

**IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN *LEPTIN*
PADA DOMBA DORPER**

SKRIPSI

Oleh

ZERLINDA FAIRUZ AZMI



**PROGRAM STUDI S1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2026**

IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN *LEPTIN*
PADA DOMBA DORPER

Oleh

ZERLINDA FAIRUZ AZMI
NIM: 23010122130110

Salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Peternakan pada Program Studi S-1 Peternakan
Faakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

PROGRAM STUDI S1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2026

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zerlinda Fairuz Azmi

NIM : 23010122130110

Program studi : S-1 Peternakan

dengan ini menyatakan sebagai berikut:

1. Skripsi yang berjudul **Identifikasi Keragaman Gen *Leptin* pada Domba Dorper** dan penelitian yang terkait dengan skripsi ini merupakan karya penulis sendiri.
2. Setiap ide atau kutipan dari karya orang lain berupa publikasi atau bentuk lainnya dalam skripsi ini, telah diakui sesuai dengan standar prosedur disiplin ilmu.
3. Penulis juga mengakui bahwa skripsi ini dapat dihasilkan berkat bimbingan dan dukungan penuh dari Pembimbing yaitu: **Bapak Ir. Sutopo, M.Sc. Ph.D.** dan **Ibu Dr. Dela Ayu Lestari, S.Pt., M.Si.**

Apabila di kemudian hari dalam skripsi ini ditemukan hal-hal yang menunjukkan telah dilakukannya kecurangan akademik, maka penulis bersedia gelar sarjana yang telah penulis dapatkan ditarik sesuai dengan ketentuan dari Program Studi S-1 Peternakan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Semarang, Juni 2026

Penulis,



(Zerlinda Fairuz Azmi)

Mengetahui:

Pembimbing Anggota

A handwritten signature in black ink, consisting of a large 'D' followed by a stylized 'L' and 'A', is placed over the name of the member supervisor.

(Dr. Dela Ayu Lestari, S.Pt., M.Si.)

Pembimbing Utama

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, sweeping 'S' followed by 'U' and 'P', is placed over the name of the main supervisor.

(Ir. Sutopo, M.Sc. Ph.D.)

Judul Skripsi : IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN *LEPTIN*
PADA DOMBA DORPER

Nama Mahasiswa : ZERLINDA FAIRUZ AZMI

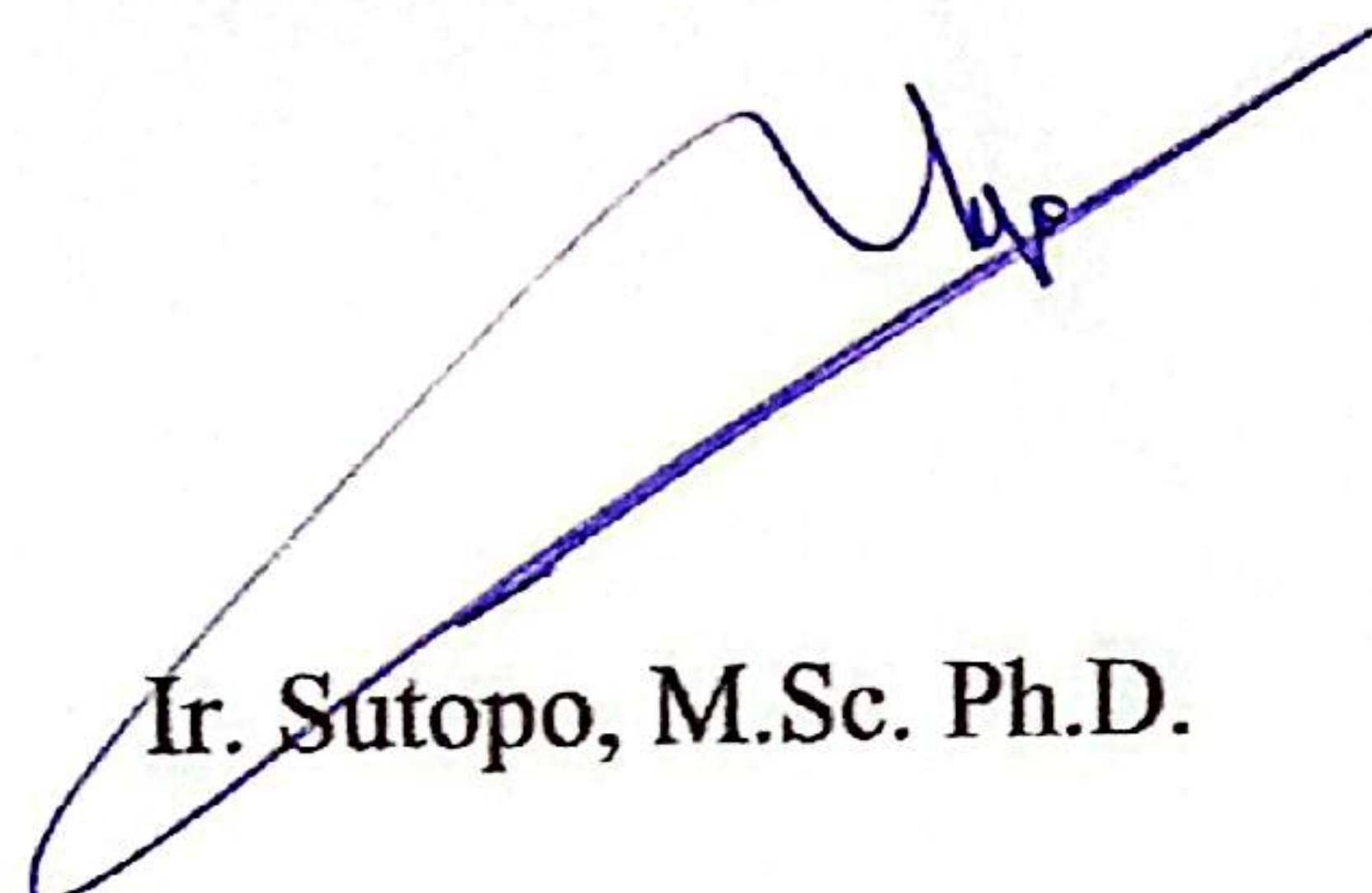
Nomor Induk Siswa : 23010122130110

Program Studi/Departemen : S-1 PETERNAKAN / PETERNAKAN

Fakultas : PETERNAKAN DAN PERTANIAN

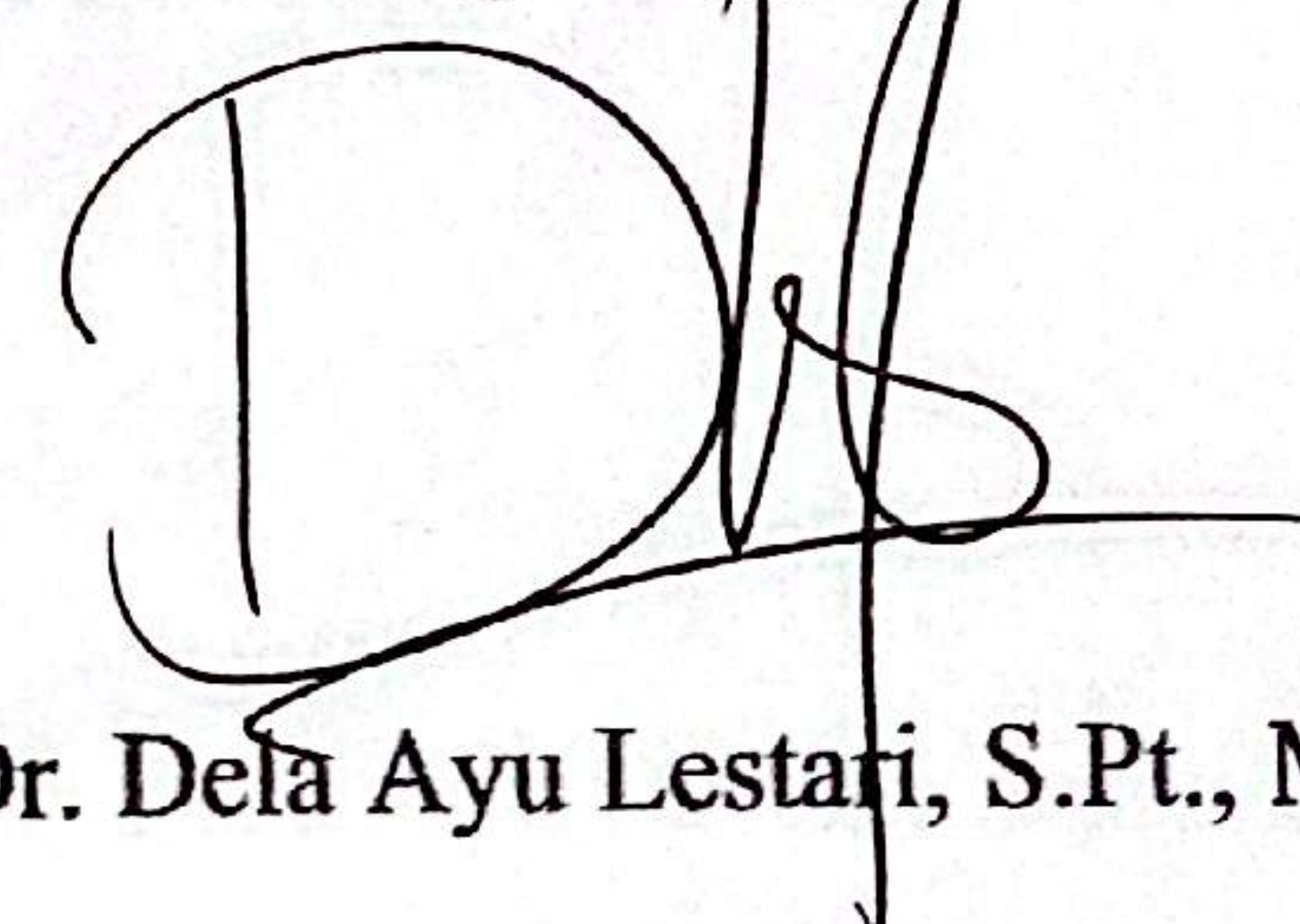
Telah disidangkan dihadapan Tim Penguji
Dan dinyatakan lulus pada tanggal ...12 JUN...2026

Pembimbing Utama



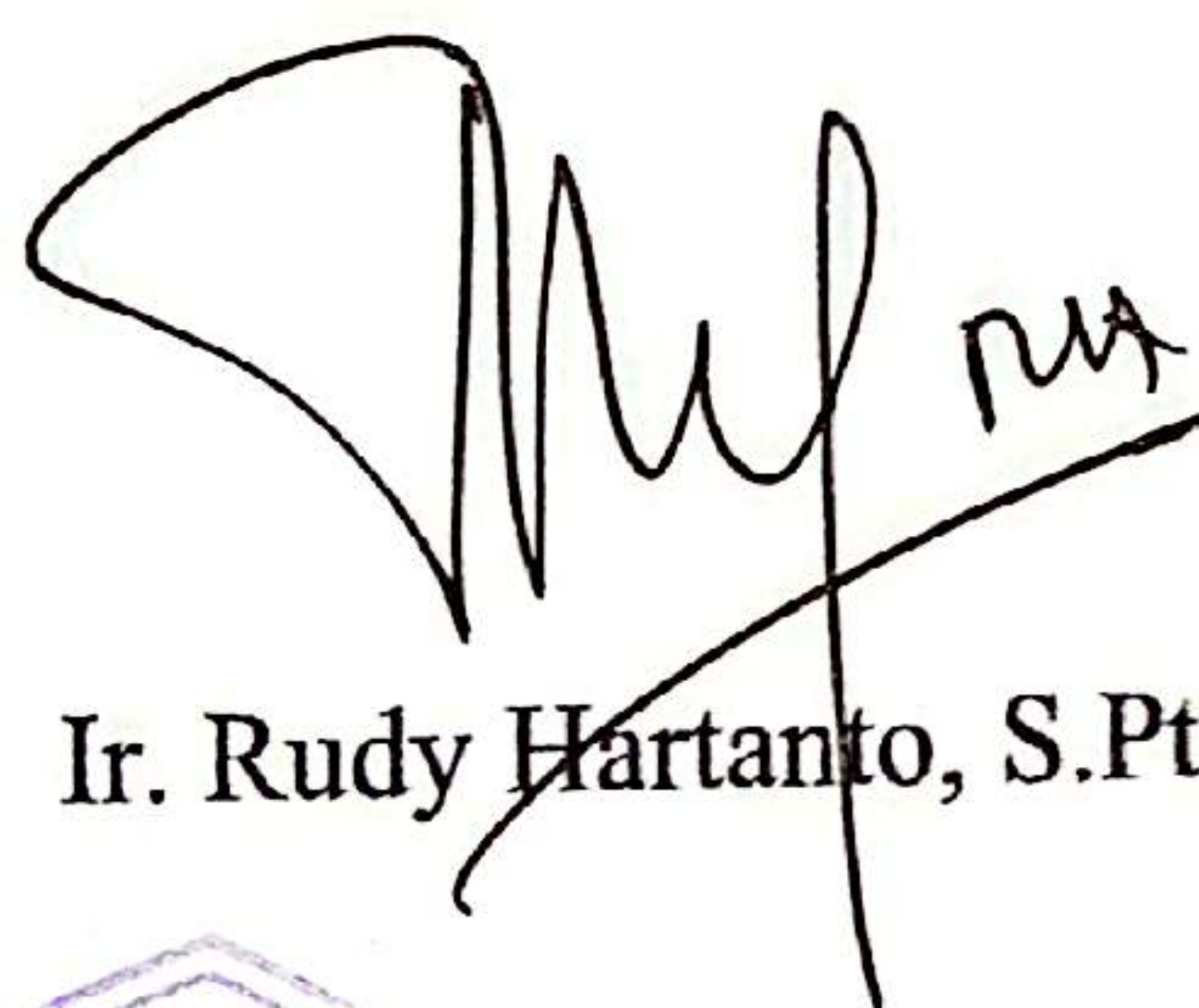
Ir. Sutopo, M.Sc. Ph.D.

Pembimbing Anggota



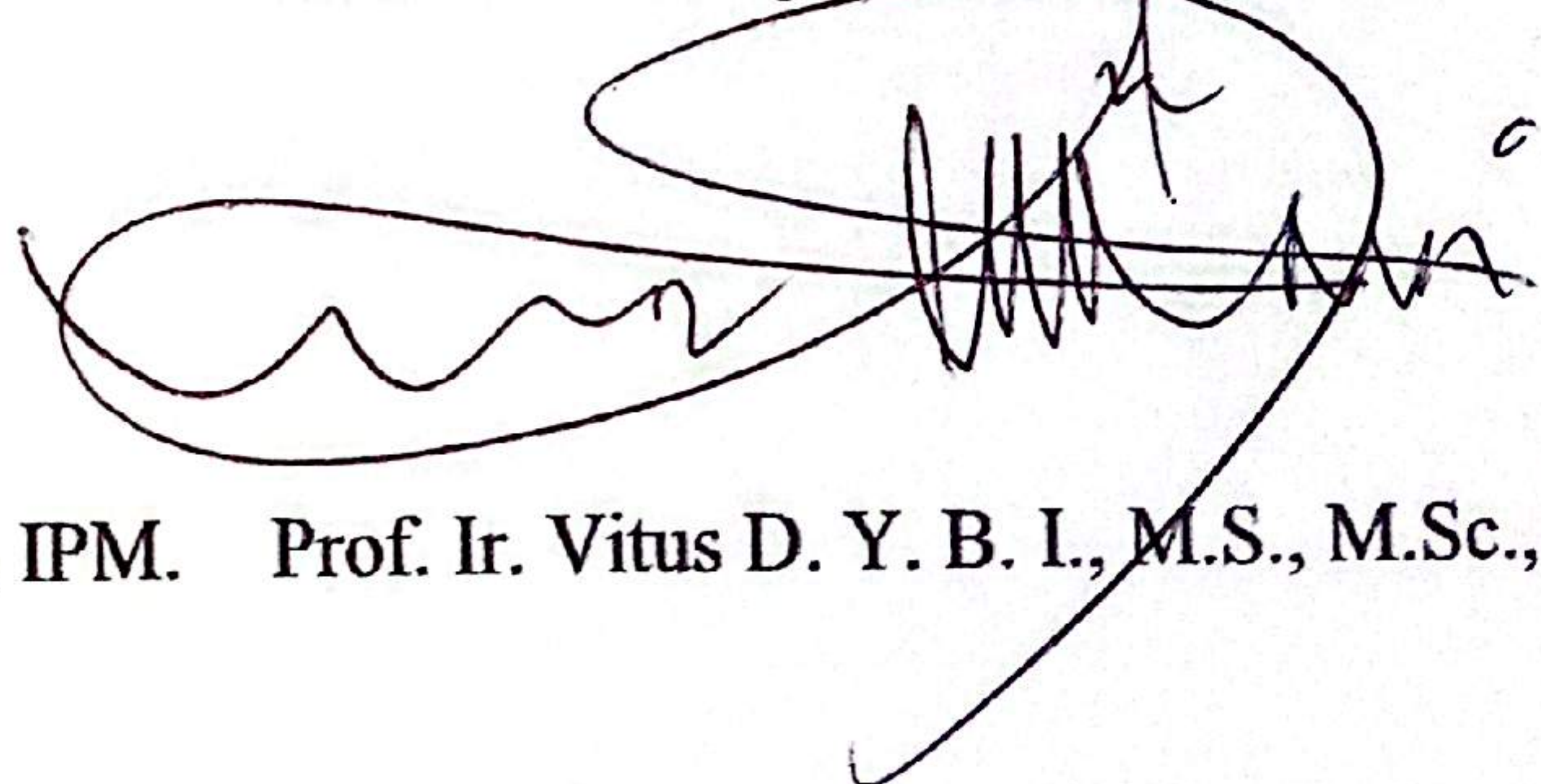
Dr. Dela Ayu Lestari, S.Pt., M.Si.

Ketua Program Studi



Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM.

Ketua Panitia Ujian Akhir Program



Prof. Ir. Vitus D. Y. B. I., M.S., M.Sc., Ph.D., IPU.

Dekan



Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D.

Ketua Departemen



Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM.

RINGKASAN

ZERLINDA FAIRUZ AZMI. 23010122130110, 2026. Identifikasi Keragaman Gen *Leptin* pada Domba Dorper (Pembimbing: **SUTOPO** dan **DELA AYU LESTARI**).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen *Leptin* pada domba Dorper. Manfaat penelitian ini adalah untuk memberikan informasi dasar ilmiah dalam seleksi molekuler dan mempercepat peningkatan mutu genetik. Gen *Leptin* merupakan salah satu gen kandidat yang berperan dalam regulasi metabolisme energi, pertumbuhan, dan komposisi tubuh, sehingga penting untuk dikaji dalam kaitannya dengan peningkatan produktivitas ternak.

Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel darah Domba Dorper yang berasal dari Kabupaten Malang dengan jumlah sampel 85 domba Dorper yang terdiri dari 16 domba jantan dan 69 domba betina sebagai representasi populasi. Bahan yang digunakan pada penelitian meliputi Geneid DNA *Extraction Kit*, etanol, agarose, aquadest, larutan TBE, FloroSafe DNA *stain*, DNA *loading dye*, DNA *ladder*, *my taq Polymerase HS red mix*, PCR *water* atau ddH₂O, enzim restriksi BspM1 (*Bacillus Species M1*) dan sepasang primer yang didesain menggunakan primer 3 plus yakni F: 5'- GGT CCA CAA GCT CAG ACC TG -3' dan R: 5'- GAG GAG ACG GAC TGC TAT GC -3'. Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi tabung EDTA 3 ml, spuit 3 ml, *ice box*, *ice gel*, *freezer*, alat tulis, label, *micropipette*, *microtip*, *microtube*, *microtube rack*, *heatblock*, *vortex*, *spin-down*, *centrifuge*, GS-column, *collection tube*, timbangan analitik, sendok kecil, *beaker glass*, erlenmayer, *plastic wrap*, *microwave*, *gel tray*, *comb*, mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Bio-Rad T=100, PCR *tube*, *gel electrophoresis system*, *gel documentation system*, sarung tangan lateks, tabung *eppendorf* dan *magnetic stirrer*.

Penelitian dilaksanakan melalui beberapa tahapan, meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi gen *Leptin* menggunakan PCR, restriksi dengan menggunakan enzim BspM1 dengan metode PCR-RFLP, serta *alignment* (pensejajaran) sekuensing menggunakan MEGA 12. Pensejajaran dilakukan untuk mengetahui titik mutasi.

Hasil analisis RFLP menunjukkan adanya beberapa pola pita, namun tidak seluruhnya mampu membedakan genotipe secara jelas. Hal ini dibuktikan dengan hasil sekuensing yang menunjukkan bahwa satu pola pita dapat merepresentasikan lebih dari satu variasi genetik, sehingga menimbulkan ketidakpastian dalam penentuan genotipe. Hasil penelitian menunjukkan adanya keragaman genetik gen *Leptin* pada domba Dorper dengan mutasi transisi dan insersi pada daerah intron 2 meliputi g.2306 (A→G), g.2344 (T→C), g.2703 (A→G), g.2724 (T→C) dan g.2732 (insersi A). Oleh karena terdapat ambiguitas antara pengelompokan genotipe hasil PCR-RFLP yang dibandingkan dengan hasil sekuensing, maka peneliti perlu melakukan validasi genotipe melalui sekuensing untuk seluruh sampel penelitian serta asosiasi gen *Leptin* dengan sifat – sifat pertumbuhan.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. yang telah melimpahkan segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “Identifikasi Keragaman Gen *Leptin* pada Domba Dorper” tepat pada waktunya. Penulis menyadari bahwa penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada:

1. Ir. Sutopo, M.Sc., Ph.D. selaku dosen pembimbing utama dan Dr. Dela Ayu Lestari, S.Pt., M.Si. selaku dosen pembimbing anggota yang telah dengan sabar memberikan bimbingan dan masukan selama penelitian hingga penyusunan skripsi kepada penulis;
2. Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro;
3. Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM. selaku Ketua Departemen Peternakan Fakultas Peternakan dan Pertanian;
4. Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM. selaku Ketua Program Studi S-1 Peternakan sekaligus dosen wali yang telah memberikan banyak dukungan dan arahan selama masa studi;
5. Asep Setiaji, S.Pt., M.Si., Ph.D. selaku Koordinator Laboratorium Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi;

6. Dr. Ir. Achiriah Febriana, S.Pt., M.Si., IPM. selaku pembimbing lapangan yang telah memberikan bimbingan serta dukungan selama keberjalanan penelitian ini;
7. Seluruh dosen dan *staff* administrasi Program Studi Peternakan dan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro yang telah memberikan ilmu serta membantu penulis dalam proses belajar maupun pengurusan administrasi;
8. Ucapan terima kasih yang paling dalam penulis persembahkan kepada keluarga tercinta yakni Mama, Papa, Kakak yang tanpa henti mendoakan, mendukung dan mempercayai penulis bahkan disaat penulis merasa ragu. Meskipun penulis paham kita bukan keluarga yang terbiasa berbicara dari hari ke hati, tetapi penulis tahu bahwa dibalik keheningan itu tersimpan doayang tak pernah putus untuk penulis. Segala pengorbanan, ketulusan dan kasih sayang yang diberikan tidak akan mampu terbalaskan, namun menjadi salah satu alasan terbesar bagi penulis untuk terus melangkah dan menyelesaikan tahap ini;
9. Terima kasih pula kepada seseorang yang tidak dapat penulis sebutkan namanya yang selalu hadir dalam setiap proses, yang dengan caranya sendiri mampu menguatkan, mendengarkan dan menemani penulis melewati masa – masa ini. Kontribusinya mungkin tidak selalu terlihat namun sangat berarti dalam perjalanan ini;

10. Atylla, Iqbal, Evi, Dayinta dan Yashinta selaku partner penelitian yang selalu menemani, mendukung, berbagi waktu dan pengalaman yang berharga serta perproses bersama sejak penelitian dimulai hingga akhir;
11. Shinta, Nadaa, Zalfa, Siti dan Navila yang telah menjadi teman yang baik sejak awal masa perkuliahan hingga saat ini serta selalu memastikan kondisi penulis;
12. Seluruh anggota Asisten Laboratorium Genetika, Pemuliaan, dan Reproduksi yang telah membantu memberikan semangat dan dukungan kepada penulis serta memberikan rasa kebersamaan yang berharga ketika berproses bersama di Lab GPR;
13. Seluruh anggota GDRA 19' yang telah menjadi salah satu *support* penulis sejak dibangku sekolah menengah pertama serta selalu memberikan semangat dan motivasi bagi penulis;
14. Tidak lupa penulis berterima kasih kepada seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dan mendukung penulis sehingga penulisan skripsi dapat terselesaikan.
15. *Last but not least*, terima kasih untuk Zerlinda Fairuz Azmi, diri penulis sendiri. Terima kasih atas perjuangan yang mungkin tidak banyak terlihat oleh orang lain, atas mimpi besar yang diam – diam kamu perjuangkan meskipun belum menjadi takdirmu untuk berjalan ke arah itu. Namun kamu membuktikan bahwa kamu mampu mengimbangi segalanya dengan baik dan menyelesaikan perjalanan ini tepat waktu. Setiap lelah, air mata dan setiap doa yang terucap dalam diam adalah bukti keteguhan hatimu. Kamu telah melakukan yang terbaik. Teruslah melangkah dengan penuh keyakinan dan

jangan pernah meragukan kekuatan yang ada dalam dirimu. Kamu layak bangga, kamu layak bahagia. Dan hari ini, izinkan penulis berkata “*I’m so proud of u, Zerlinn*”.

Penulis menyadari bahwa di dalam proses penyusunan skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan, sehingga penulis mengharapkan kritik, saran dan masukan yang bersifat membangun untuk perbaikan kedepannya. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak baik bagi penulis dan para pembaca umumnya.

Semarang, Juni 2026

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR ILUSTRASI.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1. Domba Dorper.....	3
2.2. Keragaman Genetik Gen <i>Leptin</i>	4
2.3. Ekstraksi DNA dan Elektroforesis.....	6
2.4. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i>	7
2.5. Sekuensing DNA.....	8
BAB III. MATERI DAN METODE	9
3.1. Materi Penelitian	9
3.2. Metode Penelitian	11
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1. Hasil PCR.....	16
4.2. Hasil Sekuensing (Hasil Pengurutan DNA).....	18
4.3. Keragaman Genetik.....	21
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN	28
5.1. Simpulan	28
5.2. Saran	28
DAFTAR PUSTAKA	29
LAMPIRAN.....	38
RIWAYAT HIDUP.....	95

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Tahapan Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	12
2. Kromatogram dan Posisi Titik Mutasi Gen <i>Leptin</i>	21
3. Keragaman Genetik Gen <i>Leptin</i> pada Domba Dorper.....	24

DAFTAR ILUSTRASI

Nomor	Halaman
1. Domba Dorper (Liu <i>et al.</i> , 2022).....	3
2. Tahapan Ekstraksi DNA.....	12
3. Simulasi Penempelan Primer.....	14
4. Visualisasi Hasil PCR Sampel.....	16
5. Visualisasi Hasil RFLP Sampel untuk Sekuensing.....	19
6. Contoh Kromatogram Hasil Sekuensing.....	20

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Langkah Pembuatan Primer menggunakan Primer 3 Plus.....	38
2. Penggunaan Primer Blast.....	45
3. Langkah Analisis Sekuen menggunakan MEGA 12.....	50
4. Hasil Kromatogram Analisis Sekuensing Gen <i>Leptin</i> pada Domba Dorper.....	62
5. Hasil Alignment Gen <i>Leptin</i> pada Domba Dorper.....	86

BAB I

PENDAHULUAN

Domba Dorper merupakan salah satu rumpun domba potong unggulan yang banyak diminati di Indonesia. Domba Dorper adalah jenis domba penghasil daging yang penting secara komersial, terkenal karena tingkat pertumbuhannya yang tinggi, komposisi karkas yang menguntungkan, kemampuan beradaptasi dengan lingkungan (Wang *et al.*, 2025). Domba Dorper memiliki rata – rata penambahan bobot harian yang tinggi dan karakter karkas yang kompetitif (Brand *et al.*, 2017). Dorper sering digunakan untuk persilangan ras lokal untuk meningkatkan pertumbuhan dan kualitas karkas. Persilangan Dorper dengan domba lokal seperti Garut menghasilkan keturunan dengan pertumbuhan lebih cepat dan bobot sapih yang lebih besar (Jannah *et al.*, 2025).

Berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukannya penelitian yang mendukung program pemuliaan domba Dorper di Indonesia yang berorientasi pada peningkatan produktivitas, pertumbuhan, serta reproduksi melalui analisis molekuler. Salah satu kandidat gen yang berpotensi besar untuk seleksi pertumbuhan adalah gen *Leptin*. Leptin merupakan hormon yang dihasilkan oleh jaringan adiposa dan berperan dalam regulasi keseimbangan energi, metabolisme lipid serta fungsi reproduksi (Obradovic *et al.*, 2021). Analisis keragaman gen *Leptin* dapat memberikan gambaran mengenai potensi genetik populasi Dorper di Indonesia dan menjadi dasar dalam perencanaan strategi seleksi jangka panjang (Lakhssassi *et al.*, 2020).

Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) yang terdapat pada gen *Leptin* berhubungan erat dengan sifat produksi, pertumbuhan, efisiensi penggunaan pakan, dan performa reproduksi pada ruminansia (Kurlyana dan Hartatik, 2023). Polimorfisme pada gen *Leptin* pada sapi telah teridentifikasi pada wilayah promotor, intron dan ekson dimana setiap polimorfisme berasosiasi terhadap sifat produksi seperti berat badan, berat karkas dan produksi susu pada berbagai bangsa sapi (Putra dan Indriastuti, 2017). Boucher *et al.*, (2006) mengidentifikasi bahwa pada domba, polimorfisme gen *Leptin* mempengaruhi pertumbuhan otot, lemak dan kualitas karkas. SNP pada g.3272 T/C pada sapi persilangan dilaporkan memiliki asosiasi yang signifikan terhadap bobot lahir, panjang tubuh dan PBBH (Ermawati *et al.*, 2024).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi keragaman gen *Leptin* pada domba Dorper di Indonesia. Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi dasar ilmiah dalam seleksi molekuler dan mempercepat peningkatan mutu genetik. Hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat keragaman gen *Leptin* pada domba Dorper di Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Domba Dorper

Domba Dorper (*Ovis aries*) adalah jenis domba pedaging terkenal di dunia yang dikembangkan pada tahun 1930-an melalui persilangan domba Dorset Horn dan Blackhed Persian di Afrika Selatan (Qiao *et al.*, 2022). Domba Dorper merupakan salah satu bangsa domba pedaging yang memiliki pertumbuhan cepat dan memiliki adaptasi yang baik pada kondisi lingkungan panas serta banyak digunakan dalam persilangan untuk meningkatkan performa pertumbuhan dan karkas (Lunesu *et al.*, 2023). Domba Dorper memiliki bulu polos dengan warna hitam di kepala dan putih di tubuhnya (Pelotshweu *et al.*, 2025). Tampilan domba Dorper disajikan pada Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Domba Dorper (Liu *et al.*, 2022)

Rata – rata bobot badan domba Dorper pada umur 1 – 2 tahun dapat mencapai 62 kg untuk jantan dan 44 kg untuk betina (Phaladi *et al.*, 2024). Anak

domba Dorper sebelum disapih memiliki bobot badan sebesar $28,10 \pm 1,2$ kg (Ramli *et al.*, 2025). Berat karkas domba Dorper berkisar antara 22-50 kg serta mampu menghasilkan persentase karkas dengan nilai rata – rata tertinggi mencapai 49,7% (Pena *et al.*, 2017). Selanjutnya dilaporkan pula persentase karkas pada domba Dorper muda dapat mencapai sekitar 50% (Cloete *et al.*, 2000). Domba Dorper juga dapat memiliki bobot badan harian (*Average Daily Gain/ADG*) mencapai 266,4 g/hari dari lahir hingga umur 28 hari (Gavojdian *et al.*, 2013).

2.2. Keragaman Genetik Gen *Leptin*

Keragaman genetik merupakan variasi sifat genetik antar individu dalam suatu populasi atau spesies yang mencakup perbedaan dalam urutan DNA, struktur kromosom dan polimorfisme protein (Peringottillam dan Manickavelu, 2024). Keragaman genetik merupakan bahan baku untuk studi pemuliaan dengan memahami evolusi dan kemampuan adaptasi ternak terhadap berbagai kondisi lingkungan (Saravanan *et al.*, 2022). Selain itu, identifikasi keragaman genetik dapat digunakan untuk upaya konservasi plasma nutfah dan pengembangan program pemuliaan berkelanjutan (Kostova dan Bojinov, 2018).

Salah satu cara untuk mengidentifikasi dan memanfaatkan keragaman genetik dalam studi molekuler adalah *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). SNP merupakan variasi pada salah satu posisi dalam urutan DNA di antara individu yang menjadi salah satu penanda molekuler dalam program pemuliaan ternak untuk peningkatan sifat genetik yang diinginkan (Mishra *et al.*, 2020). SNP merupakan bagian dari seleksi genomik dan *marker-assisted selection* (MAS) yang mengaitkan

profil SNP dengan sifat – sifat fenotipe ternak sehingga memungkinkan pengambilan keputusan pemuliaan yang lebih tepat (Izamin *et al.*, 2026).

Breeding selection merupakan proses penting dalam peternakan yang bertujuan untuk meningkatkan sifat – sifat yang diinginkan guna meningkatkan produktivitas kualitas dan kemampuan adaptasi (Rafian dan Lase 2023). *Breeding selection* dilakukan dengan memanfaatkan keragaman genetik yang terdeteksi melalui SNP untuk meningkatkan mutu ternak. Pemuliaan dengan metode konvensional berfokus pada sifat fenotipe yang sering kali mengakibatkan kemajuan genetik yang lebih lambat akibat periode generasi yang lebih panjang dan kurangnya seleksi yang akurat (Zinnatov *et al.*, 2020). Namun, metode modern kini menekankan seleksi berbasis genetik atau *genomic selection* dimana marker DNA digunakan untuk memperkirakan nilai *breeding* individu secara akurat dan lebih cepat (Ibtisham *et al.*, 2017).

Leptin merupakan hormon yang dikodekan oleh gen *Leptin* melalui proses transkripsi dan translasi. Leptin berperan dalam pengaturan asupan pakan, metabolisme lemak, keseimbangan energi tubuh, reproduksi serta hematopoiesis (Orrú *et al.*, 2007). Leptin sebagian besar dihasilkan oleh jaringan adiposa untuk memberikan sinyal kepada sistem saraf pusat (SSP) mengenai total cadangan lemak tubuh (Agarwal *et al.*, 2009). Leptin juga membantu dalam pengaturan asupan pakan dengan menekan rasa lapar, sehingga mengurangi massa lemak di adiposit (Al-Hussaniy *et al.*, 2021). Leptin berperan penting dalam fungsi reproduksi dengan berinteraksi dengan hipotalamus-hipofisa-gonad sehingga mempengaruhi sekresi hormon reproduksi seperti GnRH, FSH dan LH (Herdis *et al.*, 2025). Selain

berfungsi dalam regulasi energi dan reproduksi, Leptin berperan dalam sistem imun yang mendukung makhluk hidup untuk melawan infeksi dan trauma yang sangat krusial untuk mempertahankan kesehatan dan produktivitas secara keseluruhan (Wylie, 2011). Pada domba (*Ovis aries*), gen *Leptin* terletak pada kromosom 4 (OAR4q32) (Perucatti *et al.*, 2006), yang terdiri dari 3 ekson dan 2 intron sepanjang 16 kb (Rahmat *et al.*, 2020).

2.3. Ekstraksi DNA dan Elektroforesis

Ekstraksi DNA merupakan tahapan awal penting dalam penelitian molekuler untuk mendapatkan materi genetik yakni DNA dengan memisahkan DNA dari komponen sel lainnya (Ariyanti dan Sianturi, 2019). Sampel genetik dapat berasal dari darah, jaringan lunak, tulang dan gigi, air liur, akar rambut, sel kulit mati serta sperma (Famuji, 2023). Tahapan pada ekstraksi DNA diantaranya persiapan sampel, sel lisis, pengikatan DNA, pencucian dan elusi (AS, 2025). Kondisi ekstrak DNA tanpa residu sangat penting untuk tahap kerja selanjutnya, karena keberadaan residu dari tahap ekstraksi dapat menghambat reaksi kimia pada tahap teknologi DNA selanjutnya (Hutami *et al.*, 2018).

Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan molekul bermuatan berdasarkan pergerakannya dalam medan listrik melalui medium seperti gel dan cairan (Rana dan Joshi, 2023). Pergerakan partikel – partikel dipengaruhi oleh ukuran, bentuk dan muatannya, sehingga memungkinkan pemisahan dan analisis berbagai biomolekul (Maity *et al.*, 2022). Setelah melakukan tahapan elektroforesis gel agarosa, visualisasi pita DNA penting

dilakukan dalam analisis hasil amplifikasi DNA yang bertujuan menilai keberhasilan amplifikasi serta mengevaluasi kualitas pita DNA yang terbentuk (Fatimatuzzahra *et al.*, 2025). Pita DNA yang terang dan tebal menunjukkan DNA yang baik serta konsentrasi yang tinggi sedangkan pita DNA yang tipis menunjukkan konsentrasi DNA yang kurang maksimal dan rendah (Robba *et al.*, 2024). Elektroforesis biasanya digunakan untuk tujuan analisis, tetapi dapat digunakan pula untuk separasi makromolekul dan teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode lain seperti sekuensing (Satiyarti *et al.*, 2017).

2.4. *Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode enzimatik dalam genetika molekuler yang digunakan untuk mengamplifikasi atau melipatgandakan fragmen target DNA (Setyawati dan Zubaidah, 2021). PCR memiliki 4 tahapan diantaranya *pre-denaturation*, *denaturation* atau mengubah untai ganda menjadi untai tunggal, *annealing* atau pelekatan primer pada DNA untai tunggal dan *extension* atau pemanjangan untai DNA sesuai dengan urutan DNA yang terbelah, sehingga membentuk dua buah DNA tunggal yang baru (Kurniawati *et al.*, 2019).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) merupakan teknik yang digunakan dalam biologi molekuler untuk mendeteksi variasi dalam urutan DNA antara individu dari spesies yang sama (Pinta *et al.*, 2024). Enzim restriksi akan memotong situs tertentu yang dikenalnya sehingga deteksi RFLP dapat

dilakukan dengan mempertimbangkan pola pita yang terbentuk setelah pemotongan DNA target dengan enzim restriksi dari individu yang berbeda (Septiawan *et al.*, 2017). Pola pemotongan yang berbeda dapat disebabkan karena terjadinya perubahan pada urutan pasang basa (Afriani *et al.*, 2022).

2.5. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA merupakan proses menentukan urutan nukleotida (adenin, guanin, sitosin dan timin) fragmen hasil amplifikasi dengan PCR secara tepat (Sjafaraenan *et al.*, 2018). Sekuensing dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perubahan atau mutasi pada gen tersebut (Haryanto *et al.*, 2018). Pengurutan atau *sequencing* DNA kemudian dapat digunakan untuk mengidentifikasi maupun memahami peran gen atau potongan DNA dengan membandingkan urutannya dengan sekuens DNA lain yang telah teridentifikasi (Lokapirnasari *et al.*, 2017). Sekuensing DNA memiliki beberapa jenis diantaranya metode Sanger, metode Maxam & Gilbert serta metode pyrosequencing (Mahama dan Suryandari, 2023).

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei – Desember 2025. Pengambilan sampel dilakukan di peternakan domba Dorper pada Pusat Pelatihan Pertanian dan Pedesaan Swadaya (P4S) Bumi Malang Lestari, Kabupaten Malang. Ekstraksi DNA, PCR, RFLP dan analisis data penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Analisis sekuensing dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel darah Domba Dorper yang berasal dari Kabupaten Malang dengan jumlah sampel 85 domba Dorper yang terdiri dari 16 domba jantan dan 69 domba betina sebagai representasi populasi. Domba Dorper yang digunakan berasal dari populasi domba Dorper Indonesia (*Indonesian Dorper Sheep/IDS*) di Kabupaten Malang. Domba Dorper yang digunakan memiliki kriteria kesehatan yang baik dan tidak cacat, memiliki rekording yang lengkap, umur ternak berkisar 12 hingga 36 bulan serta domba yang digunakan adalah domba Dorper *Full Blood* yang terverifikasi dokumen/*pedigree* peternakan,

Bahan yang digunakan pada penelitian meliputi Geneid DNA *Extraction Kit*, etanol, agarose, aquadest, larutan TBE, FloroSafe DNA *stain*, DNA *loading*

dye, DNA ladder, *my taq Polymerase HS red mix*, PCR water atau ddH₂O, enzim restriksi BspM1 (*Bacillus Species M1*) dan sepasang primer yang didesain menggunakan primer 3 plus yakni F: 5'- GGT CCA CAA GCT CAG ACC TG -3' dan R: 5'- GAG GAG ACG GAC TGC TAT GC -3' (Lampiran 1). Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi tabung EDTA 3 ml, spuit 3 ml, *ice box*, *ice gel*, freezer, alat tulis, label, *micropipette*, *microtip*, *microtube*, *microtube rack*, *heatblock*, *vortex*, *spin-down*, *centrifuge*, GS-coloumn, *collection tube*, timbangan analitik, sendok kecil, *beaker glass*, erlenmayer, *plastic wrap*, *microwave*, *gel tray*, *comb*, mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Bio-Rad T=100, PCR tube, *gel electrophoresis system*, *gel documentation system*, sarung tangan lateks, tabung *eppendorf* dan *magnetic stirrer*.

3.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian yaitu observasional pada materi yang diamati. Metode penelitian terdiri dari 3 tahap yakni tahap pra penelitian, penelitian dan analisis data.

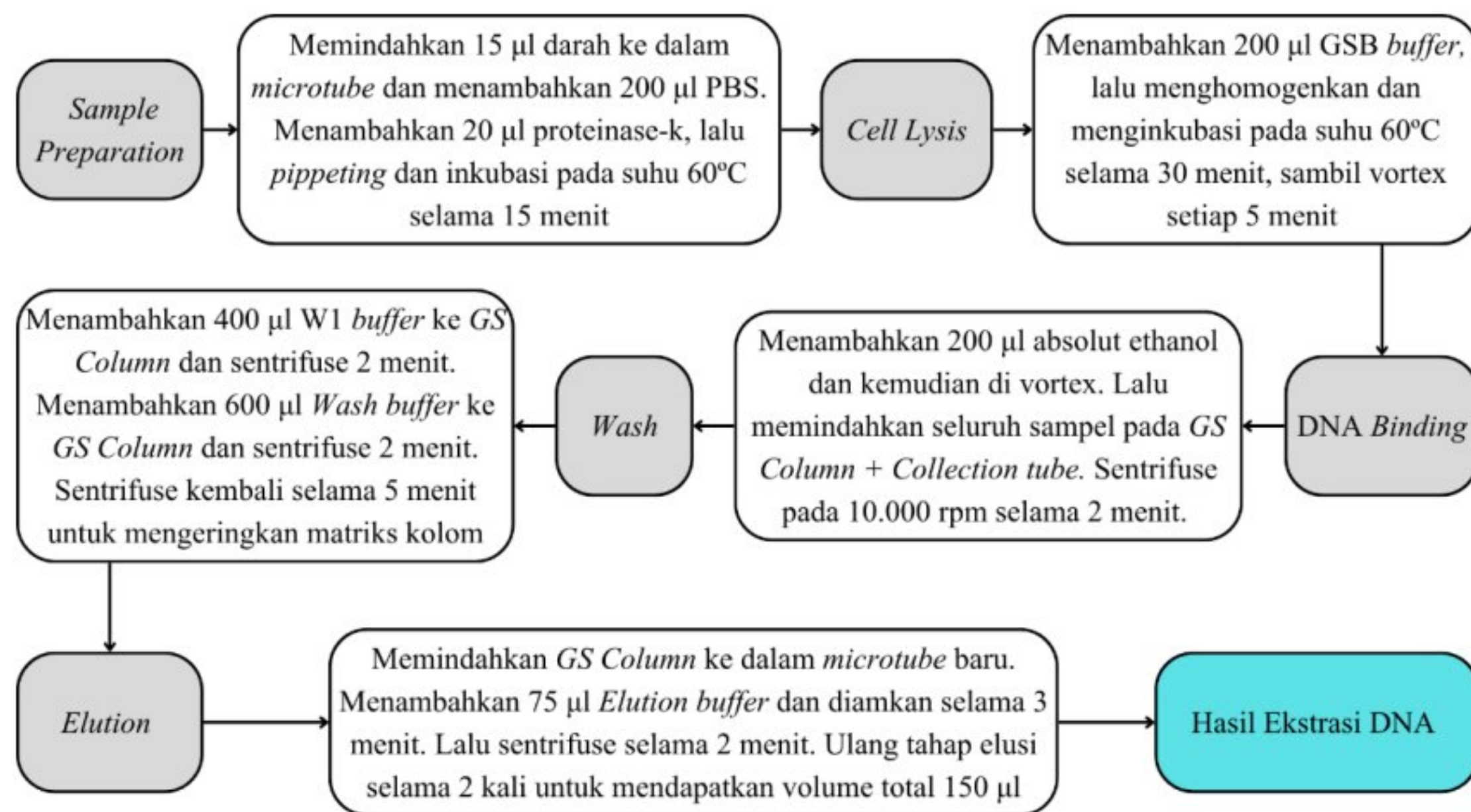
3.2.1. Tahap Pra Penelitian

Tahap pra penelitian meliputi tahap persiapan sampel, persiapan alat dan bahan yang dibutuhkan serta studi pustaka. Persiapan sampel dilakukan dengan pemilihan sampel pada 85 domba Dorper di Kabupaten Malang dengan rentang umur 8 bulan hingga 4 tahun. Tahapan pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil sampel darah pada bagian *vena jugularis* sebanyak 3 ml. Pada tahap pra

penelitian juga dilakukan persiapan logistik dan bahan penelitian, termasuk tabung EDTA, primer *forward* dan *reverse*, enzim BspM1, reagen PCR, peralatan elektroforesis dan Geneid DNA *Extraction Kit* yang terdiri dari proteinase-k, GSB, *wash buffer*, *W1 buffer* dan *elution buffer*.

3.2.2. Tahap Penelitian

Tahap penelitian terdiri dari beberapa tahapan meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi gen *Leptin*, elektroforesis, *Polymerase Chain reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) dan sekuensing. Ekstraksi DNA merupakan proses pemisahan DNA dari komponen sel lainnya seperti protein, karbohidrat, lemak, dan lain – lain. Tahap ekstraksi DNA menggunakan protokol Genomic DNA *Extraction Kit* dari Geneid dengan jumlah 85 sampel (Ilustrasi 2). Hasil dari ekstraksi DNA selanjutnya diuji kualitasnya menggunakan gel agarose 1% pada elektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 20 menit. Hasil ekstraksi DNA yang telah dielektroforesis dapat divisualisasikan melalui sinar UV menggunakan *gel documentation system*. Keberhasilan tahap ekstraksi DNA ditandai dengan adanya pita DNA yang jelas dan tidak *smear* yang menandakan tidak adanya kontaminasi pada DNA.



Ilustrasi 2. Tahapan Ekstraksi DNA

Tahap selanjutnya adalah amplifikasi gen *Leptin* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik yang didesain untuk target gen. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan tahap untuk memperbanyak untai DNA sehingga dapat dianalisis lebih lanjut. Tahapan PCR menggunakan 85 sampel dari hasil ekstraksi DNA yang terdiri dari *initial denaturation* (aktivasi enzim *polymerase*), *denaturation* (pemutusan ikatan hidrogen), *annealing* (penempelan primer pada *template*), *extension* (pemanjangan primer), dan *final extension* (pemantapan). Pada Tabel 1 disajikan tahapan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Tabel 1. Tahapan Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Tahap	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Siklus (kali)
<i>Initial denaturation</i>	95	60	1
<i>Denaturation</i>	95	15	
<i>Annealing</i>	58,7	15	35
<i>Extension</i>	72	35	
<i>Final extension</i>	72	300	1

Hasil PCR kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1%. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan produk PCR sebanyak 3 μ L dan disertai DNA *ladder* pada salah satu sumur. Elektroforesis dilakukan selama 27 menit dengan voltase sebesar 100 volt. Keberhasilan PCR dan elektroforesis dapat dilihat melalui *gel documentation system* dengan adanya pita DNA yang jelas dan tidak *smear*.

Tahap ketiga pada polimorfisme gen *Leptin* yakni *Polymerase Chain reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) dengan enzim restriksi. Tujuan utama penggunaan PCR-RFLP adalah untuk mendeteksi adanya variasi genetik (*polymorphism*) pada suatu gen dengan cara memotong fragmen DNA hasil PCR di lokasi tertentu yang dikenali oleh enzim restriksi. Proses restriksi menggunakan 85 sampel hasil PCR. Proses restriksi diawali dengan mencampur produk PCR 5 μ L, *water nuclease-free* 7,75 μ L, *fastdigest buffer* 1 μ L, *oligonucleotide* 0,75 μ L dan *fastdigest enzyme* 0,5 μ L, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Kemudian dilakukan *inactive enzymne* dengan cara mengatur suhu pada heat block dari 37°C menjadi 65°C selama 5 menit setelah dilakukan inkubasi. Hasil PCR-RFLP kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 2% selama 27 menit dengan voltase sebesar 100 volt.

Pola hasil PCR-RFLP kemudian digunakan untuk menentukan genotipe individu, misalnya AA, AG, atau GG. Perwakilan genotipe akan dianalisis lebih lanjut melalui sekuensing di PT. Genetika Science Indonesia dengan metode Sanger sebagai tahap akhir. Sampel yang dikirim untuk sekuensing sebanyak 8 sampel.

Pada Ilustrasi 3 disajikan simulasi penempelan primer *forward* dan *reverse*. Panjang fragmen primer *forward* dan *reverse* adalah 1441 bp (Lampiran 3).

1801	GTGTTTTTGC	AAACAGTTAT	CAGTGTCTCT	TGGGGCATT	TTTCTGAGGT	CCACAAGCTC	FORWARD
1861	AGACCTGCGA	CACAGATGA	GGTCTGTATT	TAGAATGAGG	GAGATGAAGT	GTGACTTCTC	
1921	ACCCTTCTGT	TCTCTGTCTG	TAAAGTCTTA	AGCTGGTCAG	CTTCCACAAG	GTCTTTAAAC	
1981	TCCAGTTTCC	TCATCTAGAA	AATGAAAGTG	GGAAAGTGTT	AGTTGCTCAG	TCATGTCCAA	
2041	CTCTTTGAGA	CTCCATGAAC	TGTAGTCTAC	CAGGCTCCTC	TGTCCATGAA	ATTCTTCAGG	
2101	CAAGAATACT	GGAGTGGCTT	GTCATTTTCT	TCTCCCAACG	AGATCTTCCC	AACCCAGGGA	
2161	ATGAACCCGG	GTCTTCTGCA	TTGCAGGCGG	ATTCTTTACC	ATCTGAGCCA	CCAGGGAAAC	
2221	CCATAAGACC	TTGTGAAGAC	TATTAAGATA	GTCATCTAGA	CAACAGGACT	ATCTTAATAG	
2281	TCTTCATAAG	GTCTTCATGA	GAATAAATTA	GATAAAGCAA	GTGACCCTCC	CTGCATACCC	
2341	TTGTAGAACC	AGAACTGTGT	GTGCCCTCTT	TCAAGGTTTT	CAGTCATAAC	TTTTGATAGC	
2401	TTCCCACCTT	AAAAGCCAAC	TTGCTCACCT	GCATGACGCA	GTCTGGAGAC	TTCCACATCT	
2461	CCTGACCACT	CTATATTTCT	AACAGTGGCT	TTGGGCAGCC	AGGGAGCAGT	TAGGTGGCCA	
2521	GAAGCAGGGA	CAGATCAGAA	ATAGACAGCG	TCTGCATTTT	CTAGAGAAAA	GCCCTTAAAT	
2581	TCCTTGCTTT	CAAAACAGTC	TTTCAACAAG	CTGTACACAA	TAGATCCAGA	GGGGTCGCAC	
2641	AGAGTCAGAC	ACGACTGAAG	CGACTTAGCA	GCAGCAGCAG	CAGGCCCAAC	CTGTGTGGTG	
2701	CCAGGATTGA	TTGCTGTGGG	TGGTGGGGGA	AGGGAGAGCC	CCTCCTGGTA	ACCAGGGTTA	
2761	CTTGAGCAGA	GCAGTGAGCT	GGGGCATCGC	TGGGGTAATG	GCCTGAATCC	CTTAGGGAGT	
2821	GAGACTTCCT	GGAGAATCTG	ACTGTGAGGG	AGGAGTCTGC	TTGGGGTGGA	AGAGCTGGGG	
2881	ACGGGGAATG	TATGGAAGAC	CTCAATGCCT	GGGGAAGAAA	CTCAAGCAGG	AAATAGGGTG	
2941	TCATGGCTTG	TTCTATAGCA	GAGTCATTTG	GAAAAGGGAA	CAGCCTGCAA	AGGCTGGTCT	
3001	GGAAGCAAAG	GGCAGGGTGG	TTTGGGAAGG	GCAGAAAGAT	AGGAGCCCAA	GGACACCAGC	
3061	TTGGAAGAAT	GGCGGCCACA	TGGGCGCAAG	AAGTAAGGGT	CCAGGAAGGA	TGGTGTGGAA	
3121	GGCAGGGGGA	GGAAGCACCT	CTACACTCGA	GGGAAAGGCG	GAGTTGGGGA	GCTCTGAGGA	
3181	GCTGCCCTCT	CTCCCACTGA	ACTCTTGTTG	TCCCCTTCCT	CCTGCATAGC	AGTCCGTCTC	REVERSE
3241	CTC	CAAACAG	AGGGTCACTG	GTTTGGA	CTT	CTCCACCCTC	

Keterangan: *highlight* kuning merupakan primer *forward* dan *reverse*; *highlight* biru merupakan pemotongan enzim restriksi BspM1; *highlight* merah merupakan target SNP

Ilustrasi 3. Simulasi penempelan primer

3.2.3. Analisis Data

Tahap analisis data hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan *software Molecular Evolutionary Genetiks Analysis* versi 12 (MEGA 12) (Kumar *et al.*, 2008). *Alignment* (pensejajaran) nukleotida pada gen *Leptin* dilakukan menggunakan program ClustalW untuk mengidentifikasi SNP dengan membandingkan gen *Leptin* domba Dorper hasil penelitian dengan spesies yang sama yaitu *Ovis Aries* dari website *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) dengan *Accession number* HE605296.1 (Lampiran 3). Parameter yang diamati yakni *segregating sites* (S), *singleton* (Si), dan *parsimony informative sites* (Pa).