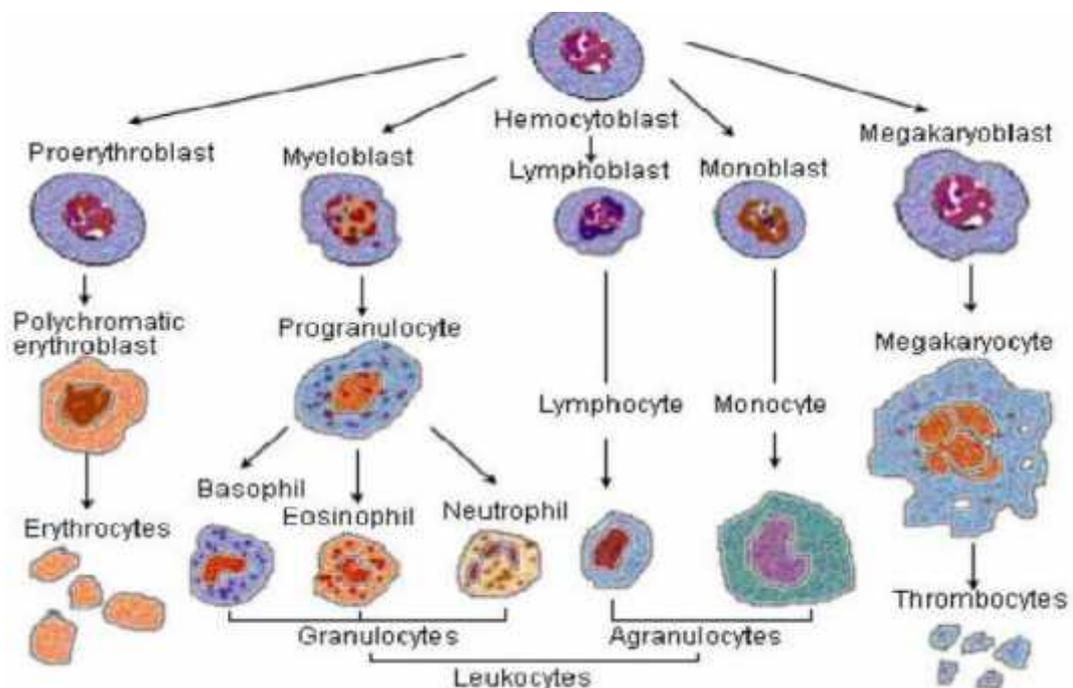


II. TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Darah

Darah disusun oleh dua komponen utama yaitu komponen cairan atau plasma dan komponen seluler. Sel darah terdiri atas eritrosit, trombosit dan leukosit (Gambar 2.1). Komponen seluler ini meliputi bagian yang besarnya 30 sampai 45% dari volume darah keseluruhan (Tilman *et. al* 1982). Frandson (1981) menyatakan volume plasma darah mencapai 55% dari bagian darah, sedangkan Anggorodi (1984) dan Currie (1988) menyatakan volume plasma darah mencapai 55 sampai 70% dari bagian darah keseluruhan.



Gambar 2.1 : Sel darah

Plasma darah tersusun atas 92% air dan 8% substansi lain. Substansi ini terdiri dari 90% protein, 0,8% material organik non protein dan sisanya material anorganik. Protein plasma darah terdiri atas dua tipe yaitu albumin dan globulin (Frandsen, 1981). Menurut Freeman dan Bell (1983) jumlah eritrosit atau sel darah merah pada ayam jantan adalah sebesar 320 juta sampai 380 juta permililiter darah, sedangkan untuk ayam betina sebesar 300 juta permililiter darah. Freeman dan Bell (1971) menyatakan rentang hidup eritrosit pada ayam

adalah 28 sampai 30 hari. Jumlah eritrosit di dalam tubuh akan dipertahankan dalam jumlah yang tetap. Keadaan ini dapat tercapai karena adanya produksi eritrosit harian yang sebanding dengan eritrosit yang mati setiap harinya (Schalm dan Carol, 1975). Sel darah merah lebih berat dari sel darah putih, dan kedua jenis sel itu lebih berat dibandingkan plasma (Wardhani, 2008).

Sel darah putih sangat berbeda dengan sel darah merah. Sel darah putih memiliki bentuk yang khas terdiri dari nukleus, sitoplasma, organel dan bersifat mampu bergerak pada keadaan tertentu. Sedangkan sel darah merah tidak berinti, berbentuk cawan bikonkaf dan bersifat pasif (Dellman dan Brown, 1989). Dua bentuk leukosit yang berbeda yaitu, granulosit yang memiliki butir khas dan jelas dalam sitoplasma dan agranulosit yang tidak memiliki butir khas dalam sitoplasma. Termasuk dalam bentuk granulosit diantaranya neutrofil, eosinofil, dan basofil. Sebaliknya yang termasuk agranulosit diantaranya monosit dan limfosit (Frandsen, 1992).

1.2. Preparasi Sampel Darah dengan EDTA dan Alkohol

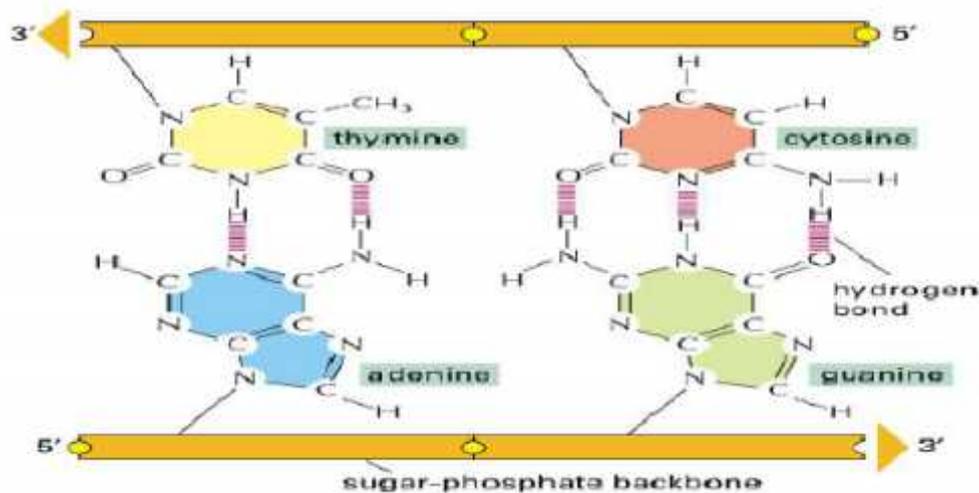
EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetate*) merupakan suatu bahan yang digunakan untuk mencegah penggumpalan darah dimana prinsip kerjanya adalah mengubah ion kalsium menjadi garam yang bukan ion (Gandasoebrata, 1989). Suparitriono (2003) menyatakan EDTA mempunyai titik tangkap kerja yang sama yaitu mengikat ion kalsium, dimana EDTA juga dipakai dalam pemeriksaan hematologi rutin karena tidak mempengaruhi morfologi sel. Fungsi EDTA adalah sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium (Muladno, 2002).

Alkohol adalah senyawa hidrokarbon berupa gugus hidroksil (-OH). Jenis alkohol yang banyak digunakan adalah $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (methanol), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (etanol) dan $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ (isopropanol). Dalam dunia perdagangan yang disebut alkohol adalah etanol (Prihandana, 2008). Alkohol mempunyai titik didih $78,4^\circ\text{C}$. Alkohol memiliki sifat tidak berwarna, volatil dan dapat bercampur dengan air (Kartika dkk, 1997). Darah akan beku bila tercampur dengan alkohol (Seutin *et al.*, 1991). Alkohol memiliki sifat merusak membran plasma, mendenaturasi protein dan terjadinya perubahan profil suhu pertumbuhan (Galeote dan Ansanay, 2001).

1.3. Ekstraksi DNA

DNA tersusun oleh tiga komponen, yaitu molekul gula pentosa (deoxyribosa), gugus posfat dan basa nitrogen. Gula pentosa dan gugus posfat bersifat identik sedangkan basa nitrogen mempunyai susunan dan bentuk yang berbeda antara satu nukleotida dengan nukleotida lain. Terdapat empat macam basa nitrogen yaitu *adenin*, *guanin*, *thymin* dan *cytosine* (Muladno, 2002).

Berdasarkan bentuk molekulnya basa nitrogen dikelompokkan menjadi dua, yaitu *purin* dan *pyrimidin*. Basa purin terdiri atas basa *Adenin* (A) dan *Guanin* (G), sedangkan basa *pyrimidin* terdiri atas basa *Cytosin* (C), *Uracyl* (U) dan *Thymine*(T). Antara *Adenine* (A) dengan *Thymine* (T) terdapat dua ikatan hidrogen, sedangkan antara *Guanine* (G) dan *Cytosine* (C) terdapat tiga ikatan hydrogen (Gambar 2.2) sehingga ikatan G-C lebih kuat dibandingkan dengan ikatan A-T (Muladno, 2002).



Gambar 2.2 Perbedaan struktur molekul lima basa nitrogen

DNA terdapat di dalam sel organisme, oleh karena itu seluruh bagian tubuh maupun organ organisme dapat dijadikan sebagai sumber untuk mendapatkan dan mengisolasi DNA. Ekstraksi DNA pada organisme eukariot (manusia, hewan dan tumbuhan) dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel, penghilangan protein dan RNA, pengendapan DNA (presipitasi DNA) dan pemanenan. Ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Hasil ekstraksi tersebut merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya (Sulandari dan Zein, 2003).

Phenol-Choroform-Isoamyl alkohol (PCI) merupakan senyawa kimia yang digunakan untuk mengekstraksi DNA yaitu untuk memisahkan protein dari asam nukleat. Metode ini menguntungkan karena dapat menghilangkan protein secara efisien. Penggunaan dua macam larutan yaitu phenol dan chloroform lebih efektif dalam mengendapkan protein dan menghambat aktifitas *RNAase* dibandingkan dengan menggunakan satu larutan (Sambrook *et al.*, 1989). Keunggulan lainnya yaitu tidak membutuhkan waktu yang lama untuk pemurnian DNA. Penambahan *Phenol-Choroform-Isoamyl Alkohol* (PCI) diharapkan akan menghasilkan DNA yang murni dan tidak terkontaminasi oleh protein dan akan dihasilkan rasio *Optical Density* (OD) 260/280 antara 1,8-2,0. Hasil DNA terbaik dapat diperoleh dengan melakukan pencucian dua kali menggunakan *Phenol-Choroform-Isoamyl Alkohol* (PCI) (Khosravinia *et al.*, 2007).

1.4. Visualisasi DNA pada Gel Elektrofesis

Elektrofesis adalah suatu teknik pemisahan molekul selular berdasarkan atas ukurannya. Elektrofesis menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini dapat digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik yang ada pada makromolekul, misalnya DNA (Triwibowo, 2008). Menurut Winarno dan Agustinah (2007) molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bergerak ke arah positif. DNA bergerak melalui gel pada kecepatan yang berbeda tergantung ukurannya.

Jenis elektrofesis yang paling populer digunakan adalah elektrofesis gel agarosa dan elektrofesis gel akrilamida. Agarosa mudah dipakai untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa sedangkan poliakrilamida digunakan untuk fragmen-fragmen DNA yang lebih kecil (Old dan Primrose, 1989) (Tabel 2.1). Agarosa adalah gel tiruan, berupa polisakarida yang merupakan hasil ekstraksi rumput laut dan bersifat *edible*. Gel agarosa dibuat dengan cara mensuspensikan agarosa dalam larutan penyangga, lalu dipanaskan sampai mendidih kemudian dituangkan pada cetakan (Soffer, 1991).

Tabel 2.1. Karakteristik Pemisahan Gel Agarosa dan Poliakrilamid

No	Tipe Gel	Kisaran Pemisahan (bp)
1	0.3% agarosa	50.000-1.000
2	0.7% agarosa	20.000-300
3	1.4% agarosa	6.000-300
4	4.0% akrilamida	1.000-100
5	10.0% akrilamida	500-25
6	20.0% akrilamida	50-1

Sumber : Nicholl (1996)

Fragmen DNA dalam gel dapat divisualisasikan dengan cara melakukan pewarnaan (*staining*) atau memberikan label radioaktif pada DNA. Pewarnaan yang biasa digunakan adalah dengan perendaman gel dalam etidium bromide. Etidium bromida berikatan dengan DNA dan berflourosen ketika terekspos sinar ultraviolet (Becker *et al.*,2006). Gel yang disinari ultraviolet dari bawah akan menampilkan pita-pita molekul DNA (Triwibowo, 2008). Ukuran fragmen DNA hasil elektroforesis dapat diketahui dengan menggunakan penanda ukuran (*marker*) yang salah satunya didapat dari DNA yang telah dipotong oleh *enzim restriksi* (Dawson *et al.* , 1996).

1.5. Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Konsentrasi DNA diukur secara spektrofotometri menggunakan *Gene Quant DNA Calculator*. Dasar teknik ini adalah DNA dapat menyerap sinar ultraviolet dengan kuat pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan panjang gelombang 280 nm merupakan daerah serapan protein. Panjang gelombang dengan nilai serapan 1,0 ($A_{260}=1,0$) setara dengan 50 µg DNA utas ganda per mililiter larutan. Oleh karena itu, konsentrasi DNA (µg/ml) diperoleh dari perkalian antara faktor pengencer, faktor konversi (50 µg/ml) dan absorbansi (A_{260}) (Muladno, 2002).

Kemurnian DNA dapat ditentukan menggunakan perbandingan optik nilai densitas larutan pada berbagai macam gelombang dengan menggunakan spektrofotometer. Rasio nilai absorbansi OD 260/280 menunjukkan tingkat

kontaminan terhadap protein dan rasio OD 260/230 menunjukkan tingkat kontaminan terhadap polisakarida (Azizah, 2009). Tingkat kemurnian DNA dikatakan baik jika nilai rasio OD 260/280 yang diperoleh adalah antara 1.8-2.0 (Sambrook *et al.*, 1989) dan rasio OD 260/230 adalah 2.0-2.2 (Wiliam, 1997). Nicholl (1996) menyatakan rasio OD 260/280 nm 1.8 mengindikasikan DNA murni, sedangkan rasio OD 260 nm dan 280 nm kurang dari 1.8 kemungkinan disebabkan DNA terkontaminasi protein atau phenol. Sambrook (1989) menyatakan rasio OD 260/230 kurang dari 2.0 mengindikasikan DNA terkontaminasi oleh polisakarida dan fenol. Menurut Montgomery and Sise (1990) apabila rasio OD 260 nm dan 280 nm berada di antara 1.8-2.0 menunjukkan bahwa proses deproteinasi pada metode tersebut baik.

Muladno (2002) menyarankan apabila jumlah DNA yang dihasilkan terlalu sedikit sehingga konsentrasinya tidak dapat diukur dengan alat spektrofotometer atau DNA yang diperoleh tidak terlalu murni, konsentrasi DNA dapat diestimasi dengan melihat intensitas fluorescen yang dipancarkan oleh Etidium Bromide. Intensitas DNA standar yang telah diketahui jumlahnya dibandingkan dengan intensitas DNA sampel, dengan asumsi jenis DNA standar harus sama dengan DNA sampel.