

**UJI TOKSISITAS AKUT FORMULA SUPLEMEN
KESEHATAN PENAMBAH NAFSU MAKAN TERHADAP
TIKUS BETINA GALUR WISTAR MENGGUNAKAN
METODE OECD 425 *UP AND DOWN PROCEDURE***

SKRIPSI

**NENDEN KARTIKA
A181028**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2022**

**UJI TOKSISITAS AKUT FORMULA SUPLEMEN
KESEHATAN PENAMBAH NAFSU MAKAN TERHADAP
TIKUS BETINA GALUR WISTAR MENGGUNAKAN
METODE OECD 425 *UP AND DOWN PROCEDURE***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**NENDEN KARTIKA
A181028**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2022**

**UJI TOKSISITAS AKUT FORMULA SUPLEMEN
KESEHATAN PENAMBAH NAFSU MAKAN TERHADAP
TIKUS BETINA GALUR WISTAR MENGGUNAKAN
METODE OECD 425 UP AND DOWN PROCEDURE**

**NENDEN KARTIKA
A181028**

November 2022

Disetujui oleh:

Pembimbing



apt. Maria Ulfah, M.Si.

Pembimbing



apt. Novi Irwan Fauzi, M.Si

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebutkan nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Skripsi ini dipersembahkan untuk kedua orang tuaku tercinta serta keluarga besar yang selalu mendukung, mendo'akan dan mendampingi sampai saat ini.

ABSTRAK

Formula suplemen kesehatan yang terdiri dari kurkuminoid, piperin dan minyak ikan berkhasiat sebagai penambah nafsu makan anak. Informasi mengenai uji toksisitas dari suplemen kesehatan adalah untuk menjamin keamanan penggunaan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui nilai LD₅₀ serta gejala toksisitas berdasarkan hasil pengamatan yang terjadi pada organ lambung, ginjal dan hati setelah diberikan suplemen kesehatan secara oral pada hewan percobaan. Metode uji toksisitas oral yang digunakan adalah metode OECD 425 *Up and Down Procedure* dengan dosis 5000 mg/kgBB dan data yang diperoleh dianalisis menggunakan software AOT425StatPgm (*Acute Oral Toxicity Guideline 425 Statistical Programme*). Hasil pengamatan menunjukkan tidak adanya gejala toksisitas selama 14 hari, namun hasil skoring pada histopatologi organ menunjukkan adanya erosi mukosa pada lambung, degenerasi dan nekrosis pada hati serta ginjal. Dari data dan pengamatan yang diperoleh walaupun termasuk kategori tidak toksik berdasarkan nilai LD₅₀ pada dosis >5000 mg/kgBB, namun dengan adanya gejala kelainan pada organ lambung, ginjal dan hati maka disarankan kehati-hatian terhadap penggunaan berlebih.

Kata kunci: suplemen kesehatan, toksisitas akut oral, kurkuminoid, piperin, minyak ikan

ABSTRACT

The health supplement formula consisting of curcuminoids, piperine and fish oil is efficacious as a child's appetite enhancer. Information regarding the toxicity test of health supplements is to ensure safe use. The purpose of this study was to determine the LD₅₀ value and symptoms of toxicity based on observations that occurred in the stomach, kidneys and liver after oral health supplements in experimental animals. The oral toxicity test method used was the OECD 425 Up and Down Procedure with a dose of 5000 mg/kgBW and the data obtained were analyzed using the AOT425StatPgm (Acute Oral Toxicity Guideline 425 Statistical Program) software. The results showed no symptoms of toxicity for 14 days, but the results of scoring on the histopathology of the organs showed mucosal erosions in the stomach, degeneration and necrosis of the liver and kidneys. From the data and observations obtained, even though it is not toxic based on the LD₅₀ value at a dose of > 5000 mg/kgBW, but with symptoms of disorders of the stomach, kidneys and liver, it is advisable to be careful of excessive use.

Keywords: *health supplement, acute oral toxicity, curcuminoid, piperine, fish oil*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Alhamdulillah rabbi ‘alamin, puji dan syukur kehadirat Alloh SWT atas segala nikmat, rahmat dan ridho-nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “**UJI TOKSISITAS AKUT FORMULA SUPLEMEN KESEHATAN PENAMBAH NAFSU MAKAN TERHADAP TIKUS BETINA GALUR WISTAR MENGGUNAKAN METODE OECD 425 UP AND DOWN PROCEDURE**” yang merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana pada Program Studi Sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing apt. Maria Ulfah, M.Si dan apt. Novi Irwan Fauzi, M.Si atas bimbingan, nasihat, dan dukungan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si, selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. apt. Diki Prayugo Wibowo, M.Si, selaku Wakil Ketua Bidang Akademik Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
3. Dr. apt. Wiwin Winingsih, M.Si, selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
4. Prof. Dr. A. Hanafiah Ws, selaku Dosen Wali yang selalu memberikan bimbingan, dukungan serta motivasi,
5. Seluruh staf dosen, staf administasi, asisten laboratorium serta seluruh karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
6. Orangtua yang sudah memberikan do’a dan selalu mendukung baik secara material maupun moril selama perkuliahan,
7. Serta kepada teman-teman terdekat dan mahasiswa/i angkatan 2018 yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang sangat membantu dalam menyelesaikan skripsi ini, memberikan semangat dan kegembiraan selama kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga tugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, November 2022

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
KUTIPAN	ii
PERSEMBAHAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Suplemen Kesehatan	4
2.1.1 Persyaratan Nilai Mutu Suplemen Kesehatan	5
2.2 Emulsi	6
2.2.1 Tujuan Emulsi	6
2.2.2 Metode Pembuatan Emulsi	7
2.2.3 Stabilitas Sediaan Emulsi	8
2.2.4 Formula Umum Sediaan Emulsi	9
2.2.5 Evaluasi Emulsi	10
2.3 Kurkuminoid	10
2.3.1 Khasiat dan Manfaat Kunyit	10
2.3.2 Mekanisme Kurkuminoid	11
2.3.3 Sifat Fisikokimia	11
2.3.4 Toksisitas Kurkuminoid	12

2.4	Piperin	12
2.4.1	Sifat Fisikokimia Piperin	13
2.4.2	Khasiat Piperin	13
2.4.3	Mekanisme Bioenhancer	13
2.4.4	Toksisitas Piperin	14
2.5	Minyak Ikan (<i>Oleum icoridis aselli</i>).....	14
2.5.1	Sifat Fisikokimia Minyak Ikan	15
2.5.2	Manfaat dan Khasiat Minyak Ikan	15
2.5.3	Mekanisme Penambah Nafsu Makan	15
2.6	Uji Toksisitas	16
2.6.1	Uji Toksisitas Akur Oral	16
2.6.2	Uji Toksisitas Kronis Oral	17
2.6.3	Uji Toksisitas Subkronis Oral	18
2.6.4	Metode OECD	18
2.7	Hewan Percobaan	22
2.8	Pemeriksaan Makropatologi dan Histopatologi Organ	23
2.8.1	Lambung	23
2.8.2	Ginjal	23
2.8.3	Hati	24
BAB III TATA KERJA		26
3.1	Alat	26
3.2	Bahan	26
3.3	Metode Penelitian	37
3.3.1	Pembuatan Formula Emulsi Suplemen Kesehatan	27
3.3.2	Evaluasi Sediaan Suplemen Kesehatan	27
3.3.3	Pembuatan Larutan Na-CMC 0,5%	28
3.3.4	Persiapan Larutan Uji	29
3.3.5	Persiapan Hewan Uji	29
3.3.6	Prosedur Uji Toksisitas Akut	29
3.3.7	Pengolahan Data	30
3.3.8	Pembuatan Larutan BNF 10%	30
3.3.9	Pengambilan Organ	30

3.3.10 Pemeriksaan Makropatologi	31
3.3.11 Pengamatan Histopatologi	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Hasil Persiapan dan Evaluasi Emulsi Suplemen Kesehatan	32
4.2 Hasil Persiapan Bahan Uji	34
4.3 Hasil Persiapan Hewan Uji	34
4.4 Hasil Uji Toksisitas Akut Oral	35
4.5 Hasil Penentuan Nilai LD ₅₀	38
4.6 Hasil Pengamatan Makropatologi	39
4.7 Hasil Pengamatan Histopatologi	41
BAB V SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA	46
5.1 Simpulan	46
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya	46
DAFTAR PUSTAKA	47

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kriteria Penggolongan Sediaan Uji Menurut OECD	21
2.2 Kriteria Penggolongan Sediaan Uji	22
4.1 Karakteristik Organoleptis Formula Emulsi	32
4.2 Pengamatan Tanda-Tanda Toksisitas.....	36
4.3 Nilai LD ₅₀ Formula Emulsi Suplemen Penambah Nafsu Makan	38
4.4 Hasil Skoring Makropatologi Organ	40
4.5 Hasil Skoring Histopatologi Lambung	42
4.6 Hasil Skoring Histopatologi Hati	44
4.7 Hasil Skoring Histopatologi Ginjal	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Kunyit	10
2.2 Struktur Kimia Kurkuminoid	11
2.3 Lada Putih	12
2.4 Struktur Kimia Piperin	13
2.5 Minyak Ikan	14
2.6 Tikus Putih	22
4.1 Grafik Bobot Badan Setelah Pemberian Dosis 5000mg/kgBB	37
4.2 Grafik Bobot Organ Sasaran	40
4.3 Histopatologi Lambung	42
4.4 Histopatologi Hati	43
4.5 Histopatologi Ginjal	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Surat Keterangan Persetujuan Etik	51
2 <i>Certificate Of Analysis</i> Curcumin	52
3 <i>Certificate Of Analysis</i> Piperin	53
4 Formula dan Perhitungan Konsentrasi Emulsi Suplemen Kesehatan	54
5 Pembuatan Emulsi Suplemen Kesehatan	55
6 Evaluasi Emulsi Suplemen Kesehatan	56
7 Hasil dan Perhitungan Evaluasi Emulsi	57
8 Perhitungan Dosis Pemberian	59
9 Alur Kerja Penelitian	61
10 Berat Badan Tikus Selama Aklimatisasi	64
11 Berat Badan Tikus Setelah Pemberian Dosis 5000 mg/kgBB	65
12 Gambar Kegiatan Penelitian	66
13 Data Nilai LD ₅₀ Emulsi	67
14 Berat Badan Organ	68
15 Makropatologi Organ	69
16 Histopatologi Organ	70

DAFTAR PUSTAKA

- Adriani, M., dan Bambang, W. 2012. *Pengantar Gizi Masyarakat*. Jakarta: Kencana Prenada Media Group. Hal 12.
- Adriani, M dan Wirjatmadi, B. 2013. *Peranan Gizi Dalam Siklus Kehidupan*. Jakarta : Kencana Prenada Media Group.
- Anggota IKAPI J. *Health Secret of Tumeric (Kunyit)*. Jakarta: Gramedia, PT Elex Media Komputindo; 2011.
- Aggarwal B.B et al. 2006. *Curcumin-Biological and Medicinal Properties*. In: *Turmeric: The Genus Curcuma*. Halaman 297-368.
- Amaliyah, F. R. 2015. *Uji toksisitas subkronik ekstrak air daun katuk (Sauropus androgynus (L.) Merr.) terhadap berat jantung dan histologi jantung pada tikus putih (Rattus norvegicus) betina*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Anonim. 1995. *Farmakope Indonesia jilid IV*. Jakarta: Depkes RI.
- Anonim. 2001. *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 1361/Menkes/SK/XII/*.
- Ariska DW, Ali MS. 2019. *Pengaruh kebiasaan konsumsi junk food terhadap kejadian obesitas remaja*. Jurnal Kesehatan Surya Mitra Husada, 1(1), pp. 1-7.
- Assehroj M, Nehammer S, Matthiessen J, Lautitzen L. 2009. *Fish Oil Supplementation During Lactation May Adversely Affect Long-Term Blood Pressure, Energy Intake, And Physical Activity Of 7-Years-Old Boys*. Journal of Nutrition. 139: 298-304.
- Atmaja, DA. 2008. *Pengaruh Ekstrak Kunyit (Curcuma domestica) Terhadap Gambaran Mikroskopik Mukosa Lambung Mencit BALB/c Yang Diberi Parasetamol*. Artikel Karya Tulis Ilmiah, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Aydin, F., E. Yilmaz, dan M. Soylak. 2018. *Vortex Assited Deep Eutectic Solvent (DES)- Emulsification Liquid-liquid Microextraction of Trace Curcumin in Food and Herbal Tea Samples*. Food Chemistry 243: 442-447.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Nomor 32. 2019. *Persyaratan Keamanan dan Mutu Obat Tradisional*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Nomor 39. 2013. *Standar Pelayanan Publik di Lingkungan Badan Pengawas Obat dan Makanan*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.

- Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). 2020. *Draft Pedoman Uji Toksisitas Praktikum Secara In Vivo*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Bagchi, A. 2012. *Extraction of curcumin*. IOSR Journal of Environment Science, Toxicology and Technology (IOSR-JESTFT). 1(3): 01-16.
- Baldwin C. 2011. *Nutritional Support For Malnourished Patients With Cancer*. *Curr Opin Support Palliat Care*. 5:29-36.
- Baliga S, Sangeeta, Muglikar, Rahul K. 2013. *Salivary pH: A Diagnostic Biomarker*. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 14 (4):461-465.
- Banerjee, C., S. Ghosh, S. Mandal, J. Kuchlyan, N. Kundu, dan N. Sarkar. 2014. *Exploring the Photophysics of Curcumin in Zwitterionic Micellar System: An Approach to Control ESIPT Process in the Presence of Room Temperature Ionic Liquids (RTILs) and Anionic Surfactant*. *The Journal of Physical Chemistry B* 118: 3669-3681.
- Burcham, P.C., 2014. *Target-Organ Toxicity: Liver and Kidney, in: An Introduction to Toxicology*. Springer London, London, pp. 151–187.
- Chattopadhyay, I., K. Biswas, U. Bandyopadhyay, R. K. Banerjee. 2004. *Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications*. *Current Science*. 87:44-50.
- Estiasih T. 2009. *Minyak Ikan: Teknologi dan Penerapannya untuk Pangan dan Kesehatan*. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Grimaldi G, Manto M. 2010. *Neurological tremor: sensors, signal processing and emerging applications*. 10:1399-422.
- Gupta P, Singhal K, Jangra AK, Nautiyal V, Pandey A. 2012. *Shark Liver Oil: A Review*. *Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 1(2): 1-15. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4200.9444>.
- Hartati, S.Y., Balitro. 2013. *Khasiat Kunyit Sebagai Obat Tradisional dan Manfaat Lainnya*. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. Jurnal Puslitbang Perkebunan*. 19 : 5-9.
- Hodge & Sterner. 1995. *Dalam Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Pedoman uji toksisitas nonklinik secara in vivo*. Jakarta: Indonesia.
- Jin X, Zhang ZH, Sun E, Tan XB, Li SL, Cheng XD, You M, Jia XB. 2013. *Enhanced oral absorption of 20(S)-protopanaxadiol by self-assembled liquid crystalline nanoparticles containing piperine: in vitro and in vivo studies*. *Int J Nanomed* 8: 641-652. doi: 10.2147/IJN.S38203.

- Kadam, P.V., K.N. Yadav, F.A. Patel., F.A. Karijkar, M.J. Patil. 2013. *Pharmacognostic, phytochemical and physicochemical studies of piper nigrum Linn, Fruit (Pipreaceae)*. International Research Journal of Pharmacy, 4(5) 189- 193.
- Li, S., W. Yuan, G. Deng, P. Wang, P. Yang, B.B. Aggarwal. 2011. *Chemical composition and product quality control of turmeric (Curcuma longa L.)*. Pharmaceuti. Crops. 2:28-54.
- Moghadamtousi, S. Z., H. A. Kadir, P. Hassandarvish, H. Tajik, S. Abubakar, dan K. Zandi. 2014. *A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin*. BioMed Research International 2014(1): 186864.
- Nugroho. 2012. *Keperawatan gerontik & geriatrik, edisi 3*. Jakarta : EGC.
- OECD. 2001. *OECD Guideline For Testing Of Chemicals Acute Oral Toxicity– Fixed Dose Procedure*. Paris: OECD.
- OECD. 2008. *OECD Guideline for Testing of Chemicals 425 Acute Oral Toxicity Up and Down Procedure*. Paris: OECD Environment Directorate, Environment, Health and safety Division.
- Patil, K. 2011. *Role of Piperine As A Bioavailability Enhancer*. Institute of Pharmacy. India: University Bhanpur.
- Pavithra, P. S., N. Sreevidya, dan R. S. Verma. 2009. *Antibacterial and Antioxidant Activity of Methanol Extract of Evolvulus nummularius*. Indian Journal Pharmacology. Vol. (41): 233-236.
- Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan (PERBPOM) Nomor 17. 2019. *Persyaratan Mutu Suplemen Kesehatan*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan (PERBPOM) Nomor 11. 2020. *Kriteria dan Tata Laksana Registrasi Suplemen Kesehatan*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Posner JB, Saper CB, Schiff ND, Plum F. Plum and Posner's. 2010. *Diagnosis of Stupor and Coma*. New York: Oxford University Press.
- Purwanti, S. Natsir, A. Dan Syam, M. H. 2010. *Kombinasi Kunyit, Bawang putih dan Mineral Zink sebagai Feed Additive untuk Meningkatkan Performa Broiler*. Makasar: Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Purwanti. 2008. *Kajian Efektifitas Pemberian Kunyit, Bawang Putih dan Mineral Zink terhadap Performa, Kadar Lemak, Kolesterol dan Status Kesehatan Broiler*. Thesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Riza Maulida. 2019. *Uji Toksisitas Akut Oral Isolat Kurkumin (Curcuma doemstica Val.) Terhadap Mencit Betina Galur Swiss Webster Menggunakan Metode*

- OECD 425 Up and Down Procedure*. Bandung: Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
- Rukmini. 2011. *Faktor-faktor yang Berpengaruh Terhadap Kejadian TB Paru Dewasa di Indonesia (Analisis data riset kesehatan dasar tahun 2010)*. Buletin Penelitian Sistem Kesehatan – Vol. 14 No. 4 Oktober 2011: 320-331.
- Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Jahurul MHA, Khatib A, Norulaini NAN. 2010. *Extraction of fish oil from the skin of Indian mackerel using supercritical fluids*. Journal of Food Engineering 99:63-69.
- Svendsen SD, Ronsholdt MD, Lauritzen L. 2013. *Fish Oil Supplementation Increases Appetite In Healthy Adults: A Randomized Controlled Cross-Over Trial*. Appetit. 66: 62-66
- Setyowati. M., Astuti. R. 2015. *Pemetaan Status Gizi Balita dalam mendukung Keberhasilan Pencapaian Millenium Development Goals (MDG's)*. Jurnal Kemas 10 (2) 110 – 121.
- Shamkuwar, B., et al. 2013. *Evaluation of Active Constituent of Piper nigrum in Diarrhoe*. Government College of Pharmacy. India.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., Srinivas, P.S.S.R. 1998. *Influence of piperin on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers*. Planta Medica, 64 (4); 353-356.
- Sianturi S, Febriani A, Manalu MADR. 2020. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol 70% Daun Tegining Ganang (Cassia planisiliqua Burm.F.) Terhadap Mencit Jantan (Mus musculus L.)*. pharmauho J Farm Sains dan Kesehatan. 5(2):1-8.
- Sihombing, M., Raflizar, 2010. *Status Gizi Dan Fungsi Hati mencit (CBS-Swiss) Dan Hati Tikus Putih (Galur Wistar) Di Laboratorium Hewan Percobaan Puslitbang Biomedis Dan Farmasi*. XX nomor 1.
- Wefa Wahyuni. 2019. *Uji Toksisitas Akut Oral Isolat Piperin Dari Lada Putih (Piper albi Linn.) Terhadap Mencit Betina Galur Swiss Webster Menggunakan Metode OECD 425 Up and Down Procedure*. Bandung: Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
- Winarto, I.W. 2004. *Khasiat dan Manfaat Kunyit*. Jakarta: AgroMedia Pustaka. pp 2 - 12.
- Zaid ZA, Shahar S, Jamal ARA. 2012. *Fish Oil Supplementation Is Beneficial On Caloric Intake, Appetite And Mid Upper Arm Muscle Circumference In Children With Leukemia*. Asia Pac J Clin Nutr. 21(4): 502-510.