

METODE ANALISIS KUALITATIF DAN KUANTITATIF LDL-C MENGGUNAKAN ELEKTROFORESIS AGAROSE DAPAR TAE (TRIS-ASAM ASETAT-EDTA)

Putu Rosi Setyari¹, Dr.rer.nat IMA Gelgel Wirasutha¹, Dr. Drs.I Ketut Junitha²

Jurusan Farmasi¹, Jurusan Biologi²
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

ABSTRACT

In this research had been done the development of analysis qualitative and quantitative methods of LDL-C in human serum using agarose electrophoresis. The methods that had been developments are separation lipoprotein in human serum using agarose electrophoresis with TAE pH 8,6 buffer system and quantification methods for LDL-C using spectrophotometer UV-Vis.

The aim of this research is to find out a simple method that can separate lipoproteins of human serum and quantificating LDL-C.

The results of this research shows agarose electrophoresis with TAE pH 8,6 buffer system could separate LDL-C in human serum as good as electrophoresis with Na-Barbital buffer system. However, for its quantification only can be done with spectrophotometer UV-Vis.

Key words: LDL-C, lipoproteins, electrophoresis, separation

PENDAHULUAN

Penyakit Jantung Koroner (PJK) seringkali dikaitkan dengan kadar kolesterol dalam tubuh. Kolesterol biasanya ditemukan berintegrasi dengan berbagai lipoprotein yang ada di dalam serum. Ada dua jenis lipoprotein pembawa kolesterol yang berkaitan dengan PJK yaitu lipoprotein densitas tinggi (HDL) dan lipoprotein densitas rendah (LDL). Kolesterol yang berintegrasi dengan lipoprotein densitas tinggi sering disebut dengan HDL-C, sedangkan kolesterol yang berintegrasi dengan lipoprotein densitas rendah disebut LDL-C. LDL-C memiliki aktivitas aterogen. Sedangkan, HDL-C memiliki aktivitas anti-aterogen (Tjay dan Kirana, 2007). Oleh karena itulah, LDL-C dan HDL-C digunakan sebagai marker untuk penilaian resiko PJK (Rifai, 1992).

Keberadaan LDL dalam tubuh manusia biasanya diketahui dengan melakukan elektroforesis pada serum darah. Jenis media gel yang biasanya digunakan adalah PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis). PAGE lebih banyak digunakan dalam analisis LDL dalam serum karena PAGE dinilai lebih

sensitif dalam memisahkan molekul protein (Janson and L.Ryden, 1998). Namun, PAGE memiliki harga yang tinggi dipasaran sehingga untuk melakukan analisis LDL diperlukan biaya yang relatif mahal. Media gel PAGE biasanya digunakan dengan kombinasi SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ataupun yang berjenis gradien poliakrilamid 4%-22%. Selain PAGE, agarose juga dapat digunakan dalam pemisahan protein. Larutan pendapar yang biasa digunakan dalam metode ini adalah Na-Barbital Namun, keberadaannya dan distribusinya dimasyarakat sangat diawasi sehingga sangat sulit didapatkan. Keberadaannya yang sangat sedikit juga berdampak pada harganya yang sangat mahal dipasaran. Hal ini dikarenakan Na-Barbital merupakan salah satu obat psikotropika, sehingga peredarannya diatur pemerintah (Janson and L.Ryden, 1998). Menurut Primrose and R.W. Old (1994), kebanyakan peran agarose adalah sebagai media gel elektroforesis digunakan dalam pemisahan molekul DNA (Deoxyribose Nucleid Acid). Larutan pendapar yang biasa digunakan dalam pemisahan molekul DNA adalah dapar TAE (Tris-Asam Asetat-EDTA). Keberadaan dapar ini lebih mudah

ditemukandi pasaran serta harganya relatif lebih murah dari Na-Barbital. Karena dapar ini mampu melindungi molekul DNA dari kerusakan selama proses elektroforesis berlangsung.

Dari uraian diatas, maka dalam penelitian ini dicobakan penggunaan elektroforesis agarose dapar TAE pH 8,6 untuk uji kualitatif lipoprotein yang terdapat dalam serum serta analisis kuantitatif kolesterol total, LDL-C dan HDL-C secara spektrofotometri. Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai usaha pengembangan metode analisis kualitatif dan kuantitatif kolesterol baik kolesterol total, LDL-C dan HDL-C menggunakan elektroforesis agarose dapar TAE-spektrofotometer.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: darah, EDTA, standar kolesterol merek Biocon, reagen kit CHOD-PAP kolesterol merek Biocon, larutan dapar TAE pH 8,6, akuades steril, loading dapar, EtBr (Ethidium Bromida).

Metode Penelitian

1. Preparasi Sampel

Sampel penelitian ini adalah darah manusia. Berikut merupakan beberapa tahapan perlakuan terhadap sampel sebelum dielektroforesis, yaitu: darah diambil dari pendonor dan ditampung dalam tabung reaksi yang berisi EDTA. Darah disentrifugasi dengan menggunakan alat sentrifugasi mikro merek Hitachi berkecepatan 7000 rpm selama 15 menit pada suhu 37°C sehingga serum plasma terpisah dari darah. Terdapat dua lapisan setelah sentrifugasi dilakukan yaitu lapisan bawah atau debris (sel darah) dan lapisan atas atau supernatan. Lapisan supernatan (serum) diambil menggunakan pipet mikro dan ditempatkan pada tabung effendorf. Serum tersebut kemudian disimpan pada suhu -20°C selama menunggu proses selanjutnya (Archer et al, 2003).

2. Metode Elektroforesis Agarose dapar TAE

Pembuatan Larutan Dapar TAE pH 8,6

Dipipet sebanyak 20 mL larutan baku stok dapar TAE 50 kali (48,4 gram Tris; 11,4 gram Asam Asetat; 7,4 gram EDTA) ke dalam labu ukur 1000 mL dan akuades steril ditambahkan sampai tanda batas. Larutan tersebut kemudian dikocok perlahan hingga homogen.

Pembuatan Larutan Agarose

Agarose ditimbang sebanyak 2 gram dengan neraca analitik dan ditambahkan 100 mL larutan dapar TAE pH 8,6. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada suhu 100°C, sambil diaduk dengan magnetik stirer hingga suhu sedikit menurun dan homogen.

Cara Kerja

Sebanyak 8 mL larutan agarose 2% yang telah dilarutkan dengan 8 mL dapar TAE pH 8,6 dituangkan pada cetakan gel yang telah berisi comb. Sampel diinjeksikan pada sumur gel. Gel agarose yang berisi sampel dielektroforesis 110 Volt selama 60 menit. Gel yang telah dielektroforesis, dibagi menjadi 2 bagian. Bagian pertama di-staining dalam EtBr (Ethidium Bromida) selama 10 menit, kemudian dilanjutkan dengan destaining bagian tersebut ke dalam akuadestilata. Lihat perpendaran pita di bawah sinar UV. Bagian agar yang lainnya kemudian dipotong sesuai dengan perpendaran pita yang terlihat dibawah sinar UV. Potongan-potongan agar tersebut kemudian didestruksi dalam 1000 µL reagen kit kolesterol dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Potongan gel yang telah diinkubasi disaring menggunakan kertas saring untuk mendapatkan hasil ekstraksinya. Kemudian diencerkan dengan 1000 µL dapar TAE pH 8,6. Absorbansi larutan tersebut diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya 500 nm. Bagan proses di atas yang dapat dilihat pada gambar 1.

Penetapan Kadar LDL-C

Sebelum kadar LDL-C dalam sampel ditetapkan, perlu diketahui terlebih dahulu persen LDL yang terdapat dalam sampel. Jika

menggunakan metode spektrofotometri-UV Vis, absorbansi fraksi LDL dimasukkan kedalam persamaan regresi yang didapat dari kolesterol total. Hasil yang didapat diubah dalam bentuk persen. Untuk mendapatkan kadar LDL-C maka persen LDL dikalikan dengan kadar kolesterol total sampel untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat (Ohno, 1983; Rifai, 1992).

3. Metode Pengukuran Kolesterol Total

Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 1000 μ L akuades steril dipipet menggunakan pipet mikro kemudian ditambahkan dengan 1000 μ L reagen kit CHOD-PAP (Cholesterol Oxydase-Peroxidase Amino Antipyrine) kolesterol merek Biocon. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.

Pembuatan Larutan standar

Dibuat variasi konsentrasi larutan standar kolesterol 50, 100,150 dan 200 mg/dL. Berikut tabel cara membuat larutan stok standar:

Tabel 1. Cara pembuatan larutan stok standar kolesterol

No.	Larutan stok standar (mg/dL)	Jumlah yang dipipet (μ L)	
		Larutan standar kolesterol 200 mg/dL	Air steril
1	50	50	150
2	100	100	100
3	150	150	50
4	200	200	-

Dari larutan stok standar diatas, dipipet sebanyak 10 μ L menggunakan pipet mikro kemudian ditambahkan dengan 1000 μ L reagen kit CHOD-PAP kolesterol merek Biocon. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Absorbansi masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada maksimum 546 nm.

Pembuatan Larutan Sampel

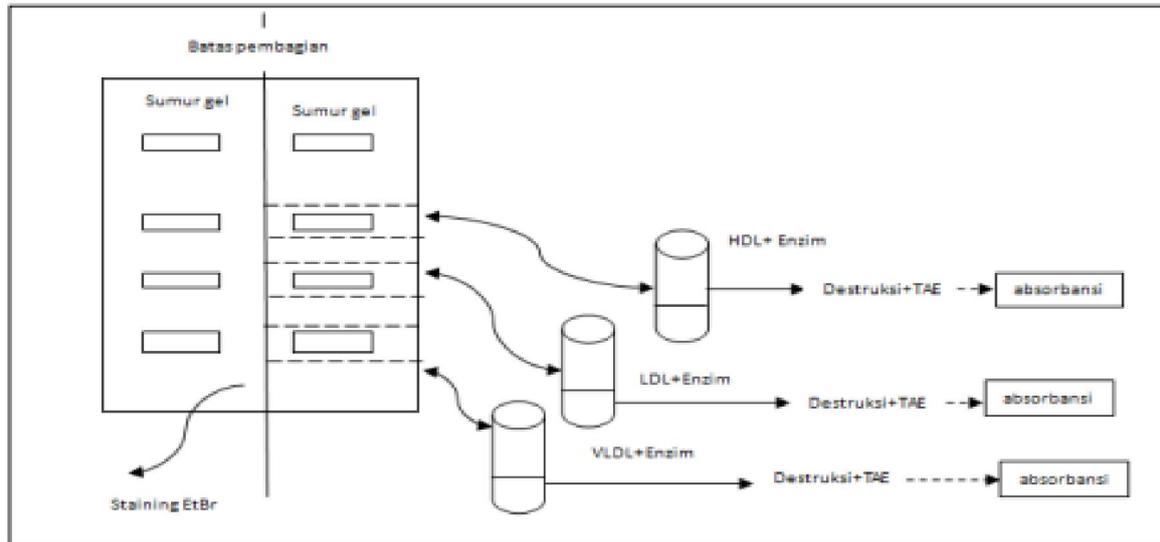
Dipipet sebanyak 10 μ L serum menggunakan pipet mikro, kemudian ditambahkan dengan 1000 μ L reagen kit CHOD-PAP kolesterol merek Biocon. Larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada maksimum 546 nm.

Cara Kerja

Adapun cara kerja pengukuran kolesterol total dalam serum, yaitu: alat spektrofotometer UV-Vis dinyalakan dan diset pada maksimum 546 nm. Absorbansi larutan standar dan sampel diukur pada maksimum 546 nm. dan dicatat absorbansinya.

Penetapan Kadar Kolesterol Total

Penetapan kadar kolesterol total dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi $y=bx+a$ yang dihasilkan dari plot antara konsentrasi standar dan absorbansinya. Masukkan nilai absorbansi sampel pada persamaan regresi yang didapat. Konsentrasi kolesterol total dinyatakan dalam satuan mg/dL (Swantara, 1996).



Gambar 1. Cara kerja analisis LDL-C menggunakan metode elektroforesis agarose dapar TAE pH 8,6-spektrofotometer UV-Vis

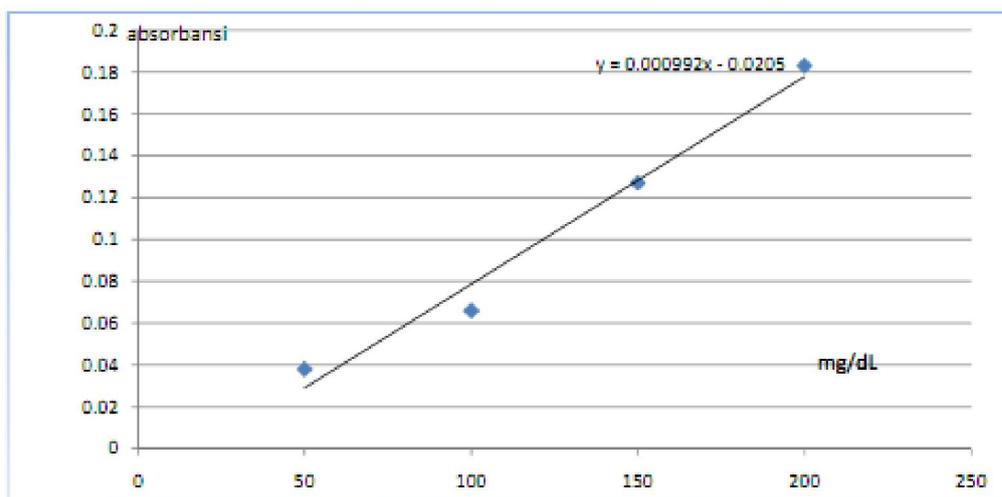
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengukuran Kadar Kolesterol Total

Pengukuran kadar kolesterol total dalam sampel dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Analisis ini berjalan secara enzimatis. Reagen CHOD-PAP yang digunakan, bekerja dalam tiga tahap reaksi yaitu reaksi hidrolisis, oksidasi dan pemasangan (couple reaction). Reaksi hidrolisis dilakukan dengan bantuan enzim pengkatalisis kolesterol ester menjadi kolesterol yaitu enzim kolesterolesterase. Enzim ini menghidrolisis ikatan kolesterol ester sehingga menjadi kolesterol. Memasuki tahap oksidasi, kolesterol kemudian dioksidasi menjadi cholest-4-ene-3-one dengan bantuan enzim kolesterol oksidase. Namun kelemahan cholest-4-ene-3-one tidak dapat menunjukkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang yang diinginkan. Sehingga, ketika tidak mungkin memonitor secara langsung progress dari sebuah reaksi, maka peroksidase bersama 4-amino antipyrine yang terkandung pada reagen CHOD-PAP akan membentuk couple reaction menghasilkan quinoneimine kromogen. Quinoneimine kromogen inilah yang akan diukur absorbansinya dan mewakili absorbansi

kolesterol (Ratna, 2007). Pada analisis ini sebelum mengukur kadar kolesterol total sampel, dibuat empat variasi konsentrasi standar dengan rentang konsentrasi sebesar 50 mg/dL; 100 mg/dL; 150 mg/dL; dan 200 mg/dL dengan tujuan untuk membuat kurva standar atau kalibrasi. Plot antara absorbansi terhadap konsentrasi merupakan garis lurus yang mengikuti persamaan regresi dengan model $y = bx + a$ (Swantara, 1996).

Kurva kalibrasi antara konsentrasi standar kolesterol total dengan absorbansi (gambar 2) memberikan koefisien korelasi $r = 0,99$. Linieritas dari kurva diatas menunjukkan hubungan erat yang antara konsentrasi dengan absorbansi pada rentang pengukuran. Berdasarkan data tersebut pada rentang pengukuran memenuhi hukum Lambert-beer. Dari pengukuran absorbansi sampel didapat sebesar 0,211. Sehingga, dari perhitungan kadar didapatkan kadar kolesterol total sebesar 233,33 mg/dL. Nilai kadar kolesterol tersebut termasuk dalam klasifikasi batas tinggi, karena memiliki kadar kolesterol total antara 200-240 mg/dL. Tinggi rendahnya kadar kolesterol total ini berpengaruh terhadap tinggi rendahnya resiko jantung koroner pada suatu individu (Tim Penyusun, 2005).

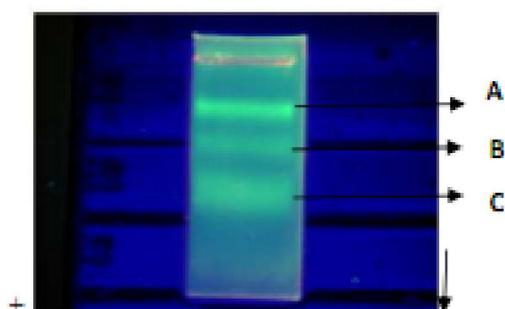


Gambar 2. Kurva Kalibrasi Standar Kolesterol Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

2. Elektroforesis Agarose Dapar TAE Sebagai Metode Uji Kualitatif LDL-C

Setelah elektroforesis selesai, gel akan di-staining dan di-destaining. Staining dengan EtBr berfungsi untuk mewarnai protein, karena EtBr membantu menjembatani bagian-bagian protein yang menumpuk sehingga dapat tervisualisasikan dengan jelas (Primerose and R.W. Old, 1994). Destaining beberapa saat berfungsi untuk menghilangkan warna yang menempel pada permukaan gel, sehingga saat divisualisasi dengan lampu UV, pita-pita yang terdapat dalam gel dapat terlihat (Franks, 1993). EtBr adalah agen pewarna yang memberikan fluoresensi saat divisualisasi dengan lampu UV. Sifat khas inilah yang dimanfaatkan dalam uji kualitatif protein.

Uji kualitatif lipoprotein dapat dilihat dengan adanya pita-pita yang mewakili jenis-jenis lipoprotein yang memisah. Berikut merupakan hasil visualisasi pemisahan lipoprotein di bawah sinar UV:



Gambar 3. Visualisasi lipoprotein dengan EtBr Di Bawah Sinar UV

Hasil di atas menunjukkan bahwa terdapat 3 pita yang secara berturut-turut A, B dan C. Uji kualitatif dengan EtBr hanya menunjukkan pemisahan lipoprotein saja namun tidak dapat menunjukkan adanya ikatan lipoprotein dengan kolesterol. Untuk mengatasi kekurangan di atas, maka dilakukan pengembangan metode enzimatik dengan memanfaatkan EtBr sebagai penanda. Ikatan lipoprotein dengan kolesterol dapat diketahui dengan mendestruksi bagian agar yang telah ditandai sebagai A, B, dan C serta diekstraksi dengan menggunakan enzim CHOD-PAP. Hasil ekstraksi diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada daerah pengukuran 400-600 nm sehingga didapatkan spektrum absorbansi kolesterol dari masing-masing pita yang kemudian dibandingkan dengan bentuk spektrum kolesterol total. Berikut gambar 4, 5, 6, dan 7 yang merupakan spektrum absorbansi kolesterol dari fraksi A, B dan C serta spektrum kolesterol total secara berturut-turut.

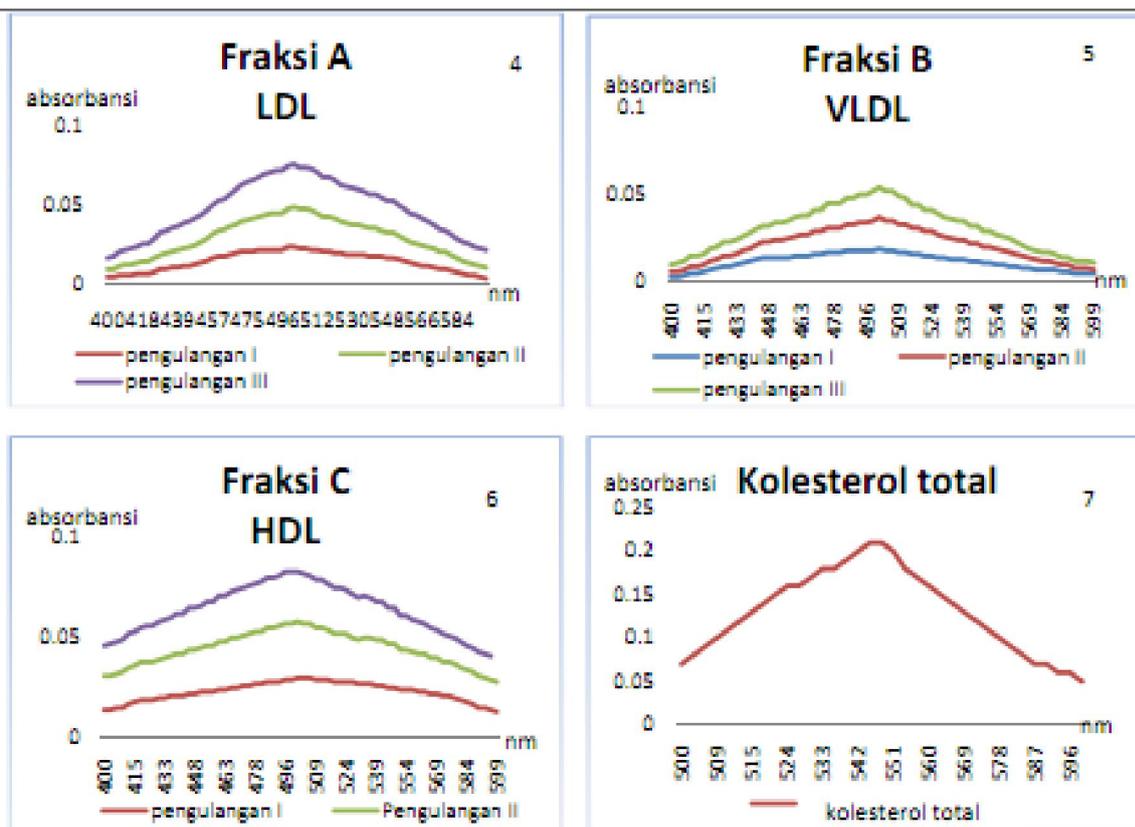
Hasil yang didapat menunjukkan bahwa bentuk spektrum yang diberikan ketiga pita tersebut sama dengan bentuk spektrum kolesterol total. Hal ini berarti, ketiga spektrum di atas yaitu A, B dan C memiliki ikatan dengan kolesterol karena memberikan bentuk kurva yang sama. Untuk menentukan jenis lipoprotein yang terkandung pada A, B, dan C maka dilakukan tinjauan pustaka.

Dilihat dari segi mobilitas elektroforetiknya, mobilitas lipoprotein densitas rendah lebih pendek daripada VLDL, karena LDL bersifat kurang negatif dari VLDL. Hal ini dikarenakan sedikitnya kandungan protein dalam LDL. Pita HDL adalah pita yang memiliki mobilitas yang paling jauh dan mendekati anoda karena 50% struktur HDL terdiri atas protein (Guyton, 1997). Hal inilah yang membuat HDL menjadi protein yang bermuatan sangat negatif dibanding LDL dan VLDL. Sehingga, hal ini membuat HDL saat dielektroforesis akan sangat tertarik mendekati anoda (kutub positif). Dari uraian tersebut makadapat dikatakan pita A merupakan LDL, pita B merupakan VLDL dan pita C merupakan HDL.

Dilihat dari segi absorbansi yang diberikan, pita A (LDL) menunjukkan absorbansi yang lebih besar dari pita B (VLDL), karena menurut Guyton (1997) LDL mengandung kolesterol dalam jumlah yang lebih besar dari VLDL. Namun pita C (HDL) memberikan nilai absorbansi yang paling besar, padahal menurut Guyton (1997), HDL merupakan lipoprotein yang mengandung kolesterol dalam jumlah kecil. Absorbansi yang besar dari pita C ini, kemungkinan disebabkan pada saat elektroforesis HDL belum terpisah dengan albumin. Albumin merupakan protein plasma yang menjadi sumber asam amino. Pada keadaan normal satu molekul albumin dapat berikatan dengan asam lemak ester seperti kolesterol. Namun, pada keadaan tertentu dimana tubuh membutuhkan transport asam lemak dalam waktu singkat, satu molekul albumin dapat berikatan dengan 30 molekul asam lemak ester

seperti kolesterol (Guyton, 1997). Hasil ini disebabkan oleh pemisahan yang tidak sempurna antara HDL dan albumin.

Dari kajian literatur Chalvardjian (1971), hasil yang sama pun ditunjukkan oleh elektroforesis yang menggunakan dapar berkekuatan ion tinggi seperti Glycine-Na-Barbital. Dapar TAE dapat memisahkan lipoprotein seperti dapar Glycine-Na-Barbital diperkirakan akibat adanya kandungan tris pada dapar TAE yang dapat melindungi protein dari kerusakan (Franks, 1993). Kandungan EDTA-nya juga berfungsi menghambat enzim protease yang dapat merusak dan mengendapkan protein (Deutscher, 1990). Menurut Chalvardjian (1971), untuk memisahkan antara HDL dan albumin diperlukan metode pemisahan lanjutan seperti ultrasentrifugasi. Menurut Janson and Ryden (1998), kelebihan dari dapar yang mengandung Na-Barbital apabila dibandingkan dengan dapar TAE adalah terletak pada kekuatan ionnya yang berefek memberikan resolusi tinggi dan ketajaman bentuk pita. Hal yang sama juga dikemukakan Monthny et al (1978), Na-Barbital memberikan ketajaman bentuk pita daripada dapar-dapar lainnya yang biasa digunakan dalam pemisahan lipoprotein. Dapar jenis ini mampu mendeterminasi bentuk-bentuk lipoprotein lebih spesifik yang sangat bermanfaat dalam fenotifikasi penyakit hiperlipoproteinemia (Papadopoulos, 1978). Dari uraian di atas, maka metode elektroforesis agarose dengan menggunakan dapar TAE pH 8,6 dapat digunakan untuk memisahkan lipoprotein dalam serum.



Keterangan gambar:

4. Spektrum Spektrofotometer UV-Vis Kolesterol Fraksi LDL pada λ 400-600 nm
5. Spektrum Spektrofotometer UV-Vis Kolesterol Fraksi VLDL pada λ 400-600 nm
6. Spektrum Spektrofotometer UV-Vis Kolesterol Fraksi HDL pada λ 400-600 nm
7. Spektrum Spektrofotometer UV-Vis Kolesterol total pada λ 500-600 nm

3. Metode Kuantifikasi LDL-C Menggunakan Alat Spektrofotometer UV-Vis

Absorbansi yang diberikan fraksi LDL-C dan HDL-C dari pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dapat dilihat pada tabel 2. Absorbansi fraksi LDL-C adalah sebesar 0,0253 sedangkan absorbansi fraksi HDL-C adalah sebesar 0,028. Besarnya konsentrasi LDL-C dan HDL-C didapat dengan memanfaatkan persamaan regresi yang didapat saat pengukuran kolesterol total. Hasil tersebut kemudian dikalikan dengan besarnya kadar kolesterol total yang dimiliki sampel (Ohno,1983; Rifai, 1992). Konsentrasi LDL-C yang dimiliki sampel adalah 107,34 mg/dL. Sedangkan konsentrasi HDL-C Sampel adalah sebesar 113,87 mg/dL (Tabel 2). Untuk

mengetahui seberapa efektif metode ini dalam menganalisis kadar LDL-C yang menjadi marker resiko jantung koroner, maka konsentrasi di atas akan dibandingkan dengan konsentrasi yang didapat dari pengukuran di salah satu laboratorium klinik di Denpasar. Perbandingan konsentrasi LDL-C dan HDL-C menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dan alat Modular Prodia dapat dilihat pada tabel 3. Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa konsentrasi LDL-C yang didapat dari metode yang digunakan dalam penelitian ini apabila dibandingkan dengan konsentrasi yang didapat dari Prodia memiliki selisih sebesar 17,66 mg/dL. Selain itu, hasil dari keduanya juga sama-sama dapat menunjukkan bahwa kadar LDL-C Sampel termasuk ke dalam kategori mendekati optimal (100-129 mg/dL) serta sama-sama dapat menunjukkan bahwa Sampel

tidak memiliki resiko PJK (Rifai, 1992). Hasil tersebut belum dapat menunjukkan efektifitas metode spektrofotometer UV-Vis, karena belum bisa dilakukan uji statistik. Namun, selisih hasil yang besar ditunjukkan saat membandingkan kadar HDL-C. Perbedaan hasil yang cukup besar ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan dalam penelitian ini belum dapat mengkuantifikasi HDL-C dengan baik. Hal ini

disebabkan oleh pemisahan yang tidak sempurna antara albumin dan protein HDL. Metode ini memiliki nilai LOD (Limit of Detection) dan LOQ (Limit of Quantitation) secara berturut-turut sebesar 35,0 dan 116,7. Dari uraian diatas, metode ini dapat dipakai membantu menilai resiko PJK pada suatu individu. Walaupun, metode ini belum dapat mengkuantifikasi LDL-C sebaik laboratorium klinik.

Tabel 2. Konsentrasi LDL-C dan HDL-C pada Sampel Dengan Spektrofotometer UV-Vis

No.	Fraksi	Absorbansi pada pengulangan			Absorbansi Rata-rata	Konsentrasi (mg/dL)
		I	II	III		
1.	LDL-C	0,024	0,025	0,027	0,0253	107,34
2.	HDL-C	0,030	0,028	0,026	0,028	113,87

Tabel 3. Perbandingan Konsentrasi Yang Didapatkan Dengan Hasil Dari Prodia

No.	Fraksi	Konsentrasi (mg/dL)	
		Spektrofotometer UV-Vis	Modular Prodia
1.	LDL-C	107,34	124
2.	HDL-C	113,87	45

KESIMPULAN

Dari uraian diatas, maka dapat disimpulkan bahwa elektroforesis agarose dengan sistem dapar TAE (Tris-Asam Asetat-EDTA) pH 8,6 dapat digunakan sebagai metode pemisahan lipoprotein (LDL, VLDL dan HDL) dalam serum. Analisis kuantitatif LDL-C dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis melalui bantuan ekstraksi LDL dengan enzim CHOD-PAP karena dapat memberikan hasil yang relatif sama dengan hasil dari laboratorium klinik.

DAFTAR PUSTAKA

Archer, W. et al. 2003. High Carbohydrate and High Monounsaturated Fatty Acid Diets Similary Affect LDL Electroforetic Characteristic in Men Who Are Losing Weight. USA. American Society for Nutritional Sciences: 3124-3126: diambil dari URL:

jn.nutrition.org., diakses 19 Oktober 2008.

Chalvardjian, A. 1971. Agarose-Starch Gel Electrophoresis of Rat Serum Lipoproteins. Journal of Lipid Research Vol. 12. Canada. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc: 872-873: diambil dari URL: www.jlr.org., diakses 2 Februari 2009.

Deutscher, M.P. 1990. Methods in Enzymology Guide to Protein Purification. San Diego. Academic Press. p. 259-260.

Franks, F. 1993. Protein Biotechnology, Isolation, Characterization and Stabilization. Totowa-New Jersey. Humana Press. p. 1-10, 313-326, 333, 489, 529.

Guyton, A. and Hall. 1997. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran ECG. p. 1088-1089.

Janson and L.Ryden, 1998. Protein Purification Principles, High Resolution Methods and Applications. New York. A

- john Willey and Sons Inc. Publication. p. 463-549
- Monthony, et al. 1978. A Non-Barbital Buffer for immunoelectrophoresis and Zone Electrophoresis in Agarose Gels. *Clinical Chemistry* Vol. 24 No.10: 1825-1827: diambil dari URL: www.jlr.org., diakses 11 Juni 2009.
- Ohno, F, et all. 1983. Studies On The Phenotyping System Of Hyperlipoproteinemia. Tokyo-Japan. *Japan Med.* Vol 22. No.3: 200-205: diambil dari URL: www.jlr.org., diakses 19 Oktober 2008.
- Papadopoulos, N.M. 1978. Hyperlipoproteinemia Phenotype Determination by Agarose Gel Electrophoresis Update. Bethesda. *Clinical Chemistry* Vol. 24 No.2: 227-229. diambil dari URL: www.jlr.org., diakses 11 Juni 2009.
- Primrose and R.W. Old. 1994. Prinsip-prinsip Manipulasi Gen Pengantar Rekayasa Genetik. Jakarta. Universitas Indonesia Press. p. 3-6.
- Ratna,S. 2007. Pengukuran Kadar Kolesterol Dengan Enzim Sebagai Reagen Pada Kimia Klinik. Surabaya: Airlangga.
- Rifai, N., Russell W.,et al. 1992. Measurement Of Low Density Lipoprotein Cholesterol In Serum: A Status Report. *Clinical Chemistry* Vol38 No.1:150-154: diambil dari URL: www.jlr.org., diakses 11 Juni 2009.
- Swantara, I Made. 1996. Analisis Kimia Instrumental. Denpasar. Jurusan Kimia F.MIPA Universitas Udayana. p. 9-20.
- Tim Penyusun. 2005. Pemeriksaan Lipid dan Penyakit Jantung Koroner. Jakarta. Prodia Clinic Laboratories.
- Tjay, Drs.T.H. dan Drs. Kirana R. 2007. Obat-Obat Penting. Jakarta. Penerbit Elex Media Komputindo. p.569-574.
- Watanabe, H. et al. 2006. Decrease High-Density Lipoprotein (HDL) Particle Size, Pre-β₁, and Large HDL Subspecies Concentration in Finnish Low-HDL Families: Relationship With Intima-Media Thickness. Dallas. American Hearts Association: 897-902: diambil dari URL: atbv.ahajournals.org., diakses 19 Oktober 2008.