

**STUDI IDENTIFIKASI GEN *TYROSINASE* (TYR) PADA
KUCING ODD EYE DENGAN METODE
PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

SKRIPSI

Oleh:
DYASTI ARDA P
135130100111019



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**STUDI IDENTIFIKASI GEN *TYROSINASE* (TYR) PADA
KUCING ODD EYE DENGAN METODE
PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
DYASTI ARDA P
135130100111019



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI IDENTIFIKASI GEN *TYROSINASE* (TYR) PADA KUCING ODD
EYE DENGAN METODE PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Oleh:
DYASTI ARDA P
135130100111019

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 27 Desember 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES
NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dyasti Arda P
NIM : 135130100111019
Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Studi Identifikasi Gen *Tyrosinase* (TYR) pada Kucing Odd Eye dengan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 12 Januari 2018

Yang menyatakan,

Dyasti Arda P
NIM.135130100111019

Studi Identifikasi Gen *Tyrosinase* (TYR) pada Kucing Odd Eye dengan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

ABSTRAK

Odd eye ditandai dengan salah satu mata kucing berwarna biru dan mata lainnya berwarna hijau atau oranye. Warna mata dipengaruhi oleh sintesis dan distribusi melanin pada iris. Perbedaan warna mata diduga akibat pengaruh berbagai gen pigmentasi salah satunya adalah gen *Tyrosinase*. *Tyrosinase* (TYR) merupakan gen memberikan instruksi untuk membuat sebuah enzim yang dinamakan *tyrosinase*. Enzim ini terletak di melanosit, yang berfungsi mengatur biosintesis melanin. Melanosit merupakan sel yang menghasilkan melanin, dan melanin merupakan bahan yang memberikan warna pada mata, kulit, dan rambut. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa gen TYR berdasarkan sekuen gen pada kucing. Gen TYR diisolasi dari sampel darah dan diamplifikasi menggunakan metode PCR dengan Primer TYR_F 5'-CATCACGCTGTCCAAAGCTC-3' dan TYR_R 5'-ATTTTCAGACCCTCCAAGCA-3'. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan metode *Sanger*. Analisa sekuen gen dilakukan dengan menggunakan *software Sequence Scanner*, *software MEGA*, *software BioEdit*, dan NCBI BLAST untuk mengetahui homologi sekuen gen TYR pada kucing odd eye, dan kucing non odd eye. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan sekuen DNA pada urutan 664 sampel kucing odd eye terhadap sampel kucing non odd eye dan sekuen gen TYR *Felis catus* dari NCBI, urutan sekuen ke 664 yaitu basa sitosin (C) menjadi timin (T) (c.664 C>T) dengan mutasi transisi melalui efek *silent mutation*, dan tidak merubah susunan asam amino, dimana kodon GTC menjadi GTT tetap menyandi asam amino valin (V). Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat perbedaan sekuen nukleotida gen TYR, namun tidak berdampak pada susunan asam amino.

Kata kunci: Kucing, Odd eye, gen TYR, PCR.

Study of Identification on Gene Tyrosinase (TYR) in Odd-Eyed Feline by PCR (Polymerase Chain Reaction) Method

ABSTRACT

An odd eye is marked by one of the cat's eye coloured blue and the other is either green or orange. Eye colour is affected by the synthesis and distribution of melanin in iris. The difference of eye colour is suspected because of the influence of pigmentation genes, one of them is Tyrosinase gene. Tyrosinase is a gene that provides instruction for making an enzyme called tyrosinase. This enzyme is located in melanocytes, which can controls melanin biosynthesis. Melanocytes is a cell that creates melanin, and melanin is a material that gives colour to eye, skin, and hair. The aim of this study is to analyze TYR gene based on gene sequence in feline. TYR gene is isolated from the blood sample and amplified using PCR method with primers TYR_F 5'-CATCACGCTGTCCAAAGCTC-3' dan TYR_R 5'-ATTCAGACCCTCCAAGCA -3'. Sequencing was performed with the same primer using Sanger method. The gene sequence was analysed using Sequence Scanner software, MEGA software, Bioedit software and NCBI BLAST to determine the homology of TYR sequence gene in the odd-eyed feline and non-odd-eyed feline. The research result showed there is difference between DNA sequence on 664th of odd-eyed feline sample to an odd-eyed feline and TYR gene sequence of *Felis catus* from NCBI, the 664th sequenced is cytosine (C) base changes to thymine (T) (c.664 C>T) with transition mutation through silent mutation effect and it doesn't influence the change of amino acid sequence, where GTC codon becomes GTT is still coding valine (V) amino acid. This research can be concluded that although there is sequence difference in TYR gene but it has no effects on protein sequence.

Keywords: Feline, Odd eye, TYR gene, PCR.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “**Studi Identifikasi Gen Tyrosinase (TYR) pada Kucing Odd Eye dengan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction)**”.

Penulis menyampaikan penghargaan setinggi-tingginya kepada seluruh pihak yang terlibat dalam penyusunan skripsi dan secara khusus penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES selaku pembimbing I dan drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan kepada penulis.
2. drh. Aulia Firmawati, M.Vet dan drh. Albiruni Haryo, M.Sc selaku dosen penguji.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan FKH UB.
4. Keluarga tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan, dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
5. Tia Sundari, Ristanti Putri, Regy Marandita, Laylia Roziqoh, Andrea Puput, Novita Sari, Maya Rosida, dan Ratna yang memberikan bantuan, saran, dukungan, dan semangat

6. Seluruh kolega dan civitas akademika FKH UB yang telah terlibat dalam kelancaran pembuatan skripsi.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan dapat menambah pengetahuan baik bagi penulis maupun bagi pembaca, Aamiin.

Malang, 12 Januari 2018

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kucing	5
2.2 Klasifikasi dan Morfologi Kucing	6
2.3 Anatomi Mata Kucing	7
2.4 Warna Mata Kucing	9
2.5 Gen <i>Tyrosinase</i> (TYR)	11
2.6 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	12
2.6.1 Teknik Dasar Amplifikasi PCR	13
2.6.1.1 Denaturasi Untai Ganda DNA	13
2.6.1.2 Primer <i>Annealing</i>	14
2.6.1.3 DNA <i>Polymerase Extension</i>	15
2.7 Sekuensing DNA	15
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konseptual	17
3.2 Bagan Kerangka Konseptual	18
3.3 Hipotesis Penelitian	18
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	19
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
4.2 Alat dan Bahan	19
4.3 Tahapan Penelitian	20
4.4 Rancangan Penelitian	20
4.5 Prosedur Kerja	21
4.5.1. Pemilihan dan Pengambilan Sampel Darah Gajah Sumatera	21
4.5.2. Isolasi DNA	22
4.5.3. Uji Kuantitas dan Kualitas DNA	23

4.5.3.1. Uji Kuantitas DNA.....	23
4.5.3.2. Uji Kualitas DNA.....	23
4.5.4. Desain Primer.....	24
4.5.5. Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	25
4.5.6. Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR.....	25
4.5.7. Purifikasi Produk PCR.....	26
4.5.8. Sekuensing DNA.....	26
4.5.9. Analisa Data.....	27
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
5.1 Isolasi DNA dari Darah Kucing.....	28
5.2 Amplifikasi Gen TYR dengan Metode PCR.....	30
5.3 Sekuensing Gen TYR.....	33
5.4 Analisa Sekuen DNA dan Asam Amino Gen TYR.....	37
5.5 Regulasi Gen TYR terhadap Perbedaan Warna Mata.....	42
BAB 6. PENUTUP.....	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN.....	48



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1. Konsentrasi dan Kemurnian DNA Darah Kucing.....	28
5.2. Program PCR untuk Amplifikasi Gen TYR.....	30
5.3. Urutan Oligo Nukleotida Primer Gen TYR	30
5.4. Konsentrasi dan Kemurnian Purifikasi Produk PCR	32



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Anatomi mata.....	8
3.1. Kerangka konsep penelitian	19
5.1. Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%)	29
5.2. Origin Oligo Nukleotida Gen TYR.....	30
5.3. Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%)	31
5.4. Hasil Elektroforesis Purifikasi Produk PCR Agarosa 2%	33
5.5. Alignment TYR Nukleotida Sampel O (Query) terhadap Urutan Nukleotida dari Database (Sbjct)	35
5.6. Alignment TYR Nukleotida Sampel N (Query) terhadap Urutan Nukleotida dari Database (Sbjct)	36
5.7. Penyejajaran antara Sekuen DNA sampel Kucing Odd eye dan Kucing Non Odd eye terhadap 3 referensi dengan <i>Program ClustalW</i> <i>BioEdit</i>	37
5.8. Analisa Hasil Sekuensing Sampel Kucing Odd eye (a), dan Kucing Non Odd eye (b) menggunakan <i>Software Sequence Scanner</i>	38
5.9. Penyejajaran Asam Amino antara Kucing Odd eye dan Non Odd eye terhadap 3 Referensi dengan Program <i>CrustalW Bioedit</i>	39
5.10. Urutan Kodon Pembentuk Asam Amino Gen TYR (Locus AY743343.1) terhadap Sampel Kucing Odd eye.....	40
5.11. Urutan Kodon Pembentuk Asam Amino Gen TYR (Locus AY743343.1) terhadap Sampel Kucing Non Odd eye.....	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Laik Etik.....	49
2. Protokol Isolasi DNA <i>DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit</i>	50
3. Cara Desain Primer	51
4. Pembacaan Hasil Sekuensing menggunakan Software Sequence Scanner.....	56
5. BLAST NCBI	58
6. Pembacaan Hasil Sekuensing menggunakan Software MEGA	60
7. Pembacaan Hasil Sekuensing menggunakan BioEdit Tools.....	62
8. Grafik Elektroferogram.....	65
9. Kerangka Operasional Penelitian	66



DAFTAR SINGKATAN

Simbol/ Singkatan	Keterangan
%	: Persen
°C	: Derajat Celcius
μL	: Mikrometer
BLAST	: <i>Basic Local Agligment Search Tool</i>
bp	: <i>Base pair</i>
CDS	: <i>Complete DNA Sequence</i>
ddH ₂ O	: <i>Doubele distilled water</i>
ddNTPs	: <i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	: <i>Triphospat deoxynucleoside</i>
EtBr	: <i>Etidium bromida</i>
g	: Gram
Kb	: Kilobase
Kg	: Kilogram
Mg	: Magnesium
NCBI	: <i>National Centre for Biotechnology Information</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SNP	: <i>Single nucleotide polymorphism</i>
TYR	: <i>Tyrosinase</i>
TBE	: <i>Tris Borat EDTA</i>
Tm	: <i>Melting temperature</i>
Uv	: Ultraviolet

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hewan kesayangan dari anggota karnivora yang banyak dipelihara oleh masyarakat salah satunya, yaitu kucing. Kucing telah mengalami domestikasi dan hidup dalam simbiosis mutualistik dengan manusia. Kucing yang telah mengalami domestikasi dikenal sebagai kucing domestik dengan nama ilmiah *Felis catus* atau *Felis domesticus* merupakan kucing hasil evolusi kucing liar yang beradaptasi dengan lingkungan, dan dekat dengan manusia sepanjang ribuan tahun usia kehidupan. Proses adaptasi ini menghasilkan jenis kucing yang berbeda di berbagai wilayah (Case, 2003).

Kucing memiliki salah satu keunikan berupa perbedaan warna mata yang disebut odd eye. Odd eye atau *complete heterochromia* merupakan suatu kondisi dimana salah satu iris memiliki warna yang berbeda dengan iris lainnya, sebagai contohnya salah satu mata berwarna biru dan lainnya berwarna hijau ataupun oranye. Odd eye terjadi sejak lahir atau sebagai pewarisan sifat (hereditas). Perbedaan warna mata disebabkan oleh pigmen yang dipengaruhi oleh gen yang terlibat dalam sintesis melanin (Genetic Home Reference, 2007). Melanin berpengaruh terhadap pigmentasi pada mata kucing.

Studi tentang pigmentasi warna mata memberikan peran penting terhadap pengetahuan adanya interaksi evolusi, genetika, dan perkembangan biologi. Fungsi pigmentasi sebagai penanda fenotip telah dilakukan lebih dari

100 tahun dan telah menghasilkan berbagai kandidat gen yang berperan dalam mekanisme perkembangan fenotip (Hoekstra, 2006). Salah satu gen yang berperan penting dalam sintesis melanin pada mamalia adalah gen *Tyrosinase* (TYR). Gen *Tyrosinase* memberikan instruksi untuk membuat sebuah enzim yang dinamakan *tyrosinase*. Enzim ini terletak di melanosit, yang berfungsi mengatur biosintesis melanin. Pigmen melanin akan memproduksi eumelanin dan feomelanin yang akan bertanggung jawab terhadap warna mata, warna rambut, dan warna kulit. Pigmen melanin juga ditemukan di jaringan yang peka cahaya di bagian retina, dan berperan dalam penglihatan normal (Genetic Home Reference, 2007).

Identifikasi gen TYR untuk menentukan perbedaan warna mata pada kucing odd eye sampai saat ini belum banyak diteliti. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk menganalisa perbedaan susunan sekuen gen TYR pada kucing odd eye, dan kucing non odd eye. Analisa gen TYR dilakukan dengan metode PCR untuk mengetahui perbedaan sekuen gen TYR pada kucing odd eye, dan kucing non odd eye.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana perbedaan gen warna mata kucing odd eye dengan kucing non odd eye berdasarkan identifikasi sekuen gen *Tyrosinase* (TYR) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)?

1.3. Batasan Masalah

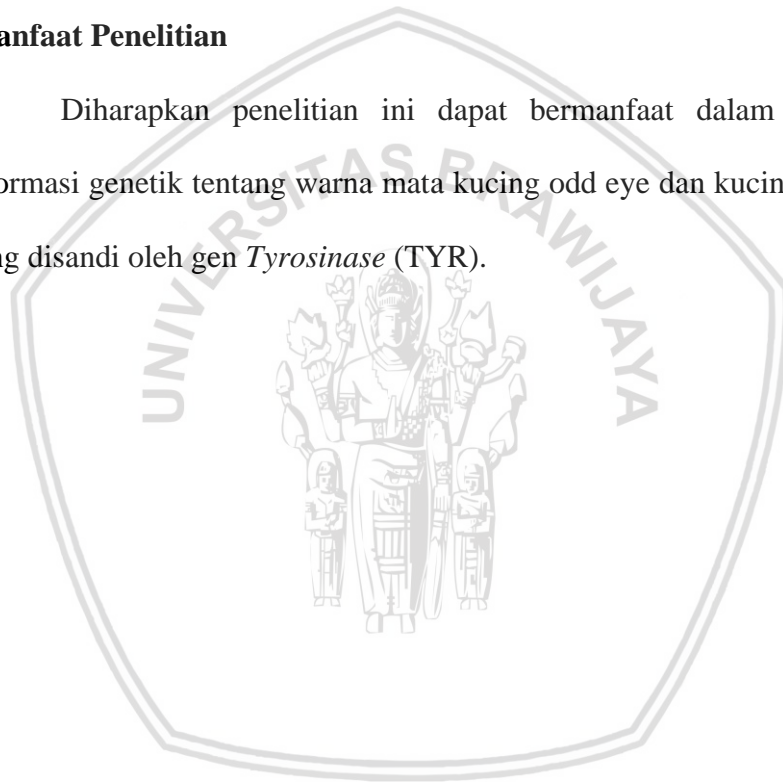
1. Sampel yang digunakan adalah sampel darah dari kucing odd eye dan kucing non odd eye yang memiliki warna rambut putih (*white solid*).
2. Gen TYR di isolasi dari sampel darah kucing odd eye dan kucing non odd eye menggunakan kit isolasi DNA (*DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit*).
3. Amplifikasi DNA gen *Tyrosinase* (TYR) kucing dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *Forward* (TYR_F) 5'-CATCACGCTGTCCAAAGCTC-3' dan *Reverse* (TYR_R) 5'- GATTCAGACCCTCCAAGCA -3' *Felis catus*. Desain primer menggunakan software Primer3Plus.
4. Metode PCR dilakukan dengan mesin *SensoQuest Thermocycler* dengan program: predenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 51,5°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, dan *post extension* 72°C selama tujuh menit.
5. Sekuensing DNA dilakukan dengan memilih satu sampel kucing odd eye, dan satu sampel kucing kucing non odd eye dengan metode dideoksi sanger berdasarkan *dye terminator labelling* dengan menggunakan sepasang primer *Forward* (TYR_F) 5'-CATCACGCTGTCCAAAGCTC-3' dan *Reverse* (TYR_R) 5'- GATTCAGACCCTCCAAGCA -3'.
6. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA antara kucing odd eye, dan kucing non odd eye menggunakan program *Sequence Scanner*, MEGA, *Bioedit*, dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan sekuen gen TYR (gen warna mata) kucing odd eye dengan kucing non odd eye dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

1.5. Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini dapat bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik tentang warna mata kucing odd eye dan kucing non odd eye yang disandi oleh gen *Tyrosinase* (TYR).



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kucing

Kucing telah mengalami domestikasi dan hidup dalam simbiosis mutualistik dengan manusia. Domestikasi pertama yang dilakukan manusia terjadi pada tahun 4000 SM di Mesir, ketika kucing dimanfaatkan sebagai hewan penjaga. Hubungan manusia dengan kucing sudah dimulai dari 8000 SM ketika manusia masih hidup nomaden (Kane, 2001). Kucing yang telah mengalami domestikasi dikenal sebagai kucing domestik dengan nama ilmiah *Felis catus* atau *Felis domesticus* merupakan kucing hasil evolusi kucing liar yang beradaptasi dengan lingkungan, dekat dengan manusia sepanjang ribuan tahun usia kehidupan. Proses adaptasi ini menghasilkan jenis kucing yang berbeda di berbagai wilayah (Case, 2003).

Perkembangan evolusi keluarga kucing terbagi dalam tiga kelompok, yaitu *Panthera*, *Acinonyx*, dan *Felis*. *Felis* adalah jenis kucing kecil, salah satunya *Felis sylvestris* yang kemudian berkembang menjadi kucing *modern* (Suwed, 2006). Terdapat juga ras kucing yang terjadi akibat mutasi gen secara alami ataupun perkawinan silang. Ras kucing dapat dibedakan berdasarkan kondisi rambut, yaitu kucing *short hair*, *semi-long hair*, variasi *semi-long hair*, *long hair*, dan kucing tidak berambut seperti kucing *Sphinx*. Jenis kucing ras yang banyak ditemukan di Indonesia antara lain: Anggora, Persia, *Exotic Sorthair*, Himalayan, *American Sorthair*, *Maine Coon*, *Sphynx*, *Ragdoll*, *Scottish Fold*, *Siamese*, dan Bengal (Kane, 2001).

2.2. Klasifikasi dan Morfologi Kucing

Kucing termasuk keluarga *Felidae*, termasuk di dalamnya spesies kucing besar seperti singa, harimau dan macan. Kucing tersebar secara luas di seluruh Eropa, Asia Selatan dan Tengah, dan Afrika. Saat ini, kucing merupakan salah satu hewan peliharaan terpopuler di dunia (Suwed, 2006). Klasifikasi biologi kucing (*Felis catus*) berdasarkan Suwed (2011) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Carnivora
Famili	: Felidae
Subfamili	: Felinae
Genus	: Felis
Spesies	: <i>Felis catus</i>

Seekor kucing mempunyai panjang sekitar 76 cm dengan berat badan yang sangat bervariasi antara 2,5 – 7 kg. Kucing memiliki indera penciuman yang tajam karena dilengkapi dengan alat khusus yaitu organ vomeronasal atau organ jacobson. Kucing tidak hanya dilengkapi dengan indera penciuman yang tajam, kucing juga sensitif pada bunyi berfrekuensi tinggi yaitu 60 kHz sehingga dapat mendengar pekikan ultrasonik (Suwed, 2006).

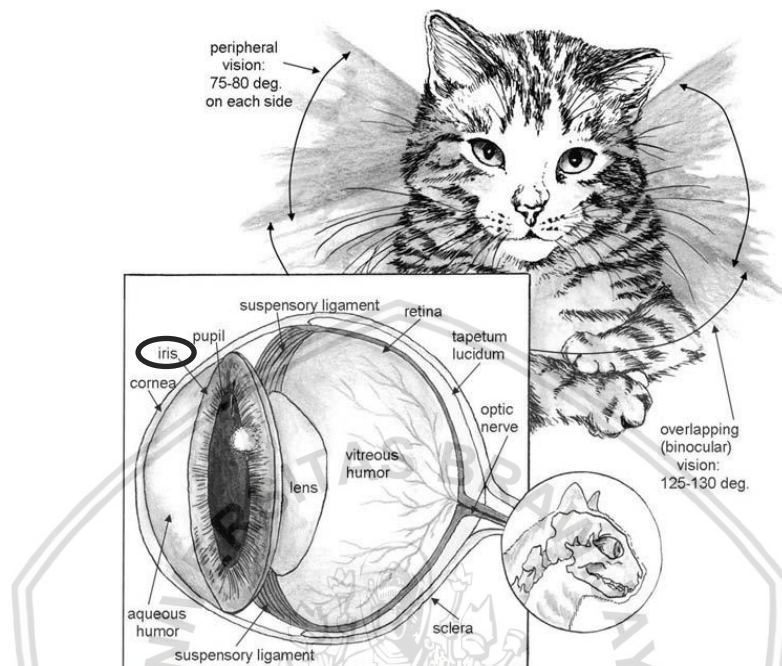
2.3. Anatomi Mata Kucing

Mata merupakan organ fotosensoris yaitu organ yang menerima rangsangan cahaya. Cahaya masuk melintasi kornea, lensa, dan beberapa struktur refraksi di dalam orbita. Cahaya kemudian difokuskan oleh lensa ke bagian saraf mata yang sensitif terhadap cahaya yaitu retina. Retina mengandung sel-sel batang dan kerucut yang akan mengubah impuls cahaya menjadi impuls saraf (Ross, 2011).

Kucing memiliki ukuran mata berkisar 8 inci (20 cm). Kornea atau lapisan terluar bola mata kucing cukup besar sehingga memungkinkan lebih banyak cahaya yang masuk ke bagian belakang mata. Sklera merupakan bagian yang putih melingkupi lima-perenam bagian bola mata dan terletak di sebelah belakang, sementara kornea merupakan bagian yang jernih, dan transparan melingkupi seperenam bagian depan bola mata. Konjungtiva merupakan membran mukosa jernih yang melapisi permukaan dalam kelopak mata (*konjungtiva palpebra*), dan menutupi permukaan sklera pada bagian depan bola mata (*konjungtiva bulbi*) (Eldredge, 2008).

Iris merupakan bagian yang paling depan dari lapisan uvea. Celah di antara iris disebut pupil. Fungsi iris untuk mengatur jumlah cahaya yang masuk ke bagian posterior bola mata melalui pupil dengan cara mengatur ukuran diameter pupil, dan mewarnai mata. Iris terbagi menjadi dua lapisan yaitu lapisan anterior dan lapisan posterior. Stroma iris terdapat di lapisan anterior. Lapisan posterior atau *Iris Pigment Epithelium* (IPE) terdiri dari

double layer sel pigmen kuboid yang menyatu. Epitel pigmen posterior merupakan penentu penting warna mata (Rennie, 2012).



Gambar 2.1 Anatomi mata (Eldredge, 2008).

Retina merupakan lapisan terdalam bola mata, mengandung sel-sel fotoreseptor yaitu sel-sel batang dan sel kerucut. Sel batang bereaksi terhadap intensitas cahaya yang memungkinkan kucing melihat warna hitam, putih, dan abu-abu. Sel kerucut merupakan sel fotoreseptor yang peka terhadap warna. Perbandingan antara jumlah sel batang dan sel kerucut sebesar 25 : 1. Kerapatan sel batang pada mata kucing di sentralis kurang lebih $463.000/\text{mm}^2$, sedangkan di peripheral sebesar $250.000/\text{mm}^2$. Kerapatan sel kerucut pada mata kucing di sentralis kurang lebih sebesar $27.000/\text{mm}^2$, sedangkan di peripheral sebesar $4.000/\text{mm}^2$. Kucing dapat melihat dengan

baik dalam cahaya redup namun mempunyai penglihatan warna yang terbatas (Eldredge, 2008).

Mata kucing tampak bersinar dalam kegelapan karena memiliki lapisan sel di belakang retina yaitu *tapetum lucidum*. Sel ini bertindak seperti cermin, memantulkan cahaya kembali ke retina. Banyaknya sel batang di dalam retina, dan adanya *tapetum lucidum* ini yang membuat penglihatan kucing lebih baik dari hewan lain dalam cahaya redup maupun di lingkungan yang cukup gelap. Kucing tidak dapat melihat objek yang dekat dalam fokus yang baik (Tsonis, 2008)

2.4. Pigmentasi Warna Mata Kucing

Pigmentasi mata merupakan hasil produksi pigmen melanin pada melanosit di iris. Menurut Gladstone (2016), mekanisme penentuan warna mata dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah faktor hereditas, *melanocyte stimulating hormone* (MSH), faktor biokimia yang memerintah metabolisme melanin, granule pigmen dalam epitel pigmen posterior, konsentrasi pigmen dalam melanosit stroma iris, jenis pigmen melanin dalam melanosit iris, dan cahaya serta proses absorpsi.

Melanosit di mata berbeda dengan di kulit dan rambut. Melanosit di kulit terus-menerus diproduksi dan disekresi, sedangkan di mata melanosom yang mengandung pigmen dipertahankan dan mengalami kongesti di sitoplasma melanosit di dalam stroma iris (Sturm *et al*, 2014). Melanin adalah biopolimer yang terdiri dalam dua tipe yaitu eumelanin dan feomelanin. Perbandingan kedua bentuk melanin tersebut bervariasi pada

individu. Melanosit dalam epitel pigmen posterior pada dasarnya mengandung eumelanin, sedangkan dalam epitel pigmen anterior dan stroma iris mengandung kedua bentuk melanin yaitu eumelanin dan feomelanin. Peningkatan pigmen dalam stroma iris menyebabkan penyerapan cahaya yang lebih besar dan warna mata yang dihasilkan lebih gelap (Rennie, 2012).

Densitas dari sel melanosit dan pigmen melanin berbeda pada masing-masing iris, pada iris yang memiliki warna biru memiliki densitas sel melanosit yang lebih sedikit dibandingkan iris berwarna coklat, selain itu pada iris berwarna biru, distribusi melanin utama ditemukan di epitelium posterior, distribusi sedikit pada bagian stroma sementara pada lapisan anterior tidak ada dan tembus cahaya, sehingga mengakibatkan cahaya yang masuk ke mata sedikit diserap. Hal ini berpengaruh pada odd eye, dimana pada salah satu mata berwarna biru (Gladstone, 2016).

Odd eye secara medis dikenal dengan sebutan *heterochromia* yang merupakan suatu kondisi dimana salah satu iris memiliki warna yang berbeda dengan iris lainnya karena jumlah melanin yang berbeda pada setiap iris, sebagai contohnya salah satu mata berwarna biru dan lainnya berwarna hijau ataupun oranye. *Heterochromia* terjadi sejak lahir atau sebagai pewarisan sifat (hereditas). *Heterochromia* memiliki dua bentuk yaitu hipopigmentasi atau hiperpigmentasi pada iris. Perubahan warna iris kemungkinan mencakup satu mata (mono) atau keduanya (bilateral) dan kemungkinan terjadi secara parsial atau *complete* (Gladstone, 2016).

2.5. Gen *Tyrosinase* (TYR)

Gen TYR sering dikenal dengan sebutan gen OCA1, karena berkaitan dengan *okulokutaneus albinisme*. Gen TYR merupakan gen yang berperan menginstruksi dalam pembentukan enzim yang disebut *tyrosinase*. *Tyrosinase* terletak di melanosit dan berperan penting dalam pembentukan melanin selama proses melanogenesis. Melanin selain terdapat di iris juga terdapat di jaringan yang peka cahaya di bagian belakang mata yaitu retina (Genetic Home Reference, 2007). *Tyrosinase* diproduksi di ribosom dan di transfer melalui retikulum endoplasma ke golgi. Aktivitas enzim *tyrosinase* bersifat termosensitif (Makpol, 2009).

Enzim *tyrosinase* berperan penting dalam proses melanogenesis karena *tyrosinase* memiliki gugus tembaga (Cu) sehingga mampu menghidroksilasi *tyrosine* menjadi *dihidroksi fenilalanin* atau DOPA (monofenol) dan selanjutnya DOPA mengalami oksidasi yang menghasilkan *Dopaquinone* (difenol). *Dopaquinone* diubah menjadi *Dopachrome* melalui autooksidasi sehingga menjadi *Dihidroksi Indole* (DHI) dan *Dihidroksi Indole Carboxy Acid* (DHICA) untuk membentuk eumelanin. *Dopaquinone* berikatan dengan *cysteine* atau *glutathione* menjadi *cysteinyldopa*, reaksi ini membentuk feomelanin. Rasio kedua bentuk ini menentukan pigmentasi yang terlihat. Gugus tembaga (Cu) merupakan suatu *active site* yang dapat berikatan dengan substrat pada proses pembentukan melanin (Ramsden, 2010).

Melanosit membentuk dua tipe melanin, yaitu eumelanin dan feomelanin. Jumlah dari dua pigmen tersebut membantu dalam menentukan warna mata. Individu yang memproduksi banyak eumelanin cenderung memiliki warna mata yang lebih gelap, sedangkan individu yang memproduksi banyak feomelanin cenderung memiliki warna mata lebih terang (Rennie, 2012).

2.6. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) atau reaksi polimerase berantai merupakan suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Handoyo dkk, 2001). Metode PCR sangat sensitif, sehingga dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Konsep teknologi PCR mensyaratkan bahwa bagian tertentu sekuen DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses pelipatgandaan tersebut dapat dilakukan. Sekuen yang diketahui tersebut penting untuk menyediakan primer, yaitu sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase (Widowati, 2013).

Penggunaan PCR telah berkembang secara cepat seiring dengan perkembangan biologi molekuler. Teknik ini digunakan untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi oleh virus, diagnosis dini penyakit seperti AIDS, *Genetic profiling in forensic, legal and biodiversity applications*, biologi

evolusi, *site-directed mutagenesis of genes* dan *mRNA quantitation* di sel ataupun jaringan (Fatchiyah, 2008).

2.6.1. Teknik Dasar Amplifikasi PCR

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu:

- (1) pra-denaturasi DNA *template*,
- (2) denaturasi DNA *template*,
- (3) penempelan primer pada *template* (*annealing*),
- (4) pemanjangan primer (*extension*), dan
- (5) pemantapan (*post-extension*).

Tahap ke-(2) sampai dengan ke-(4) merupakan tahapan berulang (siklus), dimana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA. Waktu tergantung dari panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi (Handoyo dkk, 2001).

2.6.1.1. Denaturasi Untai Ganda DNA

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA *template* dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs dan *buffer* yang sesuai. Umumnya hal ini

dilakukan antara 20-40 siklus. Denaturasi untai ganda DNA merupakan langkah yang kritis selama proses PCR. Temperatur yang tinggi pada awal proses menyebabkan pemisahan untai ganda DNA (Handoyo dkk, 2001).

Suatu fragmen DNA (*double strand*) dipanaskan pada suhu 95°C selama 1-2 menit sehingga akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single strand*) (Yuwono, 2006). Denaturasi yang tidak berlangsung secara sempurna dapat menyebabkan utas DNA terputus, dan tahap denaturasi yang terlalu lama dapat mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim polimerase (Triwibowo, 2010).

2.6.1.2. Primer Annealing

Primer *annealing* merupakan proses pengenalan suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC dan konsentrasi primer itu sendiri. Secara umum suhu *annealing* yang digunakan berkisar antara 37 - 60°C. Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan *melting temperature* (T_m) primer yang digunakan untuk proses PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan $(T_m - 5)^\circ\text{C}$ sampai dengan $(T_m + 5)^\circ\text{C}$. Dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan perlu diperhatikan adanya *misspriming* pada daerah target dan non target, dan keberhasilan suatu proses PCR akan ditentukan oleh eksperimen (Handoyo dkk, 2001).

Faktor yang mempengaruhi tahap ini antara lain suhu *annealing* dan primer. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat mengakibatkan timbulnya pita elektroforesis yang tidak spesifik, sedangkan suhu yang tinggi dapat meningkatkan kespesifikan amplifikasi (Triwibowo, 2010).

2.6.1.3. DNA Polymerase Extension

Pada tahap ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses ekstensi primer pada proses PCR selalu dilakukan pada suhu 72°C karena suhu tersebut merupakan suhu optimum polimerase DNA yang biasa digunakan untuk PCR (Handoyo dkk, 2001). Setiap satu kilobase (1000 bp) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit, bila kurang dari 500bp hanya 30 detik dan pada kisaran 500 tapi kurang dari 1kb perlu waktu 45 detik, namun apabila lebih dari 1kb akan memerlukan waktu dua menit di setiap siklusnya (Fatchiyah, 2008).

2.7. Sekuensing DNA

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan nukleotida dari suatu fragmen DNA tertentu. Metode sekuensing yang telah dikembangkan terdiri atas tiga metode, yaitu metode Maxam-Gilbert, metode Sanger dan *automated DNA sequencing* (Campbell *et al*, 2002). Proses sekuensing

diawali oleh proses *cycle sequencing*. *Cycle sequencing* adalah proses amplifikasi dengan metode PCR untuk mendapatkan DNA untai tunggal yang akan digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk proses sekuensing (Sambrook and Russel, 2001).

Metode sekuensing yang umum digunakan saat ini adalah metode Sanger (*chain termination method*) yang sudah dimodifikasi menggunakan *dyedideoxy terminator*, dimana proses awalnya adalah reaksi PCR dengan pereaksi yang berbeda, yaitu hanya menggunakan satu primer dan adanya tambahan *dideoxynucleotide* trifosfat (ddNTP's) yang dilabel *fluorescent*. Karena warna *fluorescent* untuk setiap basa berbeda, maka urutan basa suatu DNA yang tidak diketahui bisa ditentukan. *Dideoxynucleotide* trifosfat akan menghentikan proses polimerasi apabila melekat pada ujung 3' untai DNA (Widowati, 2013).

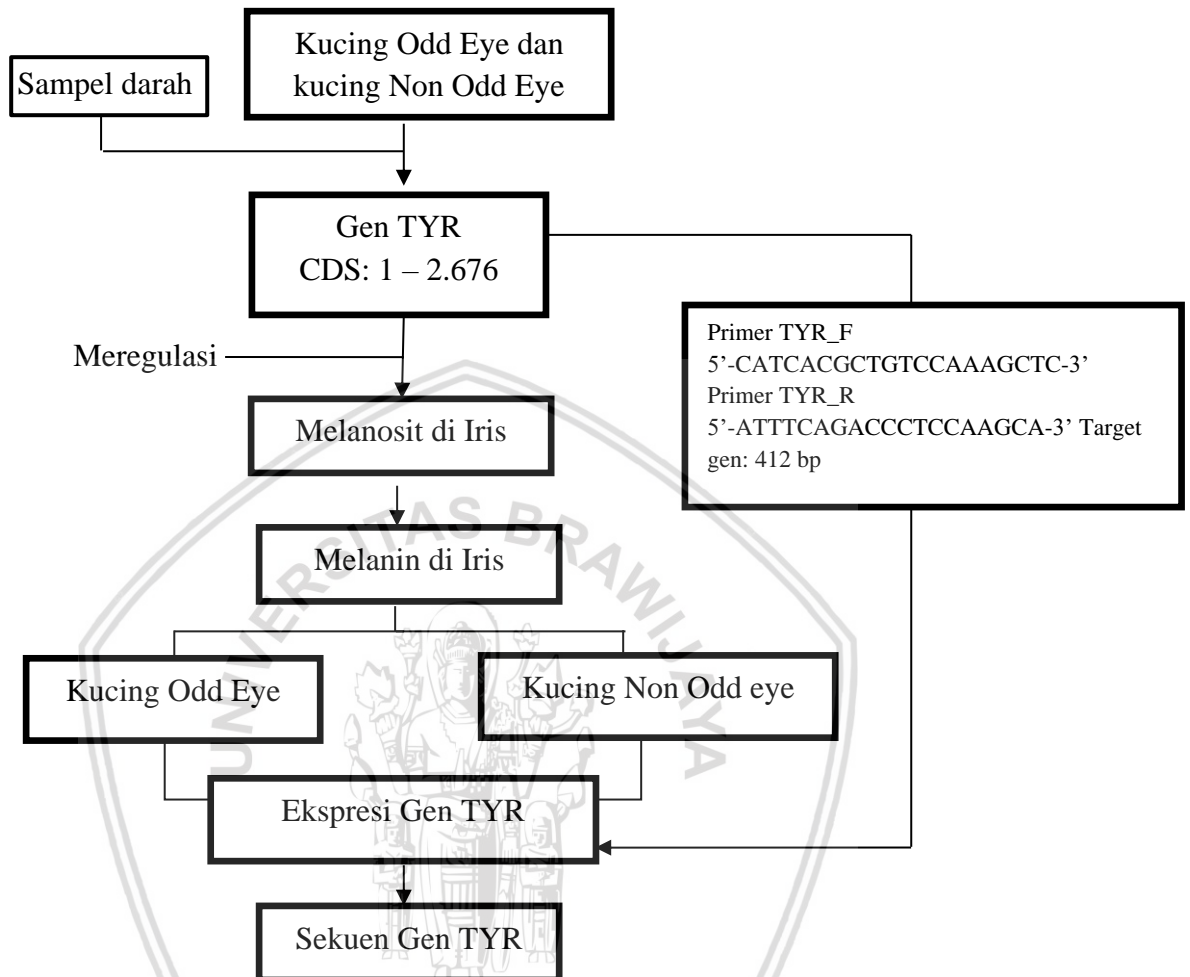
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual

Pigmentasi mata merupakan hasil produksi pigmen melanin pada melanosit di iris. Melanin adalah biopolimer yang terdiri dalam dua bentuk yaitu eumelanin dan feomelanin. Rasio kedua bentuk ini menentukan pigmentasi yang terlihat. Kucing umumnya memiliki variasi warna mata yaitu biru, hijau, oranye, dan odd eye. Odd eye atau *heterochromia* merupakan suatu kondisi dimana salah satu iris memiliki warna yang berbeda dengan iris lainnya, sebagai contohnya salah satu mata berwarna biru dan lainnya berwarna hijau ataupun oranye. Perbedaan warna mata disebabkan oleh pigmen yang dipengaruhi oleh gen yang terlibat dalam sintesis melanin. Salah satu gen yang terlibat dalam sintesis melanin adalah TYR.

Sampel darah dapat digunakan untuk melihat ekspresi gen TYR melalui sekuen gen yang dihasilkan. Analisa gen TYR pada kucing yang berkaitan dengan perbedaan warna mata belum banyak diteliti. Analisa gen TYR dapat dilakukan dengan amplifikasi DNA *in vitro* dengan menggunakan metode PCR membutuhkan sepasang primer *forward* dan *reverse*. Primer untuk mengamplifikasi gen TYR didapatkan dari *database* NCBI *GeneBank* AY743343.1 (*Felis catus tyrosinase gene, exon 1 and partial cds*). Hasil sekuen DNA dianalisis menggunakan *software* *Sequence Scanner* versi 1.0, kemudian disejajarkan menggunakan BLAST NCBI, *software* MEGA versi 7.0, dan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada *software* *BioEdit*.

3.2. Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian.

3.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan ekspresi gen TYR pada kucing odd eye, dan kucing non odd eye.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel darah Kucing dilakukan di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang pada bulan April – Juli 2017.

4.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian antara lain *disposable syringe*, sarung tangan, masker, *ice box*, aluminium foil, kertas label, tabung EDTA, *microcentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, mesin vortex, sentrifugator, mesin penangas, inkubator, freezer, timbangan analitik digital, *thermocycler*, mesin *sequencing*, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator DH-4 Gel Doc Bio Step*, mesin ND-1000 *Spectrophotometer*, *Mupid-Exu Electrophoresis*, kamera, dan tisu.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu sampel darah kucing (kucing odd eye, dan kucing non odd eye) masing-masing sebanyak 3cc, *DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit*, *double distilled water* (ddH₂O), primer *forward* (TYR_F) 5'-CATCACGCTGTCCAAAGCTC-3' dan *reverse* (TYR_R) 5'-GATTTTCAGACCCTCCAAGCA-3', PCR *mix* (Promega *GoTaq Green Master Mix*), DNA *ladder* 100 bp dan 1 kb, Tris Borat EDTA (TBE

1x), agarosa 1% dan 2%, *loading dye*, etanol absolut, alkohol 70%, larutan etidium bromida (EtBr), dan natrium asetat 3M.

4.3. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Pemilihan kucing odd eye, dan kucing non odd eye
2. Pengambilan sampel berupa darah kucing odd eye, dan kucing non odd eye di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Brawijaya Malang
3. Isolasi DNA
4. Uji kuantitas dan kualitas DNA
5. Desain primer
6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
7. Uji kuantitas dan kualitas produk PCR
8. Purifikasi produk PCR
9. Sekuensing DNA produk PCR
10. Analisa data

4.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Sebanyak dua sampel darah yang diuji merupakan darah kucing sebanyak 3 cc tiap individu (satu individu kucing odd eye, dan satu individu kucing non odd eye). Kemudian dilakukan pengisolasian DNA melalui sampel darah tersebut dengan menggunakan

DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit. Hasil isolasi DNA tersebut akan diukur konsentrasinya dengan nanospektrofotometri dan dilakukan elektroforesis dengan gel agarosa 1%. Setelah itu, sampel DNA akan diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *forward* (TYR_F) 5'-CATCACGCTGTCCAAAGCTC-3' dan *reverse* (TYR_R) 5'-GATTCAGACCCTCCAAGCA-3'. Untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Produk PCR kemudian di sekuensing. Hasil sekuensi fragmen DNA kemudian dianalisis dengan menggunakan *software Sequence Scanner* versi 1.0, BLAST pada NCBI, *software MEGA* versi 7.0, dan *software BioEdit* serta dianalisa secara deskriptif.

4.5. Prosedur Kerja

4.5.1. Pemilihan dan Pengambilan Sampel Darah Kucing

Sampel yang diambil yaitu berupa darah pada kucing. Individu kucing yang diambil pada penelitian ini adalah kucing yang memiliki warna putih solid (satu ekor kucing odd eye, dan satu ekor kucing non odd eye). Pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan teknik *purposive sampling*. Menurut Sugiyono (2012), *purposive sampling* adalah teknik penentuan sampel dengan pertimbangan subjektif peneliti. Teknik ini biasanya digunakan untuk penelitian eksploratori seperti studi kasus (meneliti satu atau dua objek secara mendalam), dalam hal ini pengambilan sampel berdasarkan pertimbangan data yang diinginkan. Hal ini didukung dengan pernyataan Arikunto (2010), terkait syarat-syarat

yang harus dipenuhi dalam menentukan sampel berdasarkan tujuan tertentu, yaitu: pengambilan sampel harus didasarkan atas ciri-ciri, sifat-sifat, atau karakteristik tertentu, dan subjek yang diambil sebagai sampel benar-benar merupakan subjek yang paling banyak mengandung ciri-ciri yang terdapat populasi.

Sampel darah di ambil dengan menggunakan *disposable syringe* 3 cc, melalui *vena femoralis*. Sampel yang diambil kemudian dimasukkan ke dalam EDTA *vacutainer tube* yang sudah diberi label, dan disimpan dalam suhu 4°C. Pengambilan sampel dilakukan di RSHP Universitas Brawijaya, dan darah disimpan dalam *ice box* untuk dibawa ke laboratorium biokimia FMIPA untuk langsung dilakukan isolasi DNA. Penyimpanan sampel *whole blood* pada suhu 4°C dipilih karena jarak antara pengambilan sampel dan proses isolasi DNA tidak terlalu jauh (Bulla *et al.*, 2016).

4.5.2. Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel darah kucing menggunakan *DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit* mengikuti protokol untuk isolasi DNA. Terdapat 3 langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu perusakan dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki, 2000). Protokol isolasi DNA dari sampel darah dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

4.5.3. Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

4.5.3.1. Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas dilakukan dengan menggunakan mesin ND-1000 *Spectrophotometer*. Pengujian dilakukan dengan *buffer* terakhir saat isolasi DNA (ddH₂O) sebagai blanko. ddH₂O diteteskan langsung diatas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1 µl, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Sebanyak 1 µl sampel diteteskan diatas *pedestal submicroliter cell* yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup diatas sampel yang telah diteteskan dan ditekan tombol sampel kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor (Fatchiyah dkk, 2009).

4.5.3.2. Uji Kualitas DNA

Hasil konfirmasi isolat DNA diukur menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen TYR. Uji kualitas DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1% menggunakan mesin *Mupid-Exu Electrophoresis*. Elektroforesis gel agarosa 1% dilakukan sesuai Sambrook and Russel (2001). Dibersihkan cetakan agarosa dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 ml dan gel agarosa 1% (0,15 g) hingga mendidih atau agarosa larut. Menurut Fatchiyah dkk (2011), campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1 µl dan di dinginkan (tidak sampai memadat), kemudian disiapkan sisir dan *plate* untuk membentuk sumuran.

Campuran agarosa, TBE 1x dan EtBr kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel selanjutnya dibiarkan memadat selama 20-30 menit pada suhu kamar hingga memadat, kemudian diambil sisir dari gel secara perlahan.

Gel dengan sumuran yang telah terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam *chamber Mupid-Exu Electrophoresis*. Kemudian larutan *buffer* elektroforesis (*running* TBE 1x) dituangkan kedalam *chamber* hingga menutupi seluruh bagian gel. *Marker* (DNA *ladder*), dan *loading dye* (1:1) selanjutnya dimasukkan ke dalam salah satu sumuran (umumnya sumur pertama). Campuran larutan *loading dye*, dan DNA (1:1) kemudian dimasukkan pada sumur selanjutnya. *Chamber* dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan 20-30 menit dengan tegangan 100 volt. Setelah *running* gel elektroforesis selesai arus listrik diputuskan dan diangkat gel dari *chamber*. Gel selanjutnya dipindahkan ke *UV-transilluminator gel doc* dan diamati hasilnya. Hasil didokumentasikan dan di ekspos dengan *gel doc imaging* sehingga memudahkan analisis (Fatchiyah dkk, 2011).

4.5.4. Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) didesain menggunakan NCBI *GeneBank* AY743343.1. Primer di desain melalui *Primer3Plus* dengan menggunakan data *locus* AY743343.1 673 bp DNA *linear. Felis catus*

tyrosinase gene, exon 1 and partial cds. Sepasang sekuen primer yang didapatkan adalah primer *forward* (TYR_F) 5'-CATCACGCTGTCCAAAGCTC-3' (*start*: 108 panjang: 20 bp; Tm: 56,5°C; GC: 55%), dan *reverse* (TYR_R) 5'-GATTCAGACCCTCCAAGCA-3' (*start*: 519; panjang: 20 bp; Tm: 54,8°C; GC: 50%). Tata cara pembuatan primer dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

4.5.5. Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sampel DNA dari darah kucing diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (TYR_F) dan *reverse* (TYR_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1 µL DNA, 1 µL primer *forward* 10 pmol, 1 µL primer *reverse* 10 pmol, 5µL PCR *mix*, dan 2 µL ddH₂O kedalam mikrotube 200 µL. Tahapan amplifikasi dimulai dari predenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian *annealing* pada suhu 51,5 °C selama 30 detik. *Extension* pada suhu 72°C selama satu menit, dan *post extension* pada 72°C selama tujuh menit. Proses akan berulang hingga 35 siklus (Fatchiyah dkk, 2009).

4.5.6. Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Pengujian kuantitas untuk memvisualisasikan produk PCR gen TYR dari darah kucing, kemudian dilanjutkan dengan *running* elektroforesis gel

agarosa. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas DNA. Sebanyak 2 μ L, produk PCR ditambahkan 2 μ L *loading dye* dan dicampurkan homogen di dalam PCR tube. Produk PCR tersebut dipipet kedalam sumur gel agarosa 2% dengan TBE 1x pada voltage 100 V, selama 30 menit. Kemudian dokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada *UV-transilluminator*. Penentuan *base pair* hasil produk PCR dilakukan menggunakan *gel doc imaging* (Fatchiyah dkk, 2011).

4.5.7. Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan sisa-sisa PCR *mix* meliputi dNTPs, *Taq polimerase*, ion Mg, serta ddH₂O dan primer yang berada didalam PCR tube. Metode yang digunakan dalam purifikasi produk PCR adalah metode gel ekstraksi.

4.5.8. Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen TYR dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer TYR_F dan TYR_R untuk melihat sekuen gen TYR sebesar 412 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50 ng/ μ L untuk dapat dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik elektroferogram dan data dalam format fasta (urutan basa-basa hasil sekuensing). Grafik elektroferogram merupakan grafik yang menunjukkan basa-basa (adenin, timin, guanin, dan sitosin) yang terdapat pada fragmen

DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs yang terekam pada hasil sekuensing (Abdullah dkk, 2011).

4.5.9. Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan perbedaan DNA gen TYR antara kucing odd eye, dan kucing non odd eye menggunakan *software Sequence Scanner* versi 1.0, BLAST NCBI, *software MEGA* versi 7.0, dan *software BioEdit*. Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen DNA dengan membandingkan antara sampel dengan database NCBI *GeneBank AY743343.1 (Felis catus tyrosinase gene, exon 1 and partial cds)* penyejajaran menggunakan *software MEGA* versi 7.0, dan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada *software BioEdit*.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi DNA dari Darah Kucing

Isolasi DNA dilakukan menggunakan *DeRiPRO™ 3-In-1 Extraction Kit*. Hasil yang didapatkan berupa DNA total yang selanjutnya dilakukan uji kuantitatif, dan uji kualitatif. Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui konsentrasi, dan kemurnian DNA dengan menggunakan mesin ND-1000 *Spectrophotometer*. DNA total hasil isolasi tersebut selanjutnya digunakan sebagai DNA template dalam proses amplifikasi gen TYR dengan teknik PCR. Berikut adalah konsentrasi, dan kemurnian DNA darah kucing (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Darah Kucing

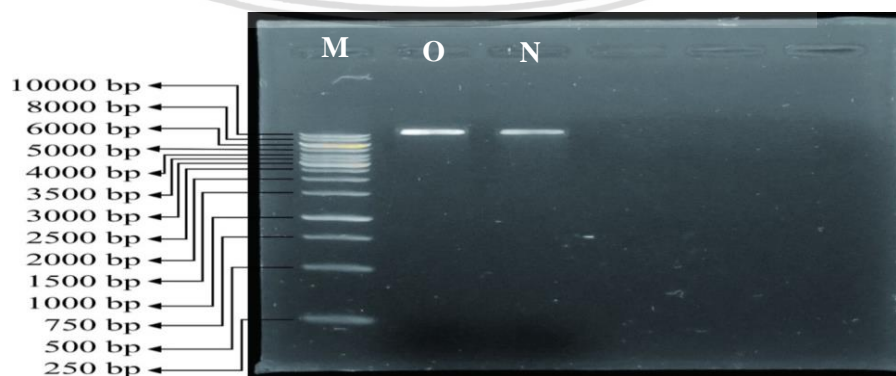
Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (Absorbansi 260/280)
O	19,04	1,20
N	15,09	1,45

Keterangan: O : Sampel kucing odd eye.
N : Sampel kucing non odd eye.

Tabel diatas menunjukkan konsentrasi DNA yaitu pada sampel O sebesar 19,04 ng/ μ L, dan sampel N sebesar 15,09 ng/ μ L dengan tingkat kemurnian berturut-turut sebesar 1,20 nm, dan 1,61 nm. Menurut Fatchiyah dkk (2011), DNA dikatakan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi apabila rasio absorbansi DNA yang diukur pada A260/A280 menunjukkan nilai 1,8-2,0 nm. Hasil tingkat kemurnian DNA sampel O, dan sampel N dengan nilai kurang dari 1,8 nm menunjukkan adanya kontaminasi protein pada sampel.

Nilai absorbansi pada A260/A280 dengan nilai lebih dari 2,0 nm dapat diindikasikan adanya kontaminasi RNA, sedangkan jika kurang dari 1,8 nm maka dapat diindikasikan adanya kontaminasi protein. Kontaminasi dapat disebabkan karena proses ekstraksi kurang optimal, atau *human error* (Santella, 2006).

Konsentrasi DNA yang rendah pada hasil isolasi sebagai DNA *template* tidak mempengaruhi amplifikasi, sebagaimana yang dijelaskan oleh Chen *and* Janes (2002), amplifikasi DNA dengan PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sampel (DNA) dengan konsentrasi yang rendah. Hasil isolasi DNA dengan kemurnian rendah dapat diamplifikasi, apabila setidaknya terdapat satu untai utuh DNA target amplifikasi. Hasil isolasi DNA total juga di uji secara kualitatif menggunakan elektroforesis dengan konsentrasi agarose 1%. Hasil gel elektroforesis menunjukkan adanya *band* di atas marker 10.000 bp, hal ini menunjukkan bahwa DNA yang terisolasi memiliki ukuran fragmen >10.000 bp. Berikut adalah hasil uji kualitatif isolasi DNA menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% (**Gambar 5.1**).



Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%).

Keterangan: M: Marker 1 kb; O: Sampel kucing odd eye; N: Sampel kucing non odd eye.

5.2 Amplifikasi Gen TYR dengan Metode PCR

Amplifikasi gen TYR dilakukan dengan tujuan untuk memudahkan analisa pada gen target dengan melihat susunan sekuen gen TYR dari hasil isolasi DNA. Amplifikasi gen TYR dilakukan dengan program PCR yang ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. Primer yang digunakan dalam program PCR didesain dari genebank NCBI dengan *reference sequence*: AY743343.1 menggunakan *Primer3plus*, sehingga didapatkan sepasang primer *forward*, dan *reverse* yang ditunjukkan pada **Tabel 5.3**. Susunan basa nitrogen dari gen TYR dengan primer yang telah di desain ditunjukkan pada **Gambar 5.2**.

Tabel 5.2 Program PCR untuk Amplifikasi Gen TYR

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	4 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
Annealing	30 detik	51,5°C
Ekstensi	1 menit	72°C
Post Ekstensi	7 menit	72°C

Tabel 5.3 Urutan Oligo Nukleotida Primer Gen TYR

Primer	Urutan Oligo Nukleotida
<i>Forward</i> (TYR_F)	5'-CATCACGCTGTCCAAGCTC-3'
<i>Reverse</i> (TYR_R)	5'-GATTTCAGACCCTCCAAGCA-3'

```

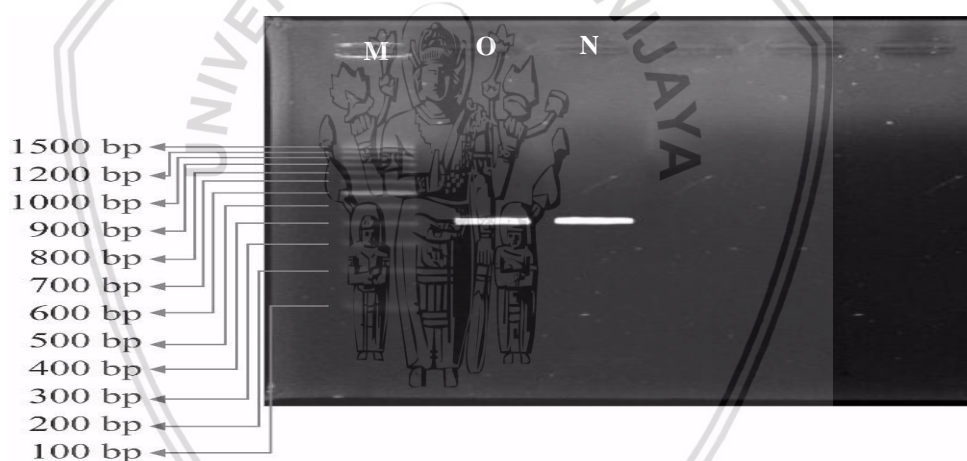
1 cgagcctgtg cctcctccaa gagcctgatg gagaaggaat gctgtccagc gtggacgggt
61 gacagcagtc cctgcggcca gctctcaggc aggggtgect gtcaggacat cacgctgtcc
121 aaagctccac tcgggacctca ataccocctc acggggatgg atgaccggga ggctggccc
181 tccgtctttt ataatcggac ctgccagtgc tttggcaact tcatgggatt caactgtgga
241 aattgcaagt ttggcttttg gggaccaaac tgcacagaga agcgactttt ggtgagaaga
301 aacatctttg atttgagcgt cccagagaag aacaaatttc ttgcctacct cactttagcg
361 aagcatacta tcagcccaga ctatgtcatc cccataggca cctatggcca aatgaataat
421 ggatctacac ccatgtttaa tgacatcaat gtttatgacc tcttcgtctg gatgcattac
481 tatgtgtcaa gggacacacg gcttggaggg cctgaatctt ggaaagacat tgattttgct
541 catgaagccc ctggtttcct gccttggcac agactcttct tgttgctgtg ggaacaagaa
601 atccagaagc tgaccgggga tgagaacttc actattccat attgggattg gcgagatgct
661 aaaagctgtg aca

```

Gambar 5.2 Origin Oligo Nukleotida Gen TYR.

Keterangan: Warna kuning: Primer *forward* TYR; Warna biru : Primer *reverse* TYR; Warna abu-abu: *Region of interest*.

Produk PCR di uji secara kualitatif dan didapatkan adanya pita DNA dengan ukuran 412 bp, hal ini membuktikan bahwa gen TYR telah teramplifikasi secara spesifik sesuai dengan target gen primer TYR_F dan TYR_R. Penentuan *base pair* dari pita yang ditemukan dilakukan analisa dengan menggunakan *gel doc imaging*. Menurut Bartlett and Stirling (2003), Keberhasilan amplifikasi divisualisasikan dengan adanya pita tunggal dengan ukuran yang sesuai dengan target desain primer tanpa disertai adanya pita non spesifik ataupun *smear*. Berikut adalah hasil elektroforesis dari produk PCR pada gen TYR (**Gambar 5.3**).



Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%).

Keterangan: M: Marker 100 bp; O: Sampel kucing odd eye; N: Sampel kucing non odd eye.

Hasil produk PCR selanjutnya dilakukan uji kuantitatif agar dapat dilanjutkan ke tahap purifikasi, dan sekuensing gen TYR. Uji kuantitatif dilakukan dengan mesin ND-1000 *Spectrophotometer*. Konsentrasi, dan kemurnian DNA yang diperoleh dari produk PCR dapat dilihat pada **Tabel 5.4**.

Tabel 5.4 Konsentrasi dan Kemurnian Produk PCR

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (Absorbansi 260/280)
O	67,8	1,80
N	104,2	2,07

Keterangan: O : Sampel kucing odd eye.
N : Sampel kucing non odd eye.

Hasil yang diperoleh dari produk PCR menunjukkan bahwa konsentrasi DNA pada sampel O sebesar 67,8 ng/ μ L dengan kemurnian 1,80 nm sedangkan sampel N menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 104,2 ng/ μ L dengan kemurnian 2,07 nm. Data hasil pengukuran rasio DNA menunjukkan sampel O dan sampel N memiliki kemurnian yang tinggi. Menurut Jaffe (2013), DNA yang murni memiliki nilai absorbansi 1,8 - 2,0 pada gelombang 260 nm dan 280 nm. Produk PCR tersebut kemudian dipurifikasi dengan metode gel ekstraksi, dan dilanjutkan ke tahap sekuensing.

5.3 Sekuensing Gen TYR

Sampel yang digunakan untuk sekuensing dalam penelitian ini berjumlah 2 sampel terdiri dari sampel O (kucing odd eye), dan sampel N (kucing non odd eye). Sekuensing dilakukan dengan metode dideoksi *Sanger* menggunakan *Automatic DNA sequencer* yang berdasarkan pada metode *dye terminator labelling*. Hasil sekuensing di baca menggunakan *software Sequence Scanner* versi 1.0, *software MEGA* versi 7.0, dan *software Bioedit* 7.2.5 dengan menggunakan sistem operasi Windows 10.

Hasil sekuensing berupa grafik elektroferogram yaitu merupakan grafik yang menunjukkan basa-basa yang terekam pada hasil sekuensing dan

data dalam format fasta yaitu urutan basa-basa hasil sekuensing. Kemudian data hasil sekuensing dimasukkan kedalam program BLAST NCBI untuk mengetahui kesejajaran basa nitrogen hasil sekuensing dengan *database* NCBI. Urutan hasil sekuen pada sampel O menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 157 sampai 519 dari *database* NCBI, sedangkan pada sampel N menunjukkan adanya kesejajaran dari basa ke 157 sampai 519 dari *database* NCBI. Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen basa nukleotida yang memiliki kesamaan basa nukleotida terhadap *database* NCBI atau disebut daerah *conserved*. Menurut Jegg and Aronow (2006), daerah *conserved* merupakan suatu daerah sekuen basa nukleotida yang mengalami sedikit perubahan atau mutasi pada segmen DNA yang disejajarkan. Berikut adalah gambar yang menunjukkan *alignment* TYR nukleotida sampel O, dan sampel N terhadap *database genebank* NCBI (**Gambar 5.5** dan **Gambar 5.6**).

Sampel O (**Gambar 5.4**), memiliki *query cover* 99% dan *ident* sebesar 99% terhadap NCBI *GeneBank*: AY743343.1, begitu pula dengan sampel N (**Gambar 5.5**) yang memiliki *query cover* 99% dan *ident* 100% terhadap NCBI *GeneBank*: AY743343.1. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa sekuen DNA baik dari sampel O maupun sampel N memiliki kemiripan yang hampir identik dengan DNA target yaitu spesies *Felis catus* berdasarkan sekuen gen TYR. Persentasi *query cover* adalah persen dari panjang segmen DNA yang sejajar, sedangkan *ident* adalah persentasi identitas satu segmen DNA yang disejajarkan dengan urutan subjek yang sama (NCBI News, 2006).

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/> Felis catus tyrosinase gene, exon 1 and partial cds	665	665	99%	0.0	99%

Felis catus tyrosinase gene, exon 1 and partial cds
Sequence ID: [AY743343.1](#) Length: 673 Number of Matches: 1

Range 1: 157 to 519 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
665 bits(360)	0.0	362/363(99%)	0/363(0%)	Plus/Plus

Query 1 ATGGATGACCGGGAGGCTGGCCCTCCGTCCTTTATAATCGGACCTGCCAGTGCTTTGGC 60

Sbjct 157 ATGGATGACCGGGAGGCTGGCCCTCCGTCCTTTATAATCGGACCTGCCAGTGCTTTGGC 216

Query 61 AACTTCATGGGATTCAACTGTGGAAATGCAAGTTTGGCTTTGGGGACCAAATGCACA 120

Sbjct 217 AACTTCATGGGATTCAACTGTGGAAATGCAAGTTTGGCTTTGGGGACCAAATGCACA 276

Query 121 GAGAAGCGACTTTTGGTGAGAAGAACAATCTTTGATTTGAGCGTCCCAGAGAAACAACA 180

Sbjct 277 GAGAAGCGACTTTTGGTGAGAAGAACAATCTTTGATTTGAGCGTCCCAGAGAAACAACA 336

Query 181 TTTCTTGCCTACCTCACTTTAGCGAAGCATACTATCAGCCCAGACTATGATATCCCCATA 240

Sbjct 337 TTTCTTGCCTACCTCACTTTAGCGAAGCATACTATCAGCCCAGACTATGATATCCCCATA 396

Query 241 GGCACCTATGGCCAAATGAATAATGGATCTACACCCATGTTTAATGACATCAATGTTTAT 300

Sbjct 397 GGCACCTATGGCCAAATGAATAATGGATCTACACCCATGTTTAATGACATCAATGTTTAT 456

Query 301 GACCTCTTCGTCTGGATGCATTACTATGTGTCAAGGGACACACTGCTTGGAGGGTCTGAA 360

Sbjct 457 GACCTCTTCGTCTGGATGCATTACTATGTGTCAAGGGACACACTGCTTGGAGGGTCTGAA 516

Query 361 ATC 363

Sbjct 517 ATC 519

Gambar 5.4 Alignment TYR Nukleotida Sampel O (Query) terhadap Urutan Nukleotida dari Database (Sbjct).

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/> Felis catus tyrosinase gene, exon 1 and partial cds	671	671	99%	0.0	100%

Felis catus tyrosinase gene, exon 1 and partial cds
Sequence ID: [AY743343.1](#) Length: 673 Number of Matches: 1

Range 1: 157 to 519 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
671 bits(363)	0.0	363/363(100%)	0/363(0%)	Plus/Plus

```

Query 1 ATGGATGACCGGGAGGCCTGGCCCTCCGTCTTTTATAATCGGACCTGCCAGTGCTTTGGC 60
Sbjct 157 ATGGATGACCGGGAGGCCTGGCCCTCCGTCTTTTATAATCGGACCTGCCAGTGCTTTGGC 216
Query 61 AACTTCATGGGATTCAACTGTGGAAATTGCAAGTTTGGCTTTTGGGGACCAAACACTGCACA 120
Sbjct 217 AACTTCATGGGATTCAACTGTGGAAATTGCAAGTTTGGCTTTTGGGGACCAAACACTGCACA 276
Query 121 GAGAAGCGACTTTTGGTGAGAAGAAACATCTTTGATTTGAGCGTCCCAGAGAAGAACAAA 180
Sbjct 277 GAGAAGCGACTTTTGGTGAGAAGAAACATCTTTGATTTGAGCGTCCCAGAGAAGAACAAA 336
Query 181 TTTCTTGCCTACCTCACTTTAGCGAAGCATACTATCAGCCCAGACTATGTCATCCCCATA 240
Sbjct 337 TTTCTTGCCTACCTCACTTTAGCGAAGCATACTATCAGCCCAGACTATGTCATCCCCATA 396
Query 241 GGCACCTATGGCCAAATGAATAATGGATCTACACCCATGTTTAAATGACATCAATGTTTAT 300
Sbjct 397 GGCACCTATGGCCAAATGAATAATGGATCTACACCCATGTTTAAATGACATCAATGTTTAT 456
Query 301 GACCTCTTCGTCTGGATGCATTACTATGTGTCAAGGGACACACTGCTTGGAGGGTCTGAA 360
Sbjct 457 GACCTCTTCGTCTGGATGCATTACTATGTGTCAAGGGACACACTGCTTGGAGGGTCTGAA 516
Query 361 ATC 363
Sbjct 517 ATC 519

```

Gambar 5.5 Alignment TYR Nukleotida Sampel N (Query) terhadap Urutan Nukleotida dari Database (Sbjct).

5.4 Analisa Sekuen DNA dan Asam Amino Gen TYR

Hasil sekuensing setelah disejajarkan pada program BLAST NCBI untuk mengetahui seberapa besar kemiripan urutan sekuen antara sampel dengan sekuen target berdasarkan NCBI, selanjutnya dilakukan analisa sekuen dan asam amino. Penyejajaran hasil sekuensing selain menggunakan BLAST NCBI juga dengan *software* MEGA dan BioEdit. Dimana, data hasil sekuensing (sampel O dan sampel N) disejajarkan dengan tiga referensi yaitu gen TYR *Felis catus* dengan Database NCBI Locus XM_019811665.1, Locus XM_003992642.3, dan Locus AY743343.1 dimasukkan kedalam *software* MEGA dengan menggunakan *Align by ClustalW* dan *software* BioEdit dengan menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment*.

```

          440      450      460      470      480
XM_019811665.1_Felis_catus_434 ATGGATG ACCGGGAGGC CTGGCCCTCC GTCTTTTATA ATCGGACCTG CCA
XM_003992642.3_Felis_catus_434 ATGGATG ACCGGGAGGC CTGGCCCTCC GTCTTTTATA ATCGGACCTG CCA
AY743343.1_Felis_catus_434 ATGGATG ACCGGGAGGC CTGGCCCTCC GTCTTTTATA ATCGGACCTG CCA
Odd eye_434 ATGGATG ACCGGGAGGC CTGGCCCTCC GTCTTTTATA ATCGGACCTG CCA
Non Odd eye_434 ATGGATG ACCGGGAGGC CTGGCCCTCC GTCTTTTATA ATCGGACCTG CCA

          490      500      510      520      530
XM_019811665.1_Felis_catus_484 GTGCTTT GGCAACTTCA TGGGATTCAA CTGTGGAAAT TGCAAGTTTG GCT
XM_003992642.3_Felis_catus_484 GTGCTTT GGCAACTTCA TGGGATTCAA CTGTGGAAAT TGCAAGTTTG GCT
AY743343.1_Felis_catus_484 GTGCTTT GGCAACTTCA TGGGATTCAA CTGTGGAAAT TGCAAGTTTG GCT
Odd eye_484 GTGCTTT GGCAACTTCA TGGGATTCAA CTGTGGAAAT TGCAAGTTTG GCT
Non Odd eye_484 GTGCTTT GGCAACTTCA TGGGATTCAA CTGTGGAAAT TGCAAGTTTG GCT

          540      550      560      570      580
XM_019811665.1_Felis_catus_534 TTTGGGG ACCAAACTGC ACAGAGAAGC GACTTTTGGT GAGAAGAAAC ATC
XM_003992642.3_Felis_catus_534 TTTGGGG ACCAAACTGC ACAGAGAAGC GACTTTTGGT GAGAAGAAAC ATC
AY743343.1_Felis_catus_534 TTTGGGG ACCAAACTGC ACAGAGAAGC GACTTTTGGT GAGAAGAAAC ATC
Odd eye_534 TTTGGGG ACCAAACTGC ACAGAGAAGC GACTTTTGGT GAGAAGAAAC ATC
Non Odd eye_534 TTTGGGG ACCAAACTGC ACAGAGAAGC GACTTTTGGT GAGAAGAAAC ATC

          590      600      610      620      630
XM_019811665.1_Felis_catus_584 TTTGATT TGAGCGTCCC AGAGAAGAAC AAATTTCTTG CCTACCTCAC TTT
XM_003992642.3_Felis_catus_584 TTTGATT TGAGCGTCCC AGAGAAGAAC AAATTTCTTG CCTACCTCAC TTT
AY743343.1_Felis_catus_584 TTTGATT TGAGCGTCCC AGAGAAGAAC AAATTTCTTG CCTACCTCAC TTT
Odd eye_584 TTTGATT TGAGCGTCCC AGAGAAGAAC AAATTTCTTG CCTACCTCAC TTT
Non Odd eye_584 TTTGATT TGAGCGTCCC AGAGAAGAAC AAATTTCTTG CCTACCTCAC TTT

          640      650      660      670      680
XM_019811665.1_Felis_catus_634 AGCGAAG CATACTATCA GCCCAGACTA TGTCATCCCC ATAGGCACCT ATG
XM_003992642.3_Felis_catus_634 AGCGAAG CATACTATCA GCCCAGACTA TGTCATCCCC ATAGGCACCT ATG
AY743343.1_Felis_catus_634 AGCGAAG CATACTATCA GCCCAGACTA TGTCATCCCC ATAGGCACCT ATG
Odd eye_634 AGCGAAG CATACTATCA GCCCAGACTA TGTCATCCCC ATAGGCACCT ATG
Non Odd eye_634 AGCGAAG CATACTATCA GCCCAGACTA TGTCATCCCC ATAGGCACCT ATG
    
```

```

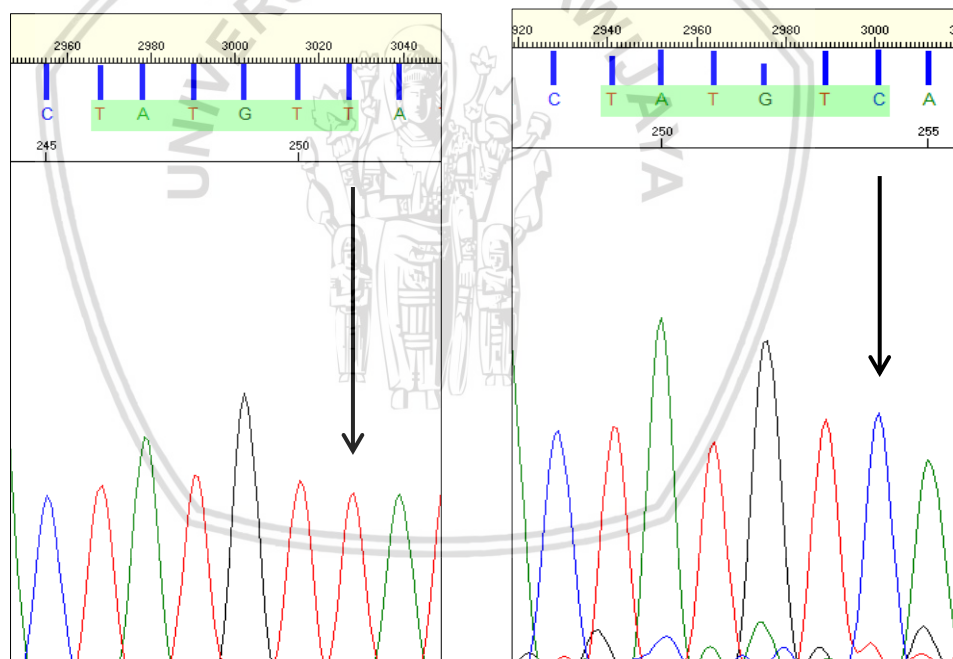
                                690      700      710      720      730
XM_019811665.1_Felis_catus 684  GCGAAAT GAATAATGGA TCTACACCCA TGTTTAATGA CATCAATGTT TAT
XM_003992642.3_Felis_catus 684  GCGAAAT GAATAATGGA TCTACACCCA TGTTTAATGA CATCAATGTT TAT
AY743343.1_Felis_catus    684  GCGAAAT GAATAATGGA TCTACACCCA TGTTTAATGA CATCAATGTT TAT
Odd eye                    684  GCGAAAT GAATAATGGA TCTACACCCA TGTTTAATGA CATCAATGTT TAT
Non Odd eye                684  GCGAAAT GAATAATGGA TCTACACCCA TGTTTAATGA CATCAATGTT TAT

                                740      750      760      770      780
XM_019811665.1_Felis_catus 734  GACCTCT TCGTCTGGAT GCATTACTAT GTGTCAAGGG ACACACTGCT TGG
XM_003992642.3_Felis_catus 734  GACCTCT TCGTCTGGAT GCATTACTAT GTGTCAAGGG ACACACTGCT TGG
AY743343.1_Felis_catus    734  GACCTCT TCGTCTGGAT GCATTACTAT GTGTCAAGGG ACACACTGCT TGG
Odd eye                    734  GACCTCT TCGTCTGGAT GCATTACTAT GTGTCAAGGG ACACACTGCT TGG
Non Odd eye                734  GACCTCT TCGTCTGGAT GCATTACTAT GTGTCAAGGG ACACACTGCT TGG

                                790
XM_019811665.1_Felis_catus 784  AGGGTCT GAAATC
XM_003992642.3_Felis_catus 784  AGGGTCT GAAATC
AY743343.1_Felis_catus    784  AGGGTCT GAAATC
Odd eye                    784  AGGGTCT GAAATC
Non Odd eye                784  AGGGTCT GAAATC

```

Gambar 5.6 Penyejajaran antara Sekuen DNA Sampel Kucing Odd eye dan Kucing Non odd eye terhadap Tiga Referensi dengan Program *ClustalW BioEdit*.



Gambar 5.7 Analisa Hasil Sekuensing Sampel Kucing Odd eye (a), dan Kucing Non Odd eye (b) menggunakan *Software Sequence Scanner*.

Hasil dari penyejajaran sekuen, ditemukan adanya perbedaan sekuen DNA yaitu perbedaan basa nukleotida antara sampel O terhadap sampel N,

dan tiga referensi yang digunakan dalam penyejajaran. Perbedaan terletak pada sekuen ke 664 dimana terjadi mutasi transisi yang ditunjukkan dengan adanya pergantian basa pada sekuen sampel O yaitu pergantian basa sitosin menjadi timin (c.664 C>T). Menurut Arruji (2014), mutasi transisi dapat terjadi apabila basa pirimidin pada rantai nukleotida DNA diganti oleh basa pirimidin yang lain, atau basa purin yang satu diganti oleh basa purin yang lain. Basa pirimidin timin (T) dapat diganti oleh basa sitosin (C), atau sebaliknya. Basa purin adenin (A) dapat diganti oleh basa guanin (G), atau sebaliknya.

Mutasi yang terjadi tidak mempengaruhi perubahan susunan asam amino, sehingga mutasi ini memiliki efek *silent mutation*. Salah satu penyebab terjadinya *silent mutation* yaitu adanya pergantian salah satu basa pada suatu kodon (biasanya pada basa terakhir), namun tidak terjadi perubahan asam amino (Setty, 2007).

				
	150	160	170	180	190
XM_0198116	MDDREAWPSV	FYNRTCQCFG	NFMGFNCGNC	KFGFWGPNCT	EKRLLVRRNI
XM_0039926	MDDREAWPSV	FYNRTCQCFG	NFMGFNCGNC	KFGFWGPNCT	EKRLLVRRNI
AY743343.1	MDDREAWPSV	FYNRTCQCFG	NFMGFNCGNC	KFGFWGPNCT	EKRLLVRRNI
Odd Eye	MDDREAWPSV	FYNRTCQCFG	NFMGFNCGNC	KFGFWGPNCT	EKRLLVRRNI
Non Odd Eye	MDDREAWPSV	FYNRTCQCFG	NFMGFNCGNC	KFGFWGPNCT	EKRLLVRRNI
				
	200	210	220	230	240
XM_0198116	FDLSVPEKNK	FLAYLTLAKH	TISPDYVIPI	GTYGQMNNGS	TPMFNDINVY
XM_0039926	FDLSVPEKNK	FLAYLTLAKH	TISPDYVIPI	GTYGQMNNGS	TPMFNDINVY
AY743343.1	FDLSVPEKNK	FLAYLTLAKH	TISPDYVIPI	GTYGQMNNGS	TPMFNDINVY
Odd Eye	FDLSVPEKNK	FLAYLTLAKH	TISPDYVIPI	GTYGQMNNGS	TPMFNDINVY
Non Odd Eye	FDLSVPEKNK	FLAYLTLAKH	TISPDYVIPI	GTYGQMNNGS	TPMFNDINVY
				
	250	260			
XM_0198116	DLFVWMHYV	SRDTLLGGSE	I		
XM_0039926	DLFVWMHYV	SRDTLLGGSE	I		
AY743343.1	DLFVWMHYV	SRDTLLGGSE	I		
Odd Eye	DLFVWMHYV	SRDTLLGGSE	I		
Non Odd Eye	DLFVWMHYV	SRDTLLGGSE	I		

Gambar 5.8 Penyejajaran Asam Amino antara Sampel Kucing Odd eye dan Kucing Non Odd eye terhadap Tiga Referensi dengan Program *ClustalW BioEdit*.

As. Amino	150
AY743343.1	M D D R E A W P S V F Y N R T
Odd eye	ATG GAT GAC CGG GAG GCC TGG CCC TCC GTC TTT TAT AAT CGG ACC
As. Amino	M D D R E A W P S V F Y N R T

As. Amino	160
AY743343.1	C Q C F G N F M G F N C G N C
Odd eye	TGC CAG TGC TTT GGC AAC TTC ATG GGA TTC AAC TGT GGA AAT TGC
As. Amino	C Q C F G N F M G F N C G N C

As. Amino	180
AY743343.1	K F G F W G P N C T E K R L L
Odd eye	AAG TTT GGC TTT TGG GGA CCA AAC TGC ACA GAG AAG CGA CTT TTG
As. Amino	K F G F W G P N C T E K R L L

As. Amino	190
AY743343.1	V R R N I F D L S V P E K N K
Odd eye	GTG AGA AGA AAC ATC TTT GAT TTG AGC GTC CCA GAG AAG AAC AAA
As. Amino	V R R N I F D L S V P E K N K

As. Amino	210
AY743343.1	F L A Y L T L A K H T I S P D
Odd eye	TTT CTT GCC TAC CTC ACT TTA GCG AAG CAT ACT ATC AGC CCA GAC
As. Amino	F L A Y L T L A K H T I S P D

As. Amino	220
AY743343.1	Y V I P I G T Y G Q M N N G S
Odd eye	TAT GTC ATC CCC ATA GGC ACC TAT GGC CAA ATG AAT AAT GGA TCT
As. Amino	Y V I P I G T Y G Q M N N G S

As. Amino	240
AY743343.1	T P M F N D I N V Y D L F V W
Odd eye	ACA CCC ATG TTT AAT GAC ATC AAT GTT TAT GAC CTC TTC GTC TGG
As. Amino	T P M F N D I N V Y D L F V W

As. Amino	250
AY743343.1	M H Y Y V S R D T L L G G S E
Odd eye	ATG CAT TAC TAT GTG TCA AGG GAC ACA CTG CTT GGA GGG TCT GAA
As. Amino	M H Y Y V S R D T L L G G S E

As. Amino	I
AY743343.1	ATC
Odd eye	ATC
As. Amino	I

Gambar 5.9 Urutan Kodon Pembentuk Asam Amino Gen TYR (Locus AY743343.1) terhadap Sampel Kucing Odd eye.

As. Amino	M D D R E A W P S V F Y N R T
AY743343.1	ATG GAT GAC CGG GAG GCC TGG CCC TCC GTC TTT TAT AAT CGG ACC
Non Odd eye	ATG GAT GAC CGG GAG GCC TGG CCC TCC GTC TTT TAT AAT CGG ACC
As. Amino	M D D R E A W P S V F Y N R T

As. Amino	C Q C F G N F M G F N C G N C
AY743343.1	TGC CAG TGC TTT GGC AAC TTC ATG GGA TTC AAC TGT GGA AAT TGC
Non Odd eye	TGC CAG TGC TTT GGC AAC TTC ATG GGA TTC AAC TGT GGA AAT TGC
As. Amino	C Q C F G N F M G F N C G N C

As. Amino	K F G F W G P N C T E K R L L
AY743343.1	AAG TTT GGC TTT TGG GGA CCA AAC TGC ACA GAG AAG CGA CTT TTG
Non Odd eye	AAG TTT GGC TTT TGG GGA CCA AAC TGC ACA GAG AAG CGA CTT TTG
As. Amino	K F G F W G P N C T E K R L L

As. Amino	V R R N I F D L S V P E K N K
AY743343.1	GTG AGA AGA AAC ATC TTT GAT TTG AGC GTC CCA GAG AAG AAC AAA
Non Odd eye	GTG AGA AGA AAC ATC TTT GAT TTG AGC GTC CCA GAG AAG AAC AAA
As. Amino	V R R N I F D L S V P E K N K

As. Amino	F L A Y L T L A K H T I S P D
AY743343.1	TTT CTT GCC TAC CTC ACT TTA GCG AAG CAT ACT ATC AGC CCA GAC
Non Odd eye	TTT CTT GCC TAC CTC ACT TTA GCG AAG CAT ACT ATC AGC CCA GAC
As. Amino	F L A Y L T L A K H T I S P D

As. Amino	Y V I P I G T Y G Q M N N G S
AY743343.1	TAT GTC ATC CCC ATA GGC ACC TAT GGC CAA ATG AAT AAT GGA TCT
Non Odd eye	TAT GTC ATC CCC ATA GGC ACC TAT GGC CAA ATG AAT AAT GGA TCT
As. Amino	Y V I P I G T Y G Q M N N G S

As. Amino	T P M F N D I N V Y D L F V W
AY743343.1	ACA CCC ATG TTT AAT GAC ATC AAT GTT TAT GAC CTC TTC GTC TGG
Non Odd eye	ACA CCC ATG TTT AAT GAC ATC AAT GTT TAT GAC CTC TTC GTC TGG
As. Amino	T P M F N D I N V Y D L F V W

As. Amino	M H Y Y V S R D T L L G G S E
AY743343.1	ATG CAT TAC TAT GTG TCA AGG GAC ACA CTG CTT GGA GGG TCT GAA
Non Odd eye	ATG CAT TAC TAT GTG TCA AGG GAC ACA CTG CTT GGA GGG TCT GAA
As. Amino	M H Y Y V S R D T L L G G S E
As. Amino	I
AY743343.1	ATC
Non Odd eye	ATC
As. Amino	I

Gambar 5.10 Urutan Kodon Pembentuk Asam Amino Gen TYR (Locus AY743343.1) terhadap Sampel Kucing Non Odd eye.

5.5 Regulasi Gen TYR terhadap Perbedaan Warna Mata

Proses pigmentasi pada mata terjadi melalui sintesis dan distribusi melanin di iris. Melanosit di mata berbeda dengan di kulit dan rambut. Melanosit di kulit terus-menerus diproduksi dan disekresi, sedangkan di mata melanosom yang mengandung pigmen dipertahankan dan mengalami kongesti di sitoplasma melanosit di dalam stroma iris. Melanosit membentuk dua tipe melanin, yaitu eumelanin dan feomelanin (Sturm *et al*, 2014).

Gen TYR akan menginstruksi pembentukan enzim *tyrosinase* yang berperan dalam proses melanogenesis untuk membentuk dua tipe pigmen warna yaitu eumelanin dan feomelanin (Genetic Home Reference, 2007). Enzim *tyrosinase* mengkatalisis dua reaksi utama dalam melanogenesis, yaitu hidroksilasi *tyrosine* menjadi *3,4-dihidroksilfenilalani* (DOPA) dan oksidasi DOPA menjadi *Dopaquinone*. Senyawa *Dopaquinone* memiliki kereaktifan yang sangat tinggi sehingga dapat mengalami polimerisasi secara spontan membentuk *Dopachrome* yang kemudian menjadi melanin. *Tyrosinase* terlibat dalam degenerasi lisosomal setelah membentuk *Dopaquinone*, adanya *cysteine* dalam bentuk granule lysosomal akan berikatan dengan *Dopaquinone* menjadi *cysteinyldopa* yang kemudian teroksidasi menjadi feomelanin. *Dopaquinone* akan diubah menjadi *Dopachrome* melalui autooksidasi ketika sudah tidak terdapat *cysteine*, sehingga menjadi *Dihidroksi Indole* (DHI) dan *Dihidroksi Indole Carboxy Acid* (DHICA) yang akan membentuk eumelanin. Rasio kedua tipe melanin tersebut yang menentukan pigmentasi yang terlihat (Jimbow, 2000). Jumlah dari dua

pigmen tersebut membantu dalam menentukan warna mata. Individu yang memproduksi banyak eumelanin cenderung memiliki warna mata yang lebih gelap, sedangkan individu yang memproduksi banyak feomelanin cenderung memiliki warna mata lebih terang (Rennie, 2012).

Hasil sekuensing gen TYR pada kucing odd eye, didapatkan perubahan basa nukleotida sitosin menjadi timin (c.664 C>T), maka ditinjau dari perubahan basa nukleotida tersebut terjadi mutasi transisi, sedangkan apabila ditinjau dari perubahan asam amino, hasil sekuensing tersebut menunjukkan adanya *silent mutation*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Graur (2003), dimana *silent mutation* merupakan perubahan suatu pasangan basa dalam gen yang menimbulkan perubahan satu kode genetik tetapi tidak mengakibatkan perubahan atau pergantian asam amino yang dikode. Selain itu, berdasarkan hasil sekuensing gen TYR pada kucing odd eye menunjukkan adanya variasi sekuen DNA yang berkaitan dengan *single nucleotide polymorphism* (SNP). *Single nucleotide polymorphism* merupakan polimorfisme yang terjadi karena adanya perubahan pasang basa tunggal normal pada sekuen DNA suatu individu (Guerra, 2005). SNP terbagi menjadi tiga berdasarkan lokasinya yaitu regio coding, regio non-coding, dan regio intergenic (regio antara 2 gen). SNP pada regio coding terbagi lagi menjadi dua tipe yaitu *synonymous*, dan *nonsynonymous*. SNP *synonymous* tidak memberikan efek perubahan asam amino atau urutan protein, sedangkan pada SNP *nonsynonymous* terjadi perubahan sekuens basa nukleotida, dan asam amino, berdasarkan pernyataan tersebut apabila dibandingkan dengan

hasil sekuensing, maka gen TYR pada kucing odd eye termasuk kedalam *single nucleotide polymorphism synonymous* dimana keanekaragaman genetik terjadi dikarenakan adanya perubahan basa nukleotida tanpa adanya perubahan asam amino.



BAB 6 PENUTUP

6.1. Kesimpulan

Identifikasi sekuen gen TYR antara kucing odd eye dan kucing non odd eye menunjukkan adanya perbedaan sekuen DNA. Perbedaan terdapat pada sekuen kucing odd eye pada urutan basa ke 664 yaitu pergantian basa sitosin (C) menjadi timin (T) (c.664 C>T), menghasilkan *silent mutation* yang tidak diikuti perubahan asam amino.

6.2. Saran

Diperlukan penelitian lanjutan tentang perbedaan warna mata pada kucing odd eye dengan menggunakan gen lain yang bertanggung jawab dalam produksi melanin di mata.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., Nurjanah, dan K. Nanang. 2011. Autentikasi Tuna Steak Komersial dengan Metode PCR-Sequencing. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. Vol. XIV (1): 1-7.
- Arikunto, S. 2010. *Prosedur Penelitian : Suatu Pendekatan Praktik*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Arruji, E . 2014. *Biologi Mutasi*. Universitas Islam Negeri. Jakarta.
- Bartlett, J. M. S., and D. Stirling. 2003. *PCR Protocols Second Edition*. Methods in Molecular Biology Vol. 226.
- Bulla A., B. De Witt., W. Ammerlaan, F. Betsou, and P. Lescuyer. 2016. *Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage*. *Biopreservation and Biobanking* 14 (1).
- Caldwell, J. M., M. E. Raley, and J. F. Levine. 2007. *Mitochondrial Multiplex Real Time PCR as a Source Tracking Methodin Fecal-Contaminated Effluents*. *Environ Sci Technol* 41, 3277–3283.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, and L. G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Terj dari *Biology*, oleh Lestari, R., E.I.M. Adil & Anita. 5th ed. Erlangga, Jakarta: xxi.
- Case, L. P. 2003. *The Cat Its Behavior, Nutrition and Health*. Iowa State Press: USA.
- Chen, B. Y., and H. W. Janes. 2002. *Methods in Biomolecular Biology: PCR Cloning Protocol 2nd Ed*. Rutgers University.
- Eldredge, Debra M., D. G. Carlson, L. D. Carlson, and J. M. Giffin. 2008. *Cat Owner's Home Veterinary Handbook (Third Edition)*. Wiley Publishing, Inc. New Jersey.
- Fatchiyah. 2008. *Buku Praktis: Mengenal Polymerase Chain Reaction Dasar Teknik Amplifikasi DNA & Aplikasinya*. UB. Malang.
- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2009. *Dasar-Dasar Anlisa Biologi Molekuler*. Malang: LSIH Press Universitas Brawijaya.
- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga: Jakarta.

- Fatchiyah. 2015. *Prinsip Dasar Bioinformatika*. UB Press. Malang.
- Genetics Home Reference. 2007. *TYR Gene (Tyrosinase)*. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TYR>. Diakses pada tanggal 07 Juli 2017.
- Gladstone, M. R. 2016. *Development and Significance of Heterochromia of the Iris*. University of Toronto.
- Graur, Dan. 2005. *Single-base Mutation*. Tel Aviv University. Israel.
- Guerra. 2005. *Single Nucleotide Polymorphisms and Their Applications*. Rice University. USA.
- Handoyo, Darmo dan A. Rudiretna. 2001. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Unitas*, Vol. 9, No.1.
- Hoekstra, H. E. 2006. *Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates*. *Heredity* (2006) 97, 222-234.
- Jaffe, M., W. Hammond, P. Toalis, and T. Arinzeh. 2013. *Characterization of Biomaterials*. Woodhead Publishing. UK.
- Jegga, A. G., and B. J. Anorow. 2006. *Evolutionarily Conserved Noncoding DNA*. *Encyclopedia of Life Sciences* 32: 1-7.
- Jimbow K., H. Chen, F. G. Paul, and H. Kuninori. 2000. *Intracellular vesicular trafficking of tyrosinase gene family protein in eu- and pheomelanosome biogenesis*. *Pigment Cell Res*: 110–117.
- Kane, E. 2001. *Feeding Behavior of the Cat Feed Laboratory and Comercial Diets*. *Nutritional Research* 1:499-507.
- Karen G, E. Jakob, and B. N. Karen. 2007. *Oculocutaneous albinism*. BioMed Central Ltd. Denmark
- Makpol, S. 2009. *Modulation of Melanin Synthesis and Its Gene Expression in Skin Melanocytes by Palm Tocotrienol Rich Fraction*. National University of Malaysia.
- Ramsden, C. A., and A.R. Patrick. 2010. *Mechanistic Studies of Tyrosinase Suicide Inactivation*. *Special Issue Reviews and Accounts*: 260-274.
- Rennie, I. G. 2012. *Don't It Make My Blue Eyes Brown: Heterochromia and Other Abnormalities of The Iris*. Oxford Ophthalmological. *Eye* 26(1): 29–50.

- Ross M. H., and W. Pawlina. 2011. *Histology a Text and Atlas (Sixth Edition)*. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- Santella, R. M. 2006. *Approachesto DNA/RNA Extraction and Whole Genom Amplification*. *Cancer Epidemiol Biomarkers*.15: 185-187.
- Sambrook J., and D. W. Russel. 2001. *Molecular Cloning 3rd ed*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Setty, R. S., and V. Sreekrishna. 2007. *Biotechnology-2: Including Cell Biology, Genetics, Microbiology*. New Age International Pvt Ltd Publishers. ISBN 13: 9788122414172.
- Sturm, Richard, and T. N. Frudakis. 2014. *Eye Color: Portals into Pigmentation Genes and Ancesary*. Trends in Genetics Vol.20 No.8. Institute for molecular bioscience. University of Queensland. Australia.
- Sugiyono. 2012. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag Berlin. Hendelberg.
- Suwed, M. A., dan Budiana. 2006. *Membiakkan Kucing Ras*. Penebar Swadaya: Depok.
- Suwed, M., dan R. M. Napitupulu. 2011. *Panduan Lengkap Kucing*. Depok : Penebar Swadaya.
- The National Guard Health Affairs. 2013. *Infection Prevention and Control Department*. King Abdullah International Medical Research Center.
- Tsonis, P. A. 2008. *Animal Models in Eye Research*. University of Dayton. USA.
- Triwibowo. 2010. *Teori dan Aplikasi PCR*. Yogyakarta: Penerbit AND.
- Widowati, E.W. 2013. *Desain Primer Sitokrom B (Cyt b) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk Deteksi DNA Babi*. Laporan Penelitian Individual Lembaga Penelitian Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga. Yogyakarta.