

**IDENTIFIKASI WARNA RAMBUT KELINCI  
NEW ZEALAND (*Oryctolagus cuniculus*)  
BERDASARKAN SEQUENCE GEN  
MC1R (*Melanocortin 1 receptor*)  
DENGAN METODE PCR**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ISMA AULIA NOVARIANI  
155130100111021**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**IDENTIFIKASI WARNA RAMBUT KELINCI  
NEW ZEALAND (*Oryctolagus cuniculus*)  
BERDASARKAN SEQUENCE GEN  
MC1R (*Melanocortin 1 receptor*)  
DENGAN METODE PCR**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ISMA AULIA NOVARIANI  
155130100111021**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Identifikasi warna rambut Kelinci New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*)  
berdasarkan sequence gen MC1R (*Melanocortin 1 reseptor*)  
dengan metode PCR**

Oleh :

**ISMA AULIA NOVARIANI**  
NIM. 155130100111021

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 4 Oktober 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof.Dr.Ir.Gatot Ciptadi, DESS, IPU**

NIP. 196005121987011001

**drh.Dyah Ayu Oktaviane A.P.,M.Biotech**

NIP. 198410262008122004

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc**

NIP. 19631216 198803 1 002

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Isma Aulia Novariani  
NIM : 155130100111021  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul:

Identifikasi warna rambut Kelinci New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) berdasarkan sequece gen MC1R (*Melanocortin 1 reseptor*) dengan metode PCR

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 saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Januari 2019  
Yang menyatakan,

**(ISMA AULIA NOVARIANI)**  
**NIM. 155130100111021**

**IDENTIFIKASI WARNA RAMBUT KELINCI NEW ZEALAND  
(*Oryctolagus cuniculus*) BERDASARKAN SEQUENCE  
GEN MC1R (*Melanocortin 1 reseptor*)  
DENGAN METODE PCR**

**ABSTRAK**

Kelinci New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) merupakan salah satu kelinci populer di Indonesia yang sering diperlombakan karena warna rambutnya yang memiliki daya tarik tersendiri. Kelinci New Zealand terbagi menjadi empat berdasarkan warna rambutnya yaitu Kelinci New Zealand Black, Red, Blue, dan White (Albino). Perbedaan warna rambut yang dimilikinya dipengaruhi oleh ekspresi gen *Melanocortin 1 reseptor* (MC1R). MC1R merupakan gen pengkode produksi melanin pada kulit dan rambut. Penelitian ini bertujuan mengetahui adanya perbedaan sekuen gen MC1R pada Kelinci New Zealand dengan metode PCR. Sampel yang digunakan berupa DNA yang diisolasi dari masing-masing satu sampel darah Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino). Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR menggunakan sepasang primer *forward* (MC1R\_F) 5'- GTG GAC CGC TAC ATC TCC AT -3' dan *reverse* (MC1R\_R) 5'- TCT CAC CAG GAG CAC AAC AG -3' yang didesain melalui *Primer3Plus* menggunakan *database* NCBI FN658677.1. Analisa sekuen gen dilakukan sekuensing dengan metode Sanger. Hasil sekuen dianalisa menggunakan *software* Bioedit dan BLAST NCBI. Hasil penelitian menunjukkan sampel Kelinci New Zealand Black terdapat mutasi 2 transisi dan 9 mutasi transversi yang mempengaruhi susunan asam amino, sehingga disebut mutasi *miss sense*. Pada Kelinci New Zealand Red dan White (Albino) terdapat 1 mutasi transisi pada sekuen ke-369 yang tidak merubah susunan asam amino sehingga disebut *silence mutation*. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat perbedaan urutan basa nukleotida yang mempengaruhi susunan asam amino gen MC1R pada Kelinci New Zealand Black. Sedangkan pada Kelinci New Zealand Red dan White (Albino) perbedaan urutan basa nukleotida tidak mempengaruhi susunan asam amino gen MC1R.

**Kata Kunci:** Kelinci New Zealand, MC1R, PCR, warna rambut.

repository.ub.ac.id

**IDENTIFICATION OF NEW ZEALAND RABBIT (*Oryctolagus cuniculus*)  
HAIR COLOR BASED ON MC1R (*Melanocortin 1 receptor*)  
SEQUENCE USING PCR METHOD**

**ABSTRACT**

New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is one of the most popular rabbits in Indonesia which is often contested because of the hair color that has its charm. New Zealand rabbits are divided into four by the color of their hair, namely New Zealand Black, Red, Blue and White (Albino) Rabbits. The difference in hair color it possesses is influenced by the expression of the Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene. MC1R is a gene that codes for melanin production in the skin and hair. This study aims to determine the differences in the MC1R gene sequence in New Zealand rabbits using the PCR method. The samples used were DNA isolated from each of the New Zealand Black, Red, and White (Albino) Rabbit blood samples. DNA amplification was carried out by PCR method using a pair of forward primers (MC1R\_F) 5'- GTG GAC CGC TAC ATC TCC AT-3 'and reverse (MC1R\_R) 5'- TCT CAC CAG GAG CAC AAC AG-3' designed through Primer3Plus using Primer3Plus database NCBI FN658677.1. Gene sequence analysis is done by Sanger method. Sequence results were analyzed using Bioedit and BLAST NCBI software. The results showed that the New Zealand Black Rabbit sample contained 2 transitions and 9 transversion mutations that affect the formation of amino acids, so called miss sense mutations. In New Zealand Red and White (Albino) rabbits, there is one transition mutation in the 369th sequence that does not change the composition of amino acids so it is called silence mutation. This study concludes that there are differences in the sequence of nucleotide bases that affect the amino acid composition of the MC1R gene in New Zealand Black Rabbit. Whereas in New Zealand Red and White (Albino) Rabbits the difference in nucleotide base sequence does not affect the amino acid composition of the MC1R gene.

**Keywords:** New Zealand Rabbit, MC1R, PCR, hair color.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi yang berjudul **“Identifikasi warna rambut Kelinci New Zealand (*Oryctolagus Cuniculus*) berdasarkan sequeance gen MC1R (*Melanocortin 1 reseptor*) dengan metode PCR”** dapat diselesaikan. Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Naskah skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat ununtut memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS, IPU selaku dosen pembimbing I dan drh. Dyah Ayu Oktavianie A. P., M.Biotech. selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, waktu, koreksi, dan arahan dalam penulisan skripsi ini.
2. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet selaku dosen penguji I dan drh. Galuh Chandra A., M.Si selaku dosen penguji II atas bimbingan, kritik, saran, dan arahan dalam penulisan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES, selaku Pembimbing Akademik atas bimbingan dan dukungan.

5. Keluarga penulis, Abah Ahmad Yamani, Mama Zuhairiah, Kakak Fajrin Azwary, dan Nenek Ainun Jariah atas semangat, dukungan, doa, dan kasih sayang.
6. Teman-teman Future Planner, teman-teman seperjuangan skripsi Andi Kurniawan, Agnes Arimbi, Sankha Rossa, dan teman-teman penelitian PCR atas persahabatan, bantuan, semangat, kerja sama, dan selalu ada dari awal sampai akhir penulisan skripsi.
7. Muhammad Ibenk Abdillah yang telah membantu memberikan pencerahan dalam proses pengerjaan skripsi.
8. Semua pihak yang telah turut berperan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Skripsi ini dapat memberikan manfaat tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, 24 Januari 2019

Penulis

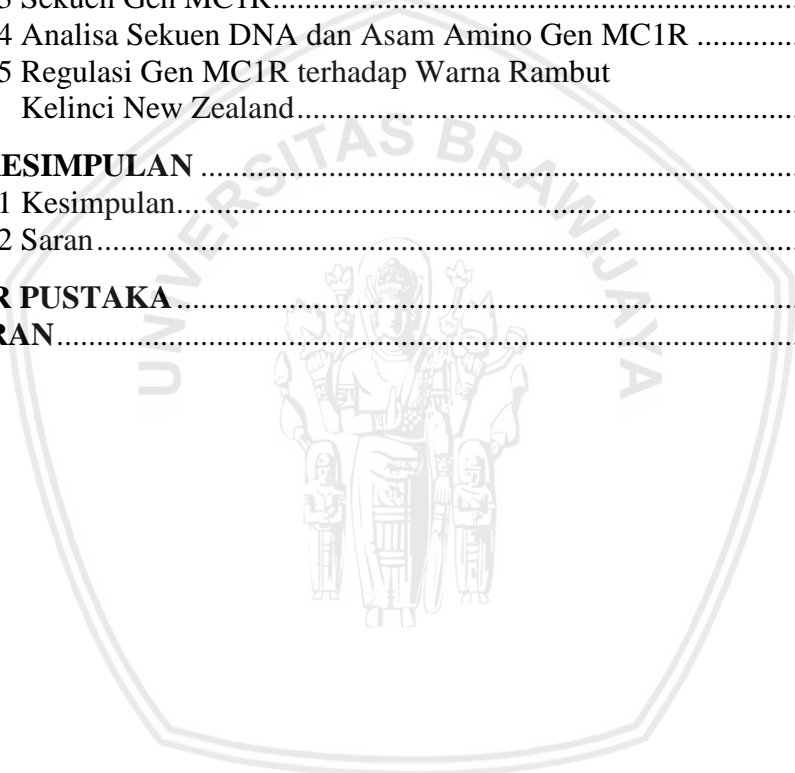


## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN</b> .....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Kelinci New Zealand .....	6
2.2 Morfologi Kelinci New Zealand .....	7
2.3 Warna Rambut Kelinci New Zealand .....	8
2.4 <i>Melanocortin 1 receptor</i> (MC1R) .....	10
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	12
2.6 Sekuensing DNA .....	16
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> ...	18
3.1 Kerangka Konseptual .....	18
3.2 Hipotesis Penelitian .....	20
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	21
4.0 Hewan Percobaan .....	21
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	21
4.2 Sampel Penelitian .....	21
4.3 Alat dan Bahan .....	22
4.4 Tahapan Penelitian .....	22
4.5 Rancangan Penelitian .....	23
4.6 Prosedur Kerja .....	24
4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Kelinci New Zealand dan Kelinci New Zealand Albino .....	24
4.6.2 Isolasi DNA .....	24
4.6.3 Uji Kuantitas DNA .....	24
4.6.4 Uji Kualitas DNA .....	25



4.6.5 Design Primer.....	26
4.6.6 Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	26
4.6.7 Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR .....	27
4.6.8 Purifikasi Produk PCR .....	27
4.6.9 Sekuensing DNA.....	28
4.6.10 Analisis Data .....	28
4.6.11 Kerangka Operasional .....	29
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	30
5.1 Isolasi DNA Kelinci New Zealand.....	30
5.2 Amplifikasi Gen MC1R dengan Metode PCR.....	33
5.3 Sekuen Gen MC1R.....	35
5.4 Analisa Sekuen DNA dan Asam Amino Gen MC1R .....	37
5.5 Regulasi Gen MC1R terhadap Warna Rambut Kelinci New Zealand.....	41
<b>BAB 6 KESIMPULAN</b> .....	43
6.1 Kesimpulan.....	43
6.2 Saran.....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	44
<b>LAMPIRAN</b> .....	47



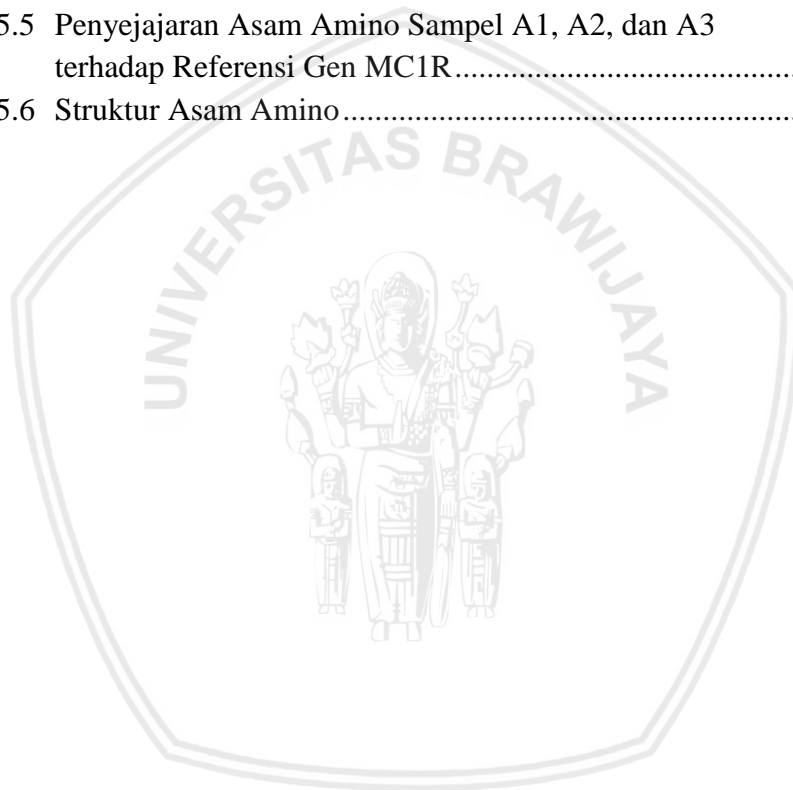
## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Sampel Darah Kelinci.....	30
Tabel 5.2 Urutan Oligo Nukleotida Primer Gen MC1R .....	33
Tabel 5.3 <i>Query Coverage</i> dan <i>Identity Percentage</i> Sampel Kelinci .....	35
Tabel 5.4 Jenis Mutasi pada Sampel .....	38



**DAFTAR GAMBAR**

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Warna Rambut Kelinci New Zealand.....	9
Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total .....	32
Gambar 5.2 Origin Oligo Nukleotida Gen MC1R.....	33
Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR .....	34
Gambar 5.4 Penyejajaran antara Sekuen DNA Sampel IB, IR, dan IW terhadap Referensi Gen MC1R.....	37
Gambar 5.5 Penyejajaran Asam Amino Sampel A1, A2, dan A3 terhadap Referensi Gen MC1R.....	39
Gambar 5.6 Struktur Asam Amino .....	40



## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Sertifikasi Laik Etik Penelitiani.....	48
Lampiran 2. Protokol Isolasi DNA .....	49
Lampiran 3. Desain Primer .....	50
Lampiran 4. Pembacaan Hasil Sekuensing Menggunakan <i>BioEdit Tools</i> .....	54
Lampiran 5. <i>Aligment</i> MC1R Nukleotida Sampel IB ( <i>Query</i> ) terhadap Urutan Nukteotida dari <i>Database</i> (Sbjct).....	56
Lampiran 6. <i>Aligment</i> MC1R Nukleotida Sampel IR ( <i>Query</i> ) terhadap Urutan Nukteotida dari <i>Database</i> (Sbjct).....	56
Lampiran 7. <i>Aligment</i> MC1R Nukleotida Sampel IW ( <i>Query</i> ) terhadap Urutan Nukteotida dari <i>Database</i> (Sbjct).....	57
Lampiran 8. Grafik Elektroforegram Sampel I1, I2, dan I3 .....	58
Lampiran 9. Dokumentasi Sampel Kelinci New Zealand.....	61



## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

<b>Simbol/ Singkatan</b>	<b>Keterangan</b>
%	: Persen
°C	: Derajat Celcius
μL	: Mikroliter
BLAST	: <i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
Bp	: <i>Base pair</i>
cAMP	: <i>cyclic adenosine monophosphates</i>
dATP	: <i>deoxyadenosin triphosphates</i>
dCTP	: <i>deoxytidine triphosphates</i>
ddNTPs	: <i>dideoxynucleotide triphosphates</i>
ddH <sub>2</sub> O	: <i>double distilled water</i>
dGTP	: <i>deoxyguanosine triphosphates</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
dNTPs	: <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
dTTP	: <i>deoxytimidine triphosphates</i>
EtBr	: <i>Ethidium Bromide</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
g	: gram
Kg	: Kilogram
MC1R	: <i>Melanocortin-1 Receptor</i>
MgCl <sub>2</sub>	: Magnesium Klorida
NCBI	: <i>National Centre for Biotechnology Information</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
T <sub>m</sub>	: <i>Melting Temperature</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kelinci merupakan mamalia dari famili Leporidae (pemakan tumbuhan hijau) yang memiliki daya adaptasi relatif tinggi sehingga dapat ditemukan di banyak daratan bumi. Kelinci dulunya merupakan hewan liar yang sulit dijinakkan dan hidup di Afrika hingga daratan Eropa. Sejak 2000 tahun silam, kelinci mulai dijinakkan dengan tujuan sebagai bahan pangan, hewan percobaan, maupun peliharaan (Brahmantiyo, 2007). Kelinci pertama kali dibawa ke tanah Jawa pada tahun 1835 oleh orang-orang Belanda. Pada saat itu, kelinci sudah dijadikan sebagai ternak hias. Asal kata kelinci berasal dari bahasa Belanda yaitu “*konijntje*” yang berarti anak kelinci. Hal tersebut menunjukkan bahwa masyarakat Indonesia telah mengenal kelinci saat masa kolonial (Irfandi, 2010).

Data Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia tahun 2013 hingga 2017 menunjukkan peningkatan semua jenis populasi kelinci di berbagai Provinsi di Indonesia. Pada tahun 2013, populasi kelinci di Indonesia mencapai 1.137.041 ekor. Populasi terus meningkat berdasarkan data jumlah kelinci pada tahun 2017 yaitu 1.237.762 ekor (Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2017). Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa masyarakat Indonesia cukup tertarik untuk memelihara kelinci. Bentuk kelinci yang lucu dengan telinga yang panjang, tingkah lakunya yang menggemaskan, dan tidak membutuhkan

banyak ruang untuk pemeliharannya membuat banyak masyarakat menyukai kelinci.

Kelinci New Zealand termasuk salah satu jenis kelinci yang populer di masyarakat Indonesia. Sesuai namanya, kelinci berbadan besar ini berasal dari New Zealand. Kelinci ini menyebar dan berkembang ke Amerika Serikat dan Australia. Namun sekarang sudah menyebar ke seluruh dunia termasuk Indonesia. Kelinci New Zealand di Indonesia sering diperlombakan dalam berbagai kontes kelinci karena warna rambutnya yang memiliki daya tarik tersendiri (Irfandi, 2010). Kelinci New Zealand memiliki empat jenis warna rambut yang telah diakui oleh *American Rabbit Breeder Association* (ARBA) diantaranya black (hitam), red (merah), blue (abu-abu), dan white (albino).

Perbedaan warna rambut yang dimiliki Kelinci New Zealand dipengaruhi oleh ekspresi gen *Melanocortin 1 receptor* (MC1R). *Melanocortin 1 receptor* (MC1R) merupakan gen yang mengkode produksi melanin sehingga memberikan warna pada kulit dan rambut (Rees, 2000). Identifikasi warna rambut Kelinci New Zealand berdasarkan sekuen gen MC1R sampai saat ini belum banyak diteliti. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan sekuen gen *Melanocortin-1 receptor* pada Kelinci New Zealand yang dilakukan dengan metode PCR.



## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbedaan sekuen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) yang mempengaruhi warna rambut Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino)?

## 1.3 Batasan Masalah

1. Penggunaan hewan coba pada penelitian ini sedang dalam tahap pengajuan sertifikasi Laik Etik Penelitian dari Komisi Etik Penelitian (KEP) Universitas Brawijaya.
2. Sampel yang digunakan adalah darah dari 1 ekor Kelinci New Zealand Normal Black berumur  $\geq 1$  tahun, 1 ekor Kelinci New Zealand Normal Red berumur  $\geq 1$  tahun, dan 1 ekor Kelinci New Zealand White (Albino) berumur  $\geq 1$  tahun. Semua kelinci yang diambil sampelnya berjenis kelamin jantan yang diperoleh dari Peternakan Kelinci Modern Kota Batu, Jawa Timur.
3. Isolasi gen DNA MC1R menggunakan Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit.
4. DNA gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) Kelinci New Zealand diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer dari database NCBI *Genebank*: *Forward* (MC1R\_F) 5'- GTG GAC CGC TAC ATC TCC AT -3' dan *Reverse* (MC1R\_R) 5'- TCT CAC CAG GAG CAC AAC AG -3'. Primer didesain melalui *Primer3Plus* menggunakan *database* NCBI FN658677.1.

5. Metode PCR dilakukan menggunakan alat *SensoQuest Thermocycler* dengan program: pradenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, dan *post extension* 72°C selama tujuh menit.
6. Sekuensing DNA dilakukan dengan mengambil 1 sampel Kelinci New Zealand Black, 1 sampel Kelinci New Zealand Red, 1 sampel Kelinci New Zealand White (Albino) dengan metode dideoksi sanger berdasarkan *dye terminator labelling* dengan menggunakan sepasang primer *Forward* (MC1R\_F) 5'- GTG GAC CGC TAC ATC TCC AT -3' dan *Reverse* (MC1R\_R) 5'- TCT CAC CAG GAG CAC AAC AG -3'.
7. Analisa data dilakukan untuk mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA pada Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino) menggunakan program *BioEdit* dan *Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui perbedaan urutan basa nukleotida gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) yang mempengaruhi warna rambut pada Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino).

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dalam penyediaan informasi genetik tentang warna rambut Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino) yang disandi oleh gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R).



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kelinci New Zealand

Kelinci merupakan salah satu kelompok hewan yang sangat populer dan digemari masyarakat. Kelinci secara umum memiliki potensi biologis dan ekonomi yang tinggi sebagai penghasil daging, kulit dan rambut, juga untuk hewan kesayangan atau kelinci hias. Bentuk kelinci yang lucu dengan telinga yang panjang, tingkah lakunya yang menggemaskan, dan tidak membutuhkan banyak ruang untuk pemeliharannya membuat banyak masyarakat menyukai kelinci. Selain itu, warna rambut yang dimiliki oleh kelinci juga menjadi daya tarik tersendiri (Irfandi, 2010).

Salah satu jenis kelinci yang sangat populer di Indonesia adalah Kelinci New Zealand. Kelinci ini berasal dari New Zealand yang kemudian menyebar dan berkembang ke Amerika Serikat dan Australia. Kelinci New Zealand pada awalnya dikembangkan untuk memenuhi permintaan perdagangan daging dan bulu. Kelinci New Zealand mulai dijadikan peliharaan sejak keberadaannya meluas ke daerah tropis. Kelinci New Zealand memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap iklim yang hangat dan lembab sehingga keberadaannya dapat meluas ke daerah tropis seperti Indonesia (Hardy *et al.*, 2013). Meskipun ukuran tubuhnya yang besar, Kelinci New Zealand memiliki sifat yang tenang dan tidak agresif sehingga sangat mudah untuk dipelihara. Kelinci New Zealand

memiliki empat jenis warna rambut yang telah diakui oleh *American Rabbit Breeder Association* (ARBA) diantaranya black (hitam), red (merah), blue (abu-abu), dan white (albino). Oleh karena ragam warna rambut yang dimilikinya, Kelinci New Zealand banyak dibudidayakan sebagai penghasil bulu dan hewan peliharaan (kelinci hias). Menurut Damron (2003) bangsa kelinci diklasifikasikan sebagai berikut.

Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Legomorpha
Famili	: Leporidae
Sub famili	: Leporine
Genus	: Orictolagus
Spesies	: Orictolagus cuniculus

## 2.2 Morfologi Kelinci New Zealand

Kelinci New Zealand memiliki karakter diantaranya bagian dada yg padat, kaki depan agak pendek, kepala besar dan agak bundar, rambut halus dan tebal, telinga besar dan tebal dengan ujung membulat. Hewan ini merupakan herbivore non ruminansia yang mempunyai sistem lambung sederhana (tunggal) dengan perkembangan sekum seperti pencernaan ruminansia, sehingga hewan ini disebut ruminansia semu (pseudoruminant) (Faiz, 2009). Umur hidupnya 5-10 tahun dengan umur produktif 2-3 tahun dan jumlah beranak rata-rata 10 kali per

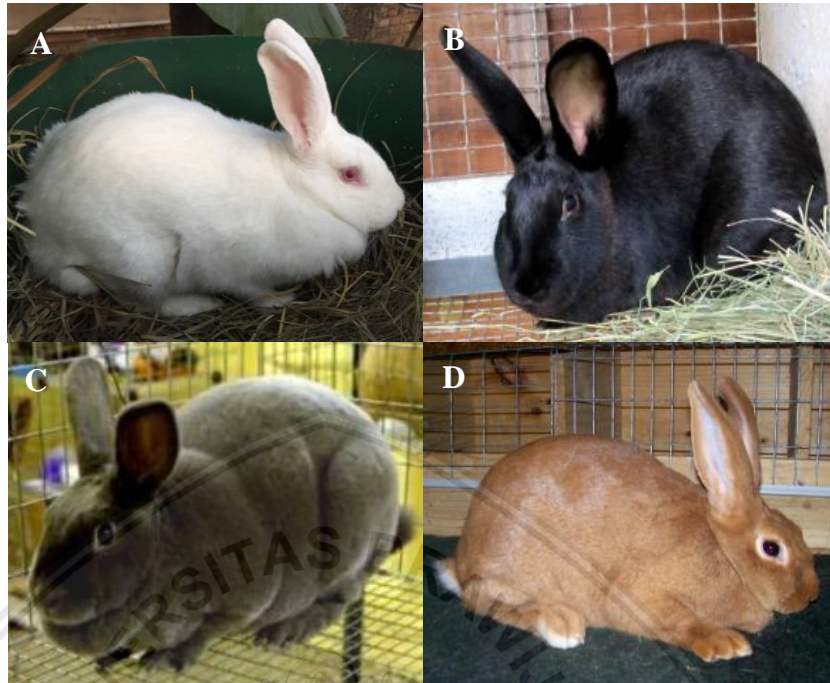
tahun. Kelinci New Zealand memiliki bobot lahir rata-rata 50-70 g/ekor dan bobot dewasa 5-10 kg per ekor (Brahmantiyo dan Raharjo, 2005). Kelinci pada umumnya memiliki 44 buah kromosom. Kelinci memiliki suhu tubuh berkisar 38-40°C dan memiliki bobot tulang sebesar 7-8% dari total bobot tubuhnya (Muslih *et al*, 2006).

Kelinci telah mencapai dewasa kelamin saat berumur 4 bulan. Pada saat itu pula kelinci sudah dapat dikawinkan. Setiap satu ekor pejantan dapat dikawinkan dengan 8-10 ekor betina dengan tingkat keberhasilan pembuahan 95% (Brahmantiyo dan Raharjo, 2005). Lama masa bunting kelinci sekitar 31-32 hari. Jumlah anak per kelahiran rata-rata 6-7 ekor dengan tingkat keselamatan 85-95%. Masa sapih anak kelinci saat berumur 6-8 minggu setelah kelahiran (Cheeke *et al*, 1987). Kelinci umumnya beraktifitas saat tengah malam dan pada saat hari mulai senja, tetapi dapat menyesuaikan diri terhadap pengaruh lingkungan (Muslih *et al*, 2006).

### **2.3 Warna Rambut Kelinci New Zealand**

Kelinci New Zealand terbagi menjadi dua berdasarkan warna rambut yang dimilikinya yaitu Kelinci New Zealand White (Albino) dan Kelinci New Zealand (Red, Blue, dan Black). Kelinci New Zealand White merupakan kelinci albino yang tidak mempunyai rambut berwarna yang mengandung pigmen. Kelinci New Zealand White merupakan keturunan dari Kelinci New Zealand Red yang pada tahun 1916 oleh William Preshaw ditemukan lahir di kandang Kelinci

New Zealand Red. Kemudian pada tahun 1919 oleh William Preshaw Kelinci New Zealand White mulai dikembangkan. Rambut kelinci ini berwarna putih mulus, sangat padat, dan terasa tebal apabila diraba. Kelinci ini memiliki ciri khusus berupa mata berwarna merah yang merupakan ekspresi gen cc yang menyebabkan albino pada permukaan tubuh dan merah pada mata (Covrig *et al.*, 2013). Kelinci New Zealand White di negara asalnya sendiri merupakan kelinci yang paling banyak ditenakkan untuk diambil rambutnya dikarenakan warna rambut putihnya membawa harga yang lebih tinggi dibandingkan warna lainnya (Peace Corps, 2014). Sedangkan Kelinci New Zealand memiliki tiga jenis warna sesuai dengan nama yang dimilikinya yaitu New Zealand Red dengan rambut berwarna merah, New Zealand Blue dengan rambut berwarna abu-abu, dan New Zealand Black dengan rambut berwarna hitam. Adanya produksi melanin pada Kelinci New Zealand sehingga memberikan warna yang beragam pada warna rambutnya (Busono dan Mardiani, 2010). Perbandingan warna rambut Kelinci New Zealand dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



**Gambar 2.1** Perbandingan warna rambut Kelinci New Zealand:

- a) Kelinci New Zealand White (Albino)
  - b) Kelinci New Zealand Black
  - c) Kelinci New Zealand Blue
  - d) Kelinci New Zealand Red
- (Busono dkk, 2015).

#### 2.4 Melanocortin-1 Receptor (MC1R)

*Melanocortin 1 receptor* atau reseptor melanokortin 1 (MC1R) merupakan suatu kelompok reseptor pasangan protein G (*G-Protein Coupled Receptors*) transmembran pada melanosit yang menjabarkan fenotip dari pigmen kulit, mengatur aspek fungsional melanosit termasuk stimulasi siklik adenosin monofosfat (cAMP) yang mengarah pada peningkatan aktivitas tirosinase, melanogenesis serta proliferasi. Reseptor ini terletak pada permukaan melanosit



yang merupakan sel khusus penghasil pigmen yaitu melanin. Melanin merupakan zat pemberi warna pada kulit, rambut, dan mata. Melanin juga ditemukan pada jaringan peka cahaya di bagian belakang mata (retina) yang berperan dalam penglihatan normal (Rees, 2000).

Pigmentasi kulit dan rambut tergantung pada beberapa pengaruh termasuk faktor genetik yang mempengaruhi ukuran satuan melanin epidermis dan melanosom serta produksi melanin. Dalam mengatur pigmentasi, melanokortin berikatan dengan reseptornya yaitu MC1R yang terletak pada permukaan melanosit. Terdapat dua tipe pigmen melanin utama, yaitu *eumelanin* dan *feumelanin*. *Eumelanin* bersifat inert secara kimia dan *photoprotective* yang akan menyerap radiasi UV, semakin banyak *eumelanin* maka akan semakin terlindungi dari kerusakan UV. *Eumelanin* memberikan warna coklat atau coklat gelap dan hitam (Scherer dan Kumar, 2010). *Feumelanin* tidak efisien dalam menghalangi penetrasi radiasi UV dan dapat mengakibatkan kerusakan sel yang diinduksi oleh UV yang didukung oleh radikal bebas dan *oxidative injury* (Mitra *et al.*, 2012). *Feumelanine* memberikan warna cerah seperti kuning hingga coklat kemerahan. MC1R adalah protein yang sangat polimorfik. Disfungsional MC1R akan mengalami penurunan sintesis *eumelanin* dan menunjukkan warna bulu *feumelanotic* pirang sebagai hasilnya. Selain itu juga dikenal tipe pigmen lain diantaranya *oksimelanin*, *trichrome*, melanin campuran (*mixed type melanins*) dan *neuromelanin* (Damayanti, 2004).

Pensinyalan MC1R merupakan penentu utama terhadap jumlah dan jenis pigmen melanin yang disintesis oleh melanosit, yang mengatur pigmentasi basal dan respon induksi dari UV (D'Orazio *et al.*, 2006). Pensinyalan MC1R meningkatkan sintesis eumelanin dan transfer melanosom untuk meningkatkan deposisi melanin dalam keratinosit (Virador *et al.*, 2002).

## 2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam waktu beberapa jam. Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Komponen yang diperlukan pada proses PCR diantaranya yaitu template DNA, sepasang primer (oligonukleotida pendek yang memiliki urutan nukleotida komplementer dengan urutan nukleotida DNA template, dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates), buffer PCR, MgCl<sub>2</sub> (magnesium klorida), dan enzim polimerase DNA (Innis, 1990).

### a. Template DNA

Template DNA berfungsi sebagai cetakan pembentuk DNA baru yang sama. Template DNA dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun yang mengandung fragmen DNA target yang dituju. Persiapan DNA template untuk proses PCR dapat dilakukan dengan metode lisis sel atau dengan melakukan isolasi DNA kromosom

atau DNA plasmid menggunakan metode standar yang ada. Metode isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid memiliki prinsip yaitu dengan pemecahan dinding sel yang diikuti dengan pemisahan DNA kromosom atau DNA plasmid dari komponen lain. Sehingga akan diperoleh kualitas DNA yang lebih baik dan murni (Innis, 1990).

b. Primer

Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung ' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Primer dirancang berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein dapat diperoleh dari *database GenBank* (Innis, 1990).

c. dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates)

dNTPs merupakan campuran dari dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). dNTPs pada proses PCR bertindak sebagai *building block* DNA pada proses eksistensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA template (Innis, 1990).

d. Buffer PCR dan  $MgCl_2$

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi PH tertentu, sehingga dalam proses PCR diperlukan buffer PCC untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga ion  $Mg^{2+}$  yang berasal dari  $MgCl_2$ . Umumnya buffer PCR sudah mengandung senyawa  $MgCl_2$  yang diperlukan (Innis, 1990).

e. Enzim Polimerase DNA

Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA dan diperlukan untuk tahap ekstensi DNA pada proses PCR. Enzim ini bersifat termostabil sampai temperatur  $95^{\circ}C$ . Penggunaan jenis polimerase DNA berkaitan erat dengan buffer PCR yang dipakai (Innis, 1990).

Pada proses PCR terdapat tiga tahapan penting yang berulang dalam 30 sampai 40 siklus, diantaranya:

1. Denaturasi

Denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polymerase ditambahkan. Proses ini bertujuan untuk pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Proses ini berlangsung sekitar 3 menit untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak berlangsung sempurna akan mengakibatkan DNA mengalami renaturasi yang akan menggagalkan proses PCR (Yusuf, 2010).

## 2. *Annealing* (Penempelan Primer)

Oligonukleotida primer menempel pada DNA cetakan yang komplementer dengan sekuen primer. Primer *annealing* berkaitan dengan pengenalan primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, jumlah kandungan GC, dan konsentrasi primer. Suhu optimal dihitung dengan rumus *Temperature Melting* ( $T_m$ ) =  $\{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$ .  $T_m$  dipengaruhi oleh DNA template, komponen buffer, dan konsentrasi primer (Fatchiyah, 2008). Penentuan waktu proses *annealing* tergantung pada panjang primer. Panjang primer 18-22 basa membutuhkan waktu *annealing* 30 detik, sedangkan panjang primer yang lebih dari 22 basa membutuhkan waktu *annealing* 60 detik. Suhu pada proses *annealing* umumnya dihitung berdasarkan  $(T_m - 5)^\circ\text{C}$  sampai dengan  $(T_m + 5)^\circ\text{C}$  (Handoyo dkk, 2001).

## 3. *Extention* (Pemanjangan Primer)

Pemanjangan untai baru DNA dimulai dari posisi primer yang telah menempel pada urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses ini dilakukan pada suhu  $72^\circ\text{C}$  yang 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, apabila kurang dari 500 bp maka hanya memerlukan waktu 30 detik dan pada kisaran 500 tetapi kurang dari 1 kb maka diperlukan waktu 45 detik,

namun apabila lebih dari 1 kb maka diperlukan waktu 2 menit pada tiap siklusnya (Fatchiyah, 2008).

## 2.6 Sekuensing DNA

Proses ini bertujuan menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) dari suatu sampel DNA. Metode sekuensing yang umum digunakan yaitu metode Sanger (*Sanger dideoxy sequencing*). Metode ini menggunakan DNA template dan memerlukan primer spesifik untuk reaksi sekuensing. Prinsip utama metode Sanger adalah penggunaan trifosfat dideoxynucleotide (ddNTPs) sebagai terminator rantai DNA (Ravi dan Jyoti, 2014). Pada metode Sanger, primer digunakan secara terpisah, yaitu hanya menggunakan satu primer dan ditambahkan dengan trifosfat dideoxynucleotide (ddNTPs) yang diberi label fluorescent. Penambahan ddNTPs akan menghentikan proses polimerisasi, dan basa pada ujung molekul DNA merupakan basa yang dibawa oleh molekul ddNTPs. Pewarna pada ddNTPs akan terdeteksi pada sensor mesin sequencer dikarenakan warna fluorescent yang berbeda pada setiap basa, sehingga urutan basa pada DNA dapat ditentukan (Rinanda, 2011). Hasil sekuensing yang susunan nukleotidanya sudah terlihat akan dilakukan proses secara online dan sederhana dengan menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). BLAST merupakan algoritma yang digunakan untuk membandingkan informasi urutan biologis primer seperti urutan

nukleotida DNA materi genetik yang ada pada *Database*. Hasil dari penggunaan BLAST NCBI akan berbentuk grafis, tabel, dan data skor (Fatchiyah, 2015).



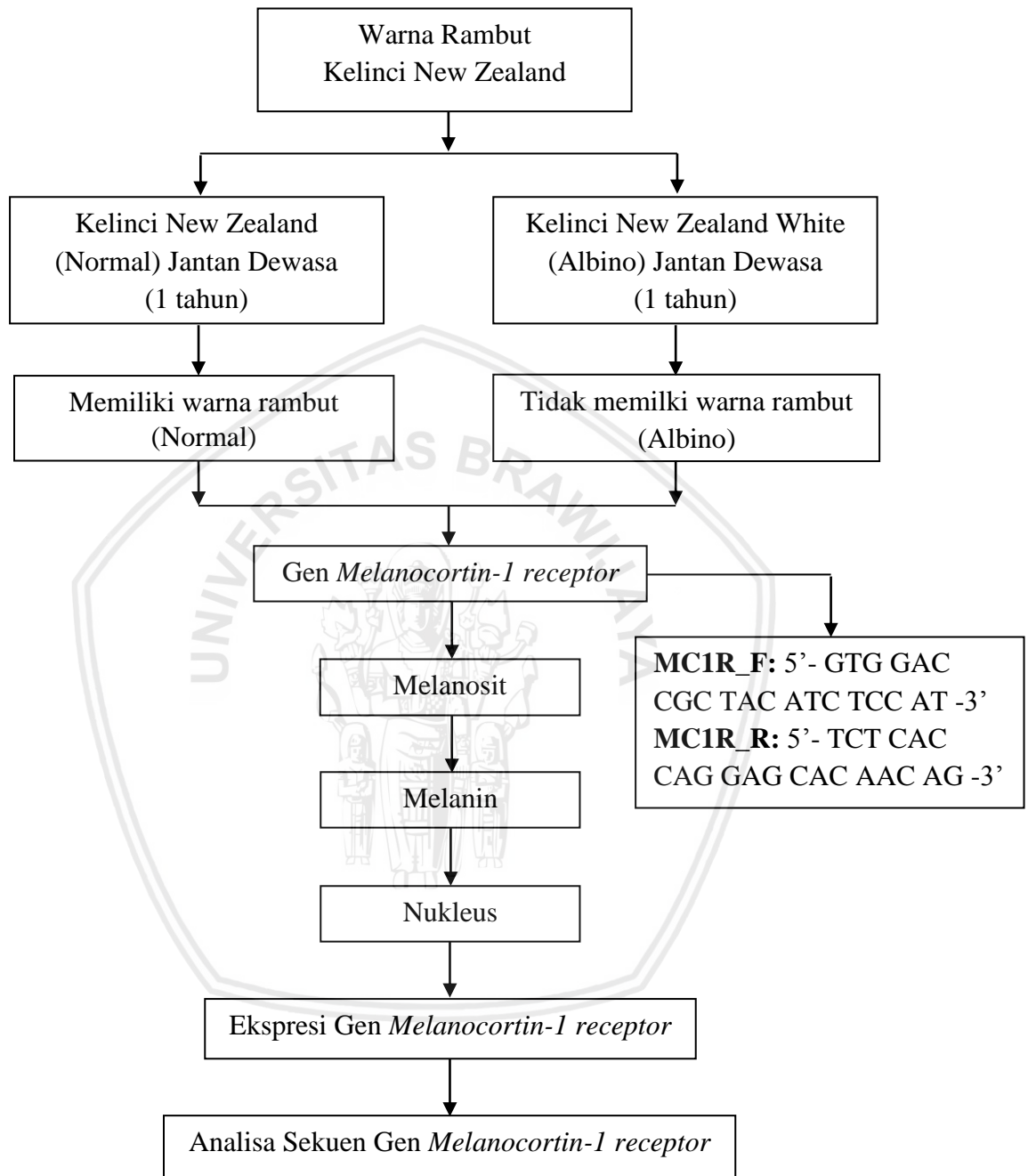
## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual

Pada Kelinci New Zealand Normal jantan (umur 1 tahun) yang memiliki warna rambut merah, abu-abu, dan hitam dengan Kelinci New Zealand Albino jantan (umur 1 tahun) yang memiliki warna rambut putih ditentukan oleh ekspresi gen *Melanocortin-1 receptor* (MC1R). Pada Kelinci New Zealand Albino memiliki kelainan genetik berupa kekurangan melanin atau sama sekali tidak memiliki melanin sehingga memiliki ciri khusus berupa mata berwarna merah yang merupakan ekspresi gen cc yang menyebabkan albino pada permukaan tubuh dan merah pada mata (Covrig *et al.*, 2013).

Sampel darah digunakan untuk melihat ekspresi gen MC1R melalui sekuen gen yang dihasilkan. Analisa gen MC1R dapat dilakukan dengan amplifikasi DNA *in vitro* dengan menggunakan metode PCR membutuhkan sepasang primer *forward* dan *reverse*. Primer untuk mengamplifikasi gen MC1R diperoleh dari *database* NCBI *Genebank* FN6586.1. Hasil sekuen DNA dianalisis menggunakan *software* *Sequense Scanner* versi 1.0, kemudian disejajarkan menggunakan BLAST NCBI, *software* MEGA versi 7.0, dan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada *software* *BioEdit*. Bagan kerangka konseptual dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.





**Gambar 3.1** Bagan Kerangka Konsep

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan sekuen gen MC1R pada warna rambut Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino) jantan dewasa berumur 1 tahun.



## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.0 Hewan Percobaan

Kelinci New Zealand yang digunakan yaitu Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino) yang masing-masing berumur  $\geq 1$  tahun dan berjenis kelamin jantan. Kelinci New Zealand yang diambil berasal dari Peternakan Kelinci Modern Kota Batu, Jawa Timur.

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel darah Kelinci New Zealand berlokasi di Peternakan Kelinci Modern Kota Batu, Jawa Timur. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang untuk pemesanan primer, Laboratorium ADD (*Animal Diagnostic Disease*) untuk pelaksanaan PCR, dan Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maliki Ibrahim Malang untuk uji kuantitas DNA. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2019 – April 2019.

### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa sampel darah yang diambil pada bagian vena aurikular dari 1 ekor Kelinci New Zealand Black berumur  $\geq 1$  tahun, 1 ekor Kelinci New Zealand Red berumur  $\geq 1$  tahun, dan 1 ekor Kelinci New Zealand White (Albino) berumur  $\geq 1$  tahun. Semua kelinci yang diambil sampelnya berjenis kelamin jantan.

### 4.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya *disposable syringe*, *ice box*, kertas label, sarung tangan, masker, tisu, tabung EDTA, *microcentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), miropipet, *white tip*, *yellow tip*, mesin vortex, sentrifugator, mesin penangas, inkubator, *freezer*, timbangan analitik digital, *thermocycler*, mesin *sequencing*, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator* DH-40, ND-1000 *Spectrophotometer*, Mupid-Exu *Electrophoresis*, dan kamera. Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya 1 sampel darah Kelinci New Zealand jantan dan 1 sampel darah Kelinci New Zealand Albino jantan, *Qiaamp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit* (50), ddH<sub>2</sub>O, primer *Forward* (MC1R\_F) 5'- GTG GAC CGC TAC ATC TCC AT -3' dan *Reverse* (MC1R\_R) 5'- TCT CAC CAG GAG CAC AAC AG -3', PCR *mix* (*Promega Gotaq Green Master Mix*), DNA *ladder* 100 bp dan 1 kb, Tris Borat EDTA (TBE 1x), agarose 1% dan 2%, *loading dye*, larutan etidium bromida (EtBr), natrium asetat 3M, ethanol absolut, alkohol 70%, dan aluminium foil.

### 4.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Pemilihan sampel Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino).
2. Pengambilan sampel berupa darah
3. Isolasi DNA
4. Uji kuantitas dan kualitas DNA total

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

#### 4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Tiga sampel darah diuji dengan jumlah 3 cc pada masing-masing individu (1 ekor Kelinci New Zealand Black jantan berumur  $\geq 1$  tahun, 1 ekor Kelinci New Zealand Red jantan berumur  $\geq 1$  tahun, dan 1 ekor Kelinci New Zealand Albino jantan berumur  $\geq 1$  tahun). Pengisolasian DNA kemudian dilakukan melalui sampel darah (*whole blood*) tersebut menggunakan *Qiaamp dna Mini Kit and Tissue Kit*. Kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi dari hasil isolasi DNA dengan menggunakan nanospektrofotometri dan elektroforesis del agarose 1%. Sampel DNA kemudian diamplifikasi dengan PCR melalui sepasang primer *Forward* (MC1R\_F) 5'- GTG GAC CGC TAC ATC TCC AT -3' dan *Reverse* (MC1R\_R) 5'- TCT CAC CAG GAG CAC AAC AG -3'. Produk PCR kemudian diukur menggunakan elektroforesis del agarose 2% untuk mengetahui ukuran fragmen. Kemudian produk PCR disekuensing. Menggunakan aplikasi *nucleotide* BLAST pada NCBI dan *software BioEdit*, perbandingan hasil sekuensing fragmen DNA dapat dilakukan.

## 4.6 Prosedur Kerja

### 4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Kelinci New Zealand

Sampel yang digunakan berupa darah dari Kelinci New Zealand di Peternakan Kelinci Modern Kota Batu, Jawa Timur. Tiga ekor kelinci diambil sampel darah melalui *vena auricularis* dengan *disposable syringe 3 cc*, yaitu satu ekor Kelinci New Zealand Black, satu ekor Kelinci New Zealand Red, dan satu ekor Kelinci New Zealand Albino yang masing-masing berumur  $\geq 1$  tahun. Sampel darah kemudian dimasukkan ke dalam tabung EDTA.

### 4.6.2 Isolasi DNA

Sampel darah dari Kelinci New Zealand kemudian dilakukan isolasi DNA menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit*. Terdapat tiga langkah utama dari isolasi DNA, diantaranya perusakan dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, dan pemurnian DNA (Surzycki, 2000).

### 4.6.3 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin ND-1000 *Spectrophotometer* dengan menggunakan blanko ddH<sub>2</sub>O yang diteteskan langsung pada *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1  $\mu$ L. Kemudian absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutup. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 260 nm dan 280 nm. Panjang gelombang 260 nm merupakan serapan maksimum untuk asam nukleat, sedangkan panjang gelombang 280 nm merupakan

serapan maksimum untuk protein (Harahap, 2017). Sebanyak 1  $\mu$ L sampel diteteskan pada *pedestal submicroliter cell* yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup di atas sampel yang telah ditetes dan ditekan tombol *sample*, selanjutnya ditunggu hingga keluar hasil pada layar monitor (Nanodrop Technologies, 2007).

#### 4.6.4 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas isolasi DNA diukur menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen MC1R. Uji kualitas DNA menggunakan mesin *Mupid-Exu Electrophoresis*. Elektroforesis gel agarosa 1% dilakukan sesuai Sambrook dan 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., (2009) selanjutnya ditambahkan larutan EtBr 1  $\mu$ L dan didinginkan (tidak sampai padat), kemudian disiapkan sisir dan *plate* untuk membentuk sumuran. Campuran agarosa, TBE 1x dan EtBr dituang ke dalam cetakan, pastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel didiamkan selama 20-30 menit pada suhu kamar hingga memadat, kemudian diambil sisir secara perlahan. Gel yang telah terbentuk sumuran dimasukkan ke dalam *chamber Mupid-Exu Electrophoresis*. Kemudian larutan buffer elektroforesis (*running TBE 1x*) dituang ke dalam *chamber* hingga menutupi seluruh bagian gel. *Marker* (DNA *ladder*) dan *loading dye* (1:1) dimasukkan ke dalam salah satu

sumuran. Campuran larutan *loading dye* dan DNA (1:1) kemudian dimasukkan ke dalam sumur selanjutnya. *Chamber* dihungkan dengan *power supply* dan dinyalakan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah *running gel* elektroforesis selesai, arus listrik diputus dan gel diangkat dari *chamber*. Selanjutnya gel dipindah ke *UV-transilluminator gel doc* dan diamati hasilnya. Hasil kemudian didokumentasikan dan diekspos dengan *gel doc imaging* sehingga memudahkan analisis (Fatchiyah dkk, 2009).

#### 4.6.5 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) didesain menggunakan NCBI *GeneBank* FN6586.1. Primer didesain melalui *Primer3Plus* dengan menggunakan data FN6586.1 1.342 bp DNA *linear*. Sepasang sekuen primer yang didapatkan adalah primer *Forward* (MC1R\_F) 5'- GTG GAC CGC TAC ATC TCC AT -3' (*start*: 426; *length*: 20 bp; *Tm*: 56,6°C; *GC*: 55%) dan primer *Reverse* (MC1R\_R) 5'- TCT CAC CAG GAG CAC AAC AG -3' (*start*: 964; *length*: 20; *Tm*: 57 °C; *GC*: 55%) dengan target produk PCR 538 bp.

#### 4.6.6 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sampel DNA dari darah Kelinci New Zealand diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan yaitu primer *forward* (MC1R\_F) dan *reverse* (MC1R). Amplifikasi dimulai dengan mencampurkan 1 µL DNA, 1 µL primer *forward* 10 pmol,



1  $\mu\text{L}$  primer *reverse* 10 pmol, 5  $\mu\text{L}$  PCR *mix*, dan 2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O ke dalam mikrotube 200  $\mu\text{L}$ . tahapan amplifikasi dimulai dengan predenaturasi 94°C selama 4 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian *annealing* pada suhu 51,5°C selama 30 detik. *Exntension* pada suhu 72°C selama 1 menit dan *post extension* pada 72°C selama 7 menit. Proses akan berulang hingga 35 siklus (Fatchiyah dkk, 2009).

#### 4.6.7 Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR

Pada dasarnya pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Pengujian kuantitas untuk memvisualisasikan produk PCR gen MC1R dari darah Kelinci New Zealand, kemudian dilakukan *running* elektroforesis gel agarosa. Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  produk PCR ditambahkan dengan 2  $\mu\text{L}$  *loading dye* dan dicampurkan homogen di dalam PCR tube. Produk PCR tersebut dipipet ke dalam 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).

#### 4.6.8 Purifikasi Produk PCR

Proses purifikasi produk PCR bertujuan memurnikan DNA serta menghilangkan sisa-sisa PCR *mix* meliputi dMTPs, *Taq polimerase*, ion Mg, serta ddH<sub>2</sub>O dan primer yang berada di dalam PCR tube. Metode yang digunakan adalah metode gel ekstraksi.

#### 4.6.9 Sekuensing DNA

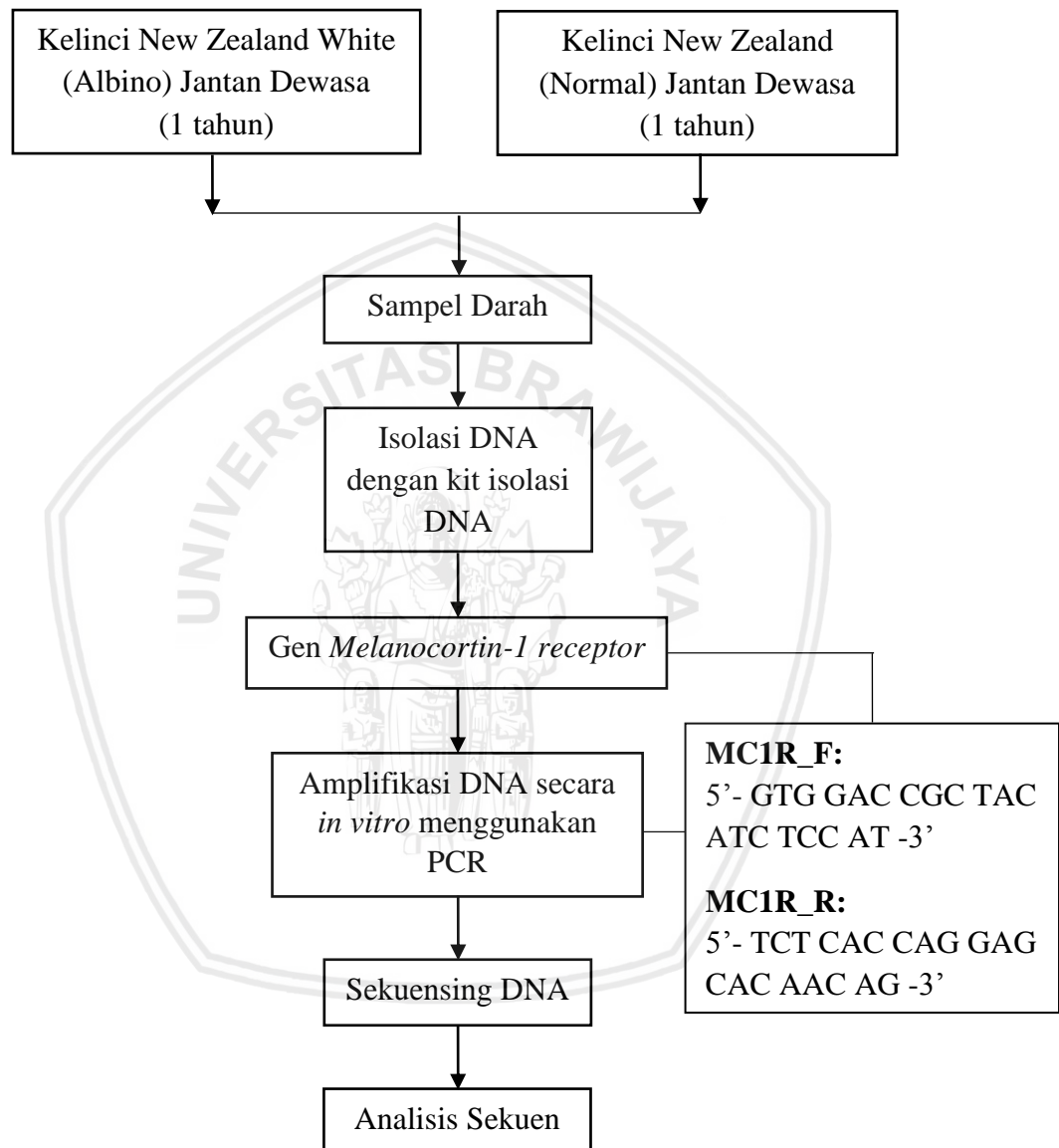
Sekuensing produk PCR dari gen MC1R dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer MC1R\_F dan MC1R\_R untuk melihat sekuen gen MC1R sebesar 538 bp yang teramplifikasi menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50 ng/ $\mu$ L untuk dapat dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin, sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

#### 4.6.10 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan perbedaan DNA gen MC1R antara Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino) menggunakan *software Sequence Scanner* versi 1.0, BLAST NCBI, dan *software BioEdit*. Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyelarasan sekuen DNA dengan membandingkan antara sampel dengan database NCBI *GeneBank* FN658677.1 penyelarasan menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada *software BioEdit*.

#### 4.6.11 Kerangka Operasional

Kerangka operasional dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



**Gambar 3.2** Bagan Kerangka Operasional

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Isolasi DNA Kelinci New Zealand

Sampel *wholeblood* dari Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino) digunakan untuk isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan sesuai protokol dengan menggunakan *Qiaamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit*. Hasil dari isolasi DNA akan dilanjutkan ke uji kuantitas DNA yang diukur menggunakan alat *Implen NanoDrop Spectrophotometer ND-100* dengan panjang gelombang 260 nm. Konsentrasi dan kemurnian DNA total dari Kelinci New Zealand, Black, Red, dan White (Albino) ditunjukkan pada **Tabel 5.1**.

**Tabel 5.1** Konsentrasi dan Kemurnian DNA Sampel Darah Kelinci

Sampel	Kemurnian (Absorbansi 260/280)	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)
IB	0,49	13,04
IR	40,46	31,94
IW	0,54	7,33

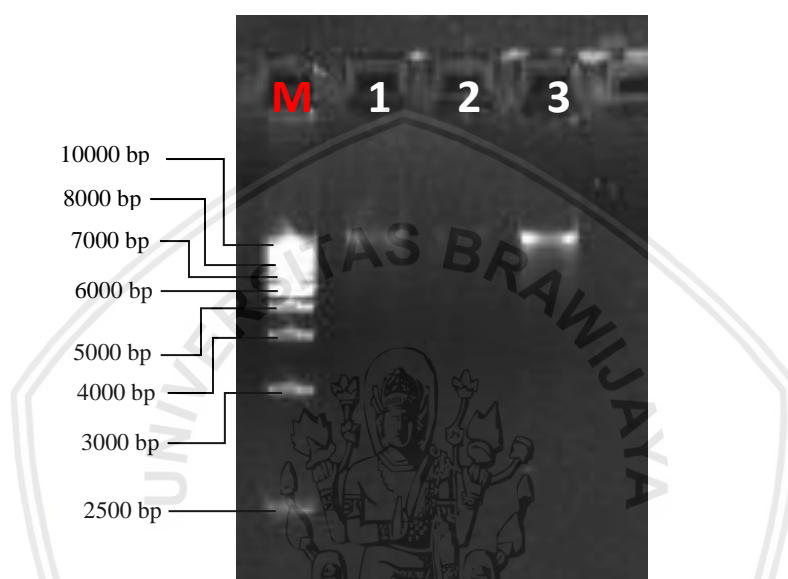
**Keterangan:** IB : Kelinci New Zealand Black  
 IR : Kelinci New Zealand Red  
 IW : Kelinci New Zealand White

Hasil uji kuantitas DNA di atas menunjukkan nilai konsentrasi DNA sampel IB sebesar 13,04 ng/ $\mu$ L, sampel IR sebesar 31,94 ng/ $\mu$ L, dan sampel IW sebesar 7,33 ng/ $\mu$ L dengan nilai kemurnian secara berurutan 0,49 nm, 40,46 nm, dan 0,54 nm. Kualitas DNA yang baik mempunyai rasio absorbansi berkisar 1,8 – 2,0 (Promega, 2017). Sampel IR memiliki nilai

kemurnian yang sangat tinggi yaitu 40,46. Nilai kemurnian yang tinggi menunjukkan masih adanya sisa buffer yang terbawa selama proses isolasi (Kate dan Lakote, 2008). Nilai kemurnian yang tinggi juga mengindikasikan adanya kontaminasi dari phenol atau mengandung RNA murni (Santella, 2006). Pada sampel IB dan IW memiliki nilai kemurnian lebih rendah dari 1,8 nm diduga mengandung 50% kontaminan dan 50% asam nukleat. Kontaminasi dapat disebabkan karena proses ekstraksi yang kurang optimal atau *human error* (Santella, 2006). Menurut Chen dan Janes (2002), amplifikasi DNA dengan PCR dapat dilakukan menggunakan sampel (DNA) yang memiliki konsentrasi rendah. Hasil dari isolasi DNA yang memiliki nilai kemurnian rendah dapat diamplifikasi dengan satu untai utuh DNA target amplifikasi dan kontaminan tidak dapat menghambat aktivitas enzim polimerase.

Hasil dari isolasi DNA total selanjutnya dilakukan uji kualitas (elektroforesis) menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1% dan marker 10.000 bp DNA *Ladder* bertengangan 100 V selama 30 menit. Produk PCR kemudian divisualisasi dengan sinar UV (ultraviolet) (**Gambar 5.1**). Elektroforesis merupakan teknik memigrasikan partikel bermuatan di bawah pengaruh medan listrik dalam kondisi konstan. Pada prosesnya, elektroforesis DNA akan memisahkan sampel DNA berdasarkan ukuran dan struktur fisik molekul. Fragmen DNA hasil elektroforesis dapat dilakukan visualisasi dengan beberapa cara, diantaranya dengan penambahan etidium bromida ke dalam gel saat proses pembuatannya atau dengan perendaman gel ke dalam

larutan etidium bromida sebelum divisualisasikan di bawah sinar UV transluminator. Etidium bromida adalah pewarna mutagenik yang akan berikatan dengan bagian basa DNA dan dapat menyebabkan transmisi sinar UV menjadi dapat dilihat (Ocvania, 2015).



**Gambar 5.1** Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%): M: Marker 1 kb, 1: Kelinci New Zealand Black, 2: Kelinci New Zealand Red, 3: Kelinci New Zealand White

Hasil visualisasi gel elektroforesis menunjukkan pita DNA total dengan ukuran fragmen  $>10.000$  bp. Pada sampel 1 dan 3 terlihat pita DNA yang cukup tebal, sedangkan pada sampel 2 terlihat pita DNA yang tipis. Tingkat ketebalan pita DNA ditentukan dari kemurnian dan proses ekstraksi yang kurang tepat pada sampel, sehingga menyebabkan sampel tersebut memiliki kualitas yang kurang bagus. Menurut Irmawati (2003), pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi DNA total yang tinggi dan DNA total diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang tipis atau terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar

molekul DNA yang terputus pada saat ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul dapat disebabkan oleh gerakan fisik yang berlebihan saat proses pemipetan, disentrifus, dan karena aktivitas bahan kimia tertentu.

## 5.2 Amplifikasi Gen MC1R dengan Metode PCR

Tahap ini dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida Kelinci New Zealand berdasarkan sekuen gen MC1R. Sepasang primer *forward* dan *reverse* diperoleh dari *genebank* NCBI dengan *reference sequence*: FN658677.1 1.342 bp DNA *linear* dan didesain menggunakan *Primer3Plus*. Sepasang primer yang telah diperoleh ditunjukkan pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2** Urutan Oligo Nukleotida Primer Gen MC1R

Primer	Urutan Oligo Nukleotida
<i>Forward</i> (MC1R_F)	5'- GTG GAC CGC TAC ATC TCC AT -3'
<i>Reverse</i> (MC1R_R)	5'- TCT CAC CAG GAG CAC AAC AG -3'

```

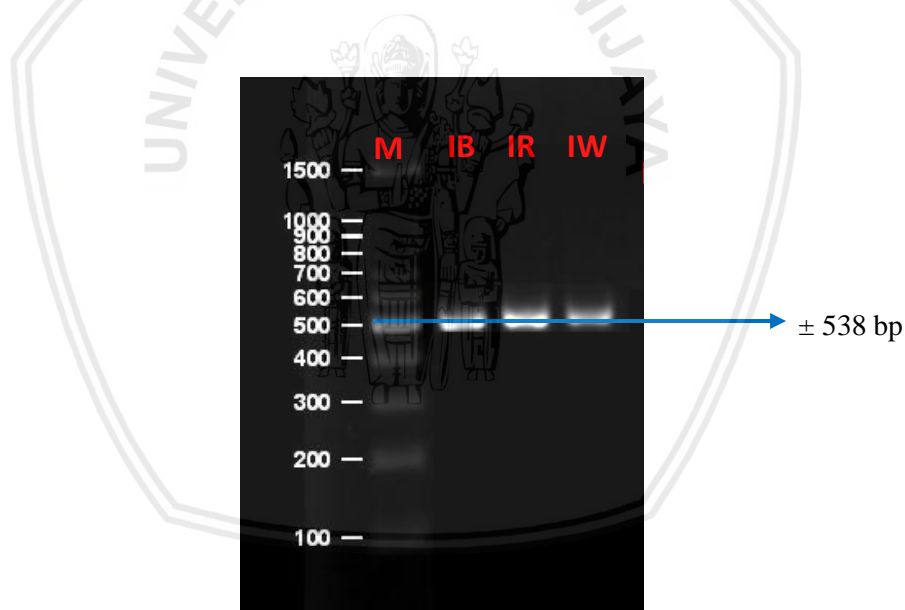
421  tgcctgtgga ccgctacatc tccatcttct acgcaactgag ctaccacagc atcgtgacgc
481  tgcccagggc gcggtgtgtc gtccctggccg tctggggggc cagtgtcacc tccagctccc
541  tcttctgttc ctactacaac catacggccg tctgtctctg cctcatcacc ctcttcttgg
601  ccatgctggc cctcatggca gttttgtaag tccgcatgtt caccggggca tgccagcagc
661  cccagggcat cgcccggctc cacaagggac agcgcccatc ccaccagggc tctggcctca
721  aggtgtctgc caccctcacc atcctcctgg gcattctctt cttctgtctg ggcccctctt
781  tctgtcaact cgcgctcacc gtgctgtgcc ctggcacc cacttgacgc tgcgtcttta
841  agaacttcaa cctcttctc accctcatca tctgcaactc catcgtggac ccgctcatct
901  atgccttccg cagccaggaa ctgctcagga cgctcaagga ggtgctggtg tgcctctggt
961  gagagggggt ggcggccacg ggcctccggg ccagggcgctc ggtgccatgg tgtggcctga

```

**Gambar 5.2** Origin Oligo Nukleotida Gen MC1R

Keterangan: Kuning: Primer *forward* MC1R  
 Biru: Primer *reverse* MC1R  
 Abu-abu: *Region of interest*  
 (*National Center for Biotechnology Information, 2018*)

Produk PCR kemudian dilakukan uji kualitatif dan diperoleh pita DNA dengan ukuran 538 bp sesuai dengan target amplifikasi menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang telah didesain (**Lampiran 3**). Hasil elektroforesis PCR menggunakan gel agarose 1,8 % dapat dilihat pada **Gambar 5.3**. Visualisasi pita dengan ukuran fragmen 538 bp pada **Gambar 5.3** hasil elektroforesis purifikasi produk PCR sesuai dengan gen MC1R yang ditargetkan. Hal tersebut membuktikan gen MC1R berhasil dilakukan amplifikasi secara spesifik dan hasil purifikasi produk PCR siap disekuensing.



**Gambar 5.3** Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 1,8 % M: Marker 1 kb, IB: Kelinci New Zealand Black, IR: Kelinci New Zealand Red, IW: Kelinci New Zealand White, Tiga sampel produk PCR menunjukkan adanya pita marker 538 bp



### 5.3 Sekuen Gen MC1R

Sekuensing DNA dilakukan dengan metode dideoksi Sanger menggunakan *Automatic DNA sequencer* berdasarkan metode *dye terminator labelling*. Hasil sekuensing dibaca menggunakan *software Bioedit 7.0.5.3*. Hasil sekuensing DNA berupa grafik elektroferogram yang memberikan visualisasi basa-basa yang terekam pada hasil sekuensing serta data berupa *fasta* yang merupakan urutan basa hasil sekuensing (**Lampiran 3**). Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen basa nukleotida yang memiliki kesamaan basa nukleotida terhadap *database* NCBI daerah *conserved* yang merupakan daerah sekuen basa nukleotida yang mengalami sedikit mutasi pada segmen DNA yang disejajarkan (Jegga dan Aronow, 2006). Hasil sekuensing sampel dimasukkan ke program BLAST NCBI untuk mengetahui kesejajaran basa nitrogen hasil sekuensing dengan *database* NCBI (**Lampiran 5, 6, dan 7**).

**Tabel 5.3** *Query Coverage* dan *Identity Percentage* Sampel Kelinci

Sampel	<i>Query Coverage</i> (Persentasi panjang nukleotida)	<i>Identity</i> (Identitas)
IB	99 %	97,62 %
IR	99 %	100 %
IW	99 %	100 %

**Keterangan:** IB : Kelinci New Zealand Black  
 IR : Kelinci New Zealand Red  
 IW : Kelinci New Zealand White

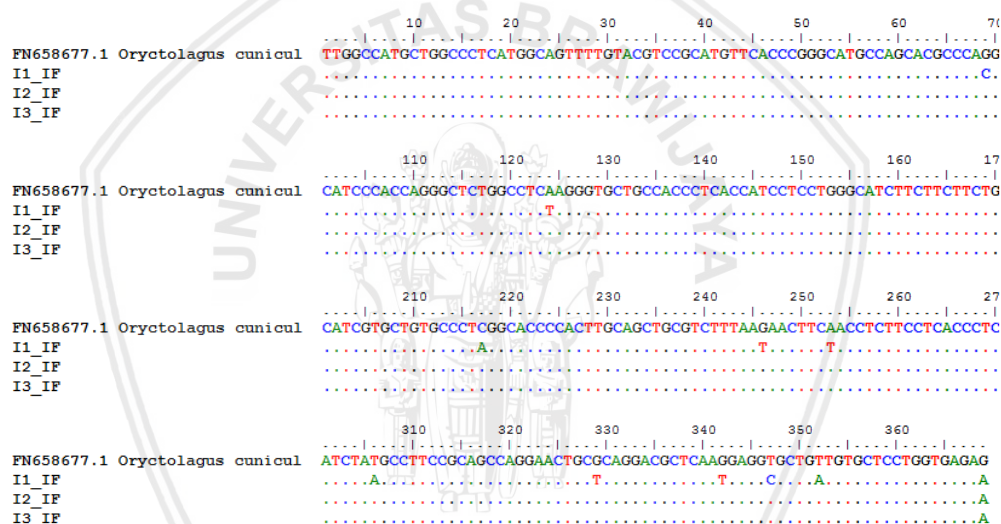
Persentase *query cover* merupakan persen dari panjang nukleotida yang selaras dengan *database* yang terdapat pada NCBI (Nurhikmayani, 2015). Nilai minimal persentase *query cover* yang dapat diterima adalah 95 %. Nilai *query cover* yang lebih rendah dari 95 % disebabkan sekuen yang sangat berbeda dengan sekuen yang terdapat di *database* (Narita *et al.*, 2012). *Identity* merupakan persentase identitas satu segmen DNA yang disejajarkan dengan urutan subjek yang sama (NCBI, 2006).

Hasil penyejajaran menggunakan program BLAST NCBI, sampel IB (**Gambar 5.4**) menunjukkan *query coverage* mencapai 99 %, yang mana dari 462 total basa nukleotida dari hasil sekuensing, terdapat 457 segmen basa yang sejajar dengan sekuen dari referensi, pada titik basa ke 1 – 462 terdapat sekuen referensi di titik basa ke 503 – 923. Sebanyak 451 basa nukleotida dari 462 segmen basa tersebut sama (daerah *conserved*) sehingga untuk persentase *identity* mencapai 97,62 %.

Hasil sekuensing sampel IR dan IW (**Gambar 5.5 dan 5.6**) sama-sama menunjukkan *query coverage* yang mencapai 99 %, dari 462 total basa nukleotida dari hasil sekuensing, terdapat 457 segmen basa yang sejajar dengan sekuen dari referensi, pada titik basa ke 1 – 462 terdapat sekuen referensi di titik basa ke 503 – 964. Sebanyak 462 basa nukleotida dari 462 segmen basa tersebut sama (daerah *conserved*) sehingga untuk persentase *identity* mencapai 100 %. Hasil analisa menunjukkan sekuen DNA sampel IB, IR, dan IW memiliki kemiripan dengan DNA target yaitu kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

#### 5.4 Analisa Sekuen DNA dan Asam Amino Gen MC1R

Sekuen gen MC1R dari tiga sampel Kelinci New Zealand disejajarkan (menggunakan BLAST NCBI) dengan referensi gen MC1R *Oryctolagus cuniculus database* NCBI FN658677.1 untuk mengetahui persentasi kemiripan urutan sekuen antara sampel dengan sekuen target pada NCBI. Urutan sekuen sampel yang disejajarkan dimulai dari basa 426 sampai 964 dengan total target gen yaitu 538 bp.



**Gambar 5.7** Penyejajaran antara Sekuen DNA Sampel IB, IR, dan IW terhadap Referensi Gen MC1R: I1 : Kelinci New Zealand Black, I2 : Kelinci New Zealand Red, I3 : Kelinci New Zealand White

Hasil sekuen sampel I1, I2, dan I3 saat disejajarkan dengan sekuen referensi gen MC1R *Oryctolagus cuniculus database* NCBI FN658677.1 menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada software *Bioedit* (**Gambar 5.7**). Hasil penyejajaran sekuen gen MC1R *Oryctolagus cuniculus* dengan sampel I1 (Kelinci New Zealand Black) menunjukkan adanya

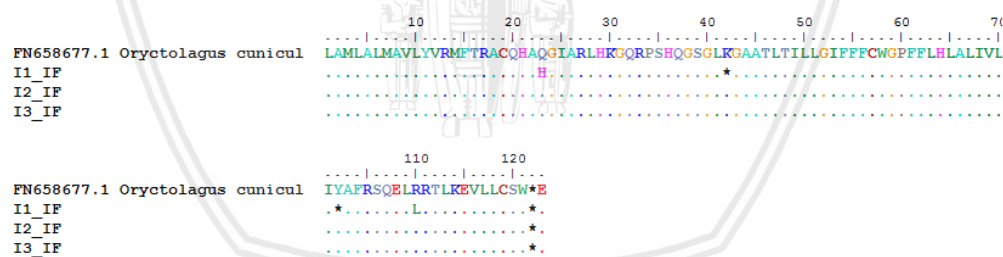
perbedaan pada basa nukleotida ke-347 dan 369 yang mengalami mutasi transisi, serta pada basa nukleotida ke-69, 124, 212, 246, 253, 306, 329, 342, dan 347 yang mengalami mutasi transversasi. Hasil penyejajaran sekuen gen MC1R *Oryctolagus cuniculus* dengan sampel I2 (Kelinci New Zealand Red) dan I3 (Kelinci New Zealand White) menunjukkan perbedaan pada basa nukleotida ke-369 yang mengalami mutasi transisi (**Tabel 5.4**). Mutasi adalah perubahan gen atau kromosom pada suatu individu yang bersifat menurun. Mutasi transisi merupakan suatu pergantian basa purin menjadi basa purin lain atau basa pirimidin menjadi basa pirimidin lain. Mutasi transversasi merupakan suatu pergantian basa purin menjadi basa pirimidin atau sebaliknya (Wariant, 2011). Terdapat juga mutasi insersi yang terjadi akibat adanya penambahan basa nukleotida, dan mutasi delesi yang terjadi akibat adanya pengurangan basa nukleotida (Lemey, 2009).

**Tabel 5.4** Jenis Mutasi pada Sampel

Sampel	Jenis Mutasi	Jumlah	Basa ke-	Total
I1	Transisi	2	347, 369	11
	Transversasi	9	69, 124, 212, 246, 253, 306, 329, 342, 347	
	Insersi-Delesi	-	-	
I2	Transisi	1	369	1
	Transversasi	-	-	
	Insersi-Delesi	-	-	
I3	Transisi	1	369	1
	Transversasi	-	-	
	Insersi-Delesi	-	-	
Total				13

Basa nukleotida sampel I1 pada urutan ke-69 mengalami mutasi transversasi dimana basa CAG berubah menjadi CAC. Perubahan basa tersebut mengubah susunan dari asam aminonya yaitu Q (*Glutamine*/Gln) berubah menjadi H (*Histidine*/His). Pada urutan ke-329 juga mengalami mutasi transversasi dimana basa CGC berubah menjadi CTC yang mengubah susunan asam aminonya dari R (*Arginine*/Arg) menjadi L (*Leusine*/Leu). Perubahan basa nukleotida yang mempengaruhi susunan asam aminonya disebut *missense mutation*.

Hasil penyejajaran asam amino sampel I1, I2, dan I3 dengan referensi gen MC1R *Oryctolagus cuniculus* database NCBI FN658677.1 menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada software *BioEdit* (**Gambar 5.8**).



**Gambar 5.8** Penyejajaran Asam Amino Sampel I1, I2, dan I3 terhadap Referensi Gen MC1R: I1 : Kelinci New Zealand Black, I2 : Kelinci New Zealand Red, I3 : Kelinci New Zealand White

Pada sampel I1 yaitu Kelinci New Zealand Black terjadi perubahan asam amino pada sekuen ke-23 yaitu Q (*Glutamine*/Gln) berubah menjadi H (*Histidine*/His). *Glutamine* merupakan antioksidan dengan efek anti apoptosis yang dapat menghambat terjadinya vitiligo. Vitiligo merupakan gangguan



Sama dengan *melanocortin receptor* lainnya, struktur asam amino MC1R memiliki ekor C-terminal pendek yang panjangnya hanya 14 asam amino dan terdapat penambahan pentapeptide pada ujung C-terminal yang berisi urutan tripeptide invarian T314, C315, dan W317 yang terdapat pada semua *melanocortin receptor* (**Gambar 5.9**). Pentapeptide, khususnya tripeptide invarian diperlukan untuk translokasi reseptor ke membran plasma (SanchezMas *et al.*, 2005).

Asam amino MC1R terdiri dari tiga bagian yaitu *extracellular loops*, *transmembrane*, dan *intracellular loops*. Pada *extracellular loops* terdapat N-terminal yang berfungsi sebagai sinyal peptide untuk menangkap protein ke dalam membran retikulum endoplasma. Pada *intracellular loops* terdapat tempat untuk berikatan dengan G-protein dan menjadi target fosforilasi yang dibutuhkan untuk pemberi sinyal dan fungsi internal. Pada sampel II perubahan asam amino terjadi pada bagian *intracellular loops* yang bagian tersebut merupakan tempat proliferasi, *signalling*, dan proses awal pembentukan pigmentasi. *Intracellular loops* dapat menghambat sintesis feumelanin dan terjadi sintesis eumelanin sehingga menimbulkan warna gelap pada kulit dan rambut (Pratama *et al.*, 2010).

### 5.5 Regulasi Gen MC1R terhadap Warna Rambut Kelinci New Zealand

Gen MC1R terdapat di membran plasma melanosit epidermal dan korteks folikel rambut yang tersekspresikan di dalam melanosit. Melanosit akan mensintesis tirosinase untuk dapat melakukan proses sintesis dan deposit dari melanin. Pada albinisme tirosinase diproduksi sangat sedikit atau sama

sekali tidak ada. Melanosit pada mamalia memproduksi dua jenis melanin yaitu eumelanin yang menghasilkan warna gelap seperti hitam hingga kecoklatan dan feumelanin yang menghasilkan warna terang seperti kuning, oranye, hingga kemerahan. Kedua jenis melanin dibentuk oleh oksidasi tirosin oleh enzim tirosinase. Produksi melanin diatur oleh MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*).

Sekuen gen MC1R dari tiga sampel Kelinci New Zealand disejajarkan dengan referensi gen MC1R *Oryctolagus cuniculus database* NCBI FN658677.1 yaitu Kelinci breed *Checkerd Giant* yang memiliki warna rambut putih, sehingga pada hasil penyejajaran menunjukkan lebih banyak perbedaan basa nukleotida pada sampel I1 yaitu Kelinci New Zealand Black. Mutasi susunan asam amino pada sampel Kelinci New Zealand Black diprediksi memiliki peran untuk menentukan pigmentasi warna rambut menjadi gelap. Asam amino *leusine* merangsang pembentukan pigmen eumelanin pada proses melanogenesis. Eumelanin disintesis oleh L-dopachrome yang bertugas meningkatkan tirosinase. Semakin banyak tirosinase maka akan semakin banyak melanin yang akan diproduksi sehingga warna rambut menjadi gelap. Kelinci New Zealand Black merupakan *wild type* dari Kelinci jenis New Zealand yang memiliki susunan basa dan asam amino gen MC1R berbeda dengan Kelinci New Zealand Red dan White.



## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Gen MC1R pada Kelinci New Zealand Black, Red, dan White (Albino) terdapat perbedaan sekuen gen. Pada Kelinci New Zealand Black terdapat 2 mutasi transisi pada sekuen ke-347 dan 369 serta 9 mutasi transversasi pada sekuen ke-69, 124, 212, 246, 253, 306, 329, 342, dan 347. Mutasi susunan basa tersebut juga merubah susunan asam amino MC1R Kelinci New Zealand Black pada sekuen ke-23, 110, 114, 116, dan 118 sehingga disebut *missense mutation*. Perubahan asam amino terjadi pada bagian *intracellular loops* yang merupakan tempat proliferasi, *signalling*, dan proses awal pigmentasi. Pada Kelinci New Zealand Red dan White (Albino) terdapat 1 mutasi transisi pada sekuen ke-369. Mutasi tersebut tidak merubah susunan asam amino sehingga disebut *silence mutation*.

### 6.2 Saran

Penelitian lebih lanjut mengenai warna rambut pada Kelinci New Zealand dapat dilakukan dengan menggunakan sampel rambut serta menggunakan gen selain MC1R, seperti gen ASIP, TYR, dan gen lain terkait pigmentasi warna rambut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Brahmantiyo, B. 2007. *Budi Daya Kelinci*. Balai Penelitian Ternak. Ciawi, Bogor.
- Busono, E., dan D., Mardiani. 2010. *Mengenal Dan Memelihaa Berbagai Jenis Kelinci Ras Yang Populer Di Indonesia*. Koperasi Nukita. Bandung
- Cheeke, P. R., N. M. Patton, S. D. Lukefahr, dan J. L. Mcnitt. 1987. *Rabbit Production*. 6<sup>th</sup> Ed. The Interstate Printers and Publisher, Inc., Danville, Illinois.
- Chen, B. Y. and H. W. Janes. 2002. *Methods in Biomolecular Biology*. PCR Cloning Protocol 2nd Ed. Rutgers University.
- Covrig, I. Oroian I., Patrutoiu T. C. 2013. *The C locus: rabbit genetics for full color development, chinchilla, seal, sable, pointed black and red-eyed full white*. *Rabbit Gen.* 3(1): 23-32.
- Damayanti, N. 2004. *Fisiologi dan Biokimia Pigmentasi Kulit*. Berkala Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin. Jakarta: EGC.
- Damron, M. 2003. *Klasifikasi Makhluk Hidup Mamalia*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2017. *Buku Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan (Livestock and Animal Health Statistics)*. Jakarta.
- D'Orazio, J., Jarrett S., Omaro-Ortiz A. and Scott T. 2013. *UV Radiation and The Skin*. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(6), 12222-12248.
- EVOED. 2012. *DNA, Central Dogma, and The MC1R Protein*. Molecular Genetics. Michigan State University.
- Fatchiyah. 2008. *Buku Praktis Mengenal Polymerase Chain Reaction Dasar Teknik Amplifikasi DNA & Aplikasinya*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2009. *Dasar-Dasar Analisa Biologi Molekuler*. LSIH Press. Malang.
- Fatchiyah, E. L. Arumningtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler. Prinsip Dasar Analisa*. Jakarta. Penerbit Erlangga.
- Handoyo, D. 2001. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polimerase Chain Reaction (PCR)*. *Unitas*, Vol.9, No.1.



- Innis, M. A . 1990. *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*. California: Academic Press, Inc.
- Irfandi, A. H. 2010. *Performa Induk Kelinci Peranakan New Zealand dengan Pemberian Pakan Pelet dan Silase Ransum Komplit Berbasis Pakan Lokal*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Irmawati. 2003. *Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama pada Stok Hatchery*. Thesis. Bogor: IPB.
- Jegga, A. G. and B. J. Anorow. 2006. *Evolutionarily Conserved Noncoding DNA*. Encyclopedia of Life Sciences.
- Jiang, L., Guo Z., Kong Y., Liang J., Wang Y., Wang K. 2018. *Protective Effects of Glutamine on Human Melanocyte Oxidative Stress Model*. US National Library of Medicine National Institutes of Health.
- Kate, S. and Lakote P. 2008. *A comparative study of different RAPD-PCR protocols for genetic diversity analysis of Doritis germplasm*. 39(3):203–206.
- Lemey, Phillipe., Marco Salemi., and Anne-Mieke Vandemme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press., United Kingdom.
- Mitra, D., Luo X., Morgan A. 2012. *An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/ fair skin background*. Nature 491. 449-453.
- Nanodrop Technologies, Inc. 2007. *260/280 and 260/230 Ratios Nanodrop ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Wilmington (US): Nanodrop Technologies, Inc.
- Narita, V., A. Arum, S. Isnaeni, dan N. Fawzya. 2012. *Analisis Bioinformatika Berbasis WEB untuk Eksplorasi Enzim Kitosanase berdasarkan Kemiripan Sekuens*. Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi. Vol. 1. No. 4.
- Ocvania, Nur. Roslim, Dewi I., dan Herman. 2015. *Teknik Isolasi dan Elektroforesis DNA Total Pada Tanaman Ubi Kayu (Manihot esculenta Crantz) Genotipe Roti dan Menggalo*. Pekanbaru. Repository FMIPA Universitas Riau.
- Peace Corps. 2014. *A Complete Handbook on Backyard and Commercial Rabbit Production*. Feed The Future. USAID from The American People. Washington DC.

- Pratama, G., Sunny W., Jemima N.J. 2010. *Reseptor Melanokortin 1 (MC1R) Asal Usul dan Struktur Protein*. Jurnal Biomedik. Volume 2. No.1.
- Ravi, I. dan Jyoti S. 2014. *Advences in Biotechnology*. Springer. India.
- Rees JL. *The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair*. Pigmen Cell Res [serial online]. 2000 [dikunjungi 2019 Februari 11]; 13: 135-40. Diunduh dari: <http://www.derm.med.ed.ac.uk/PDF/morethanjustredhair.pdf>
- Rinanda, T. 2011. *Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi*. Jurnal Kedokteran Syiah Kuala. 11(3): 172-173.
- PROMEGA. 2017. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/?activeTab=0>. [20 Juli 2019].
- Sambrook, Joseph., and Russell. 2001. *Molecular Cloning 3<sup>rd</sup> ed*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Mas, J., Sanchez-Laorden B.L., Guillo L.A., Jimenez-Cervantes C., Garcia-Borron J.C. 2005. *The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface*. Peptides 26, 1848–1857.
- Santella, R. M. 2006. Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genom Amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 15:185-187.
- Scherer, D. and Kumar R. 2010. *Genetics od Pigmentation*. Division of Molecular Genetic Epidemiology. German Cancer Research Center. Heidelberg, Germany.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Spinger-Verlag. Berlin. Heidelberg.
- Virador, V., Scott M.C., Wakamatsu K., Kadekaro A.L., Kobayashi N., Groden J., Kavanagh R., Takakuwa T., and Hearing V.J. 2002. *Melanocortin 1 receptor Variants, Receptor Function and Melanocyte Response to UV Radiation*. J. Cell Science. Pt 11: 2349-2355.
- Warianto, C. 2011. *Mutasi*. Handout Kuliah. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Yusuf, Z. 2010. *Polymerase Chain Reaction*. Saintek Vol.5 No.6. Gorontalo. Universitas Negeri Gorontalo.