

## Sumbangan *All-Trans* Asam Retinoat (ATRA) Bagi Penyembuhan Periodontitis

Praptiwi \*, Siti Fatimah-Muis \*\*, Soeharyo Hadisaputro \*\*, Suryono \*\*\*

### ABSTRACT

*All-trans retinoic acid (ATRA) contribution to periodontitis healing*

**Background:** In inflammation and infection of periodontal ligament i.e periodontitis, collagen fiber is damaged. All-trans retinoic acid (ATRA), metabolite of vitamin A, has potency to depress damage in inflammation. Indonesia with high vitamin A deficiency, facing to delayed recovery of periodontitis. The disease is vastly suffered by common people in this country. The study aimed to know the collagen status of periodontal ligament suffering periodontitis treated with tetracycline and ATRA supplementation.

**Method:** The experimental study using post test only design in 12 adult male Wistar rat was done in 7 days. The animal study were induced periodontitis through *Porphyromonas gingivalis* inoculation. Tetracycline 90 mg/kg was given, beside ATRA supplementation of 10 mg/kg and 5 mg/kg. Four experimental groups were chosen randomly. Group of periodontitis + tetracycline was the control of the study. The independent variables were ATRA supplementation of those high and low dose. The dependent variable was collagen status. Collagen status consist of degradation and synthesis of collagen, indicated by mRNA MMP-2 and mRNA PICP respectively. They were measured by reversed transcriptase polymerizing chain reaction and thin layer chromatography. All-trans retinoic acid concentration was measured using high performance liquid chromatography. The data analyzed using t-test, Oneway ANOVA, post hoc duncan and least significant differences.

**Result:** In group receiving 10 mg ATRA/kgBB, the ATRA level was highest but the collagen degradation was lower although not significant compared to the low dose ATRA group. In both groups the degradation was significantly lower than the control group ( $p=0.007$ ). The synthesis of collagen in the low dose ATRA group was higher than the high dose ATRA group and the control group.

**Conclusion:** High dose of ATRA supplementation contribution to less degradation of collagen, but in term of collagen synthesis, low dose ATRA supplementation gives better result.

**Keywords:** ATRA supplementation, collagen degradation, periodontitis

### ABSTRAK

**Latar belakang:** Pada peradangan dan infeksi kronik ligamentum periodontal yaitu periodontitis, terjadi kerusakan serat kolagen. All-trans asam retinoat (ATRA), metabolit vitamin A, berpotensi menekan kerusakan pada peradangan. Tingginya defisiensi vitamin A di Indonesia, menghambat proses penyembuhan periodontitis yang banyak diderita masyarakat luas. Penelitian bertujuan mengetahui status kolagen ligamentum periodontal periodontitis yang mendapat pengobatan tetrasiklin dan suplementasi ATRA.

**Metode:** Studi eksperimental dengan rancangan post test only pada 12 tikus Wistar jantan dewasa telah dilakukan selama 7 hari. Hewan coba diinduksi periodontitis melalui inokulasi bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Diberikan tetrasiklin 90 mg/kg, juga suplementasi ATRA 10 mg/kg dan 5 mg/kg. Empat kelompok studi dipilih secara acak. Kontrol adalah kelompok sakit + tetrasiklin. Variabel bebas adalah suplementasi ATRA dosis tinggi dan dosis rendah, variabel tergantung adalah status kolagen. Status kolagen mencakup degradasi dan sintesis, berturut-turut dengan petanda mRNA MMP-2 dan mRNA PICP, diukur menggunakan reverse transcriptase polymerizing chain reaction dan thin layer chromatography. Kadar ATRA diukur dengan high performance liquid chromatography. Data dianalisis dengan uji t, Oneway ANOVA, post hoc Duncan dan least significant differences.

**Hasil:** Pada kelompok yang menerima suplementasi ATRA 10 mg/kgBB kadar ATRA tertinggi, tetapi degradasi kolagennya lebih rendah walau tidak bermakna. Kedua kelompok suplementasi degradasi kolagennya lebih rendah secara bermakna dibanding

---

\* Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Muhammadiyah Semarang

\*\* Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang

\*\*\* Bagian Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi UGM Yogyakarta

kelompok kontrol ( $p=0,007$ ), dalam sintesis kolagen, kelompok yang mendapat suplementasi ATRA 50 mg/kgBB sintesisnya lebih baik dibanding kelompok yang mendapat ATRA 10 mg/kgBB maupun kelompok kontrol.

## PENDAHULUAN

Periodontitis yang merupakan radang kronik dan infeksi ligamentum periodontal, menjadi ancaman bagi kesehatan gigi dan mulut pada masyarakat luas di Indonesia.<sup>1-3</sup> Penyakit ini akan cepat meningkat keparahannya dengan bertambahnya umur melalui pembentukan saku gusi (poket).<sup>4</sup> Periodontitis berpotensi mempengaruhi keparahan kelainan-kelainan seperti penyakit inflamasi kronik diabetes mellitus (DM), artritis, juga kejadian bayi lahir prematur dengan berat badan rendah.<sup>5-7</sup> Faktor risiko periodontitis antara lain meliputi umur, status sosial-ekonomi, merokok, penyakit DM dan stres.<sup>8-12</sup> *Porphyromonas (P) gingivalis*, bakteri paling agresif penyebab periodontitis<sup>13</sup> selain menghasilkan toksin yang memicu produksi sitokin pro inflamasi,<sup>14</sup> menghambat fagositosis,<sup>15</sup> mendegradasi imunoglobulin, juga menginduksi produksi enzim matrix metaloproteinase (MMP).<sup>16</sup> Kolagen tipe 1 yang mendominasi ligamentum periodontal, akan rusak oleh aktivitas MMP.<sup>17</sup> Peningkatan ekspresi gen MMP akan di *down regulate* oleh ATRA dan *transforming growth factor- (TGF- )*.<sup>18</sup> Matriks metaloproteinase-2 teraktivasi oleh pemisahan N-terminal propeptida dari molekul prokolagen. *Carboxy-terminal propeptide of type I collagen (PICP)* adalah fragmen prokolagen yang dilepas ekstraseluler oleh fibroblas.<sup>19</sup> Pada infeksi kronik, komposisi tubuh mengalami kerusakan dengan berarti, ditandai oleh penurunan status gizi.<sup>20</sup> Berat badan merupakan salah satu parameter untuk mendiagnosis status gizi.<sup>21</sup> Pada keadaan patologik degradasi kolagen meningkat.<sup>22</sup> Metabolit vitamin A yaitu *all-trans* asam retinoat (ATRA) secara umum berpengaruh besar dalam penyembuhan jaringan.<sup>23</sup> Secara khusus, ATRA mampu menghambat ekspresi gen MMP dan menekan serta menurunkan degradasi kolagen. Asam ini menstimulasi sistem imun, dan melalui lintasan panjang berperan penting terhadap sintesis kolagen.<sup>24</sup> *All-trans* asam retinoat tergantung dosis serta lama pemberian, mampu menghambat *turn over MMP-2*.<sup>25</sup> *All-trans* asam retinoat menghambat degradasi matriks ekstraseluler dalam waktu yang lebih cepat dibanding pengaruhnya pada sintesis.<sup>26</sup> Asam tersebut juga mampu mereduksi kolagenase yang dihasilkan oleh fibroblas dan monosit, serta menurunkan degradasi matriks ekstraseluler oleh fibroblas yang dipicu sitokin.<sup>24</sup> Bahan makanan sumber

**Simpulan:** Suplementasi ATRA dosis tinggi berperan dalam rendahnya degradasi tetapi dalam hal sintesis kolagen, ATRA dosis rendah memberikan hasil yang lebih baik.

vitamin A dengan kualitas tinggi lebih banyak terdapat dalam produk asal hewani dibanding nabati. Sumber nabati lebih banyak dikonsumsi masyarakat Indonesia.<sup>27</sup>

Berbagai pengobatan periodontitis telah dilakukan. Irigasi dengan larutan antibakteri kurang memuaskan untuk perawatan poket.<sup>28</sup> Antibiotika sistemik, juga yang diaplikasikan lokal dengan skeling subgingival, tidak nyaman karena perdarahan yang timbul.<sup>1</sup>

Studi yang dilakukan merupakan upaya pengobatan periodontitis pada tikus. Sinergi antibiotika tetrasiklin dan ATRA dimaksudkan untuk mempercepat penyembuhan. Keadaan sembuh tersebut adalah pencapaian nilai status kolagen yang lebih baik dibanding kontrol.

Status kolagen mencakup degradasi dan sintesis, yang bersama-sama membentuk *remodeling* kolagen. *Messenger ribo-nucleic acid (mRNA) MMP-2* dan *mRNA PICP* yang mentransfer informasi genetik dari DNA, berturut-turut merupakan petanda biomolekuler untuk degradasi dan sintesis kolagen jaringan periodontal yang sangat spesifik.<sup>17,29</sup> Penelitian menggunakan istilah jaringan periodontal, yang dalam pengukuran mencakup ligamentum periodontal dan gingiva.

Periodontitis dengan pengobatan standar antibakteri tetrasiklin, disuplementasi ATRA, dengan pengaruhnya pada kesembuhan yang diukur dari status kolagen mencakup degradasi dan sintesis menggunakan petanda biomolekuler *mRNA MMP-2* dan *mRNA PICP*, belum pernah dilakukan. Studi preklinik ini akan menjadi berharga bila dilanjutkan dengan uji klinik pada manusia penderita periodontitis. Defisiensi vitamin A yang tinggi<sup>30</sup> dan meningkatnya faktor risiko periodontitis di Indonesia, menghambat penyembuhan penyakit ini. Penelitian bertujuan mendapatkan kejelasan tentang pengaruh suplementasi ATRA dalam 2 dosis terhadap status kolagen dengan petanda untuk degradasi dan sintesis kolagen, berturut-turut indeks *mRNA MMP-2* dan *mRNA PICP* pada tikus periodontitis yang mendapat pengobatan tetrasiklin. Pengaruh suplementasi tersebut akan memberikan sumbangan yang berarti bagi penyembuhan periodontitis.

## METODE

Studi eksperimental yang dilakukan menggunakan desain *post test only*. Alokasi acak sederhana membagi

hewan coba menjadi 4 kelompok, masing-masing 3 ekor. Kelompok-kelompok tersebut adalah sakit (periodontitis), sakit + tetrasiklin 90 mg/kg sebagai kontrol, sakit + tetrasiklin + ATRA dosis 10 mg/kg, dan sakit + tetrasiklin + ATRA dosis 5 mg/kg.

Populasi referens adalah tikus putih jantan galur *Wistar (Rattus norvegicus L)*, turunan ke-5 dari spesiesnya (LPPT 5), dewasa umur 8 minggu, berat 200 gram. Populasi diinduksi periodontitis melalui inokulasi bakteri spesies *P. gingivalis* ATCC 32277, dan mendapat pengobatan tetrasiklin dosis 90 mg/kg di LPPT-UGM Yogyakarta tahun 2007. Sampel studi adalah bagian dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi adalah tikus putih jantan galur *Wistar (Rattus norvegicus L)*, LPPT 5, dewasa umur 8 minggu, berat  $177,2 \pm 27,46$  gram, periodontitis melalui inokulasi bakteri spesies *P. gingivalis* ATCC 32277, dan mendapat pengobatan tetrasiklin dosis 90 mg/kg. Kriteria eksklusi adalah hewan coba kehilangan nafsu makan dan atau diare. Besar sampel 12 ekor terbagi dalam 4 kelompok. Variabel bebas penelitian adalah suplementasi ATRA dosis tinggi (10 mg/kg) dan dosis rendah (5 mg/kg). Variabel tergantung adalah status kolagen, terdiri dari degradasi dan sintesis kolagen, berturut-turut diukur dengan petanda indeks *mRNA MMP-2* dan *mRNA PICP*. Variabel perancu adalah TGF- yang terkendali oleh penggunaan hewan coba dengan kesamaan galur, umur, jenis kelamin, pakan, kondisi lingkungan, dan kesehatan.

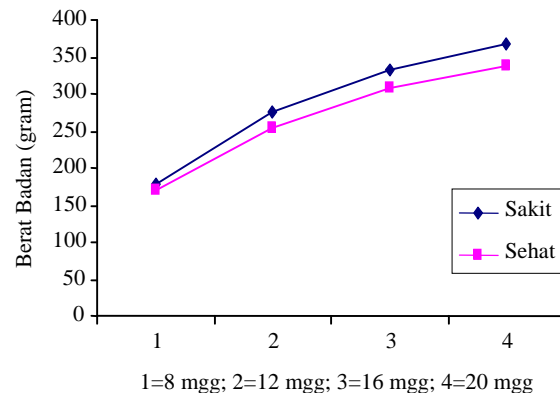
Materi penelitian adalah gingiva dan ligamentum periodontal di sekeliling gigi regio molares 1, 2, dan 3 di maksila dan mandibula, kiri dan kanan. Irisan dimulai dari kedua sisi lateral/*buccal*, dilanjutkan ke arah palatinal/*lingual* setebal  $\pm 2$  mm. Lebar irisan 3-5 mm.

Studi dilakukan di lingkungan FK-UGM dan Undip, LPPT-UGM Yogyakarta, juga di Fakultas Peternakan Undip Semarang, sejak tahun 2007 sampai 2009. Pemeliharaan dan pengembangbiakan bakteri *P. gingivalis* bertempat di Bagian Mikrobiologi FK-UGM. Hewan coba dipelihara dan mendapat perlakuan di Laboratorium (Lab) Unit 4 LPPT-UGM. Unit 2 dan 3 Lab tersebut merupakan tempat pengukuran kadar ATRA dan *mRNA MMP-2* serta *mRNA PICP*. Penentuan awal periodontitis dan pembuatan sediaan histopatologik jaringan periodontal dilakukan di Bagian Patologi Anatomi FK-UGM. Ekstraksi jaringan periodontal untuk persiapan pengukuran kadar ATRA dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Peternakan Undip. Setelah hewan coba dibiasakan 4 hari dalam kandang individual, diinduksi periodontitis. Periodontitis kronik 7 hari sejak terdeteksi. Perlakuan dengan dan tanpa suplementasi ATRA diberikan selama 7 hari. Kadar ATRA diukur menggunakan *high*

*performance liquid chromatography (HPLC)*. Ekspresi *mRNA MMP-2* dan *PICP* diukur dengan *reverse transcriptase polymerizing chain reaction (RT-PCR)*, *thermal cycler machine*, *gel electrophoresis*, spektrofotometer UV-Vis, dan *thin layer chromatography (TLC)*. Analisis data deskriptif meliputi berat badan, kadar ATRA, status kolagen mencakup degradasi dan sintesis, masing-masing dalam rerata dan simpang baku. Analisis data inferensial menggunakan uji t dan *One way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Duncan* dan *LSD*.

## HASIL

Penelitian dilakukan setelah mendapat *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan RSUP Dr. Kariadi Semarang. Tidak ada hewan coba yang alergi tetrasiklin/ATRA ataupun diare. Pemeriksaan histopatologik setelah 3 minggu sejak awal inokulasi bakteri memperlihatkan tanda positif periodontitis. Pengukuran bobot tubuh selama pelaksanaan studi memperlihatkan peningkatan sesuai dengan umur yang bertambah pada Gambar 1.

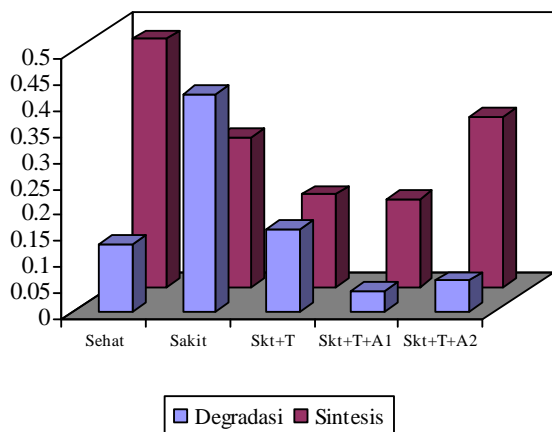


Gambar 1. Bobot tubuh hewan coba menurut umur dalam minggu

Uji t tidak menunjukkan beda bermakna bobot tubuh hewan coba sehat dengan sakit pada umur 8 minggu ( $p=0,376$ ), 12 minggu ( $p=0,096$ ), 16 minggu ( $p=0,093$ ) dan 20 minggu ( $p=0,058$ ).

Kadar ATRA tertinggi pada kelompok dengan suplementasi ATRA dosis tinggi (10 mg/kg) sebesar  $2,60 \pm 0,584$  ppm, terendah pada kelompok sakit dan kontrol. Kadar ATRA kelompok sakit dan kontrol sama besar, yaitu  $0,01 \pm 0,000$  ppm.

Degradasi dan sintesis kolagen kelompok studi terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Degradasi dan sintesis kolagen kelompok studi

Degradasi kolagen kelompok dengan suplementasi *ATRA* dosis tinggi ( $0,04 \pm 0,019$ ) paling rendah dibanding semua kelompok perlakuan. Degradasi tersebut tidak berbeda bermakna dengan kelompok suplementasi *ATRA* dosis rendah ( $0,06 \pm 0,012$ ). Degradasi kelompok dengan suplementasi *ATRA* dosis tinggi dan rendah jauh lebih rendah dibanding kontrol ( $0,16 \pm 0,047$ ), berbeda bermakna dengan  $p=0,007$ .

Sintesis kolagen kelompok *ATRA* dosis tinggi ( $0,17 \pm 0,062$ ) < dosis rendah ( $0,33 \pm 0,026$ ). Sintesis kolagen kelompok *ATRA* dosis rendah berbeda bermakna dengan kontrol ( $0,18 \pm 0,059$ ), dengan  $p=0,014$ .

## BAHASAN

Keadaan fisik hewan coba yang baik menunjang keberhasilan studi. Kondisi tersebut nampak dari bobot tubuh sebagai petanda status gizi<sup>21</sup> yang meningkat sesuai umur selama penelitian. Terlihat bahwa periodontitis kronik tidak menurunkan status gizi hewan coba.

Suplementasi *ATRA* dosis tinggi dan rendah menekan degradasi kolagen, ditandai oleh ekspresi *mRNA MMP-2* kedua kelompok tersebut, yang lebih kecil dibanding kelompok lain. Keadaan tersebut menunjukkan kemampuan *ATRA* menekan degradasi kolagen<sup>24</sup> ke tingkat paling rendah. Tingkat degradasi tersebut merupakan efek suplementasi *ATRA* yang tergantung dosis serta lama pemberian, mampu menghambat *turn over MMP-2*.<sup>25</sup> Asam tersebut memperlihatkan kemampuan mereduksi kolagenase yang dihasilkan oleh fibroblas dan monosit, serta menurunkan degradasi matriks ekstraseluler oleh fibroblas yang dipicu sitokin.<sup>27</sup> Lama waktu studi yaitu 7 hari, lebih memperlihatkan peran *ATRA* dosis rendah dalam mensintesis kolagen.

## SIMPULAN

Sumbangan *ATRA* pada pengobatan tikus periodontitis yang diberi tetrasiklin selama 7 hari memperlihatkan kemampuan *ATRA* khususnya dosis tinggi 10 mg/kg menekan degradasi kolagen ke tingkat sangat rendah, paling rendah dibanding kelompok lain. Hasil studi menunjukkan, bahwa suplementasi *ATRA* berdampak pada lebih rendahnya kerusakan yang terjadi, dibanding kontrol. Disimpulkan bahwa *ATRA* berpotensi besar mengurangi kerusakan kolagen pada awal pengobatan periodontitis.

## Ucapan terima kasih

Terimakasih yang sebesar-besarnya kami tujukan kepada Pemimpin pabrik obat Phapros Semarang yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian dengan pemberian tetrasiklin HCl.

## DAFTAR PUSTAKA

- Rosenberg JD. Periodontitis. Palm Beach Gardens. ADAM, Inc. 2010.
- Arief EM, Lambri SE, Van Der Velden U, Van Der Weijden GA. Prevalensi periodontitis pada suatu populasi penduduk Indonesia yang berumur 22-32 tahun disebuah Perkebunan Teh Jawa Barat. J. PDGI.1995; 44 (3): 58-62.
- Tampubolon Nurmala Situmorang. Dampak karies gigi dan penyakit periodontal terhadap kualitas hidup. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Sumatera Utara. Medan, 2005.
- Roeslan Boedi Oetomo, M. Andi Hidayat, Harris Rahmadi, Bakti Prasetyo, Ermayanti. Kadar IgA dan IgG dalam saliva penderita penyakit periodontal sebelum dan sesudah operasi. Jurnal PDGI. 2003;53(2): 25-9.
- Kantarci A, Van Dyke TE. Resolution of inflammation in periodontitis. J Periodontology. 2005;76(11S):2168-74.
- Galvao MPA, Rösing CK, Ferreira MBC. (2003). Effects of ligature-induced periodontitis in pregnant Wistar rats. Pesqui. Odontol. Bras. 2003;1,17.
- Siqueira FM, Cota LOM, Costa JE, Haddad JPA, Lana AMQ, Costa FO. Intrauterine growth restriction, low birth weight, and preterm birth: adverse pregnancy outcomes and their association with maternal periodontitis. Journal of Periodontology Online. 2007; 78(12):2266-76. Abstract.
- Novak KF, Novak JM. Risk assessment, In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA, editors. Carranza's clinical periodontology 9<sup>th</sup> ed. Sydney: WB Saunders Company; 2002; 4669-71.
- Burt BA. Epidemiology of periodontal disease. J. Periodontol. 1996;67:935-45.
- Kubota M, Tanno-Nakanishi M, Yamada S, Okuda K, Ishihara K. Effect of smoking on sub-gingival

- microflora of patients with periodontitis in Japan. *BioMed Central Oral Health*. 2011;11,1. Abstract.
11. Kinane DF, Marshall, GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. Review. *Australian Dental Journal*. 2001;46(1):2-12.
  12. Suryono, Kido J, Hayashi N, Kataoka, M, Shinohara Y, Nagata T. Norepinephrine stimulates gen calprotectin expression in human monocytic cells. *J Periodont Res*. 2006;41:159-64.
  13. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2003; 82(5):338-44.
  14. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. 1997. Cytokines, In: *Medical immunology*. Stites DP, Terr AI, Parslow TG, eds), 9<sup>th</sup> editors. Tokyo: Prentice-Hall International; 1997;161.
  15. Haake SK, Nisengard RJ, Newman MG Miyasaki KT. Microbial interactions with the host in periodontal diseases. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA, editors. *Carranza's Clinical Periodontology* 9<sup>th</sup> ed. Sydney: WB Saunders Company; 2002;132-9.
  16. Cockayne A, Arbuthnott JP. Bacterial pathogenicity. In: Greenwood D, Slack RCB, Pentherer JF, editors. *Medical Microbiology*. Melbourne: Churchill Livingstone; 1992:104.
  17. De Souza AP, Da Silva RA, Da Silva, MAD, Catanzaro-Guimaraes SA, Line SRP. (2005). Matrix metalloproteinases: the most important pathway involved with periodontal destruction. *Braz J Oral Sci*. 2005;4(15): 884-90.
  18. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999; 274 (31):21491-4.
  19. Sassi ML. Procollagen and collagen synthesis: Department of Clinical Chemistry University of Oulu, Oulu. 2000.
  20. Beisel WR. Nutrisi dan infeksi. Dalam: Linder MC, editor. *Biokimia nutrisi dan metabolisme*. Terjemahan. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia; 1992: 668.
  21. Supariasa IDN, Bachyar Bakri, Ibnu Fajar. *Penilaian status gizi*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2002:39.
  22. Gusman H, Travis J, Helmerhorst EJ, Potempa J, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect Immun*. 2001;69(3):1402-8.
  23. Boyd LD, Lampi KJ. Importance of nutrition for optimum health of the periodontium. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2001;2(2):2-3.
  24. Perssonelle JG, de Campos S, Ribeiro GQ, Ruiz RO. All trans retinoic acid injectable in the treatment of thin wrinkles. *Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plastica*. 1997;12(3):1-11.
  25. Axel DI, Frigge A, Dittmann J, Runge H, Spyridopoulos I, Riessen R, *et al*. *All-trans* retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*. 2001;4:851-62.
  26. Zhu YK, Liu X, Ertl RF, Kohyama T, Wen FQ, Wang H, *et al*. Retinoic acid attenuates cytokine-driven fibroblast degradation of extra-cellular matrix in three-dimensional culture. *Am J Respir Cell Mol Bi-ol*. 2001; 25(5):620-7.
  27. WFP Indonesia. *The world food programme in Indonesia An Exit Strategy*. 2001.
  28. Prayitno SW. *Penatalaksanaan gigi goyang akibat kelainan jaringan periodontium*. *Cermin Dunia Kedokteran*. 1997:115.
  29. Granner DK. RNA synthesis, processing, & metabolism, In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Harper's Biochemistry*. 24<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall International, Inc; 1996:427.
  30. Gibson RS. *Recent advances in nutritional assessment*. SEAMEO-TROPED RCCN. Jakarta: Universitas Indonesia; 2003.