

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik, penelitian dilakukan dengan memberikan perlakuan kepada sampel yang telah dibagi menjadi kelompok kontrol dan perlakuan lalu dibandingkan efeknya (Taufiqurahman, 2008).

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Post Test Only Control Group Design*. Jenis rancangan ini dipilih karena dapat menghasilkan data dengan validitas yang tinggi dan perlakuan dapat diatur oleh peneliti. Penggunaan desain ini dapat mengontrol terjadinya bias testing dan interaksi testing (Dantes, 2012).

B. Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengukuran kadar SGPT dilakukan di Unit Pemeliharaan Hewan Coba PAU UGM Yogyakarta. Jl. Teknik Utara, Caturtunggal, Kec. Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281.

Pengecatan dan Pengamatan imunohistokimia terhadap ekspresi NF- κ B p65, TGF- β 1, E-selectin, kolagen-1 serta pengecatan dan pengamatan pembentukan serabut kolagen (fibrosis hati) dengan pengecatan Tricome Mason dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi Penelitian

Penelitian menggunakan tikus putih sebagai hewan Coba dengan kriteria inklusi meliputi jenis kelamin jantan, galur Wistar (*Rattus Norvegicus*), berumur 3-4 bulan dengan berat badan 170-200 gram. Kriteria eksklusi yang digunakan adalah tikus putih yang sakit atau mati selama penelitian.

Tikus diperoleh dan dipelihara di Pemeliharaan Hewan Coba PAU UGM Yogyakarta. Jl. Teknik Utara, Caturtunggal, Kec. Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281.

2. Sampel Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan pada populasi (N) tidak diketahui. Rumus yang dipakai untuk menentukan besar sampel (n) memakai rumus Steel and Torrie adalah:

$$n = \left[\frac{(Z_{1/2\alpha} + Z\beta) \sigma}{\delta} \right]^2 \quad (\text{Nurudhin, 2016}).$$

Karena σ^2 sulit ditaksir dari literatur, studi yang sama sebelumnya atau studi pendahuluan oleh peneliti, maka diasumsikan $\sigma^2 \approx \delta^2$, sehingga hasilnya $n = (Z_{1/2\alpha} + Z\beta)^2$

$$n = (1,645 + 0,842)^2 = 6,185 \text{ dibulatkan menjadi } 7$$

Keterangan:

n = besar sampel masing-masing kelompok

$Z_{1/2\alpha}$ = nilai standar normal, yang besarnya tergantung α

$$\text{Bila } \alpha = 0,05 \rightarrow Z_{1/2\alpha} = 1,645$$

$Z\beta$ = nilainya tergantung β yang ditentukan (berdasarkan Tabel)

β = *error* untuk menerima H_0 , bila H_0 salah

$$\text{Bila } \beta = 0,08 \rightarrow Z\beta = 0,842$$

δ = selisih antara rerata variabel terapi dan kontrol yang diharapkan oleh peneliti

σ = standar deviasi

Berdasar rumus tersebut didapatkan jumlah sampel minimal adalah tujuh ekor (Nurudhin, 2016). Sebagai cadangan jumlah tiap kelompok di tambah 10%. Sehingga dalam penelitian ini digunakan delapan ekor tikus putih jantan.

3. Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel menggunakan *purposive sampling* yang tergolong ke dalam *non-probability sampling*. Pada teknik sampling ini, pemilihan sampel dilakukan berdasarkan subjek yang memenuhi kriteria sampai total jumlah subjek yang dibutuhkan terpenuhi (Farr, 2008).

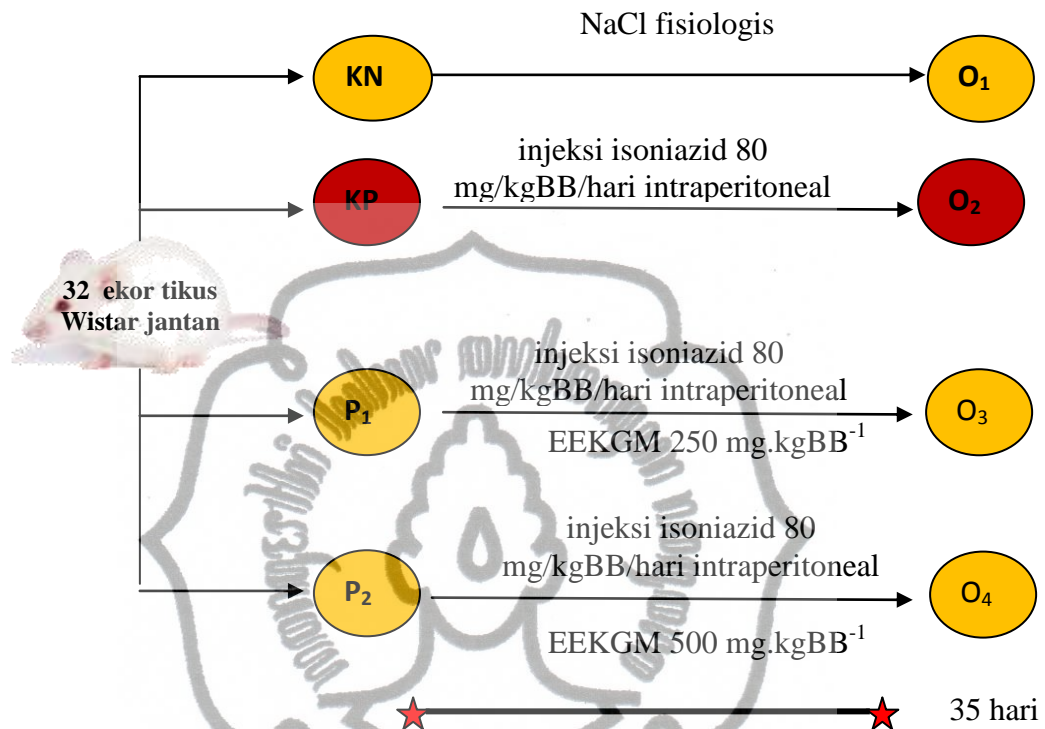
D. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design*. Pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi, sehingga dapat dikembangkan rancangan eksperimental tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*), tetapi hanya pengukuran akhir (*post test*)/*post-test only control group design*.

Subjek penelitian dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan secara random. Setiap kelompok mendapatkan perlakuan yang berbeda. Setelah perlakuan selesai, selanjutnya dilakukan pengukuran efek yang terjadi pada kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan hasil yang diakibatkan oleh perlakuan yang diberikan.

Penelitian ini kelompok kontrol negatif hanya diberikan NHCL fisiologis, kelompok kontrol positif diberikan isoniazid 80 mg/kgBB/hari, kelompok perlakuan terdapat dua kelompok perlakuan. Perlakuan satu, diberi isoniazid dan ekstrak ethanol kulit manggis 200 mg/kgBB/hari, kelompok perlakuan dua diberi isoniazid dan ekstrak ethanol kulit manggis 500 mg/kgBB/hari.

Bagan Rancangan Penelitian (Pengelompokkan dan perlakuan serta pengamatan)



Gambar 4.1 Bagan Rancangan Penelitian

Keterangan:

- KN : Kelompok Negatif (tikus hanya mendapat NaCl fisiologis/*normal saline*)
- KP : Kelompok positif (mendapatkan injeksi isoniazid intraperitoneal dosis 80 mg/kgBB setiap hari selama 35 hari)
- P1 : Kelompok Perlakuan pertama (penyuntikan isoniazid dosis 80 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal dan EEKGM 250/kgBB mg tiap hari selama 35 hari).
- P2 : Kelompok Perlakuan ke 2 (penyuntikan isoniazid dosis 80 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal dan EEKGM 500/kgBB mg tiap hari selama 35 hari).
- O1 : • Pengamatan ekspresi NF-κB p65, TGF-β1, *E-selectin* dan kolagen-1 pada kelompok negatif.
• Pengamatan kadar SGPT pada kelompok negatif.

- Pengamatan Gambaran matriks ekstra seluler (jaringan fibrosis) di hati pada kelompok negatif.
- O2 : • Pengamatan ekspresi NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin* dan kolagen-1 pada kelompok positif.
• Pengamatan kadar SGPT pada kelompok kontrol positif.
• Pengamatan Gambaran matriks ekstra seluler (jaringan fibrosis) di hati pada kelompok positif.
- O3 : • Pengamatan ekspresi NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin* dan kolagen-1 pada kelompok perlakuan 1.
• Pengamatan kadar SGPT pada kelompok perlakuan 1.
• Pengamatan Gambaran matriks ekstra seluler (jaringan fibrosis) di hati pada kelompok perlakuan 1.
- O4 : Pengamatan ekspresi NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin* dan kolagen-1 pada kelompok perlakuan 2.
Pengamatan kadar SGPT pada kelompok perlakuan 2.
Pengamatan Gambaran matriks ekstra seluler (jaringan fibrosis) di hati pada kelompok perlakuan 2.

E. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Ekstrak etanol kulit Manggis (*Garcinia Mangostana L*)
2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini yaitu perubahan respon yang terjadi di jaringan hati tikus Wistar yang diinduksi Isoniazid dan diberi perlakuan EEKGM. Variabel tersebut meliputi:

- a) Ekspresi sitokin-sitokin yang berperan pada pembentukan fibrosis hati diukur dari ekspresi NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin* dan kolagen-1 pada hati.
- b) Kadar SGPT
- c) Pengamatan pembentukan serabut kolagen dan terjadinya fibrosis pada jaringan hati dari Gambaran histologis jaringan hati dengan pengecatan *Tricome Mason*.

3. Variabel Luar :

- a) Variabel luar yang dapat dikendalikan: penyeragaman galur, umur, jenis kelamin, berat badan dan jenis makanan maupun minuman tikus putih.
- b) Variabel luar yang tidak dapat dikendalikan: kondisi psikologis tikus dan keadaan awal Hati tikus.

F. Jenis Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 4. 1 Jenis Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Metode Pengukuran	Skala	Unit
1.	Ekstrak etanol kulit Manggis (<i>Garcinia Mangostana</i> L). (EEKGM)	ekstrak etanol kulit Manggis (<i>Garcinia Mangostana</i> L). Ekstraksi dan karakterisasi ekstrak etanol kulit manggis dilakukan di PAU UGM Yogyakarta. Jl. Teknik Utara, Caturtunggal, Kec. Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281. Pemberian ekstrak etanol kulit <i>Garcinia Mangostana</i> L. dilakukan dengan pemberian peroral dengan sonde <i>intragastrik</i>	Maserasi	Rasio	Mg/kgBB
2.	NF-κB p65	<i>Nuclear factor kappa B</i> ini meregulasi ekspresi beberapa gen yang terlibat dalam respon imun dan proses inflamasi diantaranya ekspresi sitokin proinflamasi, kemokin, maupun molekul adhesi yang terlibat pada inisiasi proses pelepasan leukosit ke tempat inflamasi.	Imunohisto kimia (IHC)	Ordinal	Skor Kriteria skor IHC 0: Negatif 1: < 25% 2: 25-50% 3: 51-75% 4: >75%
3.	TGF-β1	<i>Transforming growth factor-β1</i> berperan penting dalam aktivasi fibroblast miofibroblast dan memicu sekresi protein matriks ekstra	Imunohisto kimia (IHC)	Ordinal	Skor Kriteria skor IHC 0: Negatif 1: < 25% 2: 25-50%

	seluler terutama kolagen tipe 1.			3: 51-75% 4: >75%
4. <i>E-selectin</i>	Salah satu molekul adhesi yang terdapat pada sel endotel dan berperan penting pada proses perekrutan serta akumulasi leukosit ke tempat inflamasi	Imunohisto kimia (IHC)	Ordinal	Skor Kriteria skor IHC 0: Negatif 1: < 25% 2: 25-50% 3: 51-75% 4: >75%
5. Kolagen 1	Kolagen tipe 1 paling banyak ditemukan pada tubuh manusia. Kolagen tipe 1 membantu membentuk tulang, tendon, ligamen, organ, dan kulit. Manfaat lain dari kolagen tipe 1 adalah membantu proses penyembuhan luka, meningkatkan kualitas kulit agar elastis dan menjaga jaringan agar tidak mudah rusak.	Imunohisto kimia (IHC)	Ordinal	Skor Kriteria skor IHC 0: Negatif 1: < 25% 2: 25-50% 3: 51-75% 4: >75%
6. SGPT	Serum Glutamic Pyruvic Transaminase atau SGPT merupakan enzim di dalam tubuh yang biasa digunakan untuk memonitor kerusakan fungsi hati. Pengamatan tes fungsi hati (SGPT/ ALT) dilakukan dengan pemeriksaan darah tikus putih yang diambil dari vena pleksus ophthalmic dan selanjutnya diperiksa kadarnya dengan metode spektrofotometri di PAU UGM	Spektrofotometri	Rasio	μ/L
7. Fibrosis	Fibrosis karakteristiknya adalah akumulasi yang banyak dari kolagen dan komponen ECM yang lain, merupakan penyembuhan cedera hati yang menyimpang. Deposisi ECM dan remodeling ECM adalah proses yang dinamis selama	Histologi mikroskopik dengan skala Metavir	Ordinal	Skor Fibrosis F0: tidak ada fibrosis F1: fibrosis ringan (gambaran portal fibrosis tanpa septa)

perkembangan fibrosis.
Preparat histopatologi hati
diwarnai dengan pewarnaan
Tricome Mason.

F2: fibrosis
sedang (sedikit
tautan maupun
jaringan fibros)
F3: fibrosis
berat (portal
fibrosis dengan
banyak septa)
F4: gambaran
sirosis

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah : a) Kandang tikus putih, b) Timbangan untuk obat, c) Timbangan hewan, d) Alat bedah hewan coba (scalpel, pinset, gunting, jarum, meja lilin), e) Sonde lambung, f) Alat untuk membuat preparat histologis (*staining set, object glass, deck glass, microtome*), g) Mikroskop cahaya, h) Gelas pengaduk, i) Kamera, j) alat untuk imunohistokimia yaitu : botol kaca steril 250 ml (*Schoot-Duran®*), Beaker glass 1 L (*Pyrex®*), mikropipet 20, 200, 1000 μ L (*Gilson®*), gelas objek (*sail brand®*), *deck glass*, tip kunig, putih, dan biru, lemari es pendingin.

2. Bahan

- a. Senyawa murni isoniazid didapat dari Hangzhou Gulf Fine Chemical Zone, Shangyu City, Zhejiang Province, China.
- b. Tikus Putih Wistar, 3-4 bulan, berat badan 170-200 mg
- c. Bahan untuk pengamatan ekspresi NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin*, kolagen 1 : antibodi primer (antibodi NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin*, kolagen 1), antibodi sekunder, streptavidin (HRP), DAB, H₂O₂, larutan mayer *hematoxcillin eosin*, etanol absolut, xylene, metanol, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), aquades.
- d. Bahan untuk pembuatan preparat histologis dengan pengecatan *hematoxcillin eosin* untuk kerusakan hepatosit dan *Tricome Mason* untuk serabut kolagen (fibrosis) hati : aquades pewarna HE, pewarna

Tricome Mason, xylol, parafin, alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70%, Canada Balm.

H. Cara Kerja

1. Persiapan Tikus Putih

Sampel penelitian berupa 32 ekor tikus putih jantan berumur 3-4 bulan dengan berat badan 170-200 gram. Tikus diperoleh dan dipelihara di Pemeliharaan Hewan Coba PAU UGM Yogyakarta. Jl. Teknik Utara, Caturtunggal, Kec. Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281. Sebelum mendapatkan perlakuan, semua tikus wistar diaklimasi selama seminggu untuk menyesuaikan suhu kelembapan, dan kondisi ruangan. Tikus diberi pakan standar BR I dengan jumlah pakan disesuaikan dengan rerata berat badannya, sedangkan minum diberikan secara bebas (*ad libitum*). Selama penelitian, tikus dipelihara dengan suhu ruang 32⁰C, dengan siklus gelap dan terang masing-masing 12 jam.

2. Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana L.*)

Ekstraksi dan karakterisasi ekstrak etanol kulit manggis dilakukan di PAU UGM Yogyakarta. Jl. Teknik Utara, Caturtunggal, Kec. Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281.

Dosis ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia Mangostana L.*) yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebesar 250 mg/kgBB yang diberikan untuk kelompok perlakuan 1 dan dosis 500 mg/kgBB yang diberikan untuk kelompok perlakuan 2. Besar dosis kulit manggis EEKGM diambil berdasar pada dosis kulit manggis yang digunakan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Sebagaimana yang terlihat pada tabel 2.3. Pemberian ekstrak etanol kulit manggis ini selama 35 hari berturut-turut.

3. Dosis Isoniazid

Dosis isoniazid yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebesar 80 mg/kgBB dan diberikan pada kelompok kontrol positif maupun kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 selama 35 hari (5 minggu) berturut-turut (Jahromi *et al.*, 2018).

4. Pengelompokan Subjek

Alokasi hewan coba ke dalam masing-masing perlakuan yang homogen dilakukan secara acak untuk mempertahankan validitas internal. Semua tikus dibuat kerusakan hati karena isoniazid dengan cara penyuntikan isoniazid 80 mg/kgBB dosis tunggal setiap hari selama 5 minggu. Tikus dikelompokkan menjadi empat kelompok yaitu:

- a) Kontrol negatif (KN), dimana tikus hanya mendapatkan NaCl fisiologis/*normal salin* secara intraperitoneal.
- b) Kontrol positif (KP): tikus mendapatkan penyuntikan isoniazid dosis 80 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal.
- c) Perlakuan 1 (P1): tikus mendapatkan penyuntikan isoniazid dosis 80 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal dan EEKGM 250/kgBB mg tiap hari.
- d) Perlakuan 2 (P2): tikus mendapatkan penyuntikan isoniazid 80 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal dan EEKGM 500 mg/kgBB tiap hari.

Setiap kelompok masing-masing terdiri dari delapan ekor tikus putih, yang mendapatkan perlakuan selama lima minggu berturut - turut. Setiap minggu berat badan tikus ditimbang.

Perlakuan terhadap hewan coba pada penelitian ini sudah memenuhi prinsip 3R sesuai ketentuan *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs)* dan mendapatkan persetujuan dari komite etik penelitian kesehatan Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Tikus dikorbankan dengan cara dislokasi cervical. Jaringan hati diperiksa secara imunohistokimia untuk pemeriksaan ekspresi NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-Selectin*, dan kolagen 1. Jaringan hati juga dibuat pengecatan secara histopatologis untuk mengetahui pembentukan serabut kolagen (fibrosis hati) dengan pengecatan trikrom Masson.

I. Pembuatan Ekstrak dan Preparat Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak etanol Kulit manggis yang dipakai dalam penelitian ini di dapat dari Kelurahan girilayu, Kecamatan Matesih, Karanganyar, Jawa Tengah. Ekstrak etanol dibuat di laboratorium PAU Yogyakarta. Proses pembuatan ekstrak etanol kulit manggis dilakukan dengan teknik maserasi. Kulit buah manggis masak berwarna ungu kecoklatan dikumpulkan dari pengepul dan dibawa ke PAU Yogyakarta. Kulit dipotong-potong kecil dikeringkan di suhu udara dan digiling menjadi serbuk. Sempel serbuk dimaserasi di dalam etanol 96% selama 72 jam. Ekstrak disaring dan diuapkan sehingga kering didapatkan EEKGM (Manalo *et al.*, 2018).
2. Pemeriksaan kadar SGPT
Pemeriksaan darah tikus putih yang diambil dari vena pleksus ophthalmic dan selanjutnya diperiksa kadar SGPT pada serum dengan metode spektrofotometri di PAU UGM Yogyakarta.

J. Pembuatan Preparat Imunohistokimia Dan Histopatologi

1. Pembuatan preparat Imunohistokimia

Hati dikeluarkan, dibersihkan dari darah dan jaringan lemak, difiksasi segera dalam 10% buffer formalin untuk pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin*, kolagen tpe 1.

Teknik pewarnaan imunohistokimia menggunakan metode pewarnaan imuno-peroksidase tidak langsung tiga fase dengan *Avidin Biotin Complex* (ABC) sebagai berikut: dilakukan deparafinisasi sayatan jaringan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Deparafinisasi dilakukan dengan cara standar baku laboratorium, yaitu secara bertahap dengan waktu tertentu memasukkan preparat kedalam cairan aseton, *xylol*, alkohol 100%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70% dan air. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4, diinkubasi dengan tripsin 0,125 % pada temperatur 37 °C selama 5-10 menit, untuk membuka *masking antigen*.

Jaringan diinkubasikan dengan H_2O_2 0,5% dalam metanol selama 30 menit untuk menghilangkan pewarnaan endogen, dibiarkan pada temperatur ruangan. Selanjutnya jaringan dicuci dengan air mengalir selama 1 menit, diikuti pencucian dengan akuades.

Jaringan ditandai dan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit, diinkubasi dengan 3% serum yang dilarutkan dalam *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1% selama 20 menit, dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak dua kali, masing-masing selama 3 menit.

Jaringan diinkubasi dengan monoklonal antibodi primer yaitu *murine monoclonal antibody* terhadap molekul NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin* dari *mouse* (Santa Cruz, US). Monoklonal antibodi dilarutkan dengan *Tris-Phosphate Buffer Saline* (PBS) 1:300. Untuk jaringan seluas 1 cm^2 diperlukan 100 μL monoklonal antibodi. Inkubasi dilakukan selama 30 menit dalam ruang lembab.

Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit. Jaringan diinkubasi dengan antibodi primer yaitu antibodi *anti murine* yang telah dibiotinilisasi (Dako Kit). Lama inkubasi 30 menit. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.

Jaringan diinkubasi dengan streptavidin-biotin peroksidase (Dako Kit) selama 30 menit, dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit. Inkubasi jaringan dengan substrat (Dako Kit) sampai timbul warna coklat pada jaringan, selama ± 15 menit.

Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya jaringan dicuci dengan air mengalir. Jaringan ditutup dengan kaca penutup (*deck glass*).

Ekspresi molekul yang positif dengan monoklonal antibodi primer akan terlihat berwarna coklat dibawah mikroskop cahaya. Dari setiap pelaksanaan pewarnaan dibuat kontrol positif dan kontrol negatif.

2. Pembuatan Preparat Histopatologi

Dilakukan deparafinisasi sayatan jaringan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Deparafinisasi dilakukan dengan cara standar baku laboratorium, yaitu secara bertahap dengan waktu tertentu memasukkan preparat kedalam cairan aseton, *xylol*, alkohol 100%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70% dan air.

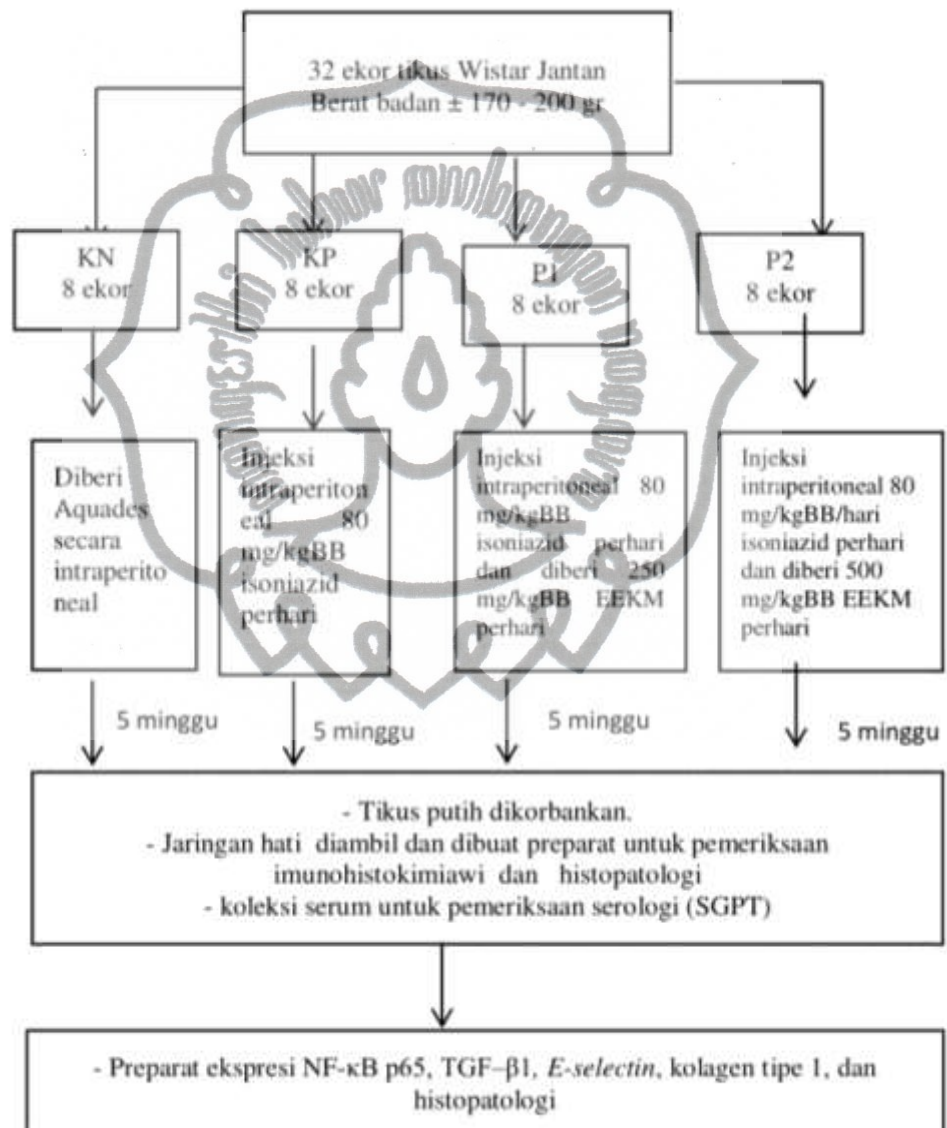
Selanjutnya jaringan diwarnai dengan hematoksinilin eosin maupun Tricome Mason. Jaringan dicuci dengan air mengalir, ditutup dengan kaca penutup (*deck glass*).

3. Pembacaan Preparat

Pembacaan preparat imunohistokimia dan histopatologi dilakukan oleh dua dokter ahli patologi Anatomi ditempat terpisah. Apabila mendapatkan hasil berbeda lebih dari 25 persen, pembacaan diulang dilakukan secara bersama – sama.

K. Alur Penelitian

1. Bagan Alur Penelitian



Keterangan bagan alur penelitian:

Kebutuhan tikus sesuai rumus pada 4 kelompok masing-masing 8 ekor tikus sehingga didapat 32 ekor tikus. Kelompok negatif (KN) hanya diberi NaCl fisiologis/*normal salin*. Kelompok positif mendapatkan injeksi isoniazid intraperitoneal dosis 80 mg/kgBB setiap hari. Kelompok Perlakuan pertama (P1) mendapatkan injeksi isoniazid dosis 80 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal dan EEKGM 250/kgBB mg setiap hari. Kelompok Perlakuan ke 2 (P2) penyuntikan isoniazid dosis 80 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal dan EEKGM 500/kgBB mg tiap hari. Setelah 5 minggu (35 hari) diambil darah dari vena pleksus ophthalmic untuk pemeriksaan SGPT. Tikus dikorbankan jaringan hati diambil dan dibuat preparat untuk pemeriksaan imunohistokimia (ekspresi NF- κ B p65, TGF- β 1, *E-selectin*, kolagen tpe 1) dan histopatologi (fibrosis hati).

2. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh setelah memenuhi kriteria akan diuji menggunakan uji Kruskal-Wallis, dengan menggunakan program *Statistical Package For The Social Sciences (SPSS) for Windows Release 22*. Hasil pengujian dianggap bermakna bila harga $p < 0,05$.

L. Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian

Hasil Penelitian ini akan dipublikasikan di dalam jurnal kedokteran atau kesehatan internasional dan secara keseluruhan hasil akhir penelitian dibuat dalam bentuk disertasi sebagai salah satu syarat untuk mencapai sebutan Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.