

# RESPON AKTIVITAS TIKUS WISTAR JANTAN AKIBAT KONDISI DIET TINGGI SUKROSA DIUKUR MENGUNAKAN PEREKAM AKTIVITAS

Yanuar Restu Wijaya<sup>1</sup>, Koekoeh Santoso<sup>1</sup>, Isdoni<sup>1</sup>, dan Atin Supiyani<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor, Indonesia. <sup>2</sup>Prodi Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta (UNJ), Indonesia

\*Email: atinsupiyani78@gmail.com

---

## ABSTRACT

Excessive energi consumption play a role in increasing blood glucose levels (hyperglycemia), due to the inability of the hormone insulin to compensate the high blood glucose levels. Blood glucose receptor found in the hypothalamus of VMH (Ventre Medial Hypothalamus) and LH (the Lateral Hypothalamus) is able to detect and change the settings for the feeding activity. The aim of this study was to obtain the relationship between high sucrose feeding on male Wistar rats of behavior and activity. This method uses Wistar rats (*Rattus norvegicus*) as an animal model. Sixteen rats were grouped into 4 treatment groups. The first group was given additional feed 20% sucrose, the second group was given additional feed 40% sucrose, a third group was given additional feed 60% sucrose, and the last as a control group. This feed given continuously for 70 days. Observation of activities conducted using Optovarimex® auto-track system ver.4.31. The results showed an corellation between activity based doses of sucrose.

*Keywords: sucrose, ventromedial hypothalamus, wistar rats, activity*

---

## PENDAHULUAN

Makan adalah kegiatan memasukkan makanan atau sesuatu ke dalam saluran pencernaan untuk menyediakan nutrisi bagi makhluk hidup. Berbagai nutrisi yang dibutuhkan tubuh akan dipenuhi melalui kegiatan ini, salah satu diantaranya adalah karbohidrat. Gula adalah senyawa karbohidrat sederhana yang menjadi sumber energi utama dan sering digunakan sebagai bahan tambahan dalam produk pangan. Dewasa ini semakin banyak beredar produk pangan yang diberi pemanis tambahan. Produk pangan ini melimpah dipasaran dan sangat diminati karena memiliki palatibilitas yang tinggi.

Konsumsi makanan sumber energi yang terus menerus secara berlebihan akan mengakibatkan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia). Tubuh menerima glukosa melalui penyerapan usus yang kemudian akan beredar dalam pembuluh sebagai gula darah untuk kemudian disimpan dalam hati dan sel otot sebagai glikogen. Hiperglikemia disebabkan oleh terlalu tingginya kadar gula darah yang terus beredar dalam sistem peredaran akibat tidak bisa dikonversi menjadi glikogen. Keadaan tersebut terjadi akibat terbatasnya kemampuan sekresi insulin dalam mengimbangi konsentrasi glukosa di peredaran darah serta penurunan glucose carrier (pengangkut glukosa ke dalam sel) sehingga banyak glukosa yang tertimbun dalam darah (Sherwood. 2001).

Perubahan pada kadar glukosa darah dirasakan dan direspon oleh sistem saraf pusat. Jean Mayer dengan

hipotesis glucostatiknya mendalilkan bahwa reseptor glukosa berada di hipotalamus. Hipotesis ini menyatakan bahwa penurunan kadar glukosa darah akan meningkatkan nafsu makan, dan sebaliknya juga nafsu makan akan menurun saat kadar glukosa darah meningkat (Oomura et al. 1964). Hal ini diduga terkait, bahwa asupan pakan tinggi gula akan mempengaruhi pusat kenyang pada sensor ventromedial hipotalamus sehingga menurunkan tingkat konsumsi pakan (Tsalisravina et al. 2006).

Campfield dan Smith (1986) menunjukkan bahwa kadar glukosa darah berhubungan dengan keinginan makan. Selain itu, kadar glukosa didalam VMH (Ventre Medial Hipotalamus) dan LH (Lateral Hipotalamus) juga bervariasi dengan berbagai konsentrasi glukosa darah. Penelitian lain juga menyebutkan VMH dapat menanggapi kejadian hipoglikemia dengan meningkatkan keinginan makan (Dunn-Meynell et al. 2009).

Meningkatnya keinginan makan akan membuat hewan menjadi lebih aktif dan agresif. Pernyataan tersebut didukung oleh Silver dan Erecinska (1994) bahwa reseptor kadar glukosa di otak mampu mengatur asupan makanan sehari-hari. Hasil ini menunjukkan adanya kaitan respon fisiologis dengan peningkatan atau penurunan asupan makanan serta aktivitas makan sendiri. Dengan demikian, tingginya kadar glukosa darah tidak hanya mempengaruhi sistem endokrin dan homeostatis, glukosa juga akan mempengaruhi aktivitas dalam mencari makan.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan hubungan pemberian pakan tinggi energi terhadap aktivitas individu tikus wistar jantan dengan menggunakan Opto-varimex® auto-track system ver. 4.31 sebagai alat pemonitor aktivitas. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran mengenai efek konsumsi energi berlebih terhadap aktivitas tubuh.

## **METODE**

### **BAHAN DAN ALAT**

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan dewasa strain Wistar (*Rattus novogicus*) berusia 12 minggu dengan bobot badan 200–250 g sebanyak 16 ekor. Pakan berupa pelet, serta disediakan minum ad libitum. Sukrosa diberikan untuk meningkatkan asupan energi secara manipulatif, dihitung berdasarkan perbandingan dari total konsumsi energi dari pelet yang diberikan. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang plastik, sonde lambung, Opto-varimex® auto-track system ver. 4.31 dan seperangkat komputer.

### **METODE**

#### *Pengelompokan Tikus dan Perawatan*

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan dewasa strain Wistar berusia 12 minggu dengan bobot badan 200 hingga 250 g sebanyak 16 ekor. Tikus dipelihara dalam kandang plastik berukuran 30 x 40 cm dengan tutup terbuat dari kawat ram dan dialasi dengan serbuk kayu. Lingkungan kandang dibuat agar tidak lembab dengan sirkulasi udara yang baik serta pencahayaan yang cukup. Setiap kandang individu dilengkapi dengan sebuah tempat makan berbahan plastik dan sebuah tempat air minum yang dipasang terbalik berupa botol kaca kapasitas 150 ml dengan penutup berbahan karet yang dilengkapi saluran air menggunakan pipa aluminium. Pakan yang diberikan berupa pelet standar.

Tikus dikelompokkan secara acak menjadi dua kelompok perlakuan yaitu 4 ekor tikus kontrol (TK) dan 12 ekor tikus sukrosa (TS) yang dibagi menjadi 3 dosis pemberian sukrosa yaitu 20%, 40% dan 60% dari total energi pakan yang diberikan. Sukrosa diberikan menggunakan sonde lambung 1 kali sehari selama 70 hari, jumlah yang

diberikan dalam sehari adalah masing-masing 1.4 ml, 2.8ml dan 4.2 ml, sedangkan minum disediakan ad libitum.

Observasi awal pada periode pra penelitian menunjukkan konsumsi pakan tikus mencapai 15.6 g/hari. Sumber energi yang didapat dari pakan senilai 4 kkal/g, dengan demikian kebutuhan kalori tikus dalam sehari adalah 62.56 kkal/hari. Nilai ini akan menjadi acuan terhadap jumlah pemberian sukrosa terhadap masing-masing kelompok. Semua kelompok perlakuan tikus terus dipantau hingga pada hari akhir perlakuan atau hari ke 70 akan dilakukan pengukuran aktivitas.

### *Pengukuran Aktivitas*

Semua tikus kontrol dan tikus perlakuan diamati perubahan tingkah laku dan aktivitasnya pada akhir perlakuan pemberian sukrosa. Aktivitas yang teramati dengan Opto-varimex® activity monitor adalah menyangkut kegiatan yang umum dilakukan tikus sehari-hari diantaranya:

1. Distance traveled (DT/jarak tempuh) adalah jarak yang ditempuh oleh tikus atau panjang lintasan perpindahan tikus dari satu tempat ketempat yang lain. Perpindahan tikus dapat berkaitan dengan agresivitas dalam mencari makanan dan minuman, ekspresi stres, mencari tempat perlindungan ataupun pengenalan lingkungan.
2. Resting time (RT/waktu istirahat) adalah waktu yang dibutuhkan selama tikus diam tidak bergerak atau istirahat.
3. Ambulatory time (AT/waktu ambulatori) adalah waktu yang diukur saat tikus melakukan gerakan ditempat diantaranya membersihkan diri atau grooming, makan, defekasi dan urinasi.

Seluruh kelompok tikus dalam kotak plastik dipindahkan menuju ruang analisa dan didiamkan selama 5 menit untuk beradaptasi dengan wilayah baru. Ruang analisa ini didesain khusus untuk pengamatan hewan dengan meminimalkan tingkat stres yang biasanya berasal dari getaran, suara, suhu dan cahaya. Sesuai dengan kelompoknya kemudian tikus ditempatkan pada wadah pengukuran aktivitas dalam Opto-varimex® activity monitor selama 5 menit untuk mengurangi pengaruh stres lingkungan sebelum dimulai pengukuran.

Alat mulai dioperasikan selama 10 menit dalam ruangan yang bebas gangguan baik suara maupun getaran guna meminimalkan pengaruh lingkungan selama proses pengukuran aktivitas. Setelah proses perekaman aktivitas dimulai, operator segera meninggalkan ruangan guna meminimalisir stres pada tikus.

### PROSEDUR ANALISIS DATA

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dan masing-masing perlakuan terdiri atas 4 ekor tikus sebagai ulangan. Data kuantitatif dianalisa dengan analysis of variance (ANOVA), kemudian dilanjutkan dengan Uji Duncan dengan selang kepercayaan 95% ( $\alpha=0.05$ ) untuk melihat perbedaan antar perlakuan. Serta uji regresi menggunakan perangkat lunak SAS 9.1.3 (Mattjik dan Sumertajaya 2006).

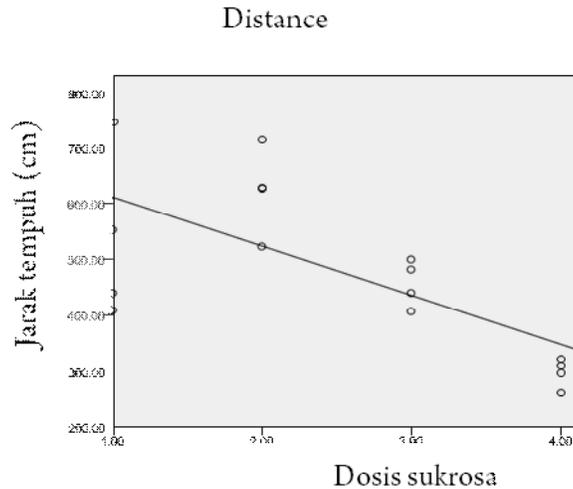
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### PENGAMATAN AKTIVITAS

Secara umum metabolisme energi merupakan proses reaksi yang terjadi di dalam makhluk hidup mulai dari makhluk hidup bersel satu sampai yang paling kompleks (manusia) untuk mendapat, mengubah dan memakai senyawa kimia di sekitar untuk mempertahankan kelangsungan hidup (Berg dan Stryer 2002). Greeno dan Wing (1994) telah menguraikan model perbedaan individu, yang menunjukkan ada banyak cara di mana pola cerna dan

metabolisme energi dari asupan makanan salah satunya dipengaruhi oleh tingkatan stres. Manipulasi pemberian energi yang dilakukan pada penelitian ini berupa sukrosa.

VMH (Ventromedial Hypothalamus) sebagai reseptor glukosa pada sistem saraf pusat memainkan peran penting dalam mendeteksi dan mengontrol kadar glukosa darah melalui persepsi rasa kenyang (Shin et al. 2010). VMH berfungsi dalam menekan tingkat stres akibat rasa lapar dan mengurangi aktivitas berlebih pada tikus akibat keinginan mencari makan.



**Gambar 2 Sebaran kurva uji regresi antara distance traveled dengan dosis pemberian sukrosa**

Ekspresi aktivitas akibat pemberian energi berlebih ini dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa aktivitas Distance traveled secara nyata menunjukkan penurunan ( $P>0.05$ ). Aktivitas Ambulatory time terlihat meningkat seiring naiknya dosis pemberian sukrosa. Adanya peningkatan waktu ambulatori ini disebabkan oleh perasaan tenang yang didapatkan oleh tikus akibat rasa kenyang. Resting time terlihat mengalami penurunan dengan bertambahnya pemberian sukrosa. Naik atau turunnya waktu istirahat ini dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya faktor internal seperti penurunan fungsi vegetatif tubuh ataupun eksternal seperti pengaruh cahaya dan obat-obatan (Greeno dan Wing 1994).

#### DISTANCE TRAVELED (DT)

Di alam liar, wilayah yang dijelajahi tikus telah diukur antara 10 – 8000 m<sup>2</sup>. Pergerakan tikus yang sedemikian luas dapat berkaitan dengan agresifitas dalam mencari makanan dan minuman, mencari tempat bersarang, kawin ataupun pengenalan lingkungan. Kegiatan ini dilakukan secara alamiah oleh tikus dan diperlukan kemampuan dalam bergerak baik lari ataupun berjalan (Jackson 1982). Distance traveled dalam data ini merupakan jarak yang ditempuh oleh tikus selama 10 menit atau perpindahan tikus dari tempat yang satu ketempat yang lain.

Hasil pengukuran DT (gambar 2) menunjukkan bahwa jarak tempuh yang dilalui tikus mengalami penurunan secara nyata seiring bertambahnya dosis sukrosa yang diberikan. Secara umum, energi dalam aktivitas ini diperoleh dari hasil penyerapan maupun metabolis dari cadangan energi yang akan dikeluarkan melalui kegiatan fisik seperti berlari ataupun bermain (Hill 2012). Pada kondisi diet energi berlebih, pusat kenyang akan diaktifasi dan menurunkan sekresi epinefrin sehingga aktivitas tubuh dalam mencari makan akan menurun.

Uji lanjutan berupa uji regresi ( $r$ ) menunjukkan nilai 0.690 yang berarti bahwa aktivitas distance traveled memiliki hubungan yang lemah dengan dosis pemberian sukrosa. Terlihat pada kurva  $y = 699 - 88x$  menunjukkan

hubungan yang lemah antara dosis pemberian sukrosa dengan distance traveled, dalam perlakuan ini tubuh memiliki kelebihan energi yang berasal dari makanan. Nilai

determinasi (R<sup>2</sup>) sebesar 0.476 menunjukkan kaitan sebesar 47% dari penambahan konsentrasi sukrosa yang berpengaruh terhadap jarak tempuh yang dilalui tikus. Hal ini dikarenakan tikus yang diberikan pakan tinggi kalori akan mengalami peningkatan rasa tenang akibat berkurangnya stres akibat rasa lapar (Corbett et al. 1986).

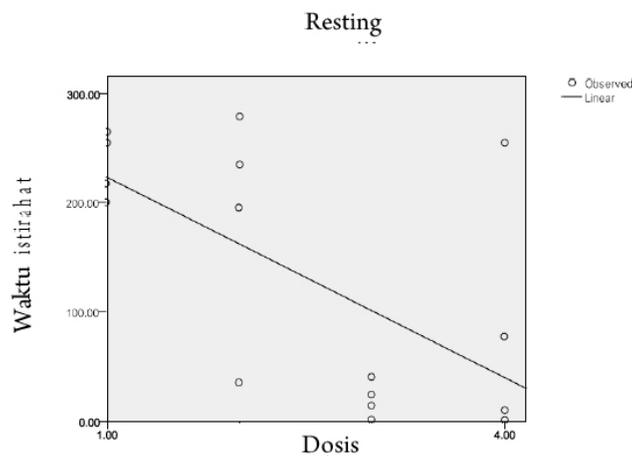
**Tabel 1. Aktivitas tikus wistar jantan pada dosis sukrosa berbeda**

Parameter	Aktivitas		
	DT (cm)	AT (detik)	RT (detik)
Kontrol	536.75±153.829c	50.75±21.884a	234.25±30.804c
Sukrosa 20%	624.00±79.414c	39.75±19.610a	186.00±106.351b
Sukrosa 40%	456.25±41.883b	80.50±13.520b	19.75±16.459a
Sukrosa 60%	299.25±25.316a	114.50±20.371c	85.75±117.817a

Keterangan: a Angka-angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji selang berganda Anova) DT = Distance traveled, RT = Resting time, AT = Ambulatory time

### RESTING TIME (RT)

Resting time adalah waktu yang dibutuhkan untuk tikus beristirahat selama 10 menit waktu pengamatan. Istirahat bagi hewan sangat penting untuk menghemat energi dan mencerna sekaligus memetabolisme makanan yang telah dimakan. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kelompok perlakuan sukrosa secara nyata mengalami penurunan waktu istirahat seiring meningkatnya dosis pemberian sukrosa. Hasil uji regresi antara resting time dengan dosis pemberian sukrosa berupa persamaan  $y = 284 - 61x$ . Hal ini menunjukkan hubungan negatif antara dosis pemberian sukrosa dengan resting time. Adapun nilai regresi (r) adalah 0.776. Nilai determinasi (R<sup>2</sup>) sebesar 0.603 menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi sukrosa mempengaruhi 60.3% waktu istirahat tikus.



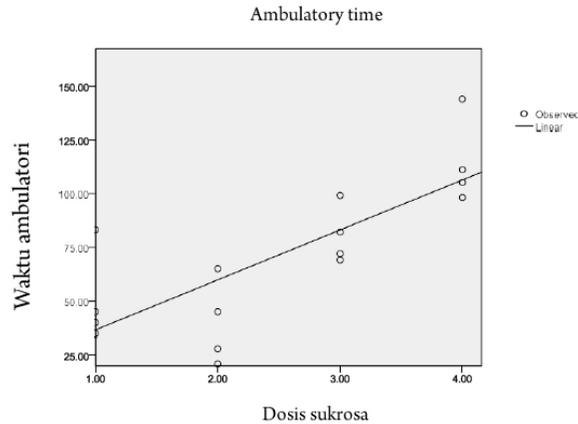
**Gambar 3. Sebaran kurva uji regresi antara resting time dengan dosis pemberian sukrosa**

Menurut Corbett et al. (1986) tikus yang mengalami pertambahan bobot badan dan kenaikan asupan kalori cenderung akan mengalami penurunan aktivitas berlebih. Data ini juga ditentukan oleh faktor individu diantaranya kecepatan metabolisme, kondisi sistem endokrin, serta tingkat pencernaan pakan. Borg et al. (1997) menjelaskan bahwa dalam kondisi istirahat, hewan tidak sama sekali atau pada tingkat minimal stres, namun Heller dan Ruby

(2004) menjabarkan lebih lanjut bahwa kondisi istirahat hanya bisa dicapai saat pusat kesadaran dalam sistem saraf pusat mendapat rangsangan langsung, diantaranya oleh pengaruh hormon serotonin dan pengaruh obat-obatan.

#### AMBULATORY TIME (AT)

Ambulatory Time adalah waktu yang diukur saat tikus akan melakukan gerakan berjalan, grooming, makan, defekasi ataupun urinasi. Meskipun memiliki wilayah jelajah yang luas, tikus tetap merupakan spesies sosial yang hidup berkelompok. Seperti pada hewan primata, tikus juga mampu melakukan kegiatan membersihkan diri, mengupas biji-bijian dan bermain (Ebensperger 2001).



**Gambar 4** Sebaran kurva uji regresi antara ambulatory time dengan dosis pemberian sukrosa

Hasil pengukuran AT (Gambar 4) menunjukkan bahwa kelompok perlakuan sukrosa mengalami peningkatan aktivitas ambulatori secara nyata seiring naiknya pemberian dosis sukrosa. Aktivitas ambulatori ini mengalami peningkatan disebabkan oleh naiknya frekuensi napas akibat proses oksidasi gula selama proses metabolisme. VMH merespon tingginya kadar gula darah sebagai persepsi kenyang yang menurunkan aktivitas berlebihan pada tikus. Perasaan kenyang ini mampu menekan keinginan tikus untuk mencari makan. Kejadian ini akan mengakibatkan tikus menjadi lebih tenang dan menekan stres (Kobayashi et al. 2001).

Hasil uji regresi antara ambulatory time dengan dosis pemberian sukrosa berupa  $y = 13 + 23x$ . Hal ini menunjukkan hubungan yang lemah antara dosis pemberian sukrosa dengan ambulatory time. Adapun nilai yang didapat dari uji regresi ( $r$ ) adalah 0.625 yang berarti bahwa aktivitas ambulatory time dikatakan berhubungan kecil dengan dosis pemberian sukrosa.

Nilai determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0.391 tetap menunjukkan 39.1% pengaruh keterkaitan penambahan konsentrasi sukrosa terhadap ambulatory time. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa karbohidrat cair kurang mengenyangkan dan mengurangi energi kompensasi saat makan berikutnya, yang menyebabkan peningkatan asupan energi namun menurunkan tingkat penyerapannya (Libuda dan Kersting 2009).

## SIMPULAN DAN SARAN

Pemberian diet sukrosa berlebih dapat memberikan pengaruh terhadap respon aktivitas tikus wistar jantan. Tikus dengan asupan tinggi sukrosa menunjukkan penurunan jarak tempuh dan penurunan waktu istirahat dan peningkatan waktu ambulatori.

## DAFTAR PUSTAKA

- Berg J, Stryer L. (2002). Biokimia. Jakarta(ID): Erlangga.
- Borg MA, Sherwin RS, Borg WP, Tamborlane WV, Shulman GI. (1997). Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J Clin Invest.* 99: 361-365.
- Campfield LA, Smith FJ. (1986). Functional coupling between transient declines in blood glucose and feeding behavior: temporal relationships. *Brain Res Bull.* 17: 427-549.
- Corbett SW, Stern JS, Keeseey RE. (1986). Energi expenditure in rats with diet- induced obesity. *Am J Clin Nutr.* 44: 173-180.
- Dunn-Meynell AA, Sanders NM, Compton D, Becker TC, Eiki JI, Zhang BB, Levin BE. (2009). Relationship among brain and blood glucose levels and spontaneous and glucoprivic feeding. *J Neurosci.* 29: 7015-7022.
- Ebensperger LA. (2001). A review of the evolutionary causes of rodent group- living. *Acta Theriologica.* 46: 115-144.
- Ferraris RP, Diamond J. (1997). Regulation of Intestinal Sugar Transport. *Physiol Rev* 77:257.
- Greeno CG, Wing RR. (1994). Stres-induced eating. *Psychol Bull.* 115:444-464. Guyton AC, Hall JE. 2007. Textbook of medical physiologi, 11 th ed. Jakarta(ID): EGC Pr.
- Hau J, Hoosier GL. (2003). Handbook of Laboratory Animal Science 2nd Edition. Boca Raton: CRC Pr.
- Heller HC, Ruby NF. (2004). Sleep and Circadian Rhytm in Mammalian. *Annu Rev Physiol.* 66:275
- Hernowati ET, Therik JW, Hendra. (2009). Efek nutrisiional tepung daun kelor (*moringa oleifera*) varietas ntt 17 terhadap status gizi tikus wistar kep. [Tesis]. Malang (ID): Universitas Brawijaya Pr.
- Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. (2012). Energi Balance and Obesity. [Internet]. Anschutz Health and Wellness Center, Box C263, University of Colorado Anschutz Medical Campus, 12348 E. Montview Blvd., Aurora, CO 80045. [diunduh 2014 Sep 4]. Tersedia pada: <http://www.circ.ahajournals.org/content/126/1/126.long>.
- Jackson WB. (1982). Norway rat and allies. In: Wild Mammals of North America (Chapman JA, FeldhamerGA, eds). Baltimore: The Johns Hopkins University Pr.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. (2000). Principles of Neural Science 4th Edition. New York: MyGraw-Hill Pr.
- Kobayashi A, Osaka T, Inoue S, Kimura S. 2001. Thermogenesis induced by intravenous infusion of hypertonic solutions in the rat. *J Phys.* 535(2): 601- 610.
- Libuda L, Kersting M. 2009. Soft drinks and body weight development in childhood: Is there a relationship?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 12:596- 600.
- Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. 2003. Regulation of Amino Acid and Glucose Transporter in Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Physio Rev* 83:183.
- Millenson, Leslie JC. 1979. Priciples of Behavioral Analisis. 2nd Ed. The New University of Ultser, Northern Ireland.
- Murray, Robert K. 2009. Harpers Ilustrated biochesmistry, 27 th ed. Jakarta:EGC.
- Oomura Y, Kimura K, Ooyama H, Maeo T, Iki M, Kuniyoshi N. 1964. Reciprocal activities of the ventromedial and

- lateral hypothalamic area of cats. *J Science*. 143: 484-485.
- Popkin BM, Duffey K, Gordon-Larsen P. 2005. Environmental influences on food choice, physical activity and energy balance. *J Physiol Behav*. 86:603-13.
- Rahman, M., Palash K.S, Fida M.H, Sarnad M.A.M, dan Habibur M.R. 2004. Purification and Characterization of Invertase Enzyme from Sugarcane. *Pakist Jour Bio Sci*. 7: 340-345.
- Sherwood. 2001. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Edisi Kedua. Diterjemahkan oleh Brahm Upendit. Jakarta (ID): Penerbit Buku Kedokteran EGC. pp: 663-676.
- Shin AC, Pistell PJ, Phifer CB, Berthoud HR. 2010. Reversible suppression of food reward behavior by chronic mu-opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens. *J Neuroscience*. 170: 580-588.
- Silver IA, Erecinska M. 1994. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci*. 14: 5068-5076.
- Sugiyanto. 1995. *Petunjuk Farmasi*. Edisi IV. Yogyakarta(ID): UGM Pr. p: 11-12.
- Volek JS, Sharman MJ, Love DM. 2002. Body composition and hormonal responses to a carbohydrate-restricted diet. *J Metabolism*. 51:864-870.
- Westman EC. 2002. Is dietary carbohydrate essential for human nutrition?. *Am J Clin Nutr*.