

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Batasan Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Sedangkan sampel adalah tikus putih jantan galur Wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk dilakukan penelitian. Pemilihan tikus sebagai hewan coba dikarenakan tikus dapat mensimulasikan kondisi aterosklerosis, mudah ditangani, dan harga terjangkau (Kusumawati, 2004).

4.2.2 Kriteria Sampel

Berikut adalah kriteria inklusi dan eksklusi tikus yang digunakan pada penelitian ini:

Kriteria Inklusi:

- a) Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan, karena tidak ada pengaruh hormonal seperti pada tikus betina.
- b) Usia 6-8 minggu.
- c) Berat badan \pm 120-160 gram.

d) Sehat, yang ditandai dengan bergerak aktif.

Kriteria Eksklusi:

a) Memiliki kelainan anatomi (cacat fisik).

4.2.3 Besaran Sampel

Dalam penelitian ini, digunakan tujuh kelompok penelitian yang terdiri dari dua kelompok kontrol dan lima kelompok perlakuan. Estimasi jumlah sampel untuk masing-masing kelompok dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1955):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3,5$$

Keterangan :

t : jumlah perlakuan

r : jumlah replikasi atau ulangan

Dari hasil perhitungan, diperlukan jumlah replikasi atau ulangan paling sedikit adalah 4 kali (pembulatan dari 3,5) untuk masing-masing kelompok, sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini secara keseluruhan adalah sejumlah 28 ekor tikus.

4.2.4 Prosedur Pengambilan Sampel

Prosedur pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *simple random sampling* menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK), dimana sampel dibagi ke dalam beberapa kelompok secara acak sesuai dan setiap hewan coba memiliki kesempatan yang sama untuk masuk dalam suatu kelompok. Metode yang digunakan adalah sistem *lotree*, sebanyak 2 kali. *Lotree* pertama menentukan kelompok yang akan diambil terlebih dahulu, sedangkan *lotree* ke dua untuk mengelompokkan tikus.

Dalam menentukan perlakuan mana yang akan diambil terlebih dahulu maka digunakan *lotree* dengan 7 macam kertas, yakni K_n , K_p , P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_4 , di mana kertas yang keluar lebih dulu adalah kelompok yang lebih dulu ditentukan anggotanya. Selanjutnya untuk menentukan pengelompokan hewan coba, masing-masing hewan coba diberi nomor 1 - 28 dan dilakukan *lotree* untuk menentukan kelompok dari masing-masing hewan coba dengan melakukan pengambilan nomor *lotree* 4 kali untuk 1 kelompok penelitian. Kertas atau nomor *lotree* yang sudah diambil tidak boleh dimasukkan kembali.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah protein LOX-1 dosis 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 μ g yang ditambahkan dengan ajuvan alum 100 μ L.

Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivasi NF-kB pada jaringan aorta tikus.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

1. Perawatan, perlakuan dan pembedahan hewan coba dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Preparasi protein LOX-1 dan pengecetan preparat immunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Pembuatan preparat immunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr Soetomo, Surabaya.
4. Penghitungan aktivasi NF-kB dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 70 hari, yaitu dimulai dari Februari 2014 hingga Juni 2014.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

1. Bahan untuk perawatan hewan coba: sekam, air minum, pakan untuk tikus.
2. Bahan untuk mencampur protein LOX-1 dengan ajuvan: protein LOX-1, Aluminium hidroksida ($Al(OH)_3$), *water for injection* (WFI).
3. Bahan untuk injeksi protein LOX-1: vaksin untuk masing-masing kelompok percobaan dan alkohol 70%.

4. Bahan untuk pembuatan ransum makanan diet normal dan diet aterogenik.

- Diet normal AIN-93 M:

Diet normal untuk pembuatan 1 kg pakan terdiri dari 70% karbohidrat, 9% lemak, 15% protein dan 3,9 kkal/g densitas energi.

Untuk bahan pakan normal dapat dilihat pada tabel dibawah ini

Tabel 4.1 Bahan Diet Normal untuk 1 kg Pakan (Handayani, 2012)

Nama Bahan	g/kg	Nilai Gizi
Tepung jagung	620	KH : 70% total energi
Sukrosa	100	Lemak 9% total energi
Minyak Kedelai	40	Protein 15% total energi
Gelatin	65	Densitas energi: 3,9 kkal/g
Kasein	80	
CMC	50	
Mineral dan Vitamin	5 butir	

- Diet aterogenik modifikasi AIN-93 M :

Diet aterogenik yang digunakan adalah modifikasi diet tinggi lemak AIN-93M (Handayani, 2011) yang ditambahkan asam kolat 0,3 % g dan kolesterol 1% (Shatanovi *et al.*, 2012) serta propil tiourasil 0,2% (Shirai *et al.*, 1984). Diet tinggi lemak untuk pembuatan 1 kg pakan terdiri dari 33% karbohidrat,50% lemak,16% protein,dan 4,8 kkal/g densitas energi Untuk bahan pembuatan diet tinggi lemak dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 4.2 Bahan Diet Aterogenik untuk 1 kg Pakan (Handayani,2011)

Nama Bahan	g/kg	Nilai Gizi
Tepung jagung	210	KH: 33 % total energy
Sukrosa	175	Lemak: 50 % total energy
Minyak kelapa	105	Protein: 16 % total energy
Korvet	105	Densitas energi: 4,8 kkal/g
Minyak Kedelai	50	
Gelatin	50	
Kasein	128	
CMC	51	
Mineral dan Vitamin	67	

- 5) Bahan untuk pembedahan tikus: kloroform, alkohol.
- 6) Bahan untuk pembuatan preparat: formalin 10 %, aseton, Xylol, paraffin cair.
- 7) Bahan untuk pengecetan imunohistokimia: Xilol, ethanol absolute, ethanol 70 %, ethanol 80%, ethanol 90%, buffer sitrat, aquades, PBS, methanol, H₂O₂, background sniper, antibodi primer NF-kB anti p65, antibody sekunder IgG, SA-HRP, DAB, Mayer Hematoxilen.

4.5.2 Alat

- 1) Alat untuk perawatan hewan coba: kandang plastik standar perawatan yang telah dilengkapi oleh botol minum dan tempat makanan sebanyak 28 buah, timbangan analitik, handscoen, dan pembersih kandang.
- 2) Alat untuk pembuatan vaksin: vortex, falcon tube dan mikropipet.

- 3) Alat untuk penyuntikan vaksin: spuit insulin 1 cc, handscoen, kain lap, vortex, micro falcon tube.
- 4) Alat untuk pembuatan ransum makanan diet normal dan diet aterogenik: timbangan, neraca analitik, baskom, penggiling pakan, nampan, blender, mixer, panci.
- 5) Alat untuk pemberian diet normal dan diet aterogenik: tempat makanan tikus
- 6) Alat untuk pembedahan tikus: papan paraffin, gunting bedah, pinset, jarum pentul, steroform, kertas label, kapas, wadah plastik + tutup yang berisi chloroform.
- 7) Alat untuk pembuatan preparat: Waterbath, paraffin blok,obyek glas
- 8) Alat untuk untuk pengecetan immunohistokimia: waterbath, stirrer, mikropipet, pipet tetes, timbangan digital, kaca penutup, beaker glass, chamber.
- 9) Alat untuk penghitungan aktivasi NF-kB: Mikroskop Olympus dengan pembesaran 1000.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan adalah:

- a) Aterosklerosis merupakan kondisi peradangan kronik terhadap deposisi lipoprotein pada dinding arteri.
- b) *Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1* (LOX-1) merupakan scavenger reseptor dari Low Density Lipoprotein yang teroksidasi (Ox-LDL) yang berada pada sel endotel. LOX-1 hampir tidak ditemukan pada keadaan normal dan mengalami upregulasi pada keadaan aterosklerosis. Protein

LOX-1 yang digunakan adalah protein LOX-1 tikus (*Rattus norvegicus*) (Sino Biological Inc).

- c) Tikus galur Wistar merupakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Pada penelitian ini digunakan tikus galur Wistar berjenis kelamin jantan dengan usia 6 – 8 minggu dan berat 160 – 180 gram. Hewan coba ini dapat mensimulasikan kondisi aterosklerosis setelah diberikan diet aterogenik.
- d) Diet normal merupakan diet atau pakan biasa tanpa tambahan bahan yang bersifat aterogenik. Diet standar normal yang diberikan mengacu pada penelitian Handayani *et al* (2011) yang telah disesuaikan dengan rekomendasi diet oleh *American Institute of Nutrition - 93 M* (AIN-93 M).
- e) Diet aterogenik merupakan diet atau pakan yang diberikan untuk menginduksi pembentukan plak aterosklerosis pada subendotel aorta tikus. Diet aterogenik yang diberikan merupakan diet tinggi lemak AIN-93M (Handayani dkk., 2011) yang dimodifikasi dengan penambahan bahan bersifat aterogenik yaitu asam kolat , kolesterol (El-Shatanovi *et al.*, 2012) dan propil tiourasil (PTU) (Shirai *et al.*, , 2005).
- f) Aluminium hidroksida ($Al(OH)_3$) merupakan ajuvan atau bahan yang ditambahkan ke vaksin untuk meningkatkan respon imun, aktifasi sel T melalui peningkatan akumulasi *Antigen Presenting Cell* (APC) dan ekspresi sitokin oleh APC. Aluminium hidroksida merupakan ajuvan yang sesuai untuk vaksin aterosklerosis karena mempunyai efek ateroprotektif dan utamanya dapat menginduksi sistem imun humoral (Wigren *et al.*, 2009).

- g) *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B): Protein yang meregulasi transkripsi gen dan respons peradangan. Pengecekan aktivasi NF- κ B pada jaringan aorta tikus dengan metode immunohistokimia.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Perlakuan Hewan Coba

- a) Hewan percobaan tikus jantan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 28 ekor dibagi menjadi 7 kelompok penelitian menggunakan metode rancangan acak kelompok dengan jumlah 4 ekor untuk masing-masing kelompok.
- b) Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (setiap kandang berisi satu ekor tikus).
- c) Tikus diaklimatisasi selama 14 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dalam kondisi percobaan.
- d) Selama masa aklimatisasi, tikus sudah dibagi menjadi 7 kelompok, yaitu kelompok K_p , K_n , P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 . Selama satu minggu masa aklimatisasi, tikus telah diberikan standar diet normal AIN-93M terlebih dahulu. Pada saat penelitian berlangsung, minuman diberikan secara *ad libitum*. Sekam diganti setiap 2 hari sekali.
- e) Setelah masa aklimatisasi, tikus akan terus diberikan diet yang sesuai dengan kelompoknya. Tikus kelompok K_n (kontrol negatif) diberi diet normal AIN-93M. Tikus kelompok K_p (kontrol positif) dan perlakuan P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 diberi diet aterogenik modifikasi AIN-93M dan vaksin sesuai dosis masing-masing.
- f) Perlakuan terhadap semua tikus dilakukan secara bersamaan selama 56 hari.

- g) Tikus ditimbang berat badannya setiap satu minggu sekali untuk mengetahui perubahan berat badan tikus.
- h) Makanan tikus ditimbang setiap hari untuk mengetahui banyaknya pakan yang dikonsumsi tikus (asupan makanan tikus) yang kemudian akan dikonversi ke dalam nilai gizi.
- i) Pada akhir penelitian, semua tikus di eutanasia untuk diambil jaringan aorta sebagai bahan penghitungan aktivasi NF- κ B

4.7.2 Preparasi Protein LOX-1

1. Dilakukan penyemprotan alat-alat yang akan ditaruh di dalam LAF menggunakan alkohol 70%. Preparasi dilakukan dalam jarak 10 cm didekat bunsen yang telah dinyalakan dalam LAF.
2. Dilakukan pengambilan *sterile water* menggunakan spuit 5 ml kemudian difiltrasi menggunakan *sterile micropore 0,22 micron*. Filtrat ditampung dalam *falcon tube*. *Strile micropore 0,22 micron* merupakan ukuran standart untuk sterilisasi vaksin serta *strile micropore 0,22 micron* dapat menahan mikroba yang ada saat proses berlangsung.
3. Dilakukan rekonstitusi protein LOX-1 dengan cara mengambil *sterile water* sebanyak 400 μ L menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam vial yang berisi protein LOX-1 100 μ g, kemudian divortex ad homogen.
4. Didapatkan larutan stok protein LOX-1 dengan konsentrasi 0,25 μ g/ μ L.

5. Dilakukan penyemprotan alat-alat yang akan ditaruh di dalam LAF menggunakan alkohol 70%. Preparasi dilakukan dalam jarak 10 cm didekat bunsen yang telah dinyalakan dalam LAF.
6. Dilakukan pengambilan PBS menggunakan spuit 5 ml kemudian difiltrasi menggunakan *sterile micropore 0,22 micron*. Filtrat ditampung dalam *falcon tube*.
7. Dilakukan pembuatan larutan baku 1×10^{-2} ; 1×10^{-3} , 1×10^{-4} dan 1×10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

a) Pembuatan larutan baku 1×10^{-2} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (P_4).

Dilakukan pengambilan protein LOX-1 dari larutan stok sebanyak 24 μL menggunakan pipet mikro ke dalam *microtube* 4 dan ditambahkan PBS sebanyak 576 μL , kemudian divortex ad homogen.

b) Pembuatan larutan baku 1×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (P_3).

Dilakukan pengambilan protein LOX-1 dari larutan baku 1×10^{-2} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (P_4) sebanyak 60 μL menggunakan pipet mikro ke dalam *microtube* 3 dan ditambahkan PBS sebanyak 540 μL , kemudian divortex ad homogen.

c) Pembuatan larutan baku 1×10^{-4} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (P_2).

Dilakukan pengambilan protein LOX-1 dari larutan baku 1×10^{-2} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (P_3) sebanyak 6 μL menggunakan pipet mikro ke dalam *microtube* 2 dan ditambahkan PBS sebanyak 594 μL , kemudian divortex ad homogen.

- d) Pembuatan larutan baku 1×10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (P_1).

Dilakukan pengambilan protein LOX-1 dari larutan baku 1×10^{-2} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (P_2) sebanyak 0,6 μL menggunakan pipet mikro ke dalam *microtube* 1 dan ditambahkan PBS sebanyak 599,4 μL , kemudian divortex ad homogen.

- e) Masing-masing larutan baku (a, b, c, d) ditambahkan dengan 600 μL alum, kemudian di vortex ad homogen.
- f) Vaksin siap diinjeksikan pada hewan coba. Setiap hewan coba perlakuan 1,2,3 dan 4 diinjeksikan vaksin sebanyak 200 μL menggunakan spuit 1 ml (digunakan 2 buah spuit untuk 4 kali injeksi per kelompok perlakuan).
- g) Untuk perlakuan 5, dilakukan pengambilan alum sebanyak 600 μL alum, kemudian di vortex ad homogen. Setiap hewan coba P_5 diinjeksikan vaksin sebanyak 100 μL menggunakan spuit 1 ml (digunakan 2 buah spuit untuk 4 kali injeksi).

4.7.3 Penyuntikan Protein LOX-1

Sebelum protein LOX-1 diinjeksikan pada hewan coba, dilakukan pembersihan daerah yang akan diinjeksi menggunakan kapas yang telah ditetesi oleh alkohol 70%. Protein LOX-1 diinjeksikan sebanyak tiga kali secara subkutan. Injeksi primer dilakukan pada minggu ke-0, diikuti dengan injeksi *booster* pada minggu ke-3 dan -5, seperti pada Tabel 4.1 (Fredrikson *et al.*, 2008; Wigren *et al.*, 2009).

Tabel 4. 3 Protokol Injeksi Protein LOX-1

Kelompok	Hari ke-0 (Minggu ke-0)	Hari ke-21 (Minggu ke-3)	Hari ke-35 (Minggu ke-5)
P₁	1 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total:200 μ L/injeksi)	1 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)	1 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)
P₂	10 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)	10 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)	10 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)
P₃	100 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)	100 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)	100 ng LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)
P₄	1 μ g LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)	1 μ g LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)	1 μ g LOX-1/100 μ L PBS+ 100 μ L alum (Total: 200 μ L/injeksi)
P₅	100 μ L alum (Total: 100 μ L/injeksi)	100 μ L alum (Total: 100 μ L/injeksi)	100 μ L alum (Total: 100 μ L/injeksi)

4.7.4 Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal dan Diet Aterogenik

Prosedur pembuatan diet normal modifikasi AIN-93M adalah:

1. Kasein, tepung jagung, CMC, dan sukrosa dimasukkan ke dalam wadah kemudian dimixer hingga homogen.
2. Ditambahkan vitamin/mineral yang telah dihaluskan kemudian dimixer hingga homogen.
3. Ditambahkan air 400 cc secara bertahap
4. Ditambahkan minyak kedelai
5. Gelatin dicampurkan dengan air dingin 100 cc, pewarna, dan essence keju hingga rata kemudian dipanaskan hingga bewarna jernih

6. Cairan gelatin dimasukkan kedalam wadah agar tidak menggumpal, kemudian dimixer hingga homogen.
7. Setelah tercampur rata, dipipihkan seperti adonan kue membentuk persegi empat (dilakukan segera agar adonan mudah dibentuk atau tidak terlalu keras)
8. Diletakkan dalam *freezer* sampai mengeras.
9. (8) dipotong adonan menjadi ukuran kecil yang siap diberikan kepada hewan coba.

Prosedur pembuatan diet aterogenik modifikasi AIN-93M adalah:

1. Kasein, tepung jagung, CMC, asam kolat, kolesterol dan PTU dimasukkan ke dalam wadah kemudian dimixer hingga homogen.
2. Ditambahkan sukrosa yang telah dihaluskan hingga homogen.
3. Ditambahkan vitamin/mineral yang telah dihaluskan kemudian dimixer hingga homogen.
4. Corvet, minyak kedelai dan minyak kelapa (tanpa air) dipanaskan kemudian dimasukkan dalam wadah dan dimixer kembali hingga homogen.
5. Gelatin dicampurkan dengan air dingin 100 cc, pewarna, dan essence keju hingga rata kemudian dipanaskan hingga bewarna jernih
6. Cairan gelatin dimasukkan kedalam wadah agar tidak menggumpal, kemudian dimixer hingga homogen.
7. Setelah tercampur rata, dipipihkan seperti adonan kue membentuk persegi empat (dilakukan segera agar adonan mudah dibentuk atau tidak terlalu keras)
8. Diletakkan dalam *freezer* sampai mengeras.

9. (7) dipotong adonan menjadi ukuran kecil yang siap diberikan kepada hewan coba.

4.7.5 Pemberian Diet Normal dan Diet Aterogenik

Pembuatan diet normal dan aterogenik dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan tikus dewasa per-ekor setiap hari disesuaikan dengan hasil rata-rata asupan makanan tikus pada masa aklimatisasi yaitu 30 gram/hari. Diet normal diberikan selama 10 minggu untuk kelompok kontrol negatif (K_n) dan 2 minggu untuk kelompok kontrol positif (K_p) dan kelompok perlakuan (P_1 , P_2 , P_3 , P_4 dan P_5), sedangkan diet aterogenik diberikan selama 8 minggu pada kelompok kontrol positif (K_p) dan kelompok perlakuan (P_1 , P_2 , P_3 , P_4 dan P_5).

4.7.6 Pembedahan Hewan Coba

Setelah pemberian diet selama 56 hari dan penyuntikan protein LOX-1 maka dilakukan pembedahan tikus untuk pengambilan pembuluh aorta tikus. Pembedahan diawali dengan pemberian anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Setelah tikus tidak sadar, tikus difiksasi dengan jarum di atas papan. Pembedahan dilakukan dengan membuka dinding abdomen dan thorax.

4.7.7 Prosedur Penanganan Hewan Coba Setelah Penelitian

Penanganan hewan coba setelah penelitian mengikuti prosedur di laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu dengan penguburan.

4.7.8 Prosedur Pembuatan Preparat

Langkah – langkah pembuatan preparat sebagai berikut:

1. Fiksasi

Dipotong jaringan aorta tikus yang dekat jantung.

Dicuci dengan air mengalir.

Difiksasi formalin 10 % selama 18-24 jam.

Dipotong gross.

Dicuci dengan air mengalir 15 menit.

2. Embedding

Dimasukkan jaringan aorta pada

a. Aseton 1 jam x 4

b. Xylol 0,5 jam x 4

c. Parafin cair suhu 55°C 1 jam x 3

Jaringan aorta ditanam pada paraffin blok.

Didiamkan sampai membeku sampai 24 jam.

3. Penyayatan

Paraffin blok ditaruh pada balok es.

Paraffin blok ditaruh blok pada cekam nikrotom rotary.

Paraffin blok disayat dengan ukuran 4 micron.

Ditaruh pada water bath (suhu 30°C).

Diambil jaringan aorta dan direntangkan dengan obyek glass.

Didiamkan 24 jam.

4.7.9 Prosedur Pewarnaan Immunohistokimia Jaringan Aorta

Metode pewarnaan yang digunakan dalam pengecekan aktivasi NF-kB adalah immunohistokimia. Langkah – langkahnya sebagai berikut

1. Deparafinasi

Slide dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit.

Slide dicuci dengan larutan dibawah ini secara berurutan:

- a. Xilol (2 x 10 menit)
- b. Ethanol absolute (2 x 10 menit)
- c. Ethanol 90 % (1 x 5 menit)
- d. Ethanol 80 % (1 x 5 menit)
- e. Ethanol 70 % (1 x 5 menit)
- f. Aquades steril (3 x 5 menit)

2. Antigen Retrieval dengan Buffer Sitrat

Slide direndam dalam chamber berisi buffer sitrat pH 6,0.

Chamber dipanaskan dalam waterbath suhu 95°C selama 35 menit.

Slide dibilas aquades.

Slide dicuci dengan PBS (3 x 2 menit)

3. Immunohistokimia Jaringan Aorta

- a. Slide ditetaskan 4 % H₂O₂ dalam methanol dan diinkubasi 30 menit pada suhu ruang.
- b. Slide dicuci PBS 3 x 2 menit.
- c. Slide ditetaskan Background Sniper, dan diinkubasi 30 menit pada suhu ruang.
- d. Slide dicuci PBS 3 x 2 menit

- e. Slide ditetaskan antibodi primer NF-kB antip65 yang dilarutkan dalam buffer PBS + 0,1 % BSA.
- f. Slide diinkubasi 2 jam pada suhu ruang.
- g. Slide dicuci PBS 3 x 2 menit.
- h. Slide ditetaskan antibodi sekunder (IgG) dan diinkubasi 30 menit pada suhu ruang
- i. Slide dicuci PBS 3 x 2 menit.
- j. Slide ditetaskan SA-HRP dan diinkubasi 30 menit pada suhu ruang
- k. Slide dicuci PBS 3 x 2 menit.
- l. Slide dibilas dengan aquades.
- m. Slide ditetaskan DAB (DAB Chromagen : DAB buffer= 1:40), diinkubasi 5 menit pada suhu ruang.
- n. Slide dicuci aquades 3 x 2 menit.
- o. Slide ditetaskan Mayer's Hematoxilen dan diinkubasi 1 menit pada suhu ruang.
- p. Slide dibilas dengan aquades.
- q. Slide dikeringkan.

4.7.10 Prosedur Penghitungan Aktivasi NF-kB

Prosedur penghitungan aktivasi NF-kB adalah sebagai berikut:

- a. Slide diamati dibawah mikroskop pembesaran 1000 x dengan diambil 10 lapang pandang

b. Aktivasi NF-κB: $\frac{\text{Jumlah inti sel teraktivasi}}{\text{Jumlah total inti sel}} \times 100 \%$

Keterangan: Warna inti sel endotel teraktivasi (warna coklat).

Warna inti sel yang tidak teraktivasi (warna ungu).

c. Diambil rerata pada kelompok perlakuan tersebut.

4.8 Analisis Data

Pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputersasi dengan menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution 17 PS (SPSS 17 PS) for Windows* dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$).

Pada penelitian ini data yang diambil adalah asupan pakan setiap hari, berat badan setiap minggu, dan aktivasi NF-κB. Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode yang digunakan yaitu uji parametric *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan alternatifnya yaitu uji non parametric Kruskal-Wallis.

Metode *One-way ANOVA* dapat digunakan jika data memenuhi syarat – syarat uji parametric sebagai berikut (Dahlan,2004) :

1. Terdapat lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan.
2. Distribusi data normal ($p > 0,05$), yang dapat diketahui dari uji normalitas (Kolmogorov-Smirnov). Jika distribusi data tidak normal, maka dilakukan transformasi data supaya distribusi data normal.

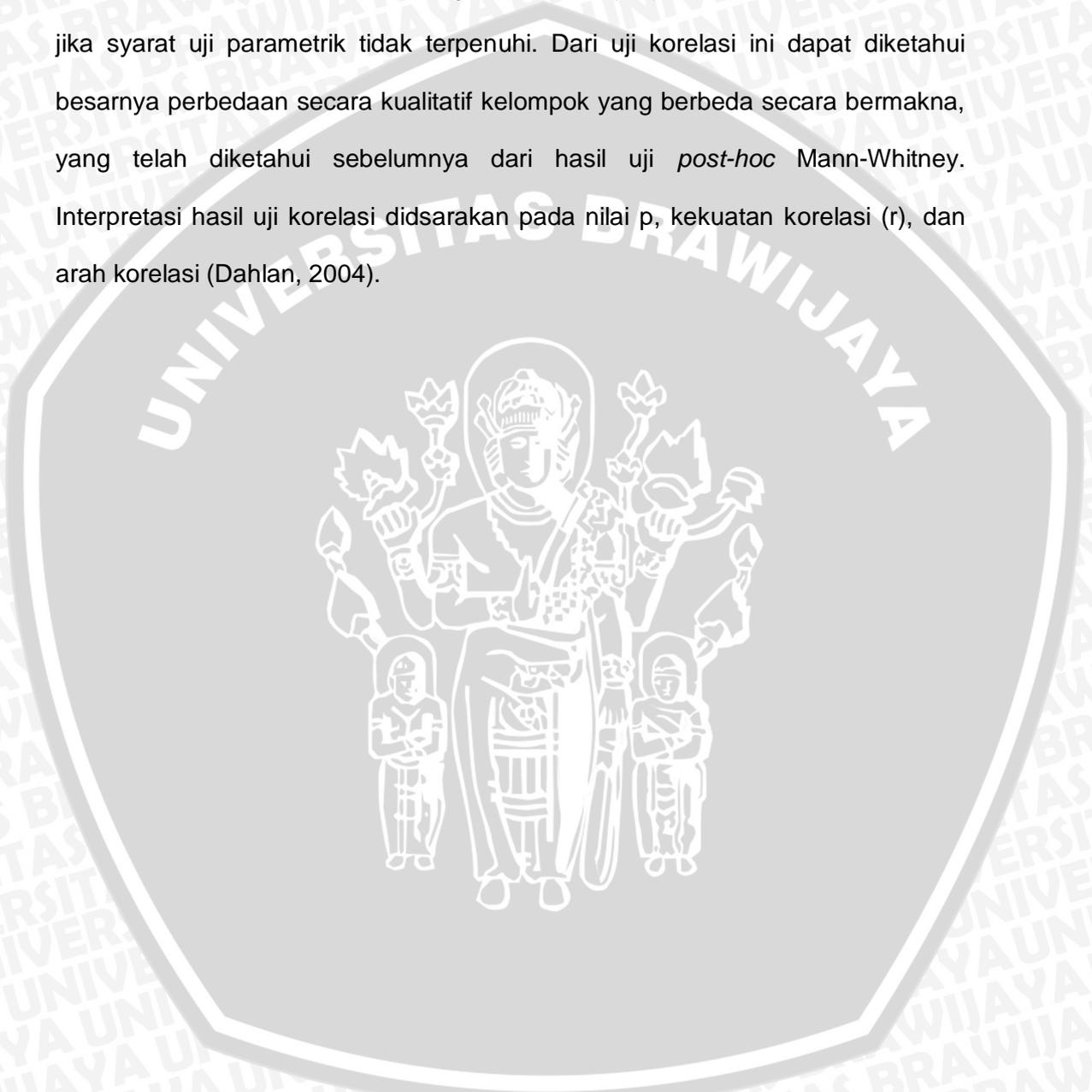
3. Varians data sama atau homogen ($p > 0,05$), yang diketahui dari uji homogenitas. Jika varians data tidak sama atau homogen, maka dapat dilakukan untuk transformasi data supaya varians data menjadi sama atau homogen.
4. Jika data hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama, maka alternatifnya dilakukan uji Kruskal-Wallis.

Jika pada uji *One-way* ANOVA atau Kruskal-Wallis didapatkan nilai $p < 0,05$ disimpulkan terdapat pengaruh perbedaan perlakuan terhadap jumlah NF- κ B yang teraktivasi dan hipotesis yang menyatakan bahwa pemberian protein LOX-1 + alum dapat menurunkan jumlah NF- κ B yang teraktivasi jaringan aorta tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar yang diberi diet aterogenik dapat diterima. Namun, bila $p > 0,05$ berarti hipotesis tersebut ditolak (Dahlan, 2004).

Untuk menganalisis apakah terdapat perbedaan hasil yang bermakna antar masing-masing kelompok perlakuan dengan melihat nilai p dapat digunakan uji *One-way* ANOVA atau Kruskal-Wallis. Bila nilai yang diperoleh $< 0,05$ maka diambil kesimpulan bahwa paling tidak terdapat perbedaan hasil yang bermakna antara dua kelompok perlakuan. Sedangkan nilai $p > 0,05$ maka diambil kesimpulan tidak terdapat perbedaan hasil yang bermakna antar masing-masing perlakuan (Dahlan, 2004).

Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna dilakukan uji post-hoc dengan uji Tukey HSD untuk data yang menggunakan uji *One-way* ANOVA dan uji Mann-Whitney untuk data yang menggunakan uji Kruskal-Wallis. Perbedaan bermakna jika didapatkan nilai $p < 0,05$ (Dahlan, 2004).

Untuk mengetahui seberapa kuat hubungan antara pemberian beberapa dosis pemberian protein LOX-1 + alum dengan jumlah NF-kB yang teraktivasi dilakukan uji korelasi Pearson dengan alternatifnya yaitu uji korelasi Spearman jika syarat uji parametrik tidak terpenuhi. Dari uji korelasi ini dapat diketahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara bermakna, yang telah diketahui sebelumnya dari hasil uji *post-hoc* Mann-Whitney. Interpretasi hasil uji korelasi didasarkan pada nilai p, kekuatan korelasi (r), dan arah korelasi (Dahlan, 2004).



4.9 Alur Penelitian

