

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

4.1.1 Studi *in silico*

Penelitian ini merupakan penelitian *Research and Development* (RnD) yang dilakukan secara *in silico* menggunakan peralatan komputer dengan sistem operasi *Microsoft Windows 7* dengan browser *Goggle Chrome* versi 35.0.1916.153 m.

4.1.2 Studi *in vivo*

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* menggunakan model hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang diberi diet aterogenik dan protein *lectin-like oxidized LDL receptor-1* (LOX-1).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Studi *in silico*

Obyek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sekuens asam amino penyusun protein *lectin-like oxidized LDL receptor-1* (LOX-1).

4.2.2 Studi *in vivo*

4.2.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Sedangkan sampel adalah tikus putih galur Wistar

jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk dilakukan penelitian. Pemilihan tikus sebagai hewan coba dikarenakan mudah ditangani, dapat diperoleh dalam jumlah besar dan harga terjangkau (Kusumawati, 2004).

4.2.2.2 Kriteria Sampel

Hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan pada penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Berikut adalah kriteria tikus yang digunakan pada penelitian ini:

Kriteria Inklusi:

- a) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar .
- b) Jantan, karena tidak ada pengaruh dari faktor hormonal seperti pada tikus betina.
- c) Usia 6-8 minggu.
- d) Berat badan \pm 120-160 gram.
- e) Sehat, yang ditandai dengan bergerak aktif.

Kriteria Eksklusi:

- a) Memiliki kelainan anatomi (cacat fisik).

4.2.2.3 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.

4.2.2.4 Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian berjumlah 7 (tujuh) yang dibagi secara acak (K_n , K_p , P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5), dengan ketentuan sebagai berikut:

- Kelompok kontrol negatif (K_n): 4 ekor tikus galur Wistar jantan yang diberikan diet normal dan tanpa diinjeksikan vaksin.
- Kelompok kontrol positif (K_p): 4 ekor tikus galur Wistar jantan yang diberikan diet aterogenik dan tanpa diinjeksikan vaksin.
- Kelompok perlakuan (P_1): 4 ekor tikus galur Wistar jantan yang diberikan diet aterogenik dan diinjeksikan vaksin yang berisi protein LOX-1 1 ng/100 μ L ditambah dengan ajuvan alum 100 μ L (Total: 200 μ L/injeksi subkutan)
- Kelompok perlakuan (P_2): 4 ekor tikus galur Wistar jantan yang diberikan diet aterogenik dan diinjeksikan vaksin yang berisi protein LOX-1 10 ng/100 μ L ditambah dengan ajuvan alum 100 μ L (Total: 200 μ L/injeksi subkutan)

- e) Kelompok perlakuan (P_3): 4 ekor tikus galur Wistar jantan yang diberikan diet standar aterogenik dan diinjeksikan vaksin yang berisi protein LOX-1 100 ng/100 μ L ditambah dengan ajuvan alum 100 μ L (Total: 200 μ L/injeksi subkutan)
- f) Kelompok perlakuan (P_4): 4 ekor tikus galur Wistar jantan yang diberikan diet aterogenik dan diinjeksikan vaksin yang berisi protein LOX-1 1 μ g/100 μ L ditambah dengan ajuvan alum 100 μ L (Total: 200 μ L/injeksi subkutan)
- g) Kelompok perlakuan (P_5): 4 ekor tikus galur Wistar jantan yang diberikan diet aterogenik dan diinjeksikan vaksin yang berisi alum 100 μ L (Total: 100 μ L/injeksi subkutan)

Penentuan dosis antigen pada penelitian ini yaitu secara deret geometri (1 ng, 10 ng, 100 ng dan 1000 ng) mengacu pada penelitian Pauwels *et al* (1979) dimana dinyatakan bahwa dosis antigen sangat berpengaruh terhadap produksi antibodi sehingga harus dilakukan eksplorasi dosis untuk mengetahui dosis optimum antigen dalam produksi antibodi.

4.2.2.5 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

Teknik 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* kedua 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 , dimana 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

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

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar antibodi (IgG) anti-LOX-1.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

- Perawatan, perlakuan dan pembedahan hewan coba dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Preparasi vaksin dan pengukuran kadar antibodi anti-LOX-1 dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 5 bulan, yaitu dimulai dari bulan Februari 2014 hingga Juni 2014.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Studi *in silico*

Studi *in silico* dilakukan menggunakan data yang ada pada *on line database*. Alamat situs *database* diakses secara bebas menggunakan komputer yang terhubung internet. Sistem operasi yang digunakan adalah *Microsoft Windows 7* dengan *browser Goggle Chrome* versi 35.0.1916.153 m.

4.5.2 Studi *in vivo*

4.5.2.1 Bahan

Berikut adalah bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini:

1. Bahan untuk perawatan hewan coba : sekam dan air minum untuk tikus.
2. Bahan untuk preparasi vaksin : protein LOX-1, alum gel, PBS, spuit 10 ml, *sterile milipore filter 0,22 micron*, dan *microtube*.
3. Bahan untuk injeksi vaksin : vaksin untuk masing-masing kelompok percobaan, spuit 1 ml, handscoen, kain lap, 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 / gram densitas energi. Untuk bahan pakan normal dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Bahan Diet Normal untuk 1 kg Pakan

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

Sumber: Handayani, 2011; Handayani, 2012.

- Diet aterogenik modifikasi AIN-93 M :

Diet aterogenik yang digunakan adalah modifikasi diet tinggi lemak AIN-93M (Handayani *et al.*, 2011; Handayani *et al.*, 2012) yang di tambahkan asam kolat 0,3 % 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 / gram densitas energi. Untuk bahan pembuatan diet tinggi lemak dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Bahan Diet Tinggi Lemak untuk 1 kg Pakan

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

Sumber: Handayani, 2011; Handayani, 2012.

5. Bahan untuk pembedahan tikus dan pengambilan spesimen darah : kloroform 20 ml, alkohol, spuit 5 ml, tabung vakum merah, kertas label, dan kapas.
6. Bahan untuk pengukuran kadar antibodi anti-LOX-1 : serum tikus, ELISA kit, *microtube*, yellow tip, label, spidol.

1.5.2.2 Alat

Berikut adalah alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini:

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 preparasi vaksin : vortex, *micropipet*, dan *Laminar Air Flow* (LAF).
3. Alat untuk pembuatan ransum makanan diet normal dan diet aterogenik : timbangan analitik, pengaduk, gelas beaker, loyang, *mixer* beserta wadah *mixer*, panci, sendok, wadah untuk menyimpan pakan dan lemari es.
4. Alat untuk pemberian diet normal dan diet aterogenik : tempat makanan tikus.
5. Alat untuk pembedahan tikus : papan paraffin, gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set.
6. Alat untuk pengukuran kadar antibodi anti-LOX-1 : vortex, inkubator, kuvet, *ELISA plate* dan *ELISA reader* (spektrofotometer).

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan adalah :

1. Aterosklerosis merupakan kondisi peradangan kronik terhadap deposisi lipoprotein pada dinding arteri.
2. *Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1* (LOX-1) merupakan *scavenger reseptor* dari *Low Density Lipoprotein* yang teroksidasi (OxLDL) yang berada pada sel endotel. LOX-1 hampir tidak ditemukan pada keadaan normal dan mengalami *upregulasi* pada keadaan aterosklerosis sehingga protein ini digunakan sebagai bahan vaksin untuk menginduksi pembentukan antibodi anti-LOX-1. Pada penelitian ini digunakan protein LOX-1 dari hewan tikus (Rat OLR1 / LOX1 Protein (Fc Tag)) dengan nomor catalog 80268-R01H. *Certificate of analysis* (CoA) dari protein LOX-1 dapat dilihat pada Lampiran 1.
3. 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; 2012) yang telah disesuaikan dengan rekomendasi diet oleh *American Institute of Nutrition - 93 M* (AIN-93 M).
4. 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 *et al.*, 2011; Handayani *et al.*, 2012) yang dimodifikasi dengan penambahan bahan bersifat aterogenik yaitu asam kolat 0,3 % dan kolesterol 1% (Shatanovi *et al.*, 2012) serta propil tiourasil 0,2% (Shirai *et al.*, 1984)
5. Alum atau Aluminium hidroksida ($Al(OH)_3$) merupakan ajuvan atau bahan yang ditambahkan ke vaksin untuk meningkatkan respons imun, aktivasi

sel T melalui peningkatan akumulasi *Antigen Presenting Cell* (APC) dan ekspresi kostimulator serta sitokin oleh APC. Alum merupakan ajuvan yang sesuai untuk vaksin aterosklerosis karena mempunyai efek ateroprotektif dan utamanya dapat menginduksi sistem imunitas humoral (Wigren *et al.*, 2009).

6. Kadar antibodi merupakan jumlah antibodi yang terdapat pada serum darah. Kadar antibodi diukur menggunakan ELISA. Antibodi yang diukur adalah Immunoglobulin G (IgG), yaitu isotop immunoglobulin yang paling dominan dihasilkan sebagai respons sekunder setelah dilakukan vaksinasi.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Studi *in silico*

4.7.1.1 Pencarian *Database Protein LOX-1*

Data yang akan digunakan dalam analisis dicari melalui *Universal Protein Resource* (UniProt). Berikut adalah langkah-langkah pencarian data protein LOX-1:

1. Dibuka situs UniProt (<http://www.uniprot.org>).
2. Pada halaman situs yang terbuka, dipilih *Protein Knowledgebase* (UniProtKB) pada *search in* dan *LOX-1* atau *OLR1* pada *query*.
3. Untuk melihat hasil, diklik *search*.
4. Diklik *P78380* yang menunjukkan sekuen dari LOX-1 manusia (*Homo sapiens*).
5. Data sekuens asam amino yang diperoleh kemudian disimpan dalam bentuk FASTA pada Notepad untuk kemudian digunakan pada seleksi data.

4.7.1.2 Pemodelan Protein

Pemodelan protein dilakukan untuk memodelkan struktur 3 dimensi dari data sekuens yang akan digunakan dalam penelitian. Berikut adalah langkah-langkahnya:

1. Dibuka situs *Swissmodel* (<http://swissmodel.expasy.org>).
2. Dipilih *my workspace*
3. Dimasukkan email dan password (log in terlebih dahulu)
4. Dipilih *automated mode* pada menu *modelling*
5. Dimasukkan sekuen protein LOX-1
6. Diklik *submit request*, hasil pemodelan protein akan dikirimkan melalui e-mail
7. Divisualisasikan pada *Pymol*.

4.7.1.3 Prediksi Aksesibilitas Permukaan dan Analisis Antigenisitas

Prediksi aksesibilitas menggunakan *emini surface accesibility prediction*, sedangkan analisis antigenisitas menggunakan metode Kolaskar-Tongaonkar. Analisis ini menunjukkan sisi dimana molekul dapat dikenal oleh antibodi sistem imun terhadap LOX-1. Semua residu yang memiliki propensitas di atas 1,0 merupakan antigenik yang potensial (Waghmare *et al.*, 2012). Berikut adalah langkah-langkah untuk analisis antigenisitas:

1. Dibuka situs *Immune Epitope Database* (IEDB) (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)
2. Disalin sekuen pada *toolbox* yang disediakan.
3. Dipilih *emini surface accesibility prediction* dan *kolaskar & tongaonkar antigenecity*.

4. Untuk melihat hasil, diklik *run prediction*.

4.7.1.4 Prediksi Epitop

Selain mempunyai antigenisitas, protein yang direkomendasikan sebagai kandidat vaksin harus memiliki potensi sebagai epitop.

a. Prediksi Epitop Sel B

Prediksi epitope sel B adalah suatu metode yang dimaksudkan untuk memprediksi daerah protein yang dapat dikenali sebagai epitop sehubungan dengan respons terhadap sel B. Berikut adalah langkah-langkah dalam prediksi epitop sel B:

1. Dibuka situs *Immune Epitope Database* (IEDB) (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input).
2. Disalin sekuens pada toolbox yang disediakan.
3. Untuk melihat hasil, klik *run prediction*.

b. Prediksi Epitop Sel T

Berbeda halnya dengan prediksi epitop sel B, prediksi epitop sel T didasarkan pada prediksi pengikatan terhadap MHC, yaitu MHC II, sesuai dengan patogenesisnya. Untuk analisis berdasarkan MHC II, semakin tinggi skor maka semakin baik pengikatannya. Berikut adalah langkah-langkah prediksi epitop sel T:

1. Dibuka situs IEDB (<http://tools.immuneepitope.org/mhcii/>).
2. Disalin sekuens pada *toolbox* yang disediakan atau *upload* sekuens menggunakan browse.
3. Diklik *submit* untuk melihat hasil.

4.7.1.5 Analisis Homologi Protein

Analisis homologi protein LOX-1 dengan protein lainnya dilakukan dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool Protein* (BLASTP) dengan cara memeriksa kesamaan susunan asam amino dari protein yang kita pilih dan analisis kesamaan susunan asam aminonya menggunakan *database* peptida atau protein yang ada (Mcentyre and Ostell, 2005). Berikut adalah langkah-langkah dari analisis potensi autoimunitas:

1. Dibuka situs BLAST
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).
2. Dalin sekuens pada *toolbox* yang disediakan.
3. Diklik *submit* untuk melihat hasil.

4.7.2 Studi *in vivo*

4.7.2.1 Perlakuan pada Hewan Coba

1. 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.
2. Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (setiap kandang berisi satu ekor tikus).
3. Tikus diaklimatisasi selama 14 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dalam kondisi percobaan.
4. 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 dua 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.

5. 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 atherogenik modifikasi AIN-93M dan vaksin sesuai dosis masing-masing.
6. Perlakuan dilakukan secara bersamaan selama 8 minggu (56 hari).
7. Tikus ditimbang berat badannya setiap satu minggu sekali untuk mengetahui perubahan berat badan tikus.
8. Makanan tikus ditimbang setiap hari untuk mengetahui banyaknya pakan yang dikonsumsi tikus (asupan makanan tikus).
9. Pada akhir penelitian, semua tikus di-eutanasia menggunakan inhalasi kloroform, kemudian diambil darahnya sebagai sampel untuk pengukuran kadar antibodi (IgG) anti-LOX-1.

4.7.2.2 Preparasi Vaksin

Berikut adalah prosedur preparasi vaksin :

1. Preparasi vaksin dilakukan pada *Laminar Air Flow* (LAF).
2. Dilakukan penyemprotan alat-alat yang akan diletakkan di dalam LAF menggunakan alkohol 70%. Preparasi dilakukan dalam jarak 10 cm didekat bunsen yang telah dinyalakan dalam LAF.
3. Dilakukan pengambilan *sterile water* menggunakan spuit 5 ml kemudian difiltrasi menggunakan *sterile micropore 0,22 micron*. Filtrat ditampung dalam *falcon tube*.

4. Dilakukan rekonstitusi protein LOX-1 dengan cara mengambil *sterile water* sebanyak 400 μL menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam vial yang berisi protein LOX-1 100 μg , kemudian divortex ad homogen.
5. Didapatkan larutan stok protein LOX-1 dengan konsentrasi 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
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} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sesuai dengan Tabel 4.3. Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 2.

Tabel 4.3 Volume Kebutuhan untuk Preparasi Vaksin

Perlakuan	Konsentrasi protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volume larutan protein (μL)	Volume PBS (μL)	Volume alum (μL)	Volume akhir (μL)
5	-	-	-	500	1000
4	1×10^{-2}	20 μL larutan stok	480	500	1000
3	1×10^{-3}	50 μL larutan P_4	450	500	1000
2	1×10^{-4}	5 μL larutan P_4	495	500	1000
1	1×10^{-5}	0,5 μL larutan P_4	499,5	500	1000

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

Dilakukan pengambilan protein LOX-1 dari larutan stok sebanyak 20 μL menggunakan pipet mikro ke dalam *microtube* 4 dan ditambahkan PBS sebanyak 480 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 50 μL menggunakan pipet mikro ke dalam

microtube 3 dan ditambahkan PBS sebanyak 450 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 5 μL menggunakan pipet mikro ke dalam *microtube* 2 dan ditambahkan PBS sebanyak 495 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 0,5 μL menggunakan pipet mikro ke dalam *microtube* 1 dan ditambahkan PBS sebanyak 499,5 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 1 buah spuit untuk 2 kali injeksi tikus per kelompok perlakuan).

- g) Untuk perlakuan 5, dilakukan pengambilan alum sebanyak 500 μL alum, kemudian di vortex ad homogen. Setiap hewan coba P_5 diinjeksikan vaksin sebanyak 100 μL menggunakan spuit 1 ml.

4.7.2.3 Penyuntikan Vaksin

Sebelum vaksin diinjeksikan pada hewan coba, dilakukan pembersihan daerah yang akan diinjeksi menggunakan kapas yang telah ditetesi oleh alkohol 70%. Vaksin diinjeksikan sebanyak tiga kali secara subkutan. Injeksi primer

dilakukan pada hari ke-0, diikuti dengan injeksi *booster* pada hari ke-21 dan -35, seperti pada Tabel 4.4 (Fredrikson *et al.*, 2008; Wigren *et al.*, 2009).

Tabel 4.4 Jadwal Pemberian Vaksin

Kelompok Perlakuan	Hari ke-0 (Minggu ke-0)	Hari ke-21 (Minggu ke-3)	Hari ke-35 (Minggu ke-5)
P ₁	LOX-1 1 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)	LOX-1 1 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/ injeksi)	LOX-1 1 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)
P ₂	LOX-1 10 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)	LOX-1 10 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/ injeksi)	LOX-1 10 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)
P ₃	LOX-1 100 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)	LOX-1 100 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/ injeksi)	LOX-1 100 ng/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)
P ₄	LOX-1 1 µg/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)	LOX-1 1 µg/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)	LOX-1 1 µg/100 µL+ alum 100 µL (Total: 200 µL/injeksi)
P ₅	Alum 100 µL (Total: 100 µL/injeksi)	Alum 100 µL (Total: 100 µL/ injeksi)	Alum 100 µL (Total: 100 µL/injeksi)

Sumber: Fredrikson *et al.*, 2008; Wigren *et al.*, 2009.

4.7.2.4 Pembuatan Ransum Makanan Diet Normal dan Diet Aterogenik

a. Diet normal modifikasi AIN-93M

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 dan mineral yang telah dihaluskan, kemudian dimixer hingga homogen.
3. Ditambahkan air 400 ml secara bertahap.
4. Ditambahkan minyak kedelai.
5. Gelatin dicampurkan dengan air dingin 100 ml, 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.
- b. Diet aterogenik modifikasi AIN-93M

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 ml , 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.

4.7.2.5 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. Diet normal diberikan selama 10 minggu untuk kelompok kontrol negatif (K_n) dan 2 minggu untuk kelompok kontrol positif (K_p), 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).

4.7.2.6 Pembedahan Tikus

Setelah pemberian diet perlakuan selama 56 hari dan penyuntikan vaksin maka dilakukan pembedahan tikus untuk pengambilan darah 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. Darah diambil dengan spuit 5 ml melalui jantung dan di simpan dalam tabung vakum tutup merah (*vacutainer non additive*).

4.7.2.7 Pengukuran Kadar IgG Anti-LOX-1

Metode yang digunakan dalam pengukuran kadar IgG anti-LOX-1 adalah metode ELISA. Sebelumnya, dilakukan preparasi sampel, reagen dan standar.

a. Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan berupa serum yang didapatkan dari hasil sentrifugasi. Berikut adalah prosedur untuk preparasi sampel:

1. Darah dimasukkan ke dalam tabung vakum tutup merah (*vacutainer non additive*) dan dibiarkan selama 20 menit pada suhu ruang.
 2. Disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit.
 3. Diambil supernatan secara perlahan menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam mikrotube yang sebelumnya telah diberi label sesuai kelompok penelitian.
 4. Disimpan pada suhu -40°C .
- b. Preparasi reagen

Wash buffer digunakan untuk pencucian well setelah diinkubasi.

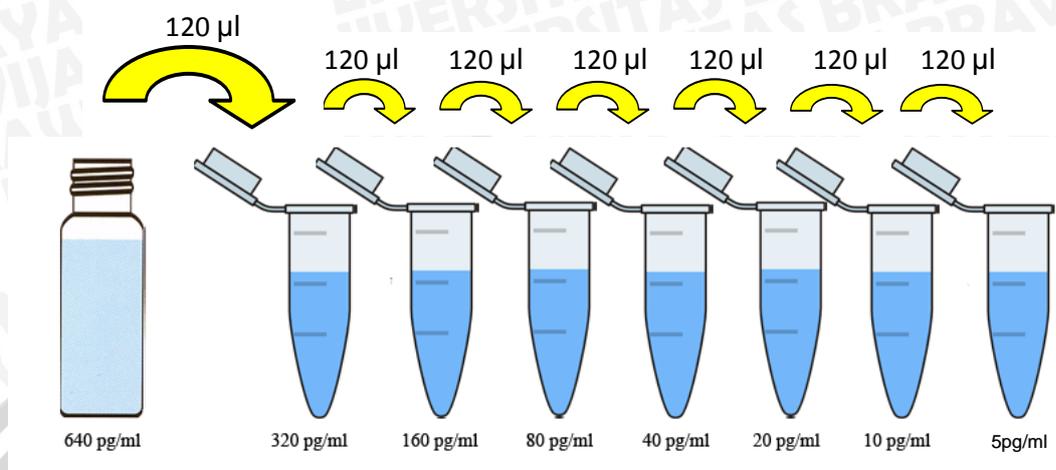
Berikut adalah prosedur preparasi *wash buffer*:

1. Diambil *wash buffer concentrate* (30 X) sebanyak 4,167 ml menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
 2. Ditambahkan *distillated water* ad 125 ml.
 3. Dicampur ad homogen dengan menggoyang-goyangkan erlenmeyer.
- c. Preparasi larutan standar

Larutan induk dengan konsentrasi 640 pg/ml diencerkan menjadi beberapa seri larutan standar dengan konsentrasi 320 pg/ml, 160 pg/ml, 80 pg/ml, 40 pg/ml, 20 pg/ml, 10 pg/ml, 5 pg/ml dan 0 pg/ml. Perhitungan lengkap kebutuhan volume untuk pembuatan larutan standar dapat dilihat pada Lampiran 4 yang dirangkum dalam Tabel 4.5 berikut ini:

Tabel 4.5 Kebutuhan Volume untuk Pembuatan Larutan Standar

No.	Konsentrasi (pg/ml)	Volume larutan standar yang diambil (μl)	Volume pelarut yang ditambahkan (μl)	Volume akhir (μl)
7	320	120 μl larutan induk	120	240
6	160	120 μl standar no.6	120	240
5	80	120 μl standar no.5	120	240
4	40	120 μl standar no.4	120	240
3	20	120 μl standar no.3	120	240
2	10	120 μl standar no.2	120	240
1	5	120 μl standar no.1	120	240
0	0	-	120	120



Gambar 4.1 Skema Pembuatan Larutan Standar

Berikut adalah prosedur pembuatan larutan standar:

1. Disiapkan 8 buah mikrotube dan diberi label larutan standar 0-7.
2. Diambil *standard diluents* sebanyak 120 µl menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam masing-masing mikrotube.
3. Diambil larutan induk sebanyak 120 µl dan dimasukkan ke dalam mikrotube 7, kemudian divortex ad homogen (larutan standar no. 7).
4. Diambil larutan standar no. 7 sebanyak 120 µl dan dimasukkan ke dalam mikrotube 6, kemudian divortex ad homogen (larutan standar no. 6).
5. Diambil larutan standar no. 6 sebanyak 120 µl dan dimasukkan ke dalam mikrotube 5, kemudian divortex ad homogen (larutan standar no. 5).
6. Diambil larutan standar no. 5 sebanyak 120 µl dan dimasukkan ke dalam mikrotube 4, kemudian divortex ad homogen (larutan standar no. 4).

7. Diambil larutan standar no. 4 sebanyak 120 μl dan dimasukkan ke dalam mikrotube 3, kemudian divortex ad homogen (larutan standar no. 3).
8. Diambil larutan standar no. 3 sebanyak 120 μl dan dimasukkan ke dalam mikrotube 2, kemudian divortex ad homogen (larutan standar no. 2).
9. Diambil larutan standar no. 2 sebanyak 120 μl dan dimasukkan ke dalam mikrotube 1, kemudian divortex ad homogen (larutan standar no. 1)
10. Sedangkan mikrotube 0 merupakan larutan standar no. 0 yang hanya berisi 120 μl *standard diluents*.

Semua reagen harus dicampur ad homogen sebelum dipipet, dan jangan sampai terbentuk busa. Setiap well digunakan satu kali, tidak dianjurkan untuk diulang. Prosedur pengukuran menggunakan metode ELISA adalah sebagai berikut:

1. Dilakukan pemberian standar dan sampel pada well sesuai peta ELISA plate (lampiran 1).
 - a. Well larutan standar : dimasukkan masing-masing larutan standar sebanyak 50 μl .
 - b. Well sampel : ditambahkan sampel sebanyak 40 μl dan antibodi sekunder (antibodi IgG anti-LOX-1) sebanyak 10 μl .
2. Ditambahkan SA-HRP sebanyak 50 μl pada masing-masing well
3. Ditutup dengan seal plate membrane dan aluminium foil.
4. Diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

5. Dilakukan pencucian well (aspirasi) dengan *wash buffer* (500 μ l / well) . Volume ini dapat dikurangi jika dirasa isi well terlalu penuh akan cairan. Dipastikan bahwa tidak terdapat gelombang pada *well* dimana jeda antara pemberian *wash buffer* dan pembuangan adalah \pm 30 detik.
6. Ditambahkan larutan kromogen A sebanyak 50 μ l pada setiap well.
7. Ditambahkan juga larutan kromogen B sebanyak 50 μ l, lalu digoyangkan secara perlahan ad larut.
8. Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C.
9. Ditambahkan 50 μ l *stop solution* pada masing-masing well untuk menghentikan reaksi (terjadi perubahan warna dari biru ke kuning).
10. Dilakukan perhitungan *optical density* (OD) menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

4.8 Analisis Data

Seluruh teknis pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Pada penelitian ini akan dianalisis asupan makanan, kenaikan berat badan, dan kadar antibodi anti-LOX-1. Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan maka dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode yang digunakan yaitu uji parametrik *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan alternatifnya yaitu uji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

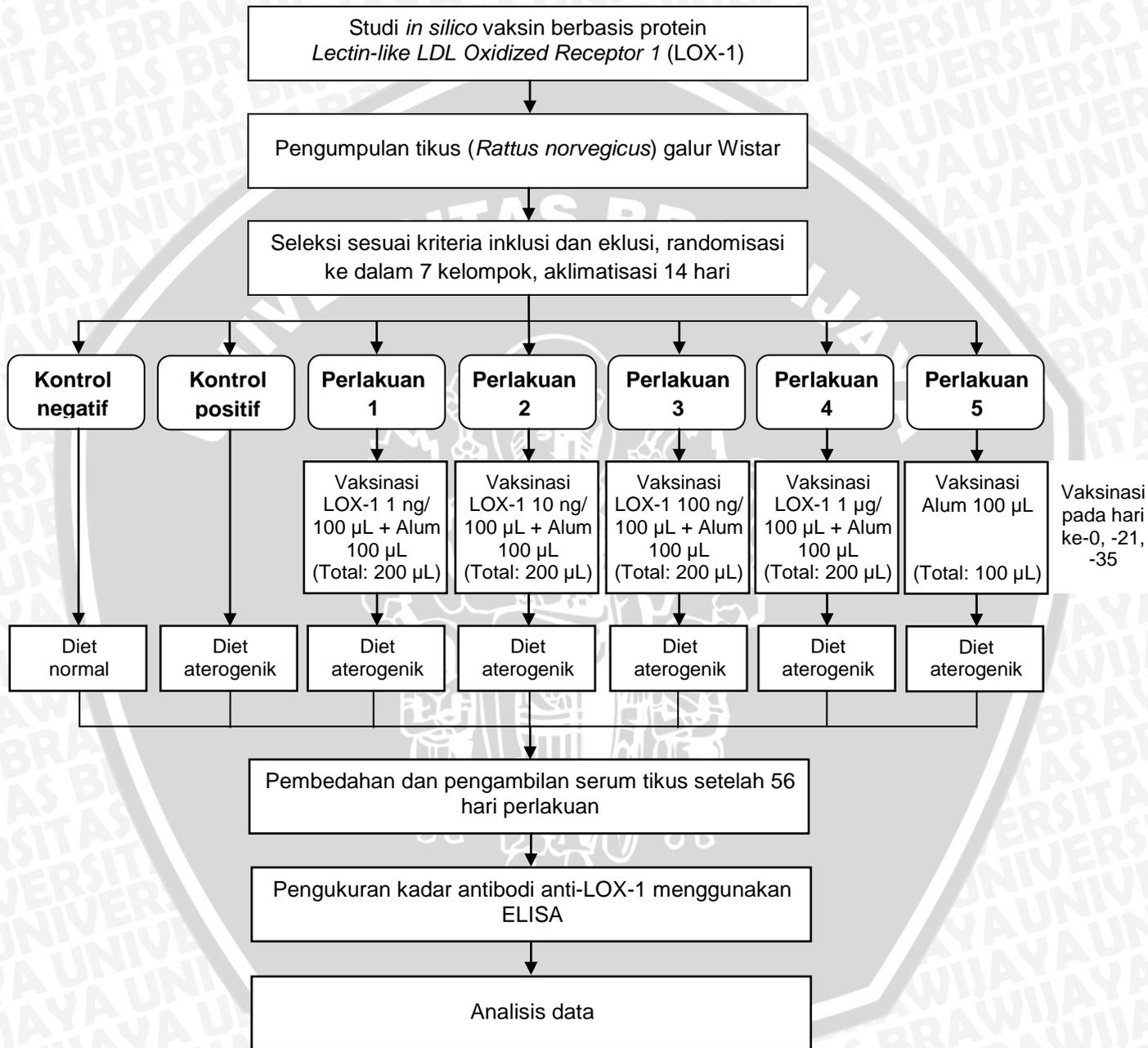
Metode *One-Way* ANOVA dapat digunakan jika data memenuhi syarat-syarat uji parametrik sebagai berikut (Dahlan, 2004):

1. Terdapat minimal tiga kelompok yang 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 untuk menormalkan data sehingga didapatkan distribusi data normal.
3. Varians data sama atau homogen ($p > 0,05$), yang dapat diketahui dari uji homogenitas. Jika varians data tidak sama atau tidak homogen, maka dilakukan transformasi data untuk menghomogenkan sehingga didapatkan varians data sama atau homogen.
4. Jika data hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama atau tidak homogen, maka alternatif uji yang digunakan adalah uji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

Uji *One-way ANOVA* atau *Kruskal-Wallis* digunakan untuk menganalisis apakah terdapat perbedaan hasil yang bermakna antar masing-masing kelompok penelitian dengan melihat nilai p . Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna, maka dilakukan uji *Post-hoc* dengan *Tukey HSD* untuk data yang menggunakan uji *One-way ANOVA* dan uji *Mann-Whitney* untuk data yang menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Untuk mengetahui seberapa kuat hubungan antara pemberian vaksin terhadap kadar antibodi anti-LOX-1, dilakukan uji kolerasi Pearson dengan alternatifnya adalah uji kolerasi Spearman jika syarat uji parametrik tidak terpenuhi. Dari uji kolerasi 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 kolerasi didasarkan pada nilai p , kekuatan kolerasi (r) dan arah kolerasi (Dahlan, 2011).

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Diagram Alur Penelitian

