

OPEN ACCESS

Indonesian Journal of Human Nutrition

P-ISSN 2442-6636

E-ISSN 2355-3987

www.ijhn.ub.ac.id

Artikel Hasil Penelitian



Korelasi Pemberian Diet Rendah Protein Terhadap Status Protein, Imunitas, Hemoglobin, dan Nafsu Makan Tikus Wistar Jantan

(The Correlation of Low Protein Diet Administration on Status of Protein, Immunity, Hemoglobin, and Appetite of Male Wistar Rats Rattus norvegicus)

Olivia Anggraeny^{1*}, Chardina Dianovita², Ekanti Nurina Putri³, Minarty Sastrina⁴, Ratih Setya Dewi⁵

¹Jurusan Gizi/Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

* Alamat korespondensi, E-mail: olivia.fk@ub.ac.id; Telp/Fax: 0817324100

Diterima: / Direview: / Dimuat: Oktober 2016 / Nopember 2016 / Desember 2016

Abstrak

Kwashiorkor merupakan salah satu bentuk kekurangan energi protein (KEP) yang disebabkan oleh kurangnya asupan protein. Kwashiorkor sering dihubungkan dengan adanya penyakit infeksi dan anemia. Tingkat kematian akibat kwashiorkor dapat mencapai 10-30 persen. Penanganan kasus kwashiorkor melalui intervensi bahan makanan harus dilakukan secara hati-hati karena terjadi penurunan imunitas. Perlu dilakukan uji kelayakan bahan makanan terlebih dulu pada hewan coba; tetapi karena di Indonesia belum ada diet standar untuk membuat model hewan coba kwashiorkor maka penelitian ini merupakan studi pendahuluan untuk membuat hewan coba kondisi kwashiorkor dengan mengetahui pengaruh pemberian diet rendah protein terhadap beberapa variabel yang merupakan indikator kondisi kwashiorkor. Metode yang digunakan adalah dengan pemberian diet rendah protein dengan berbagai konsentrasi (0%, 2%, 4%, dan 18% sebagai diet cukup protein) selama 2 dan 4 minggu. Albumin, IgG, leukosit, hemoglobin, dan leptin serta perubahan berat badan diukur sebagai indikator kondisi kwashiorkor. Analisis statistik menggunakan *One-way* ANOVA serta dilanjutkan dengan uji korelasi Pearson menggunakan SPSS 16. Regresi linear digunakan untuk mengetahui tren dari perubahan tiap nilai variabel dengan berbagai pemberian kadar protein. Jumlah protein berkorelasi dengan kadar albumin (2 minggu dan 4 minggu) dan dengan kadar IgG (2 minggu) serta ada beda kadar albumin antara kelompok perlakuan 4 minggu ($p=0,007$, $p<0,05$). Masih terlalu dini untuk menggunakan diet rendah protein dalam penelitian ini sebagai standar diet untuk membuat tikus model dengan kondisi defisiensi protein yang kronik seperti pada kwashiorkor namun diet rendah protein (0%) selama 4 minggu dalam penelitian ini dapat digunakan untuk mengetahui efektivitas pemberian intervensi gizi tertentu terhadap perubahan kadar albumin.

Kata kunci: kwashiorkor; diet rendah protein; albumin; IgG; leukosit; hemoglobin; leptin

Abstract

Kwashiorkor is one form of Protein Energy Malnutrition (PEM) caused by inadequate protein intake. Kwashiorkor is frequently related to the occurrence of infectious disease and anemia. Mortality rate caused by kwashiorkor ranges 10% to 30%. Otherwise, poor appetite in kwashiorkor is the differentiator from marasmus. Kwashiorkor case handling through particular food intervention should be done carefully because of impaired immunity in kwashiorkor patient. Therefore, it is necessary to examine the feasibility of those food on animal model, but in Indonesia there is no standard diet for animal model of kwashiorkor. This research aims to become a preliminary study to induce kwashiorkor state in animal model to determine the effect of low protein diet for some variables which are the indicators of kwashiorkor condition. The method used was the administration of low-protein diet with various concentrations (0%, 2%, 4%, and 18% as sufficient protein diet) for 2 and 4 weeks. Albumin, IgG, leukocytes, hemoglobin, and leptin and weight changes were measured as indicators of kwashiorkor condition. Statistical analysis was using One-way ANOVA and continued by Pearson correlation test using SPSS 16. Linear regression was used to determine the trend of changes in the value of each variable with a variety of protein content administrations. The amount of protein correlated with the albumin level (2 weeks and 4 weeks) and IgG level (2 weeks) and there were different levels of albumin among the 4 week treatment groups ($p = 0.007$, $p < 0.05$). It is too early to use a low-protein diet in this study as the standard diet to make animal model of chronic protein deficiency condition as in kwashiorkor, but low protein diet (0%) for 4 weeks in this study can be used to determine the effectiveness of particular nutritional interventions on the changes in albumin levels.

Keywords: kwashiorkor, low protein diet, albumin, IgG, leukocyte, hemoglobin, leptin

PENDAHULUAN

Malnutrisi adalah kondisi tubuh yang mengalami defisiensi energi, protein, dan zat gizi sedangkan KEP (Kurang Energi Protein) merupakan kondisi tubuh yang spesifik pada kekurangan energi dan protein. KEP terbagi menjadi tiga jenis yaitu kwashiorkor, marasmus, dan marasmus-kwashiorkor. Kwashiorkor merupakan KEP tingkat berat yang disebabkan oleh asupan protein yang inadekuat dengan asupan energi yang cukup [1–3].

Masalah gizi kurang khususnya kekurangan energi protein (KEP) masih merupakan masalah kesehatan yang terjadi pada masyarakat di Indonesia. Prevalensi balita gizi kurang atau balita kurus masih tinggi. Menurut hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2007, 2010, dan 2013 belum menunjukkan perbaikan, bahkan ada sedikit peningkatan. Propinsi dengan persentase balita gizi buruk tertinggi adalah Nusa Tenggara Timur (33%). Studi Diet Total (SDT) 2014 menunjukkan bahwa sebanyak 55,7% balita masih mendapatkan asupan energi kurang dari Angka

Kecukupan Energi (AKE) dan 23,6% balita hanya mendapatkan $\leq 80\%$ Angka Kecukupan Protein (AKP) [4,5].

Usia paling rawan terkena kwashiorkor adalah dua tahun karena pada usia tersebut terjadi peralihan dari ASI ke makanan pengganti ASI. Pada penelitian yang dilakukan oleh Elizabeth (2012) ditemukan bahwa kurang energi protein ini tidak hanya terjadi pada golongan masyarakat berpendidikan rendah tetapi juga golongan masyarakat berpendidikan tinggi yang umumnya memberikan pengganti ASI lebih dini dengan kualitas protein yang baik [5,6].

Gejala umum dari kwashiorkor adalah hipoalbuminemia, edema, penurunan imunitas, dermatitis, anemia, apatis, dan terjadi penipisan rambut. Dibandingkan marasmus, kwashiorkor memiliki tingkat morbiditas dan mortalitas yang lebih tinggi dengan penanganan yang lebih sulit karena penderita kwashiorkor lebih rentan terkena infeksi. Kadar serum albumin dipilih sebagai indikator dalam menentukan kondisi kwashiorkor didasarkan bahwa albumin adalah plasma

protein yang paling banyak ada di darah manusia (60%) [7–10].

Selain tanda dan manifestasi klinis tersebut dikatakan pula bahwa salah satu sistem tubuh yang paling buruk dipengaruhi adalah sistem hematopoietik. Salah satunya contohnya adalah dengan adanya anemia. Dengan adanya defisiensi protein yang parah, anak yang mengalami kwashiorkor tidak dapat memben-tuk globin yang cukup, yang merupakan moietas protein dari hemoglobin [11–13].

Defisit protein dan energi maupun keduanya telah diketahui dapat berpengaruh terhadap depresi sistem imun. Kekurangan protein yang parah pada bayi dan balita telah jelas berhubungan dengan atrofi pada organ limfoid primer yang berperan dalam sistem imun, yaitu sumsum tulang belakang dan timus. Efek tercepat dari atrofi pada timus salah satunya adalah leukopenia (penurunan jumlah leukosit) [14].

Selain leukosit, salah satu jenis imunoglobulin yang menurun pada penderita kwashiorkor adalah imunoglobulin G, sedangkan kadar serum IgA dan IgD meningkat secara signifikan. Berdasarkan penelitian yang dilaku-kan pada 50 anak dari Suku Bantu di Afrika, 30 anak yang mengalami kwashiorkor memiliki kadar IgG yang lebih rendah dibandingkan pasien marasmus maupun marasmus kwashior-kor. Perbedaan yang signifikan ini kemungkinan dikarenakan produksi *humoral antibody* yang tidak adekuat pada fase akut. Pada percobaan pada hewan coba yang dilakukan Neyestani *et al.* (2004), serum total IgG berbeda secara signifikan pada kelompok tikus yang diberi diet rendah protein dibandingkan kelompok kontrol. Peningkatan IgG dan IgM serta penurunan pada IgA pada penderita kwashiorkor terjadi setelah adanya *refeeding program* [15,16].

Pada kwashiorkor, efek penurunan pada nafsu makan lebih parah dibandingkan marasmus. Dengan stimulasi, nafsu makan pada pasien marasmus dapat membaik. Nafsu makan dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya kerja hormon leptin dalam tubuh. Leptin adalah suatu hormon yang diproduksi oleh jaringan adipose yang bekerja pada hipo-

talamus serta berperan dalam pengaturan nafsu makan, berat badan, dan fungsi neuroendokrin. Defisiensi leptin pada tikus dan manusia menyebabkan obesitas, diabetes, dan berbagai anomali neuro-endokrin, serta penggantinya dapat me-nyebabkan penurunan asupan makan, nor-malisasi homeostasis gula darah, dan pe-ningkatan pengeluaran energi [17–20].

Menurut Soliman (2000) pasien dengan KEP mengalami penurunan *Body Mass Index* (BMI) secara signifikan di-bandingkan dengan kontrol. BMI berkorelasi secara signifikan dengan leptin. Stapleton (2003) menemukan bahwa pada hewan coba yang diberi diet tanpa protein (0% kasein) mengalami peningkatan serum leptin yang signifikan dibandingkan kontrol yang diberi diet 24% kasein [21,22].

Pada sekitar tahun 1950-1970, kwashiorkor masih menjadi topik penelitian dengan kualitas tinggi dan masih banyak diperdebatkan. Namun sekarang kecenderungan tersebut menurun. Kwashiorkor menjadi topik yang jarang diperdebatkan dan tampak pula pada jumlah publikasi dengan topik tersebut yang berkurang padahal masih banyak anak yang menderita kondisi tersebut dan tidak jarang yang meninggal karenanya. Situasi ini membutuhkan penelitian pada beberapa area salah satunya adalah uji klinis intervensi tertentu salah satunya adalah intervensi gizi [23].

Berbagai alternatif penanganan kwa-shiorkor harus mulai dikembangkan misalnya dengan memanfaatkan bahan makanan lokal yang mudah didapat. Namun demikian, penelitian dengan pemberian bahan makanan maupun obat baru perlu diawali uji kelayakan-nya pada hewan coba, sebelum diujicobakan kepada manusia. Pemilihan umur tikus 4 minggu pada penelitian ini dengan asumsi umur tikus 4 minggu sama dengan usia anak-anak pada manusia seperti kejadian kwashiorkor yang pada umumnya terjadi pada usia anak. Pada penelitian yang dilakukan oleh Shimozuru (2007) dan Quan (2010), usia 4 minggu hingga 8 minggu pada tikus tergolong usia tikus dalam masa penyapihan. Bahan dasar yang digunakan untuk membuat diet rendah protein pada penelitian ini mirip

dengan bahan *free protein diet* (diet bebas protein) yang digunakan untuk membuat tikus model kwashiorkor pada penelitian Katz and Plotkin (1967) yaitu tebu, pati jagung (tepung maizena), dan minyak sayur. Sumber protein yang dipakai adalah tepung terigu. [24–26].

Tebu selain sumber karbohidrat juga memberikan tekstur pada pakan yang diharapkan sesuai dengan sifat tikus yang suka menggerat benda apapun yang dijumpai untuk mengurangi pertumbuhan gigi serinya. Selain itu, tujuan tebu digunakan sebagai salah satu komposisi diet rendah protein adalah untuk memenuhi kebutuhan serat kasar pada tikus [27].

Sebagai langkah awal pengembangan penanganan kwashiorkor perlu dibuat model tikus kwashiorkor yang saat ini sangat diperlukan untuk menunjang penelitian di bidang gizi terkait penanganan kwashiorkor. Pada penelitian ini akan dicobakan berbagai komposisi diet rendah protein sebagai prekursor pembuatan model tikus kwashiorkor. Dengan diketahuinya pengaruh pemberian diet rendah protein pada tikus galur Wistar jantan terhadap status protein (kadar albumin), status imunitas (leukosit dan IgG), nafsu makan (kadar leptin), dan hemoglobin maka diharapkan dapat ditemukan komposisi diet rendah protein yang tepat untuk menyebabkan kondisi kwashiorkor.

METODOLOGI PENELITIAN

Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan eksperimen murni (*true experimental post-test only design with control group*) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar). Penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (No.142/KEPK-FKUB/ EC/ VI/ 2009; No.060/ KEPK-FKUB/ EC/ III/ 2009; No.162/ KEPK-FKUB/ EC/ VII/ 2009; No.060/ KEPK-FKUB/ EC/ III/ 2009; No.051/ KEPK-FKUB/ EC/ II/ 2009).

Sasaran penelitian (populasi/ sampel/ subjek penelitian)

Dalam penelitian ini terdapat dua variabel independen yaitu jumlah protein dan lama perlakuan serta 5 variabel terikat yaitu kadar albumin, leptin, Immunoglobulin G, leukosit, dan hemoglobin. Variabel jumlah protein terdiri dari diet protein normal, rendah protein 0%, rendah protein 2%, dan rendah protein 4%. Variabel lama perlakuan terdiri dari 2 minggu dan 4 minggu. Oleh karena variabel jumlah protein terdiri dari 4 jenis dan variabel lama perlakuan terdiri dari 2 jenis, sehingga disebut dengan 4 x 2 desain faktorial dengan jumlah perlakuan adalah 2 x 4 = 8 perlakuan dengan pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut (28):

- Perlakuan 1 (PA₁):
Tikus diberi diet dengan kadar protein 0% dari total energi selama 2 minggu
- Perlakuan 2 (PA₂):
Tikus diberi diet dengan kadar protein 2% dari total energi selama 2 minggu
- Perlakuan 3 (PA₃):
Tikus diberi diet dengan kadar protein 4% dari total energi selama 2 minggu
- Kontrol (PA₄):
Tikus diberi diet normal/standar dengan protein cukup (18,2% dari total energi) selama 2 minggu
- Perlakuan 1 (PB₁):
Tikus diberi diet dengan kadar protein 0% dari total energi selama 4 minggu
- Perlakuan 2 (PB₂):
Tikus diberi diet dengan kadar protein 2% dari total energi selama 4 minggu
- Perlakuan 3 (PB₃):
Tikus diberi diet dengan kadar protein 4% dari total energi selama 4 minggu
- Kontrol (PB₄):
Tikus diberi diet normal/standar dengan protein cukup (18,2% dari total energi) selama 4 minggu

Penentuan jumlah hewan coba dihitung dengan rumus Hanafiah (2004) sebagai berikut: $p(n - 1) \geq 15$, (p = jumlah perlakuan; n = jumlah ulangan). Sehingga pada penelitian

ini dengan perlakuan sejumlah 8 jenis diperlukan jumlah ulangan minimal 3 kali untuk tiap perlakuan. Oleh karena itu, jumlah hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor. Kriteria inklusi dari sampel penelitian adalah: tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan jenis kelamin jantan, berusia 4-5 minggu, memiliki berat badan 100-120 gram, dan berbulu putih. Kriteria eksklusinya adalah: terdapat luka atau cacat di tubuh tikus. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan atau mati selama penelitian berlangsung akan di-drop out (29).

Agar setiap hewan coba mempunyai peluang yang sama dan karena hewan coba, bahan ransum, tempat penelitian serta bahan penelitian bersifat homogen maka dalam

penentuan kelompok perlakuan dilakukan randomisasi dengan rancangan acak lengkap.

Pengembangan instrument dan teknik pengumpulan data

Diet Normal dan Rendah Protein

Diet normal (cukup protein) diberikan secara *ad libitum* sebanyak 40 gram per tikus terdiri dari 20 gram Comfeed-Pars, 10 gram tepung terigu, dan air. Diet rendah protein yang digunakan menggunakan tebu sebagai bahan dasar dengan tambahan tepung terigu merk "Segitiga Biru" (kecuali diet rendah protein 0%), tepung maizena merk "Maizenaku non transgenik", minyak sayur merk "Bimoli Spesial", dan air.

Tabel 1. Kandungan Energi dan Zat Gizi Bahan Diet Normal (Cukup Protein)

Jenis Kandungan	Jumlah
Energi	105,2 kkal
Protein	4,8 g (18,2% dari total energi)
Lemak	0,9 g (7% dari total energi)
Karbohidrat	19,2 g (73% dari total energi)

Tabel 2. Komposisi Bahan Diet Rendah Protein

Jenis Diet	Tebu (gram)	Tepung Terigu (gram)	Minyak Sayur (gram)	Tepung Maizena (gram)
Diet Rendah Protein 0%*	20	0	1	24
Diet Rendah Protein 2%**	20	5	1	19
Diet Rendah Protein 4%***	13	10	1	15

Keterangan:

* Energi: 105,3 kkal; KH: 23,3 g (91% dari total energi); Protein: 0 g (0% dari total energi); Lemak: 1 g (9 % dari total energi)

** Energi: 104,4 kkal; KH: 22,5 g (89% dari total energi); Protein: 0,6 g (2% dari total energi); Lemak: 1,1 g (9% dari total energi)

*** Energi: 105,6 kkal; KH: 22,2 g (86% dari total energi); Protein: 1,1 g (4% dari total energi); Lemak: 1 g (9% dari total energi)

Pemeriksaan Kadar Albumin

Menggunakan metode Cobas Mira dengan satuan g/dl.

Pemeriksaan IgG dan Leptin

Menggunakan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dengan satuan ukur masing-masing mg/ml dan $\mu\text{g/ml}$.

Pemeriksaan Kadar Leukosit dan Hemoglobin

Menggunakan metode micros 6,0 dengan satuan hitung masing-masing $/\text{mm}^3$ darah dan g/dl.

Pemeliharaan Tikus

Tempat yang digunakan untuk pemeliharaan tikus adalah kandang plastik berukuran 25 cm x 15 cm x 7 cm. Pada setiap kandang diisi 1 ekor tikus. Tikus diberi makan dan minum secara *ad libitum* sesuai kelompok perlakuan setiap hari hingga waktu lama penelitian yang telah ditetapkan. Asupan tikus juga dihitung setiap hari dengan menimbang pakan sisa sedangkan penggantian sekam dan penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap 3 hari sekali.

Teknik analisis data

Pada penelitian ini, data kadar albumin, leukosit, IgG, leptin, dan hemoglobin akan diuji beda sesuai dengan kelompok lama perlakuan dengan menggunakan uji *One Way Anova* dengan derajat kepercayaan 95%. Setelah uji beda maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tuckey* untuk mengetahui perbedaan kemaknaan pada masing-masing perlakuan. Korelasi antara pemberian protein dengan kadar albumin, leukosit, IgG, leptin, dan hemoglobin diuji dengan menggunakan uji Pearson. Uji regresi linear digunakan untuk mengetahui tren dari perubahan tiap nilai variabel dengan perbedaan kadar protein yang diberikan. Sebagai alat bantu komputersasi data, menggunakan program komputer SPSS 16.

HASIL PENELITIAN

Karakteristik Tikus

Data mengenai karakteristik berat badan tikus dapat dilihat pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan berat badan akhir tikus yang diberi diet cukup protein (normal) selama 2 dan 4 minggu menunjukkan adanya peningkatan sedangkan berat badan tikus yang diberi diet rendah protein berbagai konsentrasi menunjukkan adanya penurunan.

Perubahan berat badan terjadi pada setiap tikus selama penelitian, walaupun beberapa kelompok tikus mengalami penurunan berat badan namun tidak ada tikus yang mati selama perlakuan. Beberapa tikus yang mengalami penurunan berat badan masih berada dalam kondisi normal namun beberapa tikus juga ada yang mengalami perubahan fisik seperti kerontokan bulu. Beberapa tikus yang mengalami kerontokan bulu membuat bulu tubuh mereka tampak jarang tidak sebat bulu tubuh tikus normal. Tikus yang dari segi penampakan fisik paling banyak mengalami kerontokan bulu adalah tikus yang diberi diet rendah protein 0%.

Asupan Protein Tikus

Sisa pakan ditimbang setiap hari kemudian jumlah pakan yang dikonsumsi dalam satuan gram dikonversi menjadi asupan protein (kkal) dengan cara membagi jumlah pakan yang dikonsumsi per hari (dalam satuan gram) dengan 40 (jumlah pakan dalam satuan gram yang diberi pada tiap tikus tiap hari) kemudian dikalikan dengan jumlah protein tiap jenis diet. Setelah itu, hasil dari perhitungan tersebut dikalikan dengan 4 (1 gram protein=4 kkal protein) Rerata asupan protein tikus pada perlakuan 2 dan 4 minggu dapat dilihat pada Tabel 4.

Berdasarkan data pada tabel 4 dapat diketahui bahwa asupan protein tertinggi pada perlakuan 2 dan 4 minggu adalah pada tikus yang diberi diet normal dan yang terendah adalah pada kelompok tikus yang diberi diet rendah protein 0%.

Tabel 3. Karakteristik Berat Badan Tikus

Kelompok Perlakuan	Rerata Berat Badan Awal	Rerata Berat Badan Akhir ± SD (gram)
	± SD (gram)	
2 Minggu		
PA ₁	116,30 ± 3,76	140,27 ± 7,12
PA ₂	118,30 ± 1,08	86,53 ± 3,10
PA ₃	107,33 ± 7,09	86,56 ± 3,09
PA ₄	113,26 ± 5,74	77,33 ± 6,42*
4 Minggu		
PA ₁	110,33 ± 9,29	129,33 ± 25,67
PB ₂	106,00 ± 3,60	89,16 ± 1,44
PB ₃	114,67 ± 568	83,50 ± 6,61
PB ₄	112,83 ± 2,25	79,67 ± 2,08**

Keterangan:

PA₁: Kelompok perlakuan: diet 0% protein selama 2 minggu

PA₂: Kelompok perlakuan: diet 2% protein selama 2 minggu

PA₃: Kelompok perlakuan: diet 4% protein selama 2 minggu

PA₄: Kelompok perlakuan: diet cukup protein selama 2 minggu

PB₁: Kelompok perlakuan: diet 0% protein selama 4 minggu

PB₂: Kelompok perlakuan: diet 2% protein selama 4 minggu

PB₃: Kelompok perlakuan: diet 4% protein selama 4 minggu

PB₄: Kelompok perlakuan: diet cukup protein selama 4 minggu

*Berbeda secara signifikan dengan nilai P<0,05 pada kelompok perlakuan 2 minggu

**Berbeda secara signifikan dengan nilai P<0,05 pada kelompok perlakuan 4 minggu

Tabel 4. Rerata Asupan Protein Tikus (kkal)

Kelompok Perlakuan	Rerata Asupan Protein (kkal)
2 minggu	
PA ₁	0,13 ± 0,005
PA ₂	1,10 ± 0,03
PA ₃	1,02 ± 0,03*
PA ₄	14,63 ± 1,81*
4 minggu	
PA ₁	0,17 ± 0,02**
PB ₂	0,79 ± 0,02**
PB ₃	1,24 ± 0,09**
PB ₄	8,43 ± 0,05**

Keterangan:

PA₁: Kelompok perlakuan: diet 0% protein selama 2 minggu

PA₂: Kelompok perlakuan: diet 2% protein selama 2 minggu

PA₃: Kelompok perlakuan: diet 4% protein selama 2 minggu

PA₄: Kelompok perlakuan: diet cukup protein selama 2 minggu

PB₁: Kelompok perlakuan: diet 0% protein selama 4 minggu

PB₂: Kelompok perlakuan: diet 2% protein selama 4 minggu

PB₃: Kelompok perlakuan: diet 4% protein selama 4 minggu

PB₄: Kelompok perlakuan: diet cukup protein selama 4 minggu

*Berbeda secara signifikan dengan nilai P<0,05 pada perlakuan 2 minggu

**Berbeda secara signifikan dengan nilai P<0,05 pada kelompok perlakuan 4 minggu

Kadar Albumin, Immunoglobulin G, Leukosit, Hemoglobin, dan Leptin Serum

Hasil pemeriksaan kadar albumin, Immunoglobulin G, leukosit, hemoglobin, dan Leptin pada tiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5. Pada tabel tersebut dapat diketahui bahwa kadar albumin tertinggi dimiliki oleh kelompok tikus yang diberi diet normal selama 4 minggu, sedangkan kadar albumin terendah dimiliki oleh kelompok tikus yang diberi diet rendah protein 0% selama 2 minggu. Tidak ditemukan beda kadar albumin antar kelompok perlakuan 2 minggu dan 4 minggu ($p=0,213$, $p<0,05$) namun pada kelompok perlakuan 4 minggu ditemukan adanya perbedaan antara kelompok perlakuan diet normal dengan diet rendah protein 0%, diet rendah protein 2%, dan diet rendah protein 4% ($p=0,007$, $p<0,05$).

Tabel 5 menunjukkan kadar IgG tertinggi pada kelompok perlakuan PA1 yaitu $1,18\pm 0,04$ mg/ml, sedangkan rerata kadar IgG yang terendah pada kelompok perlakuan PA4. Tidak ditemukan adanya perbedaan kadar IgG pada kelompok perlakuan 4 minggu ($p=0,644$, $p<0,05$) namun pada kelompok perlakuan 2 minggu ditemukan adanya perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan diet protein 0% dengan diet protein 2%, 4%, dan diet normal ($p=0,002$, $p<0,05$).

Berdasarkan data pada Tabel 5 diketahui pula bahwa jumlah leukosit tertinggi terdapat pada kelompok tikus yang diberi diet normal selama 2 minggu, sedangkan yang paling rendah terdapat pada kelompok tikus yang diberi diet rendah protein 0% selama 4 minggu. Tidak terdapat perbedaan jumlah leukosit pada kedua kelompok lama perlakuan.

Kadar Hb tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 2% protein selama 2 minggu, sedangkan rerata kadar Hb yang terendah pada kelompok perlakuan protein 0% selama 4 minggu. Tidak terdapat perbedaan kadar Hb pada kedua kelompok lama perlakuan.

Dari tabel 5 menunjukkan rerata kadar serum leptin yang terendah terdapat pada kelompok lama perlakuan 2 minggu yang diberi diet protein 2% dan yang tertinggi ada pada kelompok yang diberi diet protein 2% selama 4

minggu. Tidak ada perbedaan kadar serum leptin pada kedua kelompok lama perlakuan.

Uji korelasi antara asupan protein dengan kadar albumin, leukosit, IgG, leptin, dan hemoglobin dikelompokkan menjadi 2 bagian yaitu korelasi antar variabel pada kelompok lama perlakuan 2 minggu dan 4 minggu. Berdasarkan uji korelasi dari semua variabel, hanya asupan protein selama 2 dan 4 minggu dengan kadar albumin serta asupan protein selama 2 minggu dengan kadar IgG yang memiliki hubungan yang bermakna, masing-masing $p=0,032$; $0,000$; dan $0,004$ ($p<0,05$).

PEMBAHASAN

Protein berperan sebagai komponen utama yang terdapat dalam jaringan tubuh manusia dan hewan. Protein merupakan zat gizi esensial dalam menunjang pertumbuhan yang optimal, perkembangan, manajemen berat badan, dan kesehatan manusia. Bahan makanan yang kaya akan protein hewani adalah daging, ikan, telur, unggas, serta produk susu dan olahannya. Kekurangan zat gizi yang bersumber dari protein menyebabkan *stunting*, anemia, kelemahan fisik, edema, disfungsi vaskuler, dan gangguan imunitas. [9,30,31].

Pada penelitian ini tikus galur Wistar jantan diberi pakan diet rendah protein dengan berbagai dosis yaitu diet rendah protein 0%, 2%, dan 4%. Lama perlakuan pada penelitian ini adalah 2 minggu dan 4 minggu pada kelompok tikus yang berbeda, sehingga pada penelitian ini terdapat sebanyak 8 perlakuan. Pada tiap kelompok lama perlakuan terdapat tikus kontrol dengan pemberian diet normal yang memiliki kandungan protein cukup (18%) sebagai pembanding dengan tikus yang diberi diet rendah protein.

Bahan penyusun diet rendah protein terdiri dari tebu, tepung terigu, tepung maizena, minyak sayur, dan air. Komposisi bahan berbeda-beda pada setiap jenis diet rendah protein namun tetap dibuat isokalori dengan diet normal artinya kandungan energi pada setiap jenis diet rendah protein adalah setara dengan diet normal, hanya berbeda kandungan proteinnya saja. Jumlah zat gizi makro lain

yaitu lemak dan karbohidrat mendekati sama antar diet baik normal maupun diet rendah protein. Jumlah energi yang isokalori bertujuan untuk memastikan asupan kalori yang relatif normal sehingga pengaruh pemberian diet protein dapat terlihat. Bahan penyusun diet normal berbeda dengan diet rendah protein. Pada diet normal terdiri dari *Comfeed-pars*, tepung terigu, dan air. Hal tersebut bertujuan agar tikus kontrol benar-benar berada dalam kondisi normal dan sehat.

Perubahan pada asupan protein akan sangat berpengaruh terhadap perubahan berat badan. Hal tersebut dikarenakan protein dapat mempengaruhi proses thermogenesis, rasa kenyang, komposisi tubuh, dan efisiensi energi. Pada penelitian ini, kecenderungan terjadinya peningkatan berat badan hanya terjadi pada tikus yang diberi diet normal, sedangkan kecenderungan penurunan berat badan terjadi pada tikus yang diberi diet rendah protein. Peningkatan berat badan tikus pada perlakuan 2 minggu dan 4 minggu yang hanya terjadi pada kelompok tikus yang diberi diet normal disebabkan oleh tingkat konsumsi dan asupan protein yang paling tinggi dimana kandungan protein dan energinya telah disesuaikan dengan kebutuhan tikus [30].

Komposisi zat gizi dari diet normal lebih seimbang dibandingkan dengan komposisi diet rendah protein. Selain itu, tekstur dari diet ini lebih padat, sehingga diet normal ini lebih dapat diterima oleh tikus karena sesuai dengan pakannya sehari-hari. Pada kelompok lama perlakuan 2 minggu dan 4 minggu, asupan protein paling rendah pada dua kelompok tersebut sama-sama terdapat pada kelompok tikus yang diberi diet rendah protein 0%. Temuan tersebut sejalan dengan penurunan berat badan yang terjadi hanya pada tikus yang diberi diet rendah protein dengan lama perlakuan 2 minggu maupun 4 minggu dan penurunan berat badan paling besar yang terdapat pada perlakuan diet rendah protein 0%. Selain itu, meskipun pada penelitian ini tidak ditemukan perbedaan kadar serum leptin antar kelompok dan tidak berkorelasi dengan asupan protein namun apabila dilihat dari hasil analisis regresi pada kelompok perlakuan 2 minggu, menunjukkan bahwa kadar serum leptin ber-

banding lurus dengan jumlah protein. Ketika tubuh kekurangan asupan protein maka tubuh akan mengalami defisiensi asam amino. Defisiensi ini akan berpengaruh terhadap penurunan sekresi protein plasma enzim, hormon, dan lain-lain sehingga leptin sebagai bagian dari protein hormon juga akan menurun sekresinya [32].

Leptin berperan pula dalam pengaturan selera makan dan asupan makanan. Tren regresi pada kelompok perlakuan 4 minggu menunjukkan bahwa asupan protein berbanding terbalik dengan kadar serum leptin. Ini mengakibatkan nafsu makan tikus terus menurun sesuai dengan tren asupan pakan kelompok 4 minggu yang menurun tajam memasuki minggu ke-3, terutama pada tikus diet protein 2%. Seperti yang telah diketahui bahwa saat kondisi tubuh kekurangan protein dalam waktu yang lama (mengarah ke kondisi kwashiorkor), tubuh banyak mengalami defisiensi, salah satunya berefek pada penurunan nafsu makan, yang membedakannya dengan marasmus. Walaupun demikian, tampaknya efek tersebut akan berbeda dengan pemberian protein yang lebih tinggi dibandingkan kebutuhan normal karena pada penelitian yang dilakukan oleh Plantenga *et al* (2006) menunjukkan bahwa konsumsi diet tinggi protein menyebabkan rasa kenyang yang lebih dibandingkan dengan kelompok dengan jumlah protein normal [17,18,30].

Masing-masing diet rendah protein memiliki tekstur yang berbeda-beda. Tekstur diet rendah protein 0% memiliki tekstur yang paling lembek dan sukar dibentuk karena pada diet ini tidak menggunakan tepung terigu sama sekali untuk memastikan agar kandungan proteinnya mendekati 0%. Jumlah kandungan protein pada diet protein 0% adalah mendekati 0% dari jumlah energi total. Hal ini dikarenakan pada hampir semua bahan makanan pasti mengandung protein walaupun dengan jumlah yang sangat sedikit maka tidak mungkin jika dalam diet protein 0% itu tidak mengandung protein sama sekali. Jumlah kandungan protein pada diet ini adalah sebanyak 0,4 gram atau hanya sebesar 1,6 kkal, sedangkan pada diet rendah protein 2% memiliki tekstur padat dan lebih mudah dibentuk. Tekstur diet ini paling mendekati tekstur diet normal sehingga lebih

mudah diterima dibandingkan diet rendah protein yang lain. Tikus yang mengalami penurunan berat badan pada akhir perlakuan tidak ada yang mati namun beberapa tikus mengalami perubahan fisik berupa peningkatan kerontokan bulu. Hal tersebut merupakan salah satu karakteristik kwashiorkor [33].

Salah satu indikator kekurangan protein adalah kadar albumin karena dalam mengindikasikan kekurangan protein, albumin memiliki akurasi dan presisi yang baik dalam kondisi akut maupun kronik. Menurut Giknis dan Clifford (2008), kadar serum albumin normal pada tikus adalah sebesar 3,40-4,8 g/dl. Jika dilihat berdasarkan *cut off* tersebut maka pada penelitian ini semua rata-rata kadar serum albumin pada seluruh kelompok termasuk di bawah normal [34,35].

Pada penelitian ini ditemukan adanya hubungan antara jumlah protein dengan kadar albumin baik setelah perlakuan selama 2 maupun 4 minggu. Penurunan kadar albumin dengan menurunnya asupan protein yang ditemukan pada kelompok perlakuan selama 2 minggu ini sejalan dengan penelitian lain yang mengemukakan bahwa pemberian diet bebas protein pada tikus selama 1 minggu menghasilkan keadaan yang abnormal termasuk penurunan kadar serum protein dan albumin. Retriksi protein pada manusia sangat berpengaruh pada penurunan parameter biokimia pada pengkajian status gizi, seperti albumin dan total protein [24,36-39].

Penelitian lain menggunakan babi muda yang diberikan diet rendah protein 3% protein, setelah 8 minggu perlakuan diet, konsentrasi plasma albumin babi secara signifikan turun jika dibandingkan dengan kontrol. Pada penelitian yang dilakukan Manary (1997) juga menunjukkan terjadinya penurunan sintesis protein sebesar 25% pada babi yang mengalami defisiensi protein. Dalam penelitian yang sama juga dijelaskan bahwa sintesis protein merupakan proses kompleks yang secara umum meningkat dengan peningkatan asupan protein pada kejadian malnutrisi. Pada anak dengan defisiensi protein juga terjadi pembatasan *turnover* protein dengan penurunan sintesis dan katabolisme protein yang ditujukan agar dapat beradaptasi dengan kekurangan protein yang

dari makanan. Penurunan *turnover* protein ini juga merupakan upaya penting untuk memastikan ekskresi nitrogen yang minimal dan memaksimalkan efisiensi protein dari makanan [8,40,41].

Pada penelitian ini ditemukan tren yang berbeda pada kadar albumin setelah 4 minggu perlakuan yang semakin menurun dengan meningkatnya jumlah protein. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Garlick *et al.* (1975) serta Waterlow and Stephen (1968) yang menunjukkan terjadinya peningkatan pada sintesis protein hepar pada tikus yang diberi diet rendah protein, sedangkan sintesis protein otot berkurang. Penemuan tersebut menunjukkan penggunaan asam amino dari makanan untuk pembentukan otot itu berkurang selama terjadinya defisiensi protein. Hal ini didukung dengan hasil pengukuran penurunan berat badan pada semua kelompok diet rendah protein yang menunjukkan bahwa penurunan berat badan lebih besar terjadi pada kelompok tikus yang memiliki asupan protein lebih rendah. Dengan demikian memudahkan asam amino makanan secara langsung mengatur sintesis protein organ penting lain dalam hal ini seperti albumin [40,42].

Selain dengan kadar albumin, jumlah protein juga berkorelasi dengan kadar IgG setelah perlakuan selama 2 minggu dan ditemukan adanya perbedaan antara kelompok diet protein 0% dengan kelompok lainnya. Imunoglobulin dibutuhkan tubuh dalam menghambat terjadinya penyakit infeksi. Pada penelitian ini ditemukan bahwa tikus yang mengasup jumlah protein lebih rendah memiliki kecenderungan kadar IgG lebih tinggi. Sama halnya pada kadar albumin yang ditemukan pada penelitian ini yang memiliki kecenderungan lebih tinggi pada kelompok dengan asupan lebih rendah. Hal tersebut dimungkinkan karena tubuh masih dapat mengompensasi kurangnya asupan protein dengan meminimalkan penggunaan protein untuk sintesis otot dan menggunakannya untuk protein organ penting seperti imunoglobulin. Kecenderungan ini tampak pula pada kadar IgG setelah perlakuan 4 minggu walaupun tidak signifikan korelasinya [43].

Penurunan jumlah sel darah putih juga dapat menjadi indikator adanya penurunan imunitas tubuh. Hal tersebut dikarenakan sebagian besar mekanisme imunitas tubuh tergantung pada replikasi sel, sintesis sel dan produksi komponen protein aktif, yang sangat dipengaruhi oleh ketersediaan protein. Meskipun tidak ditemukan adanya beda serta korelasi antara jumlah protein dengan kadar leukosit namun tren peningkatan kadar leukosit dengan menurunnya jumlah protein seperti yang terjadi dengan kadar IgG tampak pada perlakuan selama 2 minggu [44].

Kadar hemoglobin pada penelitian ini tidak ditemukan adanya perbedaan antar kedua kelompok perlakuan waktu. Meskipun begitu pada kelompok perlakuan 4 minggu ditemukan bahwa kadar Hb terendah terdapat pada kelompok diet rendah protein 0%. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Scrimshaw dan Viteri (2010) yang menyatakan bahwa dengan defisiensi protein maka tubuh tidak dapat membentuk globin yang cukup, yang merupakan moietas protein dari hemoglobin [11].

Walaupun terdapat hubungan antara albumin dan IgG dengan jumlah protein namun hubungan tersebut masih tergolong lemah. Selain itu, pada penelitian ini belum ditemukan hubungan antara variabel lain seperti leukosit, hemoglobin, dan leptin. Oleh karena itu, masih terlalu dini jika menggunakan standar diet yang digunakan pada penelitian ini untuk membuat tikus model dengan kondisi defisiensi protein yang kronik seperti pada kwashiorkor. Masih tampak adanya kompensasi tubuh dengan katabolisme protein yang menyebabkan kadar albumin dan IgG pada kelompok dengan perlakuan jumlah protein lebih rendah memiliki kadar lebih tinggi.

Pada kondisi kwashiorkor, adanya kompensasi tubuh tersebut tidak akan berlangsung dengan baik selamanya karena seiring dengan berkurangnya cadangan protein tubuh di otot maka proses katabolisme juga akan semakin berkurang sehingga kondisi

normal tidak lagi dapat dicapai dan kurangnya asupan protein tubuh dalam jangka waktu yang panjang akhirnya dapat menimbulkan kwashiorkor. Selain itu, ketika tubuh kekurangan protein dalam jangka waktu yang lama (kronis) maka protein plasma dan asam amino tubuh yang telah menurun akan mempengaruhi sintesis produk-produk sistem imun yang mengakibatkan terjadinya penurunan sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi [32,45].

Pada defisiensi protein kronik, terjadi penurunan sintesis protein tidak hanya pada jaringan otot tetapi juga jaringan lain. Hal ini menunjukkan semua sistem organ dan juga otot terlibat dalam adaptasi terhadap penurunan kronik protein dari asupan makanan. Kekurangan protein kronik pada makanan menyebabkan tidak tersedianya asam amino yang adekuat untuk sintesis substansi penting dan kekurangan ini tidak dapat lagi diatasi dengan katabolisme protein [46].

Waktu perlakuan yang lebih lama pada penelitian selanjutnya dapat dicoba untuk memberikan efek lebih besar pada kadar serum variabel yang diperiksa oleh karena dengan perlakuan lebih lama diharapkan katabolisme protein yang tersisa tidak mampu lagi mengompensasi pembentukan semua substansi penting tubuh seperti albumin, IgG, leukosit, leptin, dan hemoglobin. Bulu yang rontok yang terjadi pada subjek penelitian ini merupakan salah satu indikasi terjadinya efek dari defisiensi protein yang sayangnya tidak diobservasi secara detil oleh peneliti.

Terlepas dari keterbatasan yang ditemukan pada penelitian ini, diet rendah protein (0%) selama 4 minggu dalam penelitian ini dapat digunakan untuk mengetahui efektivitas pemberian intervensi gizi tertentu terhadap perubahan kadar albumin. Hal tersebut dikarenakan perlakuan 0% protein selama 4 minggu mampu menurunkan kadar albumin hingga di bawah nilai normal dan nilai tersebut berbeda nyata dengan kelompok yang mendapatkan cukup protein.

Tabel 5. Hasil Pemeriksaan Kadar Serum Albumin, Immunoglobulin G, Leukosit, Hemoglobin, dan Leptin Tikus setelah Perlakuan selama 2 Minggu dan 4 Minggu

Kelompok Perlakuan	Rerata Kadar Albumin (g/dl)	Rerata Kadar IgG (mg/ml)	Rerata Kadar Leukosit (/mm ³ darah)	Rerata Kadar Hemoglobin (g/dl)	Rerata Kadar Leptin (µg/ml)
PA ₁	2,43±0,32	1,18±0,04*	3033,33± 1656,3	10,53 ± 0,83	1696,25 ±354,88
PA ₂	2,77±0,21	1,03±0,04	5066,67± 1892,9	12,36 ± 0,75	1641,25 ±165,13
PA ₃	2,53±0,06	1,04±0,06	3833,33± 850,49	11,60 ± 1,10	1826,25 ±128,23
PA ₄	2,93±0,15	0,90±0,06	6166,67± 4772,1	11,93 ± 0,92	1776,67 ±440,32
Rerata Kadar (Berdasarkan kelompok lama perlakuan 2 minggu)	2,67±0,23	1,04±0,11	4525±1377,43	11,61 ± 0,78	1735,10±82,37
PB ₁	2,57±0,06	1,01±0,03	2633,33± 1457,16	10,10 ± 0,55	1769,58 ±75,72
PB ₂	2,70±0,26	1,03±0,12	3266,67± 1871,7	11,10 ± 1,15	2059,58 ±198,58
PB ₃	2,57±0,15	1,07±0,02	5233,33± 1446,8	11,23 ± 1,11	1844,58±216,47
PB ₄	3,23±0,21**	1,06±0,04	5766,67± 3937,4	12,13 ± 0,61	1642,92 ±63,15
Rerata Kadar (Berdasarkan kelompok lama perlakuan 4 minggu)	2,77±0,32	1,05±0,04	4225±1510,55	11,14 ± 0,83	1829,17±174,71

Keterangan:

PA₁ : Kelompok perlakuan: diet 0% protein selama 2 minggu

PA₂: Kelompok perlakuan: diet 2% protein selama 2 minggu

PA₃: Kelompok perlakuan: diet 4% protein selama 2 minggu

PA₄: Kelompok perlakuan: diet cukup protein selama 2 minggu

PB₁: Kelompok perlakuan: diet 0% protein selama 4 minggu

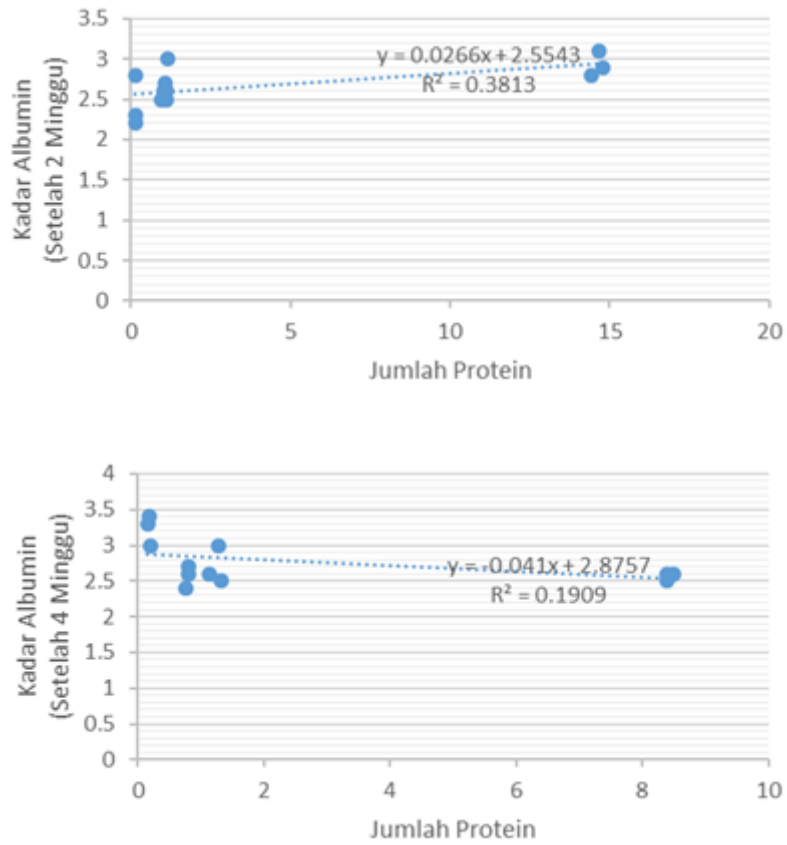
PB₂: Kelompok perlakuan: diet 2% protein selama 4 minggu

PB₃: Kelompok perlakuan: diet 4% protein selama 4 minggu

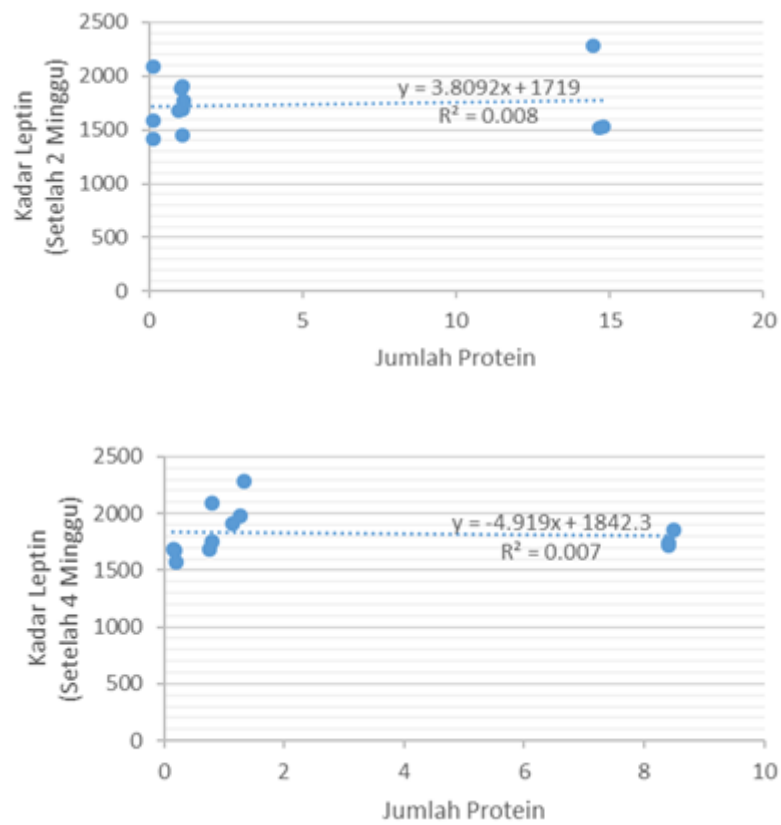
PB₄: Kelompok perlakuan: diet cukup protein selama 4 minggu

*Berbeda secara signifikan dengan nilai P<0,05 pada perlakuan 2 minggu

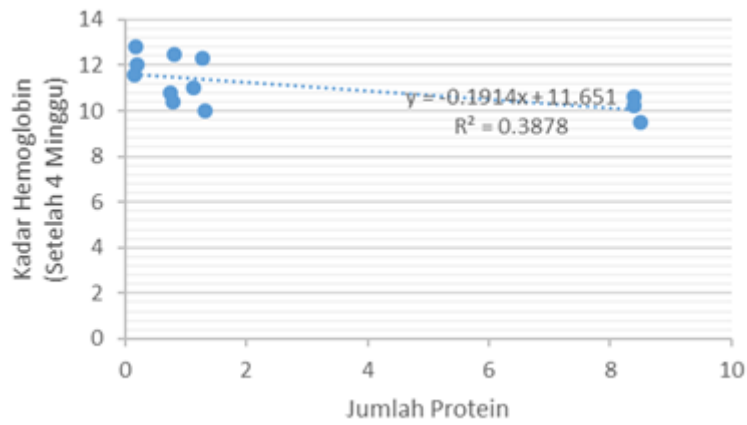
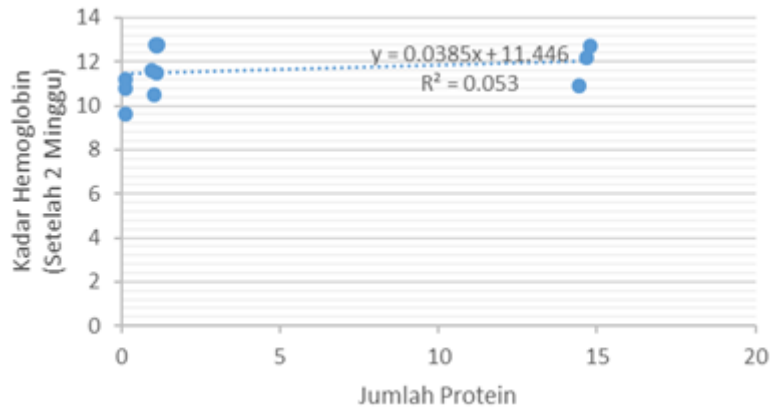
**Berbeda secara signifikan dengan nilai P<0,05 pada kelompok perlakuan 4 minggu



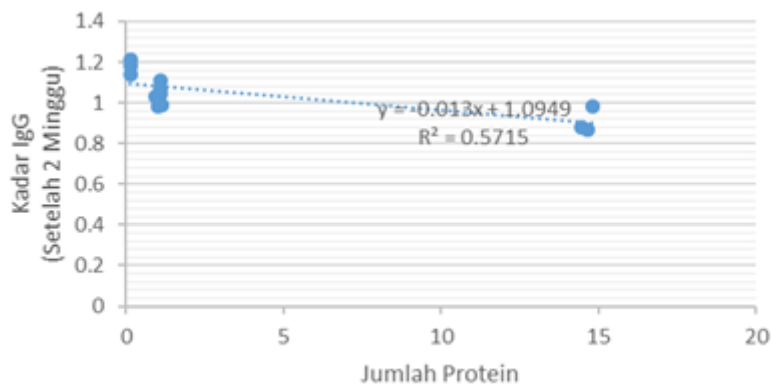
Gambar 1. Hasil Analisis Regresi Jumlah Protein dengan Kadar Serum Albumin (setelah Perlakuan selama 2 Minggu dan 4 Minggu)

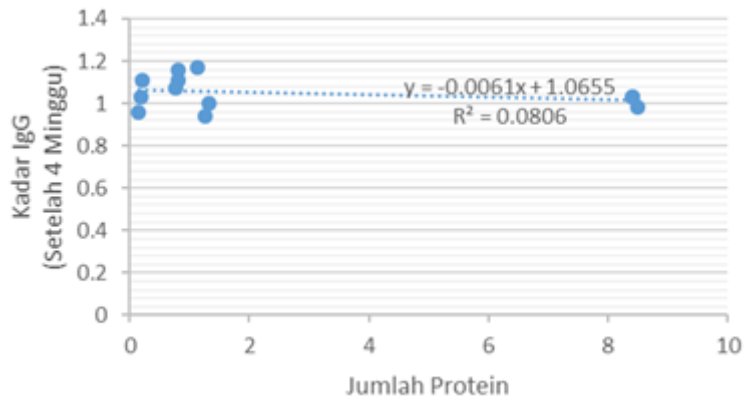


Gambar 2. Hasil Analisis Regresi Jumlah Protein dengan Kadar Serum Leptin (setelah Perlakuan selama 2 Minggu dan 4 Minggu)

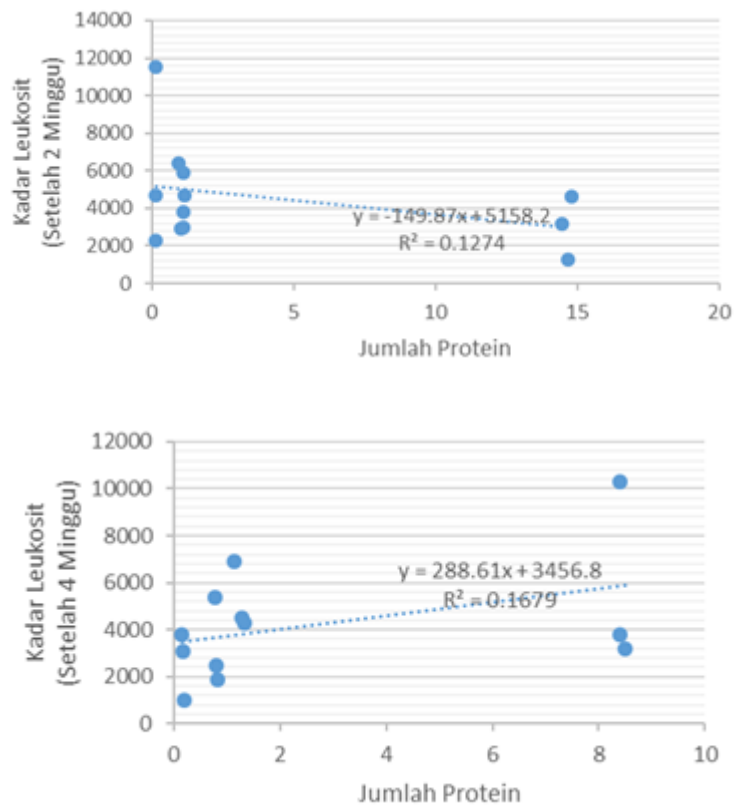


Gambar 3. Hasil Analisis Regresi Jumlah Protein dengan Kadar Serum Hemoglobin (setelah Perlakuan selama 2 Minggu dan 4 Minggu)





Gambar 4. Hasil Analisis Regresi Jumlah Protein dengan Kadar Serum IgG (setelah Perlakuan selama 2 Minggu dan 4 Minggu)



Gambar 5. Hasil Analisis Regresi Jumlah Protein dengan Kadar Serum Leukosit (setelah Perlakuan selama 2 Minggu dan 4 Minggu)

KESIMPULAN

Tidak ditemukan korelasi antara jumlah protein dengan kadar leptin, hemoglobin, dan leukosit namun pada penelitian ini ditemukan bahwa jumlah protein berkorelasi dengan kadar albumin setelah perlakuan selama 2 minggu dan 4 minggu serta berkorelasi dengan kadar IgG setelah perlakuan selama 2 minggu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada para pembimbing tugas akhir kami yang telah memberikan arahan dalam kelancaran pengambilan data hingga penyusunan laporan akhir dan para laboran yang telah membantu dalam analisa variabel serta semua pihak yang tidak dapat kami sebut satu-persatu.

DAFTAR RUJUKAN

- Grover Z, Ee LC. Protein Energy Malnutrition. *Nutr Defic*. 2009 Oct; 56 (5): 1055–68.
- Ubesie AC, Ibeziako NS, Ndiokwelu CI, Uzoka CM, Nwafor CA. Under-five Protein Energy Malnutrition Admitted at the University of In Nigeria Teaching Hospital, Enugu: a 10 year retrospective review. *Nutr J*. 2012; 11 (1): 43.
- Yandi, RA. Seorang Anak Perempuan Usia Lima Tahun dengan Kwashiorkor. *J Medula Unila*. 2016 Jan; 3: 127–32.
- Gunawan G, Fadlyana E, Rusmil K. Hubungan Status Gizi dan Perkembangan Anak Usia 1-2 Tahun. *Sari Pediatri*. 2011 Agustus; 13(2): 142–6.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Situasi Gizi Di Indonesia. Jakarta Selatan: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2016. 1-10 p.
- Elizabeth K. Changing Profile of Undernutrition and Edematous Severe Acute Malnutrition (E-SAM). *Indian Pediatrics*. 2012 Oct 16; 49:843.
- Van B. Kwashiorkor,. 2007; Available from: <http://Pennhealth.com/ency/article/001604.htm>
- Jahoor F, Badaloo A, Reid M, Forrester T. Protein metabolism in severe childhood malnutrition. *Ann Trop Paediatr*. 2008 Jun 1; 28 (2): 87–101.
- Lee P, Wu X. Review: Modifications of Human Serum Albumin and Their Binding Effect. *Curr Pharm Des*. 2015; 21 (14): 1862–5.
- Kirilova EM, Kalnina I, Zvagule T, Gabruseva N, Kurjane N, Solomenikova II. Fluorescent Study of Human Blood Plasma Albumin Alterations Induced by Ionizing Radiation. *J Fluoresc*. 2011; 21 (3): 923–7.
- Scrimshaw NS, Viteri FE. INCAP Studies of Kwashiorkor and Marasmus. *Food Nutr Bull*. 2010 Mar 1; 31 (1): 34–41.
- Bain LE, Awah PK, Geraldine N, Kindong NP, Sigal Y, Bernard N, et al. Malnutrition in Sub-Saharan Africa: burden, causes and prospects. *Pan Afr Med J [Internet]*. 2013 [cited 2016 Nov 24];15. Available from: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/15/120/full/>
- Özkale M, Sipahi T. Hematologic and Bone Marrow Changes in Children with Protein-Energy Malnutrition. *Pediatr Hematol Oncol*. 2014 May 1; 31 (4): 349–58.
- França T, Ishikawa L, Zorzella-Pezavento S, Chiuso-Minicucci F, da Cunha M, Sartori A. Impact of malnutrition on immunity and infection. *J Venom Anim Toxins Trop Dis*. 2009; 15: 374–90.
- Sall MG, Toure M, Vol S, de Vonne T, Mouray H, Kuakovi N, et al. [Effects of refeeding on serum immunoglobulin (IgA, IgG, IgM) concentrations in children with severe protein-energy malnutrition]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr*. 1994 Feb;1 (2): 132–6.
- Neyestani TR, Woodward WD, Hillyer L. Serum Levels of Th2-Type Immunoglobulins are Increased in Weanling Mice Subjected to Acute Wasting Protein-Energy Malnutrition. *Iran J ALLERGY ASTHMA Immunol*. 2004 Mar; 3 No.1: 1–6.
- Cohen MM. Role of leptin in regulating appetite, neuroendocrine function, and

- bone remodeling. *Am J Med Genet A*. 2006 Mar 1; 140A(5): 515–24.
18. Farooqi IS, Bullmore E, Keogh J, Gillard J, O’Rahilly S, Fletcher PC. Leptin Regulates Striatal Regions and Human Eating Behavior. *Science*. 2007 Sep 7; 317 (5843): 1355.
 19. Tierney EP, Sage RJ, Shwayder T. Kwashiorkor from a severe dietary restriction in an 8-month infant in suburban Detroit, Michigan: case report and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2010 May 1; 49 (5): 500–6.
 20. Gautron L, Elmquist JK. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest*. 2011 Jun 1; 121 (6): 2087–93.
 21. Stapleton P, Barden C, McCarter M, Mackrell P, Freeman T, Naama H, et al. Serum leptin levels in acute protein deprivation. *J Parenter Enter Nutr*. 2003 Mar 1; 27 (2): 132–6.
 22. Monti V, Carlson JJ, Hunt SC, Adams TD. Relationship of Ghrelin and Leptin Hormones with Body Mass Index and Waist Circumference in a Random Sample of Adults. *J Am Diet Assoc*. 2006 Jun; 106 (6): 822–8.
 23. Briend A. Kwashiorkor: still an enigma—the search must go on. In 2014. p. 1–37.
 24. Katz M, Plotkin SA. Enhanced Severity of Experimental Herpes simplex Infection in Mice Fed a Protein-free Diet. *J Nutr*. 1967 Dec 1; 93 (4): 555–60.
 25. Shimozuru M, Kodama Y, Iwasa T, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Early weaning decreases play-fighting behavior during the postweaning developmental period of wistar rats. *Dev Psychobiol*. 2007 May 1; 49 (4): 343–50.
 26. Quan MN, Tian YT, Xu KH, Zhang T, Yang Z. Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. *Neuroscience*. 2010 Aug 11; 169 (1): 214–22.
 27. Zumrotus S. Mengenal Jenis Tikus. Balaba. 2007 Tahun III Desember;5 No.2.
 28. Ghozali I. Desain Penelitian Experimental. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro; 2008. 1-259 p.
 29. Hanafiah KA. Rencana Penelitian. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada; 2004. 1-274 p.
 30. Westerterp-Plantenga MS, Luscombe-Marsh N, Lejeune MPM, Diepvens K, Nieuwenhuizen A, Engelen MPKJ, et al. Dietary protein, metabolism, and body-weight regulation: dose–response effects. *Int J Obes*. 2006 Dec; 30: S16–23.
 31. Delimaris I. Adverse Effects Associated with Protein Intake above the Recommended Dietary Allowance for Adults. *ISRN Nutr*. 2013; 2013: 1–6.
 32. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. *Biokimia Harper*. 29th ed. Jakarta: EGC; 2014. 574-633 p.
 33. Osorio SN. Reconsidering Kwashiorkor. *Top Clin Nutr [Internet]*. 2011; 26 (1). Available from: http://journals.lww.com/topicsinclinicalnutrition/Fulltext/2011/01000/Reconsidering_Kwashiorkor.3.aspx
 34. Haymond MW. Nutritional and Metabolic Endpoints. *J Nutr*. 1999;129:273S–278S.
 35. Giknis M, Clifford C. *Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI (Han)*. Charles River; 2008. 1-18 p.
 36. Dessì M, Noce A, Agnoli A, De Angelis S, Fuiano L, Tozzo C, et al. The usefulness of the prognostic inflammatory and nutritional index (PINI) in a haemodialysis population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 Dec;19 (11): 811–5.
 37. Zyga S, Christopoulou G, Malliarou M. Malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome in patients with end-stage renal disease. *J Ren Care*. 2011 Mar;37 (1) :12–5.
 38. Gama-Axelsson T, Heimbürger O, Stenvinkel P, Bárány P, Lindholm B, Qureshi AR. Serum albumin as predictor of nutritional status in patients with ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2012 Sep; 7 (9): 1446–53.
 39. Kovesdy CP, Kopple JD, Kalantar-Zadeh K. Management of protein-energy wasting in non-dialysis-dependent chronic kidney

- disease: reconciling low protein intake with nutritional therapy. *Am J Clin Nutr.* 2013 Jun 1; 97(6): 1163–77.
40. Wykes LJ, Fiorotto M, Burrin DG, Del Rosario M, Frazer ME, Pond WG, et al. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. *J Nutr.* 1996 May;126 (5): 1481–8.
 41. Manary MJ, Brewster DR, Broadhead RL, Crowley JR, Fjeld CR, Yarasheski KE. Protein metabolism in children with edematous malnutrition and acute lower respiratory infection. *Am J Clin Nutr.* 1997 Apr 1; 65 (4): 1005–10.
 42. Waterlow JC. Protein turnover with special reference to man. *Q J Exp Physiol Camb Engl.* 1984 Jul; 69 (3): 409–38.
 43. Phillips AC, Douglas C, Drayson MT, Der G. Salivary Immunoglobulin A Secretion Rate Is Negatively Associated with Cancer Mortality: The West of Scotland Twenty-07 Study. *PLoS ONE.* 2015 Dec 23; 10 (12): 1–11.
 44. Scrimshaw NS, SanGiovanni JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr.* 1997 Aug;66 (2): 464S–477S.
 45. Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL, Krause MV, editors. *Krause's food & the nutrition care process.* 13th ed. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders; 2012. 1227 p.
 46. McMurray DN, Watson RR, Reyes MA. Effect of renutrition on humoral and cell-mediated immunity in severely malnourished children. *Am J Clin Nutr.* 1981 Oct 1; 34 (10): 2117–26.