

**ANALISIS POLIMORFISME GEN *DIACYLGLYSEROL
ACYLTRANSFERASE 1 (DGAT1)* PADA SAPI LIMPO
(LIMOUSIN-PERANAKAN ONGOLE) MENGGUNAKAN
TEKNIK PCR-RFLP**

SKRIPSI

oleh :

**ADI PURWANTO
0410910002-91**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**ANALISIS POLIMORFISME GEN *DIACYLGLYSEROL
ACYLTRANSFERASE 1 (DGAT1)* PADA SAPI LIMPO
(LIMOUSIN-PERANAKAN ONGOLE) MENGGUNAKAN
TEKNIK PCR-RFLP**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang biologi

oleh :

**ADI PURWANTO
0410910002-91**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ANALISIS POLIMORFISME GEN *DIACYLGLYSEROL
ACYLTRANSFERASE 1 (DGAT1)* PADA SAPI LIMPO
(LIMOUSIN–PERANAKAN ONGOLE) MENGGUNAKAN
TEKNIK PCR-RFLP**

Oleh:
ADI PURWANTO
0410910002-91

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 13 Februari 2009
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sri Rahayu, M.Kes.
NIP. 131 652 677

Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS
NIP. 132 090 387

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sri Rahayu, M.Kes.
NIP. 131 652 677

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Adi Purwanto
NIM : 0410910002-91
Program Studi : Biologi
Penulis Skripsi Berjudul :
Analisis Polimorfisme Gen *Diacylglycerol Acyltransferase 1*
(*DGAT1*) pada Sapi LIMPO (Limousin – Peranakan Ongole)
Menggunakan Teknik PCR-RFLP

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Februari 2009
Yang Menyatakan,

(Adi Purwanto)
NIM. 0410910002-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



ANALISIS POLIMORFISME GEN *DIACYLGLYSEROL ACYLTRANSFERASE 1 (DGAT1)* PADA SAPI LIMPO (LIMOUSIN-PERANAKAN ONGOLE) MENGGUNAKAN TEKNIK PCR-RFLP

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya polimorfisme gen *DGAT1* dan hubungannya dengan karakteristik *marbling* daging pada sapi LIMPO. Sampel darah diambil dari sepuluh sapi LIMPO di RPH Krian, Sidoarjo. DNA diisolasi dari darah dengan metode *salting out* modifikasi dari Sambrook dan Russel (2001). DNA hasil isolasi diuji kualitatif dengan elektroforesis gel agarose 0,8% dan uji kuantitatif dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Amplifikasi gen *DGAT1* menggunakan pasangan primer *forward* DGAT6829F 5'-CTACCGGGACGTCAACCTC-3' dan *reverse* DGAT6829R 5'-GGTTGTCGGGGTAGCTCA-3'. DNA hasil amplifikasi kemudian dipotong menggunakan enzim restriksi *HaeIII*. DNA hasil dari PCR-RFLP dielektroforesis menggunakan gel agarose 2%. Analisis dilakukan dengan mengamati profil pita DNA hasil PCR-RFLP secara deskriptif yang selanjutnya dihubungkan dengan kualitas *marbling* daging. Amplifikasi dengan PCR menghasilkan satu pita DNA yang mempunyai ukuran ± 220 bp. PCR-RFLP dengan enzim *HaeIII* menghasilkan empat haplotip (pola potongan pita DNA), yaitu haplotip 1 dengan satu fragmen (220 bp), haplotip 2 dengan dua fragmen (100 dan 30 bp), haplotip 3 dengan tiga fragmen (220, 190 dan 30 bp), dan haplotip 4 dengan empat fragmen (220, 190, 100 dan 30 bp). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat polimorfisme gen *DGAT1* pada sapi LIMPO. Tetapi, polimorfisme tersebut belum dapat menunjukkan adanya hubungan antara pola potongan pita DNA dengan kualitas *marbling*.

Kata kunci: Gen *DGAT1*, *marbling*, PCR-RFLP, polimorfisme, sapi LIMPO

POLYMORPHISM ANALYSIS OF *DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE 1 (DGAT1)* GENE OF LIMPO CATTLE THROUGH PCR-RFLP METHODE

Abstract

The aim of this research was to determine polymorphism of *DGAT1* gene and it's relation to marbling of LIMPO cattle. The blood sample was taken from ten LIMPO cattle at animal slaughter house Krian, Sidoarjo. DNA was isolated from blood by salting out method from Sambrook and Russel (2001), DNA was qualitatively tested by using 0,8% agarose gel electrophoresis and quantitatively tested by using spectrophotometer with 260 nm and 280 nm wave length. Amplification of *DGAT1* gene by using forward primer 5'-CTACCGGGACGTCAACCTC-3' and reverse primer 5'-GGTTGTCGGGGTAGCTCA-3'. The amplified DNA was cut by *HaeIII* restriction enzyme. DNA from PCR-RFLP was run on 2% agarose gel electrophoresis. DNA band from PCR-RFLP method was related to quality of marbling, both were analyzed by using descriptive analysis. The result of the amplification was a specific single band with the length of ± 220 bp. PCR-RFLP method with *HaeIII* restriction enzyme was result four kinds of haplotype. Haplotype 1 were cut into one fragment (220 bp), haplotype 2 were cut into two fragments (100 and 30 bp), haplotype 3 were cut into three fragments (220, 190 and 30 bp) and haplotype 4 were cut into four fragments (220, 190, 100 and 30 bp). It was concluded that there were polymorphism of *DGAT1* gene of LIMPO cattle. However, it was no relationship between polymorphism of *DGAT1* gene itself with quality of marbling.

Keywords: *DGAT1* gene, LIMPO cattle, marbling, PCR-RFLP, polymorphism

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis sampaikan kehadiran Allah SWT, Tuhan seru sekalian alam, yang telah melimpahkan rahmat karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Skripsi yang berjudul '**Analisis Polimorfisme Gen *Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1)* pada Sapi LIMPO (Limousin – Peranakan Ongole) Menggunakan Teknik PCR-RFLP**'. Penulisan skripsi ini tak terlepas dari bantuan berbagai pihak maka dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. Sri Rahayu, M.Kes. dan Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS, selaku Dosen Pembimbing I dan II atas kesabaran dalam membimbing, mendampingi, dan memotivasi selama pelaksanaan skripsi ini
2. Dr. Ir. Estri Laras A., MSc.St., Dr. Agung Pramana W. M., M.Si., dan Widodo, Ph.D selaku Dosen Penguji.
3. Dr. Sri Rahayu, M.Kes. selaku Ketua Jurusan Biologi dan Dr. Sri Widyarti M.Si. selaku Ketua Laboratorium Biologi Molekuler, dan segenap civitas akademika Jurusan Biologi Unibraw.
4. Rodliyati Azrianingsih, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing akademik (PA) selama 7 semester.
5. Kementerian Nasional Riset dan Teknologi melalui program intensif.
6. Ibu, Bapak, dan saudara-saudaraku atas doa, keikhlasan, dan dukungannya setiap saat kepadaku.
7. Adi N. dan tim peneliti sapi PO (Vira dan Burhannuddin), Dian, S.Si, Riza, S.Si dan Susi, S.Si atas segala bantuannya selama di Biomol.
8. Astika Hernawati, S.Si yang selalu memberi semangat dan inspirasi.
9. Asep, Triani, Yulia, Dian S., Elok, Tito dan rekan-rekan Biologi angkatan 2004 atas kebersamaan, kekeluargaan dan solidaritas selama menempuh perkuliahan di Biologi.
10. Semua pihak terkait yang tidak dapat disebutkan satu-persatu atas segala bantuannya.

Banyak hal yang perlu diperbaiki dalam penyusunan skripsi ini karena penulis sadari masih jauh dari kesempurnaan. oleh karena itu kritik membangun dan saran sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangsih terhadap perkembangan ilmu pengetahuan.

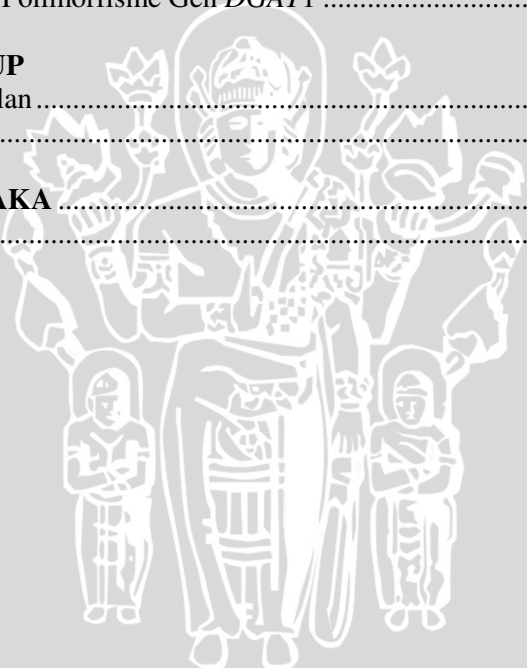
Malang, 24 Februari 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	3
1.5 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sapi LIMPO (Limousin-Peranakan Ongole)	4
2.2 <i>Marbling</i>	5
2.3 Gen <i>DGAT1</i>	7
2.4 DNA (<i>Deoxyribonucleic acid</i>).....	8
2.5 Spektrofotometri	10
2.6 Elektroforesis Gel Agarose	11
2.7 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	12
2.8 RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	14
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat.....	17
3.2 Sampel Penelitian.....	17
3.3 Alat dan Bahan	
3.3.1 Alat Penelitian.....	17
3.3.2 Bahan Penelitian	17

3.4 Isolasi Leukosit dari Sampel Darah	18
3.5 Isolasi DNA dari Leukosit	18
3.6 Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA	
3.6.1 Uji Kuantitatif DNA.....	19
3.6.2 Uji Kualitatif DNA.....	19
3.7 Amplifikasi Gen <i>DGAT1</i>	19
3.8 Pemotongan Pita DNA oleh Enzim <i>HaeIII</i>	20
3.9 Analisis Data.....	20
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Isolasi DNA Total	21
4.2 Hasil Amplifikasi Gen <i>DGAT1</i>	23
4.3 Analisis Polimorfisme Gen <i>DGAT1</i>	24
BAB V. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	37



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kemampuan pemisahan DNA pada berbagai konsentrasi..	11
Tabel 2.2. Jenis enzim dan sisi pemotongannya	16
Tabel 4.1. Hasil Uji Kuantitas DNA dengan Spektrofotometer.....	22
Tabel 4.2. Data hasil PCR-RFLP gen <i>DGAT1</i> pada sapi LIMPO dan hubungannya dengan kualitas <i>marbling</i>	27



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Sapi LIMPO.....	5
Gambar 2.2. Kualitas daging berdasarkan kandungan <i>marbling</i> nya.....	6
Gambar 2.3. Tahapan sintesis trigliserida yang dikatalis oleh enzim DGAT1	7
Gambar 2.4. Struktur heliks ganda DNA	9
Gambar 2.5. Tahapan amplifikasi DNA dalam PCR.....	13
Gambar 2.6. Pola pemotongan <i>sticky end</i> dengan <i>EcoRI</i> (a) dan <i>Blunt end</i> dengan <i>SmaI</i> (b)	16
Gambar 4.1. Hasil elektroforesis DNA total sapi LIMPO.....	21
Gambar 4.2. Hasil amplifikasi gen <i>DGAT1</i>	23
Gambar 4.3. Pola potongan pita DNA dengan teknik PCR-RFLP pada kualitas <i>marbling</i> 1.....	25
Gambar 4.4. Pola potongan pita DNA dengan teknik PCR-RFLP pada kualitas <i>marbling</i> 2.....	25
Gambar 4.5. Zimogram pola potongan pita DNA dengan teknik PCR-RFLP.....	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian	37
Lampiran 2. Komposisi Larutan Dalam Isolasi DNA dan Elektroforesis Gel Agarose	38
Lampiran 3. Isolasi Leukosit dari sampel Darah	38
Lampiran 4. Isolasi DNA dari Leukosit.....	39
Lampiran 5. Uji Kuantitatif DNA	40
Lampiran 6. Uji Kualitatif DNA	41
Lampiran 7. Amplifikasi Gen <i>DGAT1</i>	42
Lampiran 8. Pemotongan Pita DNA oleh Enzim <i>HaeIII</i>	43
Lampiran 9. Tabel Hasil Pengukuran Absorbansi dengan Spektrofotometer dan Kualitas <i>Marbling</i> Daging	43
Lampiran 10. Sekuen Gen <i>DGAT1</i> (NCBI).....	44

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
Bp	: <i>base pair</i>
DGAT1	: <i>diacylglycerol acyltransferase 1</i>
DNA	: <i>deoxyribo nucleid acid</i>
EDTA	: <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EtBr	: <i>ethidium bromide</i>
LIMPO	: <i>Limousin – Peranakan Ongole</i>
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
RBCs lysis	: <i>red blood cell lysis</i>
RFLP	: <i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	: <i>ribonucleic acid</i>
SDS	: <i>sodium dedocyl sulfate</i>
SNP	: <i>single nucleotide polymorphism</i>
Ta	: <i>annealing temperature</i>
TE	: <i>tris – edta</i>
TBE	: <i>tris boric acid edta</i>
Tm	: <i>melting temperature</i>

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama Unit</u>
m	: <i>mili (10^{-3})</i>
μ	: <i>mikro (10^{-6})</i>
n	: <i>nano (10^{-9})</i>

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sapi LIMPO (Limousin – Peranakan Ongole) merupakan jenis sapi silangan antara sapi lokal (Peranakan Ongole) dengan sapi pendatang (Limousin). Sapi LIMPO memiliki beberapa keunggulan sehingga patut dikembangkan, antara lain sebagai sapi tipe pedaging / potong, sapi pekerja, maupun sapi hias. Sebagai sapi potong, sapi LIMPO memiliki keseragaman karakteristik paling menonjol dan sifat-sifat genetik yang khas, antara lain tidak mudah stres terhadap iklim maupun lingkungan yang kurang mendukung, mempunyai daya tahan yang kuat terhadap serangan penyakit dan kualitas dagingnya tinggi. Menurut Romjali dkk. (2008) bahwa sapi potong merupakan salah satu komoditas ternak strategis yang dapat mendukung stabilitas nasional. Pada tahun 2008, produksi daging nasional baru mencapai 66 % (380.059 ton) dan kekurangannya dicukupi melalui import (34%). Pasokan import daging diprediksikan semakin meningkat dan mencapai 70% pada tahun 2020. Hal ini, memperlihatkan bahwa terdapat kecenderungan semakin meningkatnya kebutuhan akan daging sapi potong.

Peningkatan jumlah kebutuhan daging tersebut harus diimbangi dengan peningkatan kualitas daging. Kualitas daging dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor baik sebelum atau setelah pemotongan. Faktor sebelum pemotongan yang dapat mempengaruhi kualitas daging adalah genetik, spesies, bangsa, tipe ternak, jenis kelamin, umur, pakan dan bahan aditif (hormon, antibiotik, dan mineral), serta keadaan stres. Faktor setelah pemotongan yang dapat mempengaruhi kualitas daging adalah metode pelayuan, metode pemasakan, tingkat keasaman (pH) daging, bahan tambahan (termasuk enzim pengempuk daging), lemak intramuskular (*marbling*), metode penyimpanan dan pengawetan, jenis otot daging, serta lokasi otot (Astawan, 2007).

Salah satu faktor yang dapat digunakan untuk karakterisasi kualitas daging adalah *marbling*. *Marbling* merupakan komposisi lemak yang ada dalam otot intramuskular. Adanya kandungan *marbling* yang cukup pada daging dapat meningkatkan kualitas dari daging tersebut. Jumlah *marbling* dapat berbeda di antara jenis kelamin jantan dan betina. Misalnya, pada umur yang sama, sapi

jantan memiliki lebih banyak kandungan *marbling* daripada sapi betina. Daging yang mengandung sedikit *marbling* akan tampak kering dan mempunyai rasa yang kurang baik, namun *marbling* yang terlalu banyak akan membatasi palatibilitas dan menimbulkan cita rasa yang tidak disukai (Soeparno, 1998).

Kualitas daging berdasarkan komposisi *marbling* dapat dibagi menjadi 4, yaitu prima (*prime*), pilihan (*choice*), seleksi (*select*) dan standard (Taylor dan Field, 2004). Keragaman komposisi atau kualitas *marbling* dari suatu daging tidak terlepas dari gen yang mengkode *marbling* itu sendiri. Gen yang berhubungan dengan penyandian (*encoding*) *marbling* adalah gen *DGAT1* (diacylglycerol acyltransferase) (Casas dkk., 2005). Penelitian dari Thaller dkk. (2003) mendapatkan adanya polimorfisme lisin / alanin pada *DGAT 1* dari *marbling* yang diambil dari *musculus semitendinosus* dan *musculus longissimus dorsi*. Menurut Moore dkk. (2003) bahwa deposisi *marbling* tergantung pada alel yang mengkode alanin dan lisin pada posisi basa 232 dari gen *DGAT1*. Keberadaan alel yang mengkode lisin (K) terbukti berkaitan dengan meningkatnya deposisi *marbling* daripada keberadaan alel pengkode alanin (A) yang berhubungan dengan menurunnya deposisi *marbling*. Menurut Grisart dkk. (2004) bahwa adanya polimorfisme dari gen *DGAT1* pada sapi *Black-and-White Holstein-Friesian* terjadi karena adanya mutasi pada daerah non-konservasi K232A yang menyebabkan variasi pada deposisi *marbling*.

Polimorfisme suatu gen dapat diketahui dengan menggunakan metode PCR-RFLP. Sutarno (2004) menggunakan teknik ini untuk melihat polimorfisme gen hormon pertumbuhan pada 115 sapi Benggala. Sedangkan Widayadi (2006) menggunakan teknik PCR-RFLP untuk mengetahui polimorfisme gen hormon pertumbuhan *GHE5* dan hubungannya dengan variasi bobot badan sapi Madura.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka analisis polimorfisme ini perlu dilakukan untuk melihat adanya variasi gen *DGAT1* dan hubungannya terhadap variasi kualitas *marbling* pada sapi LIMPO. Variasi kualitas *marbling* sapi LIMPO di Jawa Timur telah diketahui dari penelitian yang dilakukan oleh Susilo dkk. (2007), yang mengelompokkan menjadi dua, yaitu kualitas dengan kandungan *marbling* yang sangat tipis dan tipis. Hasil dari analisis polimorfisme ini diharapkan dapat mengetahui adanya polimorfisme dari gen *DGAT1* sehingga dapat memberikan informasi tentang data genetis

khususnya pada sapi LIMPO di Indonesia. Selain itu, hasil analisis ini juga diharapkan dapat digunakan sebagai langkah awal untuk pembuatan marker gen *DGAT1* yang dapat digunakan untuk seleksi genetik secara dini.

1.2 Permasalahan

1. Apakah terdapat polimorfisme gen *DGAT1* pada sapi LIMPO ?
2. Apakah terdapat hubungan antara polimorfisme gen *DGAT1* dengan kualitas *marbling* daging pada sapi LIMPO ?

1.3 Tujuan

Mengetahui polimorfisme untuk gen *DGAT1* pada sapi LIMPO dan hubungannya terhadap kualitas *marbling* daging.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat :

- a. Memberikan informasi tentang polimorfisme gen *DGAT1* pada sapi LIMPO.
- b. Sebagai acuan untuk penelitian lanjutan dalam pembuatan marker gen *DGAT1* sapi LIMPO.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi LIMPO (Limousin – Peranakan Ongole)

Sapi LIMPO merupakan sapi hasil persilangan dari jenis sapi Limousin dan sapi Peranakan Ongole. Sapi Limousin merupakan keturunan dari *Bos taurus* yang berasal dari Perancis dengan warna kulit merah keemasan. Sapi Limousin berasal dari daerah sedang (*temperate zone*), terbiasa hidup di daerah dengan temperatur udara yang dingin dengan tatalaksana pemeliharaan yang intensif serta termasuk sapi tipe besar. Sedangkan, sapi PO (Peranakan Ongole) merupakan keturunan dari *Bos indicus* yang tersebar luas diseluruh Indonesia dengan warna kulit putih atau abu-abu. Sapi PO berasal dari daerah tropis, terbiasa hidup di daerah dengan temperatur udara yang panas dan tatalaksana pemeliharaan yang ekstensif, serta termasuk sapi tipe kecil sampai sedang (Aryogi dkk., 2005).

Sapi LIMPO mempunyai ciri-ciri fenotipe yang hampir sama dengan sapi Limousin, yaitu mempunyai warna kulit yang cokelat kemerah-merahan dan ukuran tubuh yang relatif besar (Amin, 2003). Sapi LIMPO mempunyai ciri-ciri tidak berpunuk dan warna bulunya hanya coklat tua atau kehitaman dan coklat muda seperti tampak pada gambar 2.1. Warna bulu badan yang dominan dari lahir sampai dewasa adalah coklat tua. Warna coklat putih yang sering muncul saat lahir, menjadi lebih sering muncul pada saat sapi mencapai umur dewasa. Dalam jumlah kecil, ada sapi LIMPO yang saat lahir mempunyai warna bulu badan putih (seperti PO), tetapi semuanya akan berubah menjadi coklat setelah sapi mencapai umur dewasa (Yuari, 2008).

Sapi LIMPO merupakan tipe sapi pedaging yang secara genetik memiliki tingkat pertumbuhan dan produksi daging yang baik. Selain itu, sapi LIMPO mempunyai daya tahan terhadap temperatur panas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sapi lokal (Aryogi dkk., 2005). Hal tersebut dikarenakan sapi silangan mempunyai heterosis gen yang lebih besar dibandingkan dengan kedua jenis induknya. Sapi jenis ini juga mampu memperlihatkan estrus yang lebih cepat dari rata-rata estrus sapi lokal (Zhang dkk., 2001). Menurut Tanari (2001), heterosis positif tinggi pada persilangan akan mempunyai daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan dan prosentase beranak dapat mencapai 80%.



Gambar 2.1 Sapi LIMPO (Anonimous, 2008)

2.2 *Marbling*

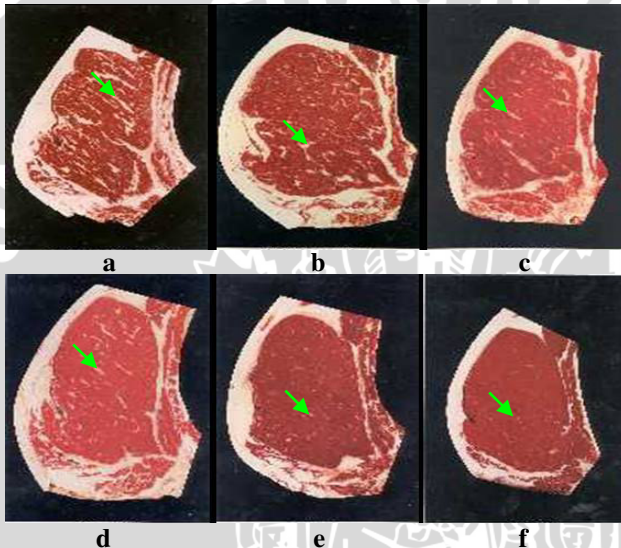
Marbling atau lemak intramuskular terletak di dalam jaringan ikat perimiseal di antara fasikuli atau ikatan serabut otot, dan lazim disebut *marbling*. Lemak ini didominasi dengan lemak netral dalam bentuk molekul-molekul trigliserida. Trigliserida yang paling dominan adalah trigliserida yang mengandung satu molekul asam palmitat dan dua molekul asam oleat. Asam lemak yang terkandung dalam *marbling* terdiri dari 55,1% asam lemak jenuh dan 44,9% asam lemak tak jenuh (Soeparno, 1998).

Tingkat kualitas *marbling* dapat berbeda tergantung jenis kelamin, usia dan jenis otot. Pada umur yang sama, sapi jantan memiliki lebih banyak kandungan *marbling* daripada sapi betina. Deposisi *marbling* akan mencapai maksimal ketika sapi berada pada usia dewasa. Hal ini dikarenakan *marbling* merupakan lemak yang terakhir kali disimpan diantara serabut otot (intramuskular) (Soeparno, 1998).

Identifikasi kualitas daging berdasarkan morfologinya bergantung pada warna, *marbling* dan kapasitas pengikatan lemak. Daging dengan kualitas baik harus memiliki kandungan *marbling* yang cukup. Adanya *marbling* akan meningkatkan jus daging, keempukan, dan rasa dari daging. Daging dengan *marbling* yang sedikit akan terlihat kering dan kurang berasa (Purdue University Animal Science, 2007). Peningkatan kadar jus daging dan cita rasa daging oleh adanya *marbling* dikarenakan pada saat pemasakan atau pengonsumsiannya, *marbling* akan meleleh sehingga sebagian air keluar dari daging dan menimbulkan rasa serta meningkatkan sensasi

jus daging. Selain itu *marbling* berperan sebagai pelumas pada saat pengunyahan, sehingga meningkatkan kemampuan dan memudahkan proses penelanan daging (Briskey dan Kauffman, 1971).

Klasifikasi kualitas daging berdasarkan tingkat kandungan *marbling*nya, yaitu *moderately Abundant* (berlimpah sedang), *Slightly Abundant* (berlimpah tipis), *moderate* (sedang), *modest* (sangat sedang), *Small* (kecil), dan *Slight* (tipis) (Purdue University Animal Science, 2007) dapat dilihat pada gambar 2.2.

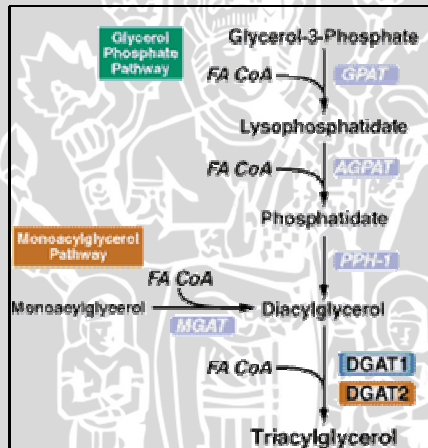


Gambar 2.2 Kualitas daging berdasarkan kandungan *marbling*nya : a. *Moderately Abundant*; b. *Slightly Abundant*; c. *Moderate*; d. *Modest*; e. *Small*; f. *Slight* (Purdue University Animal Science, 2007). (↘) menunjukkan *marbling* daging.

Kualitas *marbling* dibagi menjadi 4, yaitu prima (*prime*), pilihan (*choice*), seleksi (*select*) dan standard. Berdasarkan sistem ini, maka *marbling* dengan tingkat berlimpah tipis (*slightly abundant*) termasuk dalam kualitas prima, tingkat marbling tebal (*moderate*), sedang (*modest*) dan sedikit (*small*) merupakan karkas dengan kualitas pilihan, sedangkan tingkat *marbling* tipis termasuk kualitas seleksi (Taylor dan Field, 2004).

2.3 Gen *DGAT1*

Gen yang berhubungan dengan penyandian (*encoding*) *marbling* adalah gen *DGAT1*. Gen *DGAT1* yang terletak pada kromosom sapi 14, diketahui berhubungan dengan sifat produksi dari ternak sapi. Gen ini mengkode terbentuknya enzim *DGAT1* yang berperan dalam sintesis trigliserida. Gen ini juga diketahui berhubungan dengan peningkatan hasil susu dan kandungan susu dalam ternak (Casas, dkk, 2005). Enzim *DGAT1* merupakan enzim utama dalam sintesis lemak. Enzim ini mengkatalisis tahap akhir dari sintesis *triacylglycerol* melalui asilasi *acyl-CoA-dependent* pada *diacylglycerol*. Tingkat aktivitas enzim ini memiliki pengaruh pada penentuan kuantitas deposisi trigliserida dalam pembentukan jaringan lemak (Grisart dkk., 2004). Proses sintesis trigliserida yang dikatalis oleh enzim *DGAT1* dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Tahapan sintesis trigliserida yang dikatalis oleh enzim *DGAT1*

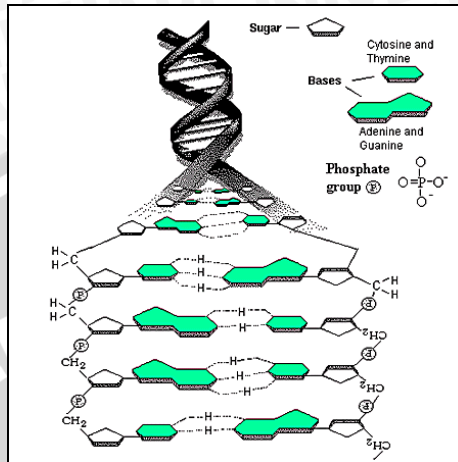
Thaller dkk. (2003) mengungkapkan bahwa Substitusi non-konservatif dari dua pasangan basa pada ekson 8 gen *DGAT1* diketahui mengakibatkan perubahan asam amino lisin (K) menjadi alanin (A) di posisi basa 232 (K232). Substitusi ini dilaporkan berhubungan dengan perubahan kandungan *marbling* pada sapi. Menurut Grisart dkk. (2004) bahwa kemampuan enzim *DGAT1* dalam mengkatalisis sintesis trigliserida akan semakin meningkat dengan adanya alel lisin pada posisi 232 daripada dengan alel alanin

pada posisi yang sama. Hal ini dikarenakan kandungan lisin pada posisi asam amino 232 dari enzim DGAT1 dapat meningkatkan kemampuan enzim dalam mengikat *acyl-CoA*.

2.4 DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

Biomakromolekul penyusun utama kromosom dan mengandung semua informasi genetik adalah DNA. Informasi genetik yang terdapat pada DNA memiliki dua fungsi, yaitu (1) sebagai sumber informasi pada sintesis molekul-molekul protein dan (2) sebagai sumber informasi yang akan diturunkan kepada sel anak. DNA adalah bahan yang diwariskan pada semua sel. Sewaktu sel membelah, salinan yang identik dengan DNA parental dibagikan kesetiap sel anak (Bresnick, 2003). DNA adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada jasad keturunannya. Informasi ini disusun dalam bentuk *codon* yang berupa tiga pasang basa nukleotida dan menentukan bentuk, struktur, maupun fisiologi suatu jasad (Yuwono, 2005).

Menurut Klug dan Cummings (2002) DNA memiliki struktur berbentuk untai ganda yang terdiri dari 3 komponen penyusun yaitu basa nitrogen, gula deoksiribosa dan fosfat. Basa penyusun DNA adalah adenin (A), guanin (G), timin (T) dan sitosin (C) di mana masing-masing basa mempunyai 1 atau 2 cincin. Basa yang mempunyai 2 cincin termasuk dalam kelompok basa purin yaitu adenin dan guanin. Basa yang hanya mempunyai 1 cincin termasuk dalam kelompok basa pirimidin, yaitu timin dan sitosin. Lehninger (1994) menyatakan bahwa basa-basa purin berikatan dengan basa-basa pirimidin dengan ikatan hidrogen. Antara adenin dan timin ada dua ikatan hidrogen ($A=T$) dan antara guanin dan sitosin terdapat tiga ikatan hidrogen ($G=C$). Gambar struktur DNA tampak pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Struktur heliks ganda DNA (Halsall, 2002).

Gen terdapat dalam kromosom sebuah sel, setiap kromosom mengandung sebuah molekul DNA yang sangat panjang dengan jutaan rantai basa yang mengkode banyak gen disepanjang rantainya. DNA mudah diekstraksi dari sel-sel, dan kemajuan biologi molekuler sekarang memudahkan ilmuwan mengambil gen-gen suatu spesies yang menyusun konstruksi molekuler mereka (Mizawarti, 2007). Menurut Roe (2007) metode isolasi yang umum digunakan dalam isolasi DNA adalah :

1. *Large scale double-stranded DNA isolation*

Metode yang digunakan untuk isolasi pada cosmid skala besar dan DNA plasmid, merupakan suatu modifikasi dari prosedur alkali lysis yang diikuti oleh keseimbangan ultrasentrifugasi di dalam gradien *cesium chloride - ethidium bromide*.

2. *Midiprep double-stranded DNA isolation*

Metode ini telah dikembangkan untuk menghasilkan jumlah template DNA yang cukup pada beberapa rantai DNA yang dikatalis oleh reaksi *terminator fluorescent*.

3. *Miniprep double-stranded DNA isolation*

Metode standard untuk *miniprep isolation* pada DNA plasmid umumnya sama dengan yang dilakukan pada metode *large scale isolation*.

4. *Large scale M13RF isolation*

Double-stranded M13RF adalah isolasi yang menggunakan M13 *SmaI cut*, yaitu preparasi vektor defosforilasi.

5. *Single-stranded M13 DNA isolation using phenol*

Prosedur isolasi ini merupakan suatu metode pilihan untuk preparasi M13 template-basa pada beberapa rantai DNA yang dikatalisis oleh reaksi *dye-terminator*.

6. *Biomek-automated modified-Eperon isolation procedure for single-stranded M13 DNA*

Metode semi otomatis ini merupakan modifikasi dari prosedur yang telah ada sebelumnya dan digunakan isolasi yang simultan pada 48 *single-stranded* DNAs selama 3 jam.

7. *96 well double-stranded template isolation*

Termasuk metode otomatis yang merupakan modifikasi dari prosedur sebelumnya dengan menggunakan isolasi simultan 96 *double stranded* DNAs per Biomek selama 2 jam.

8. *Genomic DNA isolation from blood*

2.5 Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah suatu metode yang digunakan untuk mengetahui berapa banyak suatu substansi menyerap energi pada panjang gelombang yang berbeda. Spektrofotometri dapat juga digunakan untuk analisa kuantitatif dan kualitatif suatu senyawa yang telah diketahui. Konsentrasi suatu senyawa dapat dideterminasi dengan ukuran absorpsi cahaya pada panjang gelombang yang tepat. Jumlah protein atau asam nukleat dapat diketahui menggunakan alat ini. Protein mempunyai daya serap maksimal pada panjang gelombang 280 nm sedangkan asam nukleat mempunyai daya serap maksimal pada panjang gelombang 260 nm (Karp, 1996).

Metode spektrofotometri didasarkan pada interaksi antara energi radiasi elektromagnetik dengan molekul. Interaksi tersebut menyebabkan penyerapan energi radiasi elektromagnetik dimana serapan ini bersifat spesifik untuk setiap molekul. Prinsip pengukuran spektrofotometer yaitu : sinar yang berasal dari sumber radiasi menuju monokromator dan mengubah radiasi menjadi komponen-komponen dengan panjang gelombang tunggal, kemudian melewati tempat cuplikan (transparan), yang berisi sampel air (larutan jernih). Sebagian radiasi akan diserap oleh molekul yang akan mengakibatkan molekul dalam sampel mengalami transisi elektronik dari tingkat rendah menuju tingkat yang lebih tinggi. Sebagian radiasi yang lainnya ditransmisikan melalui detektor terlebih dahulu melalui filter yang berfungsi sebagai penyaring (Bowen, 2000).

2.6 Elektroforesis Gel Agarose

Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan dan memurnikan fragmen-fragmen DNA ataupun RNA (*Ribose Nucleid Acid*). Prinsip elektroforesis adalah memisahkan molekul berdasarkan muatannya. DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke arah kutub positif selama elektroforesis. Fragmen DNA mempunyai muatan negatif yang sama untuk tiap-tiap ukuran panjang, sehingga pergerakan DNA ini akan memiliki kecepatan yang sama untuk mencapai kutub positif. Pergerakan yang sama antar molekul DNA ini tidak akan dapat digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan ukurannya. Hal inilah yang menyebabkan digunakannya gel untuk memperlambat pergerakan DNA. Gel ini merupakan polimer sehingga akan membentuk semacam jaring-jaring sebagai perangkap DNA. DNA dengan ukuran yang lebih besar akan lebih sulit melewati lubang atau pori dari gel, sehingga DNA dengan sendirinya akan terpisah berdasarkan besarnya ukuran karena kemampuan dari DNA yang berbeda-beda dalam melewati pori dalam gel (Clark dan Russel, 2005). Fragmen DNA yang lebih kecil berat molekulnya akan berjalan lebih cepat daripada molekul DNA yang lebih besar (Patel, 1998).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan perpindahan DNA pada elektroforesis gel agarose, antara lain ukuran molekul DNA, konsentrasi agarose, voltase yang diberikan, komposisi buffer elektroforesis. Agarose dalam berbagai konsentrasi mampu memisahkan asam nukleat dengan ukuran 200 sampai dengan 50000 pasang basa (Fegan, 1995). Kemampuan pemisahan DNA pada berbagai konsentrasi agarose tersaji dalam tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kemampuan pemisahan DNA pada berbagai konsentrasi agarose (Fegan, 1995):

% gel agarose	Batas pemisahan DNA (kbp)
0,5	1-30
0,7	0,8-10
1,0	0,5-8
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Pita DNA dapat dideteksi dalam gel yang menggunakan pewarna *Etidium Bromida* (EtBr) (Patel, 1998). Menurut Boyer (1993) bahwa asam nukleat dapat ditampilkan pada gel agarose yang telah dicampur pewarna EtBr. Hasil pewarnaan ditunjukkan dengan penguatan fluoresensi warna orange-merah pada gel yang mengandung asam nukleat setelah gel tersebut diradiasi dengan sinar ultra violet.

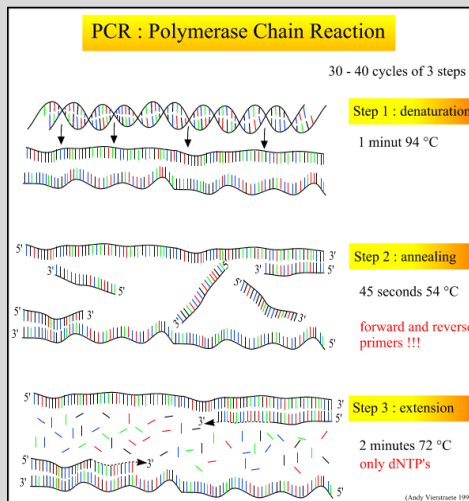
2.7 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Polymerase chain reaction merupakan suatu metode untuk mengamplifikasi urutan DNA secara *in vitro* sehingga memungkinkan sejumlah kecil sekuen DNA tertentu disalin (jutaan kali) untuk diperbanyak, atau dimodifikasi secara tertentu (Fatchiyah, 2006). Selanjutnya membentuk banyak untai DNA baru yang identik dengan DNA *original* (Weaver, 2001). Hasil dari reaksi PCR yang pertama digunakan sebagai urutan target untuk reaksi PCR yang berikutnya sehingga hasil akhir PCR yang didapatkan mempunyai spesifitas yang tinggi (Kirk dan Monson, 1993). Secara teoritik, jika efisiensi reaksi pelipatgandaan seratus persen, dalam putaran ke-30 siklus reaksi rantai (denaturasi-penempelan-perpanjangan) PCR akan dihasilkan sebanyak kurang lebih satu milyar molekul DNA target (Sentrabd, 2007).

Salah satu komponen penting dalam reaksi PCR adalah penggunaan DNA primer. DNA primer adalah suatu urutan oligonukleotida dengan panjang tertentu yang berfungsi untuk mengawali suatu proses amplifikasi (Bentley, 1995). Urutan oligonukleotida dipilih sehingga setiap nukleotidanya mempunyai pasangan basa komplementer dengan masing-masing urutan nukleotida pada DNA target, sehingga pada saat proses amplifikasi tiap primer akan membentuk hibrid dengan DNA target (Arnheim dan Levenson, 1990). Beberapa hal penting yang perlu diperhatikan dalam merancang suatu primer oligonukleotida, meliputi panjang suatu primer antara 18-28 nukleotida (Boehringer, 1995), harus mempunyai persentase kandungan GC berkisar antara 50-60 %, mempunyai temperatur *melting point* (T_m) antara 55-80 °C (Innis, dkk, 1995), pada ujung 3' dari masing-masing primer tidak terdapat pasangan basa yang komplementer karena dapat memicu pembentukan artifak primer-dimer (Sardelli dan Williams, 1994). Konsentrasi primer berkisar 0,1-0,5 μM . Konsentrasi primer yang

tinggi dapat menyebabkan kesalahan dalam pengenalan dan penumpukan produk tidak spesifik (Innis dkk., 1995). Sebaliknya jika konsentrasi primer terlalu rendah maka primer akan habis sebelum reaksi selesai dengan sempurna yang akan menghasilkan produk yang sedikit (Boehringer, 1995).

Dalam satu siklus amplifikasi terdapat tiga proses yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi, seperti terlihat dalam gambar 2.5. Sebelum siklus dimulai terlebih dahulu diprogram *hot start* pada suhu 94°C selama dua menit untuk memaksimalkan denaturasi awal DNA dan mencegah ikatan yang tidak spesifik antara primer dengan DNA non target (Finckh dan Rolfs, 1995).



Gambar 2.5 Tahapan amplifikasi DNA dalam PCR (Ugent, 1999).

Tahap pertama pada setiap siklus adalah denaturasi. Menurut Fessenden (1997), denaturasi adalah proses membukanya rantai ganda DNA menjadi rantai-rantai komplementernya. Pemisahan ini bertujuan untuk memberi kesempatan pada primer untuk melakukan pengenalan dan penempelan pada daerah yang dikehendaki.

Tahap yang kedua adalah *annealing* atau penempelan primer pada DNA target. Pada tahap ini terjadi pencarian urutan basa komplementer oleh primer pada DNA *template* sampai primer menemukan urutan basa komplementer yang sesuai dengan basa-basa yang terdapat pada primer (Promega, 1996). Urutan primer merupakan pasangan basa komplementer dari urutan pada DNA target

sehingga tiap nukleotida dari primer akan berpasangan dengan nukleotida dari DNA target (Arnheim dan Levenson, 1990). Pada *annealing* terjadi penurunan suhu sehingga primer mampu melakukan penempelan pada DNA template yang spesifik sampai membentuk gabungan yang stabil dengan pita tunggal DNA dan mengandung primer untuk mensintesis DNA baru dengan bantuan taq polimerase (Promega, 1996).

Tahap ketiga adalah ekstensi, pada tahap ini terjadi pemanjangan primer dengan penambahan dNTP pada ujung 3' dengan bantuan enzim taq DNA polimerase sampai terbentuk rantai DNA baru yang komplementer dengan rantai DNA yang lama (Arnheim dan Levenson, 1990). Menurut Bentley (1995) temperatur pada tahapan ekstensi yang optimal adalah 72⁰C selama 60 detik. Pada temperatur ini taq DNA polimerase menjadi aktif sehingga rantai yang terbentuk diharapkan maksimal.

Tahapan akhir dari proses PCR yaitu *post PCR* pada suhu 72⁰C selama lima menit agar ikatan heliks ganda hasil amplifikasi dapat lebih melekat. Produk PCR merupakan segmen DNA berjumlah jutaan kopi dan tidak dapat dilihat tanpa alat bantu, oleh karena itu perlu dilakukan identifikasi fragmen DNA dengan elektroforesis gel agarosa konsentrasi 2% yang bertujuan memvisualisasikan produk PCR sekaligus bertujuan mengetahui apakah produk yang dihasilkan adalah sesuai dengan yang diinginkan (Saiki, 1990).

2.8 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Teknik RFLP merupakan teknik dalam biologi molekuler yang menggunakan enzim restriksi untuk memotong sekuen DNA. Pemotongan terjadi pada lokasi yang spesifik yang dikenal khas oleh enzim restriksi. Prinsip dalam RFLP adalah jika terdapat perbedaan pada level DNA maka panjang fragmen yang terbentuk akan bervariasi antara satu spesies dengan yang lain atau antar individu dalam satu spesies (Becker dkk., 2000). Pola yang dihasilkan dapat digunakan untuk membedakan spesies bahkan sampai tingkat *strain* dari satu spesies dengan spesies lainnya, mengidentifikasi dan mengetahui kekerabatan individu (Tamarin, 2002).

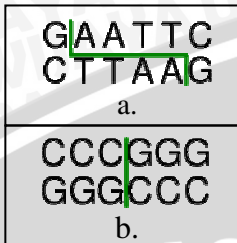
Teknik RFLP telah banyak digunakan untuk menentukan variasi gen suatu spesies. Aplikasi dari variasi genetik ini dapat digunakan untuk identifikasi hewan dan analisis silsilah (*pedigree*), pemetaan gen dan identifikasi penanda gen yang mengendalikan sifat-sifat yang

diinginkan (Sutarno, 2004). Teknik RFLP juga dapat digunakan menduga hubungan kekerabatan dari beberapa individu, menduga keberadaan variasi genetik dari koleksi plasma nutfah, memantau kemurnian benih hibrida, memantau proses seleksi berbagai karakter agronomis penting, memilih komponen genetik dari karakter kuantitatif dan menganalisis gen yang berasal dari proses transformasi genetik (Sianipar, 2003). Sementara itu Sutarno (2004), menggunakan teknik RFLP ini untuk melihat polimorfisme gen hormon pertumbuhan pada 115 sapi Benggala. Sedangkan Widayadi (2006), menggunakan teknik RFLP untuk mengidentifikasi polimorfisme gen hormon pertumbuhan *GHE5* pada sapi Madura.

Enzim restriksi secara alami diproduksi oleh bakteri (Russell, 2000). Salah satu contoh enzim restriksi adalah *EcoR1* yang diekstrak dari strain bakteri *E. coli* sebagai respon dari serangan bakteriofage. Enzim ini berfungsi untuk melindungi bakteri dari parasit virus, yang disebut bakteriofage. Kemudian oleh manusia dimanfaatkan untuk memotong sekuen DNA (Hill, 2007).

Enzim-enzim restriksi mempunyai sisi pemotongan spesifik yang membedakan satu enzim dengan enzim yang lainnya. Sisi pemotongan enzim restriksi biasanya pada panjang 4-8 bp. Enzim restriksi digolongkan dalam 3 sistem yaitu tipe I, II, dan III, untuk kebanyakan aplikasi bioteknologi tipe II sering dibutuhkan karena memotong pada sekuen yang spesifik (Becker dkk., 2000). Tipe I dan III memotong DNA pada tempat yang berbeda dari tempat pengenalan sehingga menyebabkan pola potongan yang acak dan tidak dapat diramalkan. Enzim restriksi tipe II memotong DNA pada tempat yang spesifik dari tempat pengenalan sehingga pola pemotongan dapat diramalkan (Tamarin, 2002).

Ujung pemotongan DNA dengan enzim restriksi dibedakan menjadi dua yaitu *sticky end* dan *blunt end* (gambar 2.6). Ujung tumpul (*blunt end*) berarti memotong pada ujung yang sama sedangkan ujung bergerigi (*sticky end*) berarti memotong pada ujung yang berbeda. Ujung pemotongan DNA yang sering digunakan untuk teknik rekayasa genetika adalah *sticky end*. Hal ini disebabkan ujung untai tunggal DNA pada masing-masing fragmen dapat kembali berekatan dengan ujung lain yang dihasilkan dari hasil pemotongan dengan enzim restriksi yang sama (Becker dkk., 2000).



Gambar 2.6 Pola pemotongan *sticky end* dengan *EcoRI* (a) dan *Blunt end* dengan *SmaI* (b) (Weaver, 2003).

Menurut Colorado State University (2000), kerja enzim restriksi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu : komposisi buffer, suhu inkubasi dan *star activity*. Komposisi buffer mempunyai perbedaan untuk enzim yang berbeda sehingga ketidaktepatan penggunaan buffer pada enzim berpengaruh terhadap rendahnya tingkat pemotongan enzim. Suhu inkubasi mempunyai suhu paling tepat 37°C. Sedangkan enzim yang diisolasi dari bakteri termofilik akan memotong pada suhu 50-65°C. *Star activity* berupa DNA terpotong pada daerah yang lain dengan pemotongan normal, contohnya enzim *EcoRI* yang memotong G*AATTC pada kondisi tidak normal maka akan memotong urutan basa yang telah mengalami substitusi dari urutan basa normal. Hal ini disebabkan pH terlalu tinggi (lebih dari 8), konsentrasi gliserol lebih dari 5%, konsentrasi enzim terlalu tinggi dan adanya pelarut organik seperti ethanol.

Sebuah enzim restriksi akan memotong setiap molekul *double helix* DNA menjadi sejumlah fragmen. Dengan membandingkan ukuran fragmen-fragmen DNA tersebut dapat dibuat sebuah peta restriksi untuk daerah yang memperlihatkan lokasi setiap tempat pemotongan (Albert dkk., 1994). Sisi pemotongan setiap enzim restriksi berbeda-beda seperti tampak pada tabel 2.2 berikut :

Tabel 2.2 Jenis enzim dan sisi pemotongannya (Becker, dkk., 2000).

Enzim restriksi	Sisi pemotongan pada untai DNA
BamHI	G*GATCC
EcoRI	G*AATCC
<i>HaeIII</i>	GG*CC
HindIII	A*AGCTT
PstI	CTGCA*G
SacI	C*TCGAC

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2008 sampai bulan Desember 2008. Analisis sampel secara molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Sampel Penelitian

Sampel darah sapi LIMPO didapatkan dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Krian, Sidoarjo. Sebanyak 10 sampel darah sapi LIMPO akan dianalisis gen *DGATI*-nya. Sampel darah tersebut telah diketahui tingkat marblingnya berdasarkan penelitian sebelumnya, yaitu *grade 1* (kualitas 1) dengan kandungan *marbling* sangat tipis dan *grade 2* (kualitas 2) dengan kandungan *marbling* yang tipis (Susilo, dkk, 2007). Sampel-sampel tersebut dikelompokkan dalam kualitas 1 (sampel 1-5) dan kualitas 2 (sampel 6-10).

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat Penelitian

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu termos es, tabung vacutainer ber-EDTA (*Vacuette*), tabung polipropilen, *microtube* 1500 μL (*Eppendorf*), mikropipet 1000 μL ; 2-200 μL ; 5-40 μL ; 0.5-10 μL (*Vinnpipette Labsystem*), tips kuning dan biru, oven, inkubator, *freezer*, *refrigerator*, erlenmeyer, labu ukur, gelas piala, neraca analitik digital (Sartorius), vortek, *magnetic stirrer* (*Heidolph*), *microwave*, sentrifus (Karl Golb), mikrosentrifus dingin (*refrigerated centrifuge Micro22R*), spektrofotometer UV-Vis (Genesis), 1 set *agarose electrophoresis chamber* (Biorad), UV-transluminator, kamera polaroid.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu darah sapi LIMPO. Bahan kimia yang digunakan yaitu RBC *lysis solution* (NH_4Cl , KHCO_3 , 0,5mM EDTA), *Cell Lysis Solution* {1M Tris-Cl,

0,5 M EDTA, 20% SDS (*sodium dedocyl sulfate*), *Protein Precipitation* (Amonium asetat), bufer TE (10mM Tris-Cl, 1 mM EDTA), etanol absolut, etanol 70%, SDS (*sodium dedocyl sulfate*), agarosa, ethidium bromida (EtBr), *loading dye* (gliserol 87%, 0,5M EDTA, bromophenol *blue*), bufer TBE (Tris-HCl, Asam Borat, Na₂EDTA), dan enzim restriksi *HaeIII*, bufer enzim, BSA (*Bovine Serum Albumin*), aquades, aquabides.

3.4 Isolasi Leukosit dari Sampel Darah

Darah sapi LIMPO diambil dari *vena jugularis*. Darah masing-masing 3 ml dimasukkan ke dalam tabung polipropilen dan ditambah RBC *lysis solution* 1X sebanyak 9 ml atau perbandingan 1:3, tabung dibolak-balik, diinkubasi selama 10 menit dan disentrifus dengan kecepatan ± 2000 rpm selama 10 menit. Prosedur ini dilakukan 2-4 kali atau sampai warna merah hilang atau dihasilkan populasi leukosit berupa pelet warna putih.

3.5 Isolasi DNA dari Leukosit

Pelet yang berupa leukosit ditambah dengan 750 μ l *cell lysis solution* dihomogenkan dengan cara *pipetting*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambah *protein precipitation* (amonium asetat) sebanyak 500 μ l, divortek dan di sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan yang didapatkan di pindah ketabung baru kemudian ditambah ethanol absolut dingin sampai mencapai leher tabung, tabung di bolak-balik 25-30 kali sampai terlihat benang-benang halus berwarna putih (DNA), selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang, pelet kemudian ditambah etanol 70% dingin sampai leher tabung, dibolak-balik beberapa kali dan disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Diambil pelet dan dikering-anginkan pada suhu ruang sampai etanol menguap (kering). Pelet ditambahkan 100 μ l TE bufer, untuk selanjutnya dilakukan penyimpanan pada suhu -20°C atau langsung digunakan dalam prosedur selanjutnya. Prosedur dari Sambrook dan Russel (2001) yang telah dimodifikasi.

3.6 Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA

3.6.1 Uji Kuantitatif DNA

Uji kuantitatif DNA dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer. DNA yang didapatkan dihitung nilai absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 260 nm dan 280 nm. Secara umum, formula yang digunakan untuk mengukur konsentrasi DNA dengan alat spektrofotometer adalah sebagai berikut (Sambrook dan Russel, 2001) :

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times \text{FP} \times 50 \mu\text{g/ml}$ (untuk DNA untai ganda).

Dimana:

A_{260} = Nilai OD_{260} pada larutan DNA yang diukur.

FP = faktor pengenceran.

50 = OD_{260} sama dengan 1 maka setara dengan 50 $\mu\text{g/ml}$.

Sedangkan kemurnian diukur dengan membandingkan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

3.6.2 Uji Kualitatif DNA

Uji kualitatif DNA hasil isolasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarose 0,8%. Langkah-langkahnya adalah terlebih dahulu ditimbang sebanyak 0.24 g agarose dan dilarutkan kedalam 30 ml TBE kemudian dipanaskan sampai melarut seluruhnya, larutan gel didinginkan sampai hangat ($\pm 50^\circ\text{C}$) lalu ditambah *E_tBr* sebanyak 0,2 μl , dan dicetak kedalam cetakan gel yang telah dipasang sisir. Biarkan sampai menjadi gel dan sisir dilepas. Setelah itu gel di pindah ke *electrophoresis chamber* lalu di isi dengan TBE sampai gel terendam. Sebanyak 3 μl sampel DNA hasil isolasi ditambah dengan 2 μl *loading dye*, lalu dimasukkan kedalam sumuran pada gel. Sampel DNA di-*running* pada voltase 100 Volt selama kurang lebih 45 menit Hasil *running* kemudian dipaparkan diatas UV transluminator dan difoto dengan kamera polaroid.

3.7 Amplifikasi Gen *DGAT1*

Amplifikasi gen *marbling* sapi LIMPO dilakukan melalui metode PCR. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer DGAT6829. Primer *forward* DGAT6829F 5'-CTACCGGGACGTCAACCTC-3', sedangkan primer *reverse*

DGAT6829R 5'-GGTTGTCGGGGTAGCTCA-3' (Ge dkk., 2003). PCR dilakukan dengan mencampurkan 6,96 μl *free water nuclease*; 10 μl PCR Mix; 0,32 μl Primer *forward* dan *reverse*; 3 μl DNA. Amplifikasi dilakukan pada alat PCR (*gene cycler*) yang diprogram sesuai dengan pasangan primer yang digunakan. *Gene cycler* diprogram sesuai dengan primer yang digunakan menurut Ge dkk. (2003) yaitu *hot start* pada suhu 94^oC selama 2 menit, denaturasi pada suhu 94^oC selama 60 detik, *annealing* pada suhu 59^oC selama 45 detik, ekstensi pada suhu 72^oC selama 60 detik dan diakhiri dengan *post PCR* pada suhu 72^oC selama 5 menit. Jumlah siklus amplifikasi yaitu 35 siklus. Produk PCR yang dihasilkan dielektroforesis dengan gel agarose 2%. Hasil elektroforesis dipaparkan diatas UV transluminator dan difoto dengan kamera polaroid.

3.8 Pemotongan Pita DNA oleh Enzim *HaeIII*

DNA hasil PCR dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII* yang memiliki sisi pemotongan GG*CC. *Mix* larutan sebanyak 7 μl dibuat dengan mencampurkan 3,5 μl DNA hasil PCR ditambah dengan enzim tersebut sebanyak 10 unit, beserta bufer enzim + BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebanyak 0,5 μl dan 2 μl aquabides (ddH₂O). *Mix* larutan di inkubasi pada suhu 37^oC selama 3 jam, kemudian sampel DNA *dirunning* dengan elektroforesis gel agarose 2%. Hasil *running* dipaparkan diatas UV-transluminator dan difoto dengan kamera polaroid.

3.9 Analisis Data

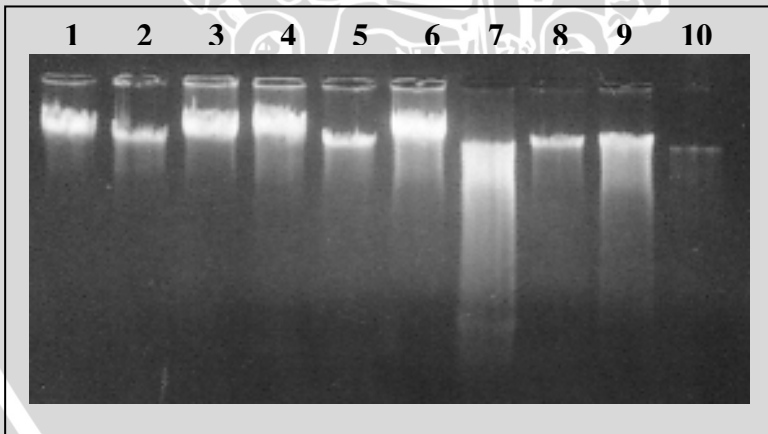
Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan melakukan pengamatan profil pita DNA hasil PCR-RFLP masing-masing sampel pada gel hasil elektroforesis. Selanjutnya dari profil pita DNA hasil PCR-RFLP dianalisis apakah terdapat hubungan antara variasi marbling dengan variasi pola potong pita DNA.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Isolasi DNA Total

Isolasi DNA dari darah sapi LIMPO dilakukan dengan metode *salting out*, yaitu suatu metode pengambilan air hidrasi oleh elektrolit yang menyebabkan destabilisasi koloid hidrofilik. Keunggulan dari metode ini yaitu waktu yang diperlukan selama proses relatif lebih singkat, bahan yang digunakan relatif murah dan mudah didapatkan, selain itu jumlah DNA yang didapatkan juga lebih banyak. Metode *salting out* terdiri dari empat tahapan yaitu pemecahan sel untuk mengeluarkan DNA, inaktivasi enzim yang dapat merusak DNA, disosiasi dan denaturasi protein serta presipitasi DNA (Robyt dan White, 1987).

Hasil dari isolasi DNA tersebut kemudian diuji secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dan kuantitatif dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA. Hasil uji kualitatif DNA total dengan elektroforesis gel agarose 0,8% dapat dilihat pada gambar 4.1 dan hasil uji kuantitatif DNA total dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dapat dilihat pada tabel 4.1.



Gambar 4.1 Hasil elektroforesis DNA total sapi LIMPO; 1-5: sampel kualitas *marbling* 1; 6-10: sampel kualitas *marbling* 2

Berdasarkan Gambar 4.1 dapat diketahui bahwa pada semua sampel darah sapi LIMPO mengandung DNA dengan beberapa tingkat konsentrasi yang berbeda, yang ditunjukkan dengan adanya variasi ketebalan pita DNA. Menurut Talbot dkk. (2003), semakin tebal pita DNA yang terbentuk pada gel maka semakin tinggi konsentrasi DNA tersebut. Adanya *smear* pada hasil isolasi DNA menunjukkan molekul DNA yang telah terfragmentasi atau dapat juga mengindikasikan adanya kontaminasi berupa RNA. Menurut Smith dkk. (1993), *smear* terjadi karena isolasi DNA yang kurang sempurna atau dengan kata lain DNA masih terkontaminasi oleh RNA. Kontaminasi ini dapat terjadi karena pencucian DNA dengan ethanol 70% kurang maksimal. *Ethidium bromide* selain mengikat DNA, molekul ini juga mengikat asam nukleat lain yaitu RNA sehingga pita RNA akan dapat terlihat pada gel agarose.

Tabel 4.1 Hasil Uji Kuantitas DNA dengan Spektrofotometer

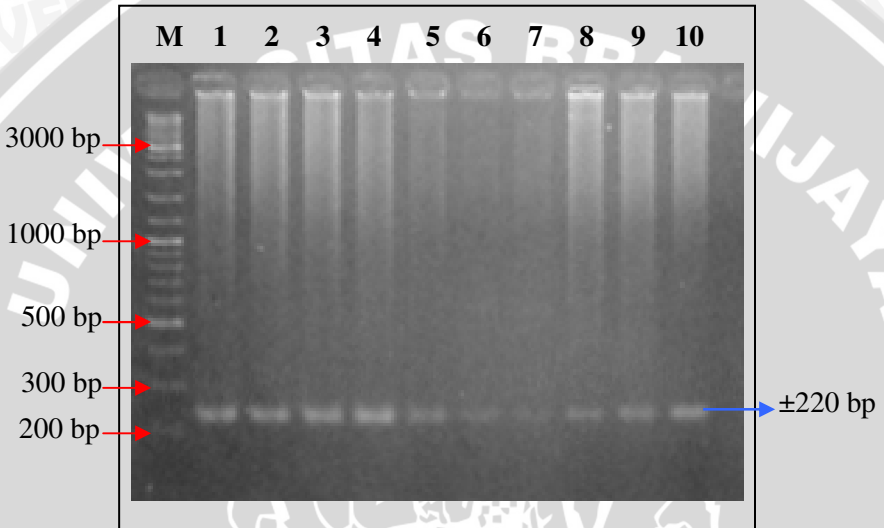
No.	Sampel	Konsentrasi DNA ($\mu\text{g/ml}$)	Kemurnian DNA (A_{260}/A_{280})
1.	Sampel 1	560	1,400
2.	Sampel 2	130	0,144
3.	Sampel 3	560	1,806
4.	Sampel 4	940	1,679
5.	Sampel 5	400	1,667
6.	Sampel 6	670	1,811
7.	Sampel 7	590	2,107
8.	Sampel 8	430	1,325
9.	Sampel 9	600	1,538
10.	Sampel 10	440	1,000

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa DNA sampel 1, 2, 4, 5, 8, 9, dan 10 masih terkontaminasi oleh protein karena nilai rasio A_{260}/A_{280} kurang dari 1,8. Sedangkan sampel 7 terkontaminasi oleh RNA dengan rasio A_{260}/A_{280} lebih dari 2. DNA sampel 3 dan 6 memiliki kemurnian yang baik karena nilai rasio A_{260}/A_{280} antara 1,8-2,0. Menurut Smith dan Wood (1991) bahwa tingkat kemurnian DNA yang baik adalah berkisar antara 1,8-2,0. Rasio yang kurang dari 1,8 menunjukkan bahwa sampel DNA masih terkontaminasi oleh

protein. Sedangkan rasio yang lebih dari 2 menunjukkan bahwa sampel DNA masih terkontaminasi oleh RNA.

4.2 Hasil Amplifikasi Gen *DGAT1*

Hasil amplifikasi gen *DGAT1* sapi LIMPO yang dikonfirmasi dengan elektroforesis gel agarose 2% terlihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil amplifikasi gen *DGAT1*; 1-5: sampel kualitas *marbling* 1; 6-10: sampel kualitas *marbling* 2

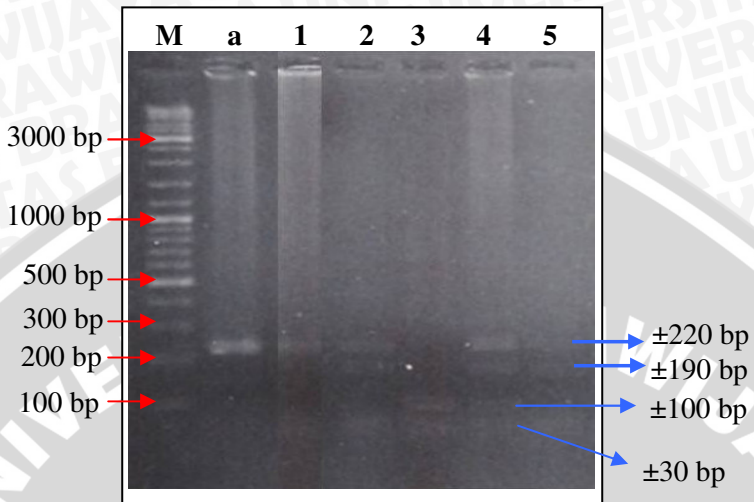
Berdasarkan Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa pasangan primer DGAT6829 dapat secara spesifik mengamplifikasi fragmen gen *DGAT1*. Hasil amplifikasi ditunjukkan dengan terbentuknya satu pita DNA yang mempunyai ukuran ± 220 bp (pasangan basa). Hasil amplifikasi tersebut sesuai dengan ukuran sekuen pasangan basa primer DGAT6829 yang terletak pada regulator gen *DGAT1* (lampiran 10), yaitu pada urutan 10260-10481 atau sekitar 222 bp. Menurut Fatchiyah (2006) bahwa Reaksi polimerase berantai atau dikenal sebagai PCR merupakan suatu metode untuk mengamplifikasi urutan DNA nukleotida secara *in vitro* sehingga memungkinkan sejumlah kecil sekuen DNA tertentu disalin (jutaan kali) untuk diperbanyak, atau dimodifikasi secara tertentu. Kirk dan Monson (1993) menyatakan bahwa hasil dari reaksi PCR yang

pertama digunakan sebagai urutan target untuk reaksi PCR yang berikutnya sehingga hasil akhir PCR yang didapatkan mempunyai spesifitas yang tinggi.

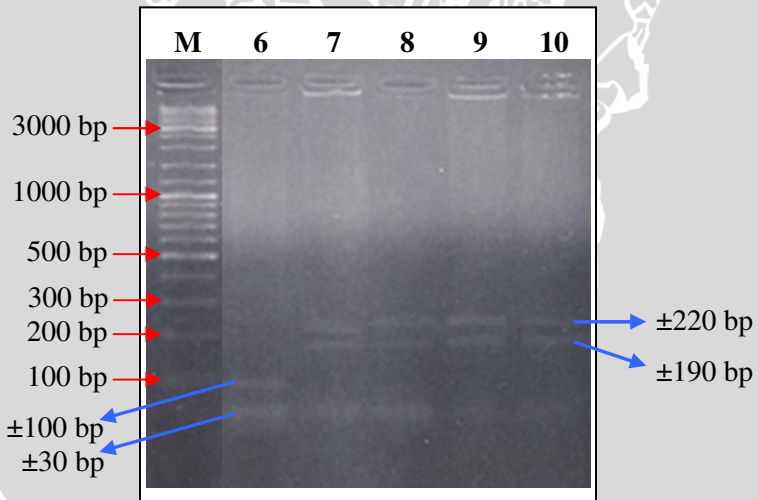
Pasangan primer DGAT6829 tersebut telah digunakan dalam penelitian yang dilakukan oleh Casas dkk. (2005) untuk mengidentifikasi daerah non-konservatif K232A pada *Bos taurus* yang terletak pada posisi basa 6829 dan 6830. Primer DGAT6829 memiliki sekuen dengan ukuran 19 bp dengan komposisi G+C sebesar $\pm 63\%$ dan temperatur *melting* (T_m) sebesar $\pm 62^\circ\text{C}$. Ketepatan pemilihan primer untuk PCR harus memenuhi beberapa hal yaitu primer disusun dari oligonukleotida sepanjang 18-28 nukleotida (Boehringer, 1995), harus mempunyai persentase kandungan GC yang tinggi berkisar antara 50-60 %, mempunyai temperatur *melting point* (T_m) antara $55-80^\circ\text{C}$ (Innis dkk., 1995), pada ujung 3' dari masing-masing primer tidak terdapat pasangan basa yang komplementer (Sardelli dan Williams, 1994).

4.3 Analisis Polimorfisme Gen *DGAT1*

Variasi gen *DGAT1* dapat dilihat dari hasil pola potong pita DNA dengan enzim restriksi. Gen *DGAT1* hasil PCR dipotong menggunakan enzim *HaeIII* yang merupakan enzim restriksi yang bersifat umum sehingga mudah mengenali sisi pemotongan. Enzim *HaeIII* merupakan enzim yang mengenali sisi pemotongan pada sekuen GG*CC dengan tipe pemotongan *blunt end*, yaitu tipe pemotongan yang menghasilkan sekuen dengan ujung yang tumpul karena pemotongannya bersifat simetris (Becker dkk., 2000). Hasil pemotongan oleh enzim *HaeIII* menghasilkan pola potongan pita DNA seperti yang tampak pada gambar 4.3 dan gambar 4.4.

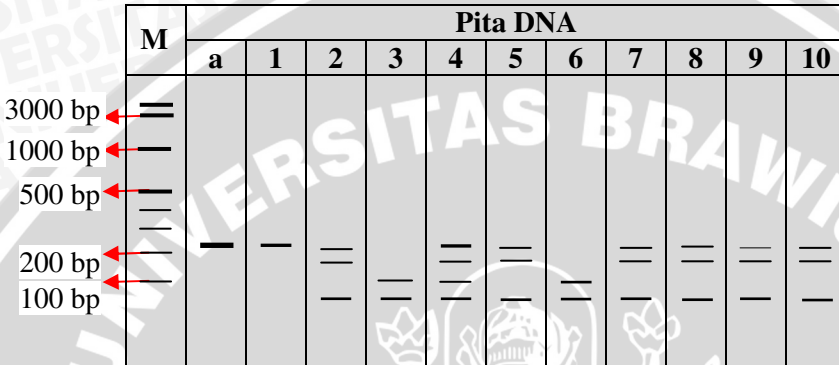


Gambar 4.3 Pola potongan pita DNA dengan teknik PCR-RFLP pada kualitas *marbling* 1. M: Marker (DNA Ladder 100 bp), a: *uncut* (fragmen DNA hasil PCR yang tidak dipotong enzim restriksi), 1-5: sampel kualitas 1



Gambar 4.4 Pola potongan pita DNA dengan teknik PCR-RFLP pada kualitas *marbling* 2. M: Marker (DNA Ladder 100 bp), 6-10: sampel kualitas *marbling* 2

Berdasarkan gambar 4.3 dan gambar 4.4, enzim *Hae*III mampu memotong gen *DGAT1* dengan beberapa variasi pola pemotongan pita DNA. Posisi pita dan ukuran potongan pita DNA hasil PCR-RFLP disajikan dalam gambar 4.5.



Gambar 4.5 Zimogram pola potongan pita DNA dengan teknik PCR-RFLP. M: Marker (DNA *Ladder* 100 bp), a: *uncut* (fragmen DNA hasil PCR yang tidak dipotong enzim restriksi), 1-5: sampel kualitas *marbling* 1, 6-10: sampel kualitas *marbling* 2.

Pola potongan pita DNA berdasarkan gambar 4.5, dapat dikelompokkan dalam 4 pola potongan (haplotip), antara lain haplotip 1 dengan satu fragmen (220 bp), haplotip 2 dengan dua fragmen (100 dan 30 bp), haplotip 3 dengan tiga fragmen (220, 190 dan 30 bp), dan haplotip 4 dengan empat fragmen (220, 190, 100 dan 30 bp). Sebagian dari DNA hasil amplifikasi ada yang tidak terpotong dengan ditandai besarnya berat molekul fragmen (haplotip 1) tersebut sama dengan besarnya berat molekul dari DNA PCR yang tidak dipotong, yaitu sebesar 220 bp. Hal ini dapat disebabkan pada sampel DNA tersebut tidak mempunyai sisi pemotongan GG*CC sehingga enzim *Hae*III tidak dapat memotongnya. Menurut Becker dkk. (2000), sebab lain adalah enzim restriksi *Hae*III memiliki sisi pemotongan *blunt end*. Sifat dari sisi pemotongan tersebut tidak dapat melakukan inaktivasi DNA sehingga sebagian DNA hasil potongan akan melekat kembali pada posisi awal pemotongan. Adanya variasi pola potongan pita DNA tersebut menunjukkan adanya polimorfisme dalam gen *DGAT1*.

Polimorfisme yang terjadi pada gen *DGAT1* sapi LIMPO ini dapat terjadi karena adanya perubahan susunan basa dalam DNA dari gen *DGAT1* tersebut. Menurut Grisart dkk. (2004) menyatakan bahwa adanya polimorfisme dari gen *DGAT1* pada sapi *Black-and-White Holstein-Friesian* terjadi karena adanya mutasi pada daerah non-konservasi K232A yang menyebabkan variasi pada deposisi *marbling*.

Polimorfisme yang terdapat pada gen dapat juga dipengaruhi oleh tinggi rendahnya perkawinan acak, migrasi, dan seleksi di dalam populasi sapi tersebut. Menurut Helyanto dkk. (2000), apabila suatu karakter memiliki keragaman genetik cukup tinggi, maka setiap individu dalam populasi hasilnya akan tinggi pula, sehingga seleksi akan lebih mudah untuk mendapatkan sifat-sifat yang diinginkan. Oleh sebab itu, informasi keragaman genetik sangat diperlukan untuk memperoleh sifat-sifat baru yang diharapkan. Hubungan antara polimorfisme gen *DGAT1* dengan *grade marbling* pada sapi LIMPO dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data hasil PCR-RFLP gen *DGAT1* pada sapi LIMPO dan hubungannya dengan kualitas *marbling*

No	Kualitas	Sampel	Pola Potongan	Ukuran Fragmen DNA (bp)			
				220	190	100	30
1	1	1	Haplotip 1	*	—	—	—
2		2	Haplotip 3	*	*	—	*
3		3	Haplotip 2	—	—	*	*
4		4	Haplotip 4	*	*	*	*
5		5	Haplotip 3	*	*	—	*
6	2	6	Haplotip 2	—	—	*	*
7		7	Haplotip 3	*	*	—	*
8		8	Haplotip 3	*	*	—	*
9		9	Haplotip 3	*	*	—	*
10		10	Haplotip 3	*	*	—	*

Haplotip 1 : satu fragmen DNA,
Haplotip 2 : dua fragmen DNA,

Haplotip 3 : tiga fragmen DNA
Haplotip 4 : empat fragmen DNA

Berdasarkan tabel 4.2 dapat diketahui bahwa sampel DNA pada kualitas 1 terdiri dari satu sampel dengan haplotip 1 (sampel 1), satu sampel dengan haplotip 2 (sampel 3), satu sampel haplotip 3 (sampel 2 dan 5) serta satu sampel haplotipe 4 (sampel 4). Sedangkan, sampel DNA pada kualitas 2 terdiri dari satu sampel dengan haplotip 2 (sampel 6) dan empat sampel dengan haplotip 3 (sampel 7, 8, 9 dan 10). Variasi pola potongan baik pada *grade 1* maupun *grade 2* tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat pola potong DNA yang khusus pada masing-masing kualitas *marbling*. Tidak adanya pola khusus tersebut menunjukkan bahwa adanya polimorfisme gen *DGAT1* tidak berhubungan dengan kualitas *marbling* pada sapi LIMPO. Hal ini dapat disebabkan oleh posisi primer DGAT6829 yang dipakai yaitu pada urutan basa 10260-10481 dari regulator gen *DGAT1* (NCBI, 2006), merupakan sebagian ekson dan sebagian intron. Menurut Yuwono (2005) bahwa intron merupakan sekuen DNA yang tidak mengekspresikan suatu gen. Sehingga polimorfisme gen *DGAT1* yang ada pada penelitian ini tidak berhubungan dengan ekspresi dari *marbling* daging.

Polimorfisme gen *DGAT1* yang terdapat pada penelitian ini belum dapat menjelaskan hubungannya dengan variasi kualitas *marbling*. Hal ini tidak sesuai dengan hasil dari penelitian yang dilakukan oleh Thaller dkk. (2003) bahwa terdapat polimorfisme gen *DGAT1* antara sapi *German Holstein* yang memiliki kandungan *marbling* tinggi dengan sapi *German Holstein* yang memiliki kandungan *marbling* rendah. Moore dkk. (2003) menyebutkan bahwa deposisi *marbling* tergantung pada alel yang mengkode alanin dan lisin pada posisi basa 232 dari gen *DGAT1*. Keberadaan alel yang mengkode lisin (K) terbukti berkaitan dengan meningkatnya deposisi *marbling* daripada keberadaan alel pengkode alanin (A) yang berhubungan dengan menurunnya deposisi *marbling*. Sementara itu, Thaller dkk. (2003) mengungkapkan bahwa SNP (*single nucleotide polymorphism*) pada daerah non-konservasi K232A gen *DGAT1* menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan deposisi lemak dengan adanya alel pengkode lisin pada daerah tersebut. Sedangkan Winter dkk. (2002) mengungkapkan bahwa terdapat hubungan antara variasi gen *DGAT1* dengan variasi pada *marbling* yang disebabkan oleh substitusi K232A.

Perbedaan hasil ini dapat disebabkan oleh beberapa keadaan, baik secara genetis maupun secara lingkungan. Menurut Rachman

(1996) menyebutkan bahwa performans atau penampilan individu ditentukan oleh dua faktor, yaitu faktor genetik dan faktor lingkungan. Faktor genetik ditentukan oleh susunan gen dan kromosom yang dimiliki oleh suatu individu sedangkan faktor lingkungan bergantung pada kapan dan dimana individu tersebut berada. Alveoli (2008) menyebutkan bahwa kedua faktor tersebut saling berinteraksi dan saling mendukung dalam meningkatkan dan mempertahankan produktivitas ternak. Faktor genetik adalah kemampuan yang bersifat baka (tidak berubah selama hidupnya) yang dimiliki seekor ternak untuk tampil maksimal, sedangkan lingkungan merupakan kesempatan yang dimiliki ternak untuk mendukung potensial genetik yang dimilikinya.

Secara genetis, trigliserida yang merupakan komposisi utama penyusun *marbling*, tidak hanya dipengaruhi oleh keberadaan gen *DGAT1*. Gen-gen lain yang dapat mempengaruhi deposisi trigliserida, antara lain adalah gen *GPAT* (*glycerol-3-phosphate acyltransferase*), *AGPAT* (*1-Acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase*), *PPH-1* (*phosphatidate phosphohydrolase 1*), *MGAT* (*monoacylglycerol acyltransferase*) dan *DGAT2* (*diacylglycerol acyltransferase 2*). Gen-gen tersebut merupakan gen-gen yang mengkode enzim (selain *DGAT1*) yang berperan dalam sintesis trigliserida (Gladstone, 2002).

BAB V PENUTUP

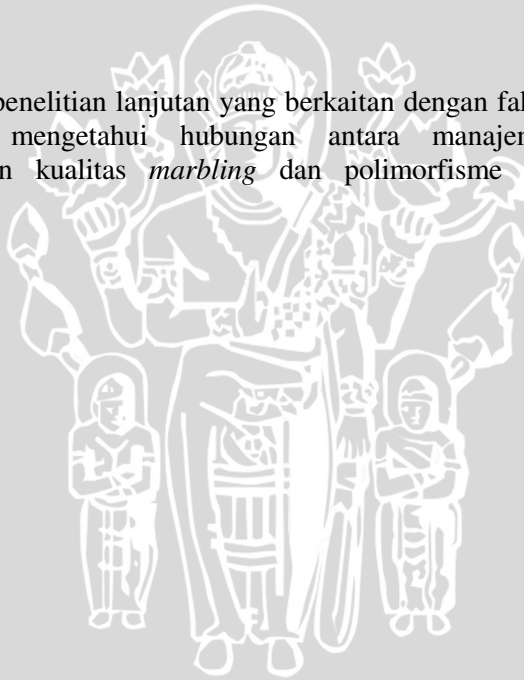
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Terdapat polimorfisme gen *DGAT1* pada sapi LIMPO yang nampak pada hasil PCR-RFLP dengan menggunakan enzim *HaeIII*.
2. Tidak terdapat hubungan antara pola potongan pita DNA hasil PCR-RFLP yang menggunakan enzim *HaeIII* dengan kualitas *marbling*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang berkaitan dengan faktor lingkungan untuk mengetahui hubungan antara manajemen pemeliharaan dengan kualitas *marbling* dan polimorfisme gen *DGAT1*.



DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., D. Bray, J. Kewis., M. Raff, K. Roberts dan J. D. Watson. 1994. Biologi Molekuler Sel edisi kedua, Penerjemah AT Kantjono W. Penerbit Gramedia. Jakarta.
- Amin. 2003. Efisiensi Reproduksi Sapi Hasil Silangan Antara Limousin dan PO Pada Keturunan F1 Dan F2. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Anonimous. 2008. Info Bakalan Sapi. <http://www.kampoengternak.or.id/images/limpo.jpg>. Tanggal Akses 3 Januari 2008.
- Arnheim, N. dan C. H. Levenson. 1990. Polymerase Chain Reaction in Special Report. C and CN. Washington DC. Hal: 36-47.
- Aryogi, S. Umadi, dan W. H. Ardjosubroto. 2005. Performans Sapi Silangan Peranakan Ongole di Dataran Rendah (Studi Kasus di Kecamatan Kota Anyar Kabupaten Probolinggo Jawa Timur). <http://peternakan.litbang.deptan.go.id/publikasi/semnas/pro05-12.pdf>. Tanggal Akses 3 Januari 2008.
- Astawan, M. 2007. Mengapa Kita Perlu Makan Daging. <http://www.depkes.go.id/index>. Tanggal akses 15 November 2007.
- Barendse, W. 1999. Asseseing Lipid Metabolism. International Patent Application, PCT/AU98/00882.
- Becker, W. M. dan L. J. Kleinsonth. 2000. The World of The Cell fourth edition. The Benjamins cummings publishing company. New York.
- Bentley, S. 1995. The Polymerase Chain Reaction in DNA Finger Printing in Plant Pathology; An Introduction, 10th Biennial Australasian Plant pathology Society Conference Workshop Manual. Lincoln University. New Zealand.
- Boehringer, N. 1995. Critical Factors Succesful of PCR in PCR Application Mannual. Boehringer Mannheim. German. Hal : 12-14.

- Bowen, R. 2000. Spectrophotometry. <http://mailto:rbowen.lamar.colostate.edu>. Tanggal akses 22 September 2007.
- Boyer, A. 1993. Modern Experimental Biochemistry, Second Edition. The Benjamin Cumming Publishing. California.
- Bresnick, S. 2003. Intisari Biologi. Alih Bahasa Herlina Y., Handoko., Beatricia I. Santoso. Hiprokrates. Jakarta. Hal. 24.
- Briskey, H.J dan Kauffman, R.G. 1971. The Science of Meat and Meat Products. Editor J.F.Price dan B.S. Schweigert. W.H. Freeman dan Co. San Fransisco.
- Camspec. 2002. Spectrophotometry Innovation Continues. <http://www.health-int.com/images/companies>. Tanggal akses 24 September 2007 pukul 10.05 WIB.
- Casas, E., S. N. White, D. G. Riley, T. P. L. Smith, R. A. Brenneman, T. A. Olson, D. D. Johnson, S. W. Coleman, G. L. Bennett dan C. C. Chase Jr. 2005. Assessment Of Single Nucleotide Polymorphisms In Genes Residing On Chromosomes 14 And 29 For Association With Carcass Composition Traits In Bos Indicus Cattle. *J. Anim. Sci.* 2005. 83:13-19
- Clark, D. P. dan L. D. Russel. 2005. Molecular Biology : Made Simple And Fun. Third Edition. Cache River Press. St. Louis.
- Colorado State University. 2000. Factor Influence Restriction Enzyme Activity. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/cuteffects.html>. Tanggal akses 28 Oktober 2007.
- Enennaam. 2004. Marker-Assisted Selection Backgrounder. http://repositories.cdlib.org/anrec/sfrec/2004_markerassisted_selection_backgrounder/. Tanggal Akses 24 September 2007.
- Fegan, M. 1995. Agarose Gel Elektroforesis. 10th Biennial Australian. Sydney.
- Fessenden, R. J. dan S. Joan. 1997. Dasar-dasar Kimia Organik. Bina rupa aksara. Jakarta. Hal : 681-704.

- Ge, W., M.E. Davis, H.C. Hines, K.M. Irvin, dan R.C.M. Simmen. 2003. Association of Single Nukleotide Polymorphisms in The Growth Hormone and Growth Hormone Receptor genes with Blood Serum Insulin-Like Growth FactorI Concentration and Growth Traits in Angus Cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 641-648.
- Grisart, B., F. Farnir, L. Karim, N. Cambisano, J.J. Kim, A. Kvasz, M. Mni, P. Simon, J. M. Frere, W. Coppieters dan M. Georges. 2004. Genetic and Functional Confirmation of the Casuality of the DGAT1 K232A quantitative Trait Nucleotide in Affecting Milk Yield and Composition. *Proc. Nat.Acad.Sci. USA* 101:2398-2403.
- Halsall. 2002. DNA Model. http://www.mariemontschools.org/halsall/images/dna_molecule.gif. Tanggal Akses 4 Januari 2009.
- Hill, W. 2005. RFLP Definition. <http://vim.cfsan.fda.gov/rflp.html>. Tanggal akses 20 Oktober 2007.
- Innis, M. dan D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCR. Academic Press. New York.
- Karp, G. 1996. Cell and Molecular Biology, Concept and Experiments. John Wiley and Sons. New York.
- Kirk, P. dan R. L. Monson. 1993. Sensitive Sex Determination Assay Applicable to Bovine Embryos Derived from IVM and IVF. *J. Reprod. Fert.*
- Klug, W. S. dan M. R. Cummings. 2002. Essentials of Genetics, Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey. Hal. 196
- Kutsiyah, F. 2002. Analisis Performan reproduksi pada *Crossbred* (Sapi Madura x Sapi Limousin) dan *Purebred* (Sapi Madura) dan performans Produksi Hasil Keturunannya. Tesis Pascasarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Lehninger, A.L. 1994. Dasar-dasar Biokimia. Alih Bahasa: M. Thenewidjaya. Penerbit Erlangga. Jakarta. pp: 138-139.
- NCBI. 2006. *DGAT1* Gene : *Bos taurus*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Tanggal Akses 15 November 2007.

- Nicholl, D. S. T. 2002. An Introduction to Genetic Engineering, Second Edition. Cambridge University Press. Cambridge
- Patel, D. 1998. Gel Electrophoresis. John Wiley & Sons. New York.
- Promega. 1996. PCR Protocols and Reference Guide. Promega corp. USA. Hal : 195.
- Purdue University Animal Science. 2007. Meat Quality and Safety: Meat Marbling. <http://ag.ansc.purdue.edu>. Tanggal akses 1 November 2007.
- Rachman, R. 1996. Genetika Ternak. PT Penebar Swadaya. Jakarta.
- Robynt, I.M and White, B.J. 1987. Biochemical Techniques : Theory and Practice. Brooks/Cole publishing company. California.
- Roe, B. A. 2007. Methods for DNA Isolation. http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_partIII.html . Tanggal akses 23 September 2007.
- Romjali E., Mariyono, D. B. Wijono, dan Hartati. 2007. Pembibitan Sapi Potong. <http://jatim.litbang.deptan.go.id>. Tanggal Akses 3 Mei 2008.
- Russell, J. R. 2000. Fundamentals of Genetics, Second Edition. Addison Wesley Longman, Inc. Benjamin Cummings. San Fransisco. Hal. 299.
- Saiki, R. K. 1990. Amplification of Genomic DNA in PCR Protocols, a Guide to Methods and Application. Academic press Inc. San Diego. Hal : 13-20.
- Sambrook J., dan D. W. Russel. 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Third Ed. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sardelli, S. dan J.F. Williams. 1994. PCR, Technical Information. Perkin-Elmer. USA. Hal: 54-61.
- Seal, I. 2007. DNA Preparation Techniques. <http://www.uci.edu/comments.shtml>. Tanggal akses 22 September 2007.

- Sentrabd. 2007. Pengertian PCR. <http://sentrabd.com/main/info/P3/RTG.htm>. Tanggal akses 10 Oktober 2007.
- Sheeler, P. 1987. Cell And Molecular Biology. John Wiley and Sons. Canada.
- Sianipar, N. 2003. Penggunaan Marker RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Dalam Pemuliaan Tanaman. http://tumoutou.net/702_07134/nessi_sianipar.htm. Tanggal akses 15 November 2007.
- Somantri, I. H., T. J. Santoso, Minantyorini, A. D. Ambarwati, A. M. Sisharmini, dan A. Apriana. 2003. Karakteristik Molekuler Plasma Nuftah Tanaman Pangan. http://biogen.litbang.deptan.go.id/terbitan/prosiding/fulltext_pdf/prosiding2003_66-74_idahanarida.pdf. Tanggal akses 20 Maret 2008.
- Soeparno. 1998. Ilmu dan Teknologi Daging. UGM Press. Yogyakarta.
- Suryanto, D. 2003. Melihat Keanekaragaman Organisme melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler. <http://library.usu.ac.id/download/fmipa/biologi-dwis.pdf>. Tanggal akses 20 Maret 2008.
- Sutarno. 2004. Penyulihan Asam Amino Leucin Oleh Valin Pada Posisi 127 Gen Penyandi Hormon Pertumbuhan Dan Pengaruhnya Terhadap Pertumbuhan Sapi Benggala. Jvet Vol 5(1).
- Taylor, R. E. dan T. G. Field. 2004. Scientific Farm Animal Production. Pearson Prentice Hall. New Jersey. Hal 142.
- Tamarin, R. H. 2002. Principles of Genetics, Seventh Edition. Mc Graw Hill. New York. Hal. 212-217, 378.
- Ugent. 1999. Principle of the PCR. <http://users.ugent.be/avierstr/Principle/seq.html>. Tanggal akses 10 Oktober 2007.
- Watson, J.D dan F.H.C. Crick. 2005. Explaining DNA. <http://folk.uio.no/klaush/watscric.htm>. Tanggal akses 6 Desember 2006.

Weaver, R. F. 2001. *Molecular Biology*, Second edition. Mc Graw Hill Companies Inc. University Of Kansas.

Yuari. 2008. Bangsa-bangsa Sapi Potong di Propinsi Jawa Timur. <http://yuari.wordpress.com/2008/01/10/bangsa-bangsa-sapi-potong-di-provinsi-jawa-timur>. Tanggal Akses 27 April 2008.

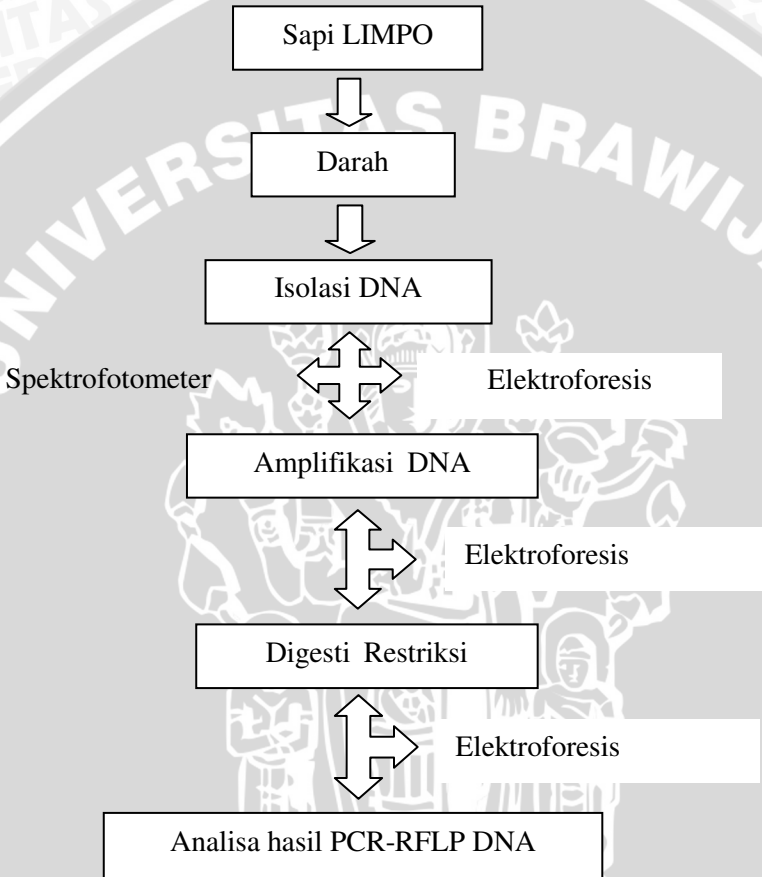
Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Penerbit Erlangga. Jakarta.

Zhang Qing., Ou Jiangtao., He kai., Zhao Sheng dan Zhong Jincheng. 1981. Cloning and sequencing 3', 5'-flanking region of growth hormone gene in yak and PCR-RFLP analysis of genetic polymorphism. *J. Animal Genetic Breeding and Reproduction*. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, Sichuan, P.R. China.



LAMPIRAN

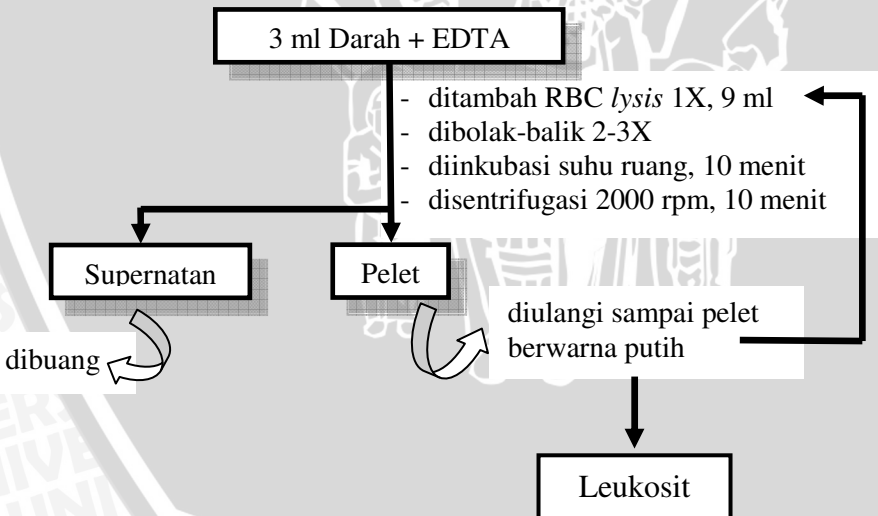
Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian



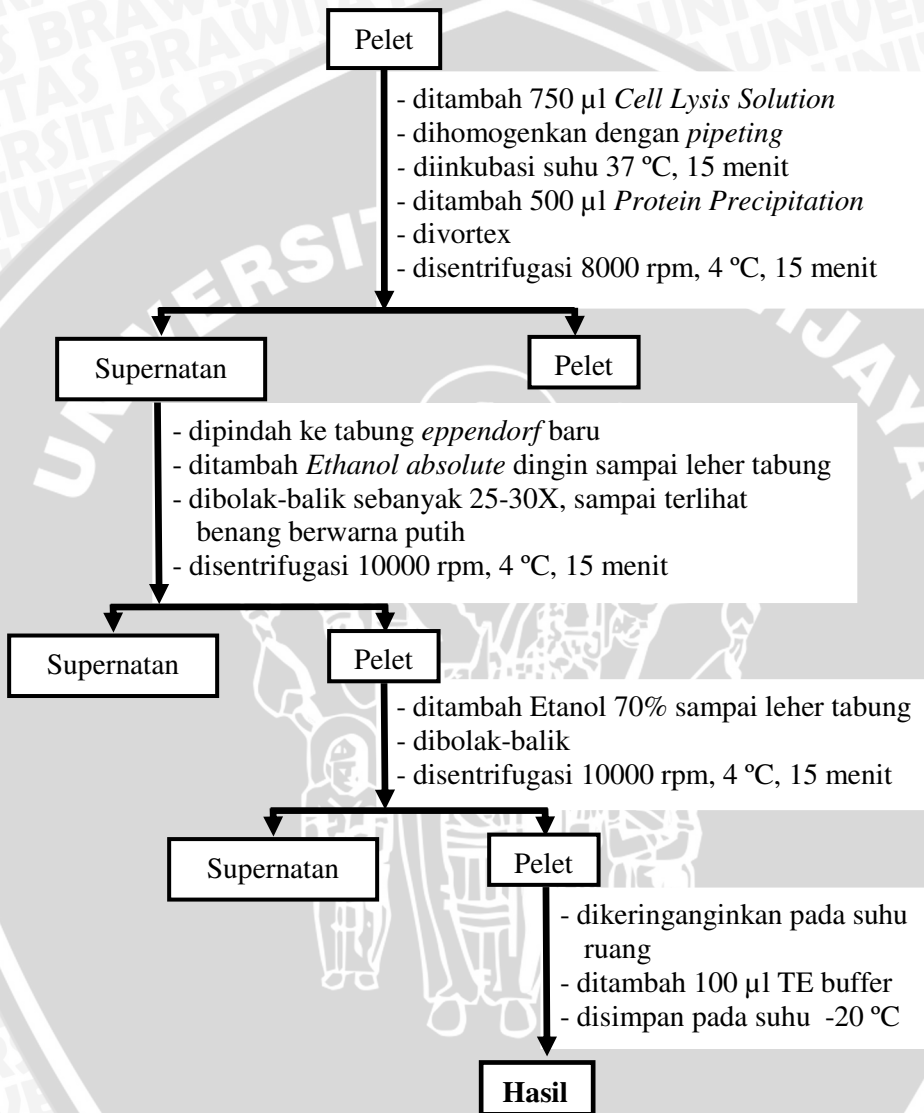
Lampiran 2. Komposisi Larutan Dalam Isolasi DNA dan Elektroforesis Gel Agarose

Larutan	Komposisi
10x RBC lysis solution (100 ml)	1,45 M NH ₄ Cl 0,1 M KHCO ₃ 5 mM EDTA
Cell lysis solution	10 mM Tris-HCl pH 8 25 mM EDTA pH 8 0,5 SDS
Protein Precipitation Solution	5 M NH ₄ COOH
Larutan TBE (dalam 1 liter)	89 mM Tris Base 89 mM Boric Acid 2 mM Na ₂ EDTA
Loading dye	87% Glycerol 0,5M EDTA 4 % Bromophenol blue

Lampiran 3. Isolasi Leukosit dari Sampel Darah



Lampiran 4. Isolasi DNA dari Leukosit



Lampiran 5. Uji Kuantitatif DNA

Larutan DNA 5 μ l + 995 μ l Tris-EDTA (TE)

Kemurnian DNA dihitung dengan rumus :

$$\text{Kemurnian DNA} = A_{260}/A_{280}$$

Keterangan : DNA murni $\rightarrow A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$

Konsentrasi DNA dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times \text{Faktor Pengenceran} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Keterangan : A_{260} = Absorbansi pada λ 260 nm

50 = Konstanta dimana pada λ 260 nm suatu larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 μ g DNA untai ganda per ml.

Lampiran 6. Uji Kualitatif DNA

Agarose

- ditimbang sebanyak 0,24 gr
- dilarutkan kedalam TBE *buffer* sebanyak 30 ml
- dipanaskan dalam *microwave*
- ditambah EtBr 0,2 μ l (suhu \pm 50°C)
- dituang kedalam *plate* yang telah dipasang sisir
- didiamkan sampai memadat

Gel agarose

- dimasukkan dalam *chamber* elektroforesis berisi TBE *buffer* sampai terendam
- dimasukkan sampel DNA: *loading dye* (3:1) ke dalam sumuran
- *running* dengan 100 volt
- diamati dengan UV-*transluminator*
- difoto dengan kamera polaroid

Hasil



Lampiran 7. Amplifikasi Gen *DGAT1*

6,96 μ l *free water nuclease*; 10 μ l PCR
Mix; 0,32 μ l Primer *forward* dan *reverse*;
3 μ l DNA

Dimasukkan ke dalam *thin*
wall tube

Dimasukkan *gene cycler* (mesin PCR) yang telah
diprogram sesuai primer yang digunakan.

1. *hot start* pada suhu 94°C selama 2 menit,
2. Siklus amplifikasi diulang sebanyak 35 kali:
 - denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit,
 - *annealing* pada suhu 59°C selama 45 detik,
 - ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit,
3. *Post* ekstensi pada suhu 72°C selama 5 menit.
4. *dirunning* pada elektroforesis gel agarosa 2 %
5. dilakukan pembacaan di bawah sinar UV.
6. difoto dengan kamera polaroid

Sumber : Ge dkk. (2003)

Lampiran 8. Pemotongan Pita DNA oleh Enzim *HaeIII*

2 μ l aquabides; 0,5 μ l *buffer* +
BSA; 10 unit enzim restriksi
HaeIII; 3,5 μ l DNA PCR

Dimasukkan ke dalam *thin*
wall tube

1. diinkubasi dalam *waterbath*; pada suhu 37 °C, selama 3 jam
2. dirunning pada elektroforesis gel agarosa 2 %
3. dilakukan pembacaan di bawah sinar UV.
4. difoto dengan kamera polaroid

Lampiran 9. Tabel Hasil Pengukuran Absorbansi dengan Spektrofotometer dan Kualitas *Marbling Daging*

No.	Sampel	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Kemurnian (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Konsentrasi (μ g/ml)	Kualitas
1.	1	0,056	0,031	1,400	560	1
2.	2	0,013	0,090	0,144	130	1
3.	3	0,056	0,031	1,806	560	1
4.	4	0,094	0,056	1,679	940	1
5.	5	0,040	0,024	1,667	400	1
6.	6	0,067	0,037	1,811	670	2
7.	7	0,059	0,028	2,107	590	2
8.	8	0,034	0,020	1,325	430	2
9.	9	0,060	0,039	1,538	600	2
10.	10	0,044	0,044	1,000	440	2

Lampiran 10. Sekuen Gen *DGAT1* (NCBI, 2006)

LOCUS AJ318490 14117 bp DNA linear MAM 21-
NOV-2006
DEFINITION Bos taurus dgat gene for Acyl-CoA:1,2-diacylglycerol O-
transferase
and partial hsf1 gene for Heat Shock Factor Protein 1.
ACCESSION AJ318490
VERSION AJ318490.1 GI:21425304
KEYWORDS Acyl-CoA:1,2-diacylglycerol O-transferase; Dgat gene; Heat
Shock
Factor Protein 1; HSF1 gene.
SOURCE Bos taurus (cattle)
ORGANISM Bos taurus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla;
Ruminantia;
Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.
REFERENCE 1
AUTHORS Winter,A., Kramer,W., Werner,F.A., Kollers,S., Kata,S.,
Durstewitz,G., Buitkamp,J., Womack,J.E., Thaller,G. and
Fries,R.
TITLE Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a
bovine gene
encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1)
with
variation at a quantitative trait locus for milk fat
content
JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (14), 9300-9305 (2002)
PUBMED [12077321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12077321/)
REFERENCE 2 (bases 1 to 14117)
AUTHORS Werner,F.A.O.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-JUL-2001) Werner F.A.O., Tierwissenschaften,
Lehrstuhl fuer Tierzucht, Alte Akademie 12, 85350 Freising,
GERMANY
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..14117
/organism="Bos taurus"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:9913"
gene 693..887
/gene="dgat"
repeat_region 693..887
/gene="dgat"
/rpt_family="SINE/Bov-ta"
gene 1465..1566
/gene="dgat"
repeat_region 1465..1566
/gene="dgat"
/rpt_type=TANDEM
/rpt_unit_range=1465..1493
variation 3343
/note="single nucleotide polymorphism (snp)"

```

variation      /replace="g"
               3399
               /note="single nucleotide polymorphism (snp)"
               /replace="g"
gene           3605..12168
               /gene="dgat"
mRNA          join(3605..3795,7413..7500,9444..9484,9564..9649,
               9742..9794,10010..10115,10205..10318,10419..10493,
               10564..10667,10758..10796,10863..10904,10978..11022,
               11097..11209,11297..11362,11449..11536,11618..11680,
               11753..11908)
               /gene="dgat"
CDS           join(3605..3795,7413..7500,9444..9484,9564..9649,
               9742..9794,10010..10115,10205..10318,10419..10493,
               10564..10667,10758..10796,10863..10904,10978..11022,
               11097..11209,11297..11362,11449..11536,11618..11680,
               11753..11908)
               /gene="dgat"
               /EC_number="2.3.1.20"
               /codon_start=1
               /product="Acyl-CoA:1,2-diacylglycerol O-
transferase"
               /protein_id="CAC86391.1"
               /db_xref="GI:21425305"
               /db_xref="GOA:Q8MK44"
               /db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:Q8MK44"

/translation="MGDRGGAGGSRRRRTGSRPSIQGGSGPAAAEVEVRDVGAGGDAP
VRDSDKGDVDVVGSGHWDLRCHRLQDSLFSDDSGFSNYRGI LNWCVVMLILSNARLFL
ENLIKYGILVDP IQVVSFLFKDPYSWPALCLVIVANIFAVAAAFQVEKRLAVGALTEQA
GLLLHGVLNLA TILCFPAAVAFLLLESTIPVGSVLALMVYTTILFKLFESYRDVNLWCRER
RAGAKAKAALAGKAANGGAAQRTVSYPDNLT YRDLYYFLFAP TLCYELNFPSPRIRK
RFLLRRLLEMLFLTQLQVGLIQQWMPAIONSMKPFKDMDYSRIVERLLKLA VPNHLLI
WLIFYFWL FHSCLNAVAELMQFGDREFYRDWNSESI T YFWQNNWIPVHKWCIRHFYK
PMLRRGSSKWAARTAVFLASAFFHEYLVSIPLGMFRLWAF TGMMAQIPLAWIVGRFFR
GNYGNAAVWLSLIIGQPVAVLMYVHDYYVLNREAPAAGT"
exon          3605..3795
               /gene="dgat"
               /number=1
intron       3796..7412
               /gene="dgat"
               /number=1
variation    7232
               /gene="dgat"
               /note="single nucleotide polymorphism (snp)"
               /replace="g"
exon        7413..7500
               /gene="dgat"
               /number=2
intron     7501..9443
               /gene="dgat"

```

<u>variation</u>	/number=2 8567 /gene="dgat" /note="single nucleotide polymorphism (snp)" /replace="g"
<u>variation</u>	8607 /gene="dgat" /note="single nucleotide polymorphism (snp)" /replace="a"
<u>variation</u>	9284 /gene="dgat" /note="single nucleotide polymorphism (snp)" /replace="c"
<u>exon</u>	9444..9484 /gene="dgat" /number=3
<u>intron</u>	9485..9563 /gene="dgat" /number=3
<u>exon</u>	9564..9649 /gene="dgat" /number=4
<u>intron</u>	9650..9741 /gene="dgat" /number=4
<u>exon</u>	9742..9794 /gene="dgat" /number=5
<u>intron</u>	9795..10009 /gene="dgat" /number=5
<u>exon</u>	10010..10115 /gene="dgat" /number=6
<u>intron</u>	10116..10204 /gene="dgat" /number=6
<u>variation</u>	10147 /gene="dgat" /note="single nucleotide polymorphism (snp)" /replace="c"
<u>exon</u>	10205..10318 /gene="dgat" /number=7
<u>intron</u>	10319..10418 /gene="dgat" /number=7
<u>exon</u>	10419..10493 /gene="dgat" /number=8
<u>variation</u>	10433 /gene="dgat" /note="single nucleotide polymorphism (snp)" /replace="a"
<u>variation</u>	10434



	/gene="dgat"
	/note="single nucleotide polymorphism (snp)"
	/replace="a"
<u>variation</u>	10486
	/gene="dgat"
	/note="single nucleotide polymorphism (snp)"
	/replace="t"
<u>intron</u>	10494..10563
	/gene="dgat"
	/number=8
<u>exon</u>	10564..10667
	/gene="dgat"
	/number=9
<u>intron</u>	10668..10757
	/gene="dgat"
	/number=9
<u>exon</u>	10758..10796
	/gene="dgat"
	/number=10
<u>intron</u>	10797..10862
	/gene="dgat"
	/number=10
<u>exon</u>	10863..10904
	/gene="dgat"
	/number=11
<u>intron</u>	10905..10977
	/gene="dgat"
	/number=11
<u>exon</u>	10978..11022
	/gene="dgat"
	/number=12
<u>intron</u>	11023..11096
	/gene="dgat"
	/number=12
<u>variation</u>	11030
	/gene="dgat"
	/note="single nucleotide polymorphism (snp)"
	/replace="a"
<u>variation</u>	11048
	/gene="dgat"
	/note="single nucleotide polymorphism (snp)"
	/replace="t"
<u>exon</u>	11097..11209
	/gene="dgat"
	/number=13
<u>intron</u>	11210..11296
	/gene="dgat"
	/number=13
<u>exon</u>	11297..11362
	/gene="dgat"
	/number=14
<u>intron</u>	11363..11448
	/gene="dgat"
	/number=14
<u>exon</u>	11449..11536

```

/feature="variation"
/number=15
variation 11520..11521
/feature="intron"
/number=15
intron 11537..11617
/feature="exon"
/number=16
exon 11618..11680
/feature="intron"
/number=16
intron 11681..11752
/feature="exon"
/number=17
exon 11753..11908
/feature="variation"
/number=17
variation 11993
/feature="variation"
/number=17
variation 12005
/feature="variation"
/number=17
variation 12036
/feature="variation"
/number=17
variation 12056
/feature="variation"
/number=17
variation 12136
/feature="polyA_signal"
polyA_signal 12163..12168
/feature="variation"
/number=17
variation 13309
/feature="gene"
/number=17
gene complement (<13731..>14075)
/feature="mRNA"
/number=17
mRNA complement (join (<13731..13936,14007..14075))
/feature="CDS"
/number=17
CDS complement (join (13731..13936,14007..>14075))
/feature="CDS"
/number=17
CDS /codon_start=3
/feature="CDS"
/number=17
CDS /product="Heat Shock Factor Protein 1"
/feature="CDS"
/number=17
CDS /protein_id="CAC86392.1"
/feature="CDS"
/number=17
CDS /db_xref="GI:21425306"
/feature="CDS"
/number=17
CDS /db_xref="GOA:Q8MI48"
/feature="CDS"
/number=17
CDS /db_xref="InterPro:IPR010542"
/feature="CDS"
/number=17
CDS /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q8MI48"

```



```

/translation="QELLSPQEPFRPLEAEKSSPDSGKQLVHYTAQPLLLLDPGSVDF
GSSDLFVLFELGEGSYFSEGDDYSDDPTISLLTGSEPPKAKDPTVS"
  exon complement (13731..13936)
    /gene="hsf1"
    /number=12
  intron complement (13937..14006)
    /gene="hsf1"
    /number=11
  exon complement (14007..>14075)
    /gene="hsf1"
    /number=11

```

ORIGIN

```

1 ctgccccgac aggcctgaca accaacaaca agccttcctc aatgccacta gagaaatggg
61 aagtgcagac cccttcctgc agcctgcttt ccacatcctg acttccagat tcaggggaca
121 tgtcccacac ctgaggaggc tttccttggt agctggacca ggctgggtgt ggggaggaga
181 tacccaagga ataagaacct cccatggcca ccccagccc ttaggctcta gacagggtga
241 gtcgaagtga gaagatgaat ggcagggtct gtctgggtc agacaacca ggaacataga
301 ctccctgccc agcaaatgcc cttggtaacc aggtaggtag gcatgagcta agaggctcca
361 aatctttgca gacatgtggt caaactggat cagcccaggg ccagcacagc tgtctgcacc
421 ctggcagggg acaggcccac cagactccac ttggtgtggc agcaggaaag cctgacctgc
481 agtagacctg ctgcttcagg gtgggatcac ctgagggtgg caccocctc tggggagcac
541 tgtcagcctt cataaactca ggatgaaaag cccagattt ggtagacctt aggtaggcat
601 cattgcccac tctgcatatg aagagtctga ccctcagggg gagaagcagc ttgccaaggg
661 ctgcctttga cttaagcctt gctccagttg ggcttccctg gtggctcaga ccctaagaa
721 tctgctgca atgtgggaaa cctgggttea gtccctggga cgggaagatc ccctggagaa
781 gctatggcaa cccactccag tgttcttgcc tgagaatccc acggacagag gagcctggcg
841 ggctgcagtc catggagtgc caaagagtgc gacacgactg agcaactaac actttcactt
901 tctgccccaa taccccaccc atctgaacct gaatacctga tggggtccca ctggcaggaa
961 gagaggctcc tagaggecca gtctcccca aggetcctca gctttggggc ctggattgac
1021 tgttcaagga ctctgatggg cggctgggtg ggatgacggg tagaggctgc ctcccagtg
1081 actgggacag gcctagcctt gtctccacag gtgtccatgg acaggacttt gcaatccaga
1141 ggatgggtgg tgtggtgcag gctgctgacc actgtgtcca gggtcttctc tcacgggcc
1201 aaggecctc caacctggag tcageccaaag gctcttteta aatccccaaa cccttcacg
1261 ccttcattcc gccagcctgc agattcctcg tccccagaa gatgttgcct cccacggggg
1321 gagattcctc attgagcttt ctttcaacaa ctctcacgc acatttgtcc caaaagacc
1381 ccacctatct tgacgttttc cctcgtgcct ctctcgtgtg acctggcag caactcaatc
1441 aggatccaga ggtaccaggg ctgtaggccc cgcctccc ggaggcccc ccctccccg
1501 aggeccgcgc ctcccggag gccccgcctt ccccgaggc cccgcctcc cggaggccc
1561 cgcctgtgat caacctgga ccccgctctc ctcaaacagg cccgcctccg ccttggtaca
1621 gaggcccttc ctgattggtg ccttcacagt ccgtgccttc tcattggctt gaggccctga
1681 tctctcaact ccagcgggtg aaccttgggt tccctcaagt cccgggtcag atcggtctc
1741 tttgatgacc ctggcccac cctggtgtcc tcaactcagc tgtttcatg tagccgaagg
1801 caaagaggca tggacgcgga cacagggagc cgcctccaa acgtacctc actcgtcagt
1861 ggctactgtg ctcagcctct ccaggccaac aggcagcctg agccgtcaat ctctcctct
1921 gccaatcagc gcgccaagcca ggctggccct ctagtcaagg ctcggtactg aaggatggca
1981 agtcccgaag gctcccaggg acgcgtgcgc accggttagg gggcttccc ccagctgct
2041 gggagagggg tagggagggg aaggcagagc tcccggact cagccctgct gcgcttctc
2101 gagaggactc tctcctcctt ccatcctccc ttgggagcta tactgagtcc tagcgtgag
2161 tggccaactc ctgcctatga atagacgaag gtgcttgga actggctaag gggatactcc
2221 tgatccaacg aggcggggcc tgtgaggagg caagagggtt tctccagct gatgaggtc
2281 ctcgagcctt tccacaagct actccaagac agggccagg tagctcagc ctgccaggta
2341 aggatgtcag gctggcctca gccgcaaatg gtccagtggg agaaatgtc accagggtcc
2401 caggtgcctg ttggttgagg taagagggtc aggaagcagt ccggcaggaa ggaggttga
2461 tctcaggctg agcctcttgg tttatttgc ttcagagagg cgttctccc agctttgctt



```

2521	accccatggg	agtgaacgga	gtgggttctg	tggctagggg	tgtttcttgt	gtaaaccagg
2581	cctaaactcc	cggtgaacco	tcqcatctgg	agatccagga	tactcacact	ccatgctctt
2641	tgccaaatgt	ttgtgaaacc	aagtaagatc	ggccttgccc	gcgcacgggc	ctcactgtgc
2701	agttgttttg	gtgtattgtc	tgcttcattc	aacgactgga	tgactgcgca	ctgtgcaatg
2761	aaacagaaac	ctctgggtct	ctgcgaatca	acaccccagg	atcctaactc	ctgtgcaaaa
2821	ctgcccgaag	tggggaagcg	gggaagttct	gcaagctcgc	agatgaaggg	agaagcgggg
2881	cgggtggaga	ggcgggctgg	cttgtctact	gtgggggctt	gggcagggga	gaggtggcca
2941	ccctgggaat	agtggggcat	ggcacaagtc	ccggaatgcg	aggactgceg	ccttctccc
3001	cctccgttct	ctgacctggc	gcgtgtttga	acagcctaag	tggaggaaaa	gtgggtgctt
3061	acggtggtaa	ttagtgggtt	cacagagcac	gaccgtcccg	cgggatgtac	gttcggtaga
3121	cgcgttgggt	gtcagcctga	cgtaacgca	ctaggcattt	cataaataac	tacaacccca
3181	aattctgctc	ctgagctgag	aaatgacgaa	atcctgtggt	tatagagcgg	gacaaggggc
3241	aggcagcggt	cagcagaggg	ttgtttgcag	ctgcccggaa	gcccccgctg	ttcctcgtct
3301	gtccgggatt	gcatttgcca	ggagaccaca	actcccaggc	tgcaccggcg	gccagcggac
3361	tacaaggata	tgcgcgcgcg	ggccctgggc	cagttagctg	ctccgggaac	tacgcttccc
3421	aggactccga	gaggagccgt	ccggcacgga	tttgacgcg	ctgattggcg	gcgcggaacca
3481	cggcagtggc	gtagttagag	cggtggcggc	agttggccaa	gggtccggag	gcgggggccac
3541	aggcctcggg	tgctgccagc	ccggcgggct	acgacttggc	cgcgccgggg	tgcgaactaa
3601	ggccatgggc	gaccgcggcg	gcgcggggcg	ctcccggcgc	cggaggacgg	ggtcgcgggc
3661	ttcgatccag	ggcggcagtg	ggcccggcgc	agcggaaag	gaggtgcccc	atgtgggcgc
3721	cggagggggac	gcgccggctc	gggacacaga	caaggacgga	gacgtagacg	tgggcagcgg
3781	ccaactgggac	ctgaggtagc	ggtggcggct	accctaacc	tttgaccctc	gatacggggc
3841	ccctgcgacc	caaccctggtg	ggccaggcct	gtcggcgcca	gctcgggctc	gagtcggaga
3901	gtctggcgcc	tggaccttgg	tgcacagctg	tgccctcgg	gcctccacgg	ggaaacttag
3961	cgggaggttg	ggggcggagg	gtctcctgcc	cggaacaccc	aggtaacggg	gcccagggga
4021	gggcaggggc	tcaactteta	gagccctcc	ctctgccttc	ctttgggtgg	ttctgaagct
4081	ttcccagggt	gcgcccacta	cgcacagtg	ctctacctg	gaaggagata	caggggtcct
4141	tcctgagggc	tatgaggggt	gccttgtggg	ttgataaagc	tcccggggga	ggagggtgga
4201	ccgcgggaga	acagagagag	gggcagtgcg	aggggatttc	tcatccctcg	cagaccctcc
4261	agagaatggt	cttcacaaa	gtccctcacc	cgtcacccgg	cgattgactg	gcctaggatc
4321	ctgcttatta	ccagcaca	tggctgctct	agggtcaaa	tgggtcctgt	aatgggaccc
4381	tcaccctcgg	ttgggttaca	ggggaggagt	tggaagtgg	cacaccacac	ggtgggcgcc
4441	ctgcttagct	gaaggactga	tgggaaggag	ttgggggagc	aaactcggcg	tgaaagggag
4501	gatctgacct	acgtgggcat	cagctaagtc	ctgtggctg	cctccagggc	ccccctttgc
4561	catcctccac	gcctccccc	ccagccctga	ccttcactct	ggtcacggcg	tctcaggggc
4621	tctggttttg	ggatcagctc	cagagctaga	ggttatcaag	gggaaagtgg	gcaacaggtc
4681	agtcaagca	gatttgctat	cttcactggg	tgctgtgggg	aggggagggg	caagggcagt
4741	tggggtgca	gcactgtccc	tgccttggg	gggcacacag	ttcacctgag	agataagata
4801	gcccagccc	tgaagagtga	gagcaaaagt	caggcacaga	gttcaggatg	acaccaggg
4861	aggtgggctc	gtgaggggca	actggcttcc	tacaggcccc	aggtggtcct	gagggggcgg
4921	ctgcaaaggc	caggaggccc	acaggcccct	ctgcccactc	ctggggaact	ggatttgggg
4981	tcactttgta	tgaggtgggg	gcgggtacca	gctttggggc	aaactgtcac	cctggtagg
5041	ccatcacttg	cctgctctgt	ataggccaga	tggccagaag	ctgctcctgt	cctgttgatg
5101	gcccactctc	gaggtctgta	ccctcgggaa	gaggagcagt	tgggtggcag	gaggggccc
5161	cggagacctc	cctgacctcc	aggacacgca	gctgtgtgtg	cctgtcccca	ggccacatgc
5221	cacagggctg	ggggcctcct	ggggcagggc	tgggcatttg	tctggctact	cttggtatcg
5281	cctctgcctc	cctgcctccc	agtcateatc	ctcccactc	tgcctccctg	cctgttctct
5341	tcttctcctc	ccggcccttc	cgcaatttcc	ctgctcacct	agctctgggc	agggcggggtc
5401	aggtgcgggg	tgtgagctca	ctccttccgg	cagcaagggt	tagctatgtg	ccggaaggaa
5461	ggccgctgct	gttgcctcgc	ctctgagtgc	atccctcca	ggtcctccac	actccctgtg
5521	gccccagcac	ctggtgctgc	cttcagccat	tggttcatgt	gctcctccag	cacagcttct
5581	tagctccagc	cctctaggct	gggtgcaggg	agtgctgagg	aagtcgcagc	cgggagcgga
5641	gctggcacc	tgtccctcct	tgttctgtcc	gtccctggag	ctggaccgta	tggccccgca
5701	tgtgtgatcc	ccacttgggg	ctgtgcctct	gggcaagttg	ggaagcttgg	tgagcctcat
5761	tttcatgtgc	ccgcctccca	gtactgatgt	cgaggtgtaa	tgaggtgcca	actgtaatga

5821 gttggaatgg ccoctgctggc tgggtgggac tggggagcag gtggggccg ctgggggca
5881 cagaggcaca cccagtgcct cagtcaggga gagggtgaca gaagaactct gggtagggc
5941 ccacctccac tctggccatg gctgctgccc tttggtccac tgcagtgaac tgtgccatgg
6001 ggctggacct ctgtggggat tgggtgggag tgggctttct tcccgtctgg ggcctctgac
6061 ctctgggggc agggcgctgc ccgggtggga cagtcggaag gctggtagg ggacctgag
6121 gttctgtgtg gtggctgggg gcaggcctca ggaattgac atcagggatc tggaaaagt
6181 ttaataacat tattttgtgt caggattggg aaatgctccc ctccccctc cccctcttc
6241 atcttagaga ctgctgcaca tctggtcagt gtggtcttct tggtgcccoc caaggtggca
6301 ggggtcacac tgttatgaaa ccgccccctg ggtatgtggt gacagatgc acatgcagt
6361 ggtgattggc aggttgtagc atgaggtggc tttgggacgg ttccagtgc agtgagtggg
6421 ctggatctgg ggggttctgg gcaggtecat caagcggata cccccacaga ctgtcctctt
6481 gggatagtgg ggcctgggag ccctgcttgc cttgccaaaa ggacggcga gactcatgaa
6541 gaagagggct tgggggctca gagccccact gtgtgtgacg cccagggtgg acctgagga
6601 ggtcgctggg caggctgggc ctgggggtgg ctgggctggg gggcctgggt gtggcagga
6661 ggcagggcca gactgtcagc gctgctggc tggaggtgct tgcaccctgt cctccccagc
6721 cgtctgtctc ctgggtgcag ccatctgagt gctgaccca gcccccctg gaggetggct
6781 gttctcctgt gccctattgc tggggacatg tgtccacag agggaaaagg aagccccgcg
6841 ctctccctt acaaaaactg aggccttget caatgcctg gatggcctcc tggtagcagg
6901 gtggttgggg ggaggtgggg ctgctgctta gaacccgcca gcgggctcg ccctgggctg
6961 agctgaacco ctccacctct gcctccagct gagggttggc ttccatctcc accaggcca
7021 gcaactggca cagggtctct agaggcaggc tctgaaaagt cccctgctggc ttctgactg
7081 gactccaggc gccgagcccc cagggggctc gcattgcgct cacctgcga agccactgga
7141 aggetgggtc ctccccctcg gaagggcaca tgcaggga tgggtggtt gaatggggc
7201 ccctgggctc cccggaggga ceagctgctg tgaggggccg cccctcccc acttccgtct
7261 tgcataacca gctcctgtgg cactccccac gccccgtccc ccagtgggag cggcagccc
7321 ccggtggctc tgcccgcgga gggggatgtg tggggggcgg ggtggccttg ctgccagatg
7381 ctctgcccgc agtgcocgtc tccgctctcc aggtgtcacg gcctgagga ttccctgttc
7441 agttctgaca gtggcttcag caactaccgt ggcactctga atgggtgtg ggtgatgctg
7501 gtacgtagag tgacaccttg gagcaagggt cctgacggcc ggggggcoat gggctctct
7561 ccaggggtag gtgtctgtac ttgtgtagct gtggtgaatg gactctgtg ctggcgggtg
7621 ggcacogtgg agcagccgta ccctgggacc cctgggagcc tctgagctgg ggtctgcgcc
7681 tgaatccag gagatgctc cagagggcag cctgggagcc tctgagctgg ggtctggtg
7741 ccagggggca ctggagtctc ccagggggc gagagagagt aggcaggat ggtctggtg
7801 cctggggtag gggatggctc ctccgtgggc ccaggccctc cctggcagca caggtgagtg
7861 gctttggggg tccactaga acttccctct ctgttccaaa ttggcctcat ggtgcgga
7921 tgccctgggtg aacctggggg agcagggtga ggacatgct ctccagccc aggactggg
7981 caggccaac tctgcaggac tctggcccct ccctcagccc tggagggagc agcagacct
8041 tctgtgtcc gccttgcctc gacctggccg aggccactgc tgtggggccc cagcagacct
8101 gccacgaca aggtggagtg cagggacccc aggggacgc ttcagggtg ggcagggtga
8161 gcccgcactg ggcccagccc caccgctcag tctgagtgtg gcctgagggc ttgcgccctc
8221 cagctgaogt gtctgcctgc cctgggtgtg gctccagagg ctgctctgtg accaggggcc
8281 cccacgcttc tgtttgtggt tctgggcagt cccctgggga gcggtggggg ctggtgcca
8341 gtccagaccc agtagtccac gcgtcctggt ctctggaggc cgtggctggt ccaggactgt
8401 ggcagggtgg tctgcaggg caggccctca gcagcctgtc tgttctcgt cagccccag
8461 cctcctggcc ctttgggtgca cccacaaagc tccccctcc cccaggagt ggggccgct
8521 gctgcgtcct ctccgagcc tgggcttcca ggtggtggg cctcttagca gctccaaact
8581 ttgctgtggt tgggctctca ggcaggcaa ctgccagtg gcagacattg caggaccag
8641 tgtgtcctgg taagctggct ggttaggtg ttagctggg gatgggtgg caggtggccc
8701 ctgcatctct gagcctgtca cctcctcggg aagcctctg ggtgggggac tccaccatg
8761 tgcctggag aagcatcact tttccacaga gctctctgca acccccgtgg ggcctgagc
8821 tgggggtggg gaggtgggtg cccctgctcc tgcagaggcc agccaggat ctggcccag
8881 gccactggca agagctgctt gtgtggggg atctgtcct tggctgtgct gcaggagcgg
8941 ccgaggecag cggggcgctg agtaggggtg gagaccagg cccagcttcc ccagcccctc
9001 aggaccggcc tgetctttcc caccacccca ccaagtgcgt gggcaacccc cgcctgtgag
9061 gatgggcccc gttggcaggg cggagccctg ggagggtggc agtgcgccgg gcaggcttgg

9121	acttcaactgg	ggettggggt	tgtcgctgtg	gccaggggcg	ctgaccgct	tgggtgggacg
9181	gacggcgcct	gggcagcagg	tttcttctgc	cacggtggca	caggcaacctg	gggttgtgggt
9241	tggctccagg	cgggcggggg	ctcggtgcc	ctgcgcaggc	acataggccg	tgggtgggga
9301	gtctcagag	ttggcgtgag	gtccccacagg	gctgggctg	caggatggag	gccactgtcc
9361	tgagctgcag	gtgctggcag	gagctggggt	gggcgttctg	gggocgtggc	tgcacagcgtt
9421	atgtccctct	ctctctatcg	cagatcttaa	gcaacgcacg	tgtatttcta	gagaacctca
9481	tcaagtgagt	ggccccggc	ctgccccagc	ccctgccacc	tcaccctcg	cctacacaga
9541	ccctcaccca	cctgcgtctg	caggtatggc	atcctggtgg	accocatcca	ggtyggtgtct
9601	ctgttctctga	aggaccctca	cagctggcca	gctctgtgcc	tggctattgg	tgagctgggt
9661	gcccaggag	cctcaggccg	cggttgggtg	ggacaggct	gatctgggoc	tgaacctgcc
9721	ctgggttctg	tctgtcctca	gtggccaata	tctttggcgt	ggctgcgctc	cagggtggaga
9781	agcgcctggc	cgtggtaac	agtgccctca	cgccctcccc	tgacttgcct	caaggtcctt
9841	accagtccgg	cttagggcgg	gccaccagct	ggtcccactg	tgcttcaggg	ttttgggct
9901	ttcgtggcc	tctgtgaggg	ggctgcacct	caggctcgtt	ggctcttctc	cagggaggtc
9961	ctctgaccag	ggagggggt	ccctggctga	cgctctgtct	ccaccctcagg	gagctctgac
10021	ggagcaggcg	gggctgctgc	tgcacggggt	caacctggcc	accattctct	gcttcccagc
10081	ggcgtggcc	tttctcctcg	agtctatcac	tccaggtggg	ccccaccccc	gcccccgcc
10141	cgccccagc	tgtctcgccc	acgggcagcg	cgggggcgct	ggcctgagct	tgcctctccc
10201	acagtggct	ccgtgctggc	cctgatggtc	tacaccatcc	tcttctcaa	gctgttctct
10261	taccgggacg	tcaacctctg	gtgccagag	cgcagggtg	gggccaaggc	caaggtggt
10321	gagggtctgcc	tcgggctggg	gccactgggc	tgcacttgc	ctcgggaccg	gcaggggctc
10381	ggtccaccce	cgaccggccc	cctgcccgtt	gctcgtagct	ttggcaggta	aggcgggcaa
10441	cgggggagct	gcccaggcca	ccgtgagcta	ccccgacaac	ctgacctacc	gcggtgagga
10501	tcctgcccgg	ggctgggggg	actgcccgcc	ggcctggcct	gctagccccg	ccctcccttc
10561	cagatctcta	ctaacttctc	ttcgcccoca	ccctgtgcta	cgagctcaac	ttcccccgct
10621	ccccccgcat	ccgaaagcgc	ttcctgctgc	ggcgactcct	ggagatggtg	aggcgggggc
10681	tctggggcca	gggtggcgcg	gctgcccggc	accggccacc	ggggctcagc	tcaactgccc
10741	cttgcttctc	tcccagctg	ttcctcaacc	agctccaggt	ggggtgatc	cagcaggtac
10801	gtgcccgggg	gggggggggg	gactctgggg	ccgttgggga	getgactctg	cgctttttgc
10861	agtggatggt	cccgcccatc	cagaactcca	tgaagocctt	caaggtgagc	aggcaggcct
10921	ggcagggtg	gttccggggt	ggaggctgag	ggagccagct	gtgccctgtg	cccacaggac
10981	atggaactag	cccgcactgt	ggagcgcctc	ctgaagctgg	cggtgagtgg	cctgctgggt
11041	ggggaacgct	gggggocggt	ggggctgtc	tggcacctgg	caccactcc	ccacaggtcc
11101	ccaaccactc	catctggctc	atcttctct	actggctctt	ccaactcctg	ctgaacgcgc
11161	tggctgagct	catgcagttt	ggagaccggc	agttctaccg	ggactgggtg	tgggtggctc
11221	tgccggggcg	gggggtggtg	gggccccgc	tggggctggg	gcgggagccc	ctgcccactc
11281	tgccccggcc	ccgcaggaac	tccagatcca	tcaactactt	ctggcagaac	tggaaactcc
11341	ctgttcacaa	gtggtgcate	aggtgggtgt	gcgctggggg	gcggggggtt	ggggggtggg
11401	acggggtcgc	gtggcccggc	gccagcccca	ctgcgcctc	ccccgcagac	actctacaa
11461	gccaatgctc	cgccggggca	gcagcaagtg	ggcagccagg	accgcaigt	ttctggcctc
11521	cgcttcttc	cacgaggtca	gtgactgag	ggcgccctc	gccctggtg	ggggtggggg
11581	tgggggtggg	ggctcgctga	cgccctctc	ccctcagtac	ctggtgagca	tccccctggg
11641	aatgttccgc	ctctgggctc	tcaaccgcat	gatggcgcag	gtgagcagcc	ctggaccctc
11701	gctccgcccc	gccccggcag	cgcagaggtc	cactcccgct	ctgtgtcccc	agatcccgct
11761	ggcctggata	gtgggcccgt	tcttccgctg	caactacggc	aacgcggccg	tgtggctgtc
11821	actcatcatc	gggcagcccg	tggcctcct	gatgtacgtc	cacgactact	acgtgctcaa
11881	ccgtgaggcg	ccggcagccg	gcacctgagc	gcctccaggc	tggcccctc	gtgggtgttg
11941	gactgcttgg	cgccgctgcc	tgcggctgga	ctagagcctg	ccccaaactg	gggtcagcag
12001	gaggaggcct	ggctggtgga	agctgctctc	tggcctccac	caggcctctg	cctgaagggc
12061	ttcctcctgc	caggggagag	caggcccagc	gcagttctgg	cccctgggag	gtgcccctgc
12121	tctggaaac	ctacagactc	cgccccaggg	tctgaatgtg	tcaataaagt	gctgtcaca
12181	gtgagctccc	tcagctcca	ggccacaggg	ctggcagagag	ggggcgccoc	tccaactggt
12241	ggccatgctg	tgggaaggag	gcccacagcg	ctggagagga	gctggggctg	tggtagacct
12301	ccctgctcca	cagggtctctg	tggctcagacg	tcttgccctg	caaggtggag	actccatgct
12361	ccaaggcccc	ctgtgctgca	ggtctgcaca	caagtgatt	caactgggt	caggccagag

12421	gctaaggtgt	ggaagaggtt	tgagaatcag	gctgacttga	acggcagcaa	agactccaag
12481	gcaaggtctc	agaggtctca	gaggtatgc	gcaagctccc	ctgctggggt	gctcacctgg
12541	gctgggctct	gggctgcttg	gacaaagcag	gtggcctggc	tcagccctca	ccgagggcct
12601	cccttggggg	cagaggttgg	cctgatgcca	ggggctcccc	gtttttccag	gccctcagca
12661	ggtagttggg	tgtggccctc	aggatacctt	ggtcccagag	cttgccactc	aaaaagcttg
12721	gcagtgaggc	aagggaacc	ccggctgtt	ccccctcta	ctgctctgc	cgctggggtt
12781	ggaaacctcg	aggctgtgcc	aggcaggtgt	accctgacag	ccagecatgg	cccagtaaga
12841	tgggtgcccg	aggtggtacc	tgggcagcgg	accagctgt	gctgcccccg	ccccaccag
12901	aagccgctct	agcccatggt	ggtcgtctgg	gcgagacag	ctggttggct	aggcactggt
12961	tggctacag	caggtgtagg	cagcgtctcc	ctgaccctga	ctccttagga	agccaccacc
13021	ctgggccccta	ctcatcagca	aggacagcga	gcagggctga	gctgggggtg	cgtagggctgc
13081	tacggcccgc	cacctccatc	acatgcacct	ctgcaccccc	tgctgctga	ctcaggagtg
13141	gggggggggg	tectgtgett	ccttcactcc	agaccacagg	tgctgaccca	gtgcaccacc
13201	ctggtcctct	agtggggacc	tggccacagg	gctcctgtgg	gccacgctg	atcccgcct
13261	ggtcccttca	taaagaactc	ttgagcaaat	gcagcccagg	ggagccagga	ggctccagtg
13321	tgctgtgtcc	atctgctctc	ctccagcccc	ttccgagaca	ctgctgatca	tgccccctc
13381	cacccccacc	cacactggca	ggaggaacag	acagggagac	cacacacaga	gctcgttgtt
13441	tataaatctc	tgcttggct	atcgtctgt	ttgtccatgt	atatatctgt	atatactctat
13501	ggaaggggaa	agggggactc	ggtgaaaaat	ccaaaataca	attctatgaa	cacctggctc
13561	ctggctcagtc	tgagtgtggc	cgtagagccc	aggtagctg	tggctcacag	ggctaggccc
13621	tgggtgctgg	ccgggggcca	cgccccacc	cctctcccc	cctccgccc	ccaggggacc
13681	aggctcctgg	acaccagggc	tggccaaggc	ctgctctctc	cctggggctt	ctacagagaca
13741	gtggggtcct	tggctttggg	gggttctgag	ccgctcagca	gggagatggt	ggggtcatcc
13801	gagtagtctg	ctcctcggga	gaagtaggag	ccctccccca	gctcgaagag	caccggcagg
13861	tcgctgctcc	ccacgtccac	ggagcccggg	tcaggagca	gcaggggctg	ggcgtgtag
13921	tgcaccaact	gcttccctag	gggtgctaact	gggtcaaggt	gcccgggggg	ccggggggcg
13981	gggtgggggt	ggggggctca	gctcacctga	gtctgggctg	cttttctctg	cctccagagg
14041	tctggggggc	tectggggag	agaggagctc	ctggatctgc	tggggcagca	ggagggagca
14101	cagtgagggc	tcccgcg				

Keterangan
 DGAT6829F
 DGAT6829R