

POLIMORFISME PROTEIN PLASMA DARAH
PADA *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora*
DAN *Rana limnocharis*

SKRIPSI



Unit UPT Perpustakaan
UNIVERSITAS JEMBER



Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata 1
Program Studi Pendidikan Biologi
Jurusan Pendidikan Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan
Universitas Jember

Oleh :

Terima : Tgl. 21 APR 2003
No. Induk : SCS

Yuli Kusantini

NIM. 980210103208

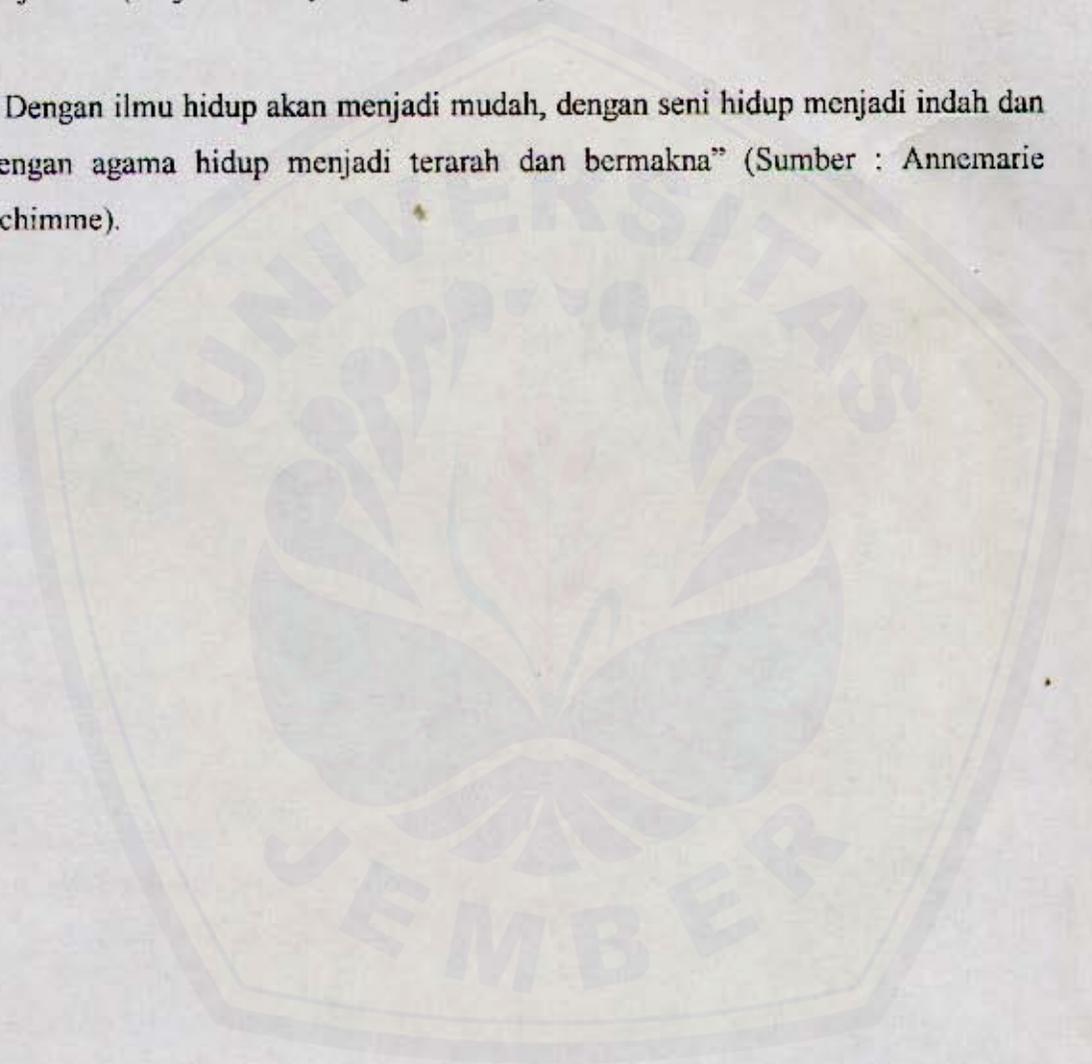
S
Klass
574.84
KUS
P
e.1

FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
2003

HALAMAN MOTTO

“ Allah SWT meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang berilmu beberapa derajat. Allah maha mengetahui apa-apa yang kamu kerjakan” (Terjemahan Q.S. Mujadalah:11).

“ Dengan ilmu hidup akan menjadi mudah, dengan seni hidup menjadi indah dan dengan agama hidup menjadi terarah dan bermakna” (Sumber : Annemarie Schimme).



HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya tertulis ilmiah ini kupersembahkan untuk :

- Bapak Adi Kusyanto dan Ibu Jumiati tercinta yang selalu mendukungku baik secara moril maupun materiil dan selalu mengiringi langkahku dalam do'a.
- Adikku Sandra, Dana dan Mike.
- Keluarga Bapak Iro.
- Seseorang yang selalu memberiku semangat serta perhatian selama aku menyelesaikan tugas akhirku.
- Sahabat-sahabatku, Ukay, Yusuf dan Hary.
- Temen-temenku Biologi angkatan 98 dan temen-temen kostku.
- Almamaterku.

HALAMAN PENGAJUAN

**POLIMORFISME PROTEIN PLASMA DARAH
PADA *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* DAN *Rana limnocharis***

Diajukan untuk dipertahankan di depan tim penguji guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana Strata I (S1) Program Studi Pendidikan Biologi

Jurusan Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

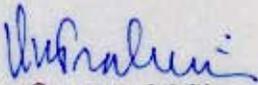
Universitas Jember

Oleh

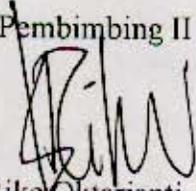
Nama Mahasiswa : Yuli Kustantin
Nim : 980210103208
Angkatan Tahun : 1998
Jurusan / Program : P.MIPA / P.Biologi
Daerah Asal : Banyuwangi
Tempat / Tgl lahir : Banyuwangi/ 9 Juli 1980

Disetujui :

Pembimbing I


Drs. Suratno, M.Si
NIP.131 993 443

Pembimbing II


Dra. Rike Oktarianti, M.Si
NIP.131 877 583

HALAMAN PENGESAHAN

Telah dipertahankan di depan tim penguji dan diterima oleh Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember

Pada hari : Selasa

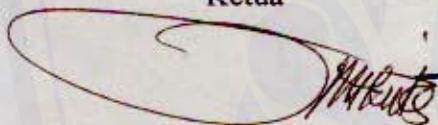
Tanggal : 7 Januari 2003

Tempat : Fakultas keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Jember

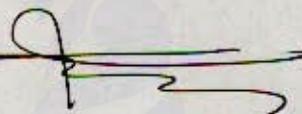
Tim Penguji

Ketua

Sekretaris



Drs. Supriyanto, M. Si
NIP. 131 660 791



Ir. Imam Mudakir, M.Si
NIP.131 877 580

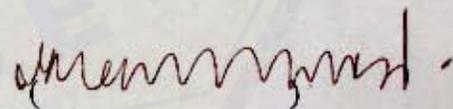
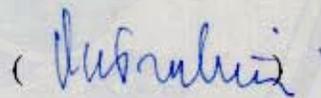
Anggota

1. Drs. Suratno, M. Si

NIP. 131 993 443

2. Drs. Slamet H, M. Si

NIP. 131 993 439



Mengetahui

Dekan



Drs. H. Dwi Suparno, M. Hum
NIP. 131 274 727

KATA PENGANTAR

Berkat rahmat Allah SWT, penulis mengucapkan puji sukur kehadiran-Nya sehingga dapat menyelesaikan penulisan karya ilmiah tertulis berjudul "Polimorfisme Protein Plasma Darah pada *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis*".

Sehubungan dengan ini penulis mengucapkan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember
2. Ketua Jurusan Pendidikan MIPA Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember
3. Ketua Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember
4. Drs. Suratno, M.Si selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan petunjuk dan saran dalam penulisan karya ilmiah tertulis ini
5. Dra. Rike Oktarianti, M.Si selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan petunjuk dan saran dalam penulisan karya ilmiah tertulis ini
6. Purnama Okviandari, SP selaku teknisi Lab Biologi Molekuler yang telah memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian ini

Penulis berharap semoga amal baiknya diterima Allah SWT.

Jember , Januari 2003

Penulis

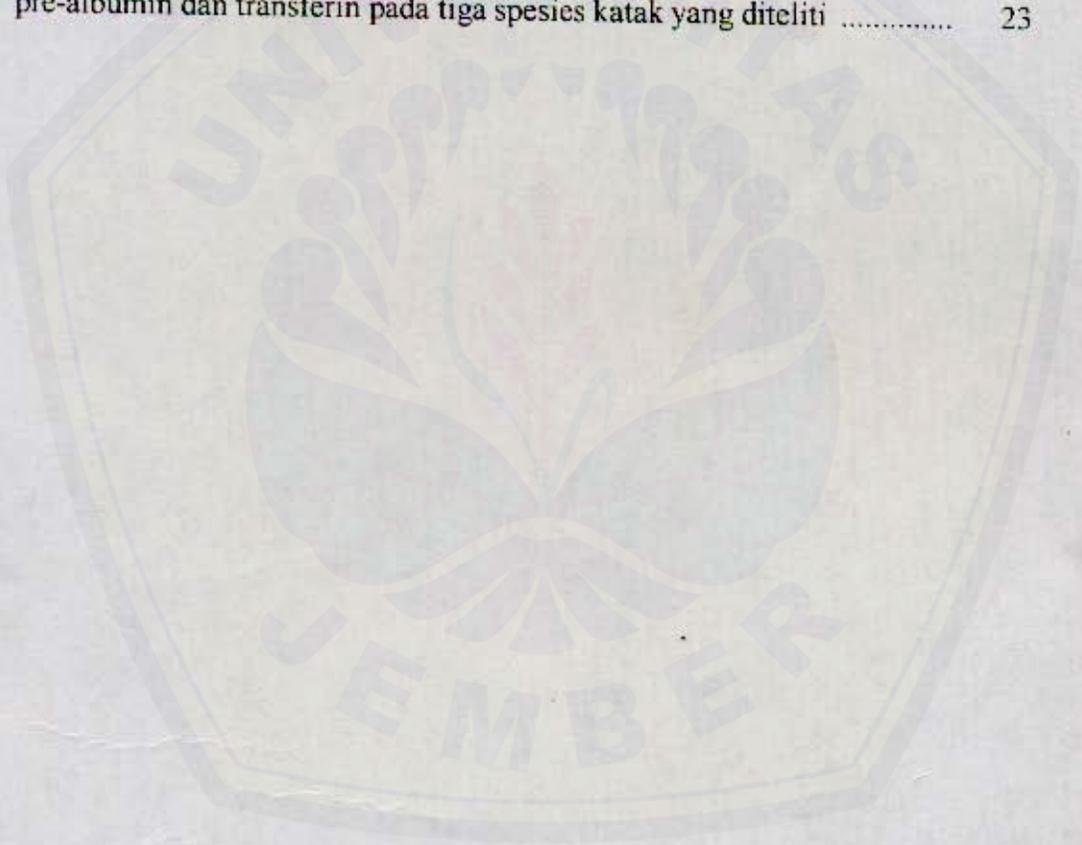
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN MOTTO	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN PENGAJUAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK	xii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Karakter Morfologi dan Sistematika Genus <i>Rana</i>	4
2.2 Polimorfisme Protein Plasma Darah.....	5
III. METODE PENELITIAN.....	
3.1 Waktu dan Tempat	11
3.2 Bahan Penelitian.....	11
3.3 Alat Penelitian.....	12
3.4 Prosedur Penelitian.....	12
3.5 Analisis data	15

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
4.1 Hasil Penelitian	17
4.1.1 Hasil elektroforesis tiga spsies katak	17
4.1.2 Heterozigositas (h)	23
4.2 Pembahasan.....	24
4.2.1 Albumin	24
4.2.2 Pre-albumin	25
4.2.3 Transferin	26
4.2.4 Heterozigositas	27
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
5.1 Kesimpulan.....	29
5.1 Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN.....	33

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
1.	Frekuensi genotip berdasarkan hasil elektroforesis lokus albumin, pre-albumin dan transferin	21
2.	Frekuensi alel berdasarkan hasil elektroforesis lokus albumin, pre-albumin dan transferin pada tiga spesies katak yang diteliti	22
3.	Heterozigositas (h) dan Heterozigositas populasi (H) dari lokus albumin, pre-albumin dan transferin pada tiga spesies katak yang diteliti	23



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
1.	Elektroforegram profil protein plasma darah <i>Rana catesbeiana</i> dan <i>Rana limnocharis</i>	17
2.	Elektroforegram profil protein plasma darah <i>Rana catesbeiana</i> dan <i>Rana limnocharis</i>	18
3.	Elektroforegram protein plasma darah <i>Rana cancrivora</i>	19
4.	Pola pita elektromorf albumin ketiga spesies katak yang diteliti	20
5.	Pola pita elektromorf pe-albumin ketiga spesies katak yang diteliti	20
6.	Pola pita elektromorf transferin ketiga spesies katak yang diteliti	20

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul	Halaman
1.	Matrik penelitian	33
2.	Hasil perhitungan frekuensi genotip, frekuensi alel dan heterozigositas pada lokus albumin, pre-albumin dan transferin dari ketiga spesies katak	34
3.	Foto ketiga species katak yang diteliti	40
4.	Foto seperangkat alat elektroforesis sistem vertikal	40
5.	Lembar konsultasi	41
6.	Lembar ijin penyelesaian penelitian Lab. Biologi Molekuler	42

ABSTRAK

Yuli Kustantin, Januari, 2003, Polimorfisme Protein Plasma Darah pada *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis* (Genus *Rana*), Skripsi, Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.

Pembimbing : (1) Drs. Suratno, M. Si
(2) Dra. Rike Oktarianti, M. Si

Perburuan liar terhadap katak konsumsi lokal (*Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis*) untuk memenuhi kebutuhan konsumen masyarakat tertentu terhadap daging katak, akan dapat mempengaruhi kelangsungan hidup katak tersebut. Sehingga alternatif untuk mengurangi perburuan tersebut didatangkan katak introduksi yaitu *Rana catesbeiana*. Tekanan-tekanan lingkungan mempunyai pengaruh terhadap tingkat keragaman genetik. Suatu populasi yang memiliki keragaman genetik rendah akan sangat mudah terseleksi terutama jika ada perubahan lingkungan yang kurang menguntungkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme protein plasma darah dan variasi genetik pada spesies *Rana cancrivora*, *Rana catesbeiana* dan *Rana limnocharis*. Lokus yang diamati adalah albumin, pre-albumin dan transferin. Teknik yang digunakan adalah elektroforesis gel poliakrilamid sistem vertikal. Atas dasar jumlah pita protein yang terbentuk pada masing-masing lokus kemudian dihitung frekuensi alel. Lokus yang dinyatakan tergolong sebagai lokus polimorfik adalah apabila frekuensi alel paling umum yang ditemukan tidak melebihi 0,99 atau 99%. Sedangkan variasi genetik ditentukan berdasarkan salah satu parameter genetik yaitu heterozigositas. Hasil penelitian menunjukkan adanya polimorfisme pada lokus albumin, pre-albumin dan transferin dari ketiga spesies katak yang diteliti. Lokus Alb dikontrol tiga alel (Alb^A Alb^B Alb^C), lokus Pa dan Tf dikontrol 2 alel (Pa^A dan Pa^B ; Tf^A dan Tf^B). Variasi genetik pada *Rana cancrivora*, *Rana catesbeiana* dan *Rana limnocharis* tercermin pada nilai heterozigositas (h) dan heterozigositas populasi (H). Heterozigositas populasi untuk *Rana cancrivora*, *Rana catesbeiana* dan *Rana limnocharis* masing-masing adalah 55,2% ; 47,6% ; 42,6%.

Kata kunci : Genus *Rana*, Polimorfisme Protein Plasma Darah.



1.1 Latar Belakang

Studi sistematik terhadap hewan khususnya Amphibia merupakan hal yang menarik bagi para ilmuwan hingga saat ini. Studi sistematik berawal dari studi perbandingan morfologi, demikian pula halnya dengan studi sistematik terhadap katak Asia yang telah dilakukan oleh Van Kampen (1923:160). Van Kampen merupakan salah satu ahli taksonomi yang telah mencoba mengadakan inventarisasi jenis-jenis katak yang ada di Indonesia. Para ahli taksonomi mengelompokkan katak-katak itu ke dalam taksonnya berdasarkan dari bentuk morfologi lengkap dengan ciri-ciri dan ukurannya.

Genus *Rana* merupakan salah satu anggota kelas Amphibi yang dapat memberikan manfaat bagi masyarakat. Disamping berperan sebagai hewan biologi kontrol di dalam ekosistem daratan, hewan ini memegang peranan dalam komoditas perikanan untuk konsumsi baik dalam negeri maupun ekspor. Bahkan pada tahun 1979 Indonesia merupakan pemasok katak terbesar kedua ke negara-negara Masyarakat Ekonomi Eropa (MEE) (Arie, 1998:2). Kandungan gizi yang cukup tinggi dari katak dan tingginya konsumsi masyarakat tertentu terhadap daging katak tidak menutup kemungkinan katak banyak diburu di alam oleh para peternak katak. Penangkapan katak di alam yang dilakukan secara terus menerus guna memenuhi kebutuhan konsumen dapat mengganggu populasi katak yang nantinya dapat mengganggu keseimbangan alam. Menghadapi masalah tersebut Indonesia mengambil kebijaksanaan mendatangkan katak budidaya dari Inggris dan Amerika yaitu *Rana catesbeiana* (Arie, 1998:7).

Rana catesbeiana memiliki beberapa kelebihan dibandingkan katak konsumsi Indonesia di antaranya adalah mudah beradaptasi di lingkungan budidaya, ukuran lebih besar, pertumbuhan lebih cepat, tidak tergantung pada pakan alami dan kandungan gizinya lebih tinggi. Kelebihan-kelebihan tersebut sangat memungkinkan *Rana catesbeiana* dibudidayakan di Indonesia baik dalam skala besar ataupun kecil. Namun jumlah masyarakat yang membudidayakannya masih relatif sedikit karena teknologinya masih belum banyak dikuasai. Oleh

sebab itu, masih banyak perburuan liar dan katak konsumsi Indonesia, mengingat di Indonesia ada lima jenis katak konsumsi yaitu *Rana macrodon*, *Rana cancrivora*, *Rana limnocharis*, *Rana erythraea* dan *Rana tigrina* (Arie, 1998:3).

Perburuan liar, penyempitan habitat serta pencemaran perairan merupakan tekanan lingkungan paling besar yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup bagi katak konsumsi Indonesia. Tekanan-tekanan lingkungan yang diterima disatu sisi bisa mempunyai dampak terhadap penampilan ukuran dan bentuk, disisi lain mempunyai pengaruh besar terhadap tingkat keragaman genetik (Salender, 1978:20). Demikian pula bagi *Rana catesbeiana*, keberadaannya sebagai hewan introduksi dapat menambah plasma nutfah Indonesia akan tetapi disisi lain juga dapat merusak plasma nutfah asli Indonesia. Suatu populasi akan mempunyai keragaman genetik rendah terutama jika ada perubahan lingkungan yang kurang menguntungkan. Di tengah-tengah keberadaannya yang semakin menurun di alam bagi katak konsumsi Indonesia dan keberadaan *Rana catesbeiana* sebagai hewan introduksi ternyata informasi mengenai penelaahan karakteristik genetiknya masih sangat kurang. Penelaahan karakteristik genetik menjadi sangat penting sebagai upaya untuk pengelolaan populasi katak konsumsi Indonesia dan bagi *Rana catesbeiana* sebagai penambah plasma nutfah Indonesia. Kemampuan suatu organisme untuk dapat beradaptasi terhadap perubahan lingkungan di alam sangat ditentukan oleh variasi genetiknya, maka dikatakan keragaman genetik dipandang sebagai bahan mentah (rawmaterial) bagi evolusi yang menyebabkan suatu populasi dapat beradaptasi terhadap perubahan-perubahan di alam lingkungannya.

Berdasarkan uraian tersebut perlu adanya penelitian mengenai variasi genetik dari *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis* melalui studi protein dengan cara melihat karakteristik genetiknya yaitu melalui kajian penampilan pola polimorfisme protein plasma darah dengan menggunakan metode elektroforesis.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) adakah polimorfisme plasma darah pada lokus albumin (Alb), pre-albumin (Pa) dan transferin (Tf) dari *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis*?
- 2) adakah variasi genetik pada *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis* berdasarkan frekuensi heterozigositas setiap lokus gen spesies dan frekuensi heterozigositas populasi ?

1.3 Batasan Masalah

Penelitian polimorfisme protein plasma darah ini hanya terbatas pada lokus albumin (Alb), pre-albumin (Pa) dan transferin (Tf).

1.4 Tujuan Penelitian

- 1) untuk mengetahui adanya polimorfisme protein plasma darah pada lokus albumin (Alb), pre-albumin (Pa) dan transferin (Tf) *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis* ?
- 2) untuk mengetahui adanya variasi genetik pada *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis* berdasarkan frekuensi heterozigositas setiap lokus gen spesies dan frekuensi heterozigositas populasi?

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk kajian taksonomi dan kajian genetika khususnya mengenai variasi genetik pada katak genus *Rana* sebagai data dasar untuk menetapkan strategi konservasi (pelestarian) populasi katak di alam.



2.1 Karakteristik Morfologi dan Sistematika

2.1.1 *Rana cancrivora*

Species ini mempunyai ciri-ciri antara lain kepala pipih, berbentuk segitiga, lebih panjang, moncong tumpul, timpanum jelas dengan diameter $\frac{1}{2}$ sampai $\frac{2}{3}$ diameter mata. Gigi vomer terletak dalam jajaran miring mulai dari koana ke arah medio-posterior. Pada punggung terdapat banyak lipatan-lipatan kulit (plika longitudinal, terdapat lipatan supratimpani yang jelas dari mata aksila. Kaki depan berjari lancip dan tidak berselaput, kaki belakang berselaput sampai bonggol jari keempat yang terluar. Jari keempat pada kaki belakang lebih panjang daripada jari pertama dan kedua dengan dua falang tidak berselaput renang. Kulit pada bagian belakang punggung berbintil dan bergaris punggung hijau, kaki depan banyak bercak berwarna hitam atau kelabu tua. Penentuan hewan jantan yaitu adanya kantong suara, leher berwarna hitam dan timpanumnya lebih besar (Iskandar, 1998:21; Van Kampen, 1923:110).

2.1.2 *Rana limnocharis*

Species ini mempunyai ciri-ciri sebagai berikut kepala runcing, lebih lebar dari panjangnya, jari kaki depan tidak berselaput sedangkan kaki belakang berselaput tidak mencapai pertengahan bonggol jari keempat. Ujung jari tidak melebar, memiliki bintil metatarsal. Warna tubuh coklat kehijauan dengan bintik gelap simetris yang tidak terlihat jelas. Kulit berkerut, tertutup oleh bintil-bintil memanjang yang agak jarang. Bintil ini biasanya memanjang sejajar dengan sumbu tubuh (Iskandar, 1998:23; Van Kampen, 1923:112).

2.1.3 *Rana catesbeiana*

Species ini mempunyai ciri-ciri sebagai berikut kepala berbentuk segitiga, mulutnya lebar dan tidak berada di ujung kepala tetapi agak sedikit ke bawah dan membelah secara horizontal hampir keseluruhan bagian kepala. Mata besar berwarna hitam dan pada bagian punggungnya berbentuk cincin berwarna coklat

Menurut Sofro (1991:12) ditinjau dari segi genetika biokimia, banyaknya molekul protein yang dijumpai dalam darah baik dalam komponen cair maupun komponen padatnya merupakan pengejawantahan ekspresi gen yang ada dalam organisme yang bersangkutan, artinya kelainan yang menyangkut gen sebagai penyimpan dan pelindung sifat keturunan dapat dengan mudah diamati dan dideteksi lewat pemeriksaan dengan menggunakan darah. Gen merupakan unit fisik yang terletak dalam kromosom, yang terutama tersusun atas asam deoksiribonukleat (DNA) dan protein. Sebagai pembawa ciri-ciri yang diwariskan kajian terhadapnya membuktikan bahwa asam nukleat penyusun gen memiliki sifat yang memenuhi syarat tertentu dimana persyaratan ini dipenuhi oleh DNA yang dapat mengalami pembelahan menjadi dua secara persis disamping terbukti memegang peranan penting dalam mengatur aktifitas sel. Melalui berbagai macam percobaan dan pengamatan, disamping sifat stabilnya yang dapat diwariskan tanpa perubahan ternyata molekul DNA juga dapat mengalami perubahan sehingga tidak persis sama dengan ciri induknya, keadaan ini dikenal dengan mutasi.

Mutasi merupakan perubahan di dalam urutan kodon dari DNA dalam suatu genom (Smith, 1998:53) sedangkan menurut Sofro (1994:30) mutasi didefinisikan sebagai suatu bias perubahan yang menurun yang tidak disebabkan oleh regenerasi atau rekombinasi normal dari materi genetik yang tidak berubah. Mutasi dalam gen merupakan faktor penentu timbulnya keanekaragaman genetik. Mutasi gen akan menyebabkan perubahan struktur DNA. Akibat perubahan ini apabila terjadi transkripsi dan translasi, polipeptida yang terbentuk berbeda dengan polipeptida sebelumnya. Inilah salah satu bahan dasar untuk terbentuk protein yang bervariasi. Mutasi gen menyebabkan dihasilkannya protein mutan yaitu spesifikasi protein yang disintesis berlainan dari normalnya. Keberadaan protein mutan di dalam suatu populasi dapat menyebabkan anggota-anggota populasi tersebut diklasifikasikan menjadi dua atau lebih fenotip protein. Fenotip protein tersebut dapat dianggap sebagai ciri fenotip individu. Pola pita yang berbeda-beda menunjukkan variasi fenotip individu dan akan menghasilkan perbedaan distribusi gen pada suatu populasi (Warwick, 1990:120).

Menurut Sofro (1991:12) ditinjau dari segi genetika biokimia, banyaknya molekul protein yang dijumpai dalam darah baik dalam komponen cair maupun komponen padatnya merupakan pengejawantahan ekspresi gen yang ada dalam organisme yang bersangkutan, artinya kelainan yang menyangkut gen sebagai penyimpan dan pelindung sifat keturunan dapat dengan mudah diamati dan dideteksi lewat pemeriksaan dengan menggunakan darah. Gen merupakan unit fisik yang terletak dalam kromosom, yang terutama tersusun atas asam deoksiribonukleat (DNA) dan protein. Sebagai pembawa ciri-ciri yang diwariskan kajian terhadapnya membuktikan bahwa asam nukleat penyusun gen memiliki sifat yang memenuhi syarat tertentu dimana persyaratan ini dipenuhi oleh DNA yang dapat mengalami pembelahan menjadi dua secara persis disamping terbukti memegang peranan penting dalam mengatur aktifitas sel. Melalui berbagai macam percobaan dan pengamatan, disamping sifat stabilnya yang dapat diwariskan tanpa perubahan ternyata molekul DNA juga dapat mengalami perubahan sehingga tidak persis sama dengan ciri induknya, keadaan ini dikenal dengan mutasi.

Mutasi merupakan perubahan di dalam urutan kodon dari DNA dalam suatu genom (Smith, 1998:53) sedangkan menurut Sofro (1994:30) mutasi didefinisikan sebagai suatu bias perubahan yang menurun yang tidak disebabkan oleh regenerasi atau rekombinasi normal dari materi genetik yang tidak berubah. Mutasi dalam gen merupakan faktor penentu timbulnya keanekaragaman genetik. Mutasi gen akan menyebabkan perubahan struktur DNA. Akibat perubahan ini apabila terjadi transkripsi dan translasi, polipeptida yang terbentuk berbeda dengan polipeptida sebelumnya. Inilah salah satu bahan dasar untuk terbentuk protein yang bervariasi. Mutasi gen menyebabkan dihasilkannya protein mutan yaitu spesifikasi protein yang disintesis berlainan dari normalnya. Keberadaan protein mutan di dalam suatu populasi dapat menyebabkan anggota-anggota populasi tersebut diklasifikasikan menjadi dua atau lebih fenotip protein. Fenotip protein tersebut dapat dianggap sebagai ciri fenotip individu. Pola-pola yang berbeda-beda menunjukkan variasi fenotip individu dan akan menghasilkan perbedaan distribusi gen pada suatu populasi (Warwick, 1990:120).

Pengkajian mengenai adanya variasi genetik antara lain dapat dilakukan melalui studi protein dengan cara melihat pada karakteristik genetiknya yaitu melalui kajian panampilan pola polimorfisme protein darah dengan menggunakan metode elektroforesis (Sofro, 1994:34). Studi polimorfisme disebut juga sebagai studi tentang karakteristik dari berbagai protein, berdasarkan pengertian bahwa protein atau enzim merupakan produk langsung gen yang tidak terpengaruh oleh perubahan lingkungan. Struktur berbagai protein yang dibedakan oleh urutan asam amino akan menggambarkan perbedaan urutan basa-basa dalam DNA. Perbedaan basa nitrogen dalam DNA dapat dianggap sebagai sifat biokimia yang paling beralasan untuk membedakan organisme.

Elektroforesis merupakan suatu teknik yang digunakan untuk memisahkan molekul-molekul protein pada suatu media berupa gel dalam medan listrik. Semua protein mempunyai muatan listrik yang ditentukan oleh komposisi asam amino penyusunnya dan pH medium. Mobilitas protein melalui matriks selama elektroforesis dipengaruhi oleh muatan rantai samping. Pada kondisi pH tinggi gugus karboksil akan bermuatan negatif sedangkan pada kondisi pH rendah gugus amino bermuatan positif (Holme *et al.*, 1993:414 ; Ferguson, 1980:35). Metode elektroforesis protein mampu memisahkan polipeptida-polipeptida yang disandikan oleh alela-alela yang berbeda, sehingga dapat mengungkapkan keragaman genetik populasi alami, aliran gen, hibridisasi, batasan spesies dan jarak filogenetik (Murphy *et al.*, 1996 dalam Nasral dan Kasmiruddin, 2000:6).

Berdasarkan matriks gel, metode elektroforesis protein dibagi menjadi empat metode utama, yaitu (1) elektroforesis gel pati (*Starch gel electrophoresis*, SGE), (2) elektroforesis gel akrilamid (*Polyacrilamid gel electrophoresis*, PAGE), (3) elektroforesis gel selulosa asetat (*Cellulose acetat gel electrophoresis*, CAGE), (4) elektroforesis gel agar (*Agarose gel electrophoresis*, AGE) (Chung, 1987:40).

Berdasarkan kondisi pH gel, metode elektroforesis dibagi menjadi dua yaitu elektroforesis protein seperti tersebut diatas dan *isoelectric focusing electrophoresis*. Gel pada *isoelectric focusing electrophoresis* mempunyai gradien pH yang dibuat semakin meningkat sedikit demi sedikit (0,01 unit pH) dari anoda sampai ke katoda. Berbeda dengan elektroforesis protein lain, protein-protein

tertentu di dalam sampel pada isoelectric focusing electrophoresis akan bergerak menuju pH yang sesuai dengan titik isoelektriknya.

Adapun yang dimaksud dengan istilah polimorfisme protein yaitu apabila suatu protein dapat dikategorikan dalam beberapa fenotip protein yang dikontrol oleh dua alel atau lebih pada suatu lokus gen tertentu (Harris, 1994:314). Batas untuk menetapkan suatu lokus tergolong sebagai lokus polimorfik yaitu apabila frekuensi alel paling umum yang ditemukan tidak melebihi 99% atau 0,99 (Harris, 1994:314).

Beberapa protein yang menunjukkan polimorfisme adalah:

1) albumin

Albumin tersusun atas asam amino dengan berat molekul 65.000 dalton (Sofro, 1992:13). Albumin merupakan protein utama dalam plasma darah (kurang lebih 3,4-4,7 g/dL) dan menyusun sekitar 40 % dari albumin terdapat dalam plasma, 60 % lainnya terdapat dalam ruang ekstraseluler. Albumin pada mulanya disintesis sebagai preprotein (Harper *et al.*, 1997:731). Albumin berperan penting untuk mengikat berbagai macam ligant, ligant ini mencakup asam lemak bebas (FFA), kalsium, hormon steroid tertentu, bilirubin dan sebagai triptofan plasma. Disamping itu memainkan peranan penting dalam transportasi obat yang mengandung unsur tembaga (Brown, 1988:379). Menurut Sofro (1992:13), albumin bertanggung jawab sekitar 80 % dari tekanan osmotik koloid dalam pembuluh darah. Penelitian tentang albumin telah banyak dilakukan di antaranya oleh Mulyono dkk. (1995); Irene *et al.* (1985); dan Astuti (1997). Wargasetia (1995), telah meneliti variasi lokus gen pada albumin untuk menentukan kekerabatan pada spesies *Rana chalconota* dan *Rana nicobariensis* hasilnya menunjukkan bahwa kedua spesies tersebut memiliki pola albumin yang sama, dengan demikian *Rana chalconota* dan *Rana nicobariensis* berkerabat cukup dekat. Nasral dan Kasmirudin (2000:20) meneliti keragaman genetik genus *Rana* di propinsi Bengkulu berdasarkan polimorfisme protein, dihasilkan bahwa lokus albumin bersifat polimorfik untuk populasi katak *Rana cancrivora* yang diwakili oleh dua macam alel yaitu Alb^A dan Alb^B. Sedangkan Nasaruddin (1998)

mendapatkan lokus albumin bersifat polimorfik untuk populasi katak *Rana cancrivora* di Jawa Tengah yang diwakili oleh tiga macam alel yaitu A, B dan C.

2) pre-albumin

Pre-albumin (Pa) memiliki berat molekul 54.000 dalton. Protein pre-albumin berperan di dalam pengikatan dan pengangkutan vitamin A serta hormon thyroxine. Hasil analisis elektroforesis memperlihatkan bahwa protein pre-albumin bermigrasi di depan protein albumin dengan membentuk dua pita di depan pita albumin (Mu'in, 1996:375). Polimorfisme lokus pre-albumin pada beberapa hewan telah banyak ditemukan oleh beberapa peneliti. Di antaranya adalah Mu'in (1996) dan Lumatauw (1993). Mu'in (1996:15) telah meneliti adanya polimorfisme lokus Pa pada lima macam ayam lokal Indonesia. Lima fenotip lokus Pa ditemukan pada lima macam ayam lokal Indonesia yang mewakili genotip Pa^{CC} , Pa^{NN} , Pa^{CN} , Pa^{CL} dan Pa^{NL} . Lokus Pa ayam Kampung Legund, ayam Kedu Hitam dan ayam Peranakan Bangkok dikontrol oleh dua alel (Pa^L dan Pa^N) sedangkan lokus Pa ayam Kampung Normal dan ayam Kampung Walik dikontrol oleh tiga alel (Pa^C , Pa^N dan Pa^L). Lokus Pa ini bersifat polimorfik kecuali pada ayam Kampung Legund menunjukkan sifat non polimorfik.

3) transferin

Transferin (Tf) disebut juga siderofilin adalah β -globulin dalam plasma darah dan memiliki berat molekul sekitar 80.000 dalton (Sofro, 1992:145). Protein ini adalah glikoprotein dan disintesis dalam hati, mempunyai peranan sentral dalam metabolisme zat besi tubuh karena unsur protein ini mengangkut zat besi (2 mol Fe^{3+} per mol transferin) dalam sirkulasi ke tempat dimana zat besi diperlukan (Harper *et al.*, 1997:733). Secara elektroforesis fenotip yang umum dijumpai dari transferin manusia adalah TfC 1, TfC 2-1 dan TfC 2 yang tampak sebagai satu pita dalam bentuk homozigot dan dalam bentuk heterozigot dengan salah satu alel jarang, akan tampak pita tambahan (Sofro, 1992:146). Adanya polimorfisme lokus Tf pada beberapa katak telah ditemukan diantaranya pada populasi *Rana cancrivora* Bengkulu Utara dan Bengkulu Selatan. *Rana cancrivora* populasi Bengkulu Utara dikontrol oleh dua macam alel (Tf^A dan Tf^B),

sedangkan *Rana cancrivora* populasi Bengkulu Selatan dikontrol tiga alel (Tf^A , Tf^B dan Tf^C) (Nasral dan Kasmiruddin, 2000:20)

2.3 Heterozigositas

Heterozigositas merupakan ukuran keragaman genetik pada populasi. Aktivitas berkelamin merupakan salah satu faktor yang menentukan keragaman genetik dalam suatu populasi. Berkelamin merupakan aktifitas organisme yang berketurunan secara seksual, dengan cara ini suatu organisme mempertahankan keberadaannya. Ciri-ciri genetis yang ada pada suatu generasi dengan sendirinya akan dapat diamati pula pada generasi keturunannya. Kegagalan individu dalam suatu organisme untuk bereproduksi setelah berkelamin atau kawin menyiratkan ketidakmampuan ciri genetis yang termuat dalam genom organisme tersebut untuk tetap bertahan dalam suatu kondisi yang sedang berlangsung. Jadi pada organisme yang berkembang secara seksual, reproduksi secara seksual bukannya mengurangi keanekaragaman tetapi mempertahankan adanya keanekaragaman. Nei (1987:50) menyatakan salah satu faktor yang mempengaruhi tingkat heterozigositas yaitu ukuran populasi. Suatu populasi lokal yang tertutup dan tidak bermigrasi cenderung mempunyai tingkat heterozigositas genetik yang lebih kecil dibandingkan dengan populasi lokal yang terbuka dan mudah melakukan migrasi. Nasral dan Kasmiruddin (2000:23) dalam penelitiannya yang berjudul "Keragaman Genetik Genus *Rana* (*Ranidae*: *cancrivora*) di Propinsi Bengkulu Berdasarkan Polimorfisme Protein" mendapatkan nilai heterozigositas yang berbeda untuk lokus albumin, pre-albumin transferin dan plasma esterase pada *Rana cancrivora* populasi Bengkulu Utara dan Bengkulu Selatan. Nilai heterozigositas terbesar terdapat pada lokus transferin untuk populasi Bengkulu Selatan yaitu 0,5513 dan Bengkulu Utara pada lokus plasma esterase sebesar 0,4963. Kemudian heterozigositas terbesar kedua terdapat pada lokus plasma esterase untuk populasi Bengkulu Selatan sebesar 0,4950 dan populasi Bengkulu Utara pada lokus transferin sebesar 0,4950.



III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan November 2001 - Januari 2002 dan lokasi pengambilan *R. catesbeiana* di daerah Tangsil Wetan-Bondowoso sedangkan *R. cancrivora* dan *R. limnocharis* di Desa Gambiran Kecamatan Kalisat Kabupaten Jember. Preparasi sampel darah dilakukan di Laboratorium Dasar-F.MIPA UNEJ sedangkan analisis profil protein plasma darah dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler UNEJ.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

3.2.1 Bahan utama :

Tiga spesies katak Genus *Rana* yaitu *R. catesbeiana* (10 ekor), *R. ancrivora* (8 ekor) dan *R. limnocharis* (9 ekor).

3.2.2 Bahan Kimia :

- 1) Untuk proses pengambilan sampel darah : Alkohol 70 % dan EDTA (Etylenen Diamine Tetra Acetic).
- 2) Untuk analisis profil protein darah :
 - Gel : Acrylamide (Sigma, USA), NN'-methylenen-bis-acrylamide (Bio-Rad Laboratories), Tris (Hydroksimethyl)-amino-methane (Merck,Germany), APS atau ammonium persulfate (Bio-Rad Laboratories), SDS atau sodium dodecyl sulphate (BDH Limited Poole, England), glycine (Merck, Germany), TEMED atau N,N,N',N-tetra-methylene diamine' (Bio-Rad Laboratories), glycerine (Merck, Germany), Mercaptoetanol 2-b (Merck, Germany), HCl atau hydrochloric acid (Merck, Germany) dan Aquades.
 - Pewarnaan, pencucian dan penyimpanan gel: bromophenol blue (Merck, Germany), coomassie brilliant blue R-250 (BDH Chemical Ltd, England), poncoeau S, TCA atau trichloro acetic

acid (Merck, Germany), methanol (Merck, Germany), AAG atau acetic acid glaciale (Merck, Germany)

3.3 Alat Penelitian

a. Alat untuk preparasi sampel plasma darah terdiri dari :

Disposable syringe 1 ml (Terumo, Japan), tabung Eppendorf 1,5 ml, mikropipet (Socorex, Swiss), Yellow tip, freezer (Sanyo, SCF 4N), sentrifuse (Sigma 3 K 12).

b. Alat untuk mengamati profil protein terdiri dari :

Disposable syringe 1 ml (Terumo, Japan), tabung Eppendorf 1,5 ml, mikropipet (Socorex, Swiss), Yellow tip, freezer (Sanyo, SCF 4N), sentrifuse (Sigma 3 K 12), timbangan analitik (Sartorius), pH meter (TOA model HSM-10A), magnetic stirrer dan perlengkapannya, botol Duran (Scott, Jerman), shaker (RIKO RS - 12 TE), seperangkat alat elektroforesis sistem vertikal (Mini protean II dual Slab Cell, Bio Craf), Power supply (Bio Craf) dan kamera (NIKON, 10 FM).

3.4 Prosedur Penelitian

Deteksi dan visualisasi protein darah katak dengan polyakrilamide gel elektroforesis (Chung, 1987: 101)

a. Preparasi sampel darah

Darah diambil dari jantung pada masing-masing spesies katak dengan terlebih dahulu membedah pada bagian abdomennya kemudian darah diambil dengan menggunakan disposable syringe steril sebanyak 0,5 ml. Kemudian darah dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang berisi EDTA (kurang lebih 1,5 mg per 1 ml darah). Tabung eppendorf tersebut selanjutnya ditutup dan digoyang perlahan agar darah bercampur dengan EDTA, lalu dimasukkan ke dalam termos es sebelum dilakukan sentrifuse. Contoh darah disentrifuse selama 10 menit pada 4000 rpm untuk memisahkan plasma darah dan sel darah. Plasma darah yang terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C sampai dilakukan elektroforesis. Plasma

darah dan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya masing-masing sebanyak 2 μ l dimasukkan ke dalam tabung eppendorf kemudian ditambahkan buffer sampel yang telah diberi 2- β -mercaptoethanol dan 0,05% (W/V) bromophenol blue dengan perbandingan 1:4, diinkubasikan pada suhu 95°C selama 4 menit. Selanjutnya dibiarkan pada suhu kamar ketika hendak diisikan (loading) ke dalam sumuran (well) gel.

b. Penyiapan gel polyacrilamide untuk elektroforesis

i) Pembuatan gel pemisah (running gel):

Untuk protein plasma darah gel pemisah dibuat dengan kadar akrilamid sebesar 12 %, yaitu dengan mencampurkan 4,0 ml larutan akrilamid-bis (30% T; 2,6% C); 3,35 ml aquabides; 2,50 ml larutan buffer Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 100 μ larutan SDS (10%, w/v); 50 μ l larutan APS (10%) dan 5 μ l TEMED.

ii) Pembuatan gel penggertak (Stacking gel)

Untuk plasma darah dibuat dengan kadar akrilamid-bis sebesar 4,5% yaitu dengan mencampurkan 2 ml larutan akrilamid bis (30 % T; 2,6% C); 1,55 ml aquabides; 1,25 ml larutan buffer tris HCl 0,5 M ph 6,8; 50 μ l larutan SDS (10 %, w/v); 25 μ l larutan APS (10%) dan 5 μ l TEMED.

c. Pelaksanaan Elektroforesis Gel

- i) Rakitan alat untuk pembuatan gel (Mini Protean Bio-Rad) yang terdiri atas dua keping kaca digabung di antara plastik spacer yang diletakkan di sisi kiri dan kanan kemudian dijepit dengan kuat.
- ii) Larutan gel pemisah yang telah dibuat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam rakitan (no.1) sampai 2/3 isi rakitan, dengan menyisakan ruang untuk gel penggertak (kurang lebih 2 cm). Larutan isobutanol ditambah diatas gel dan dibiarkan sampai gel memadat.
- iii) Memasukkan sisir gel di antara dua keping kaca kemudian menuangkan gel penggertak ke dalam ruang di antara dua keping kaca di atas gel pemisah yang telah memadat. Apabila gel penggertak telah memadat maka sisir gel dilepas.

iv) Keping kaca yang telah berisi gel pemisah dan penggertak yang telah memadat dipasang ke holder, selanjutnya dimasukkan ke dalam bejana alat elektroforesis dan diisi buffer elektroda sampai merendam alur gel (well)

d. Pemuatan (Loading)

Plasma darah sebanyak 5 μ l dicampur dengan 20 μ l larutan buffer sampel, dipanaskan pada suhu 95 °C selama 4 menit, selanjutnya sebanyak 5 μ l campuran tersebut diteteskan ke dalam alur gel (well). Protein standart dimasukkan ke dalam alur gel (well) disisi paling kanan, sedangkan plasma darah dimasukkan ke dalam alur gel lainnya.

e. Rakitan elektroforesis yang telah berisi gel dan running buffer dialiri arus listrik 5 A dari power supply dengan tegangan 100 V sampai warna penanda mencapai 1 cm dari dasar gel (kira-kira 1,5 jam).

f. Running dihentikan, gel dikeluarkan dari apitan kaca dan dicuci sampai bersih dengan aquades. Stacking gel dipisahkan dengan skapel kemudian running gel direndam dalam pewarna yang sebelumnya diberi penanda pada salah satu ujungnya.

g. Pewarnaan gel (staining)

Running gel direndam dalam pewarna coomasie blue 0,1% selama 30 menit atau 24 jam dengan diinkubasikan di atas shaker.

h. Pencucian (distaining) dan penyimpanan gel

Setelah diinkubasikan, gel dicuci dengan merendam gel kedalam larutan yang terdiri atas asam asetat 30% dan metanol 10% selama 15 menit atau sampai nampak pita-pita protein pada gel yang berwarna biru. Gel tersebut dikeringkan dengan kertas kaca selanjutnya gel difoto fuji color film HG 200. Pita-pita yang tampak pada gel hasil elektroforesis diamati berdasarkan jumlah dan posisi pita yang terbentuk.

3.5 Analisis Data

Identifikasi hasil elektroforesis : Identifikasi pita protein plasma darah yang tampak pada gel dilakukan dengan menghitung berat molekul berdasarkan mobilitas relatif (Rf-nya) dibandingkan dengan marker yang sudah diketahui berat molekulnya (Chung, 1987: 123). Atas dasar jumlah pita protein yang terbentuk pada lokus albumin, pre-albumin dan transferin, kemudian dihitung frekuensi alel dengan rumus:

$$\frac{2H_o + H_e}{2N}$$

Keterangan :

H_o : nilai homozigositas dari alel

H_e : nilai heterozigositas dari alel

N : jumlah individu (sampel) (Ferguson, 1980:163).

Kemudian batas untuk menetapkan suatu lokus tergolong sebagai lokus polimorfik yaitu apabila frekuensi alel paling umum yang ditemukan tidak melebihi 99 % atau 0,99 (Haris, 1994:342).

Besarnya variasi genetik pada ketiga spesies katak yang diteliti dapat ditentukan berdasarkan salah satu parameter genetik yaitu heterozigositas (HL). Heterozigositas untuk setiap lokus gen spesies dihitung dengan rumus :

$$HL = 1 - \sum x_i^2$$

dimana,

HL : nilai heterozigositas lokus

x_i : frekuensi alel ke-i pada setiap lokus untuk setiap spesies

Sedangkan heterozigositas populasi dari semua lokus yang diuji (r), dihitung dengan rumus :

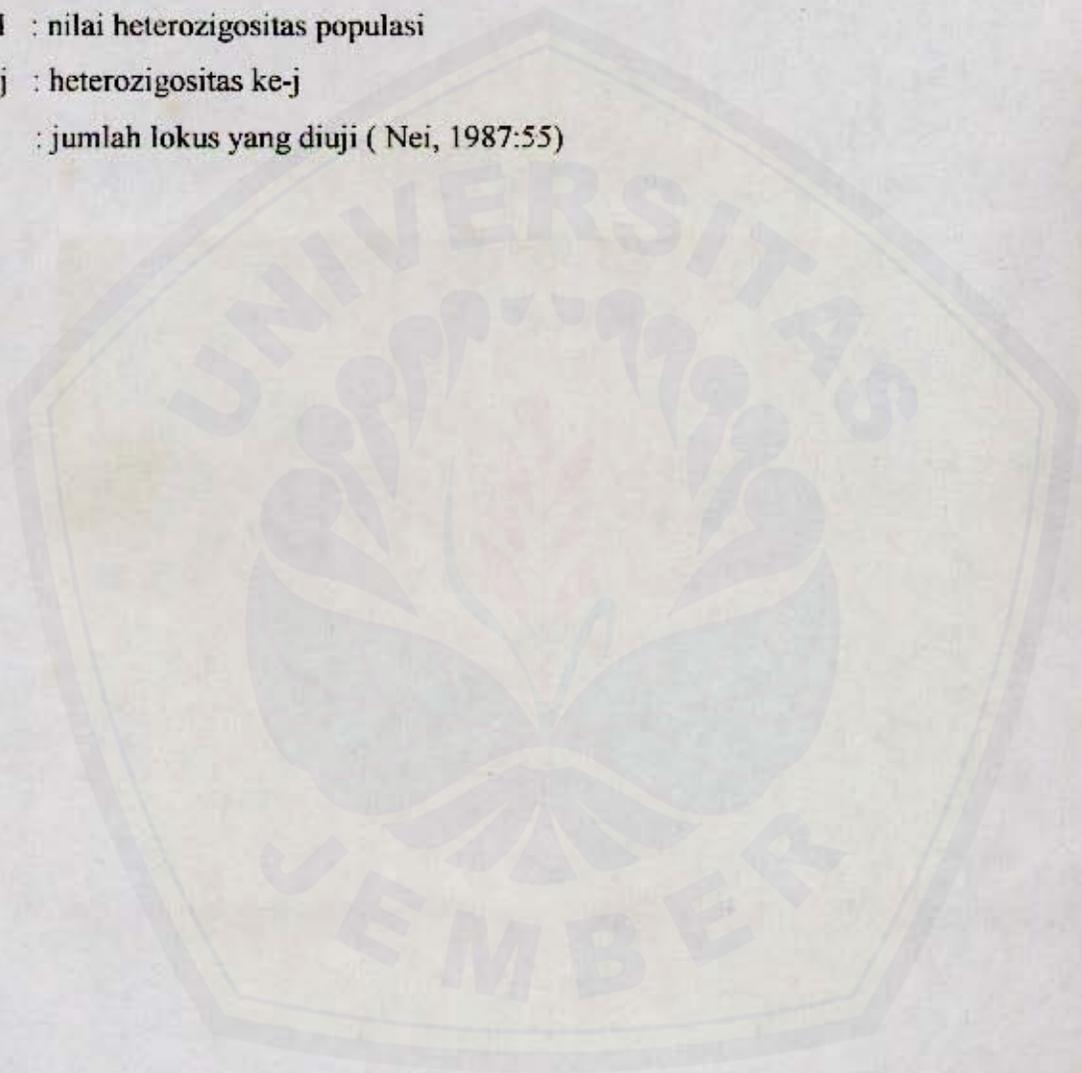
$$H = \sum hj/r$$

Keterangan :

H : nilai heterozigositas populasi

hj : heterozigositas ke-j

r : jumlah lokus yang diuji (Nei, 1987:55)



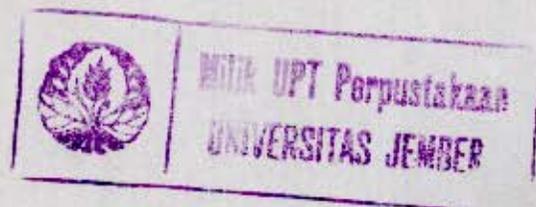
V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- 1) Polimorfisme protein darah ditemukan pada lokus albumin, pre-albumin dan transferin pada ketiga spesies katak yang diteliti. Lokus albumin dikontrol oleh tiga alel (Alb^A , Alb^B dan Alb^C). Sedangkan pre-albumin dan transferin dikontrol oleh dua alel (Pa^A , Pa^B ; Tf^A , Tf^B). Alel Alb^A dan Pa^A merupakan alel yang umum ditemukan pada spesies *R. cancrivora* dan *R. limnocharis* sedangkan Alb^B dan Pa^B merupakan alel yang umum ditemukan hanya pada spesies *R. catesbeiana*. Untuk lokus transferin, alel yang umum ditemukan baik pada spesies *R. cancrivora*, *R. limnocharis* dan *R. catesbeiana* adalah Tf^A .
- 2) Variasi genetik *R. catesbeiana*, *R. cancrivora* dan *R. limnocharis* tercermin pada heterozigositas populasi (H). Rata-rata heterozigositas untuk *R. catesbeiana*, *R. cancrivora* dan *R. limnocharis* masing-masing adalah 55,2 %, 47,6 % dan 42,6%.

5.2 Saran

Penelitian polimorfisme protein plasma darah pada tiga spesies katak ini masih terbatas pada lokus albumin, pre-albumin dan transferin sehingga masih diperlukan penelitian lanjutan untuk melihat polimorfisme pada lokus lainnya seperti haemoglobin atau pada isoenzim bahkan sampai pada aras DNA. Juga masih diperlukan penelitian mengenai jarak fenotip dan hubungan kekerabatan dari ketiga species katak yang diteliti.



DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B. Dennis, B. J. Lewis, Martin, R dan James, D.W. 1994. *Biologi Molekuler Sel*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Arie, U. 1998. *Pembibitan dan Pembesaran Bulfrog*. Sukabumi: P.T. Penebar Swadaya.
- Astuti, M. 1997. "Estimasi Jarak Genetik Antar Populasi Kambing Kacang, Kambing Peranakan Etawah dan Kambing Lokal berdasarkan Polimorfisme Protein Darah." Dalam *Buletin Peternakan*. (April, XXI). No. 1. Yogyakarta: Fakultas Peternakan UGM. p. 1-10.
- Berry, P.Y. 1975. *The Amphibian Fauna Of Peneinsular Malaysia*. Kuala Lumpur: Tropical Press.
- Brown, W.H. 1988. *Introduction To Organik And Biochemistry*. Monterey, California: Brooks/Cole Publishing Company.
- Chung, M.C.M. 1987. *Poliacrylamide Gel Elektroforesis*. Paris, France: ICSU Press.
- Copeland, R.A. 1993. *Methods For Protein Analysis*. New York: International Thomson Publishing.
- Duellam, W.E. dan Linda T. 1930. *Biologi Of Amhibians*. New York, Sanfrancisco: Mc Graw-Hill book Company.
- Ferguson, A. 1980. *Biochemical Systematies and Evolution*. Glasgow: Blackie and Son Limited.
- Hardjasasmita, S.H. 1980. *Kunci dan Daftar Amfibi di Jawa*. Yogyakarta: Gadjah Mada Universitas.
- Harper. Robert, K..M. Darylk, G. Peter, A..M. 1997. *Biokimia*. Edisi Ke 24. Jakarta: Penerbir Buku Kedokteran.
- Harris, H. 1994. *Dasar-dasar Genetika Biokimia Manusia*. Edisi ke-3. Yogyakarta: Gadjah Mada Universitas Press.
- Holme, D.J dan H.Deck. *Analytical Bio Chemistry*. Second Edition. 1993. Logman Singapore Publisher Ltd. Singapore.
- Irene, S. Wuwuh. Sutopo dan B.Sutiyono. 1995. "Blood Protein Polymorphisme on Javanese Fat Tailed Sheep And Javanese Thin Tailed Sheep." Dalam *Buletin Of Animal Science*. (Special Edition). Semarang: Faculty Of Animal Husbandry Diponegoro University.

- Iskandar, O.T. 1998. *Amfibi Jawa dan Bali*. Bandung: Puslitbang Biologi-LIPI.
- Liem, D.S.S. 1973. "The Frogs And Toads Of Tj bodas National Park mT. Gede, Java Indonesia". Dalam *The Philippine Journal Of Science*. (June, C). No 2. Manila, Philipine: The National Institute Of Science And Technology. P. 131-161.
- Mardiani, M.D. 1982. *Perbandingan Kariotipe Rana cancrivora, Rana limnocharis dan Rana chalconota*. Bandung: Tesis Sarjana Biologi-Jurusan Biologi F MIPA ITB.
- Masyud, B. 1992. "Identifikasi Sifat Genetik Satwa Dilindungi: Sisi Penting Kegiatan Konservasi Keanekaragaman Hayati." Dalam *Media Konservasi*. (April, 1V). No.2. Bogor: LIPI.P41-46.
- Mu'in, M.A., Maria A. dan Dinar T.S. 1996. "Hubungan Filigenetik Lima Macam Ayam Lokal Indonesia." Dalam *Penelitian Pasca Sarjana UGM*. (Agustus, IX) No.3A. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Mulyono, R.H., C. Sumantri, A.Sulaiman dan P.H. Hutabarat. 1997. "Pencirian Genetis Itik Alabio, Itik Tegal, Itik Mandalung dan Itik Manila dengan Teknik Elektroforesis." Dalam *Buletin Peternakan*. (April, X). No.2. Bogor: Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Ternak, FAPET IPB.P.448-456.
- Nasaruddin. 1998. *Morfologi dan Variasi Genetik Katak Sawah (Rana cancrivora) di Beberapa Wilayah Jawa Tengah: Tesis Program Pascasarjana IPB*.
- Nasral dan Kasniruddin. 2000. "Keragaman Genetik Genus Rana (*Ranidae*: amphibia) di Propinsi Bengkulu Berdasarkan Polimorfisme Protein." Dalam *Laporan Penelitian*. Bogor: LIPI.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia Press.
- Ouw, L.I. 1986. *Pembandingan Kariotipe Rana nicobariensis dan Rana chalconota*. Bandung. Tesis Sarjana Biologi Jurusan Biologi F MIPA ITB.
- Salender, R.K. 1978. *Genetics Variations in Natural Population, in Molecular Evolution*. J. F Ayala (ed). Sunderland: Sinauer Associates Inc.
- Smith, J.M. 1998. *Evolutionary Genetic*. Oxford University
- Sofro, A.S.M. 1992. *Petunjuk Laboratorium Genetika Biokimia Darah* Yogyakarta: PAU Biotecnologi UGM
- , 1994. *Keanekaragaman Genetik*. Yogyakarta: Penerbit Andi Offset.

- Sofro, A.S.M. 1992. *Petunjuk Laboratorium Genetika Biokimia Darah*. Yogyakarta: PAU Biotecnologi UGM
- , 1994. *Keanekaragaman Genetik*. Yogyakarta: Penerbit Andi Offset
- Susanto, H. 1998. *Budidaya Kodok Unggul*. Sukabumi: P.T Penebar Swadaya.
- Suryabroto, B.T.S. Prawasti, A. Farajallah, R.R.D. Perwitasari, T. Atmowidi. R. Raffludin. 1995. *Struktur Genetik dan Diferensiasi mtDNA Populasi Monyet Ekor Panjang (Macaca fascicularis) di Jawa Barat*. Laporan Hibah Bersaing 1/4 Perguruan Tinggi. Bogor: Jurusan Biologi FMIPA-IPB.
- Suryo. 1984. *Genetika*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Van Kampen, P.N. 1923. *The Amphibia Of The Indo-Australian Archipelago*. Leiden: University Leiden Press.
- Wargasetia, T.L. 1995. Pengamatan Variasi Pada Lokus Gen Albumin untuk Penentu Kekerabatan pada Beberapa Spesies Katak. Bandung: Tesis Sarjana Biologi-Jurusan Biologi F MIPA ITB.
- Warwick, E.S. Maria, J. Wartomo, H. 1990. *Pemuliaan Ternak*. Yogyakarta: UGM Press.

MATRIK PENELITIAN

JUDUL	RUMUSAN MASALAH	VARIABEL	PARAMETER	METODE PENELITIAN
Polimorfisme Protein Plasma Darah pada <i>Rana cancrivora</i> , <i>Rana catesbeiana</i> dan <i>Rana limnocharis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adakah polimorfisme protein plasma darah pada lokus albumin (Alb), pre albumin (Pa) dan transferin (Tf) dari <i>Rana cancrivora</i>, <i>Rana catesbeiana</i> dan <i>Rana limnocharis</i> ? - Adakah variasi genetik pada <i>Rana cancrivora</i>, <i>Rana catesbeiana</i> dan <i>Rana limnocharis</i> berdasarkan frekuensi heterozigositas setiap lokus gen species dan frekuensi heterozigositas populasi ? 	<ul style="list-style-type: none"> - Variabel bebas : polimorfisme protein plasma darah - Variabel terikat : tiga spesies katak yaitu : <i>Rana cancrivora</i>, <i>Rana catesbeiana</i> dan <i>Rana limnocharis</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Polimorfisme protein plasma darah pada : albumin (Alb), pre lbumin (Pa) dan transferin (Tf). 	<ul style="list-style-type: none"> - Lokasi Pengambilan dari tiga spesies katak dilakukan di Tangsil Wetan Bondowoso dan Desa Gambiran Kalisat. - Preparasi sampel dan analisis profil protein dilakukan di laboratorium Dasar Fakultas MIPA dan Lab. Biologi Molekuler-Universitas Jember. - Penentuan Polimorfisme protein darah dengan teknik elektroforesis gel - Analisis data : <ul style="list-style-type: none"> - Identifikasi hasil elektroforesis : menghitung BM berdasarkan Rf dibandingkan dengan marker. - Menghitung frekuensi alel dengan prinsip Hukum Keseimbangan Hardy-Weinberg dengan rumus : $\frac{2H_o + H_e}{2N}$ - Menghitung heterozigositas untuk setiap lokus gen yang diamati : $HL = 1 - \sum X_i^2$ - Menghitung heterozigositas populasi : $H = \sum h_i/r$



Lampiran 2

Hasil perhitungan frekuensi genotip; frekuensi alel dan heterozigositas pada lokus albumin, pre-albumin dan transferin dari *R. cancrivora*, *R. limnocharis* dan *R. catesbeiana*.

R. cancrivora

1. Albumin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8
Genotip	AB	AB	AC	AB	AC	AB	AA	AC

Frekuensi genotip

$$AB = 4/8 = 0,5$$

$$AC = 3/8 = 0,375$$

$$AA = 1/8 = 0,125$$

Frekuensi alel

$$\frac{2H_o + H_e}{2N}$$

$$A = \frac{2 \times 1 + 7}{16}$$

$$= 0,5625$$

$$B = 4/16$$

$$= 0,25$$

$$C = 3/16$$

$$= 0,1875$$

Heterozigositas

$$\begin{aligned} HL &= 1 - (0,5625^2 + 0,25^2 + 0,1875^2) \\ &= 1 - (0,3164 + 0,0625 + 0,0351) \\ &= 0,586 \end{aligned}$$

2. Pre- albumin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8
Genotip	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AA	AA

Frekuensi genotip

$$AB = 6/8$$

$$= 0,75$$

$$AA = 2/8$$

$$= 0,25$$

$$HL = 1 - (0,625^2 + 0,375^2)$$

$$= 1 - (0,391 + 0,141)$$

$$= 0,468$$

frekuensi alel

$$A = 10/16$$

$$= 0,625$$

$$B = 6/16$$

$$= 0,375$$

3. Transferin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8
Genotip	AA	AB	AB	AA	AB	AA	AA	AB

Frekuensi genotip

$$AA = 4/8$$

$$= 0,5$$

$$AB = 4/8$$

$$= 0,5$$

$$HL = 1 - (0,75^2 + 0,25^2)$$

$$= 1 - (0,5625 + 0,0625)$$

$$= 0,375$$

frekuensi alel

$$A = 12/16$$

$$= 0,75$$

$$B = 4/16$$

$$= 0,25$$

R. limnocharis

1. Albumin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Genotip	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AA	AB	AB

Frekuensi genotip

$$AB = 8/9$$

$$= 0,89$$

$$AA = 1/9$$

$$= 0,11$$

$$HL = 1 - (0,56^2 + 0,44^2)$$

$$= 1 - (0,3136 + 0,1936)$$

$$= 0,4928$$

frekuensi alel

$$A = 10/18$$

$$= 0,56$$

$$B = 8/18$$

$$= 0,44$$

2 Pre - albumin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Genotip	BB	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA

Frekuensi genotip

$$AA = 6/9$$

$$= 0,67$$

$$BB = 3/9$$

$$= 0,33$$

$$HL = 1 - (0,67^2 + 0,33^2)$$

$$= 1 - (0,4489 + 0,1089)$$

$$= 0,442$$

frekuensi alel

$$A = 12/18$$

$$= 0,67$$

$$B = 6/18$$

$$= 0,33$$

3. transferin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Genotip	AB	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AB	AA

Frekuensi genotip

$$AA = 5/9$$

$$= 0,56$$

$$B = 4/9$$

$$= 0,44$$

$$HL = 1 - (0,78^2 + 0,22^2)$$

$$= 1 - (0,6084 + 0,0484)$$

$$= 0,3432$$

frekuensi alel

$$A = 14/18$$

$$= 0,78$$

$$B = 4/18$$

$$= 0,22$$

R. catesbeiana

1. Albumin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Genotip	AB	AB	AB	AB	AB	BB	BB	AB	AB	AB

Frekuensi genotip

$$AB = 8/10$$

$$= 0,8$$

$$BB = 2/10$$

$$= 0,2$$

$$HL = 1 - (0,4^2 + 0,6^2)$$

$$= 1 - (0,16 + 0,36)$$

$$= 0,78$$

frekuensi alel

$$A = 8/20$$

$$= 0,4$$

$$B = 12/20$$

$$= 0,6$$

2. Pre - Albumin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Genotip	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	BB	BB	BB

Frekuensi genotip

$$AA = 3/10$$

$$= 0,3$$

$$BB = 7/10$$

$$= 0,7$$

$$HL = 1 - (0,3^2 + 0,7^2)$$

$$= 1 - (0,09 + 0,49)$$

$$= 0,42$$

frekuensi alel

$$A = 6/20$$

$$= 0,3$$

$$B = 14/20$$

$$= 0,7$$

3. transferin

Individu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Genotip	AB	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AB	AB	AB

Frekuensi genotip

$$AB = 7/10$$

$$= 0,7$$

$$AA = 3/10$$

$$= 0,3$$

$$HL = 1 - (0,65^2 + 0,35^2)$$

$$= 1 - (0,4225 + 0,1225)$$

$$= 0,455$$

frekuensi alel

$$A = 13/20$$

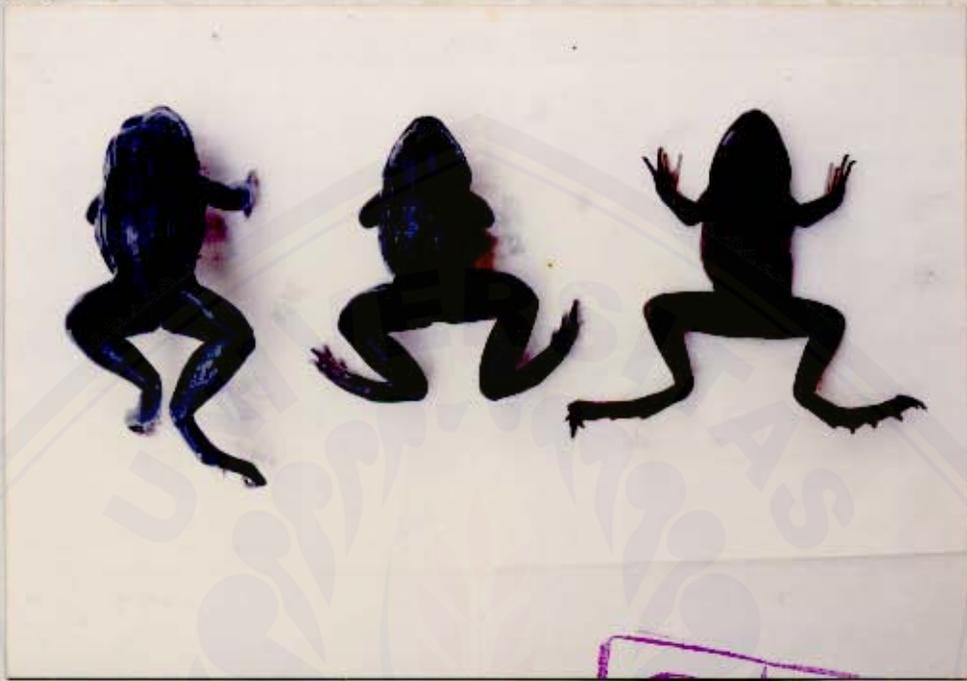
$$= 0,65$$

$$B = 7/20$$

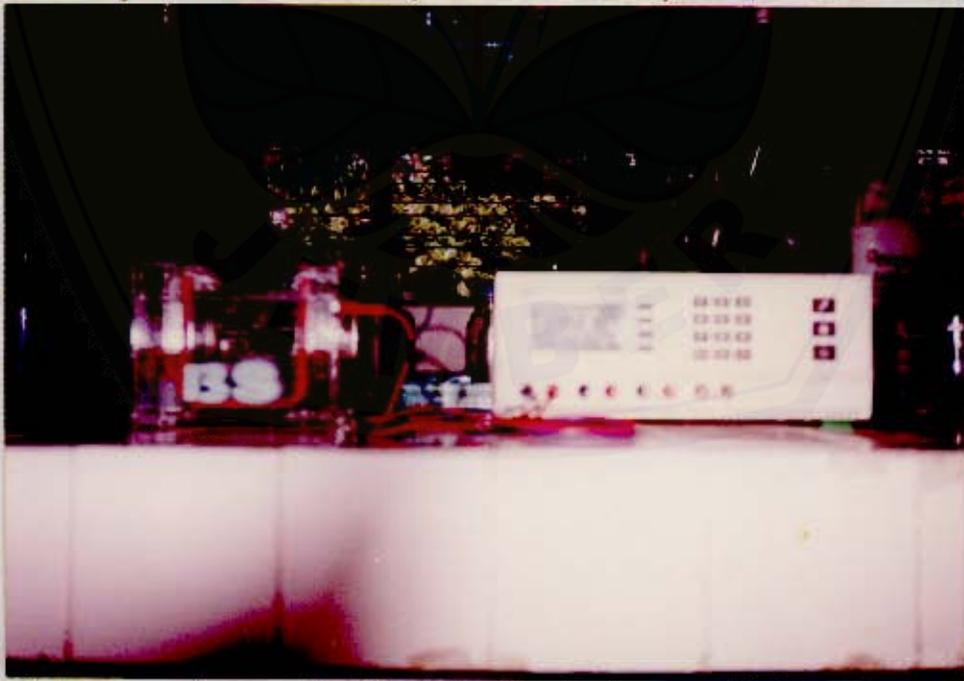
$$= 0,35$$

Lampiran 3

Foto ketiga species katak yang diteliti dan seperangkat alat elektroforesis sistem vertikal.



Keterangan : A. *R. cancrivora* ; B. *R. limnocharis* ; C. *R. batesbeiana*



Keterangan : Seperangkat alat elektroforesis sistem vertikal.

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

LEMBAR KONSULTASI PENYUSUNAN SKRIPSI

Nama : Yuli Kustantin
NIM/Angkatan : 98-3208
Jurusan/Program Studi : P.MIPA/P.Biologi
Judul Skripsi : Polimorfisme Protein Plasma Darah pada *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis*
Pembimbing I : Drs. Suratno, Msi

KEGIATAN KONSULTASI

No	Hari/Tanggal	Materi Konsultasi	T.T Pembimbing
1	28 Agustus 2001	Bab I, II, III	Rat
2	15 September 2001	Bab I, II, III	Rat
3	28 Oktober 2001	Bab I, III	Rat
4	15 Januari 2002	Bab III, IV	Rat
5	28 Maret 2002	Bab IV	Rat
6	10 Mei 2002	Bab III, IV	Rat
7	10 Juli 2002	Bab IV, V	Rat
8	20 Nopember 2002	Bab IV, V	Rat
9	5 Desember 2002	Bab V	Rat
10			
11			
12			
13			

Catatan : 1. Lembar ini harus dibawa dan diisi setiap melakukan konsultasi.

2. Lembar ini harus dibawa sewaktu Seminar Proposal Skripsi dan Ujian Skripsi.

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

LEMBAR KONSULTASI PENYUSUNAN SKRIPSI

Nama : Yuli Kustantin
NIM/Angkatan : 98-3208
Jurusan/Program Studi : P. MIPA / P. Biologi
Judul Skripsi : Polimorfisme Protein Plasma Darah pada *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis*.
Pembimbing II : Dra. Rike Oktarianti, Msi

KEGIATAN KONSULTASI

NO	Hari/Tanggal	Materi Konsultasi	T.T Pembimbing
1	28 Agustus 2001	Bab I, II, III	
2	15 September 2001	Bab I, II, III	
3	28 Oktober 2001	Bab I, III	
4	25 Maret 2002	Bab III, IV	
5	10 Mei 2002	Bab III, IV	
6	12 Juli 2002	Bab IV, V	
7	22 Nopember 2002	Bab IV, V	
8	* Desember 2002	Bab V	
9			
10			
11			
12			
13			

- Catatan : 1. Lembar ini harus dibawa dan diisi setiap melakukan konsultasi.
2. Lembar ini harus dibawa sewaktu Seminar Proposal Skripsi dan Ujian Skripsi.

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JEMBER
LABORATORIUM BIOLOGI MOLEKULER

No :
Lampiran :
Perihal : kegiatan penelitian

Dengan hormat

Ketua Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember menerangkan bahwa mahasiswi tersebut dibawah ini :

Nama : Yuli Kustantin
Nim : 98-3208
Jurusan / Program : P. MIPA / P. Biologi

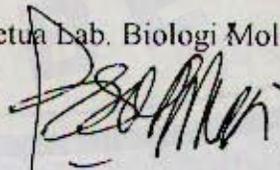
telah melaksanakan penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember dengan judul :

“Polimorfisme Protein Plasma Darah pada *Rana catesbeiana*, *Rana cancrivora* dan *Rana limnocharis* (Genus *Rana*)”.

Demikian surat ini kami buat atas kerjasamanya kami ucapkan terimakasih.

Jember, 28 Januari 2002

Ketua Lab. Biologi Molekuler



Dr. Bambang Sugiarto, M. Agr. Sc
NIP/ 131 131 021



Milik UPT Perpustakaan
UNIVERSITAS JEMBER