

**IDENTIFIKASI UKURAN SERABUT  
OTOT SKELETAL DAN SEKUEN GEN MYOSTATIN  
(MSTN) PADA KELINCI (*Oryctolaguscuniculus*) REX,  
NEW ZEALAND WHITE DAN  
AMERICAN FUZZY LOP**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**ANDI KURNIAWAN**  
**155130100111027**



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

**IDENTIFIKASI UKURAN SERABUT  
OTOT SKELETAL DAN SEKUEN GEN MYOSTATIN  
(MSTN) PADA KELINCI (*Oryctolaguscuniculus*) REX,  
NEW ZEALAND WHITE DAN  
AMERICAN FUZZY LOP**

**SKRIPSI**

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan*

**Oleh :**  
**ANDI KURNIAWAN**  
**155130100111027**



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

## LEMBAR PENGESAHANSKRIPSI

**IDENTIFIKASI UKURAN SERABUT OTOT SKELETAL DAN SEKUEN  
GEN MYOSTATIN (MSTN) PADA KELINCI (*Oryctolaguscuniculus*)  
REX, NEWZEALAND WHITE DAN  
AMERICAN FUZZY LOP**

**Oleh :**

**ANDI KURNIAWAN**  
NIM. 155130100111027

Setelah dipertahankan di depan Majelis Pengaji  
pada tanggal 12 September 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 196009031988022001

**drh. Fajar Shodiq P., M.Biotech**  
NIP. 198705012015041001

Mengetahui,  
DekanFakultasKedokteranHewan  
UniversitasBrawijaya

**Dr. Ir. SudarmintoSetyoYuwono, M.App.Sc**  
NIP. 196312161988031002

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Andi Kurniawan

NIM : 155130100111027

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

**IDENTIFIKASI UKURAN SERABUT OTOT SKELETAL DAN  
SEKUEN GEN MYOSTATIN (MSTN) PADA KELINCI  
(*Oryctolaguscuniculus*) REX, NEWZEALAND WHITE DAN  
AMERICAN FUZZY LOP**

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 17 Januari 2019

Yang menyatakan,

(Andi Kurniawan)

NIM. 155130100111027

**IDENTIFIKASI UKURAN SERABUT OTOT SKELETAL DAN SEKUEN  
GEN MYOSTATIN (MSTN) PADA KELINCI (*Oryctolaguscuniculus*)  
REX, NEWZEALAND WHITE DAN  
AMERICAN FUZZY LOP**

**ABSTRAK**

Kelinci (*Oryctolaguscuniculus*) Rex dan New Zealand White merupakan kelinci pedaging yang banyak di ternakkan di Indonesia karena kurantubuh yang besar serta pertumbuhan yang cukup cepat. Sedangkan jeniskelinci American Fuzzy Lop tergolong kelinci hias yang cukup banyak dipelihara karena nama memiliki ciri khas badan kecil dantelinga yang menggantung ke bawah. Myostatin (MSTN) termasuk kedalam DNA inti yang merupakan gen pengontrol pembentukan dan juga perkembangandan gading. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan ukuran serabut otot dan sekuen gen MSTN kelinci Rex, New Zealand White dan American Fuzzy Lop dengan metode PCR. Sampel yang digunakan adalah DNA yang diperoleh dari isolasi sampel darah kelinci Rex, New Zealand White dan American Fuzzy Lop menggunakan QIAamp® DNA Mini Kit. Primer yang digunakan pada metode PCR adalah sepasang primer forward dan reverse. Primer forward 5'- GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT -3' dan primer reverse 5'- CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3'. Hasil dari proses PCR dilakukan sekuen sing menggunakan metode Sanger. Sekuen gen dan asam amino tersebut akan dianalisa menggunakan software Bioedit, NCBI BLAST dan Image Raster. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan ukuran serabut otot kelinci Rex sebesar 3,91  $\mu$ m, New Zealand White 3,45  $\mu$ m, dan American Fuzzy Lop 2,59  $\mu$ m. Terdapat perubahan sekuen gen Myostatin (MSTN) pada kelinci Rex, dan New Zealand White yaitu c.351 C>G, c.314 G>A dan D>E, R>Q dengan database ID: KX084386.1. Kesimpulan penelitian ini terdapat *missense mutation* karena perubahan salah satunya yang menyebabkan perubahan asam amino.

**Kata Kunci :** Kelinci, MSTN, PCR

**IDENTIFICATION SKELETAL MUSCLE FIBER AND MYOSTATIN  
(MSTN) GENE SEQUENCE IN RABBIT (*Oryctolaguscuniculus*)  
REX, NEW ZEALAND WHITE AND  
AMERICAN FUZZY LOP**

**ABSTRACT**

Rabbits (*Oryctolaguscuniculus*) Rex and New Zealand White are rabbits that are widely breed in Indonesia for their meats, because of their large body size and rapid growth. While American Fuzzy Lop rabbits are usually kept as pets because they have small body and ear hanging down. Myostatin (MSTN) is one of nuclear DNA which is controlling the formation and development of muscle. This study aims to determine the differences in the size of muscle fibers and sequences of MSTN Rex Rex rabbits, New Zealand White and American Fuzzy Lop using the PCR method. The sample used was the wholeblood of Rex rabbit, New Zealand White and American Fuzzy Lop rabbits which DNA is isolated using the QIAamp® DNA Mini Kit. The primers used in this research are a pair of forward 5'-GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT-3' and reverse 5'-GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT-3'. The results of the PCR product will be sequenced using the Sanger method. The results of these sequences will be analyzed using Bioedit software, NCBI BLAST, and Image Raster 3. The research result showed that after histological analysis, there are differences in the skeletal muscle fibers of Rex rabbit (3,91  $\mu$ m), New Zealand White (3,45  $\mu$ m) and American Fuzzy Lop (3,45  $\mu$ m). There are also differences in myostatin (MSTN) gene sequence of Rex Rabbit and New Zealand White (c.351 C>G, c.314 G>A and D>E, R>Q) with database genebank of *Oryctolaguscuniculus* ID: KX084386.1. The conclusion of this research is that there is a missense mutation in myostatin gene of Rex and New Zealand White rabbit, because the change of one nucleotide base causing changes in amino acids.

**Key Words :** Rabbit, MSTN, PCR

## KATA PENGANTAR

Pujisukurkehadirat Allah SWT, karenaberkatrahmatdankarunia-Nya penulis dapat menyelesaikanskripsi yang berjudul “Identifikasi Ukuran Serabut Otot Skeletal Dan Sekuen Gen Myostatin (MSTN) Pada Kelinci (*Oryctolaguscuniculus*) Rex, New Zealand White Dan American Fuzzy Lop” dibawah payung penelitian Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES.

Dalam kesempatan ini dengan segala kerendahan dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan proposal Skripsi yaitu

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES selaku dosen pembimbing I yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis.
2. drh. Fajar Shodiq P., M. Biotech selaku dosen pembimbing II yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis.
3. drh. Yudit Oktanella, M.Sidandr. Wawid Purwatiningsih, M.Vet selaku dosen penguji atas ilmu, dukungan serta saran dan masukan yang sangat membangun.
4. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan.
5. Keluarga tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dukungan dan doa untuk menyelesaikan proposal penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
6. Dosen dan Staf kependidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
7. Teman-teman seperjuangan skripsi Sankha Rossa, Agnes Arimbi A., dan Isma Aulia N. yang selalu menemani disaat kritis.
8. M. AdiPrasetyo yang sudah menjadi editor sayadanselalu memberi sambutan, dukunganserta semangat untuk menyelesaikanskripsi ini.
9. Teman-teman GEA, Ghibah Squad, DNA, serta Brachial atas bantuan, cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, dan keceriaan.

10. drh. Moch. Abdullah yang telah mendampingi saat melakukan penelitian di Lab ADD Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan Hana Mitsuki P. yang sudah membantu saya untuk desain primer pada penelitian ini.

11. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan proposal ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulismenya darisepenuhnyabahwapenyusunan Skripsi ini masih banyak kekurangan, karena keterbatasan kemampuan yang dimiliki, maka saran dan kritik yang membangun dari semuanya pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan Yang Maha Esa memberbalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga Skripsi ini dapat memberikan manfaat serta memberambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Amin.

Malang, 17 Januari 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN COVER .....</b>	i
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	iv
<b>ABSTRAK .....</b>	v
<b>ABSTRACT .....</b>	vi
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	vii
<b>DAFTAR ISI.....</b>	ix
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	xi
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	xiii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN .....</b>	xiv
 <b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
 <b>BAB 2.TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	6
2.1 Kelinci .....	6
2.1.1 Klasifikasi Kelinci .....	6
2.1.2 Kelinci Rex.....	8
2.1.3 Kelinci New Zealand White .....	8
2.1.4 Kelinci American Fuzzy Lop.....	9
2.2 Gen Myostatin .....	10
2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	13
2.4 Sekuensing DNA .....	16
2.5 Ekspresi Gen.....	17
2.6 Otot Skeletal .....	18
 <b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...</b>	20
3.1 Kerangka Konseptual .....	20
3.2 Bagan Kerangka Konseptual .....	21
3.3 Hipotesa Penelitian.....	22
 <b>BAB 4.METODE PENELITIAN .....</b>	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	23
4.2 Alat dan Bahan .....	23
4.3 Tahapan Penelitian .....	24
4.4 Rancangan Penelitian .....	25
4.5 Prosedur Kerja .....	25
4.5.1 Pemilihan Individu dan Pengambilan Sampel Darah Kelinci .....	25
4.5.2 Isolasi DNA .....	26

4.5.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA .....	26
4.5.4 Desain Primer .....	28
4.5.5 Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	28
4.5.6 Uji Kualitas PCR .....	29
4.5.7 Purifikasi Produk PCR .....	29
4.5.8 Sekuensing DNA .....	30
4.5.9 Pembuatan Preparat Histologi Otot Skelet .....	30
4.5.10 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) .....	31
4.5.11 Pengukuran Serabut Otot Skelet .....	32
4.5.12 Analisa Data .....	32
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>33</b>
5.1 Isolasi DNA dari Darah Kelinci .....	33
5.2 Amplifikasi Gen Myostatin (MSTN) dengan Metode PCR .....	35
5.3 Sekuensing Gen Myostatin (MSTN) .....	37
5.4 Analisa Histologi Otot .....	38
5.5 Analisa Sekuen DNA dan Asam Amino Gen Myostatin (MSTN) .....	41
<b>BAB 6. PENUTUP .....</b>	<b>44</b>
6.1 Kesimpulan .....	44
6.2 Saran .....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>48</b>

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 3.1 Bagan Kerangka Konseptual .....	21
Tabel 5.1 Konsenstrasi dan Kemurnian DNA Darah Kelinci .....	33
Tabel 5.2 Urutan Basa Nukleotida Primer Gen MSTN .....	35
Tabel 5.3 <i>Querry Coverage</i> dan <i>Identity Percentage</i> Gen MSTN Sampel Kelinci .....	37
Tabel 5.4 Lebar Srabut Otot Sampel Kelinci .....	40



## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Kelinci Rex .....	8
Gambar 2.2 Kelinci New Zealand White .....	9
Gambar 2.3 Kelinci American Fuzzy Lop .....	9
Gambar 2.4 Skematik Representatif dari Gen Myostatin Kelinci .....	10
Gambar 2.5 Proses Myostatin, Sinyal, dan Intervensi Terapeutik .....	11
Gambar 2.6 Siklus PCR .....	15
Gambar 2.7 Potongan Melintang Otot Skeletal .....	19
Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%).....	35
Gambar 5.2 Origin Oligo Nukleotida Gen MSTN .....	36
Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 1,8%) .....	36
Gambar 5.4 Gambaran Histologi Serabut Otot Skeletal Sampel A1 (Kelinci Rex) .....	39
Gambar 5.5 Gambaran Histologi Serabut Otot Skeletal Sampel A2 (Kelinci New Zealand White) .....	39
Gambar 5.6 Gambaran Histologi Serabut Otot Skeletal Sampel A3 (Kelinci American Fuzzy Lop) .....	39
Gambar 5.7 Penyejajaran Asam Amino Sampel A1, A2 dan A3 terhadap Referensi Gen MSTN.....	42

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Laik Etik .....	49
Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian .....	50
Lampiran 3. Protokol Isolasi DNA .....	51
Lampiran 4. Desain Primer .....	52
Lampiran 5. Hasil Nanodrop Sampel Kelinci .....	55
Lampiran 6. Grafik Elektroforegram Hasil Produk PCR <i>Oryctolagus cuniculus</i> ..	56
Lampiran 7. BLAST Hasil Sekuensing.....	59
Lampiran 8. Penyejajaran Antara Sekuen DNA Sampel A1, A2 dan A3 Terhadap Referensi Gen MSTN.....	61
Lampiran 9. Daftar Kode Genetik Asam Amino .....	61
Lampiran 10. Perbedaan Morfologi Kelinci .....	62



## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

<b>Simbol/</b>	<b>Keterangan</b>
<b>Singkatan</b>	
%	: Persen
°C	: Derajat Celcius
µL	: Mikroliter
AE	: <i>Eluted buffer</i>
AL	: <i>Lysis buffer</i>
ActRIIB	: Activin Receptor B tipe II
BLAST	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	: <i>Base pair</i>
ddNTP	: <i>Di-deoxy Nucleotide Triphosphatase</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
dNTPs	: <i>Deoxynucleotide Triphosphatase</i>
EtBr	: <i>Etidium bromida</i>
Fasta	Merupakan suatu format teks untuk mempresentasikan sekuen nukleotida atau sekuen asam amino (protein) yang digambarkan dalam satuan huruf
g	: Gram
GDF8	: <i>Growth Differentiations Factor 8</i>
<i>Identity percentage</i>	: Persentasi identitas pada basis DNA yang sama dengan database yang disejajarkan
Kg	: Kilogram
mL	: Mililiter
MgCl <sub>2</sub>	: Magnesium Klorida
MSTN	: <i>National Centre for Biotechnology Information</i>
NCBI	: Nanometer
Nm	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR	: Persentasi dari panjang segmen DNA yang sejajar dengan database
<i>Query coverage</i>	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RNA	: Keluarga faktor transkripsi yang memediasi sinyal TGF-β. Istilah SMAD berasal dari protein Drosophila MAD (Mothers Against Decapentaplegic) dan Caenorhabditis elegans protein SMA (Small body size)
SMAD	: <i>Transforming Growth Factor-β</i>
TGF-β	: <i>Melting temperature</i>
Tm	

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kelincimerupakan salah satu ternak yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai penghasil daging, kulit dan bulu. Kelinci dapat dijadikan sebagai alternatif penyedia sumber protein hewani yang sehat dan berkualitas tinggi. Daging kelinci memiliki kadar protein tinggi, sedangkan kandungan lemak dan kolesterol lebih rendah dibandingkan ternak lain. Keunggulan kelinci dibandingkan ternak lainnya seperti kemampuan pertumbuhan yang pesat dan tingkat reproduksi yang tinggi, pemeliharaan yang lebih mudah, tidak membutuhkan lahan yang luas (Nur, 2010).

Terdapat beberapa jenis kelinci yang khusus dipelihara sebagai kelinci pedaging.

Kelinci pedaging ini dicirikan memiliki bobot sekitar 4 hingga 6 kg. beberapa jenis kelinci yang termasuk ke dalam kelinci pedaging antara lain *California*.

*New Zealand*, *Satin dan Flemish*, *Giant*.

Selain dimanfaatkan sebagai kelinci pedaging terdapat beberapa jenis kelinci yang dapat dimanfaatkan sebagai produksi bulu, kelinci jenis ini adalah *Rex dan Angora*.

Beberapa kelinci juga digolongkan ke dalam kelinci hias diantaranya *Lop, Netherland Dwarf dan Dutch* (Muryantodkk, 2005).

Data	DITJENNAK	tahun	2012
menyatakan pemenuhan daging kelinci pada tahun 2010 sampai 2011 meningkat			
71%.	Kelinci	yang	

diproduksisecarakomersialsangatmenguntungkandikarenakandapatmemproduksid aging yang berkualitasdenganbiayaproduksi yang rendah. Kecepatanpertumbuhankelincidipengaruhiolehbangsa, umur, jeniskelamin, bobotsapih, pakandansuhulingkungan.

Identifikasi gen yang terkaitdenganperekonomianpadakelinci sang penting, karenaautukpeningkatandanpengembangankualitasgenetik. Kemajuanbioteknologi di bidanggenetikamolekulerdapatdijadikanalternatif yang sangatefektif, akuratdanefisienmelaluipengcirigenetikberdasarkan gen-gen fungsionalpengontrolpertumbuhan danproduksidaging. Salah satu gen yang merupakan gen utamadanpenentudalampengontrolsifatpertumbuhan danproduksidaging adalah gen *Myostatin*. Gen *Myostatin*atau*Growth Differentiations Factor 8* (GDF8) merupakansuperfamili*Transforming Growth Factor-β* (TGF- $\beta$ )yang berfungsisebagai regulator negatifdaripertumbuhanotot skeletal (Ye et al., 2007).

Gen *Myostatin*secarakhususdiekspresikanselamaperkembanganembrio, diekspreksikansecaramenyeluruhpadaotot skeletal saatdewasadanmengontrolpertumbuhanotot skeletal. Analismolekuler gen *Myostatin*padaspesies yang berbedamenunjukkanbahwa gen tersebutterdiridari 3 eksondan 2 intron, danmempengaruhijumlahsertakomposisiseratotot. Mutasi*Myostatin*dapatmenyebab kanpeningkatanumlahseratotot (hiperplasia) danpeningkatan volume seratotot (hipertropi), atausebaliknya. (Joulia et al., 2003)

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan ukuran serabut skeletal dan gen *Myostatin* pada Kelinci Rex, New Zealand White dan American Fuzzy Lop.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat perbedaan ukuran serabut tota tantara Kelinci Rex, New Zealand White dan American Fuzzy Lop ?
2. Apakah terdapat perbedaan sekuen gen *Myostatin* (MSTN) pada Kelinci Rex, New Zealand White dan American Fuzzy Lop ?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan adalah jaringan otot skelet dandarah Kelinci Rex, New Zealand White dan American Fuzzy Lop yang diperoleh dari peternakan Kelinci Modern di Kota Batu dengan Laik Etik No. 1078-KEP-UB.
2. Gen DNA *Myostatin* diisolasi dari Kelinci Rex, New Zealand White dan American Fuzzy Lop menggunakan *Qlagen Qiaamp DNA Mini Kit*.
3. Amplifikasi gen *Myostatin* Kelinci Rex, New Zealand White dan American Fuzzy Lop dilakukan dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan sepasang primer *Forward* 5'- GGC AAG TTG TCT

CTC AAG CT -3' dan *Reverse 5'* - CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3'  
yang di design manual serta di analisa dengan IDTDNA Oligoanalyzer. .

4. Metode PCR dilakukan dengan mesin *SensoQuest Thermocycler* dengan program: pradenaturasi 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 55,6°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 1 menit, dan *post extension* 72°C selama 7 menit.
5. Sekuensi DNA dilakukan dengan memilih tiga sampel kelinci yang terdiri dari : 1 Kelinci *Rex* jantan, 1 Kelinci *New Zealand White* jantan dan 1 Kelinci *American Fuzzy Lop* jantan dengan metode dideoksi sanger berdasarkan *ye terminator labelling* dengan menggunakan sepasang primer *Forward 5'*- GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT -3' dan *Reverse 5'*- CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3'.
6. Pengukuran serabut totskelet dilakukan dengan mengambil sampel jaringan otot skeletal pada bagian paha, kemudian dibuat preparasi histologis dan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE).
7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan ukuran serabut totskeletal dan sekuen DNA dan sam amino gen *Myostatin (MSTN)* Kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop* menggunakan program *Image Raster 3, BioEdit*, dan *Basic Local Aligment Search Tool (BLAST)* dari NCBI.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui adanya perbedaan ukuran serabut totot skeletal antara Kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop*.
2. Untuk mengetahui adanya perbedaan sekuen gen *Myostatin* (MSTN) antara Kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop*.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik sekuen gen *Myostatin* Kelinci dengan perbedaan ukuran serabut totot skeletal Kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop* dan meningkatkan produksi daging kelinci di Indonesia.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kelinci

#### 2.1.1 Klasifikasi Kelinci

Menurut Damron (2003), klasifikasi kelinci secara ilmiah adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Phylum	: <i>Chordata</i>
Sub phylum	: <i>Vertebrata</i>
Kelas	: <i>Mammalia</i>
Ordo	: <i>Lagomorpha</i>
Famili	: <i>Leporidae</i>
Genus	: <i>Oryctolagus</i>
Spesies	: <i>Oryctolagus cuniculus</i>

Kelinci mempunyai ukuran, kegunaan, warna dan berat yang berbeda-beda. Berat kelinci saat dewasa sangat bervariasi mulai dari 1,5 kg sampai 7 kg. Bangsa kelinci yang dijadikan sebagai penghasil daging diantaranya *Californian*, *Flemish Giant*, *Satin* dan *New Zealand*, sedangkan kelinci yang dipelihara untuk menghasilkan kulit dan bulu adalah *Rex* dan *Angora*. Kelinci yang biasanya dipelihara sebagai kelinci hias atau sebagai binatang kesayangan diantaranya *Lyon*, *Lop*, *Dutch*, *Polish* (Putra dan Budiana. 2006).

Hasil berbagai persilangan kelinci ras popular di dunia dibagi dalam empat kategori berdasarkan bobot kelinci yaitu kelinci kerdil, kelinci kecil, kelinci sedang dan kelinci besar. Kelinci kerdil (*dwarf breeds*), kelinci jenis ini memiliki berat dewasa kurang dari 1,75 kg dan kelinci jenis ini biasa dipelihara sebagai hewan kesayangan. Beberapa jenis kelinci yang tergolong kelinci kerdil adalah *Netherland Dwarf, Britannia Petite, Hotot, Jersey Wooley* dan *Polandia*. Kelinci kecil (*small-sized breeds*) merupakan kelinci yang memiliki berat sekitar 1,25 kg – 2,5 kg. contoh dari jenis kelinci kecil antara lain *American Fuzzy Lop, Dutch, Himalaya, Holland Lop* dan *Mini Rex*. Kelinci sedang (*middle-sized breeds*), kelinci kelompok ini ditandai dengan bobot mulai dari 2,25 kg – 3,5 kg. Kelompok kelinci ini menghasilkan daging dengan tulang yang kecil, kelinci ukuran sedang merupakan kelinci yang memiliki variasi jenis paling banyak, baik sebagai kelinci hias maupun sebagai kelinci produksi. Kelinci jenis ini antara lain *Amerika Sable, English Angora, Harlequin, English Lop, Lilac, Rex, New Zealand, Chincilla* dan *Tan*. Kelinci besar (*giant breeds*), kelinci ini dapat memiliki berat sampai 12,5 kg dan biasa dimanfaatkan untuk produksi daging dan bulu. Kelompok kelinci besar meliputi *Giants Spoted, Giants Chincilla, Flemish Giant* dan *French Lop*(Hustamin, 2006).

Kelinci merupakan ternak yang cocok dipelihara di negara berkembang sebagai penghasil daging. Keuntungan ternak kelinci yaitu ukuran tubuh yang kecil sehingga tidak memerlukan banyak ruang, tidak memerlukan biaya yang besar dalam investasi ternak dan kandang, umur dewasa yang singkat yaitu sekitar 4-5 bulan, masa penggemukan yang singkat (sekitar 2 bulan sejak disapih),

kemampuan berkembang biak yang tinggi. Kelinci sangat cepat berkembangbiak, induk kelinci dapat beranak hingga 4 kali dalam setahun dan menghasilkan anak 4-8 ekor anak kelinci (Hendra, 2010).

### **2.1.2 Kelinci *Rex***

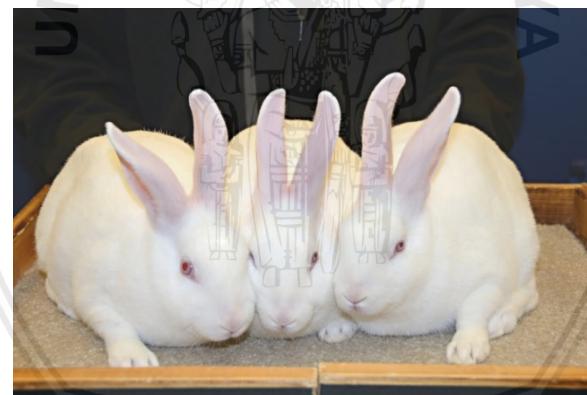
Kelinci *Rex* biasanya memiliki ciri khas yaitu pada bulu, bulu dari kelinci *rex* halus serta lembut seperti beludru. Kelinci *Rex* pertama ditemukan pada tahun 1919 di Prancis dan dari keturunan kelinci liar. Kelinci *Rex* mulai diperkenalkan pada tahun 1924 pada *Paris International Rabbit Show*, dan setelah itu kelinci *Rex* mulai banyak diimport ke Amerika Serikat. Selain keutamaan budidaya kelinci *Rex* sebagai penghasil bulu, kelinci ini juga dibudidayakan sebagai penghasil daging. Kelinci *Rex* memiliki bobot dewasa sekitar 4 – 5,5 kg (Busono dan Dini, 2010).



**Gambar 2.1.** Kelinci *rex* (Hoffman dan Smith, 2005)

### **2.1.3 Kelinci *New Zealand White***

Kelinci *New Zealand White* merupakan kelinci dengan ukuran badan yang besar dengan berat ukuran tubuh kelinci dewasa mencapai 4,5 – 6 kg. Kelinci ini sesuai namanya berasal dari *New Zealand*, dan berkembang di negara Amerika Serikat dan Australia. Kelinci ini biasa dibudidayakan untuk dimanfaatkan sebagai kelinci pedaging, dikarenakan ukuran tubuh yang besar serta pertumbuhan yang cepat. Kelinci *New Zealand* dapat menghasilkan anak sekitar 10 - 12 ekor perkelahiran. Secara umum jenis kelinci *New Zealand* memiliki berbagai macam warna yaitu *White*, *Red* dan *Black*. Jenis *New Zealand White* merupakan jenis paling popular, dikarenakan kelinci ini memiliki bulu yang keseluruhan berwarna putih dan mata berwarna merah (albino) (Busono dan Dini, 2010).



**Gambar 2.2.** Kelinci *new zealand white* (Hoffman dan Smith, 2005)

#### **2.1.4 Kelinci *American Fuzzy Lop***

Kelinci *American Fuzzy Lop* termasuk kedalam jenis Kelinci *Lop*. Ciri khas kelinci jenis ini adalah bentuk kepala yang lebar serta telinga yang menggantung ke bawah, berbeda dari kelinci pada umumnya mempunyai telinga yang tegak. Kelinci *Lop* biasa digunakan sebagai kelinci hias atau hewan

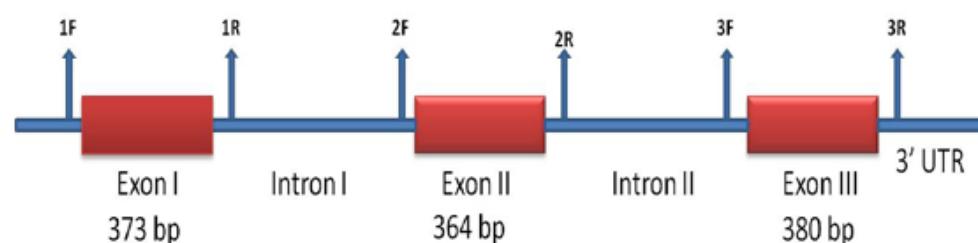
peliharaan dikarenakan kelinci ini sangat lucu. Kelinci ini memiliki berat tubuh saat dewasa sekitar 1,5 – 2 kg (Busono dan Dini, 2010).



**Gambar 2.3.** Kelinci *american fuzzy lop* (Hoffman dan Smith, 2005)

## 2.2 Gen *Myostatin*

*Myostatin* (MSTN) disebut juga GDF8 (*Growth Differentiation Factor 8*), merupakan bagian dari superfamili TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factors- $\beta$* ) yang bertindak sebagai regulator negatif pertumbuhan otot. Gen *myostatin* secara khusus diekspresikan selama perkembangan embrio, terekspresi pada level tertinggi saat dewasa dan mengontrol pertumbuhan otot. Analisis molekuler dari gen *myostatin* pada spesies yang berbeda menunjukkan bahwa gen tersebut terdiri dari tiga exon dan dua intron, serta diketahui mempengaruhi baik jumlah dan komposisi serat otot (McPherron, 1997).



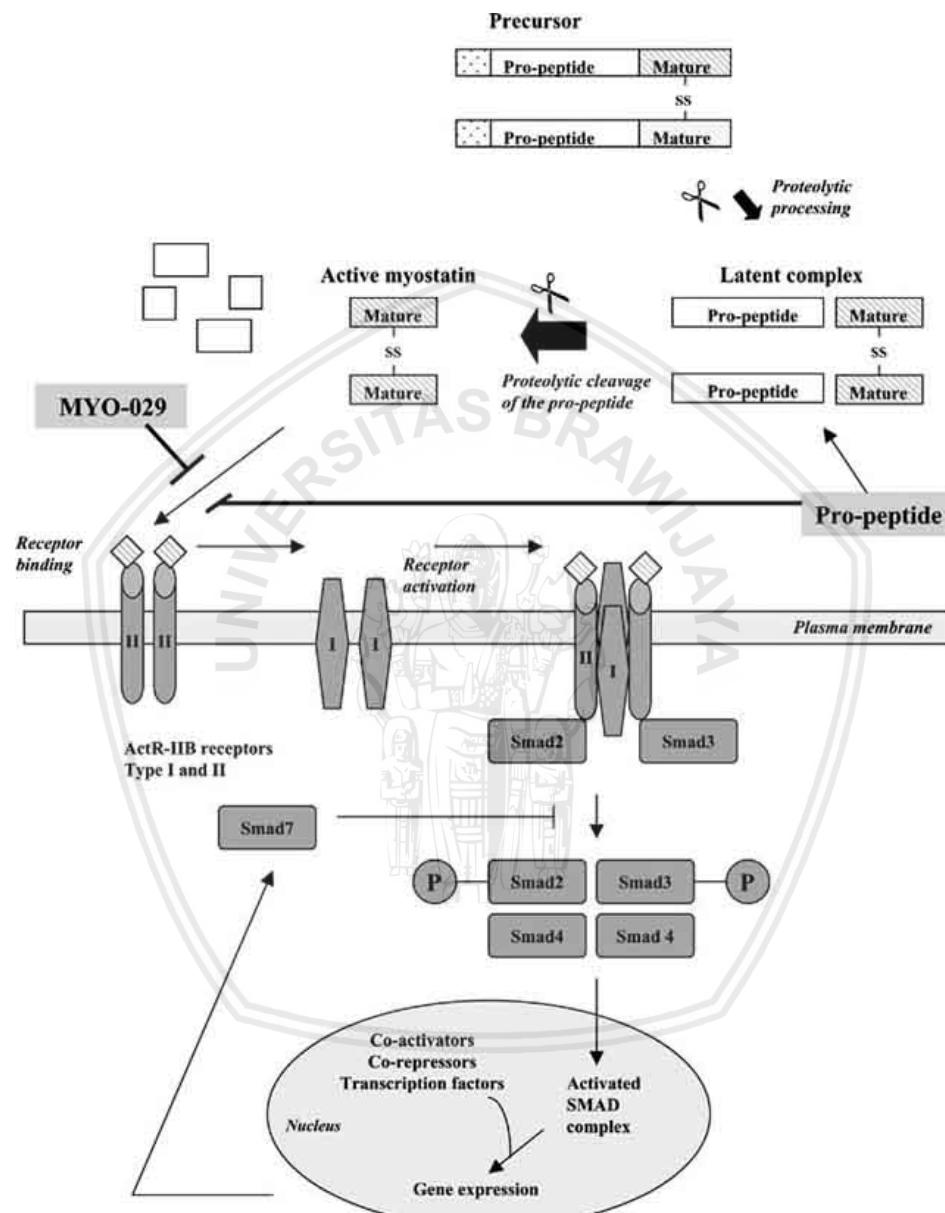
**Gambar 2.4.** Skematik representasi dari gen myostatin kelinci (McPherron, 1997)

*Myostatin* berfungsi dengan mengendalikan proliferasi sel-sel precursor otot. Mutasi *myostatin* dapat menyebabkan peningkatan masa otot skeletal dikarenakan peningkatan jumlah serat otot (hiperplasia) dan ketebalan serat otot (hipertropi). Pada sapi *Belgian Blue* dan *Piedmontese*, yang ditandai dengan peningkatan masa otot (*double muscling*) terjadi karena mutasi pada urutan penyandi gen *myostatin*. Fungsi *myostatin* sebagai regulator masa otot sangat berpengaruh (Thomas et al, 2000).

Seperti anggota superfamili TGF- $\beta$  yang lain, *myostatin* disintesis sebagai protein prekursor yang mengandung signal sekuen, penghambat domain N-terminal propeptida, dan domain C-terminal yang merupakan ligan aktif/*mature*. Prekursor mengalami pembelahan proteolitik, *folding* dan dimerisasi untuk membentuk molekul aktif. Setelah proses proteolitik, propeptida tetap terhubung dengan area C-terminal melalui ikatan non-kovalen dalam kompleks laten (Zimmers et al, 2002).

Sinyal *myostatin* beroperasi melalui kompleks heterodimeric reseptor transmembran *serin/threonin kinase*, *peptide myostatin mature* berikatan dengan salah satu activin tipe II reseptor (ActRIIB), memulai fosforilasi dan dengan demikian akan mengaktifkan co-reseptor tipe I (ALK-4/ALK-5) menyebarkan sinyal di sepanjang jalur SMAD. *Myostatin* beraksi melalui reseptor protein SMAD2 dan SMAD3. SMAD2 dan SMAD3 terfosforilasi membentuk kompleks heterodimerik dengan mediator umum SMAD4. Aktifasi protein SMAD berfungsi sebagai kunci mediator intraseluler untuk sinyal myostatin tertranslokasi ke dalam nucleus, dan mengaktifkan transkripsi gen target melalui interaksi dengan DNA

dan faktor inti lainnya. SMAD7 merepresi sinyal oleh SMAD lainnya dan mengatur transkripsi yang diinduksi myostatin.



**Gambar 2.5.** Proses *myostatin*, sinyal dan intervensi terapeutik (Zimmers *et al*, 2002).

Ekspresi gen *myostatin* diatur oleh perkembangan individu. Awalnya, ekspresi gen *myostatin* terdeteksi dalam sel-sel prekursor *myogenic* pada kompartemen *myotome* saat perkembangan somit dan ekspresi gen *myostatin* dilanjutkan pada fase setelah kelahiran. *Myostatin* sangat berperan pada semua

tahapan myogenesis. Kehilangan fungsional *myostatin* dapat menyebabkan terjadinya hyperplasia dan hipertrofi dari otot-otot skeletal, karena peningkatan serat otot dapat mengakibatkan peningkatan proliferasi *myoblast* dan penundaan differensiasi. Diketahui bahwa *myostatin* berperan dalam mengontrol proliferasi *myoblast* dan progresi siklus sel (Thomas, 2000).

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

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik sintesis serta amplifikasi DNA secara *in vitro*. Pada tahun 1985, Karry Mullis pertama kali mengembangkan teknik PCR ini. PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dengan jumlah banyak hanya beberapa jam, selain itu teknik PCR juga dapat digunakan untuk sekuensi DNA. PCR biasa dipakai dalam bidang diagnosa penyakit genetik, evolusi molecular dan kedokteran forensik (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Konsep dari teknologi PCR adalah terdapat syarat jika bagian tertentu dari sekuen DNA yang nantinya dilipat gandakan terlebih dahulu diketahui sebelum dilakukan proses pelipat gandakan. Sekuen yang diketahui tersebut digunakan untuk menyediakan primer, yaitu sekuen oligonukleotida pendek yang memiliki fungsi untuk mengawali sintesis rantai DNA pada reaksi beratai polymerase (Widowati, 2013).

Beberapa komponen penting yang diperlukan dalam proses PCR adalah templat DNA, sepasang primer yaitu suatu oligonukleotida pendek yang memiliki urutan nukleotida berkomplementer dengan urutan nukleotida pada DNA templat,

dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates), buffer PCR, magnesium klorida ( $MgCl_2$ ) dan enzim polymerase DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Proses PCR memiliki tiga tahapan yang terus berulang dalam 30 – 40 siklus, serta berlangsung secara cepat yaitu denaturasi, *annealing*, *extention*.

### 1. Denaturasi

Tahap pertama yang dilakukan adalah denaturasi awal yang dilakukan sebelum ditambahkan enzim Taq Polymerase ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA adalah proses pembukaan DNA yang memiliki untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Proses pembukaan ini biasanya akan berlangsung selama 3 menit. Denaturasi yang tidak sempurna akan menyebabkan DNA tersebut mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda kembali) secara cepat, jika proses denaturasi terlalu lama akan mengakibatkan pengurangan aktifitas enzim Taq Polymerase dan mengakibatkan gagalnya proses PCR. Enzim Taq Polymerase memiliki waktu paruh sekitar 2 jam pada suhu  $92,5^{\circ}\text{C}$ , 40 menit pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  dan 5 menit pada suhu  $97,5^{\circ}\text{C}$  (Yusuf, 2010).

### 2. *Annealing* (Penempelan Primer)

Proses *annealing* dilakukan pada suhu  $36^{\circ}\text{C}$  sampai suhu  $72^{\circ}\text{C}$ , tetapi pada umumnya digunakan suhu  $50^{\circ}\text{C}$  sampai  $60^{\circ}\text{C}$ . Semakin panjang ukuran primer maka semakin tinggi temperatur yang digunakan. Proses *annealing* biasa dilakukan selama 30 – 45 detik. Kriteria primer yang baik adalah primer yang berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50% – 60% G+C. Kedua primer yang digunakan sebaiknya sama, serta sekuens

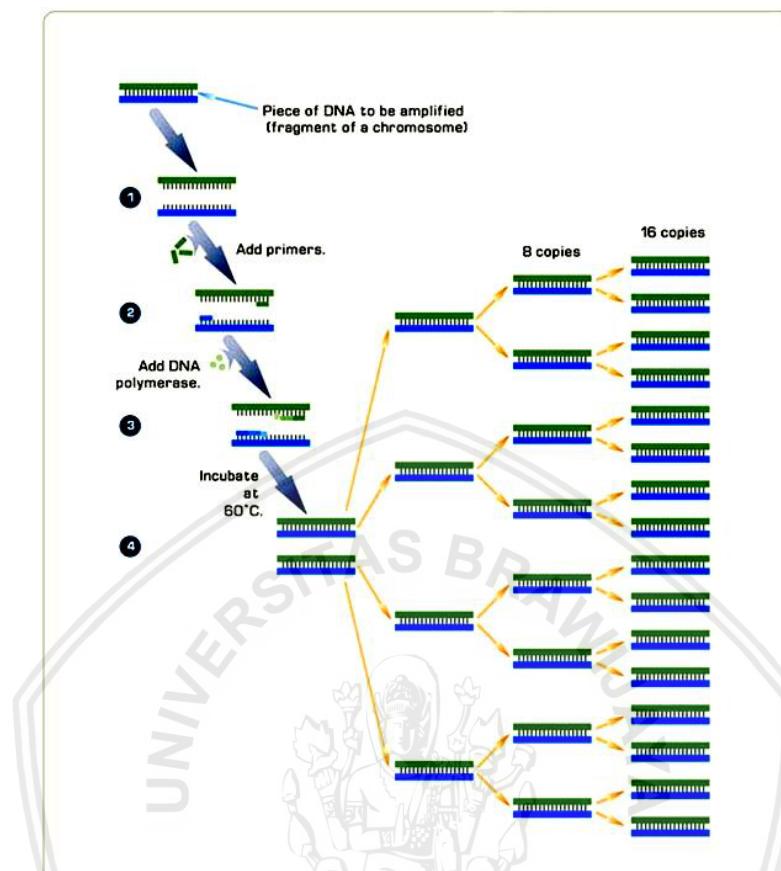
DNA dalam masing-masing primer tersebut tidak saling berkomplemen yang nantinya menyebabkan terbentuk struktur sekunder pada primer dan akan mengurangi efisiensi PCR (Yusuf, 2010). *Melting temperature* (Tm) yang biasa digunakan sekitar 50°C sampai 65°C, Tm primer akan menentukan pemilihan suhu pada proses *annealing* (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Suhu *annealing*(Ta) yang tinggi dapat menyulitkan terjadinya terjadinya ikatan primer sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien. Sebaliknya, jika suhu *annealing* yang digunakan terlalu rendah dapat menyebabkan primer pada DNA menempel pada tempat yang tidak spesifik. Ta dapat dihitung menggunakan rumus: (Eling dkk, 2014).

$$Ta = 0,3 + Tm(\text{primer}) + Tm(\text{produk}) - 14,9$$

### 3. *Extention* (Pemanjangan Primer)

Pada tahapan ini enzim Taq polymerase akan memulai aktivitas memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Proses extensi dilakukan pada suhu 72°C, karena pada suhu tersebut kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim mencapai 35 – 100 nukleotida/detik dan dipengaruhi oleh buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Produk PCR yang memiliki panjang sekitar 2000 pasang basa hanya membutuhkan waktu sekitar 1 menit untuk proses perpanjangan primer (Yusuf, 2010).



**Gambar 2.6.** Siklus PCR (Yusuf, 2010)

#### 2.4 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA atau pengurutan DNA merupakan proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada fragmen DNA. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Scheffler, 2008). Sekuensing diawali menggunakan proses *cycle sequencing*. *Cycle sequencing* merupakan proses amplifikasi menggunakan metode PCR untuk memperoleh DNA untai tunggal yang nantinya digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk proses sekuensing (Sambrook dan Russel, 2001).

Metode sekensing DNA yang saat ini lebih sering digunakan dan jauh lebih praktis adalah metode dideoksi yang dikembangkan oleh A. Sanger. Proses awal dari metode ini primer pada tahap PCR digunakan secara terpisah, yaitu hanya menggunakan satu primer saja dan adanya penambahan Di-dioksinukleotida trifosfat (ddNTP) yang diberi label fluorescent. Penambahan ddNTP akan menghentikan proses polimerisasi, dan basa yang terdapat pada ujung molekul DNA adalah basa yang dibawa oleh molekul ddNTP. Pewarna yang ada pada ddNTP akan dapat terdeteksi oleh sensor pada mesin sequencer, karena warna fluorescent untuk setiap basa berbeda, maka urutan basa pada DNA yang tidak diketahui dapat ditentukan. Penggunaan metode Sanger akan memungkinkan pembacaan urutan DNA menggunakan fluorometri (Rinanda, 2011).

Hasil dari sekensing yang sudah terlihat susunan dari nukleotidanya, berikutnya dilakukan proses secara online dan sederhana menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). BLAST adalah algoritma yang dapat digunakan untuk membandingkan informasi urutan biologis primer, seperti nukleotida urutan DNA materi genetic yang telah ada pada *Database*. Hasil yang akan muncul berbentuk grafis, tabel dan data skor jika menggunakan BLAST NCBI (Fatchiyah, 2015).

## 2.5 Ekspresi Gen

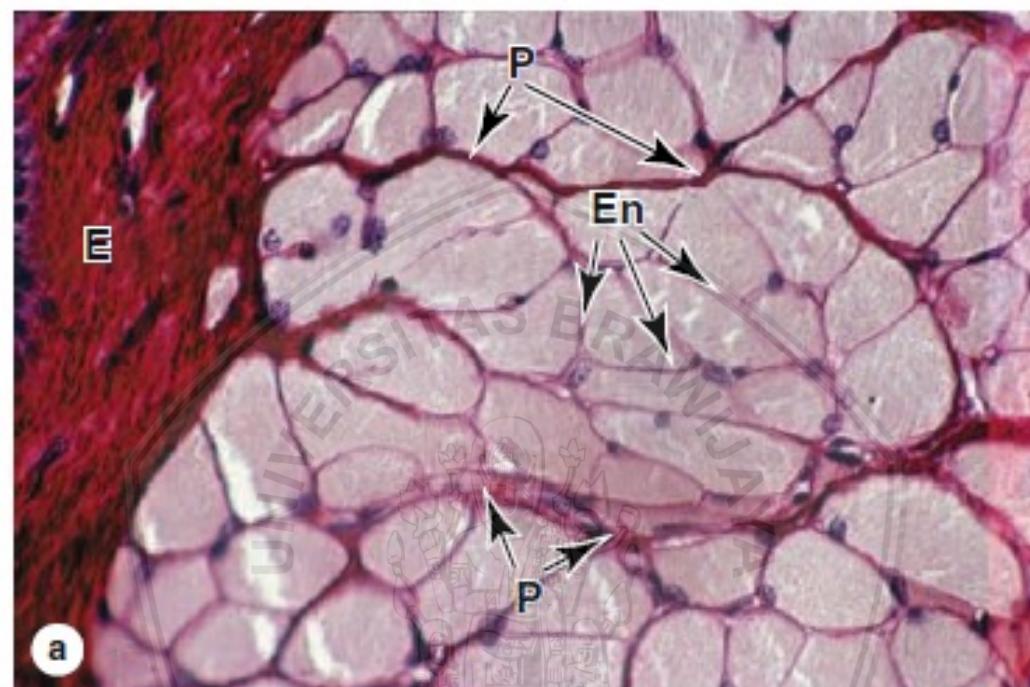
Ekspresi gen *myostatin* tampak diatur saat masa perkembangan. Pada awalnya, ekspresi gen *myostatin* terdeteksi pada sel prekursor *myogenic* dari kompartemen *myotome* somit, dan ekspresi gen akan dilanjutkan saat dewasa. Gen

*myostatin* secara eksklusif terekspresi pada otot skeletal. Meskipun peran fungsional *myostatin* dalam mengendalikan massa otot telah diatur dengan baik oleh genetik, mekanisme dimana *myostatin* mengontrol jumlah serat otot tidak diketahui. Karena ekspresi *myostatin* terdeteksi pada somit selama proses myogenesis embrionik, dan ekspresi tersebut dilanjutkan pada otot setelah kelahiran, *myostatin* berpengaruh pada semua tahapan dari myogenesis. Myostatin secara normal akan menghambat *myogenin* sehingga *myoblast* berdiferensiasi menjadi *myotubes*, dan *myotubes* tidak akan berkembang menjadi serat otot. Hilangnya fungsi *myostatin* menyebabkan hiperplasia dan hipertropi dari otot skeletal. Dikarenakan peningkatan serat otot bisa berakibat dari peningkatan proliferasi *myoblast* dan penundaan diferensiasi. *Myostatin* sangat berperan dalam mengendalikan proliferasi *myoblast* dan perkembangan siklus sel (Thomas, 2000).

## 2.6 Otot Skeletal

Secara umum otot skeletal/rangka terdiri dari tiga komponen dasar yaitu jaringan ikat, jaringan otot dan sistem membran. Banyak sel berbentuk silindris dengan panjang hingga 30 cm dan memiliki banyak inti dengan diameter 10-100  $\mu\text{m}$ . Inti yang lonjong umumnya terdapat pada tepian sel di bawah membran sel. Lokasi dari inti sel yang khas ini membantu membedakan otot skeletal dari otot jantung dan otot polos dengan inti yang berada ditengah. Massa serabut yang menyusun barbagai jenis otot yang tidak berkelompok secara acak namun tersusun teratur yang dikelilingi oleh epimisium, merupakan suatu selubung otot luar jaringan ikat padat yang mengelilingi seluruh otot. Septa tipis jaringan ikat menyusup ke dalam serta mengelilingi berkas serabut di dalam otot disebut

perimysium. Endomysium merupakan selapis halus jaringan ikat yang mengelilingi setiap otot. Tersusun dari lamina basal dan serat-serat retikulin (Junqueiras, 2007).



**Gambar 2.7** Potongan melintang otot skeletal. Endomisium ditunjukkan dengan simbol En dan perimisium ditunjukkan dengan simbol P.

## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

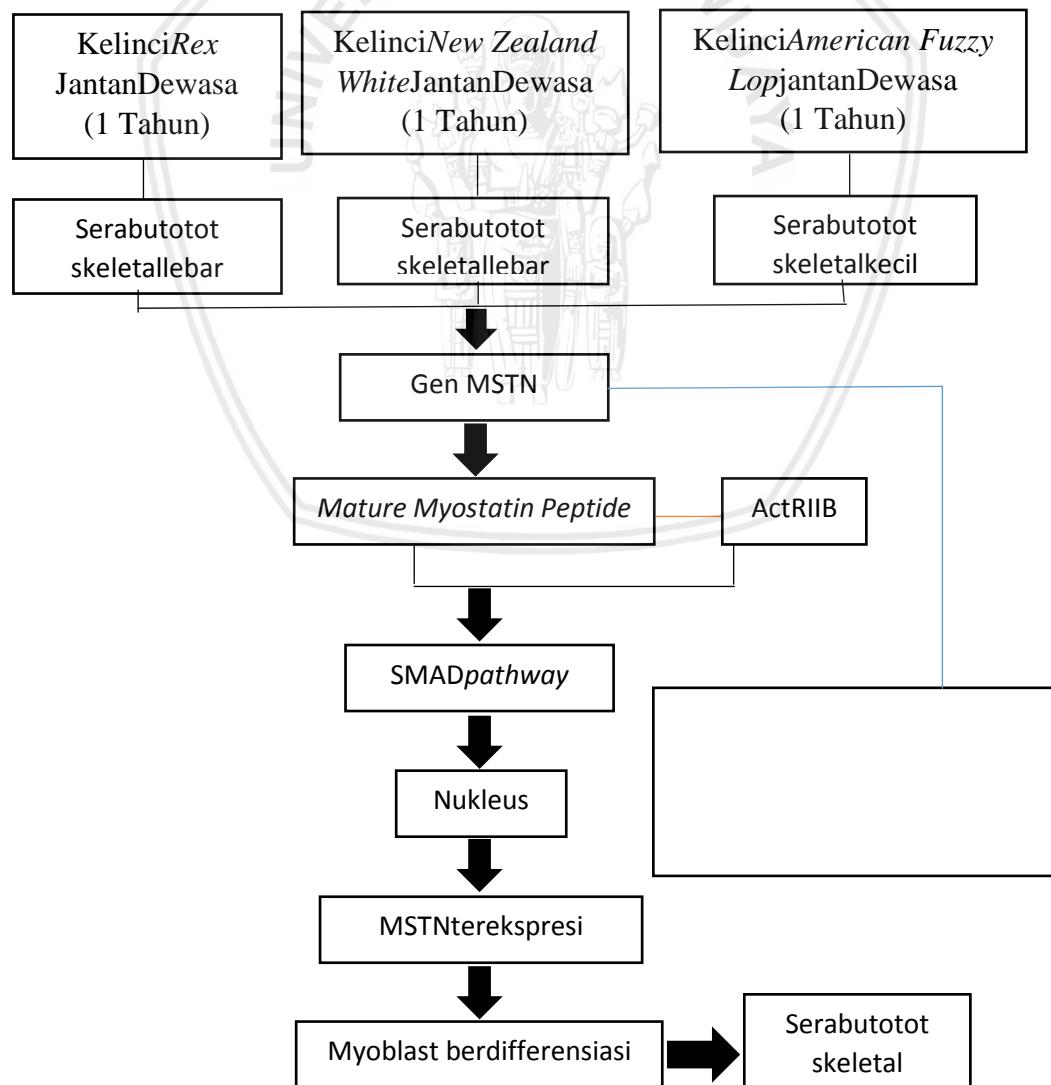
### 3.1 Kerangka Konseptual

Perbedaan ukuran serabut totot skeletal pada Kelinci *Rex* jantandewasa (umur 1 tahun) dengan Kelinci *New Zealand White* jantandewasa (umur 1 tahun) dan juga Kelinci *American Fuzzy Lop* jantandewasa (umur 1 tahun) dapat ditentukan oleh ekspresi gen *Myostatin* (MSTN). Sinyal MSTN beroperasi melalui kompleks heterodimerik dari transmembran *serine/threonine kinase* reseptör, *mature myostatin peptide* berikan tanda dengan aktivitas tipe II reseptör (ActRIIB) untuk memulai fosforilasi, dengan demikian akan mengaktifkan co-reseptör tipe I (ALK-4/5) menyebarkan sinyal di sepanjang jalur SMAD. *Myostatin* berikan tanda dengan protein reseptör SMAD2 dan SMAD3 yang kemudian terfiksasi membentuk kompleks heterodimerik dengan mediator umum SMAD4. Aktivasi protein SMAD4 berfungsi sebagai kunci mediator intraseluler untuk sinyal *myostatin* tertranslokasi ke dalam nukleus, dan mengaktifkan transkripsi gen target melalui interaksi dengan DNA dan faktor inti lainnya yang selanjutnya gen *myostatin* ekspresi. SMAD7 menekan sinyal oleh SMAD lainnya dan mengatur transkripsi yang diinduksi *myostatin*. Ekspresi *myostatin* akan mengontrol proses myogenesis, dimana *myostatin* akan menghambat *myogenin* dan menyebabkan *myoblast* berdiferensiasi menjadi *myotubes* dan ini mengakibatkan *myotube* tidak dapat berkembang menjadikan *myotubes* dan ini mengakibatkan *myotube* tidak dapat berkembang menjadikan *myotubes*. Jika *myostatin* mengalami mutasi, akan menyebabkan *myoblast*

berpoliferasimenjadimyotubesinggamyotubesakanberkembangmenjadiseratot haltersebut yang mengakibatkanukuranserabutot skeletal menjadimembesar.

Ekspresi gen MSTN dapat diketahui melalui sampel darah. Gen MSTN ini berada dalam DNA inti. Sampel DNA nantinya diperoleh dari isolasi darah menggunakan *QIAamp® DNA Mini Kit*. Amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan menggunakan metode PCR membutuhkan sepasang primer *forward* dan *reverse*. Primer yang digunakan diperoleh dari database NCBI *GeneBank*.

### 3.2 Bagan Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1.** Bagan KerangkaKonseptual

### **3.3 HipotesisPenelitian**

Hipotesispenelitianiniadalah :

1. Terdapatperbedaanukuranserabutotantarakelinci*Rex, New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop*
2. Terdapatperbedaansekuen gen *Myostatin* (MSTN) antarakelinci*Rex, New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop*

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel darah pada Kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop* dilakukan di Peternakan Kelinci Modern di Kota Batu. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya untuk pemesanan primer, ADD Lab Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk pelaksanaan metode PCR, Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maliki Ibrahim Malang untuk Uji kuantitas DNA. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – April 2019.

### 4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu : *disposable syringe* 1 cc, standar *forceps*, sarung tangan, masker, gunting, *ice box*, kertas label, *autoclave - Bio clave Gnatus* 211, *micro tube* 1,5 mL, *micro tube rack* 150 $\mu$ L, mikropipet (1-100 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 200-1000 $\mu$ L), labu *Erlenmeyer* 100mL, timbangan digital, inkubator, mesin penangas, *autoclave Gnatus* 12L, mesin vortex, *white tip, yellow tip, blue tip, pipete tube rack*, sentrifugator, *freezer -20°C*, *Thermocycler SensoQuest GmBh*, mesin *sequencing*, komputer, *Bio step UV-Transilluminator DH-40, Implen NanoPhotometer® pearl, Mupid-Exu Electrophoresis* dan kamera.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel darah Kelinci Rex jantan dewasa (umur 1 tahun) dengan Kelinci American Fuzzy Lop jantan dewasa (umur 1 tahun) dan juga Kelinci New Zealand White jantan dewasa (umur 1

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

#### **4.3 Tahapan Penelitian**

Penelitian yang dilakukan memiliki beberapa tahapan yaitu:

1. Pengambilan sampel darah Kelinci *Rex* jantan dewasa (umur 1 tahun) dengan Kelinci *New Zealand White*jantan dewasa (umur 1 tahun) dan juga Kelinci *American Fuzzy Lop*jantan dewasa (umur 1 tahun)
2. Isolasi DNA
3. Uji Kuantitas dan kualitas DNA
4. Desain primer
5. Polymerase Chain Reaction (PCR)
6. Uji kuantitas dan kualitas produk PCR
7. Purifikasi produk PCR
8. Sekuensing DNA produk PCR
9. Pembuatan Preparat Hematoxylin Eosin (HE)
10. Pengukuran Serabut Otot Skelet
11. Analisa data

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Sebanyak 1 sampel darah Kelinci *Rex* jantan dewasa umur 1 tahun, 1 sampel darah Kelinci *New Zealand White*jantan dewasa umur 1 tahun dan 1 sampel darah Kelinci *American Fuzzy Lop*jantan dewasa umur 1 tahun sebanyak 1 cc tiap individu. Tahapan selanjutnya dengan pengisolasian DNA melalui sampel darah tersebut menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit and Tissue Kit*. Hasil isolasi DNA diukur konsentrasinya dengan nanospektrofotometri dan ukuranya dengan elektroforesis gel agarose 1%. Setelah itu, sampel DNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *Forward* (MSTN\_F) 5'- GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT -3' dan *Reverse*(MSTN\_R) 5'- CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3'. Untuk mengetahui ukuran fragmen dari produk PCR diukur menggunakan elektroforesis gel agarose 2%. Produk PCR selanjutnya di sekruensing. Hasil dari sekruensing kemudian dibandingkan menggunakan BLAST pada NCBI, *software MEGA* versi 7.0 dan *software Bioedit*.

#### 4.5 Prosedur Kerja

##### 4.5.1 Pemilihan Individu dan Pengambilan Sampel Darah Kelinci

Sampel yang digunakan adalah darah pada kelinci di Peternakan Kelinci Kota Batu. Terdapat 3 ekor kelinci yang diambil sampel darahnya, yaitu satu ekor Kelinci *Rex* jantan dewasa berumur 1 tahun, satu ekor Kelinci *New Zealand White*jantan dewasa berumur 1 tahun dan satu ekor Kelinci *American Fuzzy Lop*jantan dewasa berumur 1 tahun. Sampel darah diambil melalui *vena*

*auricullaris* dengan *disposable syringe* 3 cc. sampel darah diletakkan ke dalam tabung *venoject EDTA*.

#### **4.5.2 Isolasi DNA**

Isolasi DNA menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit* dan mengikuti protocol isolasi DNA dari darah. Isolasi DNA terdapat 3 langkah utama , yaitu melisiskan dinding sel, pemisahan DNA dari bahan padat (selulosa dan protein), dan pemurnian (Surycki, 2000).

#### **4.5.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA**

##### **4.5.3.1 Uji Kuantitas DNA**

Uji kuantitas DNA dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Pengujian dilakukan dengan buffer akhir dari isolasi DNA sebagai blanko. Buffer ini diteteskan pada *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1 $\mu$ l, kemudian dilakukan pengukuran absobansi blanko dengan menekan tombol blank setelah *lid* (penutup) ditutup. Selanjutnya hasil akan muncul pada monitor (Fatchiyah dkk, 2009). Pengukuran kemurnian pada uji kuantitas DNA diperoleh dari perbandingan antara panjang gelombang 260 nm sampai dengan 280 nm sehingga didapatkan interpretasi hasil. Nilai murni isolasi DNA yaitu apabila absobansi 260/280 yaitu 1,8 – 2,0 jika memiliki nilai yang lebih besar daripada nilai 2,0 akan menunjukkan adanya kontaminasi RNA, sedangkan jika dibawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminaasi protein (Sambrook dan Russel, 2001).

#### 4.5.3.2 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas DNA hasil isolasi menggunakan teknik *nanophotometer*, sedangkan uji kualitas DNA total dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Elektroforesis sel agarosa 1% dilakukan dengan menggunakan mesin Mupid-Exu *electrophoresis*. Dilakukan pembersihan pada cetakan agarosa yang diletakkan secara horizontal, selanjunya dipanaskan TBE 1x sebanyak 15 mL dan gel agarosa 0,15 g (1%) hingga agarosa larut, selanjutnya ditambah EtBr sebanyak 1 $\mu$ L. Campuran selanjutnya didinginkan lalu disiapkan sisir untuk pembuatan slot pada gel.

Campuran Agarosa dan TBE 1x dituang kedalam cetakan dan dipastikan tidak ada gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel dibiarkan memadat selama 20-30 menit pada suhu ruangan. Sisir diambil secara perlahan dan dipindahkan agarosa yang sudah padat ke dalam chamber. Larutan buffer elektroforesis dituangkan diatas gel sehingga menutupi seluruh bagian gel ( $\pm$  1 mm). Marker (DNA ladder) dan loading dye (dengan perbandingan 1:1) dimasukkan kedalam sumuran pertama, kemudian larutan loading dye dan DNA (perbandingan 1:1) dimasukkan pada masing-masing sumur berikutnya (sesuai pelabelan). Chamber dihubungkan dengan power supply dan dinyalakan selama 15 menit dengan tegangan 100 volt, jika lead terpasang dengan benar gelembung akan dihasilkan pada anoda dan katoda karena elektrolisis dan dalam beberapa menit loading dye harus migrasi dari sumur ke gel. Setelah running elektroforesis selesai, arus listrik diputuskan dan diangkat dari chamber. Gel selanjutnya

dipindah ke UV-tranasilluminator Gel Doc dan di dokumentasikan dengan diekspos sehingga memudahkan analisis dengan menggunakan Gel Doc-imaging.

#### **4.5.4 Desain Primer**

Amplifikasi DNA menggunakan primer dalam melakukan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) didesain menggunakan NCBI GeneBank .primer tersebut didapatkan dari primer3plus dan oligo analyzer. Sepasang primer yang diperoleh adalah primer *Forward* (MSTN\_F) 5'- GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT -3' dan primer *Reverse*(MSTN\_R) 5'- CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3'.

#### **4.5.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Hasil isolasi DNA dari sampel darah kelinci di amplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *Forward* (MSTN\_F) 5'- GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT -3' dan *Reverse*(MSTN\_R) 5'- CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3'dengan konsentrasi 10 pmol. Amplifikasi dilakukan dengan mencampurkan 1  $\mu$ L DNA template (hasil isolasi), 1  $\mu$ L primer forward, 1  $\mu$ L primer reverse, 5  $\mu$ L PCR mix dan 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O ke dalam microtube 200  $\mu$ L dan dimasukkan ke thermocycler. Proses amplifikasi dilakukan dimulai pada tahapan predenaturasi dengan suhu 94°C 2 menit , selanjutnya yaitu denaturasi dengan suhu 94°C 30 detik, *annealing* pada suhu 52,3°C selama 30 detik, selanjutnya ekstensi pada suhu 72°C selama 60 detik dan post ekstensi 72°C selama 7 menit, perlakuan amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus (Fatchiyah, 2008).

#### 4.5.6 Uji Kualitas PCR

Pengujian dari kualitas produk PCR sama dengan pengujian kualitas isolat DNA. Visualisasi produk PCR gen MSTN dari darah kelinci dilakukan dengan *running elektroforesis gel agarosa*. Prinsip pengujian kualitas produk PCR dengan pengujian kualitas isolate DNA pada dasarnya sama. Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  produk PCR ditambahkan 2  $\mu\text{L}$  *loading dye* dan dihomogenkan di dalam PCR tube. Produk PCR yang telah dihomogenkan dipipet ke dalam sumur gel agarose 2% dengan TBE 1x pada voltage 100 V sekitar 30 menit. Setelah itu di dokumentasikan hasil elektroforesis menggunakan kamera digital pada *UV-transilluminator* (Fatchiyah, 2008). Hasil uji kualitas produk PCR ini diamati ukuran dari fragmen dengan mensejajarkan fragmen yang terlihat dengan fragmen DNA *ladder*.

#### 4.5.7 Purifikasi Produk PCR

Tujuan dari purifikasi produk PCR adalah memurnikan DNA dan menghilangkan sisa dari PCR mix yang meliputi dNTPs, Taq Polymerase dan ion Mg serta ddH<sub>2</sub>O, dan primer yang berada pada PCR tube. Metode yang digunakan untuk purifikasi produk PCR adalah metode presipitasi etanol dengan modifikasi protokol menggunakan natrium asetat 3M dan etanol absolut. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  produk PCR, 2  $\mu\text{L}$  natrium asetat 3M serta 40  $\mu\text{L}$  etanol absolut dicampurkan ke dalam microtube 1,5 mL dan selanjutnya di inkubasi dengan suhu -20°C selama semalam, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 60 menit dengan kecepatan 13.500 rpm. Dibuang cairan supernatant sehingga hanya tersisa pellet pada mikrotube. Pellet disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan yang sama dan lalu dilakukan pencucian sebanyak 2 kali dengan menambahkan 175  $\mu\text{L}$  etanol

absolut pada pellet. Pada pencucian terakhir, pellet dibiarkan kering lalu ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 20 µL sebagai pengencer (Suntella, 2006).

#### 4.5.8 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen MSTN dilakukan 2 arah dengan menggunakan primer *Forward* (MSTN\_F) 5'- GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT -3' dan *Reverse*(MSTN\_R) 5'- CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3' dengan konsentrasi masing-masing 10 pmol untuk melihat sekuen yang teramplifikasi dengan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR yang dilakukan untuk sekuensing yaitu 50 ng/µL. Sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah diberi label oleh ddNTPs (Abdullah dkk, 2011).

#### 4.5.9 Pembuatan Preparat Histologi Otot Skelet

Kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop* masing-masing 1 ekor di *euthanasi* dengan cara memotong 3 saluran (*esophagus*, *trachea* dan arteri *jugularis*) selanjutnya diambil otot skeletal dari bagian paha belakang yaitu *musculus semitendinosus*. Pembuatan preparat diawali dengan melakukan fiksasi yaitu merendam jaringan otot skeletal pada formalin 10%, selanjutnya diiris (*trimming*) agar dapat diletakkan dalam kotak untuk diproses dalam *tissueprocessor*. Tahapan berikutnya jaringan dimasukkan ke dalam alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95% masing-masing selama 5 menit kemudian dimasukkan ke dalam Xylol I selama 1 jam, Xylol II dan Xylol III masing-masing selama 30 menit. Sampel jaringan dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan dilakukan 2 kali. Sampel jaringan

diangkat menggunakan pinset, selanjutnya dilakukan pemblokan menggunakan paraffin blok. Pemotongan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan pemotongan 5  $\mu\text{m}$ , hasil pemotongan direndam pada *waterbath* dengan suhu 40°C dan diambil dengan gelas objek serta dikeringkan dalam suhu ruang (Jusuf, 2009).

#### **4.5.10 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)**

Pewarnaan Hematoxylin Eosin memiliki dua fungsi, yaitu Hematoxylin untuk memberi warna biru pada inti sel dan Eosin untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma. Preparat pada gelas objek direndam pada Xylol I, Xylol II dan Xylol III masing-masing selama 5 menit. Preparat selanjutnya direndam dalam alkohol 95%, alkohol 90%, alkohol 80% dan alkohol 70% masing-masing selama 5 menit dan kemudian direndam pada aquades selama 5 menit. Pewarnaan dilakukan dengan cara merendam preparat dalam Hematoxylin selama 15 menit dan dicelupkan ke dalam aquades dengan cara mengangkat dan menurunkan. Preparat kemudian dimasukkan dalam Hydrochloric acid (HCl) 0,6% selama 1 menit dan dicuci menggunakan air mengalir, dimasukkan ke dalam Lithium carbonat 0,5% selama 3 menit dan dicuci menggunakan air mengalir. Preparat direndam dalam Eosin selama 3 menit, selanjutnya dimasukkan dalam alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90% dan alkohol 95% masing-masing selama 5 menit, Xylol I dan Xylol II masing-masing 1 menit selanjutnya ditunggu hingga kering. Preparat dilakukan mounting dengan menggunakan Entela atau Canada balsam dan ditutup menggunakan *cover glass* (Ellyawati, 2018).

#### 4.5.11 Pengukuran Lebar Serabut Otot Skelet

Preparat histologi sebelumnya dipindai dengan pemindai OlyVIA, kemudian hasil disimpan dalam format JPEG. Pengamatan dilakukan dengan mengukur lebar serabut menggunakan perbesaran 40x. Setelah itu digunakan *software Image Raster 3* untuk mengukur lebar serabut otot, dan ditentukan area pengukuran. Pengukuran dengan cara menarik garis secara vertikal pada tepi serabut otot ke tepi yang lain. Kemudian dihitung 20 serabut otot secara acak yang ada pada area tersebut dan dihitung reratanya (Maria, 2014).

#### 4.5.12 Analisa Data

Pembahasan secara kualitatif dilakukan menggunakan data yang diperoleh dari hasil penelitian dengan mendeskripsikan ukuran serabut otot skeletal antara Kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop* menggunakan *software Image Raster 3*. Analisa perbedaan sekuen DNA gen MSTN dan asam aminomenggunakan *software BioEdit*, *Image Raster 3* dan BLAST NCBI. Tahapan analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen DNA dengan membandingkan antara sampel Kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop* pada *database NCBI GeneBank*, kemudian penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada *software BioEdit* dan *software Image Raster 3*.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Isolasi DNA dari Darah Kelinci

Isolasi DNA dilakukan menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA mini Kit*. Hasil yang didapatkan berupa DNA total yang kemudian akan dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui konsentrasi serta kemurnian DNA dengan metode spektrofotometri. DNA total yang diperoleh dari hasil isolasi tersebut kemudian digunakan sebagai DNA template dalam proses amplifikasi gen MSTN dengan teknik PCR. Berikut merupakan konsentrasi dan kemurnian DNA darah kelinci (**Tabel 5.1**).

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

Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (Absorbansi 260/280)
1	15,77	4,43
2	31	20,98
3	4,70	2,22

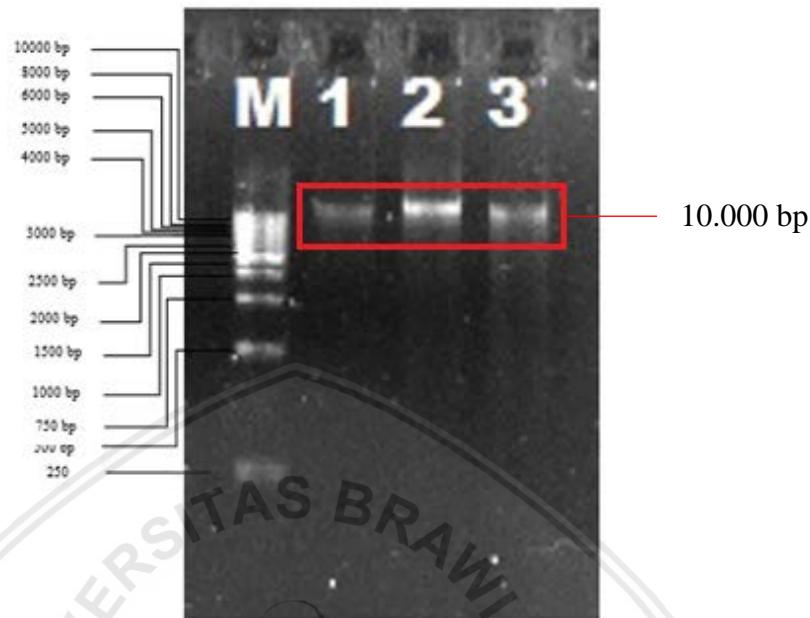
**Keterangan:** 1 : Sampel Kelinci Rex  
2 : Sampel Kelinci New Zealand White  
3 : Sampel Kelinci American Fuzzy Lop

Tabel tersebut menunjukkan konsenstrasi DNA pada sampel 1 sebanyak 15,77 ng/ $\mu$ L, sampel 2 sebanyak 31 ng/ $\mu$ L dan sampel 3 sebanyak 4,70 ng/ $\mu$ L dengan tingkat kemurnian secara berurutan 4,43 nm, 20,98 nm, 2,22 nm. Menurut Fatchiyah (2015), DNA mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi jika rasio absorbansi DNA yang diukur pada A260/A280 menunjukkan nilai 1,8-2,0 nm. Tingkat kemurnian sampel 1, sampel 2 dan sampel 3memiliki nilai lebih dari 2,0

nm yaitu 4,43 nm, 20,98 nm dan 2,22 nm karena adanya kontaminasi RNA pada sampel. Nilai absorbansi pada A260/A280 dengan nilai absorbansi kurang dari 1,8 nm dapat diduga karena mengandung 50% kontaminan dan 50% mengandung asam amino, sedangkan jika nilai absorbansi lebih dari 2,0 nm dapat diduga karena adanya kontaminasi dari phenol atau mengandung RNA murni. Kontaminasi dapat disebabkan saat proses ekstraksi kurang optimal atau karena *human error*(Santella, 2006).

Hasil isolasi jika menunjukkan konsentrasi DNA pada sampel rendah yang digunakan sebagai DNA *template* tidak akan mempengaruhi amplifikasi. Menurut Chen dan Janes (2002), amplifikasi DNA dengan metode PCR dapat dilakukan menggunakan sampel (DNA) yang memiliki konsentrasi rendah. Hasil isolasi DNA yang memiliki tingkat kemurnian rendah masih dapat dilakukan amplifikasi, jika setidaknya memiliki satu untai DNA target amplifikasi pada sampel tersebut yang sempurna, kontaminan yang ada di dalam hasil isolasi tidak mampu menghambat aktivitas enzim polymerase.

Berdasarkan hasil dari elektroforesis menggunakan gel agarose 1% diperoleh pita DNA total dengan ukuran fragmen >10.000 bp dapat dilihat pada **Gambar 5.1**.



**Gambar 5.1** Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%)

Keterangan : M: Marker 1 kb, 1: Kelinci Rex, 2: Kelinci New Zealand White, 3: Kelinci American Fuzzy Lop

## 5.2 Ampifikasi Gen Myostatin (MSTN) dengan Metode PCR

Primer yang digunakan dalam proses PCR tersebut terdiri dari sepasang primer *Forward* (MSTN\_F) 5'- GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT -3' dan *Reverse* (MSTN\_R) 5'- CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3' yang diperoleh dari *genebank NCBI* (**Tabel 5.2**) dengan target *basepair* 416 (**Gambar 5.2**).

**Tabel 5.2** Urutan Basa Nukleotida Primer Gen MSTN

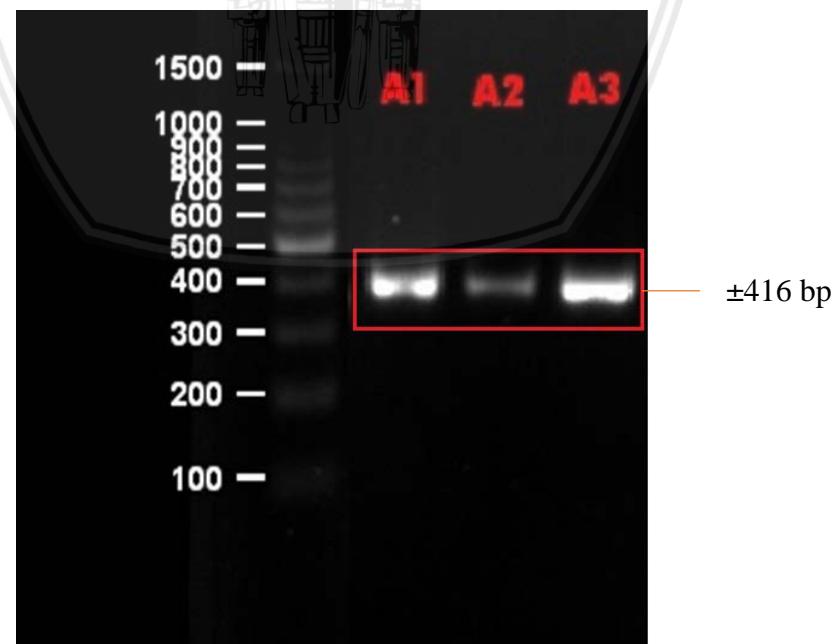
Primer	Urutan Oligo Nukleotida
<i>Forward</i> (MSTN_F)	5'- GGC AAG TTG TCT CTC AAG CT -3'
<i>Reverse</i> (MSTN_R)	5'- CAT CCC TCT GAA CGT CGT AC -3'

1	AAAAGATCCA	CCGGTGTGGC	AAGTTGTC	TCAAGCTGTT	CATGCATTAC
51	AATTTGCTT	GCCATTACTG	AAAAGCAAAA	GAAAGGTAAA	AGGAAGACAT
101	AAGAACAAAGG	GAAAGGATTG	TATAGCTTTT	AAAATCATGC	AAAAAAGTGCA
151	AATCTATGTT	TATATTACCC	TGTTTATGCT	GATCGTGCT	GGCCCAGTGG
201	ATCTAAATGA	AAACAGTGAG	CAAAAAGAAA	ATGTGGAAAA	AGACGGGCTG
251	TGTAATGCAT	GCACCTGGAG	ACAAAACAGT	AAATATTCAA	GAATAGAAGC
301	CATAAAGATT	CAAATCCTCA	GTAAACTTCG	CCTGGAAACA	GCTCCTAACCA
351	TCAGCAAAGA	TGCTATAAGA	CAACTTTAC	CCAAAGCTCC	GCTCCTAACCA
401	GAACTGATTG	ATCAGTACGA	CGTCAGAGG	GATGACAGCA	GTGATGGCTC

**Gambar 5.2** Origin Oligo Nukleotida Gen MSTN

Keterangan: Warna kuning: Primer *forward* MSTN, Warna biru: Primer *reverse* MSTN,  
Warna abu-abu: *Region of Interest*

Produk PCR selanjutnya dilakukan uji kualitatif dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1,8 % serta DNA ladder 100kb dan diperoleh pita DNA dengan ukuran 416 bp. Hal ini menunjukkan gen MSTN pada ketiga sampel kelinci telah berhasil diamplifikasi dan sesuai dengan jumlah yang basa DNA yang ditargetkan (**Gambar 5.3**).

**Gambar 5.3** Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 1,8%)

Keterangan : A1: Kelinci Rex, A2: Kelinci New Zealand White, A3: Kelinci American Fuzzy Lop

### 5.3 Sekuensing Gen Myostatin (MSTN)

Hasil sekuensing DNA berupa file dengan format FASTA (urutan basa nukleotida hasil sekuensing) serta grafik elektroforegram (grafik yang terekam pada hasil sekuensing). Sampel yang digunakan saat proses PCR berjumlah 3 sampel terdiri dari A1 (Kelinci *Rex*), A2 (Kelinci *New Zealand White* dan A3 (Kelinci *American Fuzzy Lop*). Metode yang digunakan untuk sekuensing adalah metode dideoksi *Sanger* menggunakan *Automatic DNA sequencer* yang berdasarkan pada metode *dye terminator labelling*. Persentasi *query coverage* merupakan persentasi dari panjang untaian DNA yang sejajar dengan *database*, sedangkan persentasi *identity* merupakan persentasi identitas satu segmen DNA yang disejajarkan dengan urutan subjek yang sama (NCBI News, 2006).

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

Sampel	<i>Query Coverage (%)</i>	<i>Identity (%)</i>
A1	99	100
A2	100	99,72
A3	100	99,72

**Keterangan:** A1 : Sampel Kelinci *Rex*  
 A2 : Sampel Kelinci *New Zealand White*  
 A3 : Sampel Kelinci *American Fuzzy Lop*

Hasil dari penyejajaran menggunakan program BLAST NCBI, sampel A1 yaitu kelinci *Rex* dengan sekuen pada *genebankdatabase* ID: AM931155.1 yang merupakan sekuen gen MSTN dari kelinci pedaging (**Lampiran 7**) menunjukkan hasil jika *query coverage* mencapai 99%, yang mana dari 350 total basa nukleotida hasil dari sekuensing, terdapat 347 segmen basa yang sejajar dengan sekuen dari referensi, pada titik basa ke 1 – 350 terhadap sekuen referensi di titik

basa ke 86 – 435. Selanjutnya sebanyak 350 basa nukelotida dari 350 segmen basa tersebut sama (daerah *conserved*) sehingga untuk persentasi *identity* mencapai 100%.

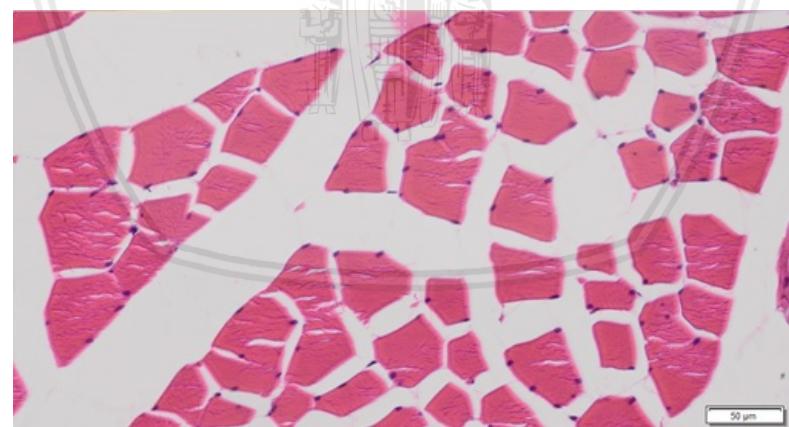
Hasil dari penyejajaran menggunakan program BLAST NCBI, sampel A2 yaitu kelinci *New Zealand White* dengan sekuen pada *genebankdatabase* ID: AM931155.1 yang merupakan sekuen gen MSTN dari kelinci pedaging(**Lampiran 7**) menunjukkan *query coverage* mencapai 100% ditunjukkan dengan 351 total basa nukleotida dari hasil sekuensing, keseluruhannya sejajar dengan sekuen referensi, pada titik basa ke 1 – 351 terhadap sekuen referensi di titik basa ke 86 – 436. Kemudian sebanyak 350 basa nukleotida dari 351 segmen basa tersebut sama (daerah *conserved*) sehingga persentasi *identity* mencapai 99,72%.

Kemudian hasil dari penyejajaran menggunakan program BLAST NCBI, sampel A3 yaitu kelinci *American Fuzzy Lop* dengan sekuen pada *genebankdatabase* ID: GU244547.1 yang merupakan sekuen gen MSTN dari kelinci *Soviet Chincilla* yang masih tergolong kelinci ras kecil(**Lampiran 7**) menunjukkan query cover mencapai 100% sehingga 351 total basa nukleotida dari hasil sekuensing keseluruhannya sejajar dengan sekuen referensi, pada titik basa ke 1 – 351 terhadap sekuen referensi di titik basa ke 86 – 436. Selanjutnya sebanyak 350 basa nukleotida dari 351 segmen basa tersebut sama (daerah *conserved*) sehingga persentasi *identity* mencapai 99,72%.

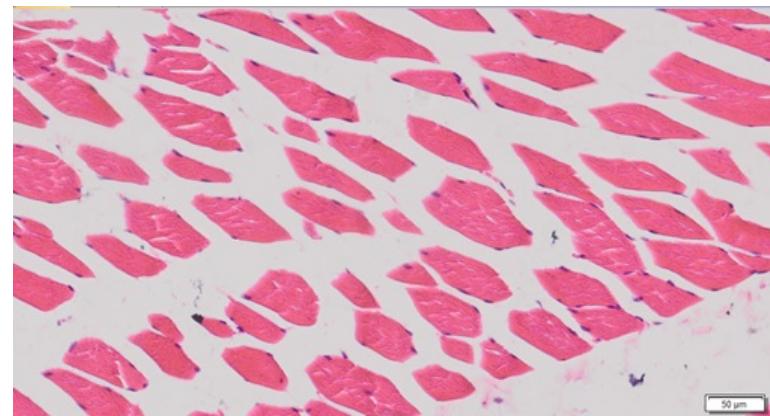
Hasil analisa tersebut menunjukkan bahwa sekuen DNA sampel A1, A2 dan A3 memiliki kemiripan dengan DNA target yaitu kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

#### 5.4 Analisa Histologi Otot

Analisa histologi serabut otot dilakukan dengan mengambil sampel otot bagian paha kemudian dilakukan pewarnaan secara HE (*Hematoxylin Eosin*) dan pemotongan secara melintang. Selanjutnya preparat histologi serabut otot tersebut dilakukan scanning menggunakan *software* OlyVIA untuk diamati bagian serabut otot skeletal dengan perbesaran *objective* 40x. Kalibrasi untuk mengetahui lebar serabut otot menggunakan *software* *Image Raster 3*.



**Gambar 5.4** Gambaran Histologi Serabut Otot Skeletal (Potongan Melintang) Sampel A1 (Kelinci Rex)



**Gambar 5.5** Gambaran Histologi Otot Skeletal (Potongan Melintang) Sampel A2 (Kelinci *New Zealand White*)



**Gambar 5.6** Gambaran Histologi Otot Skeletal (Potongan Membujur) Sampel A3 Kelinci *American Fuzzy Lop*)

**Tabel 5.4** Lebar Serabut Otot Skeletal Sampel Kelinci

Sampel	Mean±SD(μm)
A1	3,91±1,11
A2	3,45±0,56
A3	2,59±0,60

Hasil kalibrasi gambaran histologi otot skeletal menggunakan *software Image Raster 3* untuk mengukur lebar otot skeletal, pada (**Gambar 5.4**) sampel A1 yaitu kelinci *Rex* dengan rata-rata lebar serabut otot 3,91 μm. Sampel A2 (**Gambar 5.5**) yaitu kelinci *New Zealand White* dengan rata-rata lebar serabut otot

3,45  $\mu\text{m}$ . Sampel A3 (**Gambar 5.6**) yaitu kelinci *American Fuzzy Lop* dengan rata-rata lebar serabut otot 2,59  $\mu\text{m}$ .

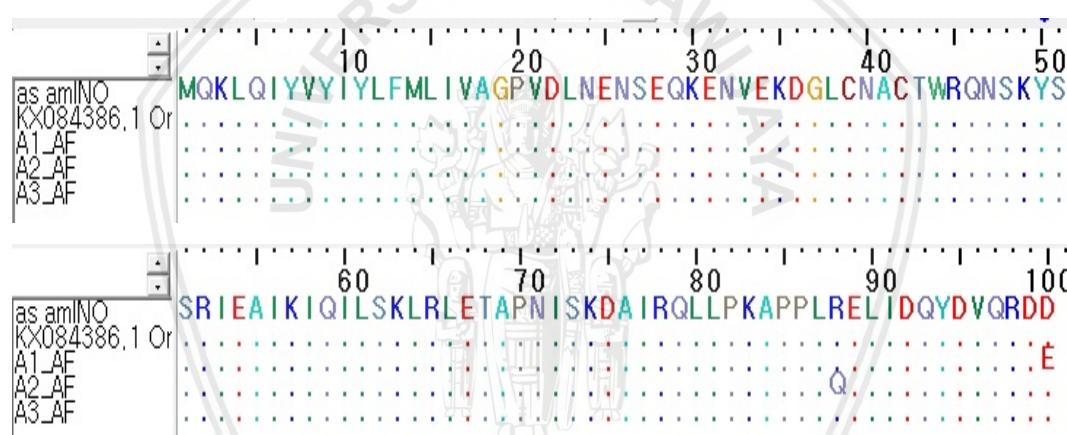
Pada penelitian ini diketahui jika sampel A1 yang merupakan kelinci *Rex* terjadi mutasi sekuen DNA dan juga asam amino, mutasi ini mengakibatkan kelinci *Rex* mengalami peningkatan massa otot. Hal ini ditunjukkan dengan rata-rata lebar serabut otot 3,91  $\mu\text{m}$ . Sampel A2 kelinci *New Zealand White* juga terjadi mutasi sekuen DNA dan asam amino, dimana mutasi ini mengakibatkan kelinci *New Zealand White* mengalami peningkatan massa otot. Ditunjukkan dengan rata-rata dari lebar serabut otot sampel A2 sebesar 3,45  $\mu\text{m}$ . Sedangkan sampel A3 kelinci *American Fuzzy Lop* yang tidak ada mutasi pada sekuen DNA dan asam amino, memiliki lebar serabut otot 2,59  $\mu\text{m}$ . Menurut Thomas (2000), mutasi dari gen myostatin dapat mengakibatkan peningkatan massa dari otot skeletal karena peningkatan jumlah serat otot (hiperplasia) dan ketebalan serat otot (hipertropi).

### **5.5 Analisa Sekuen DNA dan Asam Amino Gen Myostatin (MSTN)**

Hasil sekvensing setelah disejajarkan menggunakan BLAST NCBI guna mengetahui persentasi kemiripan urutan sekuen antara sampel dengan sekuen target pada NCBI, kemudian dilakukan analisa sekuen serta analisa asam amino. Software yang digunakan untuk penyejajaran hasil sekvensing selain BLAST NCBI juga menggunakan BioEdit. Sekuen gen dari ketiga sampel kelinci tersebut disejajarkan dengan referensi gen MSTN, yaitu *Oryctolagus cuniculus database* ID: KX084386.1. jumlah basepair yang dapat disejajarkan sebanyak 351 bp.

Hasil sekuen sampel A1, A2, dan A3 ketika disejajarkan dengan sekuen referensi gen MSTN *Oryctolagus cuniculus ras Fujian White database* ID:

KX084386.1 menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada software *BioEdit* (**Gambar 5.7**). Pada sampel A1 yaitu kelinci *Rex* pada sekuen ke 351 terdapat perbedaan dengan sekuen referensi yaitu pergantian basa sitosin (C) menjadi basaguanin (G). Sedangkan pada sampel A2 yaitu kelinci *New Zealand White* juga terdapat perbedaan dengan sekuen referensi pada sekuen ke 314 yaitu pergantian basa guanin (G) menjadi basa adenin (A). Pada sampel A3 yaitu kelinci *American Fuzzy Lop* tidak ada perbedaan atau sama dengan sekuen referensi.



**Gambar 5.7** Penyejajaran Asam Amino Sampel A1, A2, dan A3 Terhadap Referensi GenMSTN

**Keterangan:** A1 : Sampel Kelinci Rex  
A2 : Sampel Kelinci New Zealand White  
A3 : Sampel Kelinci American Fuzzy Lop

Hasil dari penyejajaran asam amino sampel A1, A2, dan A3 dengan referensi gen MSTN *Oryctolagus cuniculus* *ras Fujian White* database ID: KX084386.1 menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada software *BioEdit* (**Gambar 5.8**). Sampel A1 yaitu kelinci *Rex* terjadi mutasi susunan basa yang menyebabkan asam amino urutan sekuen ke-100 dimana pada referensi asam amino sekuen ke-100 adalah D (*Aspartic acid/Asp*) berubah menjadi E (*Glutamic*

*acid/Glu*). Sedangkan pada sampel A2 kelinci *New Zealand White* juga terjadi perubahan asam amino pada sekuen ke-88, yaitu perubahan dari R (*Arginine/Arg*) menjadi Q (*Glutamine/Gln*). Pada sampel A3 yaitu kelinci *American Fuzzy Lop* tidak ditemukan adanyamutasi asam amino pada keseluruhan sekuen. Daftar kode asam amino dapat dilihat pada **Lampiran 9**.

Pada sampel kelinci *Rex* setelah dilakukan penyejajaran sekuen DNA, sampel tersebut mengalami mutasi transversi. Sedangkan pada sampel kelinci *New Zealand White* terjadi mutasi transisi. Menurut Lemey (2009), mutasi transisi dapat terjadi jika basa purin digantikan oleh basa purin yang lain atau basa pirimidin digantikan oleh basa pirimidin yang lain. Sedangkan mutasi transversi terjadi jika basa purin digantikan oleh basa pirimidin atau sebaliknya. Sampel kelinci *Rex* terjadi pergantian basa pirimidin yaitu sitosin (C) menjadi basa purin yaitu guanin (G). Kemudian pada sampel kelinci *New Zealand White* terjadi juga pergantian basa purin yaitu guanin (G) menjadi basa purin yang lainnya yaitu adenin (A).

Mutasi pada sampel kelinci *Rex* dan kelinci *New Zealand White* diketahui mempengaruhi perubahan susunan asam amino, sehingga mutasi ini berjenis *missense mutation*. Mutasi ini terjadi ketika perubahan salah satu basa menyebabkan perubahan asam aminon dan perubahan tersebut akan mengubah fungsi dari asam amino juga (Fitriani, 2009).

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

1. Ukuranserabutotot skeletal berbedaan tarjenis kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop*. Ukuranserabutotot skeletal terkecil adalah pada kelinci *American Fuzzy Lop*.
2. Terdapat perbedaan susunan nukleotida gen MSTN antara kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop* berturut-turut yaitu c.351 C>G, c.314 G>A dibandingkan dengan database pada NCBI ID: KX084386.1. terdapat perbedaan susunan amino asam antara kelinci *Rex*, *New Zealand White* dan *American Fuzzy Lop* berturut-turut yaitu D>E, R>Q. Kelinci *Rex* dan *New Zealand White* mengalami *missense mutation*.

### 6.2 Saran

Perkembangan otot skeletal tidak hanya dipengaruhi oleh satu gen saja, jadi untuk mendapatkan hasil yang optimal diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai faktor-faktor genetik lainnya yang mempengaruhi perkembangan otot skeletal.

## DAFTAR PUSTAKA

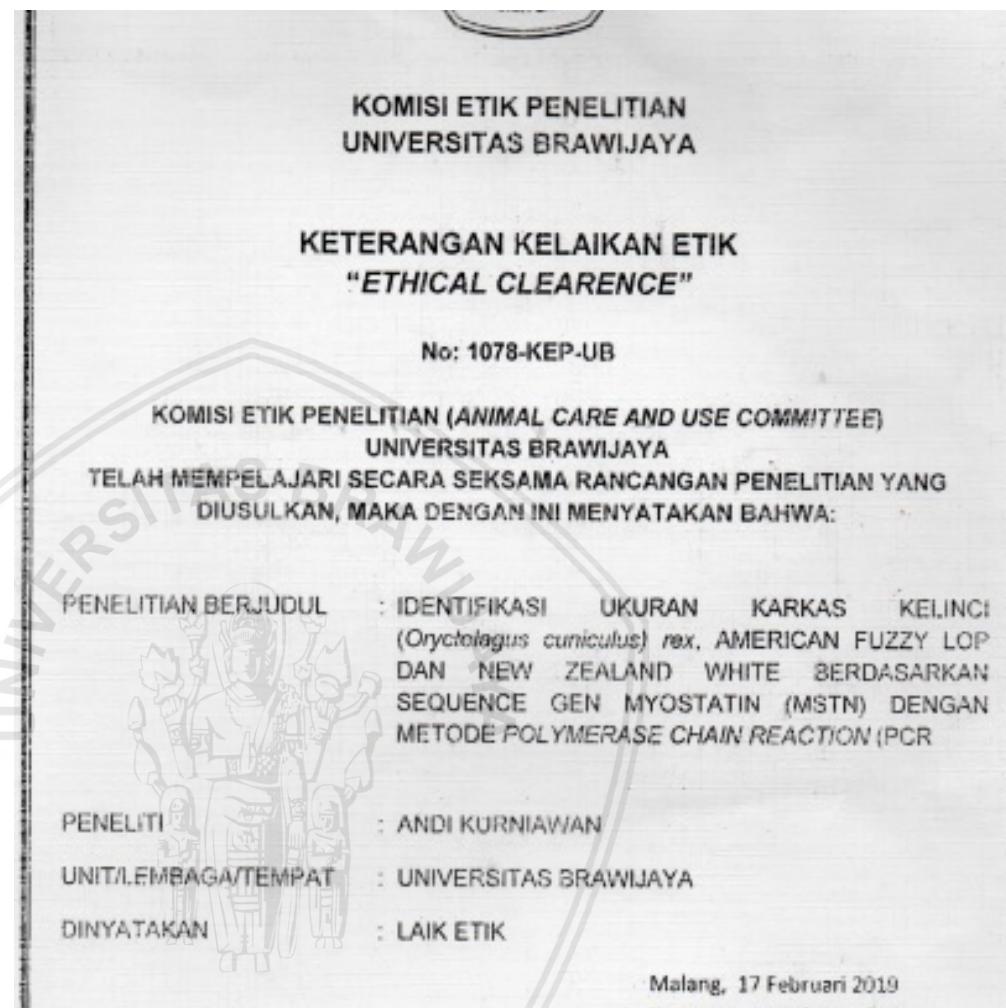
- [DITJENNAK] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2012. *Buku Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan (Livestock and Animal Health Statistics)*. Jakarta. 127:1-210.
- Anbdullah, A., Nurjanah, dan K. Nanang. 2011. Autentikasi Tuna Steak Komersial dengan Metode PCR-Sequencing. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. Vol.XIV(1): 1-7.
- Busono, E., dan D., Mardiani. 2010. *Mengenal Dan Memelihara Berbagai Jenis Kelinci Ras Yang Populer Di Indonesia*. Koperasi Nukita. Bandung
- Chen, B.Y., dan H.W. Janes. 2002. *Methods in Biomolecular Biology: PCR Cloning Protocol 2<sup>nd</sup> Ed*, Rutgers University.
- Damron, M. 2003. *Klasifikasi Makhluk Hidup Mamalia*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Eling, D.K.S., K. Rahardian, M. Izzati. 2014. *Karakteristik Primer pada Polimerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review*. SNIMed V.
- Ellyawati. 2018. *Penentuan Waktu Yang Tepat Pada Proses Staining Dalam Pembuatan Preparat Histologi Hati*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas. Sumatera Barat.
- Fatchiyah. 2015. *Prinsip Dasar Bioinformatika*. UB Press. Malang.
- Fitriani, I. 2009. *Deteksi Mutasi Gen MATP Pada Penderita Oculocutaneous Albinism (OCA) di DIY dan Wonosobo, Jawa Tengah* [Thesis]. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Handoyo, D., dan A., Rudiretna. 2001. Prinsip Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas* 9(1):17-29.
- Hendra, S.B.B. 2010. *Perbedaan Performans Anak Kelinci Lokal Periode Pra-Sapih Yang Induknya Diberi Pakan Komplit Mengandung Bungkil Inti Sawit dan Bungkil Kelapa* [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor.
- Hustamin, R. 2006. *Panduan Pemeliharaan Kelinci Hias*. Agromedia Pustaka. Jakarta

- Hoffman, R.S., dan A.T. Smith. 2005. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3<sup>rd</sup> Edition. Johns Hopkins University Press. USA. 195–205.
- Junqueira, L.C.. 2007. *Basic Histology: Text & Atlas 10ed*. United States. McGraw-Hill Education:193-196.
- Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.
- Joulia D, H. Bernardi, V. Garandel , F. Rabenoelina , B. Vernus , G. Cabello. 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by Myostatin. *Experimental Cell Research* 286 (2):263–275.
- Lemey, P., M. Salemi., dan Anne-Mieke Vandemme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testin*. Cambridge University Press., United Kingdom.
- Maria, V. S. 2014. Perubahan Jumlah Dan Diameter Serat Otot Gastroknemius Dan Seleus Pada Tikus Berusia 1 Hari, 3 Bulan, dan 12 Bulan. *Damianus Journal of Medicine* 13(1): 39-49.
- McPherron, A.C., A.M. Lawyer, S.J. Lee. 1997. Regulation of Skeletal Muscle Mass in Mice by A New TGF- $\beta$  Superfamily member. *Nature* 387:83–90.
- Muryanto, Subhihara, S. Prawirodigdo. 2005. *Produktivitas Kelinci di Dataran Tinggi*. Prosiding Pengelolaan dan Komunikasi Hasil Penelitian. Sub Balai Penelitian Ternak Klepu, Ungaran.
- Nur, E. F. 2010. *Kecernaan Zat Makanan Kelinci Jantan Lokal Yang Diberi Ransum Komplit Mengandung Bungkil Inti Sawit Dengan Jenis Hijauan Berbeda* [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor.
- Putra, G.M. dan N.S. Budiana. 2006. *Kelinci Hias*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Rinanda, T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 11(3):172-173.
- Sambrook J. and D. W. Russel. 2001. *Molecular Cloning 3<sup>rd</sup> ed*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Santella, R. M. 2006. *Approachesto DNA/RNA Extraction and Whole Genom Amplification*. Cancer Epidemiol Biomarkers.15: 185-187.
- Scheffler, I.E. 2008. *Mitochondria 2<sup>nd</sup> Edition*. John Wiley & Sons. California.

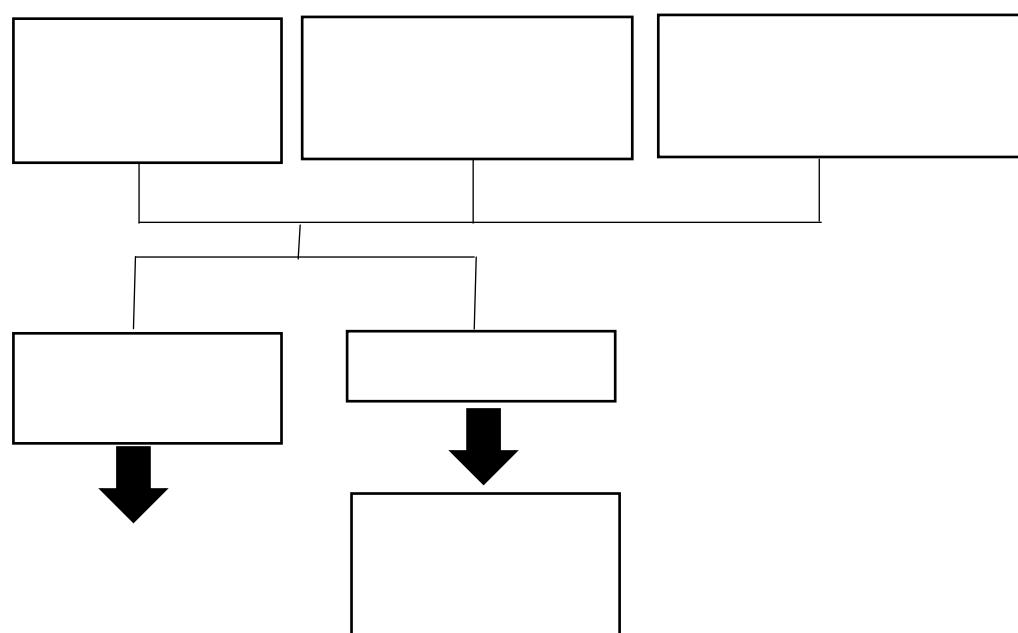
- Thomas, M., L. Brett, B. Carole, S. Mridula, K. Sonnie, B. John, K. Ravi. 2000. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. *The Journal Of Biological Chemistry*. 275(51):40235-40243.
- Widowati, E. W. 2013. *Desain Primer Sitokrom B (Cyt b) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk Deteksi DNA Babi*. Laporan Penelitian Individual Lembaga Penelitian Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga. Yogyakarta
- Xie, X.P., D.J. Chen, S.K. Sun, L. Sang, Y.F. Chen, Y.S. Lan, P.P. Lin. 2016. Characteristics and Performances of The Fujian White Rabbit. Proceedings of The 11<sup>th</sup> World Rabbit Congress. Qiangdao. 137-140
- Ye X., S.R. Brown, K. Nones, L.L. Coutinho, J.C.M. Dekkers, S.J. Lamont. 2007. Association of *Myostatin* Gene Polymorphisms With Performance and Mortality Traits in Broiler Chickens. *Genes Sel Evol*. 39:73-89.
- Yusuf, K. Z. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek* 5(6):2-3.
- Zimmers. T.A., M.V. Davies, L.G. Koniaris, P. Haynes, A.F. Esquela, K.N. Tomkinson, A.C. McPherron, N.M. Wolfman, S.J. Lee. 2002. Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. *Science*. 296:1486-1488.

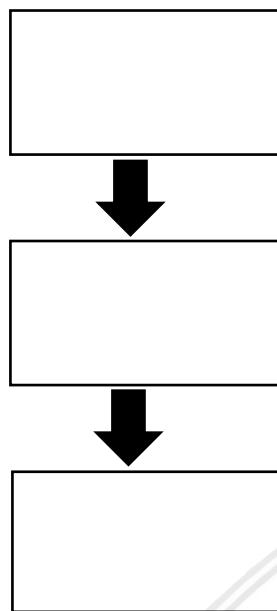
# LAMPIRAN

**Lampiran 1: Laik Etik**



**Lampiran 2: Kerangka Operasional**





### Lampiran 3: Protokol Isolasi DNA



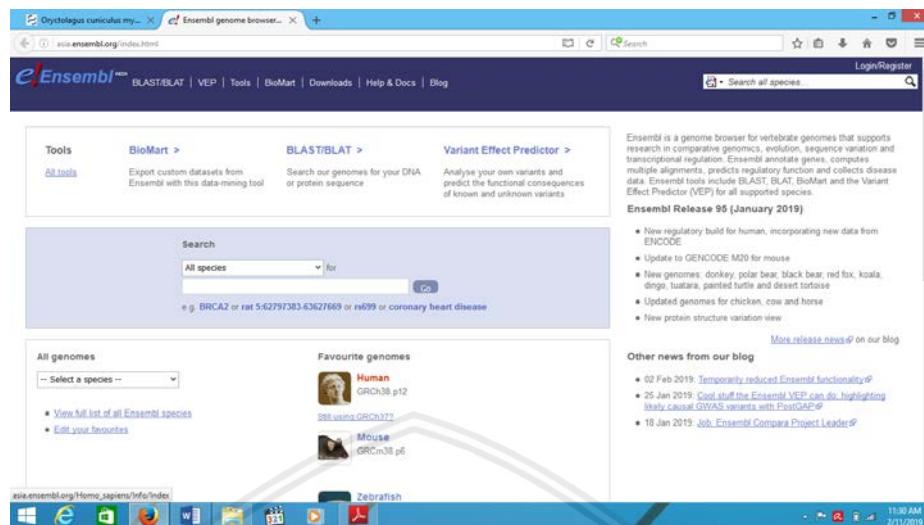
- Dimasukkan sampel darah ke dalam *microsentrifuge tube* 1,5 mL
- 100  $\mu$ L
- Ditambahkan Qiagen protease sebanyak 20  $\mu$ L
- Ditambahkan PBS 300  $\mu$ L
- Ditambahkan AL sebanyak 200  $\mu$ L, kemudian di vortex selama 15 detik dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 56°C

- Ditambahkan etanol (96-100%) sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , kemudian divortex 15 detik
- Dituangkan ke *spin column* yang terpasang pada *collection tube*, kemudian divortex selama 15 detik
- Disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm, kemudian pindahkan ke *collection tube* baru dengan suhu 20°C
- Ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  AW1, kemudian disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm dan dipindahkan ke *collection tube* yang baru
- Ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  AW2, kemudian disentrifus selama 6 menit kecepatan 13.500 rpm dan dituangkan ke dalam *collection tube* baru
- Ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  AE dan ditunggu selama 1 menit pada suhu ruang
- Disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm

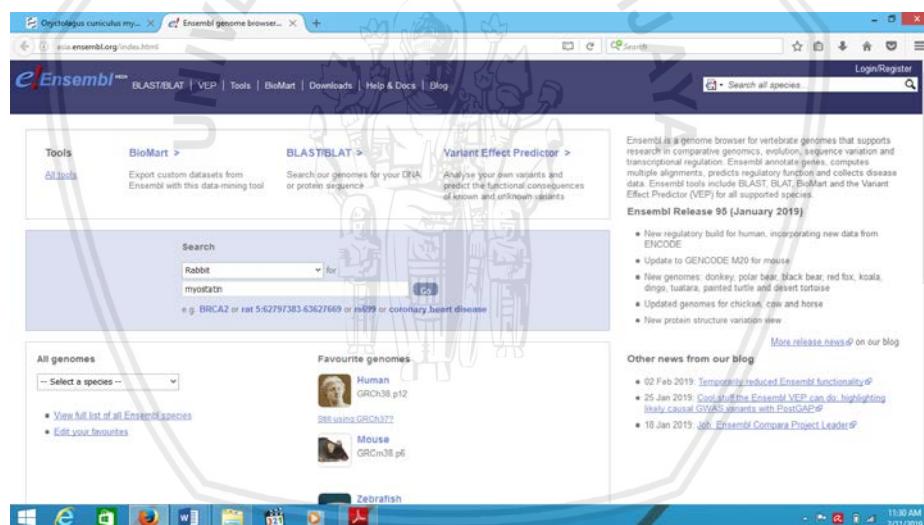


#### Lampiran 4: Desain Primer

- a. Dibuka Halaman (<http://asia.ensembl.org/index.html>) sehingga muncul tampilan seperti berikut :



- b. Dipilih spesies “Rabbit” kemudian pada kolom dibawahnya diisikan kata kunci “Myostatin” dan di klik Go. Dipilih “MSTN (Rabbit Gene)”.

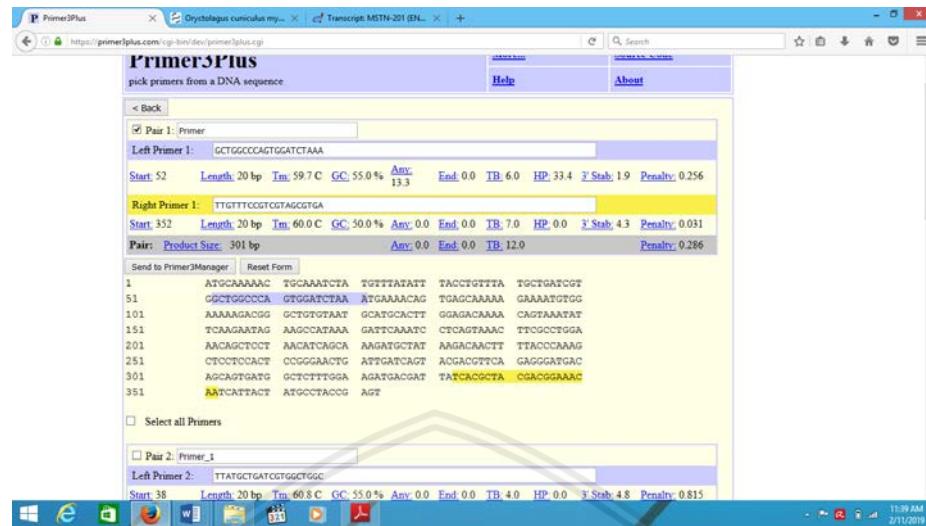


The screenshot shows the Ensembl website interface for the species Oryctolagus cuniculus. A search for 'myostatin' has been performed. The results page includes a header with 'Only searching Rabbit' and a search bar. Below this, a table lists the current selection: Gene (1), Transcript (1), Protein Family (1). It also shows options for 'Per pages' (10, 25, 50, 100) and 'Layout' (Standard, Table). The main content area displays the PTHR1184 gene entry, which is part of the SF\_13 (Rabbit Protein Family). It provides details such as the Ensembl ID (PTHR1184), UniProt ID (P19470), and a brief description of the gene's function. Below this, the MSTN-201 transcript entry is shown, including its Ensembl ID (ENSCUT0000001265), UniProt ID (P1947083), and a detailed description of the transcript.

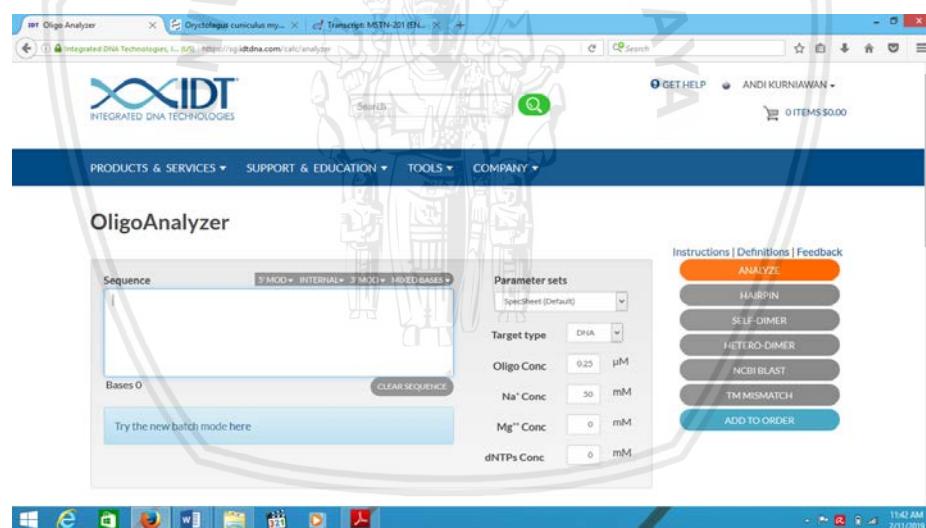
- c. Kemudian dipilih urutan basa yang akan digunakan dan selanjutnya di *copy*.

This screenshot shows the sequence details for the MSTN-201 transcript. The sequence is presented in a table format with the following columns: No., Exon / Intron, Start, End, Start Phase, End Phase, Length, and Sequence. The sequence itself is a long string of nucleotides. The sequence is highlighted in green, indicating it is selected for copying. The table shows three introns: Intron 1 (length 624), Intron 2 (length 1,784), and Intron 3 (length 2,000).

- d. Dibuka website Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Urutan basa yang telah *copy* selanjutnya dipaste di lokasi *paste souce sequence below* seperti tampilan berikut dan diklik ikon *Pick Primer*. Desain primer dilakukan sendiri hingga ditemukan primer *forward* dan *reverse*.



- e. Dibuka website (<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>) untuk melihat apakah primer sudah sesuai dengan persyaratan primer yang baik berdasarkan panjang primer, Tm, %GC, dan lain sebagainya sesuai kebutuhan.



- f. Dimasukkan calon primer ke dalam sequence kemudian di klik “Analyze” dan akan muncul tampilan sebagai berikut. Hal ini dilakukan hingga menemukan primer *forward* dan *reverse* yang sesuai.



### Lampiran 5: Hasil Nanodrop Sampel Kelinci

No Analisa : GA2103/03  
 Sampel : DNA  
 Janis Analisa: Spektrofotometer NANO Drop

Terima dari : Andi  
 Instansi Asal : Universitas Brawijaya (UB)

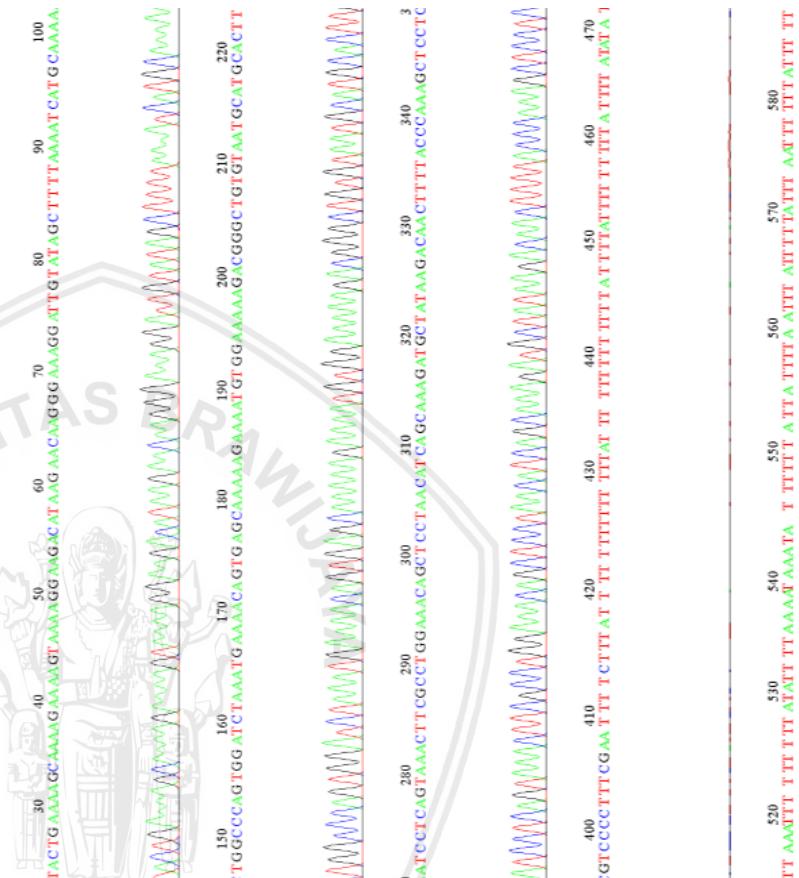
NO.	260/230	Type	Abs230	Abs260	Abs280	260/280	Con(ng/ul)
1	0.81	Dsdna	-0.25	-0.21	-0.35	0.58	-10.27
2	1.13	Dsdna	-0.33	-0.37	-0.56	0.66	-18.
3	1.48	Dsdna	-0.15	-0.23	-0.38	0.61	-11.48
4	1.37	Dsdna	-0.21	-0.28	-0.46	0.61	-14.07
5	-1.95	Dsdna	0.02	-0.03	-0.10	0.30	-1.51
6	1.66	Dsdna	-0.22	-0.37	-0.56	0.66	-18.37
7	1.27	Dsdna	-0.21	-0.26	-0.53	0.49	-13.04
8	2.66	Dsdna	0.24	0.64	-0.02	-40.46	31.94
9	8.82	Dsdna	0.02	0.15	-0.27	-0.54	7.33
10	15.10	Dsdna	0.01	0.11	-0.06	-1.79	5.72
11	1.26	Dsdna	-0.18	-0.23	-0.42	0.55	-11.
12	0.31	Dsdna	-0.07	-0.02	-0.30	0.08	-1.14
13	3.57	Dsdna	0.09	0.32	-0.07	4.43	15.77
14	2.17	Dsdna	0.29	0.63	0.03	20.98	31.
15	1.10	Dsdna	0.09	0.09	-0.04	2.22	4.70

Keterangan : ng = Nano gram, ul= microlit

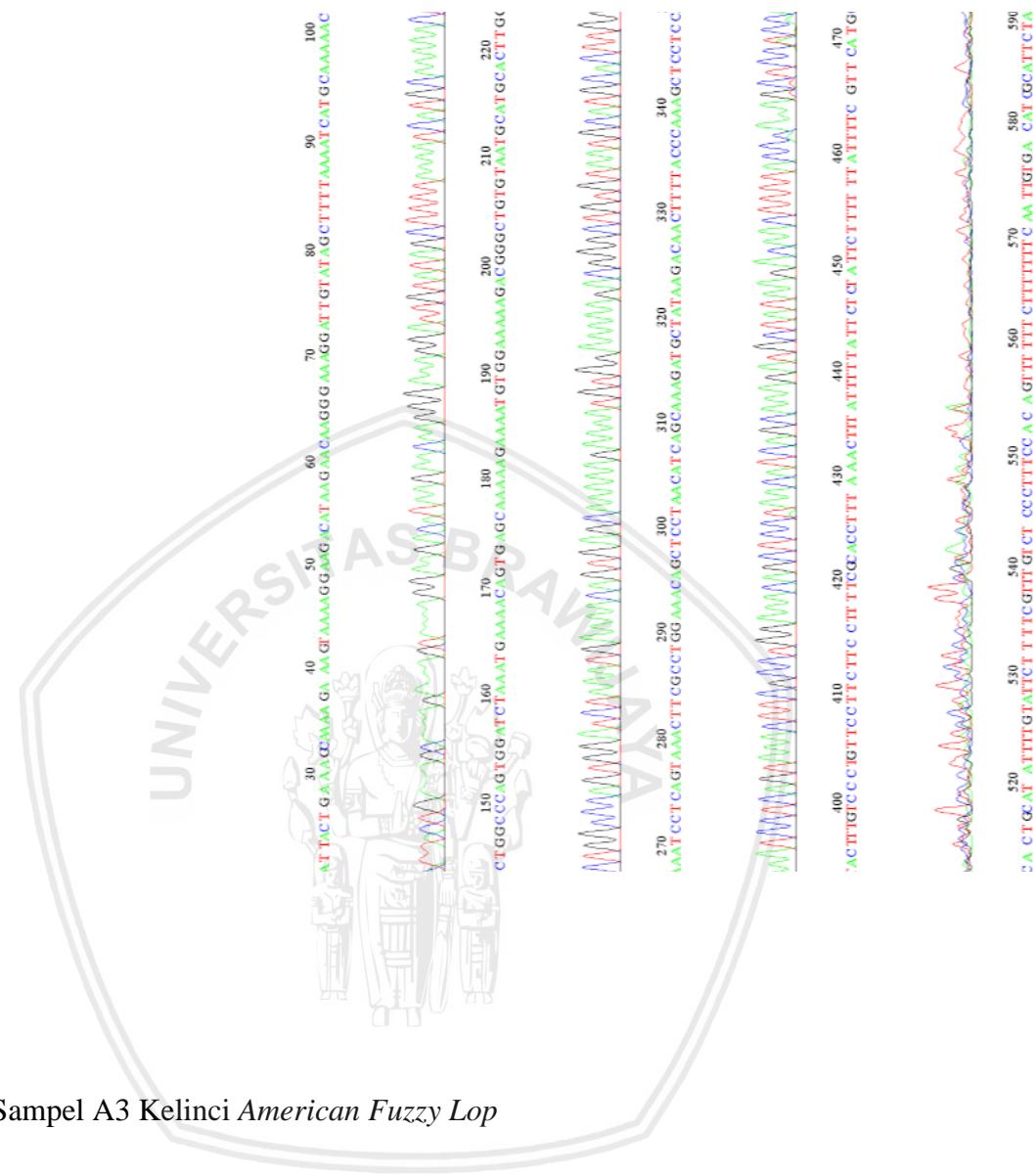
Malang, 21Maret 2019

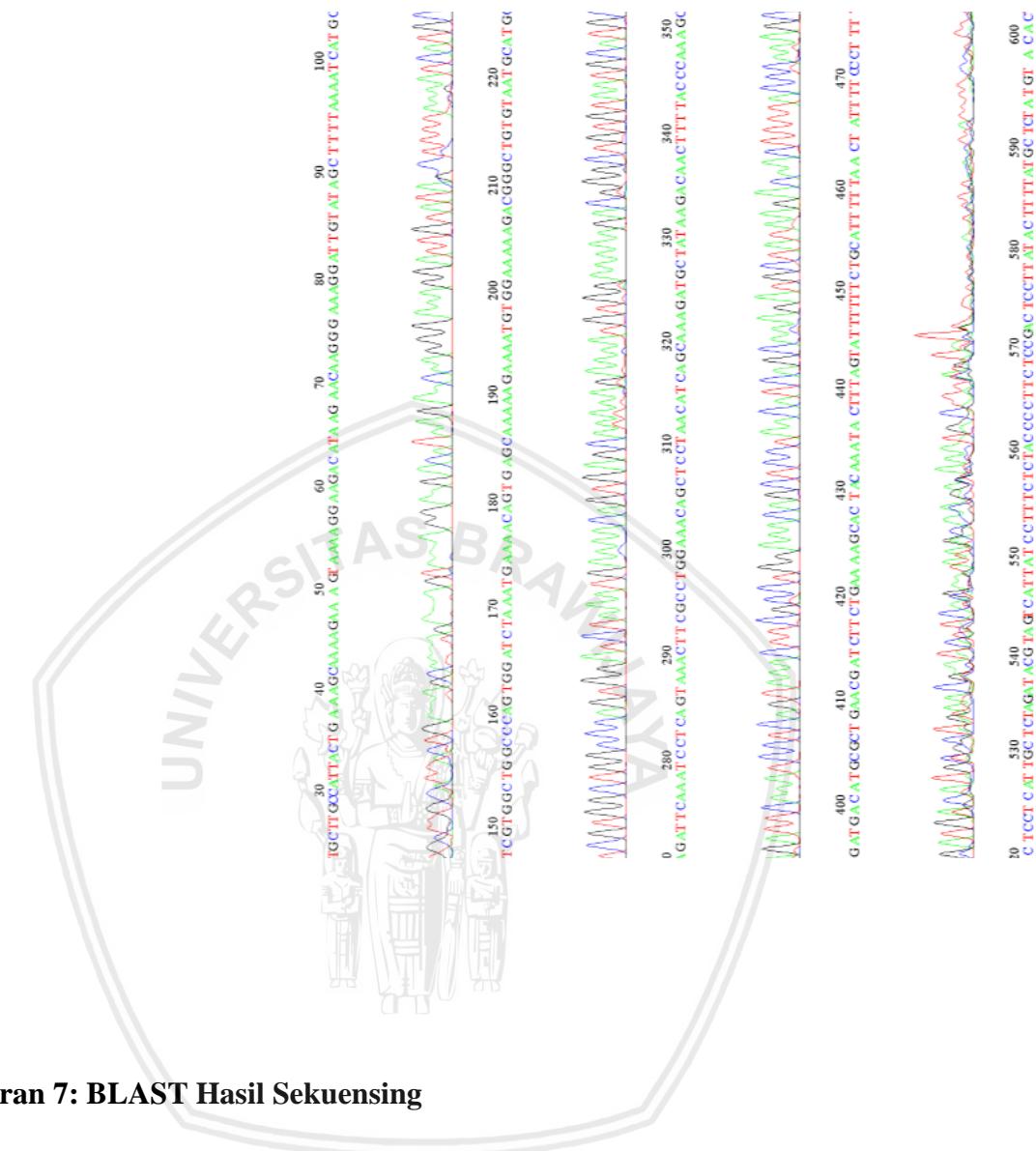
## Lampiran 6: Grafik Elektroforegram Hasil Produk PCR *Oryctolagus cuniculus*

a. Sampel A1 Kelinci *Rex*



b. Sampel A2 Kelinci New Zealand White

c. Sampel A3 Kelinci *American Fuzzy Lop*



## Lampiran 7: BLAST Hasil Sekuensing

a. Sampel A1 (Kelinci Rex)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	647	647	99%	0.0	100.0%	KX084386_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus isolate_11 breed Soviet chinchilla myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	647	647	99%	0.0	100.0%	GU244549_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus isolate_2 breed desi myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	647	647	99%	0.0	100.0%	GU244541_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus partial MSTN gene for myostatin, exon 1	647	647	99%	0.0	100.0%	AM831155_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus isolate_9 breed white giant myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	641	641	99%	4e-180	99.71%	GU244552_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus isolate_5 breed white giant myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	641	641	99%	4e-180	99.71%	GU244550_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus isolate_7 breed Soviet chinchilla myostatin-like (MSTN) gene, partial sequence	641	641	99%	4e-180	99.71%	GU244547_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus isolate_1 breed desi myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	641	641	99%	4e-180	99.71%	GU244540_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oryctolagus cuniculus myostatin (MSTN) mRNA	553	553	85%	2e-153	100.0%	NM_001109921_1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Ochetona princeps myostatin (MSTN) mRNA	540	540	99%	2e-149	94.59%	XM_004676974_1

**Oryctolagus cuniculus partial MSTN gene for myostatin, exon 1**Sequence ID: [AM931155.1](#) Length: 499 Number of Matches: 1

Range 1: 37 to 386 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					<a href="#">▼ Next Match</a>	<a href="#">▲ Previous Match</a>
Score 647 bits(350)	Expect 0.0	Identities 350/350(100%)	Gaps 0/350(0%)	Strand Plus/Plus		
Query 1	GTAAAAGGAAGACATAAGAACAAAGGGAAAGGATTGTATAGCTTTAAAATCATGCAAAAAA				60	
Subjct 37	GTAAAAGGAAGACATAAGAACAAAGGGAAAGGATTGTATAGCTTTAAAATCATGCAAAAAA				96	
Query 61	CTGCAAATCTATGTTTATTTACCTGTTATGCTGATCGTGGCTGGCCAGTGGATCTA				120	
Subjct 97	CTGCAAATCTATGTTTATTTACCTGTTATGCTGATCGTGGCTGGCCAGTGGATCTA				156	
Query 121	AATGAAAACAGTGAGCAAAAGAAAATGTGGAAAAAGACGGGCTGTGTAATGCATGCACT				180	
Subjct 157	AATGAAAACAGTGAGCAAAAGAAAATGTGGAAAAAGACGGGCTGTGTAATGCATGCACT				216	
Query 181	TGGAGACAAAACAGTAAATATTCAAGAATAGAACGCCATAAGATTCAAATCCTCAGTAAA				240	
Subjct 217	TGGAGACAAAACAGTAAATATTCAAGAATAGAACGCCATAAGATTCAAATCCTCAGTAAA				276	
Query 241	CTTCGCTGAAACAGCTCTAACATCAGCAAAAGATGCTATAAGACAACTTTACCCAAA				300	
Subjct 277	CTTCGCTGAAACAGCTCTAACATCAGCAAAAGATGCTATAAGACAACTTTACCCAAA				336	
Query 301	GCTCCTCCACTCGGGAACTGATTGATCAGTACGACGTCAGAGGGATGA	350				
Subjct 337	GCTCCTCCACTCGGGAACTGATTGATCAGTACGACGTCAGAGGGATGA	386				

b. Sampel A2 (*Kelinci New Zealand White*)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus myostatin (mstn) mRNA, complete cds	647	647	99%	0.0	100.00%	KX084386_1
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 11 breed Soviet chinchilla myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	647	647	99%	0.0	100.00%	GU244549_1
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 2 breed desi myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	647	647	99%	0.0	100.00%	GU244541_1
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus partial MSTN gene for myostatin, exon 1	647	647	99%	0.0	100.00%	AM931155_1
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 9 breed white giant myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	641	641	99%	4e-180	99.71%	GU244552_1
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 5 breed white giant myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	641	641	99%	4e-180	99.71%	GU244550_1
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 7 breed Soviet chinchilla myostatin-like (MSTN) gene, partial sequence	641	641	99%	4e-180	99.71%	GU244547_1
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 1 breed desi myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	641	641	99%	4e-180	99.71%	GU244540_1
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus myostatin (MSTN) mRNA	553	553	85%	2e-153	100.00%	NM_001109821_1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED_Ochotona princeps myostatin (MSTN) mRNA	540	540	99%	2e-149	94.59%	XM_004576974_1

**Oryctolagus cuniculus partial MSTN gene for myostatin, exon 1**Sequence ID: [AM931155.1](#) Length: 499 Number of Matches: 1

Range 1: 37 to 387 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					<a href="#">▼ Next Match</a>	<a href="#">▲ Previous Match</a>
Score 643 bits(348)	Expect 1e-180	Identities 350/351(99%)	Gaps 0/351(0%)	Strand Plus/Plus		
Query 1	GTAAAAGGAAGACATAAGAACAAAGGGAAAGGATTGTATAGCTTTAAATCATGC	AAAAAA		60		
Sbjct 37	GTAAAAGGAAGACATAAGAACAAAGGGAAAGGATTGTATAGCTTTAAATCATGC	AAAAAA		96		
Query 61	CTGCAAATCTATGTTTATTTACCTGTTATGCTGATCGTGGCTGGCCAGTGGATCTA			120		
Sbjct 97	CTGCAAATCTATGTTTATTTACCTGTTATGCTGATCGTGGCTGGCCAGTGGATCTA			156		
Query 121	AATGAAAACAGTGAGCAAAAGAAAATGTGGAAAAGACGGGCTGTGTAATGCATGCACT			180		
Sbjct 157	AATGAAAACAGTGAGCAAAAGAAAATGTGGAAAAGACGGGCTGTGTAATGCATGCACT			216		
Query 181	TGGAGACAAAACAGTAAATATTCAAGAATAGAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACA	ACTTTACCCAAA		240		
Sbjct 217	TGGAGACAAAACAGTAAATATTCAAGAATAGAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACA	ACTTTACCCAAA		276		
Query 241	CTTCGCCTGAAACAGCTCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAAC	TTTACCCAAA		300		
Sbjct 277	CTTCGCCTGAAACAGCTCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAAC	TTTACCCAAA		336		
Query 301	GCTCCTCCACTCCAGGAACGTGATTGATCAGTACGACGTTCAAGAGGGATGAC			351		
Sbjct 337	GCTCCTCCACTCCAGGAACGTGATTGATCAGTACGACGTTCAAGAGGGATGAC			387		

## c. Sampel A3 (Kelinci American Fuzzy Lop)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus myostatin (mstn) mRNA, complete cds	649	649	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KX084386.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 11 breed Soviet chinchilla myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	649	649	100%	0.0	100.00%	<a href="#">GU244549.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 2 breed deer myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	649	649	100%	0.0	100.00%	<a href="#">GU244541.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus partial MSTN gene for myostatin, exon 1	649	649	100%	0.0	100.00%	<a href="#">AM931155.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 9 breed white giant myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	643	643	100%	1e-180	99.72%	<a href="#">GU244552.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 5 breed white giant myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	643	643	100%	1e-180	99.72%	<a href="#">GU244550.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 7 breed Soviet chinchilla myostatin-like (MSTN) gene, partial sequence	643	643	100%	1e-180	99.72%	<a href="#">GU244547.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus isolate 1 breed deer myostatin (MSTN) gene, exon 1 and partial cds	643	643	100%	1e-180	99.72%	<a href="#">GU244540.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Oryctolagus cuniculus myostatin (MSTN) mRNA	555	555	85%	5e-154	100.00%	<a href="#">NM_001109821.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED_Ochotona princeps myostatin (MSTN) mRNA	542	542	99%	5e-150	94.60%	<a href="#">XM_004576974.1</a>

**Oryctolagus cuniculus isolate 7 breed Soviet chinchilla myostatin-like (MSTN) gene, partial sequence**Sequence ID: [GU244547.1](#) Length: 497 Number of Matches: 1

Range 1: 35 to 385 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>					<a href="#">▼ Next Match</a>	<a href="#">▲ Previous Match</a>
Score 643 bits(348)	Expect 1e-180	Identities 350/351(99%)	Gaps 0/351(0%)	Strand Plus/Plus		
Query 1	GTAAAAGGAAGACATAAGAACAAAGGGAAAGGATTGTATAGCTTTAAATCATGC	AAAAAA		60		
Sbjct 35	GTAAAAGGAAGACATAAGAACAAAGGGAAAGGATTGTATAGCTTTAAATCATGC	AAAAAA		94		
Query 61	CTGCAAATCTATGTTTATTTACCTGTTATGCTGATCGTGGCTGGCCAGTGGATCTA			120		
Sbjct 95	CTGCAAATCTATGTTTATTTACCTGTTATGCTGATCGTGGCTGGCCAGTGGATCTA			154		
Query 121	AATGAAAACAGTGAGCAAAAGAAAATGTGGAAAAGACGGGCTGTGTAATGCATGCACT			180		
Sbjct 155	AATGAAAACAGTGAGCAAAAGAAAATGTGGAAAAGACGGGCTGTGTAATGCATGCACT			214		
Query 181	TGGAGACAAAACAGTAAATATTCAAGAATAGAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACA	ACTTTACCCAAA		240		
Sbjct 215	TGGAGACAAAACAGTAAATATTCAAGAATAGAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACA	ACTTTACCCAAA		274		
Query 241	CTTCGCCTGAAACAGCTCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAAC	TTTACCCAAA		300		
Sbjct 275	CTTCGCCTGAAACAGCTCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAAC	TTTACCCAAA		334		
Query 301	GCTCCTCCACTCCAGGAACGTGATTGATCAGTACGACGTTCAAGAGGGATGAC			351		
Sbjct 335	GCTCCTCCACTCCAGGAACGTGATTGATCAGTACGACGTTCAAGAGGGATGAC			385		

**Lampiran 8: Penyejajaran Antara Sekuen DNA Sampel A1, A2 dan A3 Terhadap Referensi Gen MSTN**

		10	20	30	40	50	60	70	80
KX084386.1 Oryctolagus cuniculus	GTAAAAGGAAGACATAAGAACAGGGAAAGGATTGATAGCTTTAAATCATGCAAAACTGCAAATCTATGTTTATTT	.	.	.	.	.	.	.	
A1_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
A2_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
A3_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		110	120	130	140	150	160	170	180
KX084386.1 Oryctolagus cuniculus	TGGCTGGCCCAGTGGATCTAAATGAAAACAGTGAGCAAAAGAAAATGTGAAAAAGACGGGCTGTGTAATGCATGCACTT	.	.	.	.	.	.	.	
A1_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
A2_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
A3_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		210	220	230	240	250	260	270	280
KX084386.1 Oryctolagus cuniculus	TTCAAGAATAGAACGCCATAAAGATTCAAATCCTCAGTAACCTTCGCTGGAAACAGCTCTAACATCAGCAAAGATGCTAT	.	.	.	.	.	.	.	
A1_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
A2_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
A3_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		310	320	330	340	350			
KX084386.1 Oryctolagus cuniculus	GCTCCCTCCACTCCGGGAACCTGATTGATCAGTACGACGTTTCAGAGGGATGAC	.	.	.	.	.			
A1_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G		
A2_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A		
A3_AF	.....	.....	.....	.....	.....	.....			

**Lampiran 9: Daftar Kode Genetik Asam Amino**

Amino Acid	single letter code	3-letter code	DNA codons
Isoleucine	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Leucine	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valine	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Phenylalanine	F	Phe	TTT, TTC
Methionine	M	Met (start)	ATG
Cysteine	C	Cys	TGT, TGC
Alanine	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Glycine	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
Proline	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
Threonine	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
Serine	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tyrosine	Y	Tyr	TAT, TAC
Tryptophan	W	Trp	TGG
Glutamine	Q	Gln	CAA, CAG
Asparagine	N	Asn	AAT, AAC
Histidine	H	His	CAT, CAC
Glutamic acid	E	Glu	GAA, GAG
Aspartic acid	D	Asp	GAT, GAC
Lysine	K	Lys	AAA, AAG
Arginine	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Stop codons	Stop	termination	TAA, TAG, TGA

### Lampiran 10: Perbedaan Morfologi Kelinci

GAMBAR	BERAT BADAN	MORFOLOGI
 <i>Kelinci Fujian</i>	$\pm 2$ kg	Ukuran tubuh kecil Telinga pendek dan kecil. Panjang rambut pendek (Xie, dkk. 2016)
 <i>Kelinci Rex</i>	4,7 kg	Rambut halus seperti beludru Ukuran tubuh besar Telinga tegak keatas
 <i>Kelinci New Zealand White</i>	4,3 kg	Rambut berwarna putih Mata berwarna merah Ukuran tubuh besar Telinga tegak keatas

	1,8 kg	Ukuran tubuh kecil Rambut panjang Telinga jatuh ke bawah
<p>Kelinci <i>American Fuzzy Lop</i></p>		