

Hang Tuah

MEDICAL JOURNAL

VOLUME 10 NOMOR 1 JANUARI 2012

Fokus

- **GANGGUAN TIDUR**
Asami R. Kumala
- **PERAN AQUAPORIN 3 DAN METABOLISMENYA DI DALAM KULIT**
Indri Ngesti Rahayu

Penelitian

- **PENGARUH HIPERBARIK OKSIGEN TERHADAP RETINOPATI DIABETIK DI LAKESLA SURABAYA**
Irma A. Pasaribu
- **EFEK PENURUNAN KADAR KOLESTEROL DARAH AKIBAT PEMBERIAN CHITOSAN PADA TIKUS PUTIH (RATTUS NORVEGICUS) YANG DI INDUKSI STREPTOCOTOZIN**
Fitri Handajari
- **PENGARUH PEMBERIAN SUSU KEDELAI TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGIK HEPAR TIKUS YANG DIINDUKSI DENGAN PARASETAMOL DOSIS TINGGI**
Nita Pranitasari
- **POTENSI EKSTRAK BIJI BUAH PEPAYA (*Carica papaya*) SEBAGAI LARVASIDA TERHADAP LARVA NYAMUK *Aedes aegypti* INSTAR III**
Thanthawy Jauhary, Risma
- **EFEK MINYAK ZAITUN (*OLIVE OIL*) SEBAGAI ANTI RADANG PADA TIKUS PUTIH (*RATUS NORVEGICUS*) JANTAN YANG DIBERI DIET TINGGI LEMAK**
Riarni
- **DETEKSI BAKTERI *KLEBSIELLA SPP.* PENGHASIL ESBL (*EXTENDED SPECTRUM β -LACTAMASE*) DARI ISOLAT *ENTEROBACTERIACEAE* DI LABORATORIUM MIKROBIOLOGI RSAL DR.RAMELAN SURABAYA**
R. Vardianto Yudho C
- **PENGARUH EKSTRAK JINTEN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP KADAR GULA DARAH TIKUS PUTIH YANG DIINDUKSI DENGAN STREPTOZOTOSIN**
Hery Purnomo
- **PERBANDINGAN HASIL TERAPI OTITIS EKSTERNA DIFUSA ANTARA TAMPON BUROWI FILTRATA DENGAN TETES TELINGA ANTIBIOTIK - KORTIKOSTEROID**
Prijanti Eka Poerwantiningroem

Tinjauan Pustaka

- **EFEK KAFEIN TERHADAP SENSITIVITAS INSULIN**
Stefanus Djoni Husodo
- **ASAL USUL KEHIDUPAN**
Wachjudi Kurnia
- **DERMATITIS "TOMCAT" PAEDERUS**
Prawesty Diah Utami
- **FISIOLOGI NYERI DAN NYERI NEUROPATHY**
Eric Mayo Dagradi
- **DEMAM TIFOID**
Lydia Prastiwi

HANG TUAH UNIVERSITY PRESS

HANG TUAH M. J.

Vol. 10

No. 1

Hal. 1 - 108

Surabaya
Januari 2012

ISSN
1693 - 1238

SUSUNAN PENGURUS HANG TUAH MEDICAL JOURNAL

PELINDUNG :

Janto Poernomohadi, dr., Sp.P., Sp.KL

KETUA PENYUNTING :

Bing Rudyanto, dr., Sp.A., SH., DFM.

WAKIL KETUA PENYUNTING :

Irmawati M. Dikman, dr., M.Kes.
Iswahyudi, dr., Sp.R.

MITRA BESTARI :

Prof. Dr. Arit Adimoelja, dr., MSc., Sp.And., FSS (Be).
Prof. Soebandiri, dr., Sp.PD.
Dr. Irwan Setiabudi, dr., Sp.PK.

PENYUNTING PELAKSANA :

Nyoman Bhawa, dr., Sp.KJ., SH.
Sihning E.J. Tehupuring, dr., MS.
Prajogo Wibowo, dr., M.Kes.

PELAKSANA HARIAN :

Iswahyudi, dr., Sp.R.
Varidianto Yudo, dr.

PELAKSANA TATA USAHA :

Stephanus Hery S., S.Kom

ALAMAT REDAKSI :

Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah
Jl. Gadung No. 1 Surabaya

EFEK MINYAK ZAITUN (*OLIVE OIL*) SEBAGAI ANTI RADANG PADA TIKUS PUTIH (*RATUS NORVEGICUS*) JANTAN YANG DIBERI DIET TINGGI LEMAK

Riami

ABSTRACT : Non-alcoholic fatty liver (NAFLD) ranging from simple fatty liver (steatosis), fatty liver with inflammation (steatohepatitis), fibrosis to cirrhosis. Olive oil contains compounds such as phenols, tocopherols, sterols, pigments, and squalene. Squalene has long been known as an interferon inducer (IFN). Interferon works to increase the number and activity of natural killer cells (NK) or lymphocytes. The provision of high-fat diet is egg yolks for 3 weeks plus iv injection of adrenaline on the male rats (*Rattus norvegicus*) can increase the number of lymphocytes in the liver that experienced inflammation. The data would be analyzed with Kolmogorov Smirnov normality test, followed by Mann - Whitney to see the differences between the treatment groups. The administration of olive oil with dosage of 10 g / 100 g BW, 20 g / 100 g BW, and 40 g / 100 g BW could decrease the number of lymphocytes in the inflamed liver of white male rats (*Rattus norvegicus*) after being exposed to egg yolks and intravenous adrenaline injection for 3 weeks.

Keywords: olive oil, hepar, lymphocyte.

Correspondence: Department of Anatomy Faculty of Medicine Hang Tuah University, Jl. Gadung No 1 Surabaya

LATAR BELAKANG

Kerusakan hati akibat infeksi, obat-obatan ataupun virus dapat menyebabkan kerusakan menetap pada sel-sel hati yang berakibat pada peradangan (hepatitis) ataupun kematian sel-sel hati (nekrosis). (Underwood, 2004).

Penyakit perlemakan hati non alkoholik hingga saat ini merupakan kondisi klinis yang sering ditemukan dalam bidang hepatologi sebagai salah satu bentuk penyakit hati kronik (Dabhi et al., 2008).

Perlemakan hati non alkoholik (*Nonalcoholic Fatty Liver Disease* = NAFLD) bervariasi mulai dari perlemakan hati sederhana (*steatosis*), perlemakan hati dengan inflamasi (*steatohepatitis*), fibrosis sampai menjadi sirosis (Charlton, 2009).

Dengan semakin meningkatnya prevalensi obesitas, diabetes mellitus tipe 2, hiperlipidemia, NAFLD menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat yang tidak boleh diabaikan (Charlton, 2009; Niederau, 2010).

Sebuah studi pada populasi obesitas di negara maju mendapatkan 60% perlemakan hati sederhana (*steatosis*) dan dilaporkan pula bahwa pasien diabetes mellitus tipe 2 mengalami

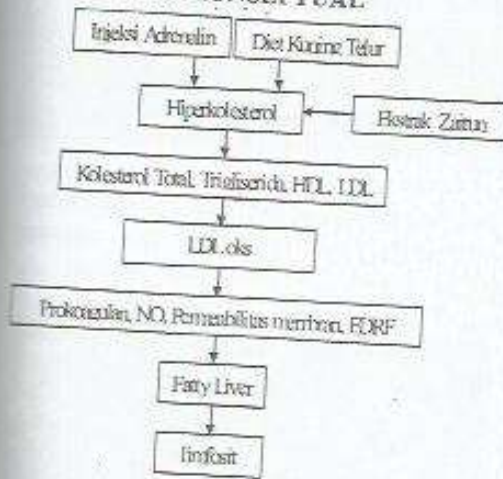
perlemakan hati sebesar 70%, sedangkan pada pasien dislipidemia angkanya sekitar 60% (Trihatmowijoyo dan Nusi, 2009).

Prevalensi NAFLD di populasi perkotaan di Indonesia diperkirakan mencapai 30% dengan obesitas sebagai faktor resiko yang paling berpengaruh (Trihatmowijoyo dan Nusi, 2009).

Pengobatan pada NAFLD sampai saat ini sangat terbatas, maka perlu dilakukan alternatif lain. Salah satunya dengan tanaman obat tradisional yang ada di Indonesia, karena obat tradisional tidak memerlukan biaya yang mahal dan dapat diramu sendiri, selain itu obat tradisional memiliki efek samping yang relatif kecil dibandingkan obat-obat sintetik (Dalimartha, 1997). Salah satu obat tradisional yang terdapat di Indonesia adalah minyak zaitun. Sejumlah studi ilmiah modern menunjukkan peran minyak zaitun dalam mencegah berbagai penyakit modern, seperti pengerasan pembuluh darah (arteriosklerosis), tekanan darah tinggi (hipertensi), kanker payudara, dan kanker rahim, sebab ia mengandung zat-zat anti oksidan yang berfungsi melindungi tubuh dari sisa-sisa metabolisme. Residu metabolisme ini berperan besar dalam proses kerusakan sel-sel tubuh dan kemunculan berbagai

penyakit (Ahmad, 2010). Perasan segar minyak zaitun (*extra-virgin olive oil*) mengandung *oleocanthal*, dimana *oleocanthal* bekerja sebagai senyawa anti inflamasi alamiah yang memiliki potensi dan kesamaan profil dengan ibuprofen. Walaupun memiliki perbedaan struktur namun kedua molekul tersebut menghambat enzim siklooksigenase dalam jalur biosintesis prostaglandin (Beauchamp et al, 2005).

KERANGKA KONSEPTUAL



MATERI DAN METODA PENELITIAN

Rancangan penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian analitik eksperimental dengan menggunakan metoda : *Randomized, the post only control group design*. Rancangan ini dipilih dengan asumsi bahwa suatu populasi tertentu dan tiap unit populasi adalah homogen yakni semua karakteristik antara unit populasi adalah sama. Pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi, sehingga hanya dilakukan pengukuran akhir.

Populasi Penelitian, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi sampel penelitian adalah tikus jantan galur wistar. Sampel penelitian yaitu tikus jantan galur wistar yang secara fisik tampak sehat berumur 20 minggu, berat badan 180 - 200 gram. Dalam penelitian ini digunakan 6 sampel untuk perlakuan, sehingga jumlah sampel keseluruhan adalah 30 ekor tikus. Metode yang digunakan adalah *simple random sampling*.

dengan alasan : walaupun populasi tikus dalam kandang pemeliharaan telah diusahakan dalam kondisi perawatan yang sama, misalnya pakan, situasi kandang, jenis dan spesies, umur, jenis kelamin, tetapi masih terdapat perbedaan berat badan (Hume, 1972).

Bahan Penelitian

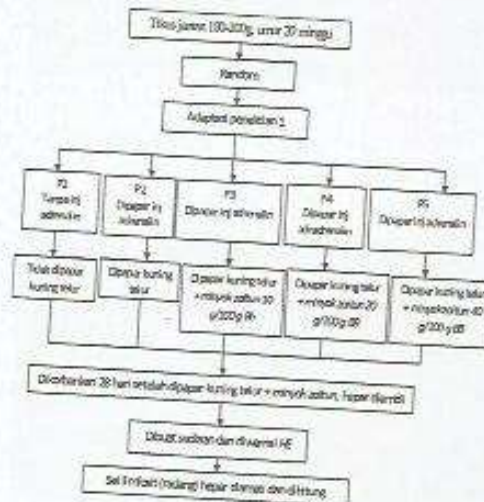
Tikus jantan strain wistar, umur 20 minggu, dengan berat badan 180 - 200 gram, yang didapat dari laboratorium Biokimia UNAIR, yang memenuhi kriteria inklusi mendapat pakan standar dari PT jawa Comfeed dan minum secara ad libitum. Bahan perlakuan dalam penelitian ini berupa :

- Kuning telur yang telah dipisahkan dari putihnya
- Adrenalin bitartras
- Minyak zaitun murni yang didapatkan dari toko bahan kimia Bratak

Tempat dan Waktu Penelitian

Kegiatan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah. Pemeriksaan dan pembuatan sediaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah. Waktu penelitian dilakukan bulan April sampai September 2011.

Kerangka Operasional Penelitian

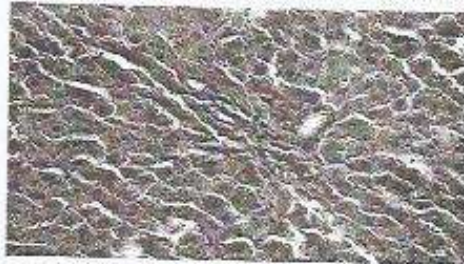


HASIL PENELITIAN

Data Penelitian

Pemeriksaan hepar tikus yang mengalami keradangan dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung sel limfosit pada daerah segitiga kiernan pada hepar perlapangan pandang. Setiap satu sampel penelitian dilakukan pengamatan dan penghitungan sel limfosit pada daerah segitiga kiernan hepar tikus yang mengalami keradangan sebanyak empat lapang pandang sesuai dengan arah jarum jam pada jam 3, jam 6, jam 9 dan jam 12. Jumlah sel limfosit pada satu lapang pandang diamati dan dihitung pada empat tempat dengan pembesaran 400x. Jumlah sel limfosit pada setiap lapangan pandang di rata-rata.

Hasil pewarnaan HE pada hepar tikus jantan yang tidak diberi kuning telur dan tidak dipapar injeksi adrenalin disajikan pada gambar 5.1.1 yang diberi kuning telur dan dipapar injeksi adrenalin disajikan pada gambar 5.1.2, yang dipapar injeksi adrenalin, diberi kuning telur dan dipapar minyak zaitun 10 g/100 g BB disajikan pada gambar 5.1.3, yang dipapar injeksi adrenalin, diberi kuning telur dan dipapar minyak zaitun 20 g/100 g BB disajikan pada gambar 5.1.4 dan yang dipapar injeksi adrenalin, diberi kuning telur dan dipapar minyak zaitun 40 g/100 g BB disajikan pada gambar 5.1.5.



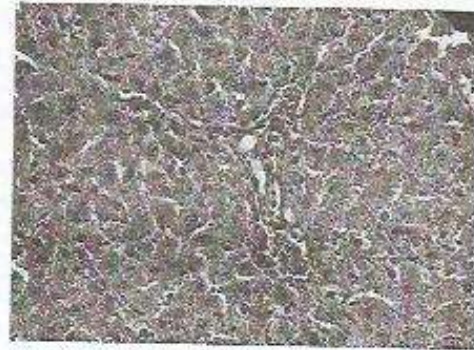
Gambar 5.1.1. Hasil pewarnaan HE sel limfosit pada hepar tikus jantan yang tidak diberi kuning telur dan tidak dipapar injeksi adrenalin dengan pembesaran 400x



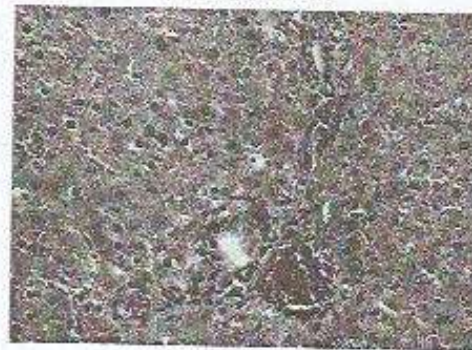
Gambar 5.1.2. Hasil pewarnaan HE sel limfosit pada hepar tikus jantan yang diberi kuning telur dan dipapar injeksi adrenalin dengan pembesaran 400x



Gambar 5.1.3. Hasil pewarnaan HE sel limfosit pada hepar tikus jantan yang dipapar injeksi adrenalin, diberi kuning telur dan dipapar minyak zaitun 10 g/100 g BB dengan pembesaran 400x



Gambar 5.1.4. Hasil pewarnaan HE sel limfosit pada hepar tikus jantan yang dipapar injeksi adrenalin, diberi kuning telur dan dipapar minyak zaitun 20 g/100 g BB dengan pembesaran 100x



Gambar 5.1.5. Hasil pewarnaan HE sel limfosit hepar tikus jantan yang dipapar injeksi adrenalin, diberi kuning telur dan dipapar minyak zaitun 40 g/100 g BB dengan pembesaran 100x

Analisis Data Hasil Penelitian

Sebelum dilakukan uji statistik terhadap data hasil penelitian, data terlebih dulu dilakukan uji homogenitas variasi antar kelompok (Sudjana, 1995). Uji homogenitas variasi dilakukan terhadap variabel sel limfosit pada segitiga kiernan hepar.

Hasil *Levene test* terhadap jumlah sel limfosit pada hepar tikus yang mengalami radang adalah $p = 0.063$ ($p > 0.05$). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa variasi yang digunakan pada penelitian ini adalah homogen.

Hasil uji distribusi dengan *Uji Kolmogorov-Smirnov satu sampel* dari data penelitian ini disajikan pada lampiran 2. Berdasarkan hasil uji ini diketahui nilai $p = 0.725$ ($p > 0,05$) sehingga data tersebut berdistribusi normal.

Data dianalisis dengan analisis varian untuk mengetahui perbedaan jumlah sel limfosit pada hepar tikus jantan yang mengalami perubahan peradangan (inflamasi) di antara masing-masing perlakuan. Bila terdapat perbedaan yang nyata diungkapkan dengan *Post Hoc Tests* (LSD) untuk mengetahui perbedaan jumlah sel limfosit pada hepar tikus jantan yang mengalami perubahan peradangan (inflamasi) antara perlakuan satu dengan perlakuan yang lain.

Hasil analisis varians jumlah sel limfosit hepar tikus jantan yang mengalami perubahan peradangan adalah berbeda nyata ($p < 0,05$) di antara kelompok yang diberi zaitun 10 mg, 20 mg dan 40 mg/kgBB, antar lima kelompok perlakuan. Uji *Post Hoc* (LSD) menunjukkan bahwa jumlah sel limfosit pada hepar tikus jantan yang mengalami perubahan peradangan yang diberi minyak zaitun 10 gr/100 gr kgBB, 20 gr/100 gr BB dan 40 gr/100 grBB setelah dipapar injeksi adrenalin i.v dan diberi diet kuning telur oral berbeda nyata dengan jumlah sel limfosit pada hepar tikus jantan yang mengalami peradangan yang tidak diberi minyak zaitun maupun injeksi adrenalin i.v dan diet kuning telur secara oral. Jumlah sel limfosit hepar yang mengalami perubahan peradangan terbanyak adalah pada

tikus yang diberi minyak zaitun dan 20 gr/100 grBB setelah terpapar injeksi adrenalin i.v dan diet kuning telur secara oral dari hasil tersebut diatas ternyata pemberian peningkatan dosis minyak zaitun yang semakin tinggi akan menyebabkan peningkatan jumlah limfosit. Dan terjadi peningkatan jumlah sel limfosit yang paling sedikit pada pemberian dosis minyak zaitun 40 mg/ 100 gr BB.

PEMBAHASAN

Stimulus (rangsangan) eksogen dan endogen yang menyebabkan jejas sel juga menimbulkan reaksi kompleks pada jaringan ikat yang memiliki vaskularisasi yang dinamakan inflamasi (peradangan). Dalam arti yang paling sederhana inflamasi adalah suatu respon protektif yang ditujukan untuk menghilangkan penyebab awal jejas serta membuang sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan kerusakan sel.

Respon radang memiliki banyak pemain, yaitu sel dan protein plasma dalam sirkulasi, sel dinding pembuluh darah, dan sel serta matriks ekstraseluler jaringan ikat sekitarnya. Sel dalam sirkulasi adalah leukosit polimorfonuklear (PMN) yang berasal dari sumsum tulang (neutrofil), eosinofil dan basofil; limfosit dan monosit; serta trombosit; protein dalam sirkulasi, meliputi faktor pembekuan, kininogen dan komponen komplemen, sebagian besar disintesis oleh hati

Dari hasil penelitian didapatkan kelompok yang diberi injeksi adrenalin i.v dan diet kuning telur secara oral, sel limfosit (keradangan) pada hepar tikus jantan mengalami peningkatan jumlah sel limfosit tetapi tidak signifikan, dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberi diet pakan biasa dan kelompok yang diberi minyak zaitun setelah dipapar injeksi adrenalin i.v dan diet kuning telur secara oral. Pemberian diet kuning telur yang diberikan selama 3 minggu terhadap hewan coba, ditambah dengan injeksi adrenalin i.v, merupakan hal-hal yang dapat menjadi penjejas timbulnya stress oksidatif. Dengan terjadinya stress oksidatif ini, jumlah radikal bebas di dalam tubuh meningkat, melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkannya. Selanjutnya, stress oksidatif ini akan memicu timbulnya ROS (Reaktif Oksigen Spesies). Akibatnya intensitas proses oksidasi sel-sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan menimbulkan

kerusakan yang lebih banyak yang ditandai dengan adanya peradangan pada hepar tikus jantan. Seperti diketahui, sumber utama ROS adalah mitokondria.

Pada kelompok perlakuan, dimana tikus mendapatkan injeksi adrenalin i.v dan diet kuning telur serta diikuti pemberian minyak zaitun dengan dosis yang meningkat, didapatkan hasil bahwa pada pemberian minyak zaitun dengan dosis yang semakin meningkat, yaitu dosis 10 gr/kgBB, 20mg/kgBB maka perubahan pada limfosit sel hepar yang mengalami peradangan jumlah limfositnya meningkat. Minyak zaitun mengandung senyawa seperti fenol, tokoferol, sterol, pigmen, dan *squalene*, yang memegang peran penting dalam kesehatan. Manfaat *squalene* luar biasa. Beberapa rumah sakit milik universitas di Tokyo dan Fukuoka, serta rumah sakit nasional di Jepang melaporkan bahwa *squalene* bermanfaat untuk mengobati penyakit kanker. Sudah lama ia dikenal sebagai *interferon inducer* (IFN). Interferon berfungsi meningkatkan jumlah maupun aktivitas sel *natural killer* (NK) atau limfosit. Perasan segar minyak zaitun (*extra-virgin olive oil*) mengandung *oleocanthal*, dimana *oleocanthal* bekerja sebagai senyawa anti inflamasi alamiah yang memiliki potensi dan kesamaan profil dengan ibuprofen. Walaupun memiliki perbedaan struktur namun kedua molekul tersebut menghambat enzim siklooksigenase dalam jalur biosintesis prostaglandin" (Beauchamp, *et al.*, 2005).

Namun demikian, sesuai data hasil penelitian, kelompok P3, P4 dan P5 yaitu kelompok yang diberi diet kuning telur 3 mgg + injeksi adrenalin i.v + minyak zaitun 10 gram/100gr BB, 20 gram/100grBB dan 40 gram/100gr BB menunjukkan perubahan jumlah sel limfosit yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok P2 yaitu kelompok yang diberi diet kuning telur 3 mgg + injeksi adrenalin i.v. Dari sini dapat diambil kesimpulan bahwa dosis pemberian minyak zaitun 10/20/40gram/100gr BB belum cukup adekuat dalam mencegah perubahan jumlah peningkatan sel limfosit hepar yang mengalami peradangan yang diakibatkan pemberian diet tinggi lemak dan injeksi adrenalin i.v.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Pemberian diet tinggi lemak yaitu kuning telur selama 3 minggu ditambah dengan injeksi

adrenalin i.v pada tikus putih (*ratus norvegicus*) jantan dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada hepar yang mengalami peradangan.

2. Pemberian minyak zaitun pada tikus putih (*ratus norvegicus*) jantan dengan dosis 10 gr/100 gr BB, 20 gr/100 gr BB, 40 gr/100 gr BB belum dapat menurunkan jumlah sel limfosit pada hepar tikus putih (*ratus norvegicus*) yang mengalami perubahan peradangan setelah dipapar kuning telur dan injeksi adrenalin i.v selama 3 minggu.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad Salim Badwilan, 2010. Manfaat dan Khasiat Minyak Zaitun
- Angulo P, 2002. "Nonalcoholic fatty liver disease". *N. Engl. J. Med.* 346 (16): 1221-31. doi: 10.1056/NEJMra011775. PMID 11961152.
- Beauchamp G K, Keast R S J, Morel, D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee C H, Smith A B, Breslin P A S, 2005. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45-46
- Bisignano, G., M. G. Lagana, D. Trombetta, S. Arena, A. Nostro, N. Uccella, G. Mazzanti, and A. Saija. 2001. In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiol. Lett.* 198:9-13.
- Brooks, G., Carroll, K.C., Butel, J., Morse, S, 09. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition, McGraw-Hill.
- Charlton, M. 2009. Liver Transplantations : Challenging Controversies and Topics. 1st edition. Humana Press, Chapter 10. Page 169-190. Available from: usagiedu.com/articles/nafl05/nafl05.pdf.
- Dabhi, A.S., Brahmhatt K.J., Pandya T.P., Thorat P.B., Shah, M.C. 2008. Non Alcoholic Fatty Liver (NAFLD). *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine.* Volume: 9, No. 1. January March. Available from medind.nic.in/jact08/i1/jact08i1p36.pdf
- Hamaguchi M, Kujima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K (2005). "The metabolic syndrome as

- Dissect*. *Ann. Intern. Med.* 143(10): 722-3. PMID 16287793.
- Niederan C. 2010. Hepatology : A clinical text book. 2nd edition. Available from http://www.hepatologytextbook.com/hep_chapt25.pdf. Accessed October 11th.
- Pereira, AP., Ferreira ICFR., Marcelino F., et al. 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* 12, 1153-1162.
- Tassou, C. C., G. J. E. Nychas, and R. G. Board. 1991. Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13:231-237.
- Wahyuni, M., Nuzi, A.I. 2009. Fatty liver dan transplantasi liver. Available from : www.scribd.com/doc/38683046/final-FT-1. Accessed: October 15th.
- Walker, M., 1997. Olive Leaf Extract - Nature's Antibiotic, New York; Kensington, 1997.
- Walker, M., 1996. "Olive leaf extract: The new oral treatment to counteract most types of pathological organisms." *Explore!* 7(4):31-37.
- Horwitz. 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed., vol. 1. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- http://www.totalkeahatananda.com/fatty_liver4.html