

**STUDI KERAGAMAN GENETIK BERDASARKAN SEKUEN GEN
D LOOP PADA KELINCI NEW ZEALAND WHITE**

SKRIPSI

Oleh

ZATA NABILAH



**PROGRAM STUDI S1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
S E M A R A N G
2 0 2 4**

STUDI KERAGAMAN GENETIK BERDASARKAN SEKUEN GEN *D LOOP*
PADA KELINCI NEW ZEALAND WHITE

Oleh

ZATA NABILAH
NIM : 23010120130093

Salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Peternakan pada Program Studi S1 Peternakan
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

PROGRAM STUDI S1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
S E M A R A N G
2 0 2 4

BAB I

PENDAHULUAN

Kelinci merupakan salah satu hewan ternak yang memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi ternak penghasil daging, *wool*, *fur*, hewan peliharaan/hias dan juga hewan percobaan penelitian. Saat ini kelinci telah banyak dikembangbiakkan oleh para peternak, dalam skala kecil dengan modal usaha yang relatif kecil dan tidak perlu bergantung pada pakan pabrik (Suroto *et al.*, 2022).

Kelinci New Zealand White (NZW) merupakan salah satu jenis kelinci yang banyak dikembangkan di Indonesia sebagai kelinci pedaging karena pertumbuhan yang cepat (Marhaeniyanto *et al.*, 2015). Persentase karkas kelinci juga cukup tinggi dapat menghasilkan karkas hingga 51,66% (Wahyono *et al.*, 2021). Daging yang rendah lemak menjadi kelebihan dari kelinci (Belabbas *et al.*, 2019). Daging kelinci memiliki kandungan lemak yang lebih rendah (9,2g/100g) dibandingkan dengan ayam (10,8g/100g), sapi (19,3g/100g), dan babi (28,2g/100g) (Nistor *et al.*, 2013). Meskipun sudah banyak dikembangkan di Indonesia, tetapi informasi mengenai kelinci NZW masih sangat terbatas terutama eksplorasi genetiknya.

Mitokondria merupakan organel sel eukariot yang memiliki fungsi penghasil adenosin triphosphat (ATP) atau sumber energi. Mitokondria memiliki perangkat genetiknya sendiri yaitu DNA mitokondria (mtDNA). DNA mitokondria merupakan salah satu sumber informasi genetik dari makhluk hidup dan telah banyak digunakan dalam studi genetika populasi (Wibowo *et al.*, 2013). mtDNA pada hewan memiliki ukuran 15.000 – 17.000 *base pairs* (Slaska *et al.*, 2014),

dengan bentuk sirkular dan terdiri dari 37 gen (Boore, 1999). *Displacement Loop* (*D loop*) merupakan salah satu dari 37 gen yang terdapat di mtDNA. *D loop* merupakan daerah yang memiliki tingkat mutasi yang tinggi dan sering digunakan untuk mempelajari tentang keragaman genetik dan hubungan kekeluargaan antar spesies (Yuriadi *et al.*, 2010).

Kajian mengenai keragaman genetik *D Loop* pada kelinci NZW belum banyak dilakukan, oleh karena itu identifikasi genetik individu, keragaman populasi, jarak genetik dan identifikasi hubungan kekerabatan dengan populasi yang lain perlu diteliti lebih lanjut. Pendugaan jarak genetik melalui morfometrik pada kelinci NZW di Indonesia pernah dilakukan oleh Nisa *et al.* (2022). Menurut Kolo *et al.* (2024), ukuran tubuh dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan, sedangkan pendugaan jarak genetik banyak dilakukan dengan metode molekular karena memiliki tingkat akurasi yang lebih tinggi karena tidak dipengaruhi faktor lingkungan. Keragaman genetik berdasarkan gen *D loop* pernah diteliti oleh Ahmed *et al.* (2022) dengan menggunakan sampel darah dari beberapa ras, salah satunya NZW di Mesir. Oleh karena itu diperlukan adanya studi mengenai keragaman genetik berdasarkan gen *D loop* pada kelinci NZW di Jawa Tengah.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui keragaman genetik kelinci NZW dan menyusun pohon filogenetik kelinci berdasarkan sekuen gen *D loop*. Manfaat dari penelitian ini adalah memperoleh keragaman genetik kelinci NZW yang dipelihara oleh masyarakat, sehingga dapat menjadi informasi dasar dalam pengembangan dan pemanfaatan kelinci. Diduga bahwa kelinci NZW memiliki keragaman genetik yang relatif rendah berdasarkan sekuen gen *D loop*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kelinci New Zealand White

Kelinci merupakan hewan mamalia kecil yang berasal dari famili *Leporidae* dengan nama spesies *Oryctolagus cuniculus*. Kelinci merupakan hewan herbivora yang sebagian besar pakannya merupakan hijauan. Kelinci merupakan salah satu ternak pseudoruminansia yang produktivitasnya cukup baik (Yunita *et al.*, 2020). Keberadaan ternak kelinci banyak dimanfaatkan oleh masyarakat menjadi berbagai hasil produk, seperti daging, kulit bulu, binatang kesayangan dan olahan hasil ternak bahkan bahan industri kerajinan kulit (Darman, 2011).

NZW merupakan jenis kelinci yang biasa digunakan sebagai kelinci pedaging dan hewan percobaan laboratorium. Ciri kelinci NZW meliputi kepala berbentuk oval dengan mata berwarna merah, bentuk tubuh bertipe komersial yaitu memiliki ukuran besar dengan bentuk yang lebar secara keseluruhan, serta memiliki bulu halus dan kompak dengan warna putih pada seluruh badan (Brahmantiyo *et al.*, 2021). Sebagai kelinci pedaging, NZW memiliki kemampuan pertumbuhan yang cukup baik. Pemberian pakan yang tepat dapat menghasilkan penambahan bobot badan harian sebesar 19,83 g dan mencapai bobot badan 3 kg pada usia 4 bulan (Marhaeniyanto dan Susanti, 2017).

2.2. DNA Mitokondria

DNA mitokondria (mtDNA) merupakan DNA yang ditemukan didalam mitokondria, organel yang memiliki peran dalam produksi energi. mtDNA berbeda dengan DNA nukleus yang diwariskan dari kedua induk, karena mtDNA hanya diwariskan dari betina. Sifat khusus dari DNA mitokondria yaitu diturunkan oleh betina dan tidak mengalami rekombinasi (Solihin, 1994). mtDNA memiliki struktur berbentuk lingkaran kecil, mengandung 15.000 – 17.000 *base pairs* (Slaska *et al.*, 2014), juga mengandung 13 gen yang mengkode protein, 22 gen transfer RNA (tRNA) dan 2 gen ribosomal RNA (rRNA) (Ladoukakis dan Zouros, 2017). mtDNA memiliki jumlah *copy* yang tinggi dengan ukuran yang kecil yang memungkinkan untuk dipelajari secara utuh, variasi basa yang berevolusi cepat pada *D loop* juga dimiliki oleh mtDNA, sehingga banyak digunakan dalam studi keragaman genetik (Sartika *et al.*, 2000). Sifat homoplasma pada mtDNA menjadikan produk PCR dapat diurutkan langsung karena tidak perlu dipisah antara alel ibu dan ayah seperti gen yang terdapat pada DNA inti sel (Ladoukakis dan Zouros, 2017).

2.3. D Loop

Molekul mtDNA memiliki daerah yang dinamakan *displacement loop* atau *D loop*. *D loop* merupakan gen *non coding* dengan tingkat keragaman tertinggi dibanding gen lain pada mtDNA (Slaska *et al.*, 2014). Daerah kontrol (*D loop*) yang bersifat hipervariabel memiliki 3 bagian yaitu 5-*(left) ppheriferal domain*, *central conserved region*, dan 3-*(right) ppheriferal domain*. Situs polimorfik yang banyak

ditemukan di daerah kontrol dapat digunakan dalam pembuatan filogenetik intraspesifik (Zein, 2007). *D loop* digunakan untuk mengidentifikasi asal dari sapi pesisir, yang menunjukkan adanya campuran asal-usul sapi pesisir berdasarkan garis matrilinealnya (Putri *et al.*, 2019). Gen *D loop* digunakan pada penelitian Sulandari dan Zein (2009) untuk mengidentifikasi hubungan antara ayam domestikasi dan sub spesies lain dari *G. gallus*. Penelitian identifikasi keragaman genetik pada ternak yang menggunakan gen *D loop* dilakukan pada Kuda asli Tengger (Yuriadi *et al.*, 2010), Sapi Bali dan Banteng (Wisesa *et al.*, 2012), Kelinci Lokal Indonesia (Setiaji *et al.*, 2023), Kerbau Lumpur Kalimantan (Suhardi *et al.*, 2023) dan Kambing Galla di Kenya (Masila *et al.*, 2024).

2.4. Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan tahap awal dalam analisis DNA. Isolasi DNA memungkinkan mendapatkan senyawa murni, sehingga disebut juga pemurnian. Tujuan dari isolasi DNA yaitu memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak dan karbohidrat (Hariyadi *et al.*, 2018). Tahapan dalam isolasi DNA secara garis besar yaitu lisis sel, ekstraksi DNA dari bahan padat dan pemurnian DNA (Hidayati *et al.*, 2016). Kontaminan menjadi salah satu indikasi keberhasilan isolasi DNA. DNA yang terisolasi dengan baik akan menunjukkan pita yang jelas dan terang saat diuji dengan elektroforesis. Pita yang tipis menunjukan konsentrasi DNA yang rendah. Isolasi DNA dinyatakan berhasil jika menghasilkan ekstrak dengan kuantitas, kemurnian, dan jangka waktu yang singkat secara konsisten (Goud *et al.*, 2018).

2.5. *Polymerase Chain Reaction*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik molekular yang digunakan untuk memperbanyak salinan (mengamplifikasi) sebuah segmen spesifik dari DNA. PCR menggunakan enzim dan oligonukleotida sebagai primer untuk menggandakan sejumlah molekul DNA tertentu dalam suatu *thermocycle* (Widayat *et al.*, 2019). Prinsip dasar langkah dalam melakukan PCR yaitu *denaturasi template* (94 - 95°C), *annealing primer* pada DNA target (50 - 60°C) dan pemanjangan (72°C) (Setyawati dan Zubaidah, 2021).

sekuensing merupakan proses untuk menentukan urutan nukleotida yang tepat dalam suatu fragmen DNA. Proses sekuensing ini membuat urutan genetik berupa susunan adenin (A), guanin (G), sitosin (C), dan timin (T) dapat terbaca. Urutan basa nukleotida dapat ditentukan dari DNA hasil amplifikasi yang telah dilakukan sekuensing (Yuliati *et al.*, 2019).

2.6. **Keragaman Genetik**

Keragaman genetik merujuk pada variasi genetik yang ada di antara individu dalam satu spesies. Variasi yang diwariskan baik dalam atau antara populasi ternak dicerminkan pada keragaman sumber daya genetik ternak (Amrullah *et al.*, 2023). Identifikasi keanekaragaman genetik dan prediksi perubahan variasi pada suatu populasi penting dilakukan dalam skema pengembangan baik dengan tujuan konservasi maupun seleksi. Keragaman genetik

pada level molekular diukur dengan frekuensi genotipe dan alel, proporsi lokus polimorfik, atau keragaman alel (Toro *et al.*, 2011).

Mutasi gen merupakan perubahan pasangan basa DNA (A = Adenin, T = Timin, G = Guanin, C = Sitosin) dalam bentuk substitusi, delesi, insersi dan inversi (Nei, 1987). Menurut Zulkharnaim *et al.* (2010) bahwa adanya mutasi dan perubahan basa nukleotida dapat digunakan sebagai dasar identifikasi keragaman genetik. Mutasi substitusi nukleotida terdiri dari substitusi transisi dan transversi. Substitusi transisi yaitu pergantian antara basa purin dengan basa purin lainnya atau basa pirimidin dengan basa pirimidin lainnya, sedangkan substitusi transversi adalah pergantian basa purin dengan basa pirimidin atau sebaliknya (Utomo, 2017). Delesi adalah peristiwa hilangnya rantai DNA dalam runutan basa DNA (Sumantri *et al.*, 2000).

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November – Januari 2024 di Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Koleksi sampel dilakukan di Kandang Hewan Uji Coba Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Isolasi DNA dan analisis data penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Analisis sekuensing dilaksanakan melalui PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 14 ekor kelinci New Zealand White berumur 2-3 bulan dan tidak memiliki hubungan darah antara satu individu dengan individu lainnya yang dibuktikan dengan catatan rekording peternak (Lampiran 1). Materi kelinci ini didapatkan dari peternakan yang berlokasi di Kabupaten Temanggung. Alat yang digunakan meliputi *ice box*, *ice gel*, sarung tangan handling, spuit 1 ml, kapas, tabung Etilena Diamina Tetra Asetat (EDTA), freezer, *collection tube*, *vortex*, *micropipette*, *tip*, *eppendorf*, inkubator, *centrifuge*, erlenmeyer, timbangan analitik, *microwave*, plastik wrap, cetakan gel, *gel comb*, parafilm, mesin elektroforesis, *PCR tube*, Gel Documentation System (Enduro™ GDS Touch II) dan mesin PCR (Bio-Rad T100), label, spidol. Bahan yang digunakan terdiri dari darah kelinci, *alcohol*, *alcohol swab*, GeneJET DNA

Isolation Kit, ethanol, *loading dye*, sarung tangan latex, Tris Boric acid (TBE) 1×, gel agarosa, *florosafe*, DNA Stain, DNA Ladder, primer *forward* (5'-agtgcttgcttgcttgtaagc-3') dan *reverse* (5'-acttaaactaccctctgctct-3'), PCR water, MyTaq Reaction Buffer dan MyTaq DNA Polymerase.

3.2. Metode Penelitian

3.2.1. Prosedur penelitian

Prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri dari pengambilan sampel darah kelinci, isolasi DNA, pembuatan gel agarosa, elektroforesis, PCR dan sekuensing DNA.

1.2.1.1. Pengambilan sampel darah

Sampel yang digunakan berupa darah kelinci yang diperoleh dari *central auricular artery* pada telinga kelinci NZW jantan. Darah diambil dengan spuit 1 ml dan ditampung pada tabung *vacuutainer* yang berisi EDTA untuk mencegah terjadi penggumpalan darah. Sampel darah disimpan sementara didalam *ice box* dengan *ice gel*. Selanjutnya sampel disimpan dalam *freezer* dengan suhu sekitar 4°C.

1.2.1.2. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan sesuai prosedur Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit. Tahap awal sebelum dilakukan isolasi DNA yaitu semua peralatan disterilisasi untuk mencegah adanya kontaminan. Tahapan pertama dalam

isolasi DNA yaitu sampel darah diambil dari tabung EDTA sebanyak 200µl dengan menggunakan *micropipette* dan dimasukkan kedalam *microtube* 2ml.

Tahapan selanjutnya yaitu penambahan *lysis solution* sebanyak 400µl dan *proteinase K* sebanyak 20µl lalu divortex agar homogen. Sampel yang sudah dihomogenkan lalu diinkubasi selama 18 menit dengan suhu 56°C dan divortex sesekali. Selanjutnya ditambahkan ethanol 96% sebanyak 200µl dan divortex kembali. Sampel lalu dipindahkan ke *collection tube* dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000rpm, dengan suhu 15°C selama 3 menit. Cairan supernatan yang terkumpul kemudian dibuang dan diganti dengan *collection tube* yang baru.

Tahapan selanjutnya yaitu menambahkan 500µl *wash buffer* I dan II yang sudah ditambahkan ethanol, lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000rpm, dengan suhu 15°C selama 3 menit. *Wash buffer* II ditambahkan setelah cairan supernatan sebelumnya dibuang. Setelah itu filter yang berisi endapan DNA dipindahkan ke *microtube* 2ml baru untuk ditambahkan *elution buffer* sebanyak 200µl secara bertahap, lalu selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 12.000rpm, dengan suhu 15°C selama 3 menit. *Elution buffer* diberikan bertahap yaitu sebanyak 2 tahap dengan masing masing 100µl, sebelum dilakukan sentrifugasi diinkubasi terlebih dahulu pada suhu ruang selama 2 menit. Hasil dari sentrifugasi terakhir merupakan produk dari isolasi DNA, yang selanjutnya dapat disimpan pada suhu $\pm$ -20°C atau dilanjutkan dengan elektroforesis untuk mengetahui keberhasilan proses isolasi DNA.

1.2.1.3. Pembuatan gel agarosa

Pembuatan agarosa ini dilakukan dengan menambahkan 0,5g bubuk agarosa dan 50ml larutan TBE ke dalam tabung erlenmeyer kemudian dihomogenkan dengan cara *stirring* secara manual. Erlenmeyer selanjutnya ditutup dengan plastik wrap yang dilubangi dan dimasukan ke dalam *microwave* dengan gelombang 300watt dipanaskan selama 1 menit. Proses ini diulang 2 kali hingga seluruh bubuk agarosa larut. Hal ini dilakukan karena, pemanasan yang terlalu spontan akan menyebabkan penguapan dan penurunan volume. Agarosa yang sudah larut kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 2 menit dan ditambahkan *florostain* sebanyak 3µl kemudian dihomogenkan. Agarosa selanjutnya dituangkan ke dalam cetakan yang sudah dilengkapi dengan *gel comb*. Saat gel agarosa mengeras, sudah dapat digunakan untuk elektroforesis.

1.2.1.4. Elektroforesis

Tahapan pertama dalam elektroforesis yaitu membuat agarosa dengan konstrasi 1%. Setelah gel mengeras kemudian diangkat dan dipindahkan ke dalam mesin elektroforesis. Selanjutnya ditambahkan larutan TBE sampai gel agarosa terendam, dan sampel dimasukkan kedalam masing-masing sumur *gel comb* sebanyak 5µl.

Secara khusus elektroforesis yang ditujukan untuk melihat hasil isolasi DNA/purifikasi DNA maka sampel DNA ditambahkan *loading dye* dengan perbandingan sampel:loading dye sebesar 4:1, sedangkan pada elektroforesis untuk melihat hasil PCR dilakukan tanpa penambahan bahan apapun. Mesin

elektroforesis selanjutnya dijalankan pada tegangan 100V selama 30 menit. Hasil elektroforesis dapat dilihat dengan menggunakan seperangkat alat berupa *Gel Documentation System* (Enduro™ GDS Touch II) yang dilengkapi dengan sinar UV, kamera dan sebuah tablet (Windows 10 Tablet).

1.2.1.5. Polymerase chain reaction (PCR)

Tahapan amplifikasi gen D loop ini menggunakan primer yang didesain berdasarkan sekuen mtDNA *Oryctolagus cuniculus* yang diambil dari GenBank dengan kode akses (NC001913). Desain primer dilakukan dengan menggunakan program BLAST. Komposisi dari campuran PCR terdiri dari MyTaq HS Red Mix 25µl, 1µl primer *forward* (5'-agt gct ttg ctt tgt tgt taa gc-3'), 1µl primer *reverse* (5'-act taa act acc ctc tgc tct-3'), 3µl DNA template dan 20 µl PCR *water*, sehingga total volume produk PCR adalah 50µl. Campuran tersebut di-*vortex* sampai homogen. Sampel kemudian dimasukkan ke mesin PCR dan di-*running* dengan pengaturan suhu *initial denaturation* 95°C selama 1 menit, *denaturation* 95°C selama 15 detik, *annealing* 51,8°C selama 15 detik, *extension* 72°C selama 55 detik dan diulang sebanyak 35 siklus. Hasil PCR dapat dilihat dengan prosedur elektroforesis. Produk PCR dapat disimpan dalam suhu $\pm -20^{\circ}\text{C}$.

1.2.1.6. Sekuensing

Pembacaan urutan basa nukleotida hasil PCR gen D loop kelinci NZW dilakukan dengan sekuensing. Proses sekuensing dilakukan di 1st Base – Asia, Malaysia melalui PT. Genetika Science Indoensia.

3.3. Analisis

Data hasil sequencing dianalisis dan ditentukan dengan model substitusi nukleotida dengan bantuan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 11 (Tamura *et al.*, 2021) (Lampiran 2). Proses pengurutan nukleotida pada gen D loop dilakukan dengan menggunakan program ClustalW dengan tujuan membandingkan keragaman gen kelinci NZW dengan hewan lain dalam famili *Leporidae* dengan nomor akses NC001913 pada website *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Keragaman haplotipe dan nukleotida, jumlah keragaman haplotipe, dianalisis dengan dnaSP v6. 12. 03. (Lampiran 3). Tahapan analisis filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi 11 dengan metode UPGMA dengan *bootstrap* 1000 ulangan.

