

## Identifikasi Keragaman Gen Leptin pada sapi Bali dan kambing Kacang (*Polymorphism of Leptin Gene in Bali Cattle and Kacang Goat*)

Nining Syarifulaya<sup>1)</sup>, Made Sriasih<sup>2)</sup>, Maskur<sup>3)</sup>

- 1). Mahasiswa Pascasarjana Program Studi Sumberdaya Peternakan Program Pascasarjana Universitas Mataram
- 2). Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi;
- 3). Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Mataram, Jalan Majapahit No. 62 Mataram 83125  
e-mail: [nining\\_syarifulaya@yahoo.com](mailto:nining_syarifulaya@yahoo.com)

Diterima : 7 Maret 2015/ Disetujui: 27 Mei 2015

### ABSTRACT

The purpose of this research was to identify polymorphism of leptin gene in Bali cattle and Kacang goat by PCR-RFLP technique. Material used was blood samples collected from 50 head of Bali cattle and 50 head of Kacang goat. Identification procedure was consisted of three stages namely extraction of DNA genom, PCR amplication of leptin gene (552bp on intron 2-exon 3) and RFLP method using enzyme restriction (*BsaAI*). Primer sequences used were *forward* primer: 5'GTCTGGAGGCA AAGGGCAGAGT-3' and *reverse* primer: 5'CCACCACCTCTGTGGAGTAG-3'. Data analyzed were frequency of allele, genotype frequency, heterozygosity value, and value of *Polymorphic Informative Content* (PIC). The results of this study indicate that three genotypes (AA, AG and GG) were found on Bali cattle whilst only two genotypes (AA and AG) were on Kacang goat. The values of heterozygosity observation ( $H_o$ ) and expectation heterozygosity ( $H_e$ ) on Bali cattle were 0.08 and 0.48 respectively. Kacang goat showed the value of 0.14 ( $H_o$ ) and 0.14 ( $H_e$ ). The PIC value of Leptin-*BsaAI* gene on Bali cattle was 0.43 (moderate high), and on Kacang goat considered as low (0.13). These results showed than Leptin-*BsaAI* in Bali cattle and Kacang goat may be used as a genetic marker for selection.

**Key words:** genetic polymorphism, leptin gene, Bali cattle, Kacang goat

### PENDAHULUAN

Sapi Bali dan kambing Kacang merupakan sumber daya genetik yang perlu dikembangkan. Ke-ragaman performa tubuh baik pada sapi Bali dan kambing Kacang dipengaruhi oleh variasi genetik yang ada pada ternak tersebut, maka untuk meningkatkan performa tubuh sapi Bali dan kambing Kacang perlu dilakukan identifikasi keragaman gen dengan memanfaatkan teknologi molekuler yang sudah mulai berkembang saat ini. Pengukuran potensi ternak dapat diamati melalui sifat pertumbuhan yang banyak dikendalikan oleh gen. Salah satu gen penting yang mempengaruhi pertumbuhan sapi Bali dan kambing Kacang adalah gen *Leptin* (LEP). Leptin merupakan kandidat utama

sebagai marker genetik untuk sifat produksi (Maskur *et al.*, 2008).

Keanekaragaman gen mengakibatkan variasi antar individu sejenis. Keragaman genetik terdapat dalam suatu individu bilamana dua alel untuk gen yang sama merupakan perbedaan konfigurasi DNA yang menduduki lokus yang sama pada suatu kromosom (Indrawan *et al.*, 2007).

Strategi kandidat gen merupakan teknik biologi molekuler untuk mengidentifikasi lokus sifat kuantitatif secara langsung, dengan asumsi bahwa variasi genetik pada kandidat gen ini berpengaruh terhadap proses metabolisme sehingga mengakibatkan variasi sifat kuantitatif. Gen *Growth hormone* (GH), *Leptin* dan *Gen Pituitary Specific Positive*

*Transcription Factor1 (Pit1/Hinfl)* merupakan kandidat utama sebagai marker genetik untuk sifat produksi (Maskur *et al.*, 2008). *Leptin* memiliki massa sekitar 16 kDa yang disekresikan oleh jaringan adipose yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme serta memiliki peran penting dalam regulasi konsumsi pakan, kese-imbangan energi, kesuburan, pro-duksi susu dan fungsi kekebalan tubuh (Singh *et al.*, 2012).

Gen *Leptin* sapi terletak pada kromosom ke 4, dengan panjang 16,735 kb, meliputi 3 ekson dan kode protein dari 167 asam amino yang mencakup 21 urutan asam amino (Taniguchi *et al.*, 2002).

Polimorfisme gen leptin dapat mempengaruhi pengaturan gen dan mempengaruhi penambahan berat badan. Beberapa mutasi gen leptin pada sapi FH berasosiasi dengan produksi susu, konsumsi pakan dan konsentrasi plasma leptin selama kehamilan (Liefers, *et al.*, 2005). Pada domba, polimorfisme gen *Leptin* dapat mempengaruhi pertumbuhan otot, lemak dan kualitas karkas (Boucher *et al.*, 2006). Menurut Shojaei *et al.* (2010) polimorfisme gen leptin pada domba kermani dapat mempengaruhi sifat pertumbuhan dan dapat digunakan sebagai pengembangan seleksisecara genetik untuk meningkatkan berat badan.

*Leptin* berperan dalam perkembangan folikel dan pematangan oosit pada ovarium kambing (Batista *et al.*, 2013). Menurut

Maskur *et al.* (2008), pengembangan marker se-leksi dari beberapa kandidat gen yang berasosiasi dengan sifat produksi sapi Bali menunjukkan bahwa polimorfisme gen *Pit1-Hinfl* dan gen *Leptin-BsaA1* pada sapi Bali memiliki pengaruh yang signifikan terhadap berat lahir dan penambahan berat badan harian ternak.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen *Leptin* pada sapi Bali dan kambing Kacang dengan menggunakan metode PCR-RFLP. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi genetik dari sapi Bali dan kambing Kacang, sehingga gen *Leptin* dapat digunakan sebagai penciri genetik dalam pelaksanaan seleksi untuk sifat pertumbuhan sapi Bali dan kambing Kacang.

## MATERI DAN METODE

### Hewan percobaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Imunobiologi FMIPA Universitas Mataram menggunakan sampel darah 50 ekor sapi Bali dan 50 ekor kambing Kacang. Identifikasi keragaman gen *Leptin-BsaA1* dilakukan menggunakan teknik PCR-RFLP.

### Desain primer gen *Leptin*

Desain primer gen *Leptin-BsaA1* yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sekuen primer dan enzim restriksi gen *Leptin*

Jenis primer	Sekuen DNA	Enzim restriksi	Target leptin
<i>Leptin</i>	F:5'GTCTGGAGGCAAAGGGCAGAGT -3' R : 5' CCACCACCTCTGTGGAGTAG -3'	<i>BsaA1</i>	522 bp

Sumber : Choudhary *et al.*, 2005

### Ekstraksi DNA genom

Materi utama penelitian ini adalah DNA genom yang diperoleh dari darah sapi Bali dan kambing Kacang masing-masing sebanyak 50 ekor. DNA diisolasi dan dimurnikan menggunakan metode ekstraksi phenol chloroform untuk mende-gradasi protein dan lemak yang dipresipitasi menggunakan etanol absolut (Sambrook *et al.*, 1989).

### Amplifikasi DNA

Untuk menghasilkan fragmen DNA dari gen *Leptin* dilakukan amplifikasi dengan menggunakan primer yang diadopsi dari Choudhary *et al.*, 2005 (Tabel 1). Fragmen gen *Leptin* yang diamplifikasi dengan primer tersebut berukuran 522 bp.

Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Kondisi mesin

PCR dimulai dengan denaturasi awal pada berikutnya masing-masing denaturasi 94°C selama 5 detik, dengan suhu *annealing*: 64°C selama 30 detik, yang dilanjutkan dengan satu siklus ekstensi awal pada 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dengan menggunakan mesin PCR.

Produk PCR kemudian di elektro-foresis pada gel agarose 1,5% yang diwarnai dengan Ethidium Bromide (EtBr). Kemudian divisualisasi dengan proses elektroforesis dan pembacaan pita DNA dengan menggunakan *gel documentation system*.

**Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymer-phism (PCR-RFLP)**

Produk PCR yang diperoleh dari masing-masing gen target kemudian dianalisis menggunakan RFLP melalui pemotongan menggunakan en-zim restriksi yang memiliki situs pemotongan pada gen *Leptin-BsaAI*. Sebanyak 10 µL produk PCR; 1,5 µL NEBuffer (10x); ditambahkan 0,5 µL (0,25 unit) enzim restriksi *BsaAI*; ddH<sub>2</sub>O sebanyak 3 µl selanjutnya dilakukan inkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C. Kemudian divisualisasikan dengan elektro-foresis menggunakan gel agarose 2% pewarnaan dengan EtBr dan pembacaan pita DNA dengan menggunakan *gel documentation system*.

suhu 94°C x 5 menit, diikuti dengan 35 siklus **Analisa data**

Nilai frekuensi alel, frekuensi genotip, Heterozigositas pengamatan (Ho) dan Heterozigositas harapan (He) dihitung berdasarkan rumus Nei (1987). Nilai Keseimbangan Hardy-Weinberg dihitung dengan rumus Hartl dan Clark (1997) dan Nilai *Polymorphic Informative Content* (PIC) dihitung berdasarkan rumus Bostein *et al.* (1980).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

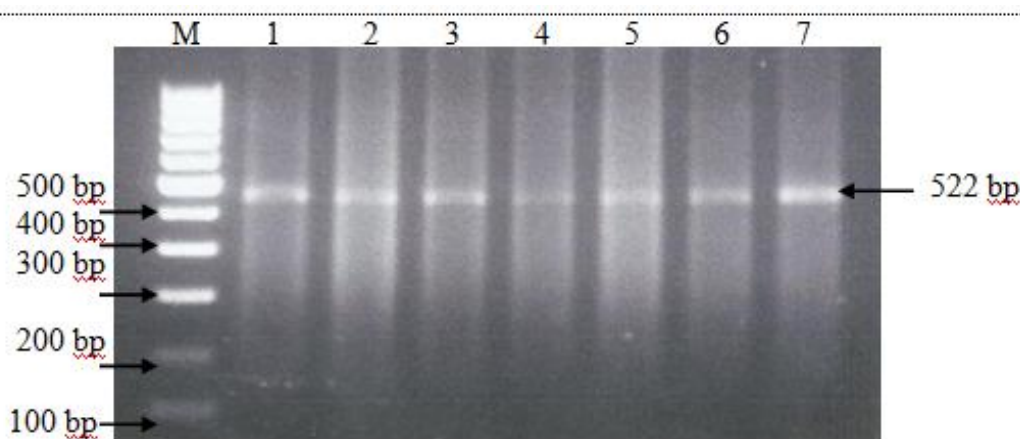
**Amplifikasi gen Leptin pada sapi Bali dan kambing Kacang**

Gen Leptin pada sapi Bali dan kambing Kacang berhasil di amplifikasi dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

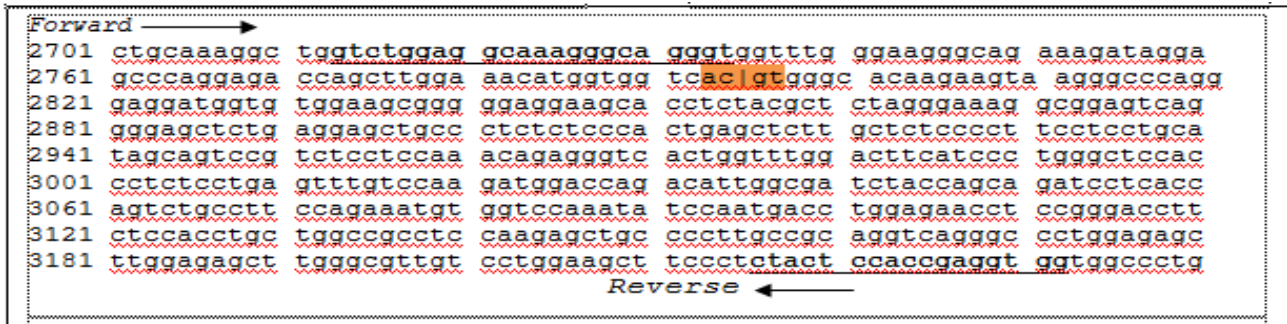
Panjang fragmen yang dihasilkan adalah 522 bp. Hasil amplifikasi gen Leptin yang dapat divisualisasikan pada gel *agarose* 1,5% dapat dilihat pada Gambar 1.

**Genotip gen Leptin pada sapi Bali dan kambing Kacang**

Gen Leptin terletak pada *Exon 3* dengan produk PCR berukuran 522 bp, yang selanjutnya dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *BsaAI*, pada situs ke 2793 dengan posisi titik potong AC|GT (Gambar 2).



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen Leptin dengan PCR pada gel *agarose* 1,5%.  
M: Marker 100 bp

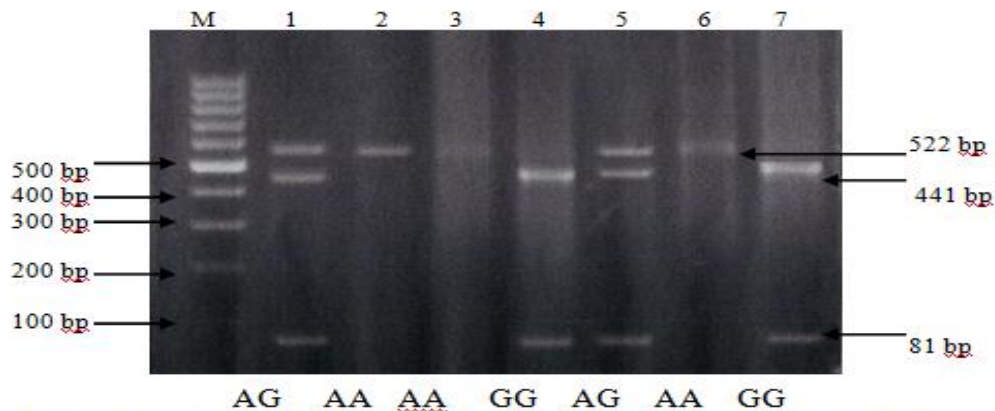


Gambar 2. Rumunan nukleotida gen *Leptin* *intron 2-exon3* dengan Kode akses GenBank: HE605298.1. Posisi primer menempel pada nukleotida yang bergaris bawah. situs pemotongan enzim *BsaAI* terletak pada huruf yang diarsir (ac|gt).

Pemotongan enzim *BsaAI* menghasilkan alel A dan alel G. Alel A berukuran 522 bp dan alel G berukuran 81 bp. Pada sapi Bali diperoleh 3 genotip yaitu AA dengan satu fragmen (522 bp), GG dengan dua fragmen (441 bp dan 81 bp) dan genotip AG dengan

menghasilkan tiga fragmen (522 bp, 441 bp dan 81 bp) (Gambar 3).

Genotip kambing Kacang yang dihasilkan pada penelitian ini adalah AA dengan fragmen 522 bp dan genotip AG dengan fragmen 522 bp, 441 bp dan 81 bp sedangkan genotip GG tidak ditemukan (Gambar 4).



Gambar 3. Visualisasi PCR-RFLP gen *leptin-BsaAI* dengan PCR pada gel *agarose* 2%. M : Marker 100 bp. 1-7 : sampel sapi Bali

Pemotongan pada lokus *BsaAI* terjadi karena mutasi yang menyebabkan enzim *BsaAI* mengenali daerah tersebut sebagai situs potong. Sebagai akibatnya, terdapat satu titik pemotongan enzim *BsaAI* yang menghasilkan 2 fragmen. Mutasi pada lokus ini diperkirakan adalah mutasi transisi yang menyebabkan terjadinya perubahan basa dari Guanin (G) menjadi Adenin (A) substitusi.

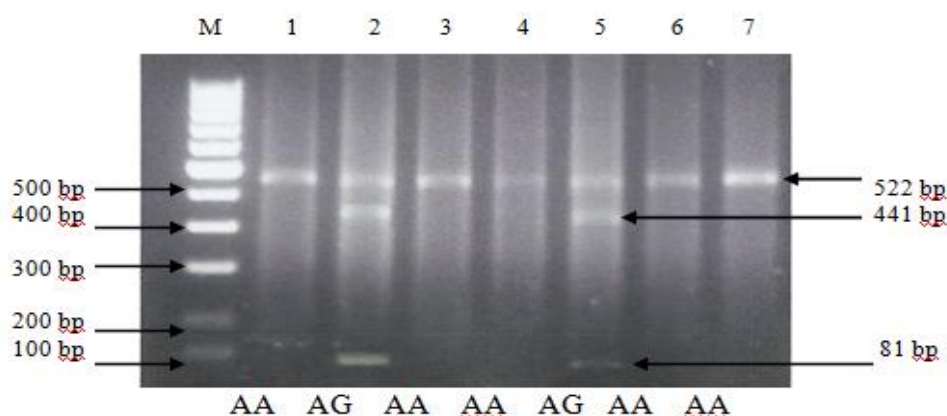
### Frekuensi alel dan frekuensi genotip

Frekuensi alel adalah frekuensi relatif dari suatu alel dalam populasi atau jumlah suatu alel terhadap total alel yang terdapat dalam suatu populasi (Nei dan Kumar., 2000). Nilai frekuensi alel dan frekuensi genotip gen *Leptin*

pada sapi Bali dan kambing Kacang disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil yaitu frekuensi alel untuk alel A pada sapi Bali (0,76) dan kambing Kacang (0,93), sedangkan frekuensi alel G pada sapi Bali (0,24) dan kambing Kacang (0,07). Dilihat dari data, frekuensi alel A lebih tinggi dari alel G baik pada sapi Bali dan kambing Kacang. Data ini menunjukkan bahwa populasi yang diamati be-ragam. Hal ini sesuai dengan pendapat Nei dan Kumar (2000) bahwa gen dikatakan polimorfik (beragam) apabila salah satu alel kurang dari 99%. Keragaman dapat ditunjukkan dengan adanya dua alel atau lebih dalam satu populasi.





Gambar 4. Visualisasi PCR-RFLP Gen Leptin (*Bsa41*) dengan PCR pada gel agarose 2%.  
M: Marker 100 bp. 1-7: sampel kambing Kacang

Tabel 2. Nilai frekuensi alel dan frekuensi genotip gen *Leptin* pada sapi Bali dan kambing Kacang

Populasi	Jumlah sampel	Frekuensi Alel		Frekuensi genotip			$\chi^2$ (HWE)	$\chi^2$ (0,05)
		A	G	AA	AG	GG		
Bali cattle	50	0.76	0.240	0.72	0.2	0.08	30.43*	5,991
Kacang goat	50	0.93	0.070	0.86	0.14	0.00	0.28 <sup>ns</sup>	3,841

Keterangan : \* =  $\chi^2$  hitung >  $\chi^2$  tabel 0,05 (tidak seimbang)

<sup>ns</sup> =  $\chi^2$  hitung <  $\chi^2$  tabel 0,05 (seimbang)

Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Azari *et al.* (2012) pada sapi *Mazandarani* menunjukkan frekuensi alel A (0,56) lebih tinggi diban-dingkan alel B (0,44). Sedangkan menurut Choudhary *et al.* (2005) pada *Bos indicus* dan *Bos Taurus* frekuensi alel G lebih tinggi diban-dingkan dengan alel A.

Frekuensi genotip AA pada sapi Bali lebih tinggi dibandingkan de-ngan genotip GG dan AG. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Azari *et al.* (2012) pada populasi sapi perah *Holstein* dan kerbau *Mazandarani* yang menunjukkan frekuensi genotip AB lebih tinggi dibandingkan dengan genotip AA dan BB. Sedangkan menurut Choudhary *et al.* (2005) pada *Bos indicus* dan *Bos Taurus*, frekuensi genotip AA lebih rendah dibandingkan dengan genotip GG dan AG.

Frekuensi genotip AA (0,86) pada kambing Kacang lebih tinggi di-bandingkan dengan genotip AG (0,14). Sedangkan genotip GG tidak ditemukan pada kambing Kacang. Hal ini disebabkan oleh peng-gabungan alel pada gen leptin terjadi secara acak, sehingga ge-

notip GG tidak ditemukan pada kambing Kacang.

### Keseimbangan Hardy-Weinberg

Pengujian keseimbangan Hukum Hardy-Weinberg pada populasi sapi Bali dan kambing Kacang dilakukan dengan menggunakan uji *chi-square* untuk mengetahui apakah data pengamatan diperoleh menyimpang atau tidak menyimpang dari yang diharapkan.

Pada penelitian ini (Tabel 2) nilai *chi square* pada sapi Bali (30,47) tersebut menunjukkan bahwa pada sapi Bali tidak berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg, Ketidak-seimbangan genetik dalam populasi sapi Bali diduga disebabkan oleh adanya kegiatan seleksi yang dilakukan oleh peternak. Pendugaan ini diperkuat oleh sampel darah sapi Bali yang digunakan pada penelitian ini merupakan peternakan sapi Bali yang dipelihara secara intensif serta proses perkawinan dalam populasi tidak terjadi secara acak. Nilai *chi square* yang dihasilkan pada

kambing Kacang (0,28). Hal ini menunjukkan bahwa populasi kambing Kacang yang diteliti berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg. Keseimbangan genetik dalam populasi kambing Kacang diduga disebabkan oleh karena belum adanya kegiatan seleksi yang dilakukan oleh peternak. Pendugaan ini diperkuat bahwa populasi kambing Kacang masih dipelihara secara tradisional, tidak pernah dilakukan seleksi dan kemungkinan terjadi perkawinan secara acak pada populasi kambing Kacang.

Suatu populasi dikatakan dalam keseimbangan Hardy-Weinberg yaitu jika frekuensi genotip dan frekuensi alel selalu konstan dari generasi ke generasi akibat penggabungan gamet yang terjadi secara acak dalam populasi besar (Vas-concellos *et al.*, 2003).

Keseimbangan genotip dalam populasi yang cukup besar terjadi jika tidak ada seleksi, mutasi, migrasi dan *genetic drift*. *Genetic drift* adalah perubahan frekuensi genotip yang

diakibatkan oleh fluktuasi acak akibat adanya peluang dalam pola perkawinan, kesalahan pengambilan sampel dan perubahan frekuensi mendadak akibat adanya faktor lingkungan (misalnya bencana alam). Sebaliknya jika terjadi akumulasi genotip, populasi yang terbagi, mutasi, seleksi migrasi dan perkawinan dalam kelompok yang sama (endogami), dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan genotip.

#### Nilai heterozigositas dan *polymorphic informative content* (PIC)

Menurut Nei dan Kumar (2000) keragaman genetik dapat diukur berdasarkan nilai heterozigositas. Nilai heterozigositas merupakan rataan persentase lokus heterozigot tiap individu atau rataan persentase individu heterozigot dalam populasi.

Hasil analisis pendugaan nilai heterozigositas dan PIC gen *Leptin* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai Heterozigositas dan PIC gen *Leptin* pada sapi Bali dan kambing kacang

Populasi	Jumlah sampel	Nilai heterozigositas		PIC
		Ho	He	
Sapi Bali	50	0,08	0,48	0,43
Kambing Kacang	50	0,14	0,14	0,13

Keterangan: Ho=heterozigositas pengamatan; He=heterozigositas harapan; PIC= *polymorphic Informative Content*

Pada sapi Bali, nilai Ho dan He yang dihasilkan masing-masing sebesar 0,08 dan 0,48, dimana nilai He lebih tinggi dari Ho. Pada kambing Kacang nilai Ho (0,14) dan He (0,14) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Kondisi ini mengindikasikan bahwa frekuensi genotip dari populasi kambing Kacang dalam keadaan keseimbangan. Tambasco *et al.* (2003) menyatakan bahwa jika terjadi perbedaan yang besar antara nilai heterozigositas pengamatan (Ho) dan nilai heterozigositas harapan (He), maka dapat dijadikan indikator adanya ketidakseimbangan genotip pada populasi yang dianalisis. Machado *et al.* (2003) menyatakan bahwa jika nilai heterozigositas pengamatan (Ho) lebih rendah nilai heterozigositas harapan (He) dapat mengindikasikan adanya derajat

endogami (perkawinan kelompok) sebagai akibat dari adanya proses seleksi yang intensif. Secara umum nilai heterozigositas harapan merupakan indikator yang baik sebagai penciri genetik yang dapat menjelaskan keragaman genetik pada suatu populasi ternak domestik. Nilai *Polymorphic Informative Content* (PIC) merupakan salah satu parameter yang menunjukkan tingkat informatif suatu penciri/marker. Hasil pendugaan nilai PIC gen *leptin-BsaA1* pada sapi Bali dan kambing Kacang masing-masing sebesar 0,43 dan 0,13. Menurut Botstein *et al.* (1980) menyatakan bahwa kriteria PIC termasuk dalam kelompok rendah jika nilai PIC < 0,25, nilai PIC termasuk kategori sedang adalah antara 0,25-0,5 dan termasuk kategori tinggi bila nilai PIC > 0,5.

Berdasarkan pernyataan tersebut maka nilai PIC gen leptin-*BsaAI* pada sapi Bali termasuk kategori sedang dan nilai PIC pada kambing kacang termasuk kategori rendah. Dengan demikian gen leptin-*BsaAI* pada sapi Bali pada penelitian ini mempunyai tingkat informasi genetik yang lebih tinggi dari pada

kambing Kacang. Sapi Bali memiliki potensi lebih tinggi sebagai penciri genetik gen Leptin dibandingkan dengan kambing Kacang. Semakin besar nilai PIC suatu primer maka primer tersebut semakin baik untuk digunakan sebagai penanda molekuler.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Gen leptin pada sapi Bali dan Kambing Kacang bersifat polimorfik. Gen leptin menunjukkan bahwa terdapat keseimbangan populasi genotip pada kambing Kacang dan pada sapi Bali tidak terjadi keseimbangan populasi genotip. Nilai informasi genetik pada kambing Kacang dan sapi Bali dikategorikan rendah sampai sedang. Berdasarkan hasil tersebut gen Leptin-*BsaAI* pada sapi Bali dan kambing kacang dapat digunakan sebagai penciri/marker untuk kegiatan seleksi.

### Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh gen leptin terhadap kandidat gen yang berasosiasi dengan sifat produksi pada sapi Bali dan kambing Kacang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Azari M, Hasani S, Heidari M, Yousefi S. 2012. Genetic Polymorphism of Leptin Gene Using PCR-RFLP Method in Three Different Populations. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Iran. ISSN 1337-9984.
- Batista AM, Silva DM, Rêgo MJ, Silva FL, Silva EC, Beltrão EI, Gomes Filho MA, Wischral A, Guerra MM. 2013. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. Anim Reprod. Sci. doi: 10.1016/j.anireprosci. 2013.08.007. Epub 2013 Aug 22.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, and Davis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314–331.
- Boucher D, Palin MF, Castonguay F, Gariépy C, Pothier F. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptine (*LEP*) gene: association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. Canadian Journal of Animal Science. 86, 31-35.
- Choudhary V., Kumar P., Bhattacharya T. K., Bhushan B. and Sharma A. (2005) DNA polymorphism of *leptin* gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. Genetics and Molecular Biology 28: 740-742.
- Hartl DI dan Clark AG. 1997. Principles of Population Genetics 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates. Inc. Publishers. Sunderland. Massachusetts.
- Indrawan, M., R.B. Primack dan J. Supriatna. 2007. Biologi Konservasi. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Liefers, S.C., R.F. Veerkamp, M.F.W. Te Pas, C. Delavaud, Y. Chilliard, M. Platje, T. van der Lende. 2005. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. Animal Genetics. 36 : 111 – 118.
- Machado MA, Schuster I, Martinez ML. Compus AL. 2003. Genetic diversity of four breed using microsatellite marker. Rev. Bras De Zoo 32. 93-98.
- Maskur, C. M. Kertanegara. N. Hilmiati. 2008. Pengembangan Marker Seleksi Dari Beberapa Kandidat Gen yang Berasosiasi dengan Sifat Produksi Sapi Bali. Badan Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) NTB.
- Nei M. and Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University, Press.
- Sambrook J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. CSH laboratory Press. USA.

- Shojaei M, M. Reza, M. Abadi, M. Asadi F., Omid D, Amin K. and Masoumeh A. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman. *Journal of Cell and Molecular Research* (2010) 2 (1), 67-73
- Singh Umesh, Kumar S, Deb R. 2012. Monograph on bovine leptin gene: A Biomarker Associated with Dairy Milk Production. ISBN: 978-3-659-13582-8, Lambert Academic Publishing, Germany (In press).
- Taniguchi Y, Itoh T, Yamada T, Sasaki Y. 2002. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. *IUBMB Life*.;53:131-5
- Vasconcellos LPMK, Talhari DT, Pareira AP, Coutinho LL, Regitano LCA. 2003. Genetic characterization of aberden angus cattle using molecular markers. *Genet Mol Biol* 26 : 133-137