

**KERAGAMAN GENETIK
BERDASARKAN ANALISIS PENANDA DAERAH D-LOOP PADA
KAMBING MARICA DAN KAMBING KACANG**

SKRIPSI

**FAJRIANI MUTMAINNAH MAKMUR
I 111 15 302**



**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**KERAGAMAN GENETIK
BERDASARKAN ANALISIS PENANDA DAERAH D-LOOP PADA
KAMBING MARICA DAN KAMBING KACANG**

SKRIPSI

**FAJRIANI MUTMAINNAH MAKMUR
I 111 15 302**

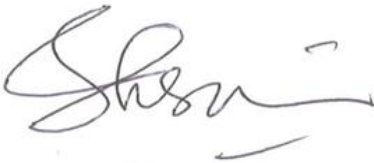
**Skripsi sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Peternakan
pada Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin**

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Skripsi : Keragaman Genetik Berdasarkan Analisis Penanda D-Loop pada Kambing Kacang dan Kambing Marica
Nama : Fajriani Mutmainnah Makmur
NIM : I 11115 302

Skripsi ini Telah Diperiksa dan Disetujui oleh :



Dr. Muhammad Ihsan A. Dagong, S.Pt., M.Si
Pembimbing Utama



Prof. Rr. Sri Rachma A. B., M. Sc., Ph.D
Pembimbing Anggota



Dr. H. Muhi. Ridwan, S.Pt., M.Si, (P)
Ketua Program Studi

Tanggal Lulus : 23 Agustus 2020

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Fajriani Mutmainnah Makmur

NIM : I 111 15 302

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis dengan judul :

Keragaman Genetik Berdasarkan Analisis Penanda Daerah D-Loop pada Kambing Marica dan Kambing Kacang adalah asli.

Apabila sebagian atau seluruhnya dari karya skripsi ini tidak asli atau plagiasi maka saya bersedia dikenakan sanksi akademik sesuai peraturan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Makassar, Agustus 2020

Peneliti



Fajriani Mutmainnah Makmur

KATA PENGANTAR



Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Rasa syukur yang luar biasa penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat, karunia dan kesempatan sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Keragaman Genetik Berdasarkan Analisis Penanda Daerah D-Loop pada Kambing Kacang dan Kambing Marica”. Sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan jenjang Strata Satu (S1) pada Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Ucapan terima kasih yang sangat mendalam penulis ucapkan kepada kedua orang tua bapak (Alm) Makmur Lateng S.P dan ibu Ir. Hermaya Rukka, M.Si yang telah memberikan segala dukungan kepada penulis dalam meraih cita-cita baik dukungan moril serta materi, mendidik dan membesarkan dengan penuh cinta dan kasih sayang yang begitu tulus serta keluarga besar, Semoga Allah SWT senantiasa menjaga dan memberikan kesehatan.

Terima kasih tak terhingga kepada bapak Dr. Muhammad Ihsan A. Dagong S.Pt., M.Si selaku pembimbing utama dan kepada ibu Prof. Rr. Sri Rachma A.B., M.Sc., Ph.D selaku pembimbing pendamping atas waktu yang telah diluangkan untuk membimbing penulis, memberikan saran serta menyalurkan ide kepada penulis mulai dari perencanaan penelitian sampai selesainya skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis haturkan dengan segala keikhlasan dan kerendahan hati kepada:

1. Rektor Unhas Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A, Dekan Prof. Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc, Wakil Dekan dan seluruh Bapak Ibu Dosen yang telah

melimpahkan ilmunya kepada penulis, dan Bapak Ibu Staf Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

2. Kepada bapak Prof. Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc serta bapak Dr. Muhammad Hatta, S.Pt, M.Si selaku pembahas yang telah banyak memberikan masukan dan nasehat kepada penulis demi kesempurnaan skripsi ini.
3. Dosen Pengajar Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin yang telah banyak memberi ilmu serta motivasi yang sangat bernilai bagi penulis.
4. Muhammad Rachman Hakim, S.Pt, M.P selaku penasehat akademik yang banyak meluangkan waktu untuk memberikan motivasi, nasehat dan dukungan kepada penulis.
5. Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DEA, DES selaku pembimbing pada Seminar Pustaka, terima kasih atas ilmu dan bimbingannya pada penulis.
6. Teman-teman Tim Penelitian Genetik Kambing “Rio Adi Mas Saputra, Muhammad Mustakar Yusuf, Ganda Adi Setyawan, dan Muhammad Agung Firdhawansyah” yang telah membantu dalam penelitian, mengolah data, dan memberikan dukungan selama pembuatan skripsi penulis.
7. Sahabat “Ashariah Hapila, Nurul Iqamah Alam, Enggar Budi Arum, Nursida, dan Sri Fadhilayanti Yunus” yang telah mendukung, memberi motivasi dan membantu dalam penulisan skripsi mulai dari perencanaan judul hingga skripsi.
8. Teman - teman ”RANTAI 2015” yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah memberi warna selama perkuliahan.
9. Teman-teman “KKN Tematik Desa Sejahtera Mandiri Kementrian Sosial Gelombang 99” Kabupaten Bantaeng Kecamatan Gantarangkeke, Desa Kaloling

yang telah berbagi cerita, pengalaman dan memberikan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

10. Teman-teman Himpunan Mahasiswa Produksi Ternak (HIMAPROTEK) yang telah banyak memberi wadah terhadap penulis untuk berproses dan belajar.
11. Teman-teman Unit Kegiatan Mahasiswa Forum Studi Ilmiah (UKM FOSIL) yang telah memberi wadah terhadap penulis untuk berproses dan belajar kepada penulis

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik serta saran pembaca sangat diharapkan demi perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan nantinya. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi kita semua. Khususnya bagi penulis untuk bisa jauh lebih baik dalam pembuatan karya tulis, sekian dan terima kasih.

Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Makassar, Agustus 2020

Fajriani Mutmainnah Makmur

ABSTRAK

Fajriani Mutmainnah Makmur. I11115302. Keragaman Genetik Berdasarkan Analisis Penanda Daerah D-Loop pada Kambing Marica dan Kambing Kacang. Pembimbing Utama : **Muhammad. Ihsan A. Dagong** dan Pembimbing Anggota : **Rr.Sri Rachma A.B.**

Sulawesi Selatan memiliki jenis kambing lokal yaitu kambing Kacang dan kambing Marica. Selama ini masyarakat beranggapan bahwa kedua kambing tersebut merupakan jenis kambing yang dianggap sama meskipun secara morfologinya terlihat berbeda namun belum dapat diketahui perbedaan atau persamaannya. Adanya dugaan keterkaitan / hubungan kekerabatan antara kambing Kacang dan kambing Marica menjadi hal penting untuk diketahui. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui keragaman genetik kambing Marica dan kambing Kacang berdasarkan analisis penanda daerah D-loop, dengan melihat komposisi nukleotida, jarak genetik, dan pohon filogeni. Materi penelitian yaitu 116 sampel darah kambing Marica dan Kacang yang dikoleksi dari Maros dan Jeneponto dan yang berhasil terkualifikasi jumlahnya 21 sampel yang dapat dianalisis. Tahapan penelitian meliputi ekstraksi DNA, PCR, elektroforesis dan *sequencing* DNA. Primer *forward* (5'-TCA CTA TCA GCA CCC AAA GC-3') dan *reverse* (5'-GGC ATT TTC AGT GCC TTG CT-3') digunakan pada proses PCR. Hasil sekuensing dianalisis dalam program MEGA 6.0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kambing Kacang dan kambing Marica menunjukkan kecenderungan berada pada satu rumpun didasarkan pada hasil analisis daerah D-loop untuk komposisi nukleotida, rataan frekuensi, rataan jarak genetik dan pohon filogeni.

Kata kunci : Kambing Marica, Kambing Kacang, DNA Mitokondria, D-Loop

ABSTRACT

Fajriani Mutmainnah Makmur. I11115302. Genetic Diversity Based on D-loop Area Marker Analysis in “Marica” Goats and “Kacang” Goats. Advisor : **Muhammad Ihsan A. Dagong** and Co-Advisor : **Rr. Sri Rachma A. B.**

The province of South Sulawesi has local types of goats, “Kacang” goats and “Marica” goats. The community assumes that the two goats are of the same type, even though they are morphologically different, but the differences or similarities are not yet known. Therefore, alleged connection/kinship between “Kacang” goats and “Marica” goats is important to find out. The objective of this research is to examine the genetic diversity of “Marica” goats and “Kacang” goats based on D-loop area marker analysis, by looking closely at the nucleotide compositions, genetic distances, and phylogenetic trees. The research materials were 116 blood samples of “Marica” and “Kacang” goats collected from Maros and Jeneponto, of which 21 samples were successfully analyzed. The research stages included DNA extraction, PCR, electrophoresis, and DNA sequencing. The Primary of forward (5'-TCA CTA TCAGCA CCC AAA GC-3 ') and reverse (5'-GGC ATT TTCAGTGCCTTG CT-3 ') were used in PCR process. Sequencing results were then analyzed using MEGA 6.0 program. The research results show that “Kacang” goats and “Marica” goats show a tendency of one family based on the results of the D-loop area marker analysis for nucleotide compositions, frequency averages, genetic distance averages, and phylogeny trees.

Keywords: “Marica” Goat, “Kacang” Goat, Mitochondrial DNA, D-Loop

DAFTAR ISI

	Halaman
Daftar Isi.....	ix
Daftar Tabel	x
Daftar Gambar	xi
Daftar Lampiran	xii
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA.....	4
Kambing Marica	4
Kambing Kacang	5
DNA Mitokondria.....	6
D-loop Mitokondria	7
METODE PENELITIAN.....	10
Waktu dan Tempat Penelitian	10
Materi Penelitian.....	10
Metode Pengambilan Data	11
Prosedur Penelitian	11
Analisis Data	15
HASIL DAN PEMBAHASAN	16
Hasil Amplifikasi Daerah D-Loop.....	16
Komposisi Nukleotida (<i>Nucleotides Composition</i>)	17
Jarak Genetik (<i>Genetic Distance</i>).....	20
Analisis Pohon Filogeni (<i>Phylogeny Tree Analysis</i>)	21
KESIMPULAN DAN SARAN	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	30
BIODATA	34

DAFTAR TABEL

No.	Halaman
1. Sequen Primer untuk PCR	10
2. Jumlah Sampel Darah Ternak Kambing.....	14
3. Jumlah Ternak Kambing yang Berhasil di <i>Sequencing</i>	16
4. Komposisi Nukleotida Kambing Kacang dan Kambing Marica Setelah Disejajarkan dengan Komposisi Nukleotida Bangsa Kambing Lainnya dari <i>GenBank</i>	18
5. Jarak Genetik antara Kambing Kacang, Kambing Marica di Maros dan Jeneponto dengan bangsa kambing lainnya	20

DAFTAR GAMBAR

No.	Halaman
1. Skema Genom Daerah D-loop kambing.....	9
2. Diagram Alir Prosedur Penelitian	11
3. Hasil elektroforesis produk PCR daerah D-loop mtDNA	16
4. Pohon Filogeni Kambing Kacang dan Marica yang Dibandingkan dengan Sampel pada <i>GenBank</i>	22

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1. Komposisi Nukleotida Kambing Kacang dan Kambing Marica di Kabupaten Maros dan Jeneponto	30
2. Jarak Genetik Kambing Kacang dan Kambing Marica di Kabupaten Maros dan Jeneponto	31
3. Dokumentasi	32

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Plasma nutfah merupakan sumberdaya genetik tak ternilai yang berpotensi besar untuk dimanfaatkan menjadi bibit unggul. Salah satu komoditas kekayaan plasma nutfah adalah ternak kambing. Di Indonesia ternak kambing memegang peranan penting dalam meningkatkan pendapatan, sebagai sumber daging, pupuk, pengoptimalan tenaga kerja keluarga, meningkatkan status sosial, dan aspek sosial budaya (Subandriyo, 2008). Beberapa plasma nutfah kambing di Indonesia seperti kambing Gembrong, Marica dan Muara dilaporkan hampir punah sementara belum banyak dieksplorasi potensi genetiknya (Batubara, 2006). Sampai saat ini, tampilan morfologi ternak masih umum digunakan secara praktis untuk mengkarakterisasi dan menyeleksi ternak. Penampilan morfologi dipengaruhi oleh faktor genetik dan faktor lingkungan seperti ketersediaan pakan dan iklim. Hal ini menjadikan seleksi ternak berdasarkan morfologi membutuhkan waktu lebih lama (Mabrouk *et al.* 2008; Nsoso *et al.* 2004; Lanari *et al.* 2003). Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi biologi molekuler, khususnya yang berhubungan dengan penggunaan penanda molekuler telah mempercepat karakterisasi sifat-sifat yang bernilai ekonomi tinggi, sifat daya tahan terhadap penyakit, asal-usul dan kekerabatan suatu individu atau rumpun ternak tertentu (Nijman *et al.*, 2003).

Penanda molekuler yang populer antara lain DNA-mitokondria, DNA mikrosatelit dan penanda molekuler DNA kromosom Y. Penanda DNA-mitokondria menggambarkan karakteristik yang diturunkan melalui garis induk (maternal) (Fan-Bin, 2007). Salah satu cara yang dapat ditempuh guna mempermudah dalam karakterisasi kambing adalah menggunakan analisis genom

DNA mitokondria. Analisis genom DNA mitokondria dilakukan secara molekuler dengan melihat DNA pada kambing dan mengidentifikasinya menggunakan bantuan penanda D-loop. Penelitian secara molekuler perlu dilakukan untuk mengetahui keragaman jenis dan hubungan kekerabatan Kambing (Elvyra dan Dedy, 2007).

Sulawesi Selatan memiliki jenis kambing lokal yaitu kambing Kacang dan kambing Marica yang dikenal dan disukai masyarakat sebagai ternak yang dikembangkan secara tradisional. Kambing Kacang dan kambing Marica memiliki banyak keunggulan misalnya mampu beradaptasi baik di daerah agroekosistem lahan kering dan dapat bertahan hidup pada musim kemarau walau hanya memakan rumput-rumput kering di daerah bebatuan (Pamungkas dkk., 2009). Kambing Kacang dan kambing Marica mampu memproduksi di lingkungan yang tidak produktif sehingga sering dimanfaatkan untuk persilangan oleh peternak untuk meningkatkan produktivitas kambing lokal. Mempertimbangkan kondisi tersebut maka perlu upaya peningkatan kualitas ternak lokal yang telah beradaptasi baik dengan kondisi lingkungan setempat, sehingga dapat dimanfaatkan secara berkelanjutan dan terhindar dari kepunahan sumber daya genetik ternak lokal (Anonim, 2007).

Selama ini masyarakat beranggapan bahwa kambing Kacang dan kambing Marica merupakan jenis kambing yang sama meskipun morfologinya terlihat berbeda, namun belum dapat diketahui perbedaan atau persamaannya. Adanya dugaan keterkaitan / hubungan kekerabatan (filogenetik) antara kambing Kacang dan kambing Marica menjadi hal penting untuk diketahui.

Untuk memperoleh informasi genetik kambing Kacang dan kambing Marica perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui keragaman genetik kedua jenis kambing tersebut. Metode untuk mempelajari keragaman genetik salah satunya adalah identifikasi DNA mitokondria (*mtDNA*) antara lain mengandung daerah kontrol atau *D-loop (Displacement Loop)* yang tidak mengkode protein, sehingga mutasi yang terjadi tidak mempengaruhi fungsi protein. Oleh karena itu, *D-loop* mempunyai tingkat polimorfisme yang paling tinggi pada *mtDNA*. Maka penelitian tentang karakterisasi genetik kambing lokal Sulawesi Selatan menggunakan DNA mitokondria yaitu D-Loop perlu dilakukan.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui keragaman genetik kambing Marica dan kambing Kacang di Sulawesi Selatan berdasarkan analisis penanda daerah D-loop dan diharapkan dapat memberikan informasi yang dapat digunakan sebagai strategis konservasi, pemurnian serta pengembangan perbaikan mutu genetik kambing Marica dan kambing Kacang.

TINJAUAN PUSTAKA

Kambing Marica

Kambing Marica yang terdapat di provinsi Sulawesi Selatan merupakan salah satu genotipe kambing asli Indonesia yang menurut laporan *Food and Agriculture Organization* (FAO) sudah termasuk kategori langka dan hampir punah (*endangered*) (Pamungkas dkk., 2009). Daerah populasi kambing Marica dijumpai di sekitar Kabupaten Maros, Kabupaten Jeneponto, Kabupaten Soppeng dan daerah Makassar di Propinsi Sulawesi Selatan (Pamungkas dkk., 2009).

Kambing Marica memiliki karakteristik yaitu bulunya berwarna coklat, hitam dan putih. Kepala dan telinganya berukuran kecil dan berdiri tegak. Tanduk kambing Marica berukuran pendek dan kecil. Bobot badan kambing Marica jantan pada saat mencapai dewasa tubuh sekitar $19,17 \pm 5,27$ kg dan bobot badan kambing Marica betina pada saat mencapai dewasa tubuh sekitar $20,88 \pm 6,61$ kg. Rata-rata tinggi pundak pada kambing Marica jantan yaitu $51,17 \pm 5,86$ cm dan pada betina yaitu $51,42 \pm 5,15$ cm. Jarak beranak pada kambing Marica antara 7-9 bulan sedangkan lama bunting pada kambing Marica yaitu 149-151 hari. Masa pubertas dicapai pada umur sekitar 8-12 bulan dan kambing Marica beranak pertama pada umur 26-28 bulan (Suswono, 2004). Kambing Marica mempunyai potensi genetik yang mampu beradaptasi baik di daerah agro-ekosistem lahan kering, yaitu daerah dengan curah hujan tahunan yang sangat rendah. Kambing Marica dapat bertahan hidup pada musim kemarau walau hanya memakan rumput-rumput kering di daerah tanah berbatu-batu (Pamungkas dkk., 2009). Ditinjau dari aspek produktifitas ternak kambing sangat potensial karena memiliki

kelebihan lain yaitu reproduksinya efisien dan dapat beranak tiga kali dalam dua tahun, memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan, tahan terhadap panas dan beberapa penyakit serta prospek pemasaran yang baik (Anggororatri, 2008). Namun pada daerah topografi tanah perbukitan dan berbatu-batu sekitar pantai, dengan kondisi rumput yang minim dan kering pada musim kemarau ternak kambing nampaknya dapat beradaptasi sangat baik (Pamungkas dkk., 2009).

Kambing Kacang

Salah satu rumpun kambing lokal Indonesia dan sebagai kekayaan sumber daya genetik ternak lokal Indonesia yang harus dilindungi dan dilestarikan, berasal dari Asia barat yang dibawa oleh pedagang ke Indonesia dan dikembangkan secara turun-temurun oleh masyarakat (Arifin, 2018). Kambing Kacang merupakan salah satu bangsa kambing lokal yang berpotensi baik dalam menghasilkan karkas dan non karkas (Kusuma dkk., 2013).

Karakteristik kambing Kacang yaitu warna bulunya berwarna putih, hitam, coklat, atau kombinasi ketiganya. Kepalanya berukuran kecil dan ramping dengan profil lurus. Telinganya berukuran sedang, tegak dan mengarah ke samping. Tanduk kambing Kacang jantan berbentuk melengkung ke belakang dan janggut yang dimiliki tumbuh bulu dengan baik. Sedangkan pada kambing Kacang betina memiliki janggut yang tidak begitu lebat. Bulu pada kambing Kacang yaitu berukuran pendek, pada jantan memiliki berbulu surai panjang dan kasar sepanjang garis leher sampai ekor. Ekor yang dimiliki oleh kambing Kacang yaitu pendek, kecil dan tegak (Suswono, 2012). Punggung kambing Kacang berbentuk lurus, beberapa kasus terlihat agak melengkung. Panjang badan

kambing Kacang jantan yaitu 58 ± 3 cm sedangkan pada betina $58,9\pm 5,6$ cm. Rata-rata bobot badan dewasa tubuh kambing Kacang jantan adalah $24,7\pm 6,1$ kg dan $21,6\pm 5,9$ kg untuk kambing Kacang betina. Umur pubertas kambing Kacang antara 5-6 bulan dan umur beranak pertama berkisar antara 16 - 20 bulan. Lama bunting pada kambing Kacang yaitu sekitar 5 bulan. Jumlah anak sekelahiran yaitu 1,2-1.5 ekor (Suswono, 2012).

DNA Mitokondria

Setiap sel mengandung satu hingga ratusan DNA mitokondria. DNA mitokondria merupakan DNA utas ganda yang berbentuk sirkuler (Freeland, 2005). Molekul mtDNA terbagi atas dua untai, yaitu untai berat atau heavy strand (H) yang banyak mengandung basa guanina dan untai ringan atau light strand (L) yang mengandung basa guanina lebih sedikit (Sharma et al. 2005; Hou et al. 2006).

DNA mitokondria (mtDNA) mempunyai beberapa kelebihan yang menjadikannya banyak digunakan untuk mengidentifikasi keanekaragaman genetik dan dinamika populasi. Beberapa kelebihan tersebut adalah memiliki ukuran yang kompak dan relatif kecil (16.000–20.000 pasang basa), tidak sekomplek DNA inti sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh, mtDNA berevolusi lebih cepat dibandingkan dengan DNA inti sehingga dapat memperlihatkan dengan jelas perbedaan antara populasi dan hubungan kekerabatannya (Park dan Moran, 1995).

Kelebihan lainnya yaitu mtDNA diwariskan secara maternal karena mitokondria dari sel sperma tidak ikut menembus sel telur pada saat fertilisasi. mtDNA yang diwariskan bukan merupakan hasil rekombinasi, sehingga

diversifikasi genetik hanya terjadi melalui mutasi. Setiap individu pada garis keturunan induk yang sama akan mempunyai tipe mtDNA yang identik (Pakendorf dan Stoneking, 2005). Bagian-bagian dari genom mitokondria berevolusi dengan laju yang berbeda, sehingga dapat berguna untuk studi sistematika dan penelusuran kesamaan asal-usul (Park dan Mohan, 1995).

Genom mitokondria hewan berukuran relatif kecil dan terdapat dalam jumlah banyak, maka eksplorasi rumpun dan penelaahannya lebih mudah (Duryadi, 1994). DNA mitokondria mewakili unsur genomik yang paling informatif untuk menguraikan asal usul ternak. Hingga kini, sekuens mitokondria secara luas telah dipelajari pada sapi, babi, domba, kuda, anjing, keledai, dan kambing. Studi identifikasi kambing domestik menggunakan mtDNA menghasilkan sedikitnya empat garis keturunan utama (Chen et al., 2005). Garis keturunan A adalah yang paling berbeda dan secara luas penyebarannya ke semua benua. Garis keturunan B dari timur dan Asia Selatan, mencakup Mongolia, Laos, Malaysia, Pakistan, dan India. Garis keturunan C dengan frekuensi rendah di Mongolia, Switzerland, Slovenia, Pakistan, dan India. Garis keturunan D jarang dan hanya diamati di Pakistan dan kambing lokal India (Chen et al., 2005)

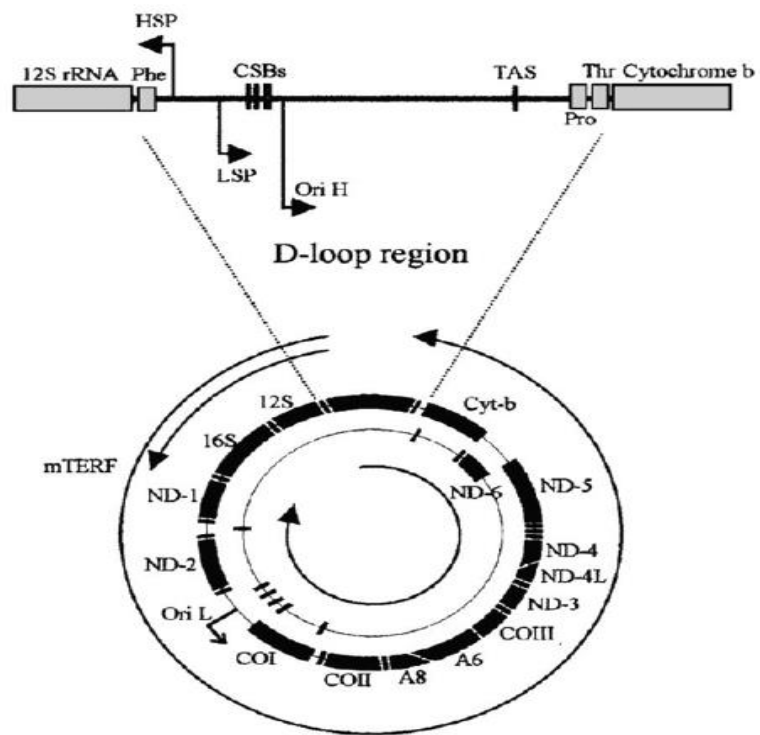
D-loop Mitokondria

Molekul *mtDNA* memiliki daerah yang disebut *displacement loop* atau *D-loop*. D-loop DNA mitokondria adalah *control region*, yaitu tempat yang mengatur replikasi rantai berat (H_o). Dinamakan D-loop karena pada fragmen tersebut terdapat fragmen DNA dengan struktur 3-rantai (membentuk hairpin) terbentuk akibat terciptanya rantai berat (H-stand) yang menggantikan rantai induk dan membentuk struktur tripleks D-loop (3-stand) (Clayton, 1992).

Daerah *D-loop* yang hipervariabel (mempunyai variasi basa yang cukup tinggi) terletak di luar segmen yang mempunyai fungsi transkripsi dan replikasi tersebut (Wood dan Phua, 1996), sehingga dapat digunakan untuk mengetahui silsilah dari suatu ternak dan hubungan kekerabatan (filogenetik) (Mannen *et al.*, 1998). Keunikan dari daerah D-Loop adalah memiliki tingkat polimorfisme yang tertinggi dalam mtDNA. Daerah D-Loop bersifat sangat variabel dan mempunyai laju evolusi lima kali lebih cepat dibandingkan daerah lain dalam genom mitokondria (Ratnayani dkk, 2007).

Daerah D-Loop bersifat sangat polimorfik dan memiliki tiga daerah hipervariabel yaitu Hipervariabel I (HVI), Hipervariabel II (HVII), dan Hipervariabel III (HVIII) dengan urutan sangat bervariasi antar individu. Tiga daerah ini memiliki laju mutasi yang lebih tinggi dari daerah *coding*. Laju mutasi sejauh ini diketahui 1:33 generasi, artinya perubahan urutan nukleotida hanya akan terjadi setiap 33 generasi. Individu yang terkait hubungan maternal akan memiliki urutan sekuen yang sama dan yang tidak terkait hubungan maternal akan berbeda (Hoong and Lex, 2005).

Daerah HVI, HVII, dan HVIII terletak di daerah kontrol, yang juga bertanggung jawab terhadap replikasi dan transkripsi *mtDNA*. Daerah kontrol terletak antara gen tRNA yang masing-masing mengkode asam amino prolin dan fenilalanin (Hoong and Lex, 2005). Oleh karena itu, daerah ini sering dianalisis dan sangat penting untuk digunakan dalam proses identifikasi individu. Daerah *D-loop* pada *mtDNA* dapat diamati pada Gambar 1.



Gambar 1. Skema Genom Daerah D-loop Kambing (Freeland, 2005)

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai Oktober 2019 di Kabupaten Maros dan Jeneponto Provinsi Sulawesi Selatan dan Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Ternak Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

Materi Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jarum jarum *venoject*, tabung *vacutainer* 10 ml, *cold box*, *vortex*, satu set pipet mikro dan makro, *tips*, tabung mikro 1.5 μ L, gelas ukur, gel tray, pencetak untuk sumur (*comb*), *power supply* 100 volt, *centrifuge*, tube penyaring, *freezer*, *stearer*, *magnet steerer* inkubator (*waterbath shaker*), mesin PCR, UV transiluminator, (Gel Documentation System) dan program *Molecular Evolutionary Genetic* (MEGA 6.0)

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel darah kambing Kacang dan kambing Marica yang dikoleksi secara acak di Kabupaten Maros dan Jeneponto (Tabel 2.), bahan ekstraksi DNA yaitu (*lysis buffer*, *proteinase K*, *wash buffer I*, *wash buffer II*, *elution buffer*, *ethanol absolute 96%*), bahan PCR (sampel DNA, primer *forward* dan *reverse* (Tabel 1.), *dNTP mix*, $MgCl_2$, enzim *Taq DNA polymerase*), bahan elektroforesis (*tris base*, *asam borat*, *agarose*, $Na_2 EDTA$, *ethidium bromide*, *marker DNA*, *DNA loading dye*).

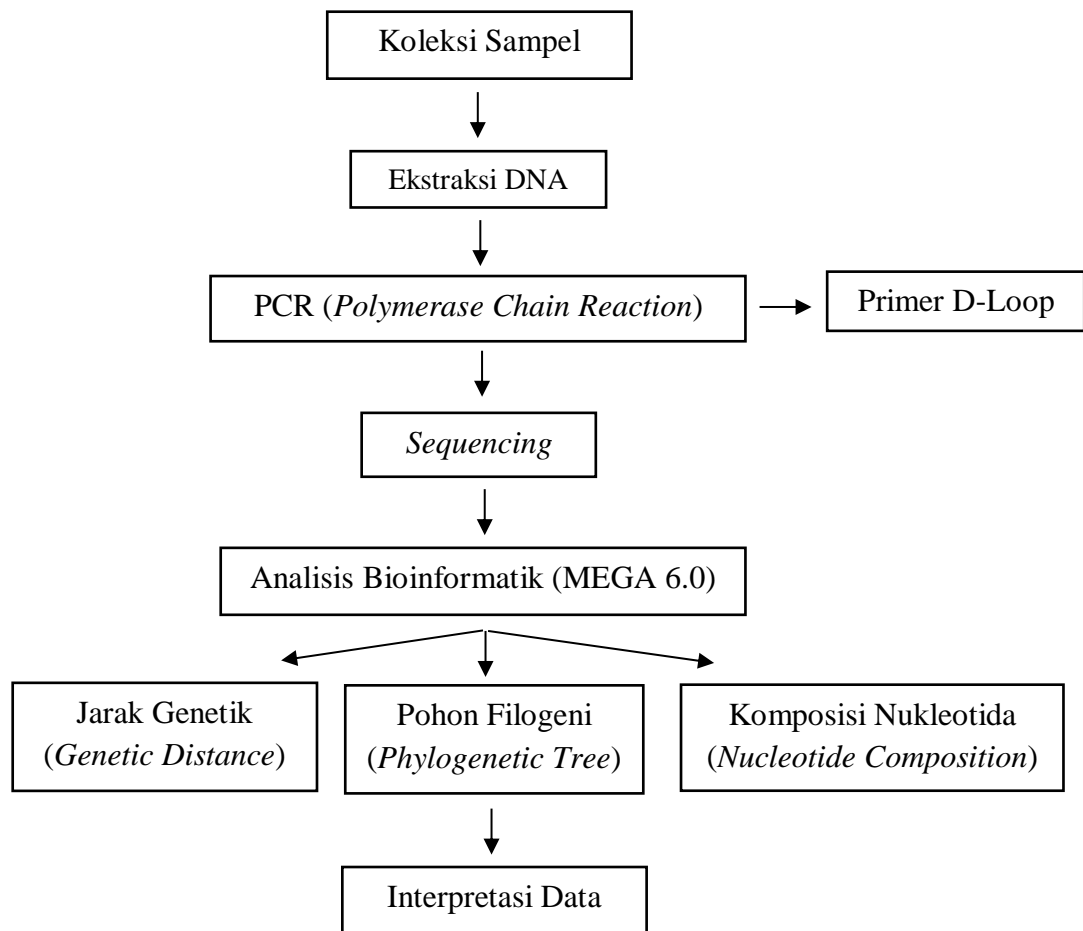
Tabel 1. Sequen Primer untuk PCR

Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Ukuran
5'-TCACTATCAGCACCCAAAGC-3'	5'-GGCATTTCAGTGCCTTGCT-3'	1213

Metode Pengambilan Data

Sampel darah kambing Marica dan kambing Kacang di Kabupaten Maros dan Jeneponto dikoleksi secara acak sedangkan penentuan hubungan kekerabatan genetik kambing Marica dan kambing Kacang didasarkan pada hasil sekuens DNA mitokondria pada daerah D-loop.

Prosedur Penelitian



Gambar 2. Diagram Alir Prosedur Penelitian

- Pengambilan Sampel

DNA yang diisolasi berasal dari sampel darah kambing Marica dan kambing Kacang di Kabupaten Jeneponto dan Kabupaten Maros dengan jumlah 116 ekor kambing (Tabel 2.)

Tabel 2. Jumlah Sampel Darah Ternak Kambing

Lokasi Sampling	Umur	Jenis Kambing				Jumlah (n)
		Marica		Kacang		
		Jantan (ekor)	Betina (ekor)	Jantan (ekor)	Betina (ekor)	
Maros	≥ 2 tahun	10	17	15	21	63
Jeneponto		16	8	4	25	53
Jumlah						116

Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari untuk mengurangi tingkat stres pada kambing. Terlebih dahulu dilakukan penentuan umur pada kambing Kacang dan kambing Marica melalui komposisi susunan gigi. Lalu, sampel darah kambing diambil sebanyak 0,3-0,5 ml dengan menggunakan jarum suntik berukuran 1 ml melalui pembuluh darah pada leher kambing (*vena jugularis*). Sampel darah kambing yang telah diambil dimasukkan ke tabung mikro 1,5 ml yang sudah ditambahkan alkohol absolute sebanyak 0,8 ml sebagai pengawet. Campuran kemudian dikocok hingga tercampur. Sampel kemudian disimpan dalam *coolbox* pada suhu ruangan (20-25°C) untuk sementara selama berada di lapangan, kemudian sampel dibawa ke Laboratorium dan disimpan dalam *freezer* untuk mempertahankan kondisi sampel agar tidak rusak.

- Ekstraksi DNA

Sebanyak 200 µl sampel darah dilisiskan dengan menambahkan 200 µl larutan *lysis buffer* dan 20 µl proitenase K (10 mg/ml), kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 60 menit di dalam *waterbath shaker*. Setelah inkubasi, larutan kemudian ditambahkan 200 µl *ethanol absolute* 96% dan disentrifugasi 15.000 x g selama satu menit.

Pemurnian DNA dilakukan dengan metode spin column dengan menambahkan 400 µl larutan pencuci wash buffer 1 pada yang kemudian

dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 15.000 rpm selama 30 detik. Setelah supernatannya dibuang, DNA kemudian dicuci lagi dengan 600 µl wash buffer II dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik. Setelah supernatannya dibuang, DNA kemudian dilarutkan dalam 200 µl elution buffer dan disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 30 detik. Pengecekan kualitas DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarose 1,5 % dengan buffer 1 × TBE (89 mM Tris, 89 mM asam borat, 2 mM Na₂ EDTA) yang mengandung 100 ng/ml *ethidium bromide* lalu divisualisasi pada UV transiluminator (*gel documentation system*).

- Amplifikasi mtDNA menggunakan PCR

Hasil ekstraksi DNA diamplifikasi dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan primer *forward* (5'-TCA CTA TCA GCA CCC AAAGC-3') dan primer *reverse* (5'-GGC ATT TTC AGT GCC TTGCT-3'). Komposisi reaksi PCR dikondisikan pada volume reaksi 25 µl yang terdiri atas 100 ng DNA, 0,25 mM masing-masing primer *forward* dan *reverse*, 150 µM dNTP, 2,5 mM Mg²⁺, 0,5 Taq DNA polymerase dan 1 × buffer.

Kondisi PCR mulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C × 4 menit, diikuti dengan 30 siklus berikutnya masing-masing denaturasi 94°C × 30 detik, dengan suhu annealing yaitu: 50°C × 30 detik, yang dilanjutkan dengan ekstensi: 72°C × 90 detik, yang kemudian diakhiri dengan satu siklus ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit dengan menggunakan mesin PCR. Produk PCR kemudian di elektroforesis pada gel agarose 1.5 % dengan buffer 1 x TBE (89 mM Tris, 89 mM asam borat, 2 mM Na₂ EDTA) yang mengandung 100 ng/ml

ethidium bromide. Kemudian divisualisasi pada UV transiluminator (*gel documentation system*).

- Perunutan DNA (*Sequencing*)

Hasil amplifikasi PCR hanya memberikan informasi mengenai ukuran DNA sampel yang ada tetapi belum mampu memberikan informasi mengenai perbedaan dan persamaan pada tingkat nukleotida. Oleh karena itu, DNA perlu dirunutkan. Hasil PCR dari ekstraksi DNA dipilih hasil yang terbaik untuk dilakukan proses *sequencing* yaitu perunutan DNA. Perunutan DNA menggunakan mesin sequencer ABI-Prism 3100-Avant *Genetic Analyzer* di Laboratorium Research and Development Centre PT. Genetika Science, Jakarta. Hasil perunutan DNA (*sequencing*) yang telah dianalisis kemudian di cek terlebih dahulu untuk memastikan bahwa hasil *sequencing* dari setiap sampel dapat dianalisis dalam program Clustal W yang terdapat pada software *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA 6.0). Hasilnya hanya 21 sampel yang terkualifikasi untuk analisis selanjutnya (Tabel 3.)

Tabel 3. Jumlah Ternak Kambing yang Berhasil di *Sequencing*

Lokasi Sampling	Umur	Jenis Kambing				Jumlah (n)
		Marica		Kacang		
		Jantan (ekor)	Betina (ekor)	Jantan (ekor)	Betina (ekor)	
Maros	≥ 2 tahun	3	2	4	3	12
Jeneponto		3	3	3	-	9
Jumlah						21

- Analisis Filogeni

Runutan nukleotida yang telah diedit kemudian disejajarkan (*alignment*) dengan menggunakan program Clustal W yang terdapat pada software *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA 6.0). Konstruksi pohon filogeni dilakukan

dengan menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA 6.0) berdasarkan nilai *p-distance* yaitu jumlah nukleotida yang berbeda dibagi dengan jumlah total nukleotida yang dibandingkan. Konstruksi pohon filogeni menggunakan metode *bootstrapped* (UPGMA) dengan 1000 kali pengulangan (Nei dan Kumar, 2000).

Analisis Data

1. Deskriptif

Menjelaskan / menggambarkan hubungan kekerabatan kambing Marica dan kambing Kacang melalui pohon filogeni.

2. *Sequencing* (Peruntutan DNA)

Meliputi penghitungan komposisi nukleotida, laju substitusi, jarak genetik berdasarkan ruas D-loop dengan menggunakan program *Clustal W* yang terdapat pada software MEGA 6.0.