

Identifikasi Gen Pertumbuhan Panjang Rambut Kelinci  
(*Oryctolagus Cuniculus*) Ras American Fuzzy Lop  
Dan Rex Berdasarkan Sequence Gen LHX2  
(LIM Homeobox 2) Dengan Metode  
*Polymerase Chain Reaction*  
(PCR)

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**AGNES ARIMBI AYUWANTI**

**155130101111024**



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

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Identifikasi Gen Pertumbuhan Panjang Rambut Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) Ras American Fuzzy Lop Dan Rex Berdasarkan Sequence Gen LHX2 (LIM Homeobox 2) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

**Oleh:**  
**AGNES ARIMBI AYUWANTI**  
**155130101111024**

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

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS., IPU**  
NIP. 19600512 198701 1 001

**Drh. Dyah Ayu O. A.P., M.Biotech**  
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc**  
NIP. 19631216 198803 1 002

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Agnes Arimbi Ayuwanti

NIM : 155130101111024

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

**Identifikasi Gen Panjang Rambut Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*)  
Ras American Fuzzy Lop Dan Rex Berdasarkan Sequence Gen  
LHX2 (LIM Homeobox 2) Dengan Metode *Polymerase Chain  
Reaction (PCR)***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat 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,  
Yang menyatakan,

**(AGNES ARIMBI AYUWANTI)**  
**NIM. 155130101111024**

**IDENTIFIKASI GEN PERTUMBUHAN PANJANG RAMBUT KELINCI  
(*Oryctolagus cuniculus*) RAS AMERICAN FUZZY LOP DAN REX  
BERDASARKAN SEQUENCE GEN LHX2 (LIM Homeobox 2)  
DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*  
(PCR)**

**ABSTRAK**

Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) ras American Fuzzy Lop dan Rex merupakan kelinci hias yang cukup banyak dipelihara. Kedua kelinci tersebut memiliki perbedaan panjang rambut, dimana kelinci American Fuzzy Lop memiliki rambut panjang sedangkan kelinci Rex memiliki rambut pendek. Perbedaan panjang ini dapat dipengaruhi salah satunya oleh ekspresi gen *LIM Homeobox 2* (Lhx2). *LIM Homeobox 2* (Lhx2) termasuk ke dalam DNA inti yang merupakan gen pengontrol pertumbuhan panjang rambut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan sekuen gen Lhx2 pada Kelinci American Fuzzy Lop dan Rex dengan metode PCR. Sampel yang digunakan adalah DNA yang di isolasi dari sampel darah kelinci American Fuzzy Lop dan Rex menggunakan *QIAamp® DNA Mini Kit*. Primer yang digunakan pada metode PCR adalah sepasang primer *forward* dan *reverse*. Primer *forward* 5'- CTG AAC GGC AGG AGA AAG AC -3' dan primer *reverse* 5'- CAT CCA CGC CGT TGT AGT AAG GA -3'. Hasil dari proses PCR nantinya akan dilakukan sekuensing menggunakan metode Sanger. Sekuen gen dan asam amino tersebut akan dianalisa menggunakan *software* Bioedit dan NCBI BLAST. Terdapat perubahan sekuen gen Lim homeobox 2 (Lhx2) pada kelinci Rex, dan American Fuzzy Lop yaitu Rex1 dan Rex 2 urutan nukleotida ke 18 dan sampel AFL1, AFL2, Rex1, Rex2 pada urutan nukleotida ke 1,2,3 dan 21 menunjukkan adanya gap (garis putus) menunjukkan bahwa terjadi mutasi gen serta terdapat mutasi transisi dan transversi pada urutan 170-180 Analisa sekuen gen Lhx2 terdapat dua perbedaan basa antara keempat sampel dan database. Adanya pergantian basa pada sekuen keempat sampel tersebut merupakan silent mutation karena tidak mengubah struktur asam amino gen Lhx2 sehingga perubahan sekuen DNA Lhx2 yang terjadi pada sampel AFL1, AFL2, Rex1 dan Rex2 tidak merubah ekspresi dari gen Lhx2. Dapat disimpulkan bahwa sekuen gen Lhx2 yang dipilih bukan merupakan sekuen yang dapat mempengaruhi morfogenesis pertumbuhan rambut secara langsung Hal ini bukan disebabkan kurang spesifiknya gen yang digunakan sebagai indikator dalam perbedaan panjang pendeknya rambut, melainkan hal tersebut juga dapat dipengaruhi oleh multiple gen yaitu gen shh yang terekspresi pada fase anagen saja

**Kata Kunci :** Kelinci, Lhx2, *Polymerase Chain Reaction*

repository.ub.ac.id

**IDENTIFICATION RABBIT (*Oryctolagus cuniculus*) GROWTH HAIR GENE  
BREED AMERICAN FUZZY LOP AND REX BASED ON  
LIM HOMEBOX 2 GENE (LHX2) SEQUENCE  
USING POLYMERASE CHAIN REACTION  
(PCR) METHOD**

**ABSTRACT**

Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) American Fuzzy Lop and Rex have different lengths of hair, where American Fuzzy Lop rabbits have long hair while Rex rabbits have short hair. This difference in length can be affected either by the expression LIM gene Homeobox 2 (Lhx2). LIM Homeobox 2 (Lhx2) is included in the DNA nucleus which is the hair length growth control gene. This study aims to determine the differences in Lhx2 gene sequences of American Fuzzy Lop and Rex rabbits by PCR method. The sample used was DNA obtained from isolation of American Fuzzy Lop and Rex rabbit blood samples using QIAamp® DNA Mini Kit. The primers used in the PCR method are a pair of forward and reverse primers. Primary forwarded 5'-CTG AAC GGC AGG AGA AAG AC-3' and the reverse 5'-CAT CCA CGT AGT AGT AAG GA-3' reverse primer. There is a change in the sequence of Lim homeobox 2 (Lhx2) gene in Rex and American Fuzzy Lop rabbits, namely Rex1 and Rex 2 to the 18th nucleotide sequence and samples of AFL1, AFL2, Rex1, Rex2 on the nucleotide sequence 1,2,3 and 21 indicate a gap dashed line shows that there is a gene mutation and there are transitions and transversion mutations in the order of 170-180. Analysis of the Lhx2 gene sequence there are two base differences between the four samples and the database. The change of bases in the four sample sequences is silent mutation because it does not change the structure of the amino acid Lhx2 gene so that changes in the Lhx2 DNA sequence that occur in AFL1, AFL2, Rex1 and Rex2 samples do not change the expression of the Lhx2 gene. It can be concluded that the selected Lhx2 gene sequence is not a sequence that can directly affect the morphogenesis of hair growth. This is not due to the lack of specificity of the gene used as an indicator of differences in hair length, but it can also be influenced by multiple genes, namely the expression gene shh in the anagen phase only

**Key Words :** Rabbit, Lhx2, PCR

## KATA PENGANTAR

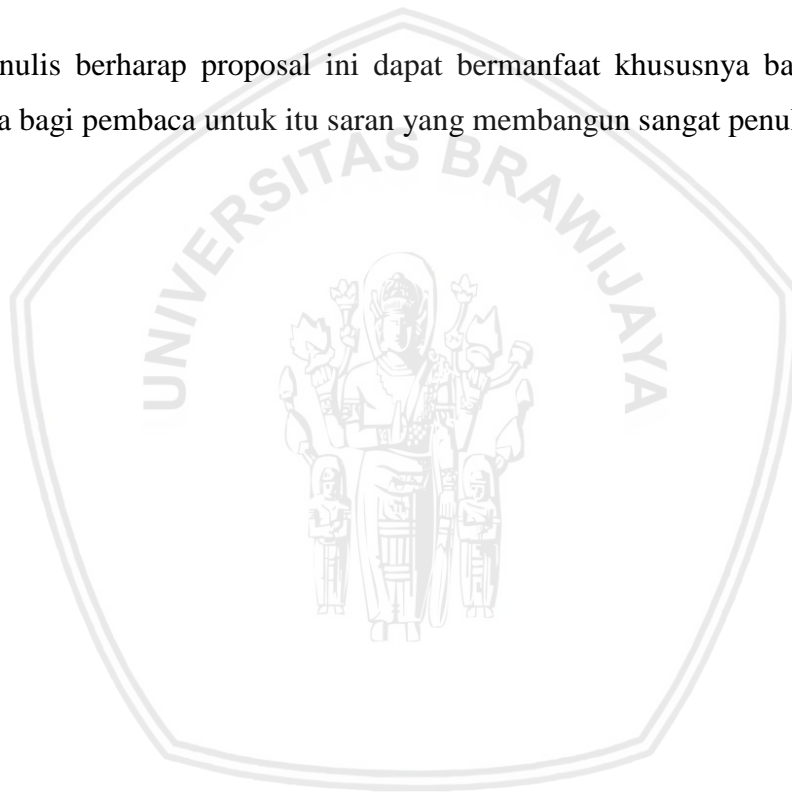
Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Identifikasi Panjang Rambut Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) American Fuzzy Lop Dan Rex Berdasarkan Sequence Gen LHX2 (LIM Homeobox 2) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)”.

Penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam menyelesaikan skripsi, yaitu:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS., IPU selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan.
3. Drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P. M.Bi selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan.
4. Drh. Yudit Oktanella, M.Si dan Drh Aldila Noviatry, M. Biomed selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun.
5. Keluarga tercinta Dr. Jati Batoro, M.si, Dra. Sri Suwanti, SE, sudah menjadi orangtua yang membimbing dengan kasih sayang, doa dan dukungan baik moril maupun materi.
6. Drg. Tectona Eka Ningtyas dan Dian Apriliyani, S.s sebagai kakak tersayang yang sangat menolong dalam memberikan motivasi
7. Adriansyah Tjahjono, S.Kg sebagai pemberi semangat dan motivasi dalam mengerjakan skripsi ini.
8. Teman-teman Sepenelitian, Andi, Isma dan Rossa yang selalu memberikan semangat saat penelitian berlangsung.

9. drh. Muhammad Abdillayah yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan selama menjalankan penelitian.
10. Hana, Hazra, Pipit yang sudah membantu dan sangat setia menolong dalam sebelum bahkan sesudah penelitian.
11. Teman-teman SAVE, KP Tumapel, BRACHIAL CLASS, Ruwet Club, GEA dan seluruh mahasiswa angkatan 2015 “DNA” yang telah ada saat suka dan duka, memberikan persahabatan, semangat, dan inspirasi.

Penulis berharap proposal ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.



Penulis



**DAFTAR ISI**

<b>Halaman</b>	
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Kelinci .....	5
2.1.1 Klasifikasi Kelinci .....	6
2.1.2 Kelinci American Fuzzy Lop .....	6
2.1.3 Kelinci Rex .....	7
2.2 DNA Nukleotida .....	9
2.3 Gen Lhx2 .....	10
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	12
2.4.1 Teknik Dasar Amplifikasi PCR .....	13
2.5 Desain Primer .....	16
2.5.1 Panjang Primer .....	16
2.5.2 Komposisi Primer .....	17
2.5.3 Melting Temperature .....	17
2.5.4 Interaksi Primer-Primer .....	17
2.6 Sekuen DNA .....	18
<b>BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>



3.1 Kerangka Konsep.....	20
3.2 Bagan Kerangka Konsep .....	21
3.3 Hipotesis Penelitian.....	22
<b>BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>23</b>
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	23
4.2. Alat dan Bahan .....	23
4.3 Tahapan Penelitian.....	24
4.4 Rancangan Penelitian.....	24
4.5 Prosedur Kerja.....	25
4.5.1 Pemilihan Individu American fuzzy lop dan Kelinci rex .....	25
4.5.2 Pengambilan Sampel Folikel Rambut .....	25
4.5.3 Isolasi DNA.....	26
4.5.4 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA .....	26
4.5.5 Desain Primer.....	28
4.5.6 Proses PCR .....	28
4.5.7 Uji Kualitas PCR.....	29
4.5.8 Purifikasi Produk PCR.....	29
4.5.9 Sekuensing DNA .....	30
4.5.10 Analisis Data .....	31
<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
5.1 Isolasi DNA Kelinci .....	32
5.2 Amplifikasi Gen Lhx2 dengan Metode PCR .....	33
5.3 Sekuensing Gen Lhx2 .....	34
5.4 Analisa Sekuen DNA Gen Lhx2 .....	35
5.5 Analisis Sekuen DNA dan Asam Amino Gen Lhx2.....	38
5.6 Dugaan Mutasi Gen Lim homeobox 2 (Lhx2).....	40
<b>BAB VI. PENUTUP .....</b>	<b>45</b>
6.1 Kesimpulan .....	45
6.2 Saran .....	45
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>46</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>50</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>		<b>Halaman</b>
2.1	(a) Kelinci American Fuzzy Lop; (b) Kelinci Rex.....	9
2.2	Sembilan Tahapan Morfogenesis Folikel Rambut .....	11
2.3	Siklus PCR (1) Denaturasi pada suhu 90° – 95°C; (2) Annealing pada suhu 37° – 65°C; (3) Elongasi pada suhu 72°C ; (4) Siklus pertama selesai .....	15
3.1	Kerangka Konsep .....	20
4.1	Tahapan Penelitian.....	23
5.1	Hasil Elektroforesis DNA total (Agaros 1%) .....	33
5.2	Hasil Elektroforesis Produk PCR .....	34
5.3	Origin Oligo Nukleotida Gen Lhx2 .....	35
5.4	Aligment Lhx2 Nukleotida Sampel AFL1 Terhadap Urutan Nukleotida ..... dari Database	36
5.5	Aligment Lhx2 Nukleotida Sampel AFL2 Terhadap Urutan Nukleotida..... dari Database	37
5.6	Aligment Lhx2 Nukleotida Sampel Rex1 Terhadap Urutan Nukleotida..... dari Database	37
5.7	Aligment Lhx2 Nukleotida Sampel Rex2 Terhadap Urutan Nukleotida..... dari Database	37
5.8	Penyejajaran Antara Sekuen DNA AFL1, AFL2, Rex1 dan Rex2..... terhadap gen Lhx2	39
5.9	Penyejajaran Sekuen Asam Amino Sampel AFL1, AFL2, Rex1 dan ..... Rex 2 terhadap gen Lhx2	40

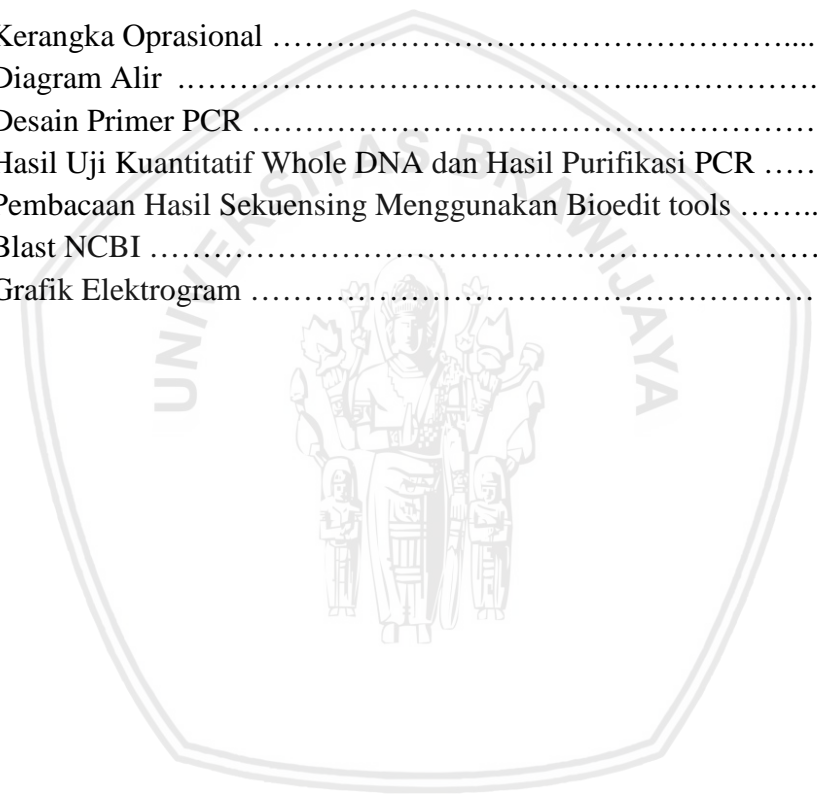
**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
5.1	Konsentrasi dan Kemurnian DNA Kelinci .....31
5.2	Urutan Oligo Nukleotida primer gen Lhx2 ..... 34



**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Kerangka Oprasional .....	46
2. Diagram Alir .....	47
3. Desain Primer PCR .....	48
4. Hasil Uji Kuantitatif Whole DNA dan Hasil Purifikasi PCR .....	52
5. Pembacaan Hasil Sekuensing Menggunakan Bioedit tools .....	52
6. Blast NCBI .....	54
7. Grafik Elektrogram .....	55



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
μL	Mikroliter
AE	<i>Eluted buffer</i>
AL	<i>Lysis buffer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base Pair</i>
CITES	<i>Convention on International Trade in Species of Wild Fauna and Flora</i>
Cm	Sentimeter
ddH <sub>2</sub> O	<i>Doubele distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
EtBr	<i>Etidium bromide</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
g	Gram
kb	<i>Kilobase</i>
Kg	Kilogram
Lhx2	Lim homeobox-2
Mg	Magnesium
mL	Mililiter

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>potential of Hydrogen</i>
Pmol	<i>Picomol</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kelinci adalah hewan mamalia dari famili Leporidae (pemakan tumbuhan hijau), yang dapat ditemukan di banyak bagian bumi. Dulunya, hewan ini adalah hewan liar yang hidup di Afrika hingga ke daratan Eropa. (Priyatna, 2011). Kelinci merupakan binatang kesayangan yang gerak-geriknya sangat menarik dan lucu, terutama di kalangan anak-anak. Namun di sisi lain kelinci adalah jenis hewan yang dari keseluruhannya dapat bermanfaat serta menguntungkan kita semua. Dari daging, kulit dan bulunya (Widodo, 2005)

Kelinci memiliki banyak ras diantaranya adalah Amerikan Fuzzy Lop dan Rex. Ras American Fuzzy Lop adalah kelinci jenis hias dan unggulan, kelinci ini berbulu tebal dan lebat. *American Fuzzy Lop* merupakan persilangan dari *Holland Lop* dengan French Angora, dikembangkan di Amerika dan pertama kali diperkenalkan dalam konvensi ARBA (*American Rabbit Breeders Association*) pada tahun 1985 (Sanjaya, 2013). Ras lainnya yaitu kelinci Rex dengan memiliki keunggulan mempunyai bulu yang halus, tebal, panjangnya seragam, tidak mudah rontok dan tampak sangat menarik (Brahmantiyo, 2011).



Menurut Tomann (2016), pertumbuhan panjang rambut kelinci dipengaruhi oleh gen *Lhx2* pada folikel rambut. Ekspresi gen *Lhx2* kuat dan konsisten dalam bagian folikel rambut tersebut. *Lhx2* dapat ditemukan di tahap 0 dari morfogenesis folikel rambut sebelum adanya tanda-tanda pembentukan placode rambut.

Penelitian sebelumnya mengenai *Lhx2* pada *Rattus norvegicus* yang telah dikawinkan dengan ras lain dianalisis masing-masing usia 15 dan 19 minggu memiliki perbedaan ekspresi gen pada folikel rambut pada masing-masing individu. Secara umum variasi genetik disebabkan oleh perkawinan acak, ukuran populasi yang sangat besar, migrasi, mutasi, rekombinasi, dan seleksi alam (Hartl dan Jones, 1998). Tingginya keanekaragaman genetik juga dapat disebabkan oleh mutasi (Agisimanto dan Supriyanto, 2007). Perbedaan genetik panjang rambut antar ras kelinci dapat diketahui melalui penelitian keragaman genetik yang memiliki prinsip yaitu dapat mengkaji komposisi genetik antar ras (Suwarminiwati, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi mengenai ekspresi gen panjang rambut kelinci ras Rex dan American Fuzzy Lop dan mengetahui faktor pembeda ekspresi gen *Lhx2* pada rambut kelinci. Hasilnya diharapkan dapat menjadi sumber informasi dasar genetik dan penentuan kebijakan pengembangan budidaya populasi kelinci.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah penelitian ini yaitu, Bagaimana perbedaan ekspresi gen *Lhx2* terhadap panjang rambut kelinci antara Kelinci Rex dan American Fuzzy Lop?

### 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Sampel rambut yang digunakan yaitu rambut Kelinci Rex dan American Fuzzy Lop dengan umur 1 tahun dengan jenis kelamin jantan yang berjumlah masing-masing 3 ekor pada setiap ras, diperoleh dari Peternakan *Modern* di Kota Batu
2. DNA diisolasi dari rambut Kelinci Rex dan American Fuzzy Lop menggunakan *Qlagen Qiaamp DNA Mini Kit*.
3. Amplifikasi gen *Lhx2* Kelinci Rex dan American Fuzzy Lop dilakukan dengan metode *Polimerase Chain Reaction (PCR)*.
4. Metode PCR dilakukan dengan menggunakan mesin *SensoQuest Thermocycler* melalui proses: predenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan (annealing) 57°C selama 30 detik, extension 72°C selama 7 menit
5. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode dideoksi sanger berdasarkan *dye terminator labelling*
6. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan penyejajaran hasil sekuen gen *Lhx2* untuk melihat perbedaan ekspresi gen pada kelinci Rex dan American Fuzzy Lop

### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan ekspresi dan susunan nukleotida Gen *Lhx2* pada kelinci ras American Fuzzy Lop dan Rex

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai data sekuen DNA nukleotida gen Lhx2 kelinci dengan perbedaan panjang rambut kelinci ras Rex dan American Fuzzy Lop, serta sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kelinci

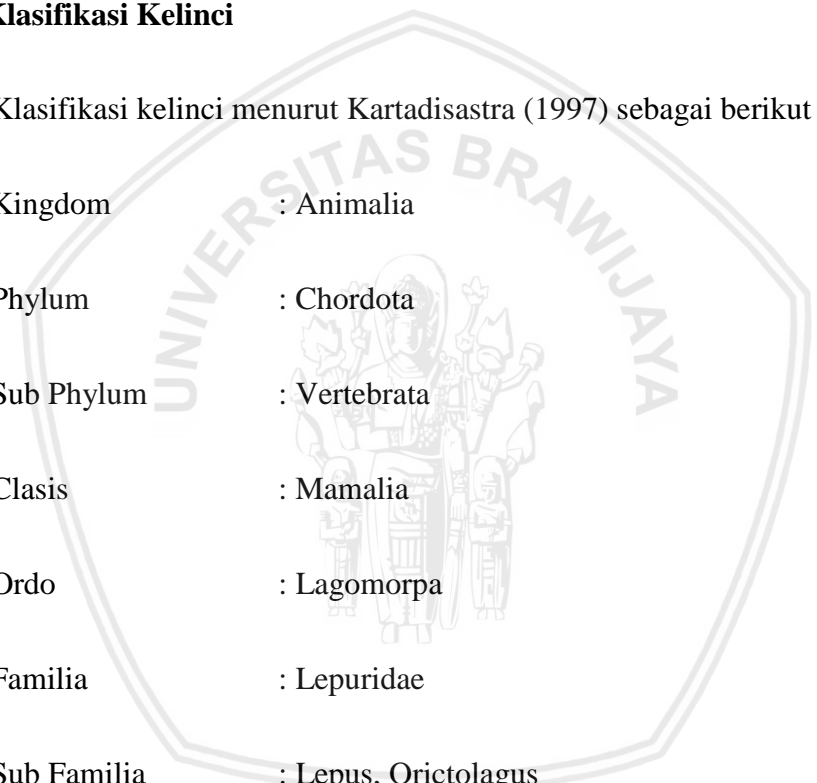
Kelinci adalah hewan pemakan tumbuhan hijau, yang banyak ditemukan di Indonesia. Dulunya, hewan ini adalah hewan liar yang hidup di Afrika hingga ke daratan Eropa. (Priyatna, 2011). Kelinci, secara umum, memiliki potensi biologis dan ekonomi yang tinggi untuk menghasilkan daging dan kulit-rambut bermutu, terutama jenis Rex dan Satin, yang juga untuk tujuan kesayangan/hias. Salah satu potensi yang menonjol dalam hubungannya dengan peternakan rakyat adalah kelinci mampu tumbuh dan berkembang biak dari hijauan, limbah pertanian dan limbah pangan serta dapat dipelihara pada skala rumah tangga/skala kecil. Semakin dikenalnya usaha beternak kelinci, baik melalui percontohan, promosi atau penyampaian informasi, menyebabkan makin meningkatnya minat beternak di kalangan peternak, meskipun jumlahnya terbatas dan tujuan pemeliharaannya beragam. (Cheeke *et al*, 1987).

Kelinci dengan potensi biologis dan bulu genetik yang tinggi, juga menghasilkan berbagai produk eksotik, memiliki potensi ekonomi yang tinggi. Rex dan Satin, selain menghasilkan daging, juga menghasilkan bulu eksotik bernilai ekonomi tinggi. Berbagai jenis kelinci lain seperti Tris Mini Rex, Lops, Angora, Dutch, Dwarf Hotot, Fuzzy, Jersey Wooly, Lion, semakin dikenal sebagai kelinci hias yang memiliki nilai jual tinggi (Wehret *al*, 1982; Petersen, 1992).

Adaptasi di daerah tropis, baik yang ada maupun pakan yang tersedia, ditambah dengan pola perkawinan yang kurang terencana menyebabkan perubahan kinerja yang semakin besar pada ternak-ternak tersebut dan dapat menyebabkan inkonsistensi kinerja dari turunan-turunannya, yang sangat berbeda dengan kinerja galur murni di negara asalnya (Raharjo, 2006)

### 2.1.1 Klasifikasi Kelinci

Klasifikasi kelinci menurut Kartadisastra (1997) sebagai berikut :



Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordota
Sub Phylum	: Vertebrata
Clasis	: Mamalia
Ordo	: Lagomorpa
Familia	: Lepuridae
Sub Familia	: Lepus, Orictolagus
Species	: Orictolagus canicullus

### 2.1.2 Kelinci American Fuzzy Lop

Kelinci ini memiliki ciri khas bentuk tubuhnya yang kompak dan padat, kepala lebar dan mata hitam. Telinganya terjatuh atau menggantung jatuh ke bawah

seperti telinga kambing Ettawa. Telinganya panjang, lebar, tebal menggantung dari samping kepala ke bawah tetapi tidak sampai menggeser di tanah. Telinga kelinci Lop yang terbaik panjangnya bisa mencapai 63-75 cm dengan ujung telinga membulat (Sarwono, 2003).

Salah satu contoh kelinci Ras Lop adalah American Fuzzy Lop. American Fuzzy Lop, merupakan persilangan dari holland lop dengan french angora. Dikembangkan di Amerika dan pertama kali diperkenalkan dalam konvensi ARBA (American Rabbit Breeders Association) pada tahun 1985. Mendapat pengakuan dari ARBA sebagai ras baru pada tahun 1988. Ciri kelinci American Fuzzy Lop adalah muka yang pesek dan lebar, bulu woll yang lebat di tubuhnya, dan telinga pendek yang menggantung (**Gambar 2.1**). Berat standarnya adalah 1,5 kg. Karakter fenotip menurut Balai Penelitian Ternak yaitu Warna bulunya putih dan coklat, Panjang Rambut *Lop* yaitu 8,275 cm pada punggung, 8,575 cm pada pinggul dan 8,475 cm pada perut. (Raharjo, 2006)

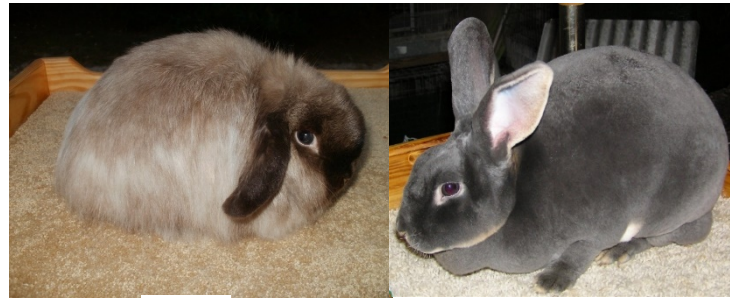
### 2.1.3 Kelinci Rex

Pada abad ini, mutasi pada kelinci Rex meningkat dan berkembang menjadi bangsa kelinci yang terpercaya. Fenomena struktur bulu kelinci Rex merupakan kondisi resesif yang pertama kali diketahui di Perancis pada tahun 1919. Mutasi ini membangkitkan minat dan menjadi pengantar sukses di semua eksibisi kelinci di Eropa. (Lukfahr dan Robinson, 1988).

Kelinci Rex pertama kali dikembangkan di Perancis dan berkembang di negara lain, seperti Amerika pada tahun 1929, dengan tujuan utama sebagai hewan hobi, kontes dan pameran. Lama-kelamaan berkembang menjadi penghasil kulit bulu (*fur*), daging (*Food*) dan keindahan (*Fancy*) yang dikelola secara komersial (Cheeke *et al.*, 1987). Rex merupakan kelinci jenis keindahan (*Fancy*), Rex berarti raja, yang dinamakan demikian karena pendeknya bulu oleh *M. Amedee Gillet fo Coulange*, Perancis. Kehalusan bulu kelinci Rex disebabkan oleh diameter bulu dan struktur kutikula. Rataan diameter bulu kelinci Rex relatif kecil, serta helai kutikula bulu relatif pendek (Prasetyo, 1999). Kelinci Rex mempunyai bulu yang halus, tebal, panjangnya seragam/*uniform* (1,27 – 1,59 cm), tidak mudah rontok dan tampak sangat menarik (**Gambar 2.1**). Bobot kelinci Rex yang dewasa bisa mencapai 2,7 – 3,6 kg (Raharjo *et al.*, 1990).

Produk utama Rex adalah fur yang banyak digunakan untuk bahan pakaian bulu, syal, seat cover, mainan dan lain sebagainya yang harganya cukup mahal. Rambut halus kelinci Rex akan semakin indah dan kualitasnya semakin baik jika hidup di lingkungan yang bersuhu rendah, yaitu berkisar 5-15°C. Namun bukan berarti kelinci Rex tidak dapat hidup di daerah tropis yang bersuhu panas, hanya saja bulunya tidak seindah bila hidup di daerah dingin. Karakter fenotip menurut Balai Penelitian Ternak yaitu warna bulunya bervariasi campuran dua warna (hitam-putih), castor, chincila (putih hitam- coklat) dan putih. Panjang Rambut Rex yaitu 2,160 cm pada punggung, 2,210 cm pada pinggul dan 2,170 cm pada perut. (Raharjo, 2006)





(a)

(b)

**Gambar 2.1** (a) Kelinci American Fuzzy Lop; (b) Kelinci Rex (Hoffman dan Smith, 2005)

## 2.2 DNA Nukleotida

Deoxyribonucleic acid (DNA) merupakan makromolekul berupa benang sangat panjang yang terbentuk dari sejumlah besar deoksiribonukleotida, yang masing-masing tersusun dari satu basa, satu gula dan satu gugus fosfat. Apabila kita ibaratkan suatu tubuh, maka DNA diibaratkan sebagai otak yang dapat mengatur segala proses di dalam tubuh. Di samping itu, DNA juga mempunyai peran penting dalam pewarisan sifat. DNA merupakan suatu senyawa kimia yang penting pada makhluk hidup. Tugas utamanya membawa materi genetik dari suatu generasi ke generasi berikutnya. DNA juga merupakan senyawa polinukleotida yang membawa sifat-sifat keturunan yang khas pada kromosom.

DNA pertama kali ditemukan oleh Miescher (1869) dari sel spermatozoa dan sel eritrosit burung, selanjutnya dinamakan sebagai nuklein. Penemuan lain dilakukan oleh Fischer (1880), yaitu tentang adanya zat pirimidin (Sitosin dan Timin) dan dua purin (Adenin dan Guanin). Setelah penemuan tersebut, dilengkapi pula dengan penemuan Levine (1910) tentang gula 5 karbon ribosa, gula deoksiribosa, dan asam

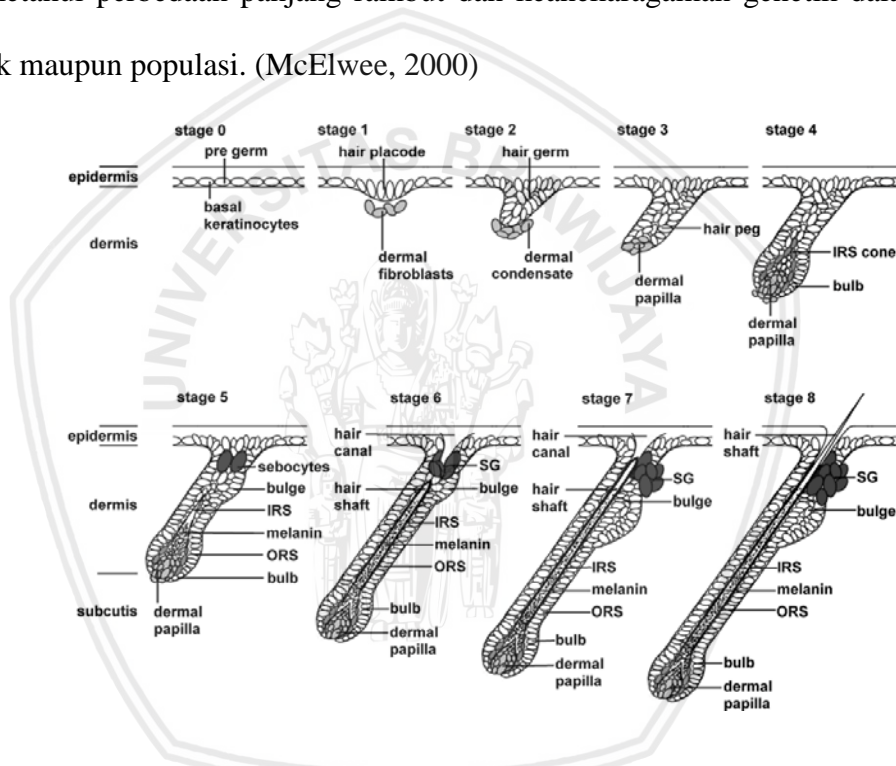
fosfat dalam inti. Keberadaan DNA tersebut sebagian besar di dalam nukleus (inti sel). Tetapi ada juga yang terdapat pada mitokondria.

Pada tahun 1953, Frances Crick dan James Watson menemukan model molekul DNA sebagai suatu struktur heliks beruntai ganda, atau yang lebih dikenal dengan heliks ganda Watson-Crick. DNA merupakan makromolekul polinukleotida yang tersusun atas polimer nukleotida yang berulang-ulang, tersusun rangkap, membentuk DNA heliks ganda dan berpilin ke kanan. Setiap nukleotida terdiri dari tiga gugus molekul, yaitu; (1) gula 5 karbon (2- Metasentris Akrosentris Submetasentris Telosentris $\lambda$  deoksiribosa), (2) basa nitrogen yang terdiri golongan purin yaitu adenin (Adenin = A) dan guanin (guanini = G), serta golongan pirimidin, yaitu sitosin (cytosine = C) dan timin (thymine = T), dan (3) gugus fosfat Basa pada molekul DNA membawa informasi genetik, sedangkan gula dan gugus fosfat mempunyai peranan struktural.

### 2.3 Gen Lhx2

LIM-homeobox gen 2 (Lhx2), merupakan gen yang mempengaruhi pertumbuhan folikel rambut. Lhx2 merupakan faktor transkripsi penyandian LIM/Homeobox dengan protein  $\beta$ -Catenin sebagai promotor pengaktifan gen Lhx2. Gen ini selanjutnya akan mengekspresi kuat dan konsisten dalam folikel rambut. Lhx2 selanjutnya akan menjadi protein yang dinamakan Protein Lim Homeobox 2 yang dapat menjadi pengatur kuat fungsi sel induk (*stem cell*) dan terlibat dalam interaksi mesenchymal-epitel selama pengembangan berbagai organ. Telah

ditemukan gen *Lhx2* di tahap 0 dari morfogenesis folikel rambut sebelum adanya tanda-tanda pembentukan placode rambut (**Gambar 2.2**). Ketika IRS (*inner root sheath*) mulai terbentuk pada tahap 4, ekspresi *Lhx2* dimatikan dalam sel-sel ini dan menjadi terbatas pada ORS (*outer root sheath*), sel matriks dan pola ekspresi ini dipertahankan selama tahap 5 sampai 8 morfogenesis folikel rambut. Pada gen ini dapat diketahui perbedaan panjang rambut dan keanekaragaman genetik dalam ras, kelompok maupun populasi. (McElwee, 2000)



**Gambar 2.2** Sembilan Tahapan Morfogenesis Folikel Rambut (McElwee, 2000).

Ekspresi gen *Lhx2* terdeteksi di telogen folikel rambut. Pada telogen akhir, sebelum adanya tanda-tanda morfologi induksi anagen, ekspresi *Lhx2* muncul kembali dalam *hair germ* kedua. Selama substages pertama anagen (I dan II), mRNA *Lhx2* terdeteksi pada *hair germ* kedua dan sel-sel matriks masa depan yang mengelilingi papilla kulit. Ketika anagen berkembang menjadi substage IIIa, ekspresi

Lhx2 dimatikan dalam pembentukan sel IRS (inner root sheath). Selama substages selanjutnya dari anagen (IV-VI) sel Lhx2 hadir dalam subpopulasi sel matriks di bagian proksimal dan tersebar di ORS, dan menyerupai pola ekspresi selama akhir morfogenesis folikel rambut. (McElwee, 2000)

Fenotip panjang rambut kelinci merupakan hasil morfogenesis pertumbuhan rambut melalui proses fase siklik. Hal tersebut dipengaruhi oleh peran Lhx2 dalam memberi kode atau sinyal dalam pertumbuhan folikel rambut. Pengembangan folikel rambut diprakarsai oleh interaksi pensinyalan timbal balik antara epitel permukaan dan mesenkim yang mendasari yang menghasilkan penebalan epitel lokal, yaitu folikel rambut, placodes. Susunan reguler dari placode diperkirakan dimediasi oleh sistem difusi reaksi dari aktivator dan kompetitor placode morphogens yang bersaing. (Tomann, 2016).

#### **2.4 *Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Polymerase Chain Reacton (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan diketemukannya teknik PCR di samping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnose penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekular.

Komponen- komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah template DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ( $MgCl_2$ ) dan enzim polimerase DNA.

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada template (annealing); (4) pemanjangan primer (extension) dan (5) pemantapan (postextension). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah 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 templat (unamplified DNA) 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 keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (long product) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton and Graham, 1994).

### 2.4.1 Teknik Dasar Amplifikasi PCR

Proses PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi, penempelan dan ekstensi. Proses ini disebut sebagai satu siklus. (Yuwono, 2006). Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan digunakan untuk analisis lebih lanjut. (Weissenteiner et al., 2004). Hasil PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel yang diwarnai dengan bromide dan divisualisasikan dengan sinar ultraviolet. (Nollet dan Todra, 2011)

Tahapan penting menurut Yusuf (2010) dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30- 40 siklus dan berlangsung dengan cepat yaitu:

1. Denaturasi

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5°; 95° dan 97,5°C.



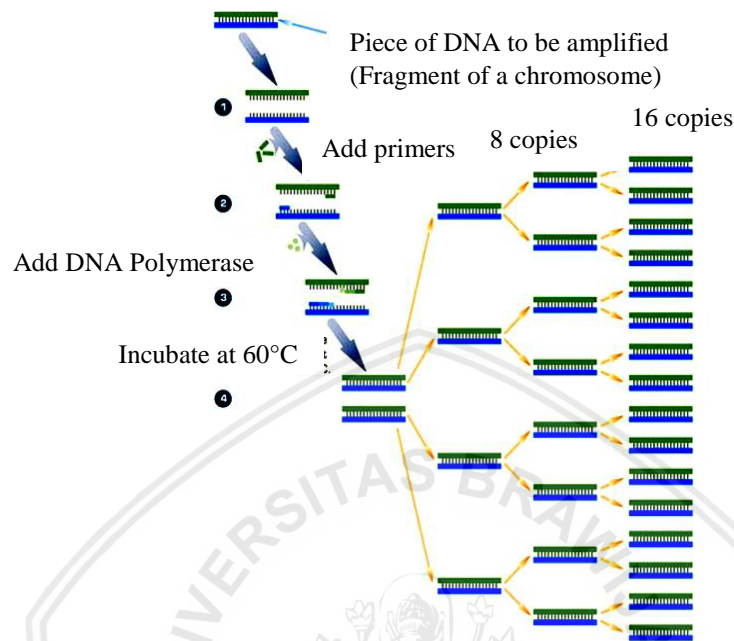
## 2. Annealing (penempelan primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C.

## 3. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini, polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.





**Gambar 2.3** Siklus PCR (1) Denaturasi pada suhu  $90^{\circ} - 95^{\circ}\text{C}$ ; (2) Annealing pada suhu  $37^{\circ} - 65^{\circ}\text{C}$ ; (3) Elongasi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$ ; (4) Siklus pertama selesai (Yusuf, 2010)

## 2.5 Desain Primer

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi(-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka

perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat (Handoyo, 2000).

### 2.5.1 Panjang primer

Di dalam merancang primer perlu diperhatikan panjang primer yang akan dipilih. Umumnya panjang primer berkisar antara 18 – 30 basa. Primer dengan panjang kurang dari 18 basa akan menjadikan spesifisitas primer rendah. Untuk ukuran primer yang pendek kemungkinan terjadinya *mispriming* (penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan) tinggi, ini akan menyebabkan berkurangnya spesifisitas dari primer tersebut yang nantinya akan berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR. Sedangkan untuk panjang primer lebih dari 30 basa tidak akan meningkatkan spesifisitas primer secara bermakna dan ini akan menyebabkan lebih mahal (Handoyo, 2000).

### 2.5.2. Komposisi primer.

Dalam merancang suatu primer perlu diperhatikan komposisinya. Rentetan nukleotida yang sama perlu dihindari, hal ini dapat menurunkan spesifisitas primer yang dapat memungkinkan terjadinya *mispriming* di tempat lain. Kandungan (G+C) (% jumlah G dan C) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan (G+C) DNA target. Sebab primer dengan % (G+C) rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju dengan demikian akan menurunkan efisiensi proses PCR. Selain itu, urutan nukleotida pada

ujung 3' sebaiknya G atau C. Nukleotida A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* dari pada G atau C, dengan demikian akan dapat menurunkan spesifisitas primer. (Handoyo, 2000)

### 2.5.3. Melting temperature (T<sub>m</sub>)

*Melting temperatur* (T<sub>m</sub>) adalah temperatur di mana 50 % untai gandaDNA terpisah. Pemilihan T<sub>m</sub> suatu primer sangat penting karena T<sub>m</sub> primer akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu *annealing* proses PCR. T<sub>m</sub> berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer. Secara teoritis T<sub>m</sub> primer dapat dihitung dengan menggunakan rumus  $[2(A+T) + 4(C+G)]$ . Sebaiknya T<sub>m</sub> primer berkisar antara 50 – 65 °C. (Handoyo, 2000)

### 2.5.4. Interaksi primer-primer

Interaksi primer-primer seperti *self-homology* dan *cross-homology* harus dihindari. Demikian juga dengan terjadinya *mispriming* pada daerah lain yang tidak dikehendaki, ini semua dapat menyebabkan spesifisitas primer menjadi rendah dan di samping itu konsentrasi primer yang digunakan menjadi berkurang selama proses karena terjadinya *mispriming*. Keadaan ini akan berpengaruh pada efisiensi proses PCR. (Handoyo, 2000)

## 2.6 Sekuen DNA

Pembacaan sekuen DNA sebagai produk PCR menjadi alat penting dan utama dalam biologi molekular karena dapat mengetahui komposisi nukleotida dan asam amino suatu gen, juga menganalisis kekerabatan dan jalur evolusinya (Albert *et al.*

1994). Hasil PCR disekuensing di FirstBase. Data sekuens selanjutnya dianalisis menggunakan calculate identity/similarity dalam piranti lunak Bioedit versi 7.0.4.1 (Hall, 1999). Sekuens DNA yang diperoleh kemudian dijajarkan untuk keperluan analisis variasi sekuens dan filogenetik. Penjajaran sekuens dilakukan menggunakan Program ClustalW (Thompson et al., 1994). Penjajaran dilakukan untuk menentukan tingkat homologi urutan basa DNA yang dianalisis.

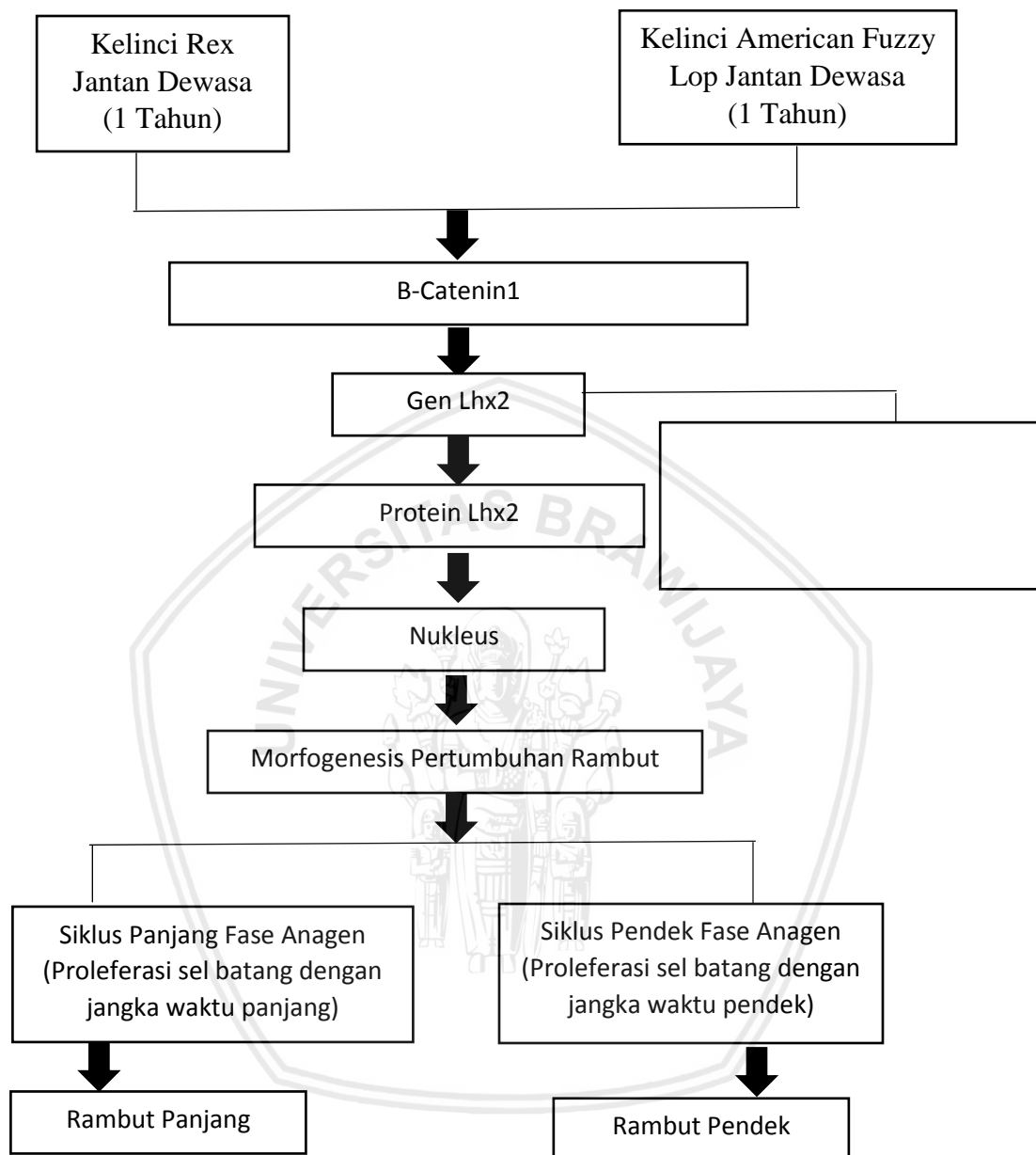


## BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual

Kelinci American Fuzzy Lop dan kelinci Rex memiliki perbedaan ukuran panjang rambut. Hal ini melibatkan ekspresi gen Lhx2 pada folikel rambut. LIM-homeobox 2 (Lhx2), merupakan gen yang mempengaruhi pertumbuhan folikel rambut. Lhx2 merupakan faktor transkripsi penyandian LIM/Homeobox dengan protein  $\beta$ -Catenin sebagai promotor pengaktifan gen Lhx2. Gen ini selanjutnya akan mengekspresi kuat dan konsisten dalam folikel rambut. Lhx2 selanjutnya akan menjadi protein yang dinamakan Protein Lim Homeobox 2 yang dapat menjadi pengatur kuat fungsi sel induk (*stem cell*) dan terlibat dalam interaksi mesenchymal-epitel selama pengembangan berbagai organ. Ekspresi Lhx2 kuat dan konsisten dalam folikel rambut ketika terdapat kulit pada bagian tersebut.

Sampel rambut yang digunakan berasal dari kelinci American Fuzzy Lop dan kelinci Rex untuk mendapatkan isolate DNA. Amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan menggunakan metode PCR membutuhkan sepasang primer *forward* dan *reverse*. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen Lhx2 diperoleh dari *databaseNCBI GeneBank*.. Sekuen produk PCR yang diperoleh kemudian diujarkan untuk keperluan analisis variasi sekuens. Penjajaran sekuens dilakukan menggunakan Program CustalW. Kerangka konsep dapat dilihat pada **gambar 3.1**



**Gambar 3.1.** Bagan Kerangka Konseptual

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Terdapat perbedaan ekspresi gen Lhx2 (LIM Homeobox 2) DNA nukleotida pada kedua kelinci ras American Fuzzy Lop dan kelinci Rex yang mempengaruhi panjang rambut.





## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel rambut kelinci diambil di Peternakan Kelinci di kota Batu Kemudian penelitian dilakukan di laboraorium *Animal Desease and Diagnosis* (ADD) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya pada bulan Maret 2019 di Kota Malang

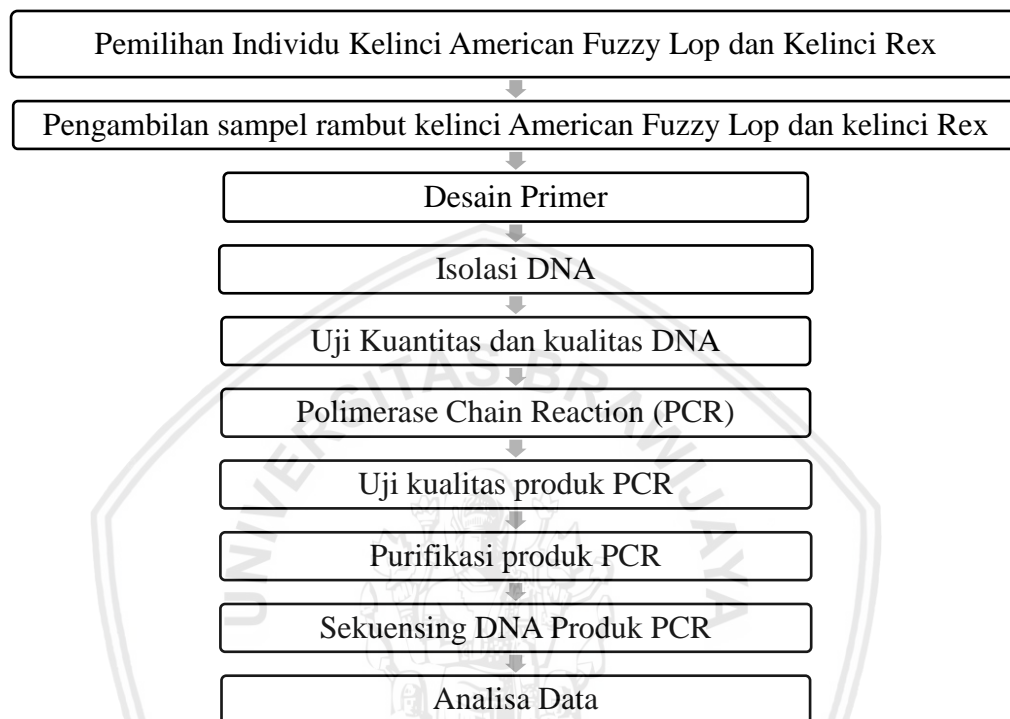
### 4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan yaitu *disposable syringe* 1 cc, *standart forceps*, sarung tangan, masker, gunting, *ice box*, kertas label, *autoclave-bio clave Gnatus 21L*, *micro tube* 1,5 mL, *micro tube rack* 150 $\mu$ L, *mikropipet* (1-100 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 200-1000 $\mu$ L), labu erlemeyer 100mL, timbangan digital, *incubator*, mesin penangas, mesin vortex, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, *pipete tube rack*, sentrifugator, freezer 20°C, *Thermocycler SensoQuest GmbH*, mesin sequenzing, computer, *Bio step UV-Trans illuminator DH-40*, *Implen NanoPhotometer® pearl*, *electrophoresis Mupid-Exu* dan kamera.

Bahan yang digunakan yaitu sampel rambut kelinci American Fuzzy Lop dan kelinci Rex, *Qiagen Qiaamp DNA mini Kit*, ddH<sub>2</sub>O, Primer forward (Lhx2) dan reverse, PCR mix (Promega GoTaq® Green Master Mix), DNA *Ladder* 100 bp dan 1kb, agrosa 1% dan 2%, Promega ble loading dye 6x, etanol 70%, Natrium asetat 3M, Kertas paraffin, Alumunium foil dan larutan etidium bromide (EtBr).

### 4.3 Tahapan Penelitian

Penelitian yang dilakukan memiliki beberapa tahapan yaitu:



**Gambar 4.1**Tahapan Penelitian

### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk melihat perbedaan karakteristik panjang rambut kelinci sesuai dengan sekuen gen Lhx2 antara Kelinci American Fuzzy Lop dan kelinci Rex dalam Database NCBI. Data penelitian yang dianalisa secara kualitatif dengan mendeskripsikan pada hasil dalam penelitian.

## **4.5 Prosedur Kerja**

### **4.5.1 Pemilihan Individu American fuzzy lop dan Kelinci rex**

Sample yang digunakan pada penelitian ini yaitu rambut pada masing-masing ras yaitu American Fuzzy Lop dan kelinci Rex. Sample rambut diambil dari peternakan kelinci Modern di kota Batu.

### **4.5.2 Pengambilan Sampel Folikel Rambut Kelinci Ras American Fuzzy Lop dan Rex**

Folikel rambut diambil dari kelinci ras tersebut karena memiliki perbedaan ukuran rambut yang sangat signifikan. Pengambilan folikel rambut yaitu bagian tengkuk kelinci. Lokasi tersebut memiliki panjang rambut yang memiliki ukuran terpanjang pada kelinci. Pengambilan sample rambut dilakukan dengan metode The Wild Life Forensik Network (2010). Folikel rambut diambil dari 2 jenis kelinci dengan masing-masing ras 3 ekor. Masing- masing ras menggunakan sampel jantan berumur satu tahun. Jumlah rambut yang diambil kurang-lebih 25-30 helai menggunakan standart forceps lalu digunting selanjutnya dimasukkan ke dalam microtube 1,5 mL dan kemudian dilabel. Selanjutnya sample disimpan pada suhu 4°C. seluruh proses dilakukan secara aseptis dan telah disetujui oleh komisi etik penelitian Universitas Brawijaya.

### 4.5.3 Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan Qiagen Qiaamp DNA mini kit. Terdapat tiga langkah utama dalam isolasi DNA yaitu perusakan dinding sel atau sel lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki, 2000). Isolasi DNA dilakukan dengan tahapan pada **Lampiran 2**.

Isolasi DNA dimulai dengan melakukan pemotongan rambut sepanjang 0,5 cm lalu dimasukkan kedalam microsentrifuge tube 1,5mL. Kedua, ditambahkan Qiagen protease (Proteinase K) sebanyak 20 $\mu$ L dan PBS 300 $\mu$ L. Ketiga ditambahkan AL sebanyak 200 $\mu$ L, setelah itu divortex selama 15 detik dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 56°C. Keempat, ditambahkan etanol (96-100%) sebanyak 200 $\mu$ L, kemudian divortex 15 detik. Kelima, sampel dituang ke dalam spin colum yang terpasang pada *collection tube*, lalu divortex selama 15 detik. Keenam disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm, kemudian di pindahkan ke *collection tube* baru dengan suhu 20°C. Ketujuh, 500  $\mu$ L AW1 ditambahkan, kemudian disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit dan dipindahkan ke *collection tube* baru. Kesembilan, 500  $\mu$ L AW2 ditambahkan, kemudian disentrifus selama 6 menit dengan kecepatan 13.500 rpm selama 1 menit dan dipindahkan ke *collection tube* baru lalu dibiarkan pada suhu ruang selama 1 menit. Langkah selanjutnya yaitu disentrifus

selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Maka, didapatkan hasil isolasi DNA untuk selanjutnya dilakukan tahap uji kuantitas dan kualitas DNA.

#### **4.5.4 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA**

##### **4.5.4.1 Uji Kuantitas DNA**

Uji kuantitas DNA dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Pengujian dilakukan dengan buffer akhir dari isolasi DNA sebagai blanko. Buffer ini diteteskan pada pedestal submicroliter cell sebanyak 1 $\mu$ l, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi blanko dengan menekan tombol blank setelah penutup ditutup. Selanjutnya hasil akan muncul pada monitor (Fatchiyah dkk, 2009). Pengukuran kemurnian pada uji kuantitas DNA diperoleh dari perbandingan antara panjang gelombang 260 nm sampai dengan 280 nm sehingga didapatkan interpretasi hasil. Nilai murni isolasi DNA yaitu apabila absorbansi memiliki nilai 260/280 yang lebih besar daripada nilai 2,0 akan menunjukkan adanya kontaminasi protein (Sambrook dan Russel, 2001).

##### **4.5.4.2 Uji Kualitas DNA**

Uji kualitas DNA hasil isolasi menggunakan teknik *nanophotometer*, sedangkan uji kualitas DNA total dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Elektroforesis sel agarosa 1% dilakukan dengan modifikasi oleh sambrook dan russel (2001); Fatchiyah dkk (2011). Pertama dilakukan pembersihan pada cetakan agarosa yang diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x sebanyak 15 mL

dan gel agarosa 0,15 g (1%) hingga agarosa larut, selanjutnya ditabuh EtBr sebanyak 1 $\mu$ L. Kedua, campuran selanjutnya didinginkan lalu disiapkan sisir untuk pembuatan slot pada gel (Fatchiyah dkk, 2011). Posisi yang baik dalam menyisir adalah 0,5-1,0 mm diatas plate sampai sumuran terbentuk saat agarosa ditambahkan dalam plate. Ketiga Campuran Agarosa dan TBE 1x dituang kedalam cetakan dan dipastikan tidak ada gelembung udara diarea sisir yang digunakan. Keempat gel dibiarkan memadat selama 20-30 menit pada suhu ruangan. Kelima sisir diambil secara perlahan dan dipindahkan agarosa yang sudah padat ke dalam chamber. Keenam larutan buffer elektroforesis dituangkan diatas gel sehingga menutupi seluruh bagian gel ( $\pm$ 1 mm). Ketujuh, dimasukkan Marker (DNA ladder) dan loading dye (dengan perbandingan 1:1) kedalam sumuran pertama, kemudian larutan loading dye dan DNA (perbandingan 1:1) dimasukkan pada masing-masing sumur berikutnya (sesuai pelabelan). Kedelapan, chamber dihubungkan dengan power supply dan dinyalakan selama 15 menit dengan tegangan 100 volt, jika lead terpasang dengan benar gelembung akan dihasilkan pada anoda dan katoda karena elektrolisis dan dalam beberapa menit loading dye harus migrasi dari sumur ke gel. Setelah running elektroforesis selesai, arus listrik diputuskan dan diangkat dari chamber. Gel selanjutnya dipindah ke UV-tranas illuminator Gel Doc dan didokumentasikan dengan diekspos sehingga memudahkan analisis dengan menggunakan Gel Doc-imaging.

#### 4.5.5 Desain Primer

Amplifikasi DNA menggunakan primer dalam melakukan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) didesain menggunakan NCBI GeneBank dengan data lokus XM\_008273337327 328 bp DNA linier. Penggunaan *Oryctolagus cuniculus* dilakukan karena sekuens genomic Lhx2 pada Kelinci belum tersedia hingga desain primer dilakukan, sehingga dipilih species dalam satu genom kelinci. Primer yang digunakan yaitu primer forward 5'CCATGCCGTCCATCAGTAGT3' dan primer reverse 5'ACCACGCCGTTGTAGTAAGGA3' dengan target gen 328 bp

#### 4.5.6 Proses PCR

Hasil isolasi DNA folikel rambut kelinci selanjutnya dilakukan amplifikasi secara *in vitro* secara PCR. Primer yang digunakan yaitu primer *forward* yaitu Lhx2\_1F 5'CCATGCCGTCCATCAGTAGT' dan primer reverse Lhx2\_1R 5'CCACGCCGTTGTAGTAAGGA' dengan konsentrasi 10 pmol. Amplifikasi dilakukan dengan mencampurkan 1  $\mu$ L DNA template (hasil isolasi), 1  $\mu$ L primer forward, 1  $\mu$ L primer reverse, 5  $\mu$ L PCR mix dan 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O ke dalam microtube 200  $\mu$ L dan dimasukkan ke thermocycler. Proses amplifikasi dilakukan dimulai pada tahapan predenaturasi dengan suhu 94°C 60 detik, selanjutnya yaitu denaturasi dengan suhu 94°C 30 detik, annealing pada suhu 51,1°C 30 detik dengan gradient suhu sebesar  $\pm 5^\circ\text{C}$ , selanjutnya ekstensi pada suhu 72°C selama 60 detik dan post ekstensi 72°C 7 menit, perlakuan amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus.

#### 4.5.7 Uji Kualitas PCR



Pengujian kualitas produk PCR dilaksanakan dengan prinsip yang sama dengan pengujian hasil isolasi DNA namun, uji terhadap kualitas PCR dilakukan menggunakan gel agarosa 2% serta running electrophoresis selama 30 menit

#### **4.5.8 Purifikasi Produk PCR**

Tujuan purifikasi yaitu mendapatkan DNA dengan hasil kualitas yang tinggi, dengan cara menghilangkan 3 pengotor utama, yaitu primer oligonukleotida yang tidak digunakan pada PCR yang sedang berlangsung, primer-dimers dan residu dNTPs. Purifikasi produk PCR yaitu menggunakan metode presipitasi etanol dengan modifikasi protocol (Suntella, 2006). Protocol purifikasi produk PCR dapat dilihat pada lampiran, yaitu dengan natrium asetat 3M dan etanol absolut. Sebanyak 20  $\mu$ L produk PCR, 2  $\mu$ L natrium asetat 3M dan 40  $\mu$ L etanol absolut dicampurkan kedalam microtube 1,5 mL dan selanjutnya dilakukan inkubasi suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama semalam, lalu campuran tersebut dilakukan sentrifugasi selama 60 menit dengan kecepatan 13500 rpm. Diambil cairan supernatan perlahan (tidak menyentuh bagian dasar mikrotube) sehingga tersisa pelet pada mikrotube. Pelet disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan yang sama. Lalu, dilakukan pencucian sebanyak 2 kali dengan menambahkan 175  $\mu$ L etanol absolut pada pelet. Pada pencucian terakhir, pelet dibiarkan kering lalu ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 20  $\mu$ L sebagai pengencer. Selanjutnya hasil purifikasi PCR dilakukan menggunakan elektroforesis, sedangkan uji kuantitas menggunakan nanofotometer.

#### **4.5.9 Sekuensing DNA**



Hasil purifikasi dan amplifikasi gen Lhx2 menggunakan PCR dilakukan sekuensing, yaitu dengan metode sanger pada pemasukan nukleotida yang termodifikasi. Sekuensing dilakukan 2 arah dengan menggunakan primer *forward* yaitu Lhx2\_1F '5CCATGCCGTCCATCAGTAGT' dan primer reverse Lhx2\_1R '5CCACGCCGTTGTAGTAAGGA' dengan konsentrasi masing-masing 10 pmol untuk melihat sekuen yang teramplifikasi dengan metode dye terminator. Konsentrasi DNA produk PCR yang dilakukan sekuensing yaitu 50 mg/μL. Sekuensing berupa grafik menyatakan kandungan guanin, sitosin, adenin, dan timin yang terdapat pada fragmen DNA yang dilabel pada ddNTPs (Abdullah dkk, 2011)

Hasil sekuensing DNA berupa fasa dan grafik elektroferogram. Penyejajaran dilakukan yaitu dengan menggunakan algoritma clustal W multiple alignment pada bioedit tools (lampiran). Setelah itu, sekuen DNA dibandingkan dengan data sekuen menggunakan BLASTN NCBI.

#### **4.5.10 Analisis Data**

Pembahasan secara kualitatif dilakukan menggunakan data yang diperoleh pada hasil penelitian. Amplifikasi DNA menggunakan PCR dianalisis dengan deskriptif berdasarkan adanya pita spesifik sesuai target amplifikasi yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis. Hasil sekuensi produk PCR kemudian disejajarkan dengan program bioedit tool dan dianalisis secara *true experimental laboratory* berdasarkan perbedaan sekuen gen Lhx2 pada kelinci ras American Fuzzy Lop dan kelinci ras Rex.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Isolasi DNA Kelinci

Isolasi DNA dilakukan menggunakan sampel rambut yang di isolasi menggunakan *QiagenQIAampDNA Mini Kit* sesuai dengan *protocol*. Hasil yang diperoleh merupakan DNA total. Isolat DNA digunakan sebagai DNA template untuk proses amplifikasi gen *Lhx2* pada DNA inti dari kelinci menggunakan metode PCR untuk mengetahui perbedaan ekspresi gen *Lhx2* pada rambut panjang dan pendek. Hasil Isolasi bertujuan mendapatkan isolasi DNA total yang kemudian dilakukan uji kuantitas menggunakan *Implen NanoDrop Spectrophotometer ND-100* dengan panjang gelombang 260nm. Konsentrasi dan kemurnian DNA total ditunjukkan pada **Tabel 5.1 (Lampiran 3)**.

**Tabel 5.1** Konsentrasi dan Kemurnian DNA Kelinci

Sample	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (Absorbansi 260/280)
AFL1	10,27	0,58
AFL2	18	0,66
Rex1	11,48	0,61
Rex2	14,07	0,61

Keterangan: 1. AFL1: American Fuzzy Lop 1

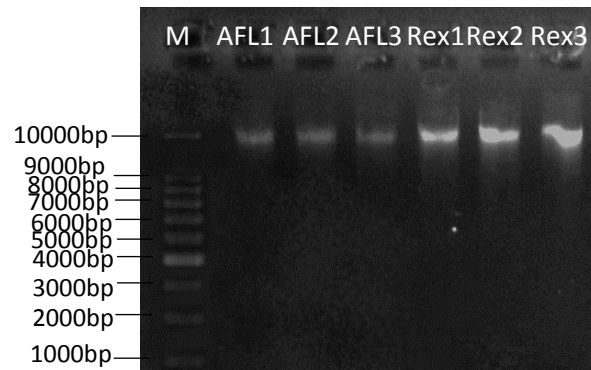
2. AFL2: American Fuzzy Lop 2

3. Rex1: Rex 1

4. Rex2: Rex 2

Hasil diatas menunjukkan bahwa konsentrasi DNA sampel AFL1 sebesar 10,27 ng/ $\mu$ L, sampel AFL2 sebesar 18 ng/ $\mu$ L, sampel Rex1 11,48 ng/ $\mu$ L dan sampel Rex2 sebesar 14,07 ng/ $\mu$ L dengan tingkat kemurnian semua sampel berada di bawah nilai 1,8 ng/ $\mu$ L. Menurut Muladno (2002) nilai kemurnian DNA yang memiliki nilai absorbansi dibawah 1,8-2,0 menunjukkan bahwa terdapat kontaminasi dengan protein. Sedangkan nilai kemurnian lebih besar dari 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi dari RNA (Santella, 2006). Konsentrasi rendah DNA pada hasil isolasi tidak mempengaruhi amplifikasi DNA. Menurut Chen dan Janes (2002) amplifikasi DNA dengan PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sampel DNA dengan konsentrasi yang rendah. Hasil kemurnian yang rendah pada isolasi DNA dapat diamplifikasi dengan adanya satu rantai utuh DNA target amplifikasi, dan kontaminan tidak dapat menghambat aktivitas enzim polimerase.

Hasil isolasi DNA total dilakukan dengan elektroforesis menggunakan konsentrasi agarose 1%. Hasil elektroforesis agarose 1% dapat diperoleh pita >10.000 bp dapat dilihat pada **gambar 5.1**.



**Gambar 5.1** Hasil Elektroforesis DNA total (Agaros 1%)

### 5.2 Amplifikasi Gen Lhx2 dengan Metode PCR

Pada amplifikasi DNA penelitian ini, sepasang primer pada Tabel 5.2 didapatkan berdasarkan desain primer yang didapatkan dari *genbank* NCBI dengan *Reference Sequence*: XM\_008273337.2 seperti pada **Gambar 5.2**.

1	GCTCGGCCTG	GGCCCGTGGC	CGGCTAAGGC	TGCGCCGATG	GGCCTGGGCC
51	CCAAGCCGCC	TGGATATAGG	CCCTTTGGGG	TGGGGGAAGC	GCACTGCCCA
101	CGCTGGCAGC	CCCCTGGGCG	GTCAGGGCTG	CCTGGGGCCA	CCGAGGCAGT
151	GGCGGGTGCC	GGCTTCCC GG	CCATGCCGTC	CATCAGTAGT	GACACGGGCG
201	CTGCGGTCTC	CCGCCTTCCT	CCCTTCGCAG	ACCATGCCGT	CCATCAGTAG
251	TGACCGGGCT	GCGCTGTGCG	CTGGCTGCGG	GGGCAAGATC	TCGGACCGCT
301	ACTACCTGCT	GGCGGTGGAC	AAGCAGTGGC	ACATGCGCTG	CCTCAAGTGC
351	TGTGAGTGCA	AGCTCAACCT	GGAGTCGGAG	CTCACGTGTT	TCAGCAAGGA
401	CGGCAGCATC	TACTGCAAGG	AAGATTACTA	CAGGTAGCCC	CCCTCCCCTG
451	CTCAGAATGC	CCTCGCGGCC	ACAGCCCCCC	CCCCCCCCCG	TTTCCCTACT
501	CAGGCTCCCC	CCGCCCCCTC	CAGACCAGCA	CGGATGCGGT	GACAGCCTTT
551	TAAAGCAGTG	ATTTGGGAAG	CTTTGGGGAA	GGTGTGCAAA	GTGTAGGGAC
601	CAGAGAGCAG	CAGGAGCTGC	CCTCCCCTCT	GAGCTGGGGG	TGGGGGCTTT
651	GCATTCCCTCT	CCCCCGTGAA	GTTTCAGGAG	TCAGCCAGAG	GGGCACAGAA
701	ATAGGCATTC	CCGCAAACCC	AGGCCGGCCA	GTGTTGGTGT	GGAACAAAGT

**Gambar 5.3** Origin Oligo Nukleotida Gen Lim homeobox 2 (Lhx2) yang digunakan untuk desain Primer pada amplifikasi

Keterangan : Warna Hijau : Primer *Forward* Lhx2  
: Warna Biru : Primer *Reverse* Lhx2

Primer	Urutan Oligo Nukleotida
Forward (Lhx2_F)	CCATGCCGTCCATCAGTAGT
Reverse (Lhx2_R)	GTGTGCAAAGTGTAGGGACC

**Tabel 5.2** Urutan Oligo Nukleotida primer gen Lhx2

Hasil amplifikasi DNA menunjukkan pita DNA dengan ukuran 370 bp (Gambar 5.2). Keberhasilan amplifikasi menurut Bartlett and Stirling (2003) ditunjukkan dengan adanya pita tunggal dengan ukuran yang sesuai dengan target desain primer tanpa disertai adanya smear dan pita non spesifik. Optimasi PCR yang dilakukan diperlukan untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang maksimal dan dapat didapatkan produk PCR dengan kuantitas optimal.



**Gambar 5.2** Visualisasi Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarosa 2%)  
Menunjukkan adanya pita tunggal berukuran 370 bp

Keterangan : M : Marker 100bp; AFL1: American Fuzzy Lop Panjang;  
AFL2: American Fuzzy Lop Panjang; Rex1: Rex Pendek;  
Rex2: Rex Pendek

### 5.3 Sekuensing Gen Lim Homeobox 2 Lhx2

Semua produk PCR selanjutnya melalui tahap sekuensing dengan metode *Sangersequencing (dideoxy sequencing)* menggunakan *Automatic DNA Sequencer* (ABI 370A DNA sequencer). Pembacaan sekuens menggunakan *software* BioEdit<sup>®</sup> pada komputer sistem operasi Windows 10. Hasil sequensing DNA berupa grafik elektroferogram dan data berupa urutan basa hasil sekuensing dalam format FASTA (**Lampiran 8**). Hasil tersebut kemudian dilakukan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) guna mengkalkulasi similaritas sekuens dengan *database* di NCBI. Hasil BLAST kemudian menjadi patokan atas keberhasilan atau kesesuaian sequensing (panjang sekuen yang dapat dibandingkan) (Madden, 2003). Hasil BLAST (**Lampiran 7**) sekuens menunjukkan kualitas baik dengan kemurnian (*identity*) dan panjang basa yang dapat dibandingkan (*Query cover*). Hasil tersebut membuktikan bahwa sampel memiliki kemiripan yang identic dengan DNA target yang diinginkan. Menurut NCBI (2006), ada yang disebut *query cover* adaah presentase dari panjang DNA yang disejajarkan dengan urutan subjek yang sama. Perbandingan dapat dilihat di **Tabel 5.3**



**Tabel 5.3** Query Coverage dan Percentage Sampel kelinci

Sampel	Query Coverage Identity	
AFL 1	75%	99,39%
AFL 2	75%	99,39%
Rex 1	75%	98,79%
Rex 2	75%	98,79%

Hasil sekuensing ke-4 sampel menghasilkan 370 bp dan ditemukan beberapa perbedaan sekuen DNA. Hasil sekuensing menunjukkan terjadi mutasi pada ke-4 sampel sekuensing. Berdasarkan alignment sekuen DNA terhadap empat referensi yang sama yaitu gen *Lhx2 Oricolagus cuniculus* database NCBI, urutan target sekuen dapat sejajar dengan total target gen yaitu 370bp. Pembacaan hasil sekuensing menggunakan software BioEdit 7.2.5.

Pembacaan hasil sekuensing yaitu berupa grafik elektroferogram yang merupakan grafik basa nukleotida yang terekam pada hasil sekuensing. Selain itu, hasil juga dapat dilihat pada data berupa fasta (urutan basa hasil sekuensing) (**Gambar 5.8**). Urutan hasil sekuensing menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 22 sampai 169. Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen basa nukleotida memiliki kesamaan pada database NCBI yang disebut daerah *conserved*. Daerah tersebut merupakan suatu daerah sekuen basa nukleotida yang mengalami sedikit mutasi pada segmen DNA yang disejajarkan (Jegga, 2006).



Berdasarkan hasil yang didapat yaitu pada sampel AFL1 (**Gambar 5.4**) yaitu memiliki *query coverage* mencapai 75% dimana total 300 basa nukleotida hasil sekuensing terdapat 225 segmen basa yang sejajar pada titik basa ke 12 - 175 terhadap sekuen referensi titik basa ke 184 - 348. Selanjutnya sebanyak 299 basa nukleotida dari 300 segmen basa tersebut sama sehingga untuk presentasi *identity* mencapai 99,39%.

Hasil pada sampel AFL2 (**Gambar 5.5**) yaitu memiliki *query coverage* mencapai 75% dimana total 300 basa nukleotida hasil sekuensing terdapat 225 segmen basa yang sejajar pada titik basa ke 16 - 179 terhadap sekuen referensi titik basa ke 184 - 348. Selanjutnya sebanyak 29 basa nukleotida dari 300 segmen basa tersebut sama sehingga untuk presentasi *identity* mencapai 99,39%

Kemudian hasil pada sampel Rex1 (**Gambar 5.6**) yaitu memiliki *query coverage* mencapai 75% dimana total 300 basa nukleotida hasil sekuensing terdapat 225 segmen basa yang sejajar pada titik basa ke 16 - 178 terhadap sekuen referensi titik basa ke 184 - 348. Selanjutnya sebanyak 298 basa nukleotida dari 300 segmen basa tersebut sama sehingga untuk presentasi *identity* mencapai 98,79%

Pada hasil yang didapat sampel Rex2 (**Gambar 5.7**) yaitu memiliki *query coverage* mencapai 75% dimana total 300 basa nukleotida hasil sekuensing terdapat 225 segmen basa yang sejajar pada titik basa ke 14 - 176 terhadap sekuen referensi titik basa ke 184 - 348. Selanjutnya sebanyak 298 basa nukleotida dari 300 segmen basa tersebut sama sehingga untuk presentasi *identity* mencapai 99,89%.

PREDICTED: *Oryctolagus cuniculus* LIM homeobox 2 (LHX2), transcript variant X1, mRNA  
Sequence ID: [XM\\_008273337.2](#) Length: 1703 Number of Matches: 1

Range 1: 184 to 348 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
298 bits(161)	1e-76	164/165(99%)	1/165(0%)	Plus/Plus
Query 12	CGCTGGCTGCGGGGGC-AGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTG	70		
Sbjct 184	CGCTGGCTGCGGGGGCAAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTG	243		
Query 71	GCACATGCGCTGCCTCAAGTGCTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTG	130		
Sbjct 244	GCACATGCGCTGCCTCAAGTGCTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTG	303		
Query 131	TTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAGGAAGATTACTACAG	175		
Sbjct 304	TTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAGGAAGATTACTACAG	348		

**Gambar 5.4** Aligment Lhx2 Nukleotida Sampel AFL1 Terhadap Urutan Nukleotida dari Database

PREDICTED: *Oryctolagus cuniculus* LIM homeobox 2 (LHX2), transcript variant X1, mRNA  
Sequence ID: [XM\\_008273337.2](#) Length: 1703 Number of Matches: 1

Range 1: 184 to 348 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
298 bits(161)	1e-76	164/165(99%)	1/165(0%)	Plus/Plus
Query 16	CGCTGGCTGCGGGGGC-AGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTG	74		
Sbjct 184	CGCTGGCTGCGGGGGCAAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTG	243		
Query 75	GCACATGCGCTGCCTCAAGTGCTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTG	134		
Sbjct 244	GCACATGCGCTGCCTCAAGTGCTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTG	303		
Query 135	TTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAGGAAGATTACTACAG	179		
Sbjct 304	TTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAGGAAGATTACTACAG	348		

**Gambar 5.5** Aligment Lhx2 Nukleotida Sampel AFL2 Terhadap Urutan Nukleotida dari Database

PREDICTED: *Oryctolagus cuniculus* LIM homeobox 2 (LHX2), transcript variant X1, mRNA  
Sequence ID: [XM\\_008273337.2](#) Length: 1703 Number of Matches: 1

Range 1: 184 to 348 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
292 bits(158)	4e-75	163/165(99%)	2/165(1%)	Plus/Plus
Query 16	CGCTGGCTGC-GGGGC-AGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTG	73		
Sbjct 184	CGCTGGCTGCGGGGGCAAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTG	243		
Query 74	GCACATGCGCTGCCTCAAGTGCTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTG	133		
Sbjct 244	GCACATGCGCTGCCTCAAGTGCTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTG	303		
Query 134	TTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAGGAAGATTACTACAG	178		
Sbjct 304	TTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAGGAAGATTACTACAG	348		

**Gambar 5.6** Aligment Lhx2 Nukleotida Sampel Rex1 Terhadap Urutan Nukleotida dari Database

PREDICTED: *Oryctolagus cuniculus* LIM homeobox 2 (LHX2), transcript variant X1, mRNA  
 Sequence ID: [XM\\_008273337.2](#) Length: 1703 Number of Matches: 1

Range 1: 184 to 348 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
292 bits(158)	5e-75	163/165(99%)	2/165(1%)	Plus/Plus
Query 14	CGCTGGCTGC-GGGGC-AGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAAGTG			71
Sbjct 184	CGCTGGCTGC GGGGGGCAAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAAGTG			243
Query 72	GCACATGCGCTGCCTCAAGTGCTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTG			131
Sbjct 244	GCACATGCGCTGCCTCAAGTGCTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTG			303
Query 132	TTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAGGAAGATTACTACAG			176
Sbjct 304	TTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAGGAAGATTACTACAG			348

**Gambar 5.7** Aligment Lhx2 Nukleotida Sampel Rex2 Terhadap Urutan Nukleotida dari Database

#### 5.4 Analisis Sekuen DNA dan Asam Amino Gen Lhx2

Hasil sekuensing (**Gambar 5.8**) keempat sampel menghasilkan 370bp dan ditemukan beberapa perbedaan sekuen DNA. Hasil sekuensing pada sampel Rex1 dan Rex 2 urutan nukleotida ke 18 dan sampel AFL1, AFL2, Rex1, Rex2 pada urutan nukleotida ke 1,2,3 dan 21 menunjukan adanya gap (garis putus) menunjukkan bahwa terjadi mutasi gen. Tanda gap tersebut menunjukkan bahwa nukleotida ke 18 dihilangkan atau dihapus. Hal ini terjadi karena adanya delesi yang termasuk dalam jenis mutasi gen yaitu pengurangan satu atau lebih basa nukleotida (Stansfield, 2003).

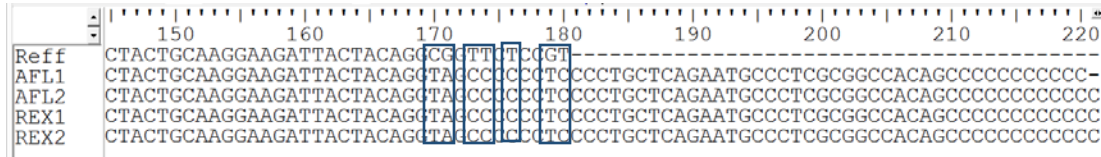
Basa nukleotida sampel AFL1, AFL2, Rex1, Rex2 pada urutan 170 menunjukkan bahwa merupakan basa pirimidin Timin (T), sedangkan pada *database* menunjukkan basa Sitosin (C). Selanjutnya, Basa nukleotida sampel AFL1, AFL2, Rex1, Rex2 pada urutan 171 menunjukkan Adenin (A), sedangkan pada *database* menunjukkan basa Guanin (G). Sampel AFL1, AFL2, Rex1, Rex2 pada urutan 173,

174, 176 dan 180 menunjukkan bahwa merupakan basa sitosin (C), sedangkan pada database menunjukkan basa pirimidin Timin (T). Urutan basa nukleotida sampel AFL1, AFL2, Rex1, Rex2 pada urutan 179 menunjukkan bahwa merupakan basa Timin (T), sedangkan pada *database* menunjukkan basa Guanin (G).

Mutasi transisi dapat terjadi apabila basa pirimidin pada rantai nukleotida DNA diganti oleh basa pirimidin lainnya, atau basa purin yang satu diganti dengan basa purin yang lain. Sitosin (C) dapat diganti oleh basa timin (T) atau sebaliknya. Basa guanine (G) dapat diganti oleh purin adenine (A), atau sebaliknya (Aruji,2014). Transversi merupakan perubahan yang terjadi antara pirimidin yang digantikan oleh purin, atau sebaliknya (Aisah dkk. 2015). Delesi adalah hilangnya basa nitrogen pada daerah tertentu, sedangkan insersi atau adisi merupakan bertambahnya basa nitrogen pada daerah tertentu.

	10	20	30	40	50	60	70
Reff	GTGCGCTGGCTGCGGGG	GCAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTGGCACATGCGCTGCC					
AFL1	CGCTGGCTGCGGGG	GCAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTGGCACATGCGCTGCC					
AFL2	CGCTGGCTGCGGGG	GCAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTGGCACATGCGCTGCC					
REX1	CGCTGGCTGCGGGG	GCAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTGGCACATGCGCTGCC					
REX2	CGCTGGCTGCGGGG	GCAGATCTCGGACCGCTACTACCTGCTGGCGGTGGACAAGCAGTGGCACATGCGCTGCC					

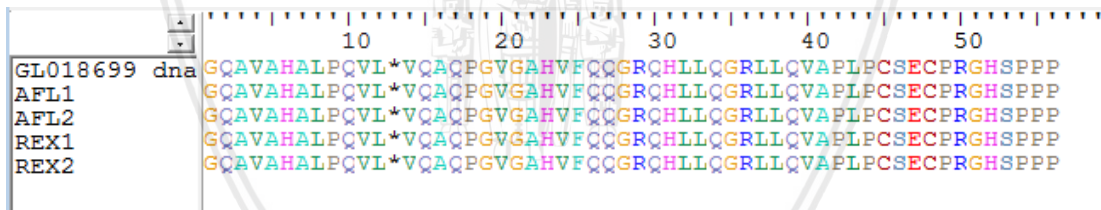
	80	90	100	110	120	130	140	150
Reff	TCAAGTGTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTGTTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAG							
AFL1	TCAAGTGTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTGTTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAG							
AFL2	TCAAGTGTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTGTTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAG							
REX1	TCAAGTGTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTGTTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAG							
REX2	TCAAGTGTGTGAGTGCAAGCTCAACCTGGAGTCGGAGCTCACGTGTTTCAGCAAGGACGGCAGCATCTACTGCAAG							



**Gambar 5.8** Penyejajaran Antara Sekuen DNA AFL1, AFL2, Rex1 dan Rex2 terhadap gen Lhx2

**Tabel 5.4**Penyejajaran Basa Nukleotida

Nama Sample	Lokasi Mutasi	Basa Nitrogen	Mutasi
AFL1	1, 2, 3, 21 170, 171, 173, 174, 176, 180 179	G>- T>- C>- A>- C>T,G>A,T>C,T>C,T>C G>T	Delesi Transisi Tranversi
AFL2	1, 2, 3, 21 170, 171, 173, 174, 176, 180 179	G>- T>- C>- A>- C>T,G>A,T>C,T>C,T>C G>T	Delesi Transisi Tranversi
Rex1	1, 2, 3, 18, 21 170, 171, 173, 174, 176, 180 179	G>- T>- C>- G>- A>- C>T,G>A,T>C,T>C,T>C G>T	Delesi Transisi Tranversi
Rex2	1, 2, 3, 18, 21 170, 171, 173, 174, 176, 180 179	G>- T>- C>- G>- A>- C>T,G>A,T>C,T>C,T>C G>T	Delesi Transisi Tranversi



**Gambar 5.9** Penyejajaran Sekuen Asam Amino Sampel AFL1, AFL2, Rex1 dan Rex 2 terhadap gen Lhx2

Hasil sekuen asam amino pada sekuen gen AFL1, AFL2, Rex1 dan Rex 2 tidak mengalami mutasi pada asam amino nomor 51, 52, 53, 54, 55 dan 56 sehingga hal ini disebut dengan *silent mutation*. Salah satu penyebab terjadinya *silent mutation* ini yaitu adanya pergantian salah satu basa pada suatu kodon, namun tidak menimbulkan perubahan asam amino (Setty, 2007)



### **5.5Regulasi Gen Lim homeobox 2 (Lhx2) terhadap Pertmbuhan Rambut Kelinci**

Protein Lhx2 terekspresi menyandi sel batang rambut kelinci rambut pendek mengalami atrofi hingga ke arrectores pilorum, yang mengindikasikan bahwa folikel rambut kelinci rambut pendek pada fase telogen menghasilkan penghentian pertumbuhan rambut. Struktur folikel rambut berada dalam fase anagen pada kelinci rambut pendek dan kelinci berambut panjang. Hal tersebut dipengaruhi oleh peran Protein Lhx2 dalam memberi kode atau sinyal dalam waktu siklus pertumbuhan folikel rambut. Dibandingkan dengan kelinci berbulu pendek, fase anagen yang jauh lebih lama daripada pada kelinci berbulu panjang (Tornqvist, 2010)

Analisa sekuen gen Lhx2 terdapat dua perbedaan basa antara keempat sampel dan database. Adanya pergantian basa pada sekuen ketiga pada keempat sampel tersebut merupakan silent mutation karena tidak mengubah struktur asam amino gen Lhx2 sehingga perubahan sekuen DNA Lhx2 yang terjadi pada sampel AFL1, AFL2, Rex1 dan Rex2 tidak merubah ekspresi dari gen Lhx2. Dapat disimpulkan bahwa sekuen gen Lhx2 yang dipilih bukan merupakan sekuen yang dapat mempengaruhi morfogenesis pertumbuhan rambut secara langsung Hal ini disebabkan kurang spesifiknya gen yang digunakan sebagai indikator dalam perbedaan panjang pendeknya rambut, melainkan hal tersebut juga dapat dipengaruhi oleh multiple gen yaitu gen shh yang terekspresi pada fase anagen saja (Tornqvist, 2010).

Menurut Rhee *et al* (2006), Ekspresi morphogenesis dan anagen terkait Lhx2 menunjukkan peran Lhx2 dalam pembentukan dan regenerasi rambut. Penelitian sebelumnya Mereka menggunakan imunohistokimia untuk mendeteksi Lhx2 dalam mengembangkan placode rambut pada folikel rambut awal. Pada folikel rambut yang \matang pada tikus dewasa, Rhee *et al.* mengklaim bahwa fungsi Lhx2 adalah untuk mempertahankan karakter pertumbuhan yang konstan dari sel-sel matrik. Kami mendeteksi protein Lhx2 dalam *Outer Root Sheet* dan dalam sel matriks di folikel rambut sesuai dengan ekspresi mRNA. Protein Lhx2 tampaknya bertahan setelah mRNA mengalami *down-regulation* selama diferensiasi sel. Pengamatan ini menunjukkan bahwa protein Lhx2 bertahan lebih lama dari mRNA, yang telah diamati sebelumnya di epitel penciuman (Kolterud, 2004). Pengamatan ini mengenai deteksi protein Lhx2 masih harus dijelaskan

## BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Terdapat perbedaan susunan nukleotida gen *Lhx2* pada kelinci ras American Fuzzy Lop dan Rex dengan genbank, yaitu adanya gap atau delesi serta terdapat mutasi transisi dan transversi. Pada hasil pembacaan asam amino terdapat *silent mutation* karena adanya pergantian salah satu basa pada suatu kodon, namun tidak terjadi mutasi atau perubahan asam amino sehingga tidak merubah ekspresi dari gen tersebut. Gen *Lhx2* dapat meregulasi protein *Lhx2* yang kemudian protein tersebut akan mengatur panjang pendeknya siklus pertumbuhan rambut fase anagen yaitu pada sel-sel batang rambut sehingga pada kelinci berambut pendek fase anagennya akan lebih pendek dibandingkan dengan kelinci yang berambut panjang, sehingga terdapat perbedaan secara fenotip pada panjang rambut antara kelinci ras American Fuzzy Lop dan Rex, namun tidak terjadi perubahan sejarah genotip karena gen *Lhx2* bekerja secara *multiple gene*.

### 6.2 Saran

Pertumbuhan panjang rambut tidak hanya dipengaruhi oleh satu gen saja yaitu *Lhx2* tetapi dapat dipengaruhi oleh multiple gen, oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai faktor genetik lainnya yang mempengaruhi dari pertumbuhan panjang rambut.