S548 (Tabel 2). Keragaman mikrosatelit diduga disebabkan oleh rekombinasi tidak seimbang saat

replikasi DNA yang berakibat pada penarikan dan pengurangan jumlah nukleotida (Moxon *et al.* 1999).

Heterozigositas merupakan ukuran keragaman genetik hewan di dalam populasi yang dihitung berdasarkan frekuensi alel pada setiap lokus. Seluruh lokus polimorfik menunjukkan nilai heterozigositas yang tinggi (Tabel 3). Heterozigositas (*h*) setiap lokus berkisar antara 0,5168 untuk lokus D12S1777 dan D3S1768 hingga 0,5934 untuk lokus D1S548. Rataan Heterozigositas (*H*) dari seluruh lokus adalah 0,5399. Nilai heterozigositas ditentukan oleh jumlah sampel, jumlah dan frekuensi alel (Nei, 1987). Hal ini didukung pula oleh hasil penelitian Prahasta (2001) yang menyebutkan bahwa semakin banyak jumlah alel yang terdeteksi pada suatu lokus semakin besar pula nilai heterozigositas yang didapat. Penelitian variasi genetik monyet ekor panjang Tinjil (Indonesia) oleh Perwitasari-Farajallah *et al.* (2004) menggunakan empat lokus mikrosatelit, menemukan rata-rata heterozigositas 0,5796. Lokus mikrosatelit yang digunakan adalah sama dengan lokus dalam penelitian ini.

Paternitas. Pejantan (No. 6742) yang berasal dari kandang Koral A merupakan tetua bibit bagi anakan di dalam kelompoknya (100%). Pada kandang Koral B pejantan (No. 6180) merupakan tetua bibit bagi anakan dikelompoknya (92%) dan pejantan (No. 6747) menjadi tetua bibit dari 8% anakan yang ada. Perlu diketahui bahwa pejantan (No.6742) merupakan pejantan sub-ordinan (β -



Gambar 1 Pola Pita DNA Mikrosatelit pada *M. nemestrina*: a. D1S548, b. D5S820, c. D12S1777 dan d. D3S1768. M: ukuran standar DNA 100 bp (Promega); no.1 s/d 7 : sample

Tabel 2 Frekuensi alel lokus D1S548, D5S820, D12S777 dan D1S1768 pada beruk

Lokus	Alel	Ukuran (pb)	Frekuensi
D1S548	A	180	0,1842
	B	184	0,1315
	C	188	0,0789
	D	196	0,0010
	E	204	0,1578
	F	212	0,0789
	G	216	0,1052
	H	224	0,0263
	I	228	0,0526
	J	232	0,0010
D5S820	A	189	0,1315
	B	193	0,1315
	C	197	0,1315
	D	201	0,1052
	E	209	0,1578
	F	213	0,0526
	G	217	0,0526
D2S1777	A	153	0,0624
	B	157	0,0827
	C	161	0,0123
	D	165	0,0314
	E	173	0,1523
	F	174	0,1045
D3S1768	A	150	0,0868
	B	158	0,1926
	C	162	0,0403
	D	170	0,1157
	E	174	0,1023
	F	178	0,0245

Tabel 3 Heterozigositas (h) dan rata-rata heterozigositas (H) lokus D1S548, D2S1777, D3S1768 dan D5S820

Lokus	Alel	Ukuran Fragmen (pb)	Nilai Heterozigositas (h)	Rataan Heterozigositas (H)
D1S548	10	180-216	0,5934	0,5390
D2S1777	6	153-174	0,5168	
D3S1768	6	150-178	0,5168	
D5S820	7	189-217	0,5327	

male) di kandang Koral A, sedangkan pejantan dominan (α -male) di kandang tersebut adalah pejantan (No.6265). Besarnya peluang pejantan sub-ordinan ini dalam menghasilkan anakan, bertolak belakang dengan fenomena yang biasa terjadi. Dalam suatu kelompok *Macaca* biasanya pejantan dominan lebih banyak dapat mengawini betina-betina. Pada penelitian ini, pejantan sub-

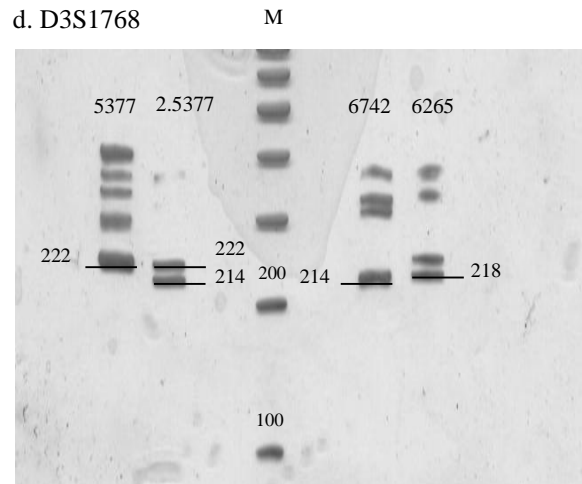
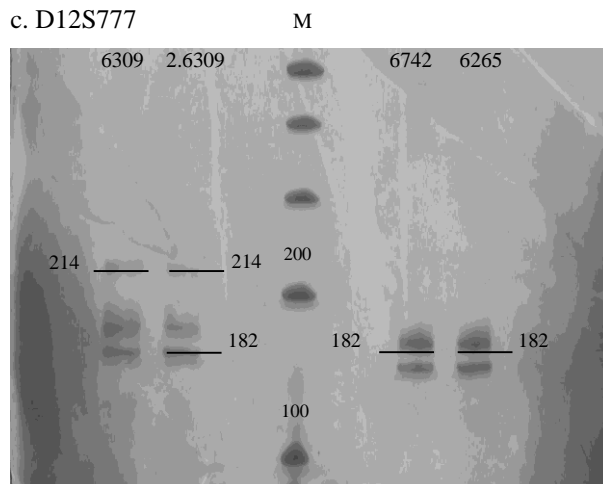
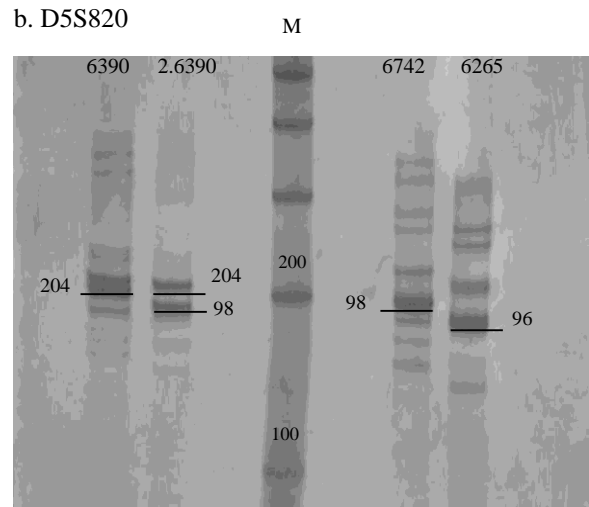
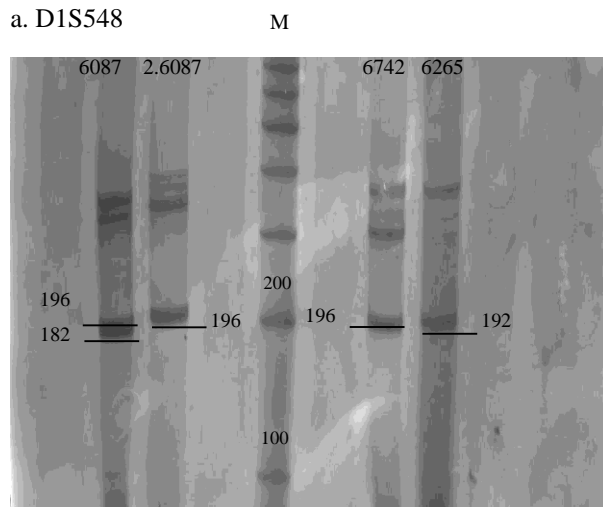
ordinan (No. 6742) lebih banyak menghasilkan anakan, hal ini menunjukkan bahwa pejantan dominan tidak dapat memonopoli paternitas (Watson *et al.* 1992). Pejantan dominan (No.6265) tidak dapat menghasilkan banyak anakan, kemungkinan adalah karena pejantan ini lebih memilih pasangan pada saat akan melakukan tindakan kawin dan biasanya pejantan dominan ini

lebih intensif kawin dengan betina yang dominan (α -male). Untuk dapat membuktikan pendugaan tersebut, masih diperlukan observasi secara khusus untuk dapat melihat frekuensi tingkah laku kawin pada kedua jantan di kandang Koral A tersebut. Pada Koral B ditemukan jantan (No. 6180) merupakan tetua dari sebagian besar anakan yang berada dikelompoknya. Hal ini karena pejantan No. 6180 merupakan pejantan yang dominan di kandang Koral B. Hierarki dan ukuran bobot badan serta makanan yang diberikan (jenisnya sama) pada beruk di kedua kandang koral tersebut, tidak selalu bisa menjadi patokan keberhasilan seekor jantan dominan untuk bisa menghasilkan banyak anakan di kelompoknya. Ada faktor lain yang perlu diperhatikan, yaitu adanya tingkah laku pemilihan jantan terhadap betina sebagai pasangan kawin didalam kelompoknya. Urutan alel yang diwariskan dari setiap tetua kepada anak berdasarkan migrasi pita dari setiap lokus (Gambar

2).

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa di kandang Koral A pejantan (no. 6742) merupakan tetua bibit bagi anakan, pejantan ini merupakan jantan subordinan dikelompoknya. Kandang Koral B pejantan (No. 6180) merupakan tetua bibit bagi anakan dikelompoknya (92%), pejantan ini merupakan jantan dominan di kelompoknya dan pejantan No. 6747 menjadi tetua bibit dari 8% anakan yang ada. Terdapat 29 alel yang terdeteksi pada keempat lokus tersebut. Sepuluh alel pada D1S548. Tujuh alel pada D5S820. Enam alel pada D2S1777 dan D3S1768. Lokus D3S1768 ukuran pita 150-178 bp, lokus D12S1777 153-174 bp, lokus D1S548 180-232, dan lokus D5S820 189-



Gambar 2 Pola pita yang diturunkan oleh induk kepada anak. A. lokus D1S548, b. lokus D5S820, c. lokus D12S777, d. lokus D3S1768; M: ukuran standar DNA 100 pb.

217. Heterozigositas (h) setiap lokus berkisar antara 0,5168 untuk lokus D12S1777 dan D3S1768 hingga 0,5934 untuk lokus D1S548. Rataan Heterozigositas dari seluruh lokus adalah 0,5399.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih diucapkan sebesar-besarnya kepada: 1) drh. Yasmina Paramastri, DACLAM dan staf Laboratorium Hewan Penelitian PSSP LPPM-IPB dalam dukungan manajemen fasilitas dan pengembangan data individu, 2) Prof. Dr. Ir. Sri Suprptini Mansjoer, Dr. drh. Diah Iskandriati dan Dr. drs. Bambang Soeryobroto atas bimbingannya, 3) Keni Sultan, S.Pt, M.Si dalam sumbang saran penyempurnaan penulisan makalah ini, dan 4) Pimpinan SSP LPM-IPB yang telah membantu dalam bentuk dana internal untuk membiayai penelitian.

Daftar Pustaka

- Avise JC.** *Molecular Markers, Natural History, and Evolution.* 1994. Chapman and Hall Inc. New York
- Chambers EK, Reichard UH, Möller A, Nowak K, Vigilant L.** 2004. Cross-Species Amplification of Human Microsatellite using Noninvasive Samples from White- Handed Gibbons (*Hylobates lar*). *American Journal of Primatology.* 64:19-27
- Disotell TD.** 1996. The Phylogeny of the Old World Monkeys. *Evol. Anthropology.* 5: 18-24
- Heath-Lange S, Ha JC, Sackett GP.** 1999. Behavioral measurement of temperament in male nursery-raised infant macaques and baboons. *American Journal of Primatology.* 47:43-50
- Inoue M, Takenaka O.** 1993. Japanese macaque microsatellite PCR primers for paternity testing. *Primates.* 34:37-45
- Joag SV, Adany I, Li Z, Foresman L, Pinson DM, Wang C, Stephens EB, Raghavan R, Narayan O.** 1997. Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ cells, and AIDS. *J. Virology.* 71:4016-4023
- Kan YW, Dozy AM, Trecartin R, Todd D.** 1977. Identification of a nondeletion defect in β -Thalassemia. *N Engl J. Med.* 297:1081-1084
- Kanthaswamy S et al.** 2006. Microsatellite markers for standardized genetic management of captive colonies of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology.* 68:73-95
- Keane B, Dittus WPJ, Melnick DJ.** 1997. Assessment in Wild Groups of Toque Macaques *Macaca Sinica* at Polonnaruwa Srilanka using Molecular Markers. *Molecular Ecology.* 6:267 – 282
- Lehmann T, Hawley WA, Collins FH.** 1996. An evaluation of evolutionary constraints of microsatellite loci using nul alleles. *Genetics.* 144:1155-1163
- Meier C, Charlotte K, Hemelrijk, Martin RD.** 2000. Paternity Determination, Genetic Characterization, and Social Correlates in a Captive group of Chimpanzees (*Pan Troglodytes*). *Primates.* 41(2):175-183
- Moxon ER, Wills C.** 1999. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? *Scientific American.*: 72-77
- Muladno.** 2000. Polimorfisme dan analisis keterpautan mikrosatelit pada genom babi. *Hayati.* 7(1):11-15
- Nei M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, New York
- Nozawa K, Shotake T, Kawamoto Y, Tanabe Y.** 1982. Population genetics of Japanese monkeys: II. Blood protein polymorphisms and population structure. *Primates.* 23:252-271
- Perwitasari-Farajallah D, Farajallah A, Kyes RC, Sajuthi D, Iskandriati D, Iskandar E.** 2004. Genetic variability in the population of long-tailed macaques introduced into Tinjil Island, Indonesia: Microsatellite loci variations. *Hayati.* 11(1):21-24
- Prahasta P.** 2001. Derajat Heterozigositas DNA Mikrosatelit pada Populasi Sapi Fries Holland (FH). Skripsi. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor

- Preuss TM, Stepniewska I, Jain N, Kaas JH.** 1997. Multiple divisions of macaque precentral motor cortex identified with neurofilament antibody SMI-32. *Brain Res.* 767:148-153
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Smith DG, Kanthasmawly S, Viary J, Cody L.** 2000. Additional highly polymorphic microsatellite (STR) loci for estimating kinship in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology.* 50:1-7
- Supriatna J, Wahyono EH.** 2000. *Panduan Lapangan Primata Indonesia.* Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Taylor AC, Cooper DW.** 1998. A set of tammar wallaby (*Macropus eugenii*) microsatellites tested for genetic linkage. *Molecular Ecology.* 7:925-931
- Valdes AM, Slatkin M and Freimer NB.** 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics.* 133:737-749
- Vandenberg JL, Williams-Blangero S.** 1997. Advantages and limitations of nonhuman primates as animal models in genetic research on complex disease. *J. Med. Primatol.* 26:113-119
- Wandia IN.** 2003. Mikrosatelit sebagai Penanda molekul untuk mengukur polimorfisme genetik monyet ekor panjang di Sangeh, Bali. *J. Vet. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.* 4(3):93-100
- Wandia IN, Mansjoer SS, Suryobroto B.** 2004. Polimorfisme genetik monyet ekor panjang di daerah pariwisata Uluwatu, Bali. *J. Vet.* 5(2):67-76
- Wandia IN.** 2007. Struktur dan keragaman genetik populasi lokal monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) di Jawa Timur, Bali dan Lombok. Desertasi. Program Studi Primatologi. IPB. Bogor
- Watson DM, Croft DB, Crozier RH.** 1992. Paternity exclusion and dominance in captive red-necked wallabies, *Macropus rufogriseus*, Marsupialia, Macropodidae. *Australian Mammology.* 15:31-36
- Weber JL.** 1990. Informativeness of Human (dC-dA)_n. (dG-dT)_n Polymorphisms. *Genomics.* 7:524-530
-