

EFEK KONSUMSI MINUMAN BUBUK KAKAO (*Theobroma cacao* L.) BEBAS LEMAK TERHADAP SIFAT ANTIOKSIDATIF LIMFOSIT SUBYEK PEREMPUAN

[The Effect of Fat Free Cocoa (*Theobroma Cacao* L.) Powder Drinks Consumption on Antioxidative Activity of Lymphocyte of Women Subjects]

Erniati¹⁾, Fransiska R. Zakaria^{2)*}, dan Bambang Pontjo Priosoeryanto³⁾

¹⁾ Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Malikussaleh, Lhokseumawe

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³⁾ Jurusan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 12 Juli 2011 / Disetujui 23 Mei 2012

ABSTRACT

The health benefits of cocoa both *in vivo* and *in vitro* have been reported in many studies. Cocoa is a rich source of flavonoids known to have antioxidant activity, such as catechin, epicatechin and procyanidin. The aim of this research was to evaluate the effect of fat free cocoa powder drink consumption on antioxidative properties and proliferation activities of woman lymphocyte. Healthy woman subjects were divided into cocoa group ($n = 9$) and control group ($n = 9$). Cocoa powder drink containing skim milk and sugar was given to the cocoa groups every morning for 25 days. The control group received only water containing skim milk and sugar. Both cocoa and control group received physical medical checkup at the beginning and at the end of the intervention. Their peripheral blood was taken for lymphocyte antioxidant analysis. The measured antioxidant properties consisted of antiradical activity by DPPH method, malonaldehyde (MDA) and glutathione levels. The data of cocoa group showed that there was a significant increase ($p \leq 0.05$) in antiradical level from 31 ± 11.2 to $40.19 \pm 7.42\%$ and glutathione from 48.2 ± 10.5 to 66.7 ± 15.9 $\mu\text{mol/l}$ and a decrease in MDA level in the lymphocyte ($p < 0.05$) from 2.98 ± 2.21 to 1.29 ± 0.33 $\mu\text{mol/l}$ as compared to the control group (from 25.77 ± 6.9 to $26.79 \pm 6.12\%$; 34.7 ± 20.7 to 37.8 ± 19.2 $\mu\text{mol/l}$ and 3.01 ± 1.53 to 2.069 ± 0.707 $\mu\text{mol/l}$ respectively) after consumption of the cocoa powder drink. The results of this research revealed that fat free cocoa powder has a strong antioxidant activity which was manifested up to the blood cells.

Key words: cell antioxidants, fat free cocoa powder, glutathion, human lymphocyte, malonaldehyde

PENDAHULUAN

Saat ini pangan telah makin diandalkan sebagai pemelihara kesehatan dan menjaga kebugaran tubuh. Berbagai jenis tanaman dan rempah-rempah telah dilaporkan mempunyai efek fungsional yang baik bagi kesehatan. Dari sinilah lahir konsep pangan fungsional (*functional foods*) (Zakaria *et al.*, 2003). Salah satu jenis pangan yang mulai diteliti mempunyai efek dapat meningkatkan kesehatan adalah kakao (*Theobroma cacao* L.) atau yang dikenal sebagai coklat. Indonesia adalah produsen kakao terbesar ketiga di dunia. Namun sampai saat ini, komoditas kakao Indonesia masih diproduksi dalam bentuk biji dan di pasaran internasional dihargai rendah.

Biji kakao dinyatakan sebagai bahan yang kaya dengan flavonoid diantaranya adalah senyawa polifenol yang erat kaitannya sebagai zat yang mempunyai kapasitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas. Polifenol dalam kakao diantaranya adalah katekin, epikatekin, prosianidin dan antosianidin (Hammerstone *et al.*, 2000). Menurut Lee *et al.* (2003), kakao mengandung total fenol dan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan anggur maupun teh. Sejumlah penelitian telah mempelajari efek kakao terhadap kesehatan, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Rein *et al.* (2000) menyatakan bahwa konsumsi kakao yang kaya flavonoid

memberikan peningkatan aktivitas antiradikal bebas dalam darah setelah dua jam mengkonsumsi coklat. Berdasarkan penelitian Zairisman (2006) bubuk kakao bebas lemak yang berasal dari perkebunan Indonesia mempunyai aktivitas antiradikal bebas pada sel limfosit manusia secara *in vitro*. Penelitian tersebut juga membuktikan bahwa bubuk kakao bebas lemak tidak bersifat toksik terhadap sel limfosit. Dengan demikian tidak akan bersifat toksik terhadap sel tubuh organisme. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian secara *in vivo* dengan menggunakan responden manusia.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan bubuk kakao bebas lemak dalam meningkatkan sifat antioksidatif sel limfosit manusia yaitu sel limfosit perempuan. Adapun parameter sifat antioksidatif yang diukur meliputi kadar malonaldehid (MDA), kadar glutathion dan aktivitas antiradikal bebas pada sel limfosit.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah bubuk biji kakao bebas lemak (0,1%) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Jember. Bubuk yang digunakan merupakan bubuk biji kakao varietas *bulk* masak non fermentasi yang memiliki total fenol yang tinggi berdasarkan uji *in vitro* (Zairisman, 2006). Bahan lain yang digunakan adalah

*Korespondensi Penulis :
E-mail : fransiska_z@hotmail.com

gula pasir, air panas dan susu bubuk skim. Bahan kimia yang digunakan adalah larutan *histopaque* (1077) (*ficoll-hypaque*) dari Sigma, media RPMI-1640, trifen biru, pereaksi TBA, pereaksi TCA, glutamin, antibiotik penisilin-streptomisin, aquabides, alkohol 90%, larutan PBS, pereaksi Ellman, pelarut air bebas ion 2,2-difenil-1-pictihidrazil (DPPH) dan metanol pro analisis.

Pembuatan minuman bubuk kakao bebas lemak

Bubuk kakao bebas lemak sebanyak 4 g dilarutkan dalam 100 ml air panas, ditambahkan 2 gula dan 2 g susu bubuk skim. Minuman bubuk kakao akan diminum oleh responden dalam keadaan hangat.

Persiapan responden

Responden yang terlibat dalam penelitian ini adalah 18 orang mahasiswa IPB yang berusia 22 – 27 tahun dan berjenis kelamin perempuan yang dengan sukarela terliba tdalam penelitian ini. Responden dibagi dalam 2 kelompok dimana masing-masing kelompok berjumlah 9 orang. Kelompok pertama merupakan kelompok kakao yang mengkonsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak dan kelompok kedua adalah kelompok kontrol yang hanya mengkonsumsi minuman yang terdiri dari 2 g susu bubuk skim ditambah 2 g gula dalam 100 ml air hangat. Pemilihan responden berjenis kelamin perempuan didasarkan pada kemudahan dalam menyediakan konsumsi dan kemudahan dalam hal koordinasi dengan peneliti. Responden yang dipilih adalah mahasiswi yang dinyatakan sehat berdasarkan hasil pemeriksaan kesehatan oleh dokter di Klinik Falfa Kampus Darmaga IPB.

Pelaksanaan intervensi

Intervensi dilaksanakan selama 25 hari pada jam 07.00–08.00 WIB setiap hari. Sebelum mengkonsumsi minuman bubuk kakao responden akan mendapatkan sarapan pagi yang seragam dari peneliti dan juga makan malam. Sarapan pagi yang disediakan adalah jenis sarapan pagi yang sering dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia seperti nasi goreng atau nasi putih dengan lauk yang sederhana. Begitu juga dengan makan malam yang disediakan adalah makan malam seperti nasi dengan lauk-pauk. Makan siang responden tidak disediakan dengan asumsi responden akan makan di kantin dengan menu yang hampir sama. Selama penelitian responden tidak diizinkan mengkonsumsi makanan atau minuman yang mengandung antioksidan yang sama dengan kakao seperti kopi, teh atau kue-kue yang banyak mengandung coklat. Sebelum pelaksanaan intervensi juga dilakukan penandatanganan surat perjanjian ("*inform consent*").

Pengambilan darah

Pengambilan darah dilakukan 2 kali yaitu sebelum dan sesudah intervensi. Pengambilan darah dilakukan di Klinik Falfa Kampus Darmaga IPB pada jam 07.00-08.00 pagi oleh seorang asisten transfusi darah. Darah diambil secara aseptis sebanyak 35 ml dengan menggunakan jarum *Precisionslide™* steril sekali pakai. Darah kemudian ditempatkan dalam tabung *vacutainer* steril yang mengandung koagulan dan segera dianalisa di laboratorium.

Isolasi limfosit

Limfosit manusia diisolasi dari darah ferifer dengan sentrifugasi berdasarkan perbedaan densitas larutan *ficoll-hypaque*. Sampel darah disentrifus pada 1500 rpm selama 5 menit. Suspensi limfosit dilewatkan pada larutan *ficoll-hypaque* dan disentrifus 30 menit pada 2500 rpm. Endapan sel limfosit, dicuci dengan media RPMI dua kali dan disentrifus pada 1500 rpm selama 10 menit. Pelet sel yang diperoleh ditambah medium pertumbuhan RPMI kemudian dilakukan perhitungan jumlah sel dengan menggunakan pewarna trifen biru perbandingan 1 : 1 dengan menggunakan hemasitometer pada perbesaran mikroskop sebesar 100 kali. Sel yang akan diuji harus dalam kondisi hidup minimal 1×10^6 sel/ml. Sel yang akan dikultur harus ditambahkan serum darah golongan AB 10%.

Analisis kadar malonaldehid (MDA) sel limfosit (Modifikasi metode Winarsi 2003; Hong et al., 2000)

Sebanyak 100 μ l suspensi sel limfosit atau standar ditambahkan 75 μ l TCA 20% (dalam 0,6 mol/L HCl). Setelah itu didinginkan dalam es selama 20 menit, campuran tersebut disentrifus pada 5000rpm selama 20 menit. Seratus μ l supernatan yang diperoleh ditambahkan 20 μ l pereaksi TBA dan dididihkan selama 30 menit. Setelah didinginkan campuran tersebut dimasukkan kedalam lempeng sumur mikro 96 sumur dan diukur absorbansinya dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar dibuat dengan memplot nilai absorbansi dengan konsentrasi standar. Konsentrasi MDA sel limfosit dapat dihitung berdasarkan kurva standar.

Analisis kadar glutation sel limfosit (Modifikasi metode Bergemeyer 1990; Zakaria et al., 2003)

Sebanyak 0,5 ml suspensi sel limfosit yang telah dilisis ditambahkan 0,25 ml asam sulfosalisilat 50% dan disentrifus pada 2500 rpm selama 15 menit. Sebanyak 100 μ l supernatan yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam lempeng sumur mikro 96 sumur, lalu ditambahkan 150 μ l PBS dan 50 μ l pereaksi Ellman yaitu 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoat (DTNB). Kadar glutation dapat dibaca dengan mengukur absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang $\lambda = 415$ nm. Kemudian diukur juga absorbansi standar glutation pada berbagai konsentrasi. Konsentrasi glutation tereduksi (GSH) limfosit dihitung berdasarkan kurva standar.

Analisis aktivitas antiradikal bebas sel limfosit dengan metode DPPH (Modifikasi Turkmen et al., 2005)

Suspensi sel limfosit yang memiliki jumlah sel $1,1 \times 10^6$ sel/ml terlebih dahulu dilisis dalam air deionisasi dan disimpan pada suhu -30°C . Sebanyak 1 ml suspensi sel limfosit yang telah dilisis diambil dan ditambahkan metanol proanalisis 1 ml serta DPPH 0,2 mM sebanyak 1 ml dan dikocok. Kemudian disimpan dalam ruang gelap (tanpa cahaya) selama 60 menit. Sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Sebagai kontrol digunakan campuran larutan DPPH dan metanol. Absorbansi dari tiap-tiap sampel didapat dan aktivitas antiradikal bebas sel limfosit dapat dihitung.

Analisa data

Analisa statistik terhadap data yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan uji t (*t-test*) perbandingan dua sampel untuk melihat adanya pengaruh nyata konsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak sebelum dan sesudah intervensi antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keadaan umum responden

Berdasarkan pemeriksaan kesehatan oleh dokter dinyatakan bahwa semua responden berada dalam keadaan sehat dan tidak menderita penyakit yang serius. Begitu juga setelah mereka menjalani intervensi, kesehatan mereka tetap baik. Hasil pengukuran antropometri responden, terjadi kenaikan berat badan pada kelompok kakao dan kelompok kontrol walaupun sangat kecil yaitu sekitar 1,23 %. Van Heerden (2006) mengemukakan bahwa konsumsi coklat bukanlah penyebab utama obesitas. Dalam penelitian ini, konsumsi flavanol kakao selama 28 hari tidak menyebabkan perubahan berat badan secara nyata antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Sifat antioksidatif sel limfosit

Parameter yang diukur untuk menggambarkan sifat antioksidatif sel limfosit pada penelitian ini adalah nilai MDA, kadar glutathion dan antiradikal bebas sel limfosit. Rekapitulasi nilai rata-rata sifat antioksidatif sel limfosit kelompok kakao dan kelompok kontrol sebelum dan sesudah intervensi dapat dilihat pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Rekapitulasi nilai rata-rata sifat antioksidatif sel limfosit responden yang menerima minuman kakao atau kontrol tanpa kakao. Perbedaan sebelum dan sesudah konsumsi dinyatakan dalam bentuk notasi

Parameter	Responden	Nilai Rata-Rata ± SD	
		Sebelum	Sesudah
Nilai MDA (µmol/l)	Kakao	2,98 ^a ± 2,21	1,29 ^b ± 0,328
	Kontrol	3,01 ^a ± 1,53	2,069 ^a ± 0,707
Kadar glutathion (µmol/l)	Kakao	48,2 ^a ± 10,5	66,7 ^b ± 15,9
	Kontrol	34,7 ^a ± 20,7	37,8 ^a ± 19,2
Antiradikal bebas (%)	Kakao	31 ^a ± 11,2	40,19 ^b ± 7,42
	Kontrol	25,77 ^a ± 6,9	26,79 ^a ± 6,12

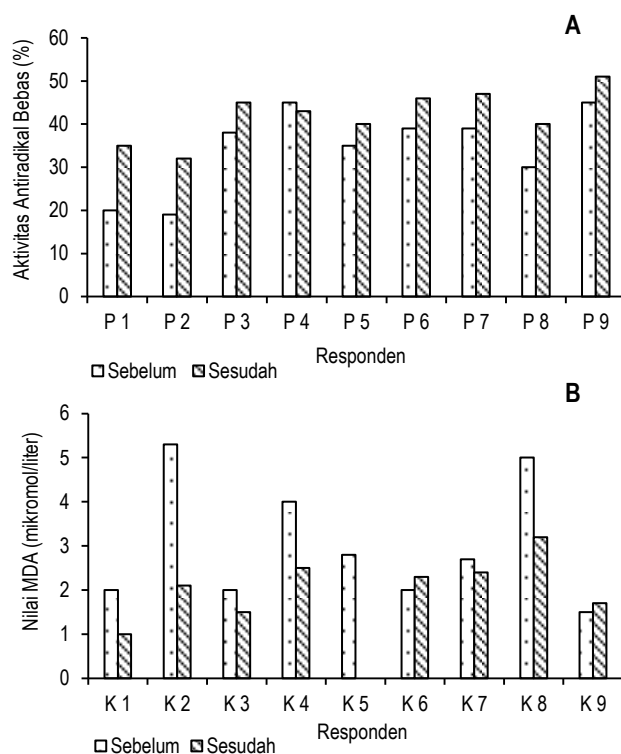
Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (p ≤ 0,05)

Nilai malonaldehida (MDA) sel limfosit

Gambaran nilai MDA sel limfosit kelompok kakao dan kelompok kontrol masing-masing responden sebelum dan sesudah intervensi dapat dilihat pada Gambar 1.

Data responden K 5 setelah intervensi tidak dapat diakses karena responden berhalangan, namun data sebelum intervensi dianggap dapat menambah informasi status awal responden. Penurunan nilai MDA sel limfosit kelompok kakao yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol dapat diduga karena efek konsumsi bubuk kakao bebas lemak selama 25 hari. Seperti diketahui berdasarkan penelitian Zairisman (2006) ekstrak bubuk kakao bebas lemak dalam pelarut air mengandung senyawa polifenol yang tinggi. Dalam hal ini senyawa polifenol

kakao yaitu dari golongan flavonoid dapat berfungsi sebagai antioksidan primer. Kochhar dan Rossell (1990) mengemukakan bahwa senyawa polifenol dapat berfungsi sebagai antioksidan primer karena mampu menghentikan reaksi berantai radikal bebas yang terjadi di dalam sel. Polifenol akan bereaksi langsung dengan senyawa peroksida radikal yang terdapat pada membran sel atau di dalam sel. Dengan demikian dapat menurunkan nilai MDA yang merupakan produk oksidasi asam lemak karena radikal bebas.



Gambar 1. Nilai MDA sel limfosit kelompok perlakuan (A) dan kontrol (B)

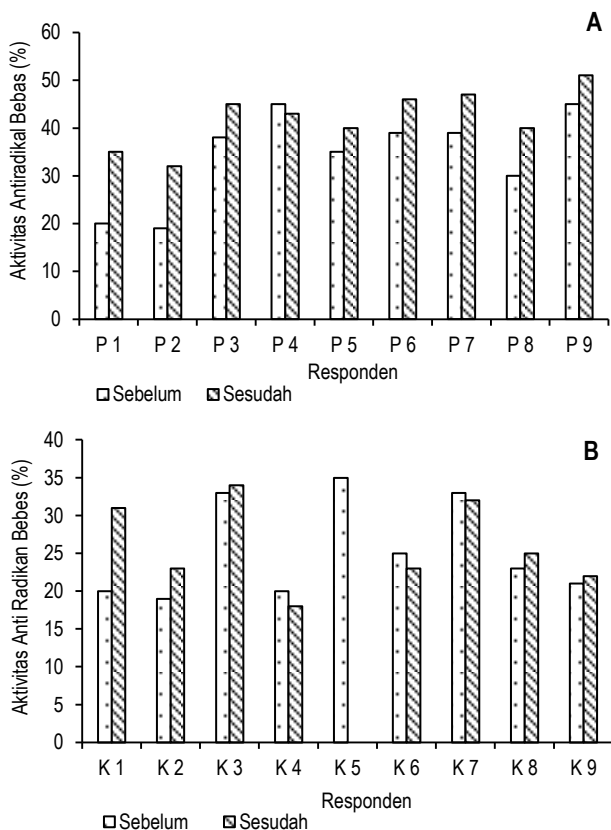
Antiradikal bebas sel limfosit dengan metode DPPH

Fang *et al.* (2002) mengemukakan bahwa dalam tubuh manusia secara alami mempunyai antioksidan seluler yang dapat menghambat pembentukan senyawa radikal. DPPH adalah senyawa radikal yang dapat bereaksi dengan antioksidan sel (Fang *et al.*, 2002). Gambaran nilai aktivitas antiradikal bebas dari hasil penelitian disajikan pada Gambar 2.

Peningkatan antiradikal bebas sel limfosit kelompok kakao setelah intervensi disebabkan bubuk kakao yang dikonsumsi adalah bubuk kakao yang mempunyai kandungan polifenol yang tinggi. Wollgast dan Anklam (2000) mengemukakan bahwa polifenol dalam biji kakao memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas sehingga bermanfaat bagi tubuh.

Peningkatan kemampuan antiradikal sel limfosit oleh polifenol kakao diduga karena senyawa polifenol yang terkandung dalam minuman bubuk kakao dapat masuk kedalam sirkulasi darah. Rein *et al.* (2000) mengemukakan bahwa konsumsi coklat yang kaya akan flavanol akan memberikan peningkatan kapasitas antioksidan darah dalam waktu 2 jam

setelah memakan coklat. Mekanisme peningkatan antiradikal bebas sel limfosit diduga bisa terjadi melalui aktivitas antioksidan primer dimana senyawa polifenol dari kakao masuk dalam sel limfosit akan bereaksi secara langsung dengan radikal bebas yang menyerang sel, dalam hal ini senyawa DPPH. Semakin banyak DPPH yang bereaksi, maka semakin tinggi antiradikal yang dimiliki oleh sel tersebut.

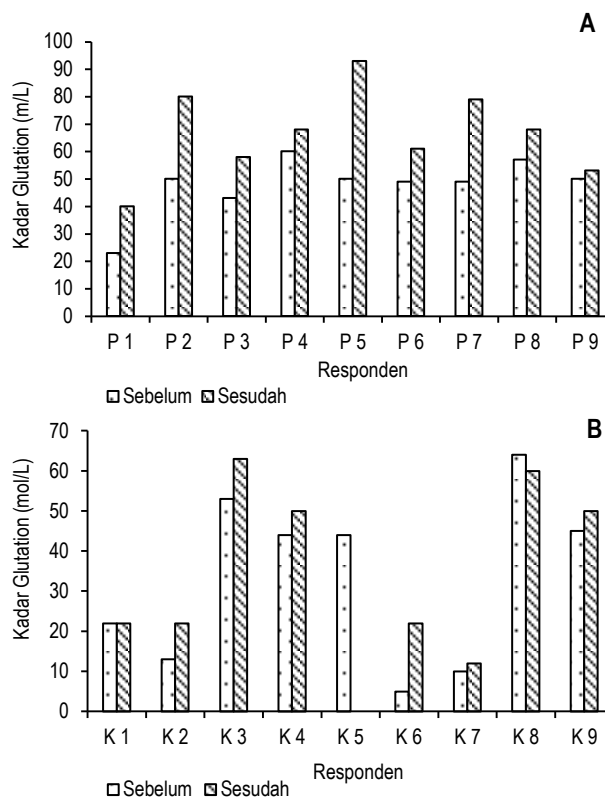


Gambar 2. Aktivitas antiradikal bebas sel limfosit kelompok perlakuan (A) dan kontrol (B)

Kadar glutatation sel limfosit

Gambaran kadar glutatation sel limfosit tdpapat dilihat pada Gambar 3. Nilai glutatation limfosit subjek K 5 setelah intervensi tidak dapat ditunjukkan karena subjek berhalangan untuk berpartisipasi pada hari pengambilan darah, namun nilai parameter sebelum intervensi dapat menunjang nilai keseluruhan responden. Peningkatan kadar glutatation sel limfosit karena konsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak diduga karena senyawa flavonoid yang terkandung dalam bubuk kakao dapat menggantikan sebagian dari fungsi glutatation sel limfosit. Komponen polifenol kakao mungkin dapat bekerja secara sinergis bersama glutatation sel dalam menetralsir radikal bebas. Seperti diketahui glutatation merupakan sistem antioksidan primer di dalam sel. Glutatation disintesis secara kontinyu dalam sel melalui reaksi gamma-glutamil oleh enzim γ -glutamylcysteine synthetase dan enzim glutatation synthase (GSH) yang melibatkan beberapa deret asam amino (Yan dan Meister, 1990). Adanya polifenol kakao yang bersifat sebagai antioksidan

primer dapat menangkal senyawa radikal sehingga glutatation yang disintesis oleh sel tidak akan berkurang jumlahnya.



Gambar 3. Kadar glutatation sel limfosit kelompok perlakuan (A) dan kontrol (B)

Mekanisme lain peningkatan kadar glutatation sel limfosit setelah mengkonsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak diduga bahwa senyawa flavonoid dalam bubuk kakao dapat menstimulir ekspresi genetika dalam sintesis glutatation. Moskaug *et al.* (2005) mengemukakan bahwa ekstrak bawang yang kaya dengan senyawa flavonoid dapat menstimulir enzim γ -glutamylcysteine synthetase melalui antioksidan respon elemen (AREs) yang merupakan enzim promotor sintesis glutatation di dalam sel tikus. Dalam penelitian lain dengan menggunakan tikus percobaan diperoleh bahwa senyawa flavonoid dari buah berry dapat memodulasi ekspresi gen γ -glutamylcysteine synthetase dalam sintesis glutatation (Myhrstad *et al.*, 2006). Winarsi (2003) melaporkan peningkatan glutatation pada limfosit manusia yang diberi flavonoid kedele. Montgomery *et al.* (2002), melaporkan peranan vitamin dari makanan dalam limfosit tikus. Laporan penelitian ini memperlihatkan pengaruh antioksidan makanan sampai pada taraf seluler, misalnya sel limfosit, baik secara *in vitro* maupun *in vivo* pada manusia.

KESIMPULAN

Konsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak setiap hari selama 25 hari berpengaruh nyata dalam meningkatkan kapasitas antioksidan sel limfosit manusia khususnya perempuan yang meliputi meningkatnya antiradikal bebas dengan

metode DPPH, meningkatnya kadar glutation dan menurunnya nilai MDA sel limfosit. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa mengkonsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak yang merupakan hasil samping produksi lemak kakao dapat meningkatkan kapasitas antioksidan sampai kedalam sel limfosit sehingga berpotensi melindungi sel limfosit dari stress oksidatif. Dengan meningkatnya sifat antioksidatif limfosit yang mengindikasikan perbaikan sistim imunitas tubuh perempuan, maka dapat dikatakan bahwa konsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak dapat berkontribusi meningkatkan kesehatan manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Bergmeyer HU. 1990. *Methods of Enzymatic Analysis*. Germany: VCH Verlagsgesellschaft GmbH.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutr* 18: 872 – 879.
- Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. 2000. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr* 130: 2086S–2092S.
- Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. 2000. Total plasma malonaldehyde levels in 16 Taiwanese College Students determined by various thiobarbituric acid test and improved high performance liquid chromatography based method. *Clin Biochem* 33: 619-625.
- Kochhar SP, Rossel JB. 1990. Detection, estimation and evaluation of antioxidant in food system. Di dalam: Hudson BJJ (ed). *Food Antioxidant*. London: Elsevier App Scip 19-64.
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemical and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem* 51: 7292–7295.
- Montgomery BA, Murphy J, Chen JJ, Desai VG, McGarrity L, Morris SM, Casciano DA, Aidoo A. 2002. Mutagenicity of food-derived carcinogens and the effect of antioxidant vitamins. *Nutr Cancer* 43:103-10.
- Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad MCW, Blomhoff R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 81(Suppl): 277S-283S.
- Myhrstad MCW, Carlsen H, Dahl LI, Ebihara K, Glemmestad L, Haffner K, Moskaug JO, and Blomhoff R. 2006. Bilberry extracts induce gene expression through the electrophile response element. *Nutr and Cancer* 54: 94-101.
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga GG. 2000. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma antioxidant capacity. *Am J Clin Nutr* 72: 30 – 35.
- Turkmen N, Ferda S, Velioglu YS. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem* 93: 713–718.
- Van Heerden IV. 2006. Chocolate update for Easter. http://www.health24.com/dietnfood/Weight_Centre/15-51-736,1867. Asp. [27 April 2006].
- Winarsi H. 2003. Respon imunitas dan hormonal wanita premenopause terhadap minuman susu fungsional yang disuplementasi dengan isoflavon kedelai dan difortifikasi dengan seng. [Desertasi]. *Prog Studi Ilmu Pangan Prog Pascasarjana IPB, Bogor*.
- Wollgast J, Anklam E. 2000. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?. *J Food Res Intern* 33: 449–459.
- Yan N, Meister A. 1990. Amino acid sequence of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 265: 1588-1593.
- Zairisman SZ. 2006. Potensi imunomodulator bubuk kakao bebas lemak sebagai produk sub standar secara *in vitro* pada sel limfosit manusia. [Skripsi]. Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, IPB, Bogor.
- Zakaria FR, Nurrahman, Prangdimurti E, Tejasari. 2003. Antioxidant and immunoenhancement activities of ginger (*Zingiberofficinale* Roscoe) extracts and compounds in vitro and in vivo mouse and human system. *Nutraceuticals and Food* 8: 96-104.