

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian tentang polimorfisme protein plasma darah pada ayam Kedu jengger merah dan hitam generasi ke-2 dilaksanakan pada bulan Maret – Agustus 2017 bertempat di Satker Maron Temanggung, Jawa Tengah. Uji elektroforesis dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Analisis data dilakukan di Laboratorium Genetika Pemuliaan Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro.

#### **3.1. Materi**

Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah 40 sampel darah dari 20 ekor ayam Kedu jengger merah (AKJM) dan 20 ekor ayam Kedu jengger hitam (AKJH).

##### **3.1.1. Alat dan bahan**

Alat yang digunakan adalah tabung EDTA warna ungu 10 ml, *sprit* 5 ml, *ice gel*, *ice box*, dan alat tulis, gelas ukur, pipet ukur, sentrifus, pipet, *beaker glass*, nampan plastik, pengaduk, wadah sampel, timbangan, alat elektroforesis (tangki, kaset, sisir, dan *spacer*), dan catu daya DC untuk elektroforesis plasma darah.

### 3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel, bufer elektroda, Acrylamid dan Bis Acrylamid, Aquades, Tris HCl, 10% SDS, APS, TEMED, glisin, Coomassie blue 0,1%, methanol, asam asetat.

## 3.2. Metode

Pengambilan sampel darah dilakukan pada bagian *vena brachialis* yang terletak di bawah sayap menggunakan spuit sebanyak 2 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung EDTA warna ungu 10 ml yang sebelumnya telah diberi antikoagulan dan diberi label sebagai tanda sesuai jenggernya. Sampel darah yang telah ditandai kemudian dimasukkan ke dalam *ice box* agar tidak terjadi kerusakan komponen darah.

Polimorfisme protein darah ayam Kedu dapat diidentifikasi dengan elektroforesis gel akrilamid/*Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (PAGE). Tahapan-tahapan proses elektroforesis yaitu persiapan bahan analisis kimia, pembuatan gel elektroforesis, penetesan sampel darah, dan *running* (proses pemisahan protein), serta pewarnaan dan pencucian.

### 3.2.1. Pembuatan gel elektroforesis

Gel elektroforesis terdiri dari dua bahan yaitu gel pemisah (*running gel* atau *separation gel*) dan gel penggertak (*stacking gel*). Gel elektroforesis akrilamid dibentuk dari bahan tersebut. Larutan gel pemisah sebagai analisis plasma darah dibuat dengan komposisi 1,2 g akrilamid dengan mencampurkan 0,032 g bis-

akrilamid, 3 ml larutan 1,5M Tris pH 8,8; 0,12 ml larutan 10% SDS, dan 8,88 ml larutan H<sub>2</sub>O, selanjutnya gel gradient 10% sebanyak 10 ml ditambahkan dengan 6 µl Temed dan 50 µl APS lalu diaduk hingga homogen.

Pembuatan larutan *stacking gel* 3% dengan cara mencampurkan akrilamid 0,9 g + Bis akrilamid 0,024 ml + Tris HCL 2,562 ml + 10% SDS 0,3 ml + H<sub>2</sub>O 17,18 ml, selanjutnya ditambahkan dengan 3 µl + 25 µl APS kemudian diaduk hingga homogen.

Langkah terakhir yaitu mencampurkan 0,0248 M Tris sebanyak 3 g + 0,19 M Glicine 14,4 g + 10% SDS sebanyak 10 ml. Campuran diaduk hingga rata dan kemudian dilarutkan dalam 1 liter H<sub>2</sub>O.

### **3.2.2. Tahap elektroforesis**

Larutan gel dimasukkan kedalam cetakan gel yang terdiri dari dua lempengan kaca *spacer* dan penjepit. Larutan dimasukkan menggunakan pipet hingga ketinggian tertentu supaya masih ada ruang bagi larutan penggerak. Alat elektroforesis disiapkan. Slab dipasang pada bak yang telah diberi larutan penyangga elektroda cetakan, sisir dibuka setelah larutan penyangga elektroda diisi pada bak bagian atas. Sampel plasma darah yang berada di refregator dikeluarkan terlebih dahulu, kemudian dimasukkan kedalam tempat contoh gel dengan menggunakan pipet Heamilton yang telah diberi larutan indikator contoh pada *coke microtiter*. Sampel plasma darah sebanyak 2 µl dicampur merata dengan larutan indikator 2 µl, selanjutnya diambil 2 µl dari campuran larutan tersebut. Alat elektroforesis dihubungkan dengan tegan tetap regulator 150 volt.

Dilanjutkan dengan proses *running* selama 105 menit untuk menganalisis plasma darah.

### **3.2.3. Teknik pewarnaan dan pencucian**

Slab dibuka pada salah satu kacanya dan gel yang masih melekat pada salah satu lempeng kaca lainnya disentuh ujungnya hingga terlepas seluruhnya pada pewarna *Commassie Brilliant Blue*. Selanjutnya gel dioven selama 20 menit. Gel lalu dipisahkan dengan pewarna dan diganti dengan pencuci dan larutan pencuci yang terdiri dari methanol : asam asetat : H<sub>2</sub>O = 50 : 10 : 40, lakukan proses tersebut hingga jernih dan terlihat pita-pita protein plasma darah. Pencucian dilakukan setelah didiamkan selama semalaman.

### **3.2.4. Teknik pembacaan hasil elektroforesis**

Pita-pita protein yang telah dicuci dengan bersih kemudian dibaca dengan memperhatikan bagian-bagian lokus yang terdiri dari prealbumin, albumin, ceruloplasmin, transferin, post-transferin dan amylase-I. Tiap lokus dibaca berdasarkan alel yang tampak.

## **3.3. Analisis data**

Analisis dilakukan dengan cara mengamati foto hasil elektroforesis yang telah dilakukan dibedakan sesuai warna jengger yaitu AKJM dan AKJH berdasarkan pita dari *marker* pre albumin, albumin, ceruloplasmin, transferin, post transferrin dan amylase-I.

### 3.3.1. Frekuensi gen

Perhitungan frekuensi gen menggunakan rumus Warwick *et al.* (1990) sebagai berikut :

$$F_{an} = \frac{\sum Lokus_{an}}{\sum Lokus_{A1} + \sum Lokus_{A2} + \dots + \sum Lokus_{An}} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

Dimana  $F_{an}$  = frekuensi gen A pada lokus ke-n

### 3.3.2. Ragam genetik

Perhitungan ragam genetik menggunakan rumus heterozigositas individu (h) dan rata-rata heterozigositas ( $\hat{H}$ ) berdasarkan Nei (1987) sebagai berikut:

$$h = 1 - \sum qi^2 \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

h = heterozigositas individu

$q_i$  = frekuensi gen ke-i

Rataan heterozigositas dapat dihitung menggunakan rumus rata-rata heterozigositas:

$$\overline{H} = \frac{\sum h}{r} \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

h = heterozigositas individu

r = jumlah lokus yang diamati

$\overline{H}$  = rata-rata heterozigositas

### 3.3.3. Chi square ( $X^2$ )

a. Uji keseimbangan Hardy-Weinberg untuk menentukan perbedaan frekuensi observasi dengan frekuensi ekspektasi melalui uji Chi square dengan rumus Sugiyono (2003):

$$X^2 \text{ hit} = \sum \frac{(Obs-Exp)^2}{Exp} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

$X^2$  = chi square

Obs = Frekuensi Gen Observasi

Exp = Frekuensi Gen Ekspektasi (Frekuensi harapan)

b. Uji chi square memiliki tingkat kepercayaan sebesar 95% dengan kesalahan sebesar 0,05.

c. Kriteria pengujian:

Jika  $X^2$  hitung =  $X^2$  tabel, maka  $H_0$  diterima

Jika  $X^2$  hitung >  $X^2$  tabel, maka  $H_0$  ditolak

### 3.3.4. Hipotesis statistik

$H_0$  :  $\mu_1 = \mu_2 = \dots\dots\dots = \mu_n = 0$  ; (tidak berbeda nyata antara genotip harapan dengan genotip observasi pada AKJM ataupun AKJH).

$H_1$  : minimal ada satu  $\mu_i \neq 0$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ), (minimal ada satu perbedaan nyata antara genotip harapan dengan genotip observasi pada AKJM ataupun AKJH).