

repository.ub.ac.id

**ANALISA PERBEDAAN GEN WARNA RAMBUT SAPI
JALITENG (JAWA BALI BANTENG) JANTAN DAN
BETINA BERDASARKAN SEKUEN GEN
MELANOCORTIN-1 RECEPTOR (MC1R)
DENGAN METODE *POLYMERASE
CHAINREACTION (PCR)***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
PARASMITA ANGGRIAN SISKI
125130101111023



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

repository.ub.ac.id

**ANALISA PERBEDAAN GEN WARNA RAMBUT SAPI
JALITENG (JAWA BALI BANTENG) JANTAN DAN
BETINA BERDASARKAN SEKUEN GEN
MELANOCORTIN-1 RECEPTOR (MC1R)
DENGAN METODE *POLYMERASE
CHAINREACTION (PCR)***

Oleh:
PARASMITA ANGGRIAN SISKI
125130101111023

Pembimbing I

Pembimbing II

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

drh.DyahAyu Oktaviani.A.P.,M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Univesitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M. App.
ScNIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Parasmita Anggrian Siska

NIM : 125130101111023

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

ANALISA PERBEDAAN GEN WARNA RAMBUT SAPI JALITENG (JAWA BALI BANTENG) JANTAN DAN BETINA BERDASARKAN SEKUEN GEN *MELANOCORTIN-1 RECEPTOR* (MC1R) DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (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 termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akansaya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,
Yang Menyatakan,

Parasmita Angrian Siska

NIM. 125130101111023

**Analisa Perbedaan Gen Warna Rambut Sapi Jaliteng (Jawa Bali Banteng)
Jantan dan Betina Berdasarkan Sekuen Gen *Melanocortin-1 Receptor*
(MC1R) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

ABSTRAK

Sapi Jaliteng (SJ/Jawa Bali Banteng) merupakan hasil persilangan antara Sapi Bali dan Banteng Jawa. Sapi Jaliteng memiliki keunikan pada warna rambut jantan dan betina memiliki warna rambut coklat yang mengalami perubahan jantan dewasa menjadi hitam dan betina dewasa tetap berwarna coklat. *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) merupakan gen penentu warna rambut dan kulit pada mamalia. Gen MC1R meregulasi melanosit untuk membentuk pigmen melanin yang kemudian pigmen tersebut menghasilkan eumelanin dan feomelanin. Individu yang memiliki eumelanin memiliki rambut berwarna hitam dibandingkan dengan individu yang memiliki feomelanin lebih memiliki rambut oranye hingga kemerahan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan perbedaan warna rambut Sapi Jaliteng (SJ) Jantan dan Sapi Jaliteng (SJ) Betina. Sampel yang digunakan adalah Sapi Jaliteng (SJ1), Sapi Bali (SB), Banteng (B) Sapi Jaliteng (SJ2), Sapi Jaliteng (SJ3), Sapi Jaliteng (SJ4), Sapi Jaliteng (SJ5) dan Sapi Jaliteng (SJ6) mengisolasi DNA melalui sampel darah lalu dilakukan uji kuantitas dan kualitas DNA, kemudian diamplifikasi menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan primer Forward MC1R_F'5ACAATGTCATCGACGTGCTC3' dan primer Reverse MC1R_R'5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3'. Analisis sekuen SJ dan SB dilakukan dengan metode sekuensing terhadap produk PCR serta analisis dilakukan dengan menggunakan *software BioEdit* dan NCBI BLAST. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen MC1R dengan sampel SJ3 mengalami mutasi gen dengan terjadi delesi pada sekuen ke-937 (C.937delT) yang menyebabkan delesi phenylalanine (F) yaitu p.179delF pada *transmembrane region MC1R*. Kesimpulan terdapat perbedaan sekuen nukleotida dan asam amino di gen MC1R antara Sapi Jaliteng (SJ3) yang memiliki *eumelanin* dominan dari sampel Sapi Jaliteng Betina (SJ2) dan sampel Sapi Bali (SB) berambut terang yang memiliki *feomelanin* dominan.

Kata Kunci: Eumelanin, Feomelanin, MC1R, PCR, Sapi Jaliteng .

Analysis of Gene Differences of the Male and Female Jaliteng (Jawa Bali Banteng) Hair Color Based on Melanocortin-1 Receptor (MC1R) Genes Sequences by Polymerase Chain Reaction Method (PCR)

ABSTRACT

Jaliteng cattle is the result of the crossing between the Bali's cattle and the Java's bull. Jaliteng cattle has a uniqueness in their hair color. Jaliteng bull and cow has brown hair color which had change, the bull's hair color become black when they reach their adulthood and the cow still has brown hair color. Melancortin-1 Receptor (MCIR) is the determining gene of mammals skin and hair color. Melancortin-1 Receptor (MCIR) regulated melanocytes to form melanin pigment which will produce eumelanin and feomelanin. The individual which has eumelanin has black hair color compares to the individual which has feomelanin, they have orange up-to red hair color. the aim of this research is to determine the hair color difference of Jaliteng bull and Jaliteng cow. the sample that is used in this research was Jaliteng cattle (SJ1), Bali cattle (SB), bull (B) Jaliteng cattle (SJ2), Jaliteng cattle (SJ3), Jaliteng cattle (SJ4), Jaliteng cattle (SJ5) and Jaliteng cattle (SJ6) isolated the DNA through the blood sample and did quantity and quality DNA, thus amplified it used PCR (Polymerase Chain Reaction) Method with forward primary MC1R_F '5ACAATGTCATCGACGTGCTC3' and Reverse Primer MC1R_R '5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3' the sequence analysis of SJ and SB was done by using the sequence method towards PCR product and the analysis was done by using Bio Edit software and NCBI BLAST. The results showed that the MC1R gene with SJ3 sample had a gene mutation with deletion in the 937th sequence (C.937delT) which caused deletionsphenylalanin (F) which is p.179delF in the transmembrane region MC1R. The conclusion is there are differences in nucleotide and amino acid sequences in the MC1R gene between Jaliteng Cattle (SJ3) which have dominant eumelanin from samples of Female Jeliteng Cattle (SJ2) and samples of bright-haired Balinese Cows (SB) that have dominant feomelanin.

Keywords :eumelanin, pheomelanin, MC1R, PCR, Jaliteng Cattle, Javanese Bali Bull Cow

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, nikmat, dan karunia-Nya sehingga penulisan skripsi yang berjudul “ANALISA PERBEDAAN GEN WARNA RAMBUT SAPI JALITENG (JAWA BALI BANTENG) JANTAN DAN BETINA BERDASARKAN SEKUEN GEN *MELANOCORTIN-1 RECEPTOR* (MC1R) DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) Merupakan bagian dari salah satu tugas akhir untuk menyelesaikan pendidikan Sarjana di Program studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penulisan Skripsi ini, terutama kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, Drh., DES., selaku dosen pembimbing yang telah memberikan dukungan, bimbingan, fasilitas dan waktu
2. drh. Dyah Ayu Oktavanie. A.P., M. Biotech selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan dukungan, bimbingan, fasilitas dan waktu
3. drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet selaku dosen penguji dalam menguji dan memberikan saran.
4. drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku dosen penguji dalam menguji dan memberikan saran.
5. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M. App. Sc selaku dekan fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang telah memberikan dukungan, bimbingan, fasilitas dan waktu
6. drh. Nanang Tejolaksono dari pihak Taman Safari Indonesia II Prigen yang telah memberikan ide penelitian skripsi dan bantuan .
7. Orangtua tercinta Hari Soetjahyo S.Pt dan Andi Rita Lembah S.Pt,serta ketiga adik yang tersayang selalu mendoakan, memberikan motivasi dan pengorbanannya baik dari segi moril.

8. Teman sekelompok penelitian Amalia Citra Dewanti S.KH dan Aditya Setiawan S.KH yang memberikan semangat , motivasi, dukungan dan kerjasama dalam penelitian ini.
9. drh. Muhammad Abdillah yang memberikan ide parameter, bantuan, semangat, dan motivasi dalam proses penelitian ini.
10. Rifqi Rahman S.KH yang memberikan bantuan, semangat, dan motivasi dalam proses penelitian ini.
11. Laboratorium Biokimia FMIPA dan Biosains yang menunjang fasilitas dan bantuan dalam proses penelitian skripsi.
12. Sahabat- sahabat saya inky,friska, farah L, magfiratul, sasa,tiva, ardini, nina, agung, della, talita ,
13. Keluarga kedua saya di tanah rantau IPPMST Malang
14. Semua pihak yang telah membatu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak mungkin penulisan sebutkan satu persatu

Malang, 12 Juli 2019

Penulis

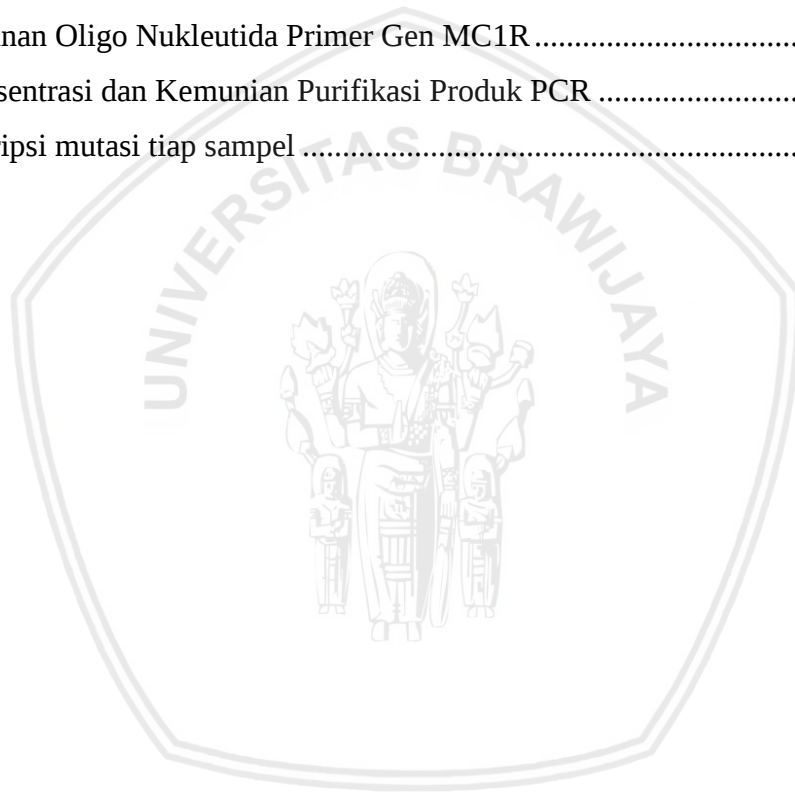
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH DAN ARTI LAMBANG.....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	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	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Sapi Bali	5
2.1.1 Taksonomi Sapi Bali	5
2.1.2 Morfologi Sapi Bali	6
2.1.3 Habitat dan Persebaran Sapi Bali.....	7
2.2 Banteng Jawa	8
2.2.1 Taksonomi Banteng Jawa	8
2.2.2 Morfologi Banteng Jawa	9
2.2.3 Habitan dan Penyebaran Banteng Jawa	10
2.3 Gen Melanocortin-1 Receptor.....	11
2.4 Melanogenesis.....	12
2.5 Melanosit PadaEpidermis.....	13
2.6 Melanosit Pada FolikelRambut.....	14
2.7Polymerase Chain Reaction (PCR).....	16
2.8 Sekuensing DNA.....	17
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN.....	18
3.1 Kerangka Konseptual	19
3.2 Bagan Kerangka Konseptual.....	19
3.3 Hipotesis Penelitian.....	19
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	20
4.1 Tempat danWaktu Penelitian	20
4.2 Alat dan Bahan	20
4.3 Tahapan Penelitian	21
4.4 Rancangan Penelitian	21
4.5 Prosedur Kerja.....	22

4.5.1 Pemilihan Individu	22
4.5.2 Pengambilan Sampel Darah	23
4.5.3 Isolasi DNA.....	23
4.5.4. Uji Kuantitas dan Kualitas DNA.....	23
4.5.5 Desain Primer.....	25
4.5.6 Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	25
4.5.7 Uji Kualitas Produk PCR	26
4.5.8 Purifikasi Produk PCR.....	26
4.5.9 Sekuensing DNA.....	26
4.5.10 Analisa Data	27
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	28
5.1 Isolasi DNA sampel darah Sapi Jaliteng, Sapi Bali, dan Banteng Jawa	28
5.2 Amplifikasi Gen MC1R dengan Metode PCR	29
5.3 Sekuen Gen MC1R (<i>Melanocortin-1 Receptor</i>).....	33
5.4 Analisa Sekuen Gen DNA MC1R (<i>Melanocortin-1 Receptor</i>).....	34
5.5Regulasi Gen MC1R terhadap Perbedaan Warna Rambut Jaliteng (Jawa Bali Banteng) jantan dan Jaliteng (Jawa Bali Banteng) betina.....	40
PENUTUP.....	42
DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Pola Warna Sapi Bali	7
4.1 Informasi Individu Jaliteng	18
5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Darah	24
5.2 Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi Gen MC1R	26
5.3 Susunan Oligo Nukleutida Primer Gen MC1R	26
5.4 Konsentrasi dan Kemurnian Purifikasi Produk PCR	28
5.5 Deskripsi mutasi tiap sampel	32



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Sapi Bali	6
2.2 Banteng Jawa	9
2.3 Mekanisme sintesis melanin	13
2.4 Mekanisme melanosit pada epidermis.....	14
2.5 Folikel rambut dan melanosit rambut	15
5.1 Origin Oligo Nukleotida Gen MC1R.....	26
5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR	27
5.3 Hasil Elektroforesis Purifikasi Produk PCR	27
5.4 Penyejajaran Antara Sekuen DNA SJ3, SJ2 dan SB.....	31
5.5 Penyejajaran Sekuen Asam Amino sampel SJ3, SJ2 dan SB terhadap Gen MC1R7.....	34
5.6 Struktur Asam Amino Pembentuk Gen MC1R.....	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Penelitian.....	42
2. Protokol Isolasi DNA.....	43
3. Desain Primer.....	44
4. Protokol Purifikasi Produk PCR	46
5. Hasil Uji Kuantitatif DNA	47
6.Hasil Uji Kuantitatif Purifikasi Produk PCR.....	48
7.Pembacaan Hasil Sekuen Menggunakan Aplikasi Bioedit Sequence Alignment Editor versi.....	49
8.Grafik Elektroferogram.....	50
9.Hasil BLAST gen MC1R sampel SJ2, SJ3, SB terhadap urutan nukleotida dari Database NCBI	51
10. Komisi Etik Penelitian.....	53

DAFTAR ISTILAH DAN ARTI LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celsius
μL	Mikroliter
Å	Angstrom
AE	<i>Eluted buffer</i>
AL	<i>Lysis buffer</i>
ATL	<i>Animal Tissue Lysis</i>
AW	<i>Washing buffer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>Base Pair</i>
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
CITES	<i>Convention of International Trade In Endangered Species</i>
cm	<i>Centimeter</i>
ddH ₂ O	<i>Double distilled water</i>
ddNTP	<i>Dideoxynucleotide triphosphate</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
dsDNA	<i>double stranded deoxyribonucleic acid</i>
EtBr	<i>Etidium Bromida</i>
G	gram
HCl	<i>hydrochloric acid</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of</i>
Kb	<i>Kilobase</i>
kg	Kilogram
mL	Milimeter
M	Molar
MC1R	<i>Melanocortin-1 Receptor</i>
MC1R_F	<i>Melanocortin-1 Receptor Forward</i>
MC1R_R	<i>Melanocortin-1 Receptor Reverse</i>
mg	Miligram
mM	Milimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pmol	<i>Picomol</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
pH	potential of hydrogen
SK	Surat Keputusan
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
SB	Sapi Bali
SJ	Sapi Jaliteng
UV	Ultraviolet



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu dari tujuh negara mega biodiversitas yang dikenal sebagai pusat konsentrasi keanekaragaman hayati dunia. Salah satu keanekaragaman spesies Indonesia adalah keanekaragaman mamalia dengan jumlah total sebanyak 436 spesies dan 51% diantaranya merupakan satwa endemik. Sapi Bali merupakan salah satu pemasok kebutuhan daging nasional. Hal ini terlihat dari tingginya kuota yang diberikan kepada daerah Bali untuk memenuhi pasar daging di Jakarta maupun di daerah lain di Jawa. Di antara berbagai bangsa sapi yang ada di Indonesia, sapi Bali merupakan salah satu sapi asli Indonesia yang cukup penting dan terdapat dalam jumlah yang cukup besar (Guntoro 2004).

Sapi Bali (*Bos sondaicus*) memiliki keunggulan dibandingkan dengan sapi lainnya antara lain mempunyai angka pertumbuhan yang cepat, adaptasi dengan lingkungan yang baik, dan penampilan reproduksi yang baik. Sapi Bali merupakan sapi yang paling banyak dipelihara pada peternakan kecil karena fertilitasnya baik dan angka kematian yang rendah (Purwantara *et al.*, 2012). Banteng (*Bos javanicus*) merupakan salah satu mamalia besar yang hidup di Pulau Jawa. Banteng juga berperan dalam siklus hara dan berpengaruh terhadap komposisi komunitas tumbuhan. Pada awal abad 18 Banteng tersebar merata di Pulau Jawa, namun kini hanya ada di hutan-hutan yang terfragmentasi (Pudiyatmoko, 2004). Berdasarkan IUCN *red list* (2013), Banteng Jawa termasuk dalam *endangered species* (spesies yang terancam punah) dan termasuk dalam 25 satwa prioritas yang ditetapkan oleh Kementerian Lingkungan

Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia sebagai upaya mencegah satwa tersebut dari kepunahan. Banteng termasuk satwa yang mempunyai satu kali musim kawin dalam satu tahun dan melakukan perkawinan dalam satu periode waktu tertentu tergantung lokasi habitatnya (Husna, 2008).

Tingkat populasi dapat dilakukan melalui sistem perkawinan. Sistem perkawinan dapat dilakukan dengan dua metode yaitu kawin alam (*nature matting*) dan kawin buatan (*artificial matting*). Salah satu tujuan sistem perkawinan adalah untuk menghasilkan sebuah bibit unggul terutama persilangan antar spesies. Bibit unggul hasil persilangan antara Banteng Jawa dengan Sapi Bali adalah Sapi Jaliteng (Jawa Bali Banteng). Sapi Jaliteng memiliki keunikan pada warna rambut. Jaliteng jantan dan betina memiliki warna rambut coklat dan berangsur-angsur mengalami perubahan yaitu jantan dewasa menjadi hitam dan betina dewasa memiliki warna rambut yang tetap yaitu berwarna coklat.

Keragaman genetik terdiri atas antar spesies, antar populasi, antar individu, dalam populasi dan dalam individu. Keragaman antar spesies sebagai manifestasi dari keragaman genetik walaupun pembedaan spesies dengan mudah tanpa mengetahui komposisi gennya (Indrawan dkk., 2007). Keragaman genetik dalam sebuah populasi organisme terutama dihasilkan oleh tiga mekanisme yaitu mutasi, perpasangan alel secara bebas atau rekombinasi dan migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain. Keragaman genetik terdapat di dalam suatu individu bilamana ada dua alel untuk gen yang sama merupakan perbedaan konfigurasi DNA yang menduduki lokus yang sama pada suatu kromosom (Suryanto, 2003; Elrod and Stansfield, 2007).

Salah satu gen yang menentukan warna rambut hitam dan coklat pada mamalia adalah gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R). Gen tersebut akan menstimulasi melanosit untuk membentuk pigmen melanin yang kemudian akan memproduksi eumelanin dan feomelanin yang akan bertanggung jawab terhadap warna rambut dan warna kulit. Eumelanin bertanggung jawab terhadap warna rambut dan kulit yang lebih gelap sedangkan feomelanin akan berperan dalam menghasilkan warna rambut dan kulit lebih cerah (*Genetic Home Reference, 2007*).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mempelajari perbedaan warna rambut jantan dan betina dewasa berdasarkan gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R).

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbedaan sekuen gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) pada sapi Jaliteng jantan dan sapi jaliteng betina dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di *Taman Safari Indonesia II Prigen- Pasuruan, Jawa timur* ?

1.3 Batasan Masalah

Basatasan masalah pada penelitian ini antara lain:

1. Sampel yang digunakan yaitu darah Banteng, Sapi Balidan Jalitengdengan menggunakan delapan sampel (satu Banteng, satu Sapi Bali, enam Sapi Jaliteng) dari Taman Safari Indonesia II Prigen- Pasuruan, Jawa Timur
2. DNA diisolasi dari darah Sapi Jaliteng, Sapi Bali, dan Banteng Jawa menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit*
3. Amplifikasi DNA gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) Sapi Jaliteng dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reactoin (PCR)* menggunakan

primer *forward* (MC1R)'5ACAATGTCATCGACGTGCTC3', primer *reverse* (MC1R)'5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3'.

4. Metode PCR dilakukan dengan menggunakan mesin *SensoQuest Thermocycler* melalui proses: pradenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) 50,1°C selama 30 detik, *extension* selama 72°C selama satu menit dan post *extension* 72°C selama tujuh menit.
5. *Sequencing* hasil PCR dilakukan menggunakan metode Sanger dengan prinsip *dye terminator Labelling* menggunakan primer *forward* (MC1R)'5ACAATGTCATCGACGTGCTC3', primer *reverse* (MC1R)'5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3'.
6. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA antara Sapi jaliteng jantan dan Sapi jaliteng betina dengan menggunakan program *BioEdit* dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

1.4 Tujuan

Penelitian bertujuan untuk mengetahui perbedaan warna rambut melalui sekuen gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) pada Sapi Jaliteng jantan dan Sapi Jaliteng betina.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi genetik perbedaan sekuen gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) pada warna rambut yang terjadi di Sapi Jaliteng jantan dan Sapi Jaliteng betina, serta sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi Bali

Sapi Bali (*Bos sondaicus*) merupakan sapi Bali asli Indonesia yang diduga sebagai hasil domestikasi (penjinakan) dari banteng liar. Sebagian ahli yakin bahwa domestikasi tersebut berlangsung di Bali sehingga disebut sapi Bali (Guntoro, 2002).

Ciri khas sapi Bali adalah postur tubuh kecil, memiliki garis hitam pada punggung yang sering disebut garis belut (sangat jelas pada pedet), bulu berwarna coklat kekuningan (merah bata), pada jantan dewasa bulu akan berubah menjadi coklat kehitaman, berwarna putih pada bagian tepi daun telinga bagian dalam, kaki bagian bawah, bagian belakang pelvis dan bibir bawah (Feati, 2011).

2.1.1 Taksonomi Sapi Bali

Menurut Williamson dan Payne (1993), bangsa sapi Bali memiliki klasifikasi taksonomi sebagai berikut :

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Sub class	: Theria
Infra class	: Eutheria
Ordo	: Artiodactyla
Sub ordo	: Ruminantia
Infra ordo	: Pecora
Family	: Bovidae
Genus	: Bos (cattle

2.1.2 Morfologi Sapi Bali

Pada Sapi Bali memiliki Warna rambut pada badannya akan berubah sesuai usia dan jeniskelaminnya, sehingga termasuk hewan dimorphism-sex. Pada saat masih “pedet”, rambut badannya berwarna sawo matang sampai kemerahan. Warna rambut sapi Bali jantan biasanya berubah dari merah bata menjadi coklat tua atau hitam setelah sapi itu mencapai dewasa kelamin sejak umur 1,5 tahun dan menjadi hitam mulus pada umur 3 tahun (**Gambar 2.1A**). Warna hitam dapat berubah menjadi coklat tua atau merah bata apabila sapi itu dikebiri, yang disebabkan pengaruh hormon testosteron. Sedangkan sapi bali betina dewasa tetap berwarna coklat kemerahan (**Gambar 2.1 B**) (Wibisono 2009).



Gambar 2.1 Sapi Bali

Keterangan : A : Sapi Bali Jantan

B : Sapi Bali Betina (Sumber : Wibinoso, 2009).

Tabel 2.1 Pola Warna Sapi Bali

Ciri-ciri Sex Keterangan eksterior	
Warna tubuh Jantan	Pada saat pedet berwarna merah bata dan dewasa berwarna hitam
Betina	Pedet berwarna sawo matang
Merah bata (61,36%), warna hitam (31,82%) dan warna putih (6,82%)	
Warna garis Jantan	Warna hitam punggung
Betina	Betina merah bata garis belutnya berwarna hitam
	Betina warna putih garis belutnya berwarna kuning kecoklatan
Tanduk Jantan	mengarah keatas (53%) -
Betina	dan mengarah kebawah(47%)
	Tanduk berwarna hitam (100%)

2.1.3 Habitat dan Persebaran Sapi Bali

Sapi Bali menyebar ke pulau-pulau di sekitar pulau Bali melalui komunikasi antar raja-raja pada zaman dahulu. Sapi Bali telah tersebar hampir di seluruh provinsi di Indonesia dan berkembang cukup pesat di daerah karena memiliki beberapa keunggulan. Sapi Bali mempunyai daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan yang buruk seperti daerah yang bersuhu tinggi, mutu pakan yang rendah, dan lain-lain. Tingkat kesuburan (fertilitas) sapi Bali termasuk amat tinggi dibandingkan dengan sapi lain, yaitu mencapai 83%, tanpa terpengaruh oleh mutu pakan. Tingkat kesuburan (fertilitas) yang tinggi ini merupakan salah satu keunikan sapi Bali (Guntoro, 2002).

2.2 Banteng Jawa

Banteng Liar atau biasa disebut dengan Banteng saja merupakan hewan mamalia yang berkerabat dengan sapi. Banteng Jawa (*Bos javanicus*) merupakan satu dari 5 (lima) spesies Banteng yang ada di dunia (satu spesies telah punah) (Alamendah 2010). Banteng (*Bos javanicus*) terdiri atas tiga subspecies (sub-jenis) yakni *Bos javanicus javanicus* (terdapat di Jawa, Madura, dan Bali, Indonesia), *Bos javanicus lowi* (terdapat di Kalimantan) dan *Bos javanicus birmanicus* (terdapat di Indocina). Banteng merupakan satwa yang dilindungi di Indonesia. Populasinya semakin mengalami penurunan. Oleh IUCN Redlist, Banteng dikategorikan dalam status konservasi Endangered (Alamendah 2010).

2.2.1 Taksonomi Banteng Jawa

Menurut Alikodra (1982) Banteng dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Klas	: Mammalia
Subklas	: Theria
Ordo	: Artiodactyla
Subordo	: Ruminantia
Famili	: Bovidae
Subfamili	: Bovinae
Tribe	: Bovini
Genus	: <i>Bos</i>
Spesies	: <i>Bos javanicus</i>

2.2.2 Morfologi Banteng Jawa

Banteng merupakan hewan yang besar, tegap dan kuat dengan memiliki bahu depan yang lebih tinggi daripada bagian belakang. Pada bagian kepala terdapat sepasang tanduk. Pada bagian tengah dada terdapat gelambir (*dewlap*) memanjang dari pangkal kaki depan hingga leher, tetapi tidak mencapai daerah kerongkongan. Banteng (*Bos javanicus*) mempunyai tinggi sekitar 160 cm dengan panjang antara 190-225 cm. Meskipun beberapa banteng mampu memiliki berat hingga 1 ton tetapi rata-rata banteng jantan memiliki berat berkisar antara 600-800 kg (**Gambar 2.2 A**), sedangkan Banteng betina memiliki berat dan ukuran yang lebih kecil. Banteng memiliki sepasang tanduk di kepalanya yang panjangnya berkisar antara 60-75 cm. Kulit kaki bagian bawah, punuk, dan daerah sekitar mata dan moncong Banteng (*Bos javanicus*) berwarna putih (**Gambar 2.2.B**).



Gambar 2.2 Banteng Jawa

Keterangan : A : Banteng Jawa Jantan
B : Banteng Jawa Betina (Sumber : Huffman 2005)

Pada Banteng berkelamin jantan memiliki kulit berwarna biru kehitam-hitaman atau coklat gelap dengan punuk di bagian pundak dan tanduk yang melengkung ke atas, sedangkan pada Banteng betina memiliki kulit berwarna coklat kemerahan tanpa punuk dan tanduk yang mengarah ke dalam. Banteng mampu hidup hingga berumur 20 tahun dengan masa kedewasaan ketika berusia 2-

3 tahun. Banteng betina mempunyai lama kehamilan hingga 285hari dan umumnya hanya melahirkan satu anak saja dalam satu masa kehamilan. Bayi Banteng akan disapih ketika berusia 6-9 bulan. Banteng hidup secara berkelompok dengan jumlah kawanan antara 2-40 individu dengan satu Banteng jantan. Banteng-banteng jantan muda hidup sendirian atau dalam kelompok-kelompok kecil bujang (Saari,2002).

2.2.3 Habitat dan Penyebaran Banteng Jawa

Banteng mempunyai habitat di daerah berhutan lebat ataupun hutan bersemak mulai dari dataran rendah hingga ketinggian 2.100 mdpl. Persebarannya mulai dari Kamboja, Indonesia (Jawa, Bali, dan Kalimantan), Laos, Malaysia, Thailand, Myanmar, dan Vietnam. Di beberapa negara seperti Brunei Darussalam, bangladesh, dan India, Banteng dinyatakan telah punah (Alamenda,2010)

Di Taman Nasional Ujung Kulon (TNUK) diperkirakan terdapat 300-700 ekor Banteng (tahun 2003), 200 ekor di Taman Nasional Meru Betiri (2000), 200 ekor di Taman Nasional Baluran (2002), 80 ekor di Taman Nasional Alas Purwo (2002). Populasi-populasi yang lebih kecil juga terdapat di beberapa tempat seperti di Cagar Alam Cikepuh-Cibanteng, Pangandaran, Malang, dan Kediri.

Lantaran populasinya yang semakin menurun, sejak tahun 1996, banteng dinyatakan dalam Status Konservasi “Endangered” oleh IUCN. Banteng sampai saat ini belum terdaftar dalam CITES meskipun sejak 1996 telah diusulkan untuk didaftar dalam CITES Apendiks I (Alamenda,2010).

2.3 Gen *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R)

Proses regulasi pigmentasi pada sapi adalah gen Melanocyte Stimulating Hormone receptor (MSHr) atau Melanocortin 1 Reseptor (MC1R). *Melanocyte Stimulating Hormone* (MSH) berperan penting dalam menentukan respon kulit terhadap radiasi ultraviolet dan dapat mempengaruhi perkembangan melanoma (Klungland, 2001).

Melanocortin-1 receptor merupakan salah satu protein kunci yang diekspresikan pada permukaan melanosit. Melanin adalah zat yang terlibat dalam mengatur dan mempengaruhi warna kulit, rambut dan warna mata. Kulit adalah lapisan atau membran dengan fungsi utama adalah melindungi permukaan kulit. Membran plasma (melanosit) yang menghasilkan pigmen melanin melalui proses melanogenesis. Garcia-Barron *et al.*, (2005) menyatakan bahwa melanin adalah amplifikasi polymorphous dan multifungsi yang mencakup Eumelanin (hitam sampai coklat), Pheomelanin (merah sampai kuning), campuran melanin (kombinasi Eumelanin dan Pheomelanin), dan Neuromelanin.

Beberapa variasi polimorfik pada gen MC1R umumnya diasosiasi dengan perbedaan pada warna rambut dan kulit. Variasi genetik umumnya sangat banyak pada individu dengan warna rambut merah, kulit yang cerah, bintik-bintik di kulit dan sensitivitas paparan sinar matahari. Sifat polimorfik di gen *melanocortin-1receptor* inilah yang menurunkan kemampuan MC1R untuk menstimulasi produksi eumelanin, mengakibatkan melanosit membuat sangat banyak feomelanin. Meskipun MC1R adalah gen kunci dalam pigmentasi normal, beberapa peneliti percaya bahwa terdapat efek terhadap gen lainnya selain berkontribusi pewarnaan rambut dan kulit. (Genetic Home Reference, 2007).

Dalam NCBI(2003), *Coding DNA Sequence* (CDS) gen MC1R pada *Bos Indicus* dengan data *Gene Bank*: XM_019979538.1

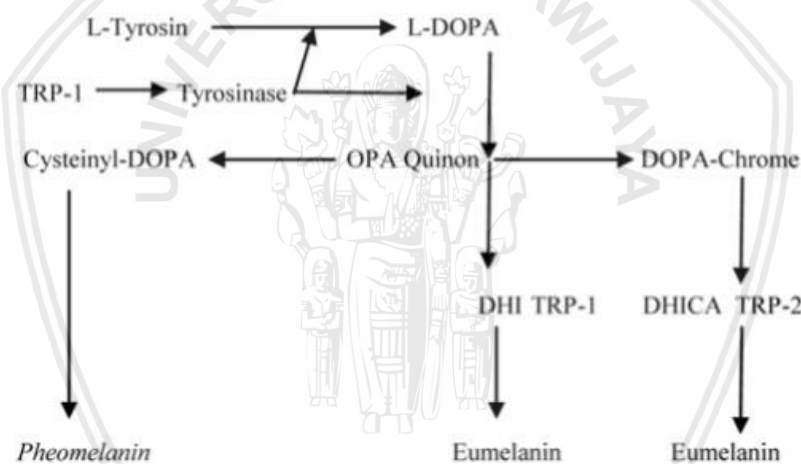
2.4 Melanogenesis

Melanin disintesis oleh berbagai protein dalam proses melanogenesis. Jalur melanogenesis diawali dari melanosit yang bermigrasi ke bagian epidermis dan folikel rambut. Melanosit adalah sel yang berasal dari *neural crest* vertebra, selama proses embriogenesis sel-sel prekursor *melanoblast* bermigrasi melalui jalur dorsolateral kemesenkim untuk mencapai epidermis dan folikel rambut (Suryaningsih dan Soebono, 2016).

Melanosit merupakan sel yang dapat menyintesis enzim tirosinase, enzim tersebut jika bergabung dalam melanosome, maka akan memulai melakukan sintesis dan mendepositkan dari melanin (Mamoto *et al*, 2009). Proses sintesis melanin (*eumelanin* dan *feomelanin*) memerlukan enzim prekursor tirosinase. Enzim tirosinase membutuhkan tembaga untuk proses awal katalisis untuk mengkonversi tirosin menjadi L-3,4- dihydroxyphenylalanine (DOPA), selanjutnya teroksidasi menjadi DOPA- *quinone* (DQ). Selanjutnya sistein akan mengubah DQ menjadi sistenil DOPA dan akan teroksidasi serta terpolimerisasi menjadi *feomelanin* (warna kuning kemerahan). *Feomelanin* merupakan melanin yang larut. Jika tidak ada senyawa thiol (sistein dan *glutathione* atau *thioredoxin*), DQ akan langsung menjadi DOPAchrome yang berwarna gelap. DOPAchrome secara spontan akan kehilangan asam karboksilat dan 5.6 dihydroxyndole (DHI) yang akan teroksidasi dan terpolimerisasi menjadi coklat gelap. DOPAchrome *tautomerase* (TYRP2/DCT) akan mengubah DOPAchrome menjadi DHI-2carboxyl acid (DHICA). Selanjutnya tirosinase dan TYRP1 akan mengonversi

menjadi melanin yang berwarna coklat terang. Melanin DHI dan melanin DHICA berwarna coklat gelap yang disebut sebagai *eumelanin* (Suryaningsih dan Soebono, 2016).

Melanosit memerlukan enzim tirosinase (TYR) dan tirosinase *related* protein (TRP-1 dan TRP-2). Enzim – enzim tersebut dibutuhkan dalam proses melanogenesis melalui tahapan di retikulum endoplasma ribosom dan di transporasikan ke apparatus golgi untuk proses glikosilasi sehingga menjadi protein esensial untuk membentuk struktur dan fungsi melanosom (Suryaningsih dan Soebono, 2016).



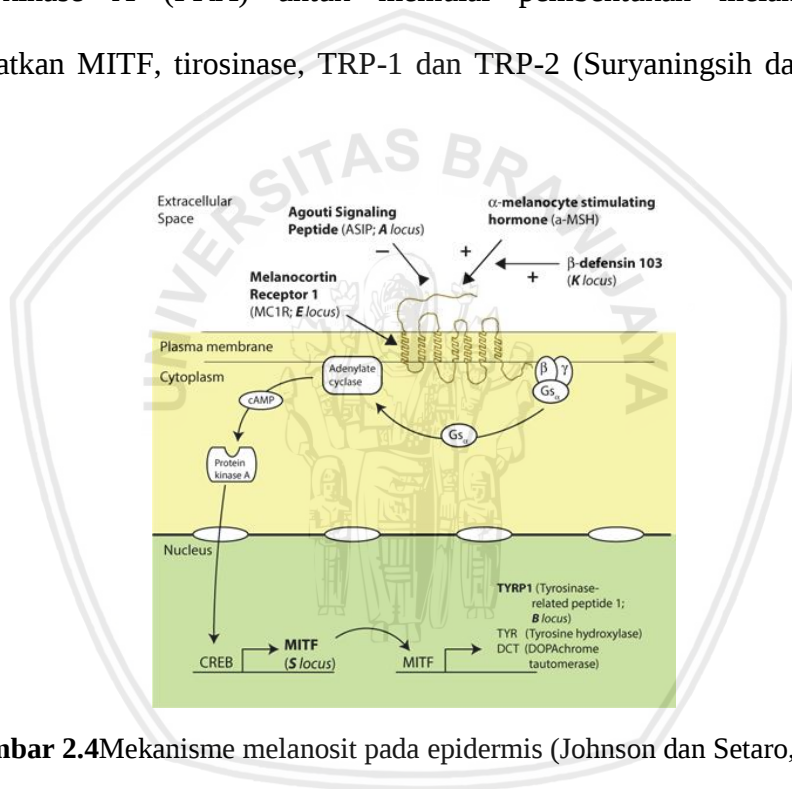
Gambar 2.3 Mekanisme sintesis melanin (Suryaningsih dan Soebono, 2016).

2.5 Melanosit Pada Epidermis

Melanosit epidermis terletak pada stratum basalis. Melanin yang ada di epidermis merupakan elemen yang sangat aktif. Terdapat beberapa sekresi target yang tidak hanya pada keratinosit tetapi juga melibatkan sistem imun di kulit, misalnya melibatkan sitokin inflamasi ($IL-1\alpha$, $IL-2$, $IL-6$, $IL-10$ dan $TNF-\alpha$) kemokin ($IL-8$, $CCL2$), $TGF-\beta$, serotonin, *melanocyte stimulin hormone* (α -MSH) dan *nitric oxide* (NO) merupakan faktor-faktor yang dilepaskan dan

kadarnya meningkat sebanding dengan stimulasi melanosit yang terjadi (Suryaningsih dan Soebono, 2016).

α -MSH berperan penting dalam proses melanogenesis, α -MSH akan berikatan dengan *melanocortin 1 receptor* (MC1R) dan selanjutnya meningkatkan adenilat siklase yang akan menginduksi adenosine monophosphate siklik (cAMP) untuk memulai menyintesis melanin. Proses selanjutnya adalah menginduksi protein kinase A (PKA) untuk memulai pembentukan melanin dengan meningkatkan MITF, tirosinase, TRP-1 dan TRP-2 (Suryaningsih dan Soebono, 2016).

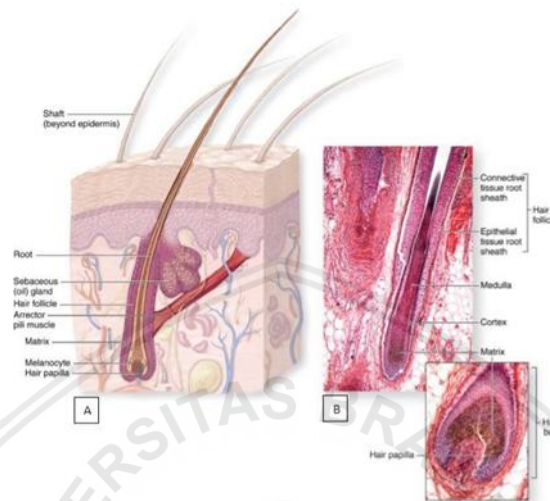


Gambar 2.4 Mekanisme melanosit pada epidermis (Johnson dan Setaro, 2013).

2.6 Melanosit Pada Folikel Rambut

Melanosit pada folikel rambut terdapat di daerah bulbus proksimal pada setiap helainya. Dendrit melanosit terdapat di antara korteks dan medulla keratinosit. Rasio folikel melanosit yang ada di folikel rambut lebih padat jika dibandingkan dengan melanosit yang ada di epidermis. Pigmentasi folikular terjadi karena terdapat stuktur dan interaksi fungsional antara melanosit folikular, matriks keratinosit dan fibroblast papilla dermis. Perbedaan warna rambut

disebabkan perbedaan jumlah dan rasio pigmen *eumelanin* yang lebih berwarna gelap dibandingkan dengan *feomelanin* yang berwarna terang (Suryaningsih dan Soebono,2016).



Gambar 2.5 Folikel rambut dan melanosit rambut (Sinaga *et al*, 2012)

Sintesis pigmen melanin dirambut diregulasikan oleh sekresi yang diproduksi dari sel – sel keratinosit, fibroblast dan endotel. Regulasi diatur oleh Autokrin, parakrin dan hormone. Penentuan warna rambut juga ditentukan oleh *Melanocortin-1 receptor* (MC1R), α – MSH, *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH), DF, sitokin dan regulator lainnya seperti pada epidermis. Melanogenesis pigmentasi rambut terjadi pada beberapa fase, yakni: fase anagen (*growing phase*) merupakan fase perubuhan, fase katagen (*regressing phase*) meruakan proses terjadinya apoptosis melanosit atau kematian formasi pigmen, tetapi akan terbentuk melanosit baru di bulbus rambut, dan fase telogen (*restingphase*) merupakan fase istirahat dari sistem pigmentasi rambut. Regulasi melanosit pada rambut dimulai dari proliferasi, diferensiasi dan kelangsungan hidup melanosit diatur sendiri oleh folikel rambut (Suryaningsih dan Soebono, 2016).

2. 7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah sebuah metode sederhana dan cepat untuk membuat *multiple copies* atau memperbanyak sekuen DNA spesifik yang diinginkan yang berada di antara dua daerah sekuen DNA yang tidak diketahui dengan meniru replikasi DNA secara *in vivo* yaitu merubah *double-stranded DNA* (dsDNA) menjadi *single-stranded DNA* (ssDNA), selanjutnya digandakan, dan *rewound* (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008; Weissensteiner *et al.*, 2003). Urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya, dan pada setiap “*n*” siklus PCR, akan diperoleh 2^n kali jumlah DNA target (Fatchiyah dkk., 2011).

PCR memiliki beberapa keunggulan, diantaranya dapat memperbanyak DNA pada bagian yang spesifik sesuai yang diharapkan, memiliki sensitivitas tinggi, dapat digunakan untuk melakukan pengujian hingga manipulasi DNA, mampu memberikan hasil dalam waktu singkat, dapat digunakan untuk mendeteksi sampel yang terkontaminasi maupun menyeleksi sampel negatif, dapat mengidentifikasi organisme secara mendetail hingga tingkat spesies bahkan serotipe yang bahkan tidak dapat dilakukan menggunakan sistem konvensional, dapat bekerja pada materi genetik dari berbagai sel, serta dapat dilakukan pada sampel yang berupa campuran kompleks. Namun meski begitu, PCR juga memiliki beberapa kelemahan, diantaranya DNA sel bakteri yang mati ikut terdeteksi pula (Prayoga dkk, 2015).

2.8 Sekuen DNA

Sekuen DNA adalah proses pembacaan urutan nukleotida dari satu fragmen DNA tertentu (Star and Taggart, 2004). Proses sekuensing diawali oleh proses *cyclesequencing*. *Cycle sequencing* adalah proses amplifikasi dengan metode PCR untuk mendapatkan DNA untai tunggal yang akan digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk proses sekuensing (Sambrook and Russel, 2001).



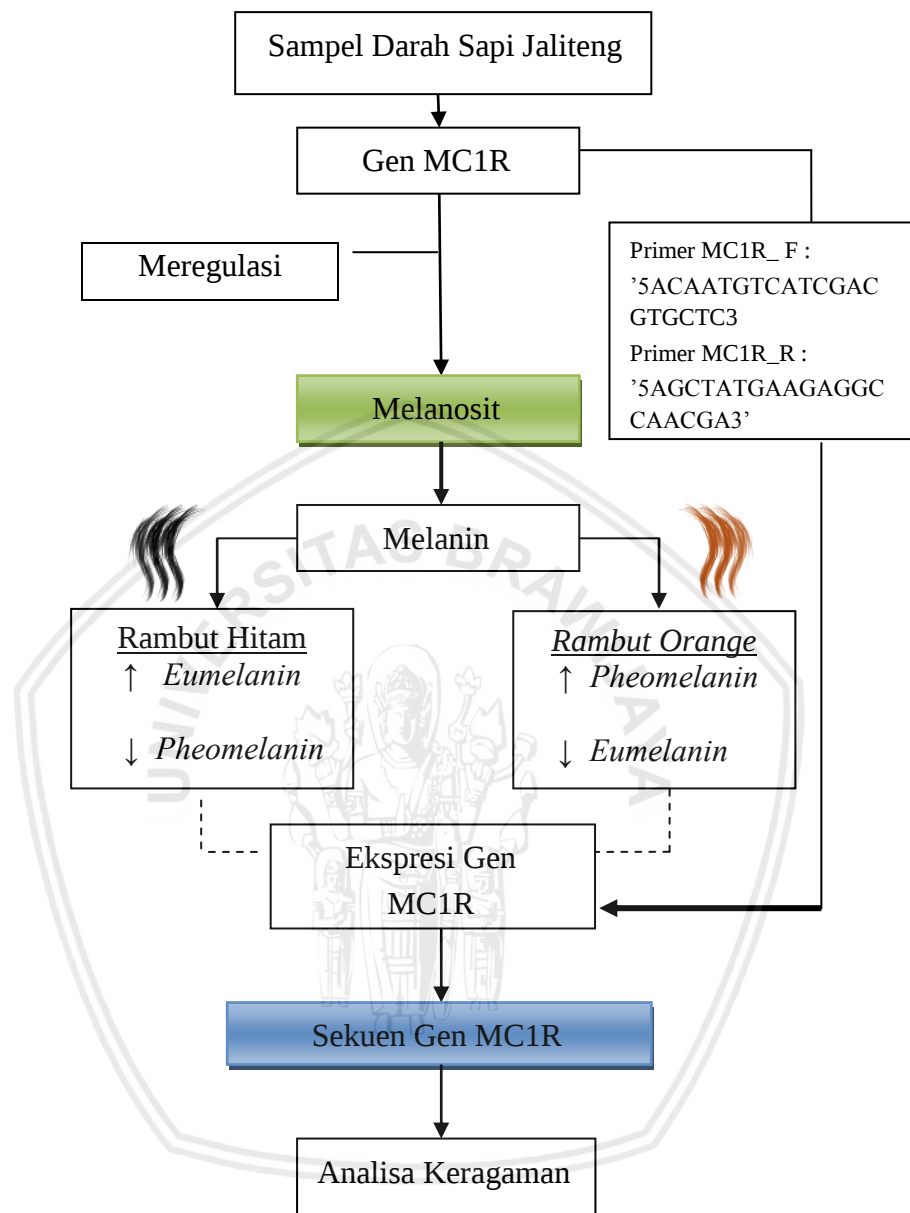
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Perbedaan pigmentasi pada Jaliteng (Sapi Jawa Banteng) jantan yang memiliki warna rambut gelap dengan Jaliteng (Sapi Jawa Banteng) betina yang memiliki warna rambut terang disebabkan karena produksi melanin yang dihasilkan berbeda. Pada Jaliteng (Sapi Jawa Banteng) jantan, menghasilkan lebih banyak *eumelanin* dari pada *feomelanin* sehingga menghasilkan rambut lebih gelap, daripada Jaliteng (Sapi Jawa Banteng) betina yang memiliki warna rambut terang.

Pigmentasi Mamalia dipengaruhi oleh melanin yaitu *eumelanin* dan *feomelanin*. Individu Jaliteng yang berambut coklat menghasilkan *feomelanin* lebih banyak dibandingkan dengan *eumelanin*, begitu pula individu Jaliteng yang berambut hitam menghasilkan *eumelanin* yang lebih banyak. Warna rambut yang berbeda pada Jaliteng jantan dan betina dewasa dipengaruhi oleh ekspresi gen *MC1R* yang berperan sebagai regulator dalam memproduksi melanosit. Ketika reseptor tersebut diaktifkan maka akan menstimulasi melanosit untuk membentuk melanin kemudian melanin akan membentuk *eumelanin* atau *feomelanin*.

3.2 Bagan Kerangka Konseptual



3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah ekspresi gen MC1R berpengaruh terhadap perbedaan fenotip warna rambut pada individu Jaliteng Jantan dan Betina.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel darah Jaliteng dilakukan di Taman Safari Indonesia II Prigen- Pasuruan, Jawa Timur, selanjutnya penelitian dilaksanakan di laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya pada September 2016– Maret 2017.

4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian antara lain disposable syringe 1 cc, standar *forceps*, sarung tangan, masker, gunting, *ice box*, kertas label, *autoclave* – *Bio Clave Gnatus 21L*, *micro tube* 1,5 ml, *micro tube rack*, 150 µL, mikropipet 1 – 10 µL, 20 – 200 µL, dan 200 – 1000 µL, labu Erlenmeyer 100 ml, timbangan analitik digital, *incubator*, mesin penangas, *autoclave Gnatus 12 L*, mesin vortex, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, *pipete tube rack*, sentrifugator, freezer -20°C, *Thermocycler SensoQuest GmbH*, mesin *sequencing*, computer, *Bio StepUV-Transilluminator DH-40*, *Implen NanoPhotometer® Pearl*, *Mupid-Exu Electrophoresis* dan kamera.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain DNA darah Sapi Jaliteng, Sapi Bali, dan Banteng Jawa, agen anestesi, kit isolasi DNA (*Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit*), Primer *Forward* (MC1R_F) '5ACAATGTCATCGACGTGCTC3' Primer *Reverse* (MC1R_R) '5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3' PCR mix (*Promega GoTaq® Green Master DNA ladder* 100 bp dan 1 kb, agarosa 1% dan 2%, *Promega blue loading*

dye6x, etanol absolut, etanol 70%, Natrium asetat 3M, kertas parafilm, alumunium foil, dan larutan etidium bromida (EtBr).

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Pemilihan Jaliteng di Taman Safari Indonesia II Prigen- Pasuruan, Jawa timur.
2. Pengambilan sampel berupa sampel darah dari Banteng Jawa, Sapi Bali Dan Jaliteng
3. Isolasi DNA
4. Uji Kuantitas dan kualitas DNA
5. Desain primer
6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
7. Uji kuantitas dan kualitas Produk PCR
8. Purifikasi produk PCR
9. Sekuensing DNA produk PCR
10. Analisa data

4.4. Rancangan Penelitian

Data yang didapat bersifat komparatif dengan melihat perbandingan sekuen gen MC1R (*Mc1r*) antara Sapi Jaliteng dan Sapi Bali, selanjutnya dibandingkan dengan sekuen spesies *Bos javanicus* dalam Database NCBI. Sampel darah sebanyak delapan sampel merupakan darah yang diambil dari enam individu Sapi Jaliteng, satu individu Sapi Bali, dan satu individu Banteng Jawa. Proses selanjutnya dengan pengisolasian DNA melalui sampel darah (whole blood) tersebut dengan menggunakan Qiagen *Qiaamp DNA Mini Kit and Tissue*

kit. Hasil isolasi DNA akan diukur konsentrasinya dengan spektrofotometri dan pengukuran menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%.Setelah itu, sampel DNA hasil akan diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *forward* (MC1R) '5ACAATGTCATCGACGTGCTC3', primerreverse (MC1R) '5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3'. Ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel agarosa 2%.Kemudian produk PCR disekuensing dengan metode *Sanger*. Hasil sekuen fragmen DNA tersebut disejajarkan dengan menggunakannucleotide BLAST pada NCBI dan softwareBioedit .

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Pemilihan Individu

Individu yang digunakan sebagai objek penelitian berasal dari Taman Safari Indonesia II Prigen- Pasuruan, Jawa Timur. Pemilihan Sapi Jaliteng, Sapi Bali, dan Banteng Jawa dilakukan berdasarkan jumlah populasi.

Tabel 4.1 Informasi Individu Sapi Jaliteng, Sapi Bali, Banteng Jawa

NO	Nama	Umur	Jenis kelamin	Simbol
1.	Matos (Banteng)	Dewasa	Jantan	B
2.	Nia (Sapi Bali)	Dewasa	Betina	SB
3.	Naruto (Jaliteng)	Dewasa	Jantan	SJ1
4.	Safitri (Jaliteng)	Dewasa	Betina	SJ2
5.	Karyo (Jaliteng)	Anak	Jantan	SJ3
6.	Teresia(Jaliteng)	Anak	Betina	SJ4
7.	Saga F2 (Jaliteng)	Anak	Jantan	SJ5
8.	Sondang F2 (Jaliteng)	Anak	Betina	SJ6

4.5.2 Pengambilan Sampel Darah Sapi Jaliteng, Banteng Jawa, dan Sapi Bali

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini darah Sapi Jaliteng, Banteng Jawa dan Sapi Bali. Pengambilan sampel dilakukan di Taman Safari Indonesia II Prigen - Pasuruan, Jawa Timur. Teknik pengambilan darah melalui vena jugularis adalah kepala hewan ditegakkan kemudian berikan penekanan pada vena jugularis di sekitar area pangkal leher supaya darah menjadi sedikit tersumbat dan ukuran vena jugularis mengembang. Kemudian tusukkan jarum berukuran 18G secara perlahan menembus kulit dan vena jugularis, arahkan jarum dengan sudut sekitar 20° terhadap permukaan kulit. Setelah itu tarik ujung *syringue/spuit* untuk mengambil darah sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan. Sampel darah yang diambil dimasukkan ke dalam tabung venoject *EDTA*.

4.5.3 Isolasi DNA

Pada dasarnya ekstraksi atau isolasi DNA dilakukan melalui tiga tahapan, yaitu penghancuran sel, penghilangan protein dan RNA, serta pemanenan DNA. DNA merupakan polimer nukleotida yang sangat panjang. Setiap nukleotida terdiri dari tiga unit, yaitu suatu gula dengan 5 atom C, suatu basa nitrogen dan basa fosfat. Basa Nitrogen adalah cincin heterosiklik yang mempunyai kerangka karbon dan nitrogen. Ada dua kelas basa nitrogen, yaitu purin dan pirimidin (Chinnery & Turnbull, 2000). Protokol Isolasi DNA dari rambut dan folikel rambut dilihat pada .

4.5.4 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

Uji kualitas DNA total (hasil isolasi) dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1%, sedangkan uji kualitas hasil isolasi DNA dilakukan

menggunakan teknik *nanophotometer*. Elektroforesis gel agarosa 1% dilakukan dengan modifikasi Sambrook and Russel (2001); Fatchiyah dkk., (2011). Cetakan agarosa dibersihkan terlebih dahulu dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x sebanyak 15 mL dan gel agarosa 0,15 g (1%) hingga agarosa larut (dalam waktu minimum melarutkan agarosa), selanjutnya ditambahkan EtBr sebanyak 1 μ L. Campuran selanjutnya didinginkan dan disiapkan sisir untuk pembuatan slot pada gel (Fatchiyah dkk., 2011).

Posisi sisir yang baik adalah 0,51,0 mm di atas *plate* hingga sumuran terbentuk saat ditambahkan agarosa ke dalam *plate*. Campuran agarosa dan TBE 1x kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel selanjutnya dibiarkan memadat selama 20–30 menit pada suhu ruang. Sisir kemudian diambil secara perlahan dan dipindahkan agarosa yang telah padat ke dalam *chamber*. Larutan bufer elektroforesis (TBE 1x untuk *running*) kemudian dituangkan di atas gel hingga menutupi seluruh bagian gel (lebih kurang 1 mm). *Marker* (DNA *ladder*) dan *loading dye* (dengan perbandingan 1:1) selanjutnya dimasukkan ke dalam salah satu sumuran (umumnya sumur pertama), kemudian larutan *loading dye* dan DNA dimasukkan (dengan perbandingan 1:1) pada masing-masing sumur berikutnya (sesuai urutan pelabelan). *Chamber* selanjutnya dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan selama 15 menit (jika *lead* terpasang dengan benar, gelembung akan dihasilkan pada anoda dan katoda karena elektrolisis, dan dalam beberapa menit *loading dye* harus bermigrasi dari sumur ke dalam gel) dengan tegangan 100 volt. Setelah *running* elektroforesis selesai, arus listrik diputuskan dan diangkat gel dari *chamber*. Gel selanjutnya dipindah ke *UV-trans illuminator Gel Doc*

dandidokumentasikan dengan diekspos menggunakan *Gel Doc-imaging* sehinggamemudahkan analisis.

Uji kuantitas dilakukan dengan menggunakan mesin ImplenNanoPhotometer®Pearl. Pengujian dilakukan dengan *buffer* terakhir saat isolasi DNA (*buffer* AE) sebagai blanko. *Buffer* diteteskan langsung di atas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1 μ L, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Sebanyak 1 μ L sampel diteteskan di atas *pedestal submicroliter cell* yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup di atas sampel yang telah diteteskan dan ditekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasil keluar di layar monitor.

4.5.5 Desain Primer

Sekuens genomik dari desain primer yang digunakan diambil dari spesies *Bos Indicus* yang didapatkan melalui NCBI dengan kode sekuens genomik *Reference Sequence*: XM_019979538.1 Penggunaan *Bos indicus* dilakukan karena sekuens genomik MC1R pada Banteng Jawa belum tersedia hingga desain primer dilakukan, sehingga dipilih spesies dalam satu *family* dengan Banteng Jawa. Primer yang didapatkan yaitu primer *forward* MC1R_1F '5ACAATGTCATCGACGTGCTC3' (*start* : 350; panjang: 20bp; Tm: 59,7 °C; GC: 50,0%; ANY: 5,0; SELF: 2,0) , primer *reverse* MITF_1R '5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3' (*start*: 594; panjang: 20 bp; Tm: 60,0°C; GC: 50,0%; ANY: 4,0; SELF: 0,0) dengan target amplifikasi 245 bp.

4.5.6 Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Hasil Isolasi DNA dari darah banteng, sapi bali dan jaliteng selanjutnya diampikasikan menggunakan metode PCR. Primer yang digunakan adalah

forward (MC1R_F) dan *Reverse* (MC1R_R). Amplifikasi dimulai dengan mencampurkan 1 µL DNA, 1µL primer *forward*, 1µL primer *Reverse*, 5 µL PCR *mix*, dan 2 µL ddhH₂O ke dalam *microtube* 200 µL. Tahapan amplifikasi dimulai dari pradenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian *annealing* pada suhu 50,1°C selama 30 detik dengan gradien +/- 2°C, *extension* pada suhu 72°C selama satu menit dan *post extension* pada suhu 72°C selama tujuh menit. Proses akan berulang hingga 30 siklus.

4.5.7 Uji Kualitas Produk PCR

Uji kualitas produk PCR dilakukan dengan *running* elektroforesis gel agarosa 2 % dan diamati dengan UV transiluminator 30 menit .

4.5.8 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan sisa-sisa PCR mix meliputi dNTPs, Taq Polimerase, dan ion Mg, serta ddH₂O dan primer yang berada di dalam PCR *tube*. Metode yang digunakan dalam purifikasi produk PCR adalah presipitasi etanol dengan modifikasi protokol dari *The National Guard Health Affairs* (2013).

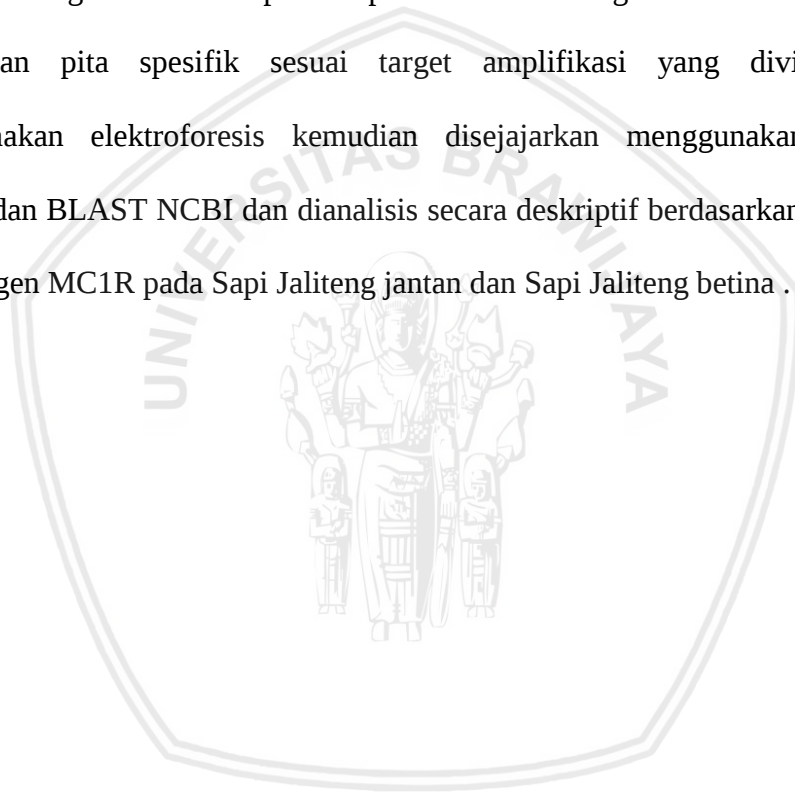
4.5.9 Sekuensing DNA

Hasil purifikasi dari amplifikasi gen MC1R menggunakan PCR selanjutnya di *sequencing* menggunakan metode Sanger yang didasarkan pada pemasukan nukleotida termodifikasi secara acak. *Sequencing* dilakukan secara dua arah yaitu dengan menggunakan primer *forward* MC1R_1F'5ACAATGTCATCGACGTGCTC3' dan primer *reverse* MC1R_1R'5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3' dengan konsentrasi masing-masing 10 pmol untuk melihat sekuen MC1R pada 245 bp yang teramplifikasi

dengan menggunakan metode *dye terminator* Konsentrasi DNA produk PCR adalah 50 ng/μl. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin, dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs (Abdullah dkk 2011).

4.5.10 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendiskripsikan perbedaan DNA gen MC1R berdasarkan keberadaan pita spesifik sesuai target amplifikasi yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis kemudian disejajarkan menggunakan *software BioEdit* dan BLAST NCBI dan dianalisis secara deskriptif berdasarkan perbedaan sekuens gen MC1R pada Sapi Jaliteng jantan dan Sapi Jaliteng betina .



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi DNA sampel darah Sapi Jaliteng, Sapi Bali, dan Banteng Jawa

Isolasi DNA dari sampel darah Sapi Jaliteng, Sapi Bali, dan Banteng Jawa menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit*. Konsentrasi DNA diukur menggunakan alat *Implen Nanophotometer® Pearl* pada panjang gelombang 260/280 nm. Hasil isolasi DNA berdasarkan nilai konsenentrasi dan kemurnian pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Darah

No	Nama	Umur	Simbol	Kemurnian (Absorbansi 260/280)	Konsentrasi (ng/μL)
1.	Matos (Banteng)	Dewasa	B	1,29	78,52
2.	Nia (Sapi Bali)	Dewasa	SB	0,96	20,11
3.	Naruto (Jaliteng)	Dewasa	SJ1	1,14	9,14
4.	Safitri (Jaliteng)	Dewasa	SJ2	0,89	24,94
5.	Karyo (Jaliteng)	Anak	SJ3	1,58	14,26
6.	Tersia (Jaliteng)	Anak	SJ4	0,97	28,54
7.	Saga (Jaliteng)	Anak	SJ5	1,09	13,57
8.	Sondang (Jaliteng)	Anak	SJ6	0,97	11,39

Hasil konsentrasi yang diperoleh dari uji kuantitas pada sampel yang didapatkan bahwa semua sampel yang diujikan mengalami kontaminasi. Hasil isolasi DNA murni apabila nilai absorbansi 260/280 yaitu 1,8 – 2,0 (Sambrook and Russell, 2001). Sementara konsentrasi DNA pada sampel B, SB, SJ1, SJ2, SJ3, SJ4, SJ5, SJ6 menunjukkan tingkat kemurnian di bawah 1,8, hal ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya kontaminasi oleh protein. Menurut

Santella (2006), nilai absorbansi pada panjang gelombang 260/280 yang lebih besar dari 2,0 menunjukkan kontaminasi RNA, sedangkan rasio di bawah 1,8 menunjukkan masih terdapat kontaminasi protein. Menurut Chen and Janes (2002) Konsentrasi DNA yang rendah pada hasil isolasi tidak mempengaruhi amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR tetap dapat dilakukan menggunakan sampel dengan tingkat kemurnian DNA yang rendah, proses amplifikasi dapat terlaksana setidaknya terdapat satu untai DNA target yang sempurna, kontaminan di dalam hasil isolasi tidak mampu menghambat aktivitas enzim polymerase.

5.2 Amplifikasi Gen MC1R dengan Metode PCR

Amplifikasi gen MC1R dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan sekuen DNA. Amplifikasi gen MC1R dilakukan dengan alat *Thermocycler SensoQuest GmbH* dengan program PCR yang ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. Program PCR menggunakan sepasang primer berdasarkan desain primer yang didapatkan dari *Genebank* NCBI dengan *Reference Sequence*: XM_019979538.1 dapat dilihat pada **Tabel 5.3**. Adapun susunan nukleotida gen MC1R pada (**Gambar 5.1**).

Produk PCR ini kemudian diuji kualitas dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose 2% dan *marker* 100 bp DNA *Ladder* bertegangan 100 V selama 30 menit. Visualisasi produk PCR dilakukan dengan sinar UV (Ultraviolet) dan didokumentasikan menggunakan kamera (**Gambar 5.2**).

Tabel 5.2 Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen MC1R

Kondisi	Suhu	Waktu
Pradenaturasi	94°C	2 menit
Denaturasi	94°C	30 detik
Annealing	50,1°C	30 detik
Ekstensi	72°C	1 menit
Post Ekstensi	72°C	7 menit

Tabel 5.3 Susunan oligo nukleotida primer gen MC1R

Primer	Oligo Nukelutida
Forward (MC1R_F)	'5ACAATGTCATCGACGTGCTCA3'
Reverse (MC1R_R)	'5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3'

ORIGIN

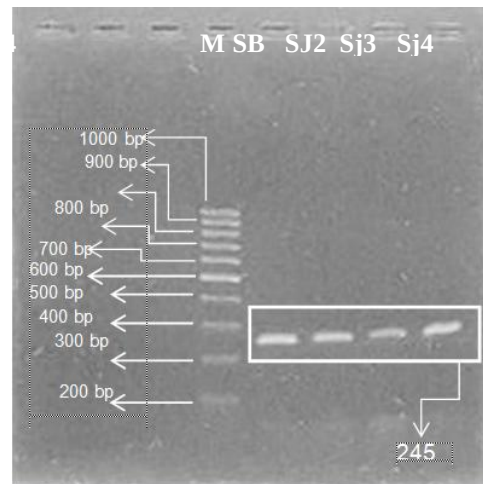
```

1 ctgcagcccg gcacacgccc atcatgtggtc cgccctcagg aggagggact ccgtgacgac
61 tttaaagatg ccaaggaagg ctctgtttct cctggacctc agcctaccgc ggcccggtaa
121 ggcaggaggt cccacacagga caggaggagg caagcgggcc agaaatgtct gcctgtgggc
181 aacgcacat ccagggaaga ggtggggagg cggactgaga acagaagagc gaagccgcgc
241 ccagagggct ggccccacaa gcttggggcc atgcctgggc cgacatttgt ccagccaggg
301 aggggaggtg tgaggccctt cccaggggag ccatgagttg agcaggaccc tgagagcaag
361 cacccttcc tgctccctgc gggacgatgc ctgcacttgg ctcccagagg cggctgctgg
421 gttcccttaa ctgcacgccc ccagccaccc tccccttcac cctggccccc aaccggacgg
481 ggccccagt cctggaggtg tccatccctg acgggtcttt tctcagcctg gggctggtga
541 gtctcgtgga gaacgtgctg gtagtggtg ccattgcca gaaccgcaac ctgcactccc
601 ccatgtacta ctttatctgc tgccctggctg tgtctgactt gctgggtgagc gtcagcaacg
661 tgctggagac ggcagtcagt ctgctgctgg aggcgggtgt cctggccacc caggcggccg
721 tgggtgcagc gctggacaat gtcacgacg tgctcactg cggatccatg gtgtccagcc
781 cctgcttccg ggggtgccatt gctgtggacc gctacatctc catcttctac gccctgctgt
841 accacagtgt tgtgacactg ccccgagcgt ggaggatcat tgcggccatc tgggtggccc
901 gcatcctcac cagcctgctc ttcacacgt actacaacca caaggtcctc ctgctgtacc
961 cgttgggtt cttcatagct atgctggccc tgatggcgt cctctacgtc cacatgctgg
1021 cccgggctg ccagcatgcc cggggcatcg cccggtcca gaagaggcag cggccattc
1081 atcagggtt tggcctcaag ggcgtgcca ccctcaccat cctgctgggc gtcttcttcc
1141 tctgctggg ccccttcttc ctgcacctct cgtcatcgt cctctgccc cagcacccca
1201 cctctgagc catcttcaag aacttcaagg tcttcttacc cctcatcatt tgaagagcca

```

Gambar 5.1 Origin Oligo Nukelutida Gen MC1R

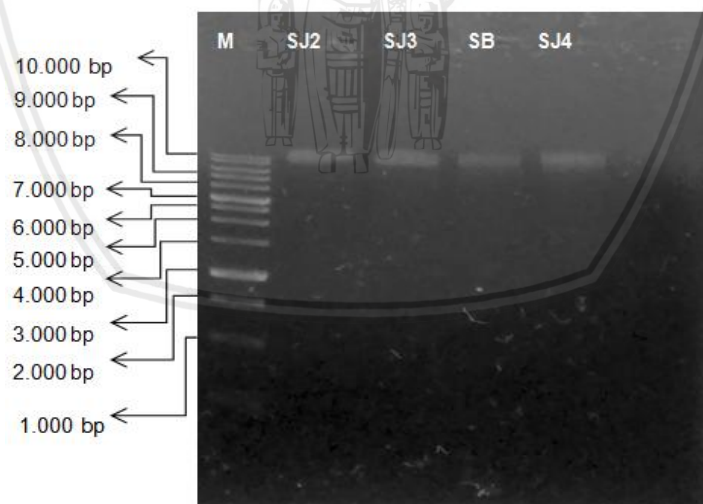
Keterangan: Warna merah: Primer *forward* MC1R
 Warna biru: Primer *reverse* MC1R
 Warna hitam: *Region of interest*



Gambar 5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR

Keterangan: M: Marker 100 bp;; SB: Nia; (F1); SJ2: Safitri (F1);
SJ3: Karyo (F1); SJ4: Teresia (F1)

Hasil PCR ini kemudian digunakan untuk sekuen gen MC1R. Verifikasi hasil purifikasi produk DNA dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260/280 nm dan elektroforesis pada gel agarose 2% didapatkan pita DNA total dengan ukuran fragmen >10.000 bp yang dapat dilihat (**Gambar 5.3**).



Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Purifikasi Produk
PCR

Keterangan: M: Marker 1000bp; SB: Nia; SJ2: Safitri; SJ3: Karyo;
SJ4: Teresia

Hasil yang di peroleh dari purifikasi produk PCR (**Tabel 5.4**), sampel SJ2 menunjukkan konsentrasi DNA sebanyak 135,6069 ng/ μ L dengan angka kemurnian 1,6714. Sampel SJ3 menunjukkan konsentrasi DNA sebanyak 149,5327 ng/ μ L dengan angka kemurnian 1,5387. Sampel SB menunjukkan konsentrasi DNA 115,6492ng/ μ L dengan kemurnian 1,5518. Menurut Brescia (2012) Nilai kemurnian 1,7 dapat diterima dan dikatakan murni. Nilai absorbansi 1,7 pada rasio 260/280 menunjukkan DNA yang murni walaupun masih ada kontaminasi fenol atau protein dengan nilai kontaminasi yang sangat kecil yaitu 0,2-0,3 % .Sampel SJ1, SJ4, SJ5, SJ6, dan B menunjukkan kemurnian yang lebih rendah di dibandingkan dengan sampel SJ2, SJ3, dan SB, sehingga sampel tersebut digunakan untuk proses sekuen DNA.

Tabel 5.4 Konsentrasi dan Kemurnian Purifikasi Produk PCR

No	Nama	Umur	Simbol	Kemurnian (Absorbansi 260/280)	Konsentrasi (ng/ μ L)
1.	Matos (Banteng)		SJ1	1,4860	91,6551
2.	Nia (Sapi Bali)		SJ2	1,6714	135,6069*
3.	Naruto (Jaliteng)		SJ3	1,5387	149,5327*
4.	Safitri (Jaliteng)		SJ4	1,3631	102,9467
5.	Karyo (Jaliteng)		SJ5	1,6476	152,8367
6.	Tersia (Jaliteng)		SJ6	1,5788	109,5298
7.	Saga (Jaliteng)		SB	1,5518	115,6492*
8.	Sondang (Jaliteng)		B	1,6560	101,6247

Keterangan: *sampel yang disekuen

Hasil visualisasi gel agarose elektroforesis 2 % pada produk PCR menunjukkan pita dengan ukuran fragmen 245 bp, tidak adanya visualisasi pita lain selain 245 bp hasil uji kualitas yang dilakukan membuktikan bahwa gen MC1R yang diamplifikasi telah spesifik sesuai dengan target gen primer MC1R_F dan MC1R_R. Produk PCR yang sudah spesifik seperti pada **Gambar 5.3** sudah dapat dilakukan sekuensing.

5.3 Sekuen Gen MC1R (*Melanocortin-1 Receptor*)

Penelitian ini menggunakan hasil sekuen gen dari MC1R (*Melanocortin-1 Receptor*) dengan memilih sampel hasil purifikasi produk PCR berdasarkan uji kuantitas dan kualitas. Sampel yang digunakan adalah SJ2, SJ3, dan SB (**Tabel 5.4**). Sekuen dilakukan dengan metode *dideoksi Sanger* menggunakan *Automatic DNA Sequencer* yang berdasarkan pada metode *dye terminator labelling*. Pembacaan hasil sekuen menggunakan *software* BioEdit 7.2.6 yang dapat dilihat pada **Lampiran 7**.

Hasil sekuen DNA berupa grafik elektroferogram yang menunjukkan basa-basa dan data berupa fasta yaitu urutan basa-basa hasil sekuen dapat dilihat pada **Lampiran 8**. Sekuen MC1R sampel SJ2, SJ3, dan SB disejajarkan dengan *database* GenbankNCBI XM_019979538.1 Urutan hasil sekuen menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 736 sampai 980. Penyejajaran tersebut menunjukkan adanya fragmen basa nukleotida yang memiliki kesamaan dengan basanukleotida (*conserved region*) *database*.. Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen basa nukleotida yang memiliki kesamaan basa nukleotida terhadap *database* NCBI (daerah *conserved*). Daerah *conserved* merupakan suatu daerah sekuen basa nukleotida yang mengalami sedikit perubahan atau mutase

pada segmen DNA yang disejajarkan (Jegga and Aronow, 2006). Hasil Blast sampel SJ2, SJ3, dan SB memiliki *query coverage* yang baik, yaitu SJ2 93% serta SJ3, dan SB(94%) dan *ident* 99% untuk sampel SJ2, SJ3, dan SB. Hasil tersebut membuktikan bahwa sampel memiliki kemiripan yang identik dengan DNA target yang diinginkan. Menurut NCBI News (2006) *query cover* adalah persentase dari panjang segmen DNA yang disejajarkan dengan urutan subjek yang sama. **Lampiran 9.**

5.4 Analisa Sekuen DNA dan Asam Amino GenMC1R

Berdasarkan *Alignment* sekuen DNA terhadap referensi yang sama yaitu gen MC1RBos *Indicus XM_019979538.1*, penyejajaran dilakukan menggunakan *software* Bioedit versi 7.2.6. Urutan target sekuen dapat sejajar dimulai pada 748 bp sampai 964 bp dengan total target gen yaitu 245 bp

	
	710 720 730 740 750
Bos Indicus	CTGGAGGCCG GTGTCCTGGC CACCCAGGCG GCCGTGGTGC AGCAGCTGGA
SJ3-R JANTA	~~~~~ TTA
SB-R BETIN	~~~~~ TTA
SJ2-R BETIN	~~~~~ TTA
	
	760 770 780 790 800
Bos Indicus	CAATGTCAT - CGACGTGCTC ATCTGCGGAT CCATGGTGTC CAGCCTCTGC
SJ3-R JANTA	CAATGTCAT T CGACGTGCTC ATATGCGGAT CCATGGTGTC CAGCCTCTGC
SB-R BETIN	CAATGTCAT T CGACGTGCTC ATATGCGGAT CCATGGTGTC CAGCCTCTGC
SJ2-R BETIN	CAATGTCAT - CGACGTGCTC ATATGCGGAT CCATGGTGTC CAGCCTCTGC
	
	810 820 830 840 850
Bos Indicus	TTCCTGGGTG CGACGTGCTC GGACCGCTAC ATCTCCATCT TCTACGCCCT
SJ3-R JANTA	TTCCTGGGTG CGACGTGCTC GGACCGCTAC ATCTCCATCT TCTACGCCCT
SB-R BETIN	TTCCTGGGTG CGACGTGCTC GGACCGCTAC ATCTCCATCT TCTACGCCCT
SJ2-R BETIN	TTCCTGGGTG CGACGTGCTC GGACCGCTAC ATCTCCATCT TCTACGCCCT

					
	860	870	880	890	900
Bos Indicus	GCGGTACCAC	AGTGTGTGTA	CACTGCCCCG	AGCGTGGAGG	ATCATTGCGG
SJ3-R JANTA	GCGGTACCAC	AGTGTGTGTA	CACTGCCCCG	AGCGTGGAGG	ATCATTGCGG
SJ2-R BETIN	GCGGTACCAC	AGTGTGTGTA	CACTGCCCCG	AGCGTGGAGG	ATCATTGCGG
SB-R BETIN	GCGGTACCAC	AGTGTGTGTA	CACTGCCCCG	AGCGTGGAGG	ATCATTGCGG
					
	910	920	930	940	950
Bos Indicus	CCATCTGGGT	GGCCAGCATC	CTCACCACCC	TGCTCTTCAT	CACCTACTAC
SJ3-R JANTA	CCATCTGGGT	GGCCAGCATC	CTCACCACCC	TGCTCTTCAT	CACCTACTAC
SJ2-R BETIN	CCATCTGGGT	GGCCAGCATC	CTCACCACCC	TGCTCTTCAT	CACCTACTAC
SB-R BETIN	CCATCTGGGT	GGCCAGCATC	CTCACCACCC	TGCTCTTCAT	CACCTACTAC
					
	960	970	980	990	1000
Bos Indicus	AACCACAAGG	TCATCCTGCT	GTGCCTCGTT	GGCCTCTTCA	TAGCTATGCT
SJ3-R JANTA	ATCCACAGCT	TCAC~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
SJ2-R BETIN	AACCACTACT	ACAC~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
SB-R BETIN	AACCACT-CG	TGAT~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

Gambar 5.4Penyejajaran Antara Sekuen DNA SJ3SJ2,SBterhadap Gen MC1R

Keterangan : SJ2 = Sapi Jaliteng (Betina)
SB= Sapi Bali(Betina)
SJ3 = Sapi Jalieng (Jantan)

Hasil sekuensing ke-3 sampel menghasilkan 245 bp dan ditemukan beberapa perbedaan sekuen DNA. Hasil sekuensing menunjukkan terjadi mutasi transisi dan transversi pada ke-3 sampel sekuen, mutasi insersi pada sampel SJ2dan SJ3, dan mutasi delesi pada sampel SJ2, SB dan SJ3. Mutasi transisi dapat terjadi apabila basa pirimidin pada rantai nukleotida DNA diganti oleh basa pirimidin yang lain, atau basa purin yang satudiganti dengan basa purin yang lain. Timin (T) dapat diganti oleh basa sitosin (C), atau sebaliknya. Basa purin adenin (A) dapat diganti oleh basa guanin (G), atau sebaliknya (Arruji, 2014).

Hasil Penjajaran sekuen ke tiga sampel mengalami perubahan gen / mutasi gen. Mutasi yang terjadi diantaranya adalah tranversi, transisi, delesi, dan insersi. Setiap sampel memiliki rasio mutasi yang berbeda-beda. Deskripsi adanya mutasi tiap sampel dapat dilihat pada **(Tabel 5.5)**

Tabel 5.5 Deskripsi mutasi tiap sampel

No	Kode Sampel	Jenis Mutasi/ Basa ke-	Total mutasi	Hasil Skuensing
1.	SJ3	748 Transversi	Tranversi 71,4 % Delesi 0,07 % Transisi 0,07 %	G > T
		749 Transversi		G > T
		937 Delesi		T > -
		952 Transversi		A > T
		958 Transisi		A > G
		959 Transversi		G > C
		960 Transversi		G > T
2.	SJ2	748 Transversi	Transversi 83,3 % Transisi 0,06 %	G > T
		749 Transversi		G > T
		957 Transisi		A > T
		959 Transversi		G > C
		960 Transversi		G > T
		961 Transversi		T > A
3.	SB	748 Transversi	Transversi 57,1 % Transisi 28,5 % Inversi 0,07 %	G > T
		749 Transversi		G > T
		760 Inversi		- > T
		957 Transisi		A > T
		959 Transversi		G > C
		962 Transversi		C > G
		964 Transisi		C > T

Perbedaan terletak pada sampel SJ2, SJ3, dan SB (**Gambar 5.4**) dimana pada sekuen ke-749 terjadi mutasi transversi yaitu pergantian basa guanine menjadi timin (c.749G>T), selanjutnya pada sekuen ke-760 terjadi mutasi insersi basa timin pada sampel SJ2 dan SJ3, selanjutnya pada sampel SJ2, SJ3, dan SB sekuen pada ke-773 terjadi mutasi transversi yaitu pergantian basa sitosin (C) menjadi

adenine (A) (c.773C>A) pada sampel SJ2, SJ3, dan SBselanjutnya pada sekuen ke-952 terjadi mutasi transversi yaitu pergantian basa adenin (A) menjadi basa timin (T) pada sampel JD (c.952A>T), selanjutnya pada sekuen ke- 957 terjadi mutasi trasnversi yaitu pergantian basa adenine (A) menjadi timin (T) pada sampel SJ2dan SB(c.957A>T), selanjutnya terjadi mutasi transisi pada sekuen ke-957 yaitu perubahan dari basa adenine (A) menjadi basa Timin (T) (c.957A>T) pada sampel BD dan JA, selanjutnya terjadi mutasi transisi pada sekuen ke-958 yaitu perubahan dari basa adenine (A) menjadi basa guanine (G) (c.958A>G), selanjutnya terjadi mutasi trasnversi pada sekuen 959 yaitu perubahan dari basa guanine (G) menjadibasitosin(C)(c.959G>C)padasampelSJ2, SJ3, dan SBselanjutya terjadi mutasi trasnversi pada sekuen ke-960 yaitu perubahan dari basa guanine (G) menjadi timin (T) (c.960G>T) pada sampel SJ2 dan SJ3, selanjutnya terjadi mutasi transversi pada sekuen ke-961 yaitu perubahan dari basa timin (T) menjadi basa adenine (A) (c.961T>A) pada sampel SJ2, selanjutnya terjadi mutasi transversi pada sekuen ke- 962 dari basa sitosin (C) menjadi basa guanine (G) (c.962C>G) pada sampel SB, dan selanjutnya terjadi mutasi transisi pada sekuen ke-964 dari basa timin (C) mnjadi basa sitosin (T) (c.964C>T) pada sampel SB.

Trasnversi adalah perubahan yang terjadi antara pirimidin yang digantikan oleh purin atau sebaliknya (Aisah dkk., 2015). Delesi merupakan hilangnya basa nitrogen pada daerah tertentu, sedangkan insersi atau nama lainnya adisi merupakan bertambahnya basa nitrogen pada daerah tertentu.

	
	110 120 130 140 150
Bos Indicus	LEAGVLTQA AVVQQLDNVI DVLICGSMVS SLCFLGAIAV DRYISIFYAL
Sj3 JANTA	~~~~~XYNVI DVLICGSMVS SLCFLGAIAV DRYISIFYAL
Sj2 BETIN	~~~~~XYNVI DVLICGSMVS SLCFLGAIAV DRYISIFYAL
SB BETIN	~~~~~XYNVI DVLICGSMVS SLCFLGAIAV DRYISIFYAL

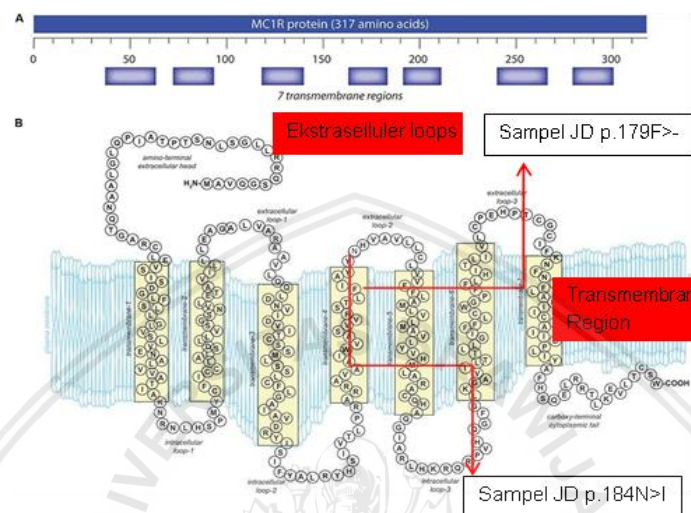
	
	160 170 180 190 200
Bos Indicus	RYHSVVTLP AWRIIAAIWV ASILTSLLFI TYYNHKVILL CLVGLFIAML
Sj3 JANTA	RYHSVVTLP AWRIIAAIWV ASILTSLLXI TYYIHXX~ ~~~~~
Sj2 BETIN	RYHSVVTLP AWRIIAAIWV ASILTSLLFI TYYNHX~ ~~~~~
SB BETIN	RYHSVVTLP AWRIIAAIWV ASILTSLLFI TYYNHX~ ~~~~~

Gambar 5.5 Penyejajaran Sekuen Asam Amino SJ3 , SJ2 dan SB terhadap Gen MC1R

Keterangan :SJ3 = Sapi Jaliteng (Jantan)
 SJ2 = Sapi Jaliteng (Betina)
 SB =Sapi Bali (Betina)

Hasil sekuen asam amino sampel SJ3 mengalami delesi asam amino phenylalanine (F) pada sekuen ke-179 yang terletak pada posisi *transmembrane region*. Susunan asam amino dibentuk oleh kodon DNA dari sampel yang telah dilakukan penyejajaran. Struktur asam amino gen MC1R dibentuk oleh tiga regional yaitu intracellular loops, transmembrane (TM) region, dan extracellular loops(**Gambar 5.5**). Desain struktur dua dimensi gen MC1R diperoleh dari Lightner (2008) dan disejajarkan dengan database UniProtKB Q864I7 (MSHR_TRAAU). Menurut Strader et al. (1994) dan Chandramohan (2015), intracellular loops dan transmembrane region pada struktur gen MC1R merupakan tempat berikatannya protein G yang dibutuhkan untuk ploriferasi, signaling dan pemrosesan awal pembentukan pigmentasi, dengan adanya daerah ini akan menghambat sintesis feomelanin sehingga terjadi sintesis melanin untuk melindungi dari radiasi sinar UV.Perubahan asam amino p.166A>T pada daerah transmembrane region menunjukkan adanya Loss of Function (LOF) dari kemampuan ligan dalam mensintesis eumelanin. Menurut Lightner (2008)

substitusi basa nukleotida yang mempengaruhi perubahan asam amino alanin (hidrofobik/non-polar) menjadi treonin (hidrofilik/polar) dapat mengubah struktur α -heliks pada transmembrane region gen MC1R. Hal tersebut dapat menghambat eumelanin sehingga gen MC1R akan memproduksi feomelanin..



Gambar 5.6 Struktur Asam Amino Pembentuk Gen MC1R (Sumber : Lightner, 2008)

Keterangan : Sampel SJ3 menunjukkan terjadinya delesi asam amino p179delF pada daerah *transmembrane region*. Sedangkan p.184N>I pada sampel JD mengalami perubahan asam amino pada area *extracelullerloops*

Struktur asam amino MC1R memiliki bagian integral membrane yaitu *intracellular loops*, *transmembrane region*, dan *extreacelullar loops*. (**Gambar 5.6**) yang tersusun dari 317 residu asam amino dengan struktur khas GPCR (*G-Protein Couple Receptor*) seperti antara lain; terminal N- bagian ekstra sel, tujuh fragmen transmembran (TM) dan terminal C-pada intra sel. Terminal-N ekstrasel sebagai sinyal peptide yang menangkap protein bebas ke dalam membrane RE (Retikulum Endoplasma). Lengkung ekstrasel (*extracellular loop*) pada MC1R lebih pendek dari terminal-N dan berhubungan dengan afinitas ikatan terhadap agonis. Lengkung intrasel (*Intracellular loop*) menyediakan tempat ikatan dengan

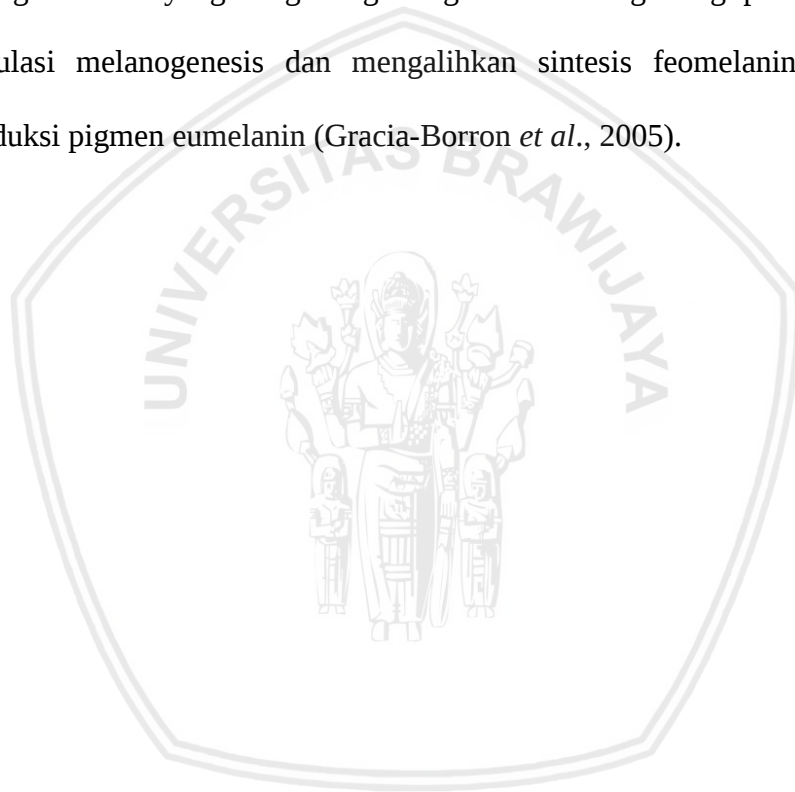
protein G dan menjaditargetfosforilasiyangdiperlukandalamregulasipemberisinyaldan fungsi internalisasi. Sebuah tripeptide kelas A terletak pada bagian antara transmembrane 3 (TM3) dan lengkung intrasel (il2) merupakan elemen kritis karena sering terjadi LOF (*loss of function*) (Pratama dkk., 2010).

5.5 Regulasi Gen MC1R terhadap Perbedaan Warna Rambut Jaliteng (Jawa Bali Banteng) jantan dan Jaliteng (Jawa Bali Banteng) betina

Perubahan susunan asam amino yang terjadi karena delesi pada sampel SJ3 p.179delF pada Sapi Jaliteng jantan yang memiliki warna rambut gelap diprediksi memiliki peran dalam pembentukan pigmentasi warna rambut dan kulit menjadi lebih gelap. Hal tersebut dikarenakan asam amino phenylalanine memiliki peran untuk menghambat sintesis pigmen melanin dengan terbentuknya phenylketonuria (PKU). PKU secara khas menunjukkan beragam kelainan neurologis dan pigmentasi seperti penurunan pigmentasi warna rambut dan kulit menjadi lebih gelap. Manifestasi PKU disebabkan tingginya phenylalanine dan rendahnya konsentrasi tyrosine di dalam individu tersebut. Phenylalanine juga menghambat aktivitas tyrosinase mamalia dan mengurangi *uptake* tyrosin pada sel dan jaringan. Individu Sapi Jaliteng yang memiliki warna rambut lebih gelap daripada Sapi Jaliteng betina dan api bali betina tidakmemiliki phenylalanine karena terjadi delesi pada asam amino tersebut (p.179delF) pada area *transmembrane region* ke-4 MC1R, sehingga Sapi Jaliteng Jantan tidak memiliki asam amino phenylalanine yang dapat menghambat pembentukan sintesis pembentukan melanin, sementara Sapi Jaliteng betina dan Sapi Bali memiliki asam amino phenylalanine yang dapatmenghambatsintesis melanin sehingga

memiliki warna rambut lebih terang daripada Banteng Jawa jantan dewasa.

Gen MC1R akan meregulasi melanosit untuk membentuk pigmen melanin kemudian melanin akan membentuk dua tipe pigmen warna yaitu eumelanin dan feomelanin (Genetic Home Reference, 2007). Gen MC1R merupakan anggota dari superfamili G-protein-coupled receptor yang diekspresikan di membran sel melanosit kulit atau folikel rambut. Aktivasi MC1R melalui α -melanocyte stimulating hormon yang bergabung dengan cAMP signaling pathway untuk menstimulasi melanogenesis dan mengalihkan sintesis feomelanin untuk memproduksi pigmen eumelanin (Gracia-Borron *et al.*, 2005).



BAB VIPENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Gen MC1R antara Sapi Jaliteng (Sapi Jawa Bali Banteng) gelap dan Betina dewasa berbeda. Hasil sekuensing menunjukkan terjadi mutasi transisi dan transversi pada sampel SJ2, SB dan SJ3.
2. Sapi Jaliteng jantan berambut gelap (SJ3) dengan Sapi jaliteng betina (SJ2) dan Sapi Bali Dewasa (SB) terdapat mutasi gen delesi pada sekuen ke 937 yakni hilangnya basa nukleotida T c.937delT sehingga menyebabkan perubahan susunan asam amino menjadi delesi asam amino phenylalanin (F) p.179delF pada sampel SJ3 (Sapi Jawa bali Banteng Jantan).
3. Sapi Jaliteng jantan (SJ3) memiliki warna rambut lebih gelap dari pada Sapi Jaliteng betina (SJ2) dan Sapi Bali betina (SB) karena phenylalanin mampu menghambat pigmentasi melanin pada gen MC1R.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan tentang perbedaan warna rambut Sapi Jaliteng (Jawa Bali Banteng) dengan menggunakan primer yang berbeda yang bertanggung jawab untuk produksi melanin dan sekuensing DNA secara keseluruhan populasi Jaliteng di Taman Safari Indonesia 2, Prigen untuk melihat sifat polimorfik antar individu serta penelitian lanjutan tentang pengaruh sinar Ultra-Violet terhadap warna rambut Jaliteng (Sapi Jawa Bali Banteng).

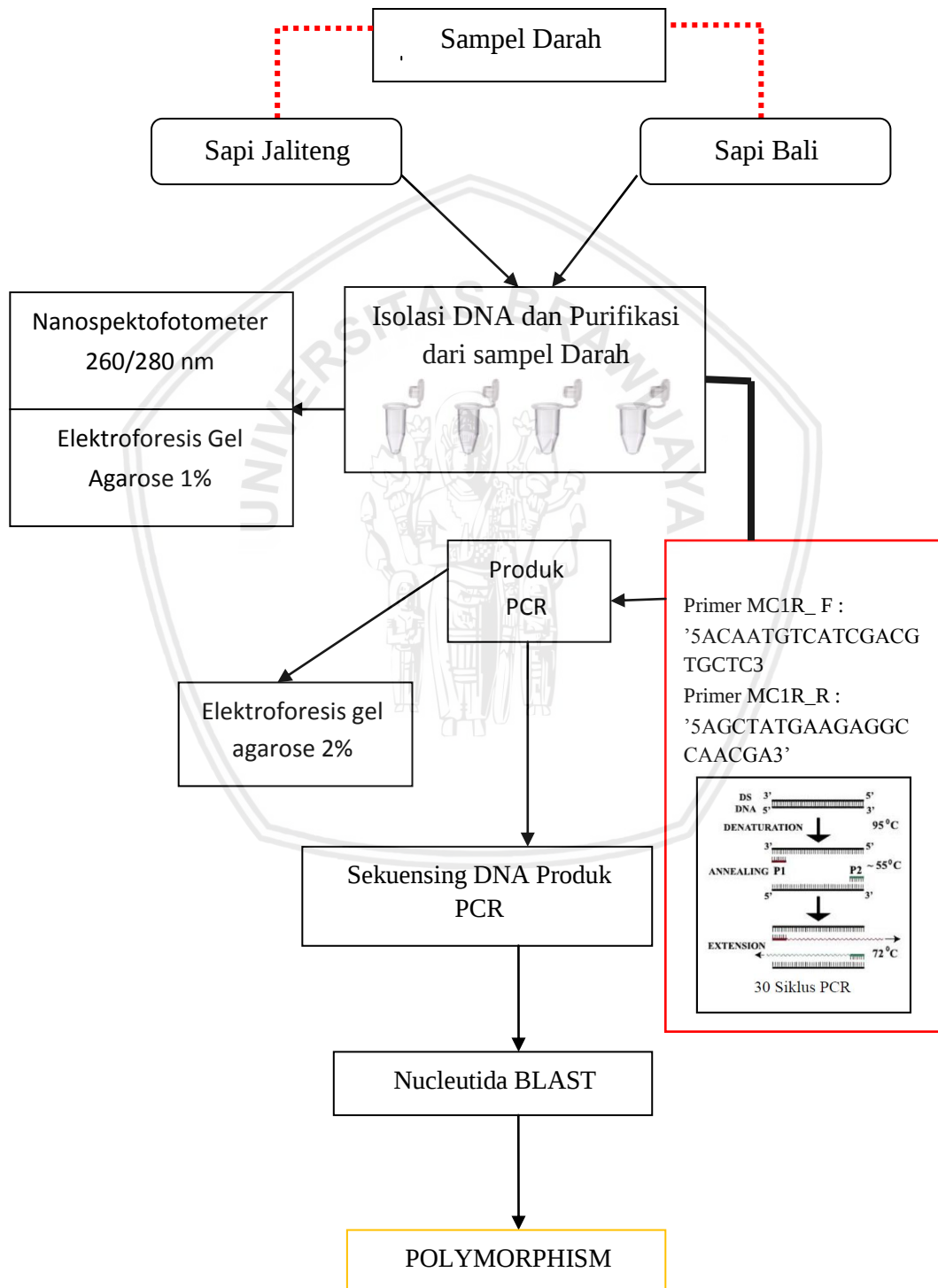
DAFTAR PUSTAKA

- Brescia, P. 2012. *Micro-Volume Purity Assessment of Nucleic Acids using A260/A280 Ratio and Spectral Scanning*. BioTek Instruments, Inc.
- Chandramohan, B., C. Renieri, V. L. Manna, and A. L. Terza. 2015 The Alpaca Melanocortin 1 Receptor: Gene Mutations, Transcripts, and Relative Levels of Expression in Ventral Skin Biopsies. *Scientific World Journal*. Vol: 2015
- Chen, B. Y. and H. W. Janes. 2002. *Methods in Biomolecular Biology: PCR Cloning Protocol 2nd Ed*. Rutgers University. New Jersey.
- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2011. *BiologiMolekular: Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. Jakarta
- Feati.2011.Teknologi Penggemukan Sapi Bali. BPPT NTB. Mataram
- Garcia-Barron, J. C., B. L. Sanchez-Laorden, and C. Jimenez-Cervantes. 2005. *Melanocortin-1 receptor Structure and Functional Regulation*. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain. Pigment cell Ressober Indonesia. Jakarta.
- Genetic Home Reference. 2007. Melanocortin-1 Receptor (MC1R). <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MC1R>>. [16 juni 2016]
- Guntoro, S. 2004. *Membudidayakan Sapi Bali*. Kanisius. Yogyakarta
- Husna, A.D. 2008. *Aplikasi Sistem Informasi Geografis untuk Pemetaan Kesesuaian Habitat Banteng (Bos javanicus) di Taman Nasional Ujung Kulon (Studi Kasus Padang Penggembalan Cidaon)*. Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor.
- Indrawan, M., R. B. Primack dan J. Supriatna. 2007. *Biologi Konservasi*. Yayasan Klug, W. S. and W. R. Cummings. 2003. *Concep of Genetic*. 7th ed. Prentice Hall
- Johnson, D dan S. Setaro, . 2013. *How Is Coat Color Controlled in Dogs?* <<https://www.adapaproject.org/doggenetics/tikiindex.php?page=Gene+and+Allele+Summary%3A+Coat+Colors>>[Diakses tanggal 17 November 2017]
- Lightner, J. K. 2008. Genetics of Coat Color I: The Melanocortin 1 Receptor (MC1R). *Answers Research Journal* 1:109–116

- Nasti, T. H. and L. Timares. 2015. MC1R, Eumelanin and Pheomelanin: Their Role in Determining the Susceptibility to Skin Cancer. *Photochemistry and Photobiology*. 91: 188–200
- Payne, W.J.A. and D.H.L. Rollinson. 1973. Bali cattle. *World Anim. Rev.* 7: 13-21
Pearson Education Inc. Upper Saddle River
- Pudyatmoko S. 2004. *Does the Banteng (Bos javanicus) have a future in Java? Challenges of the Conservation of a Large Behaviour in a Deserly Populated Island*. In: Knowledge Markeplace Reports, The 3rd IUCN World Conservation Congress, Bangkok, Thailand
- Purwantara B, RR Noor , G Andersson , and H Rodriguez-Martinez . 2012. Banteng and Bali Cattle in Indonesia: Status and Forecasts. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 1), 2– 6
- Santella, R. M. 2006. Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genom Amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 15:185-187.
- Sambrook J. and D. W. Russel. 2001. *Molecular Cloning* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sinaga, R. R. Wangko, M.MKaseke,. 2012. *Peran Melanosit Pada Proses Uban*. Jurnal Biomedik. Volume 4. Nomor 3. Hlm. 4-12
- Star, C. and Taggart. 2004. *Biology: The Unity and Diversity of Life*. 10th ed. BrooksCole-Thomson Learning. Belmont
- Strader, C.D., T.M. Fong, M. R. Tota, and D. Underwood. 1994. Structure and function of G-protein coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 101-132
- Suryanto,D. 2003. Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler. Program Studi Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara. ©2003 Digitized By Usu Digital Library.
- Suryaningsih, B.R danH. Soebono,. 2016. *Biologi Melanosit*. Jurnal Biologi. Vol. 43. No.2 Tahun 2016: 78 – 82
- Suzana, M.,M. A Nur Nadia., I. Zahariah., K. H. Chua., A. M. Y. Yasmin., Z.W. NWan. 2009. Melanogenesis Inhibition by Palm Tocotrienol Rich Fraction in Cellular Ageing. *J. Med. Health*. 4 (1): 25-34.
- Wibisono, A.W. 2010. Sapi Bali. <http://duniasapi.com/id/edufarming/43-sapi-bali.html>[19 Februari 2016].



Lampiran 1. Kerangka Operasional Penelitian



Lampiran 2 . Protokol Isolasi DNA *DNeasy Blood and Tissue Kit*

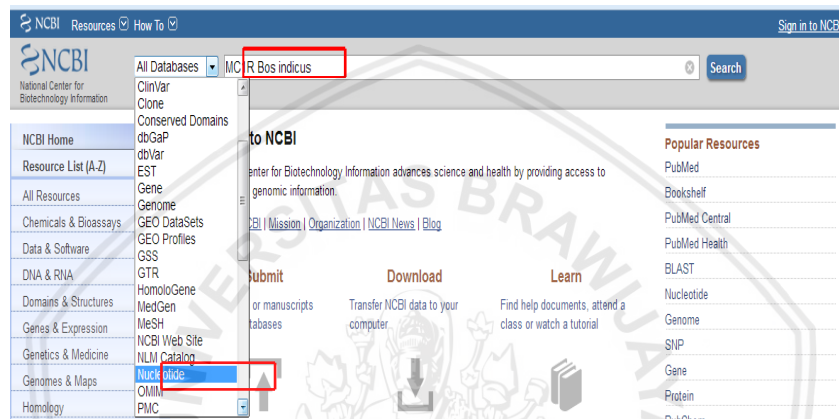
Sampel		
	- Dimasukkan ke dalam <i>microcentrifuge tube</i> 1,5 ml - Ditambahkan 180 µL bufer ATL - Ditambahkan 20 µL proteinase K, Divortex - Diinkubasi pada suhu 56°C hingga sampel lisis (divortex secara berkala) - Divortex 15 detik sebelum masuk ke langkah berikutnya	Langkah 1
	- Ditambahkan bufer AL 200 µL - Dicampur (divortex) - Diinkubasi sampel pada suhu 56°C selama 10 menit	Langkah 2
	- Ditambahkan ethanol (96-100%) 200 µL - Dicampur (divortex)	Langkah 3
	- Dipipet campuran ke dalam DNeasy Mini spin column pada 2 ml <i>collection tube</i> - Disentrifus (8000 rpm) selama 1 menit - Dibuang <i>flow-through</i> dan <i>collection tube</i>	Langkah 4
	- Dipindah spin column ke dalam <i>collection tube</i> 2 ml baru - Disentrifus (8000 rpm) selama 1 menit - Dibuang <i>flow-through</i> dan <i>collection tube</i>	Langkah 5
	- Dipindah spin column ke dalam <i>collection tube</i> 2 ml baru - Ditambah 500 µl bufer AW2 - Disentrifus (14000 rpm) selama 3 menit - Dibuang <i>flow-through</i> dan <i>collection tube</i>	Langkah 6
	- Ditransfer spin column ke dalam <i>microcentrifuge tube</i> 1,5/2 mL	Langkah 7
	- Ditambahkan 200 µL bufer AE ke tengah membran spin column - Diinkubasi selama satu menit pada suhu	Langkah 7

- ruang (15-25°C)
- Disentrifus selama 1 menit pada 8000 rpm

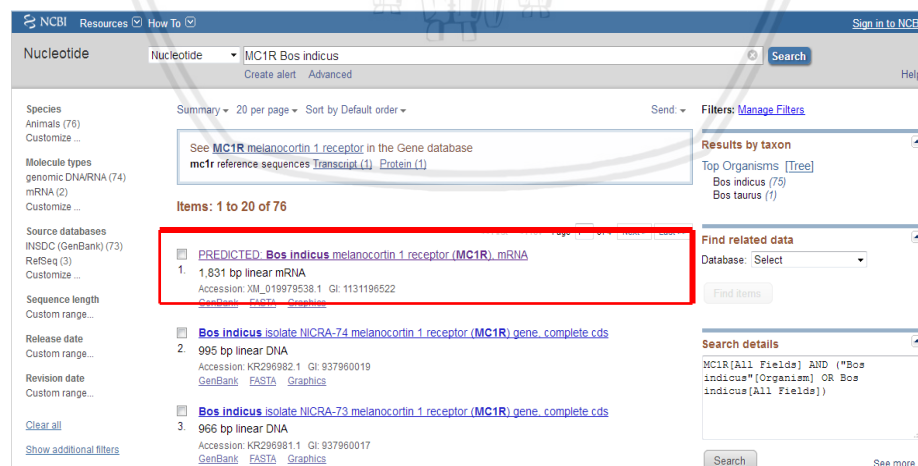
Hasil

Lampiran 3. Desain Primer PCR

1. Dibuka laman *website* NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hingga muncul tampilan berikut



2. Pada kotak pilihan *search*, dipilih *Nucleotide* dengan kata kunci MC1R *Trachypithecus*. Kemudian klik *search*
3. Maka akan muncul halaman seperti di bawah ini:



4. Dipilih kategori "*Linier DNA*"
5. Maka akan muncul halaman seperti di bawah ini:

GenBank

Predicted: Bos indicus melanocortin 1 receptor (MC1R), mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_019979538.1

FASTA Graphics

Go to: (v)

LOCUS	XM_019979538	1831 bp	mRNA	linear	MAM 12-JAN-2017
DEFINITION	PREDICTED: Bos indicus melanocortin 1 receptor (MC1R), mRNA.				
ACCESSION	XM_019979538				
VERSION	XM_019979538.1				

6. Dipilih dan diklik pilihan “*FASTA*”
7. Maka akan muncul halaman seperti di bawah ini:

NCBI

Resources

How To

Tools

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

FASTA

Predicted: Bos indicus melanocortin 1 receptor (MC1R), mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_019979538.1

[GenBank](#)
[Graphics](#)

>XM_019979538.1 PREDICTED: Bos indicus melanocortin 1 receptor (MC1R), mRNA

CTGCAGCGCCGACACGCCCAATCATGTGGCCGCCCTCAGGAGGGAGGACTCGTGACGACTTTAAAGATG
CACAAGGAGGCTCTGTTCTCCCTGGACCTCAGCCTACCGCGGGCGGTGAAGCAGGAGGTTCCCAACAGGA
CAGGAGGAGGGCAAGCGGCCCAAGAAATGTCTGCCTGTGGGCAACCCGACATCCAGGGAAGAGTGGGGAGG
CGGACTGAGAACAGGAAGCGGAGCGCGGCCAGAGGGCTGGCCCCACAGGTTCGGCCCATGCTCTGGCC
CGACATTTGTGCAGCCAGGGGAGGGGAGTGTGAGGCCCTCTCCAGGGAGGCAATGATGTTCGAGCAGGACCG
TGAGAGCAAGCAACCGCTTCTGTGCTCTGGCGGAGCATGCTGCATCTTGGCTCCGACGCGGCGCTGTGG
TTGTGCTTAATCTCGAGCGCGGAGCGCAACCTCGCTTCACCATCGGCGGAGGAGCGGCGGACGAGTGG
TTGAGCGTGATCTGGTACCGGGTGTTCGAGCGGGGCTGTTCGAGCGGGTGTGGAGGCTCTGGAGAGCTGTG
GTAGTGGTGGCAATGGCCAGACCGCAACCTTCGACCGCCCATGATCTACTTTATCTCTGGCTGGCTG
TGTCTGACTTCTGGTGTGAGCGTCAACCACTGCTGGAGAGCGGCATCATGCTGTGCTGGAAGCGGGTGT
CTGTGCGACCCAGCGCGGCCGTGTGTGCAGCAGCTGACCAATGTTCATGACGTGCTCATCTCGGATCCATG
GTGTTCAGCCTCTGCTTCTCGGTTGCCATTCGTGTGGACCGCTACATCTCCATCTTCTACGCCCTCGGGT
ACCCAGTGTGTGTGACATGCCCGAGCGTGGAGGATCATTCGGCCCATCTGGTGCCGACATCTCTCAC

8. Dibuka *website primer3plus tool*
<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. Maka akan muncul *websiteBioinformatics Primer3Plus*. Sekuen DNA yang sudah di-copy, selanjutnya di-paste dengan mengklik*Paste source sequence below*.

[illegible]

9. Kemudian klik Pick Primer di kolom atas kanan yang berwarna hijau

10. Primer *forward* dan Primer *Reverse* telah didapatkan yaitu:
MC1R F 5ACAATGTCATCGACGTGCTC3

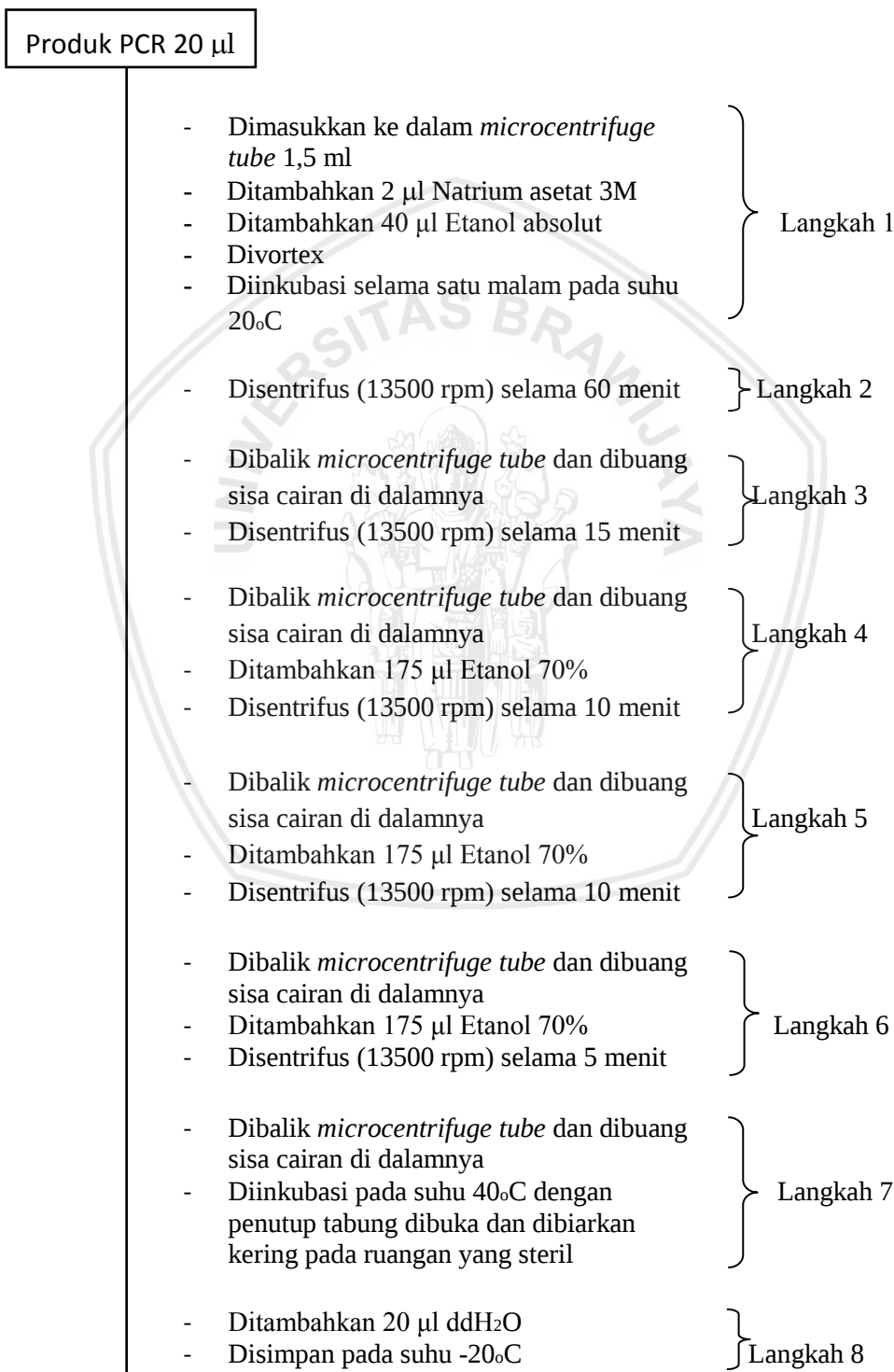
MC1R_R 5AGCTATGAAGAGGCCAACGA3

GC 50,0 %

Tm 60°C

Dengan panjang 20 bp menghasilkan produk/DNA target 245 bp

Lampiran 4. Protokol Purifikasi Produk PCR



Hasil

Lampiran 5. Hasil Uji Kuantitatif DNA

Report: DKA 110517		Test Type	Nucleic Acid		Date/Time		Page #		
Sample ID	User ID	Date	Time	ngul	A200	A260	Constant	Current Abs	340 Tm
1	Default	5/17/2017	11:00 PM	70.52	0.379	0.317	50.00	3.123	0.135
2	Default	5/17/2017	11:01 PM	20.11	0.452	0.416	50.00	1.879	0.077
3	Default	5/17/2017	11:01 PM	0.14	0.463	0.307	50.00	0.089	0.085
4	Default	5/17/2017	11:02 PM	24.94	0.405	0.345	50.00	2.129	0.417
5	Default	5/17/2017	11:03 PM	14.26	0.266	0.180	60.00	0.636	0.046
6	Default	5/17/2017	11:03 PM	20.54	0.671	0.587	50.00	5.110	0.664
7	Default	5/17/2017	11:04 PM	13.57	0.271	0.250	50.00	1.080	0.120
8	Default	5/17/2017	11:05 PM	11.30	0.226	0.234	50.00	1.073	0.052

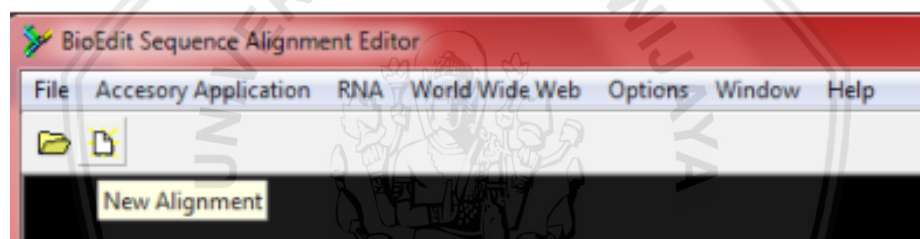
Lampiran 6. Hasil Uji Kuantitatif Purifikasi Produk PCR

SmartSpec (TM) Plus Report 19127 03/26/17 Operator: dsDNA conversion factor: 50.00 Sample #1 Wavelength Absorbance 200 nm 0.205 AU 280 nm 0.119 AU conc: 100.0409 ug/ml dilution factor: 10.0000 A260/A280: 1.6863 Path length: 1.00 cm background subtraction wavelength: none	SmartSpec (TM) Plus Report 19133 03/26/17 Operator: dsDNA conversion factor: 50.00 Sample #1 Wavelength Absorbance 200 nm 0.207 AU 280 nm 0.119 AU conc: 100.7307 ug/ml dilution factor: 10.0000 A260/A280: 1.7361 Path length: 1.00 cm background subtraction wavelength: none
SmartSpec (TM) Plus Report 19139 03/26/17 Operator: dsDNA conversion factor: 50.00 Sample #1 Wavelength Absorbance 200 nm 0.208 AU 280 nm 0.121 AU conc: 100.1003 ug/ml dilution factor: 10.0000 A260/A280: 1.6532 Path length: 1.00 cm background subtraction wavelength: none	SmartSpec (TM) Plus Report 19141 03/26/17 Operator: dsDNA conversion factor: 50.00 Sample #1 Wavelength Absorbance 200 nm 0.214 AU 280 nm 0.140 AU conc: 100.8390 ug/ml dilution factor: 10.0000 A260/A280: 1.5300 Path length: 1.00 cm background subtraction wavelength: none
SmartSpec (TM) Plus Report 19142 03/26/17 Operator: dsDNA conversion factor: 50.00 Sample #1 Wavelength Absorbance 200 nm 0.218 AU 280 nm 0.135 AU conc: 100.9809 ug/ml dilution factor: 10.0000 A260/A280: 1.6118 Path length: 1.00 cm background subtraction wavelength: none	SmartSpec (TM) Plus Report 19146 03/26/17 Operator: dsDNA conversion factor: 50.00 Sample #1 Wavelength Absorbance 200 nm 0.192 AU 280 nm 0.162 AU conc: 95.8624 ug/ml dilution factor: 10.0000 A260/A280: 1.8769 Path length: 1.00 cm background subtraction wavelength: none

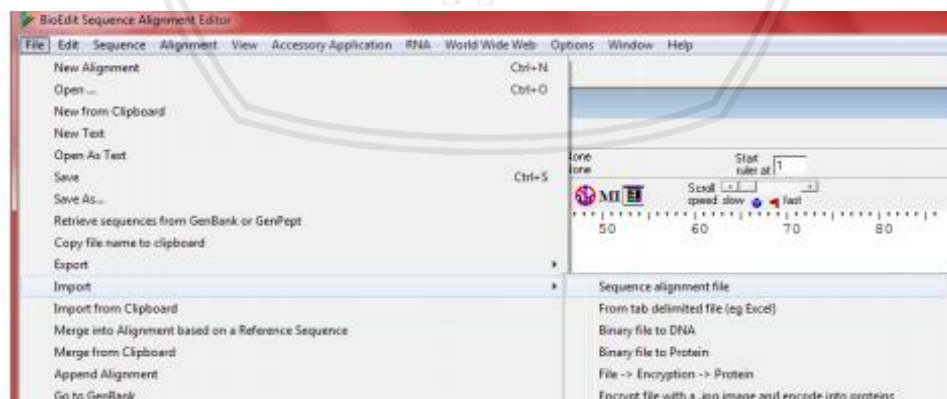


Lampiran 7. Pembacaan Hasil Sekuen Menggunakan Aplikasi Bioedit Sequence Alignment Editor versi 7.2.6

1. Buka aplikasi Bioedit hingga muncul tampilan berikut:



1. Pilih New Alignment atau File > New Alignment
2. Kemudian klik File > Import > Sequence Alignment



3. Pilih file yang sudah disalin fastanya berisi sekuen DNA serta database genbank, dan klik open



4. Pilih Tab Accessory Application > ClustalW Multiple Alignment

Lampiran 8. Grafik Elektroferogram



Lampiran 9. Hasil BLAST gen MC1R sampel SJ2, SJ3, SB terhadap urutan nukleotida dari Database NCBI

Alignments

Download

GenBank

Graphics

Distance tree of results

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☒ Bos indicus breed Gir clone 40 melanocortin 1 receptor (MC1R) gene, complete cds	375	375	94%	2e-100	99%	MG373764.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Bos indicus breed Gir clone 40 melanocortin 1 receptor (MC1R) gene, complete cds
 Sequence ID: [MG373764.1](#) Length: 954 Number of Matches: 1

Range 1: 350 to 555 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
375 bits(203)	2e-100	205/206(99%)	0/206(0%)	Plus/Minus
Query 12	GTGGTTGTAGTAGGTGATGAAGAGCAGGCTGGTGAGGATGCTGGCCACCCAGATGGCCGC	71		
Sbjct 555	GTGGTTGTAGTAGGTGATGAAGAGCAGGCTGGTGAGGATGCTGGCCACCCAGATGGCCGC	496		
Query 72	AATGATCCTCCACGCTCGGGGCAGTGTCAACACTGTGGTACCGCAGGGCGTAGAAGAT	131		
Sbjct 495	AATGATCCTCCACGCTCGGGGCAGTGTCAACACTGTGGTACCGCAGGGCGTAGAAGAT	436		
Query 132	GGAGATGTAGCGGTCCACAGCAATGGCAGGAGGAGCAGAGGCTGGACACCATGGATCC	191		
Sbjct 435	GGAGATGTAGCGGTCCACAGCAATGGCAGGAGGAGCAGAGGCTGGACACCATGGATCC	376		
Query 192	GCATATGAGCACGTCGATGACATTGT	217		
Sbjct 375	GCAGATGAGCACGTCGATGACATTGT	350		

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☒ Bos indicus breed Gir clone 40 melanocortin 1 receptor (MC1R) gene, complete cds	377	377	94%	6e-101	99%	MG373764.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) sort by: [E value](#)

Bos indicus breed Gir clone 40 melanocortin 1 receptor (MC1R) gene, complete cds
 Sequence ID: [MG373764.1](#) Length: 954 Number of Matches: 2

Range 1: 350 to 556 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
377 bits(204)	9e-101	206/207(99%)	0/207(0%)	Plus/Minus
Query 12	TGTGGTTGTAGTAGGTGATGAAGAGCAGGCTGGTGAGGATGCTGGCCACCCAGATGGCCGC	71		
Sbjct 556	TGTGGTTGTAGTAGGTGATGAAGAGCAGGCTGGTGAGGATGCTGGCCACCCAGATGGCCGC	497		
Query 72	CAATGATCCTCCACGCTCGGGGCAGTGTCAACACTGTGGTACCGCAGGGCGTAGAAGA	131		
Sbjct 496	CAATGATCCTCCACGCTCGGGGCAGTGTCAACACTGTGGTACCGCAGGGCGTAGAAGA	437		
Query 132	TGGAGATGTAGCGGTCCACAGCAATGGCAGGAGGAGCAGAGGCTGGACACCATGGATC	191		
Sbjct 436	TGGAGATGTAGCGGTCCACAGCAATGGCAGGAGGAGCAGAGGCTGGACACCATGGATC	377		
Query 192	CGCAATGAGCACGTCGATGACATTGT	218		
Sbjct 376	CGCAATGAGCACGTCGATGACATTGT	350		





**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 777-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : ANALISA PERBEDAAN GEN WARNA RAMBUT SAPI JALITENG
(JAWA BALI BANTENG) JANTAN DAN BETINA BERDASARKAN
SEKUEN GEN *MELANOCORTIN-1 RECEPTOR* (MC1R) DENGAN
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

PENELITI : PARASMITA ANGGRIAN SISKI
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 23 Maret 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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