

## Peningkatan Ekspresi GSH (Gluthathione) pada Monosit yang Dipapar Biji Kopi dan DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)

I Dewa Ayu Ratna Dewanti

Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

### Abstract

**Background.** The content of the coffee beans that are antioxidants have good potential, particularly against cancers of the oral cavity. Polyphenols in coffee beans 5% together the other ingredients in the diet, such as vitamin C, vitamin E and carotenoids, can protect the body's tissues against oxidative stress. Antioxidants can prevent a variety of diseases associated with oxidative stress, such as cancer. **Objective.** Research to determine the expression of GSH on monocytes were exposed to coffee beans and DMBA in vitro. **Research Methods.** Monocytes aspirated, added RPMI, resuspension with M 199, penstrep, fungisone. Superimposed on a cell culture plate that was given coverslip, added M 199, incubation. Add RPMI, incubation, discard lymphocytes, washing with RPMI. Add medium M 199, incubation. Cultures are washed, resuspension with M 199, treatments according to the research group. KO: Monocytes, K1: Coffee Monocytes + 10% + DMBA, K2: Coffee Monocytes + 5% + DMBA, K3: Monocytes + Coffee 10%, K4: Monocytes + coffee 5%, K5: Monocytes + DMBA. Immunocytochemistry for the analysis of GSH. Cells expressing GSH brown under a light microscope with a magnification of 400 times and counted on five visual fields. **Research Result.** Results of ANOVA analysis ( $p < 0.01$ ) showed that there were significant differences in all groups. Furthermore, the LSD test ( $p < 0.05$ ), the results are significant differences between all groups. **Conclusion.** Coffee beans can increase GSH expression on monocytes were exposed to DMBA.

**Keywords :** GSH ; coffee beans ; DMBA ; monocytes ; imunocytochemistry

**Korespondensi (Correspondence):** Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Jl. Kalimantan 37, Jember. Email: [dewadewanti@yahoo.com](mailto:dewadewanti@yahoo.com). Telp. 0331-333536. Fax. 331991

Tanaman kopi merupakan komoditi ekspor yang cukup menggembirakan karena mempunyai nilai ekonomis yang relatif tinggi di pasaran dunia. Disamping itu kandungan kimia kopi seperti flavonoid, xanthine, antioksidan, alkaloid dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, antibakteri, antikanker. Biji kopi mengandung dua jenis alkaloid, kafein dan trigonelline, sebagai komponen utama. Kebanyakan penelitian efek kesehatan kopi ini dengan cara digoreng, diseduh. Studi juga menunjukkan bahwa kafein bukanlah satu-satunya sumber manfaat kesehatan kopi, namun terdapat komponen bioaktif lain yang terlibat. Kemungkinan komponen tersebut termasuk keluarga senyawa polifenol yang dikenal sebagai asam chlorogenic, yang merupakan ester asam caffeic dan asam quinic. Asam klorogenat merupakan komponen utama ketika kopi digoreng, tapi kebanyakan dari mereka yang hilang selama proses.<sup>1,2,3,4</sup> Hambatan kopi terhadap *S. mutan*, yang dihitung pada media pertumbuhan juga telah dibuktikan.<sup>5</sup> Sebagai pencegah kanker nampaknya kandungan biji kopi yang bersifat antioksidan mempunyai potensi yang baik, khususnya terhadap kanker rongga mulut. Polifenol dalam biji kopi 5%ersama-sama bahan lain dalam diet, seperti vitamin C, vitamin E dan karotenoid, dapat melindungi jaringan tubuh terhadap stres oksidatif. Antioksidan dapat mencegah berbagai penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif, seperti kanker, penyakit jantung, peradangan dan lain-lain.<sup>6</sup> Minum kopi menurunkan agregasi platelet, dan menginduksi peningkatan yang signifikan

dalam konsentrasi platelet asam fenolat. Efek antiplatelet kopi independen dari kafein dan bisa menjadi hasil dari interaksi asam fenolik kopi dengan jaringan sinyal intraseluler yang mengarah ke agregasi platelet.<sup>7</sup> Interaksi susu dengan kopi cenderung menurun selama dilambung dan pencernaan usus, sehingga menunjukkan bahwa interaksi antara asam klorogenat dan protein susu dalam kopi dan minuman susu mungkin tidak memiliki dampak yang signifikan terhadap daya kopi 10% antioksidan sebelum dan setelah konsumsi.<sup>8</sup> Hasil kami memungkinkan untuk menyimpulkan bahwa konsumsi harian 3-4 cangkir minuman dari kopi 10% torabika memberikan efek kesehatan yang menguntungkan, sebagaimana dibuktikan dapat mengurangi kerusakan oksidatif, massa lemak tubuh dan penyerapan energi/nutrisi.<sup>9</sup> Tes imunologi menunjukkan bahwa AGP (Abinogalactan- protein) dipengaruhi beberapa mediator sel imunokompeten sistem kekebalan tubuh seperti TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  dan IL-2. Tampaknya bahwa kopi AGP adalah induktor yang baik dari kedua sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$ , bagaimanapun kurang kuat dalam induksi TNF- $\alpha$  dibandingkan dengan yang dari  $\beta$ -D-glucan. Terbukti induksi TNF- $\alpha$ , IL-2 dan IFN- $\gamma$ , polarisasi pro-TH1 mendukung kesimpulan kita tentang kemanjuran bio-immunologi dari AGP dengan penekanan pada imunitas seluler.<sup>10</sup> Sebuah studi oleh University of Scranton telah menemukan bahwa kopi 10%dalah sumber antioksidan yang tinggi. Sebagai sumber utama antioksidan bahkan mengalahkan buah-buahan dan sayuran. Ini adalah

sumber antioksidan dalam diet nomor satu di Amerika. Kita dapat meningkatkan glutathione plasma. Antioksidan secara umum, dikatakan memberikan sejumlah manfaat kesehatan potensial seperti perlindungan terhadap penyakit jantung dan kanker.<sup>11,12,13</sup>

Sebuah studi baru oleh American Cancer Society menemukan hubungan antara minum kopi dapat mengurangi risiko kematian akibat kanker mulut/faring (mulut dan tenggorokan). Penelitian sebelumnya juga telah menunjukkan bahwa kopi dikaitkan dengan penurunan risiko kanker mulut/faring. Kopi mengandung antioksidan, polifenol dan senyawa lain yang dapat membantu melindungi terhadap pengembangan atau perkembangan kanker. Namun faktor-faktor risiko terkuat untuk kanker mulut/faring adalah tembakau dan alkohol. Kebanyakan orang dengan kanker mulut/faring menggunakan tembakau. Human papillomavirus (HPV) infeksi juga telah dikaitkan dengan kanker ini, terutama di non - perokok. Jumlah kasus kanker mulut/faring terkait dengan HPV telah meningkat secara dramatis selama beberapa dekade terakhir.<sup>14</sup>

Dari hal di atas diharapkan kopi dapat memberi solusi sebagai pencegah dan terapi alternatif kanker rongga mulut yang murah, mudah didapat dan efektif. Penelitian ini dilakukan sebagai penelitian awal terhadap kanker rongga mulut, secara in vitro dengan melihat ekspresi antioksidan GSH pada monosit yang dipapar bahan karsinogenik DMBA dan biji kopi.

Penyakit kanker (termasuk kanker mulut) merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia. Morbiditas dan mortalitas penderita kanker cukup tinggi di Indonesia, oleh karena itu masih dibutuhkan upaya-upaya yang keras untuk mengatasi hal ini. Di Indonesia kanker mulut ditemukan kira-kira 3 – 4% dari seluruh kasus kanker yang ada. Selama ini kanker di mulut diatasi dengan operasi, namun hal ini sulit dilakukan karena rongga mulut dan organ mulut yang kecil, sehingga khemoprevensi merupakan pilihan utama. Mekanisme khemoprevensi tersebut dapat terjadi melalui induksi apoptosis dan proteksi antioksidan. Identifikasi apoptosis dapat dilakukan dengan menganalisa ekspresi protein: Bcl-2, Bim, Caspase 8 dan Caspase 3. Sedangkan proteksi antioksidan dapat dilakukan dengan menganalisa rasio antioksidan seperti GSH/GSSG (Glutathione), Gpx (Glutathione Peroxidase) dan GST (Glutathione S-Transferase) Sedangkan marker untuk proliferasi dan deferensiasi sel kanker dapat diketahui dari PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dan p53.<sup>15,16</sup>

Tubuh memerlukan banyak antioksidan untuk mengatasi radikal bebas sebelum terjadi kerusakan. Salah satu antioksidan terbaik adalah antioksidan yang dibuat secara alami di dalam tubuh anda yaitu glutathione. Jenis super antioksidan ini

banyak ditemui di dalam tubuh dan sangat mudah didapat dari asupan makanan sehari-hari. Glutathione tidak hanya mampu menangani radikal bebas, tetapi juga mampu mengusir racun yang masuk ke dalam tubuh sebelum racun itu menimbulkan kerugian. Glutathione disebut juga Glutathione Sulph Hydril (GSH) yang merupakan protein yang secara alami diproduksi dalam tubuh dan berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh dan regenerasi sel, bersifat antioksidan dan anti toksin. Molekulnya terdiri dari 3 asam amino: glutamate, cysteine dan glycine. Glutathione sangat diperlukan tubuh, oleh karena tanpa glutathione, antioksidan lain seperti Vitamin C dan vitamin E tidak dapat bekerja optimal, itulah sebabnya glutathione disebut sebagai master antioksidan. Tanpa glutathione limfosit tidak dapat bekerja dengan baik.<sup>17</sup> GSH terlibat dalam banyak proses metabolisme lainnya, termasuk metabolisme asam askorbat, menjaga komunikasi antara sel-sel, dan umumnya mencegah kelompok protein-SH dari oksidasi dan cross-linking. Hal ini juga tampaknya terlibat dalam transportasi tembaga intraseluler, GSH dapat mengurangi kemampuan ion tembaga untuk menghasilkan radikal bebas, atau setidaknya untuk melepaskan radikal ke dalam larutan. GSH adalah agen radioprotective dan kofaktor untuk beberapa enzim dalam jalur metabolisme yang berbeda, termasuk glyoxylases, dan enzim yang terlibat dalam sintesis leukotrien.<sup>17</sup> Glutathione atau glutathione sulfhidril (GSH), yang merupakan protein kecil yang terdiri dari tiga asam amino glutamat, glisin, dan sistein-dapat mencegah kanker melalui antioxidation, detoksifikasi, dan penguatan sistem kekebalan tubuh. Kemampuannya untuk menghancurkan radikal bebas, meningkatkan fungsi kekebalan tubuh dan mendetoksifikasi tubuh membuat glutathione agen anti-kanker penting.

Tujuan penelitian ini untuk menganalisis ekspresi GSH pada sel monosit yang dipapar biji kopi dan DMBA secara in vitro.

#### METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dengan isolasi monosit, kultur monosit dan dilanjutkan pengecatan imunositokimia. Kopi yang digunakan adalah kopi 5% bubuk Robusta Gunung Ijen (100% kopi murni) yang dibuat dari kopi merah jenis Robusta dan diperoleh dari PTPN XII (Persero) Jawa Timur. Kopi 10% dibuat dari 3 g Kopi diseduh dalam air panas 300 ml, diaduk dan didinginkan. Disentrifuse 1000 rpm selama 10 menit. Kemudian difilter, diambil supernatan.

Isolasi monosit. Pengambilan darah 9 cc kemudian dicampur dengan antikoagulan (BO), suspensi darah dibagi menjadi 3 bagian, dilakukan pemisahan serum. Darah dipindahkan ke tabung falcon, sentrifuse 600 rpm, 37°C, 10 menit, serum

diambil dan disimpan dan diencerkan dengan HBSS (Sigma) sampai 9 cc. Lapiskan darah ke ficoll hypaque, disentrifuse 1400 rpm selama 30 menit 37°C. Setelah disentrifuse akan terlihat sel darah terpisah. Monosit terletak pada cincin putih. Kemudian monosit diaspirasi, kemudian 3 tabung monosit dijadikan satu tabung, ditambahkan RPMI 1640 (Gibco) 500µl. Dicuci dengan RPMI 2x, disentrifuse 1400 rpm 10 menit. Kemudian dilakukan resuspensi dengan 1 ml M 199 (Gibco), 20 µl penstrep (Sima), 5 µl fungisone (Gibco). Dilakukan pipeting dan diambil 50 µl, ditambahkan Tripkan Blue dan dilanjutkan hitung sel dengan hemositometer.

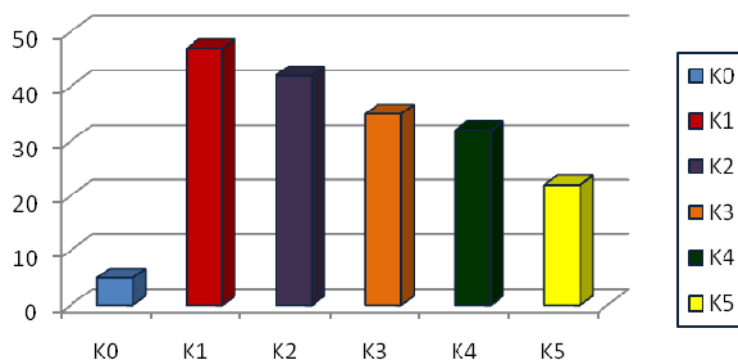
**Kultur monosit.** Menyiapkan cell culture plate 24 well (Corning) dan diberi coverslip (Neuvitro). Ditambahkan 1,5 ml M 199 dan dipipeting. Culture plate dilapisi masing-masing 100 µl/well, inkubasi 15-20 menit. Diambahkan RPMI 1640 1 ml/well, diinkubasi 2 jam. Selanjutnya limfosit dibuang, dicuci dengan RPMI 1640 2x. Ditambahkan medium M 199 1 ml/well, diinkubasi 24 jam pada 37°C 5°C CO<sub>2</sub>. Hari berikutnya, hasil kultur dicuci 2x, resuspensi dengan M 199 1000µl/well dan diberi perlakuan sesuai dengan kelompok penelitian. KO : Monosit, K1 : Monosit + Kopi 10% + DMBA, K2 : Monosit +Kopi 5% + DMBA, K3 : Monosit + Kopi 10%, K4 : Monosit + kopi 5%. K5 : Monosit + DMBA. Suspensi monosit = 1000µl, Kopi = 200 µl, DMBA (Sigma) = 500 µl, yang sebelumnya dilarutkan dalam pelarut organik (minyak wijen). Selanjutnya diinkubasi 24 jam.

**Imunositokimia.** Sediaan direndam dalam air selama 10 menit, air dibuang dan direndam dalam PBS (Gibco) 10 menit. Sediaan ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 10 menit, cuci dengan PBS 3x masing-masing 5 menit. Ditambahkan antibody primer (Biqss),

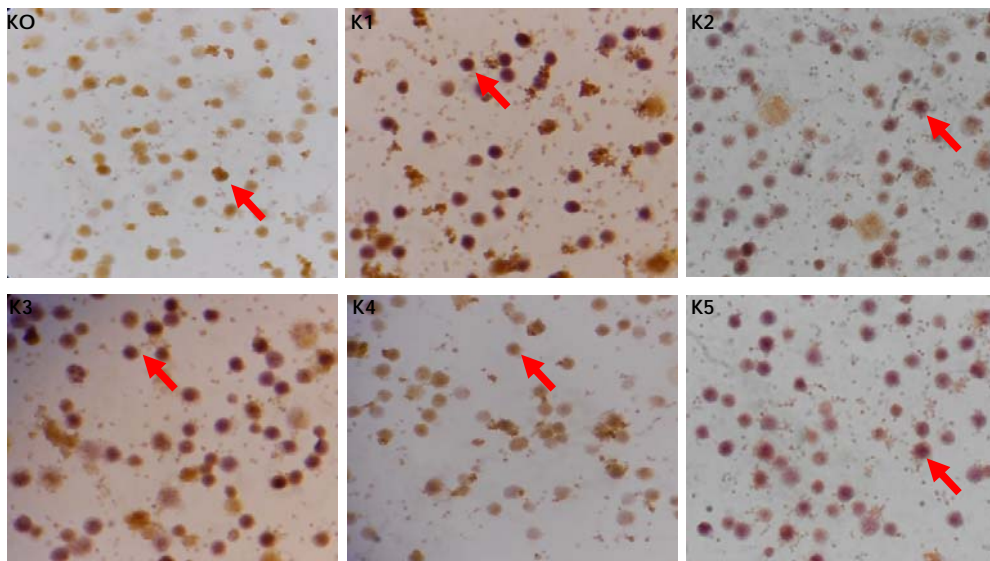
dibiarkan 24 jam pada 4°C. Dicuci dengan PBS 3x masing-masing 5 menit. Ditetesi dengan antibody sekunder (biotinylated/Daco) dibiarkan 60 menit. Dicuci dengan PBS 3x masing-masing 5 menit. Ditetesi antibody sekunder (Streptavidin + HRP/Daco) dibiarkan 30 menit. Dicuci dengan PBS 3x masing-masing 5 menit, ditetesi DAB chromogen (Daco) 20 menit. Dicuci dengan PBS 3x, dicuci dengan aquadest 10 menit. Selanjutnya direndam dalam Meyer Haematoxyline (Merck) selama 5 menit. Dicuci dengan aquadest 10 menit, dikeringkan dan dilakukan mounting dengan entelan (Meck) atau dengan Balsem Canada. Sel yang mengekspresikan GSH adalah yang berwarna coklat dan dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.

**HASIL**

Data penelitian terdistribusi normal dari Kosmogorov Smirnov dan homogen dari uji Lavene (p>0,05). Hasil analisis Anava (p<0,01) menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna pada semua kelompok. Selanjutnya dilakukan Uji LSD (p<0,05), hasilnya terdapat perbedaan yang bermakna antara KO dengan semua kelompok perlakuan (K1, K2, K3, K4, K5), antara K1 dengan K3, K4, K5, antara K2 dengan K3, K4, K5, antara K4 dengan K5. Sedangkan perbedaan yang bermakna juga terjadi antara K1 dengan K2 dan antara K3 dengan K4. Hal ini menunjukkan bahwa kopi 10% akan mempengaruhi ekspresi GSH lebih besar dibandingkan yang diencerkan 5%. Begitu juga pada kopi 10% dan kopi 5% yang ditambahkan DMBA memberikan ekspresi GSH yang berbeda secara bermakna.



Gambar 2. Diagram batang ekspresi GSH pada monosit akibat paparan kopi dan DMBA. Pada gambar terlihat batang Ko memiliki tinggi batang paling rendah, artinya ekspresi GSHnya paling sedikit. Sedangkan K1 memiliki batang tertinggi, artinya ekspresi GSH kelompok K1 (monosit + kopi 10% + DMBA) mempunyai kemampuan mengekspresikan GSH paling besar.



Gambar 1. Ekspresi GSH pada monosit dengan paparan kopi dan DMBA (warna coklat tua/panah) (KO. Monosit; K1. Monosit + kopi 10% + DMBA; K2. Monosit + KOPI 5% + DMBA; K3. Monosit + kopi 10; K4. Monosit + kopi 5%; K5. Monosit+ DMBA)

#### PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian di atas terlihat bahwa kopi dapat meningkatkan ekspresi GSH pada monosit. Hal ini diduga kopi akan ditangkap oleh reseptor monosit, kemudian akan mempengaruhi aktivitas protein transkripsi dalam sel. Protein-protein transkripsi akan menentukan atau mempengaruhi gen-gen pembentuk GSH. Peningkatan GSH oleh monosit juga terlihat pada paparan dengan DMBA. Hal ini menunjukkan bahwa kopi mampu meningkatkan aktivitas monosit dalam menghasilkan GSH ketika ada paparan bahan karsinogenik. Hal ini menunjukkan bahwa kopi dapat bermanfaat sebagai kemoprevensi. Kandungan dalam kopi yang diduga sebagai antioksidan antara lain polifenol, alkaloid. Kemampuan kopi untuk meningkatkan GSH dan aktivitas GST dalam hati tikus diamati oleh Abraham dan Singh. penulis ini menunjukkan bahwa konstituen kopi selain kafein bertanggung jawab atas ditandai efek anti - karsinogenik kopi , dan hasilnya menegaskan pentingnya kopi untuk pencegahan karsinogenesis lingkungan.<sup>11</sup> Peningkatan GSH diduga berkaitan dengan senyawa fenolik dalam kopi. Kemungkinan bahwa parameter fundamental, seperti konsentrasi GSH atau kegiatan GST, terkait dengan asupan kopi. Selain itu diduga kopi juga mengandung diterpenes bioaktif, menyebabkan peningkatan konsentrasi homosistein plasma. Sebuah sedikit peningkatan homosistein plasma juga disebabkan oleh jumlah besar kopi disaring. Terpen Kopi juga meningkatkan glutathione.

GSH telah diidentifikasi sebagai agen anti-inflamasi dalam sel. Ini adalah antioksidan alami tubuh kita. Tingkat GSH

tinggi bekerja untuk memerangi kerusakan oksidatif mencegah perkembangan peradangan lebih lanjut, dan rasa sakit yang dihasilkan. Sel akan diserang oleh tingginya tingkat stres oksidatif yang dihasilkan oleh suatu penyakit, maka diperlukan GSH untuk melawannya, yang dapat ditemukan dalam setiap sel. GSH dapat berfungsi memodulasi sistem kekebalan tubuh, memperlambat peradangan lebih lanjut dan meminimalkan efek samping dari obat penghilang rasa sakit. Dengan memodulasi sistem kekebalan tubuh, GSH memiliki peran tertentu dalam mengurangi efek inflamasi yang menyakitkan. GSH, merupakan protein kecil, dan bagian dari komponen penting dari sistem kekebalan tubuh kita. Ini diproduksi secara alami oleh sel-sel di seluruh tubuh kita, dan memainkan peran penting sebagai: antioksidan yang merupakan komponen paling penting dalam sistem kekebalan. Glutathione-S-transferase, ini merupakan katalis enzim, yang secara luar biasa dapat menangkap radikal bebas, Molekul glutathione memiliki cabang yang disebut bagian sulfhidril yang menyerap banyak elektrofil. Hal itu membuat mereka diam memiliki kemampuan serap yang besar. Kopi memiliki antioksidan yang sangat tinggi aktivitasnya. Aktivitas antioksidan ini diduga disebabkan melanoidins dan senyawa fenolik, yang mungkin bertanggung jawab untuk dan efek anti - mutagenik, anti - genotoksik coffee. Melanoidins, yang terbentuk melalui reaksi Maillard antara protein dan karbohidrat, sebagian besar hadir dalam kopi dan merupakan komponen utama minuman kopi ( hingga 30 % dari bahan kering ). Ini memiliki polisakarida yang berfungsi sebagai pembawa untuk beberapa kelompok komponen kimia bioaktif yang potensia ,

seperti cincin fenolik, reductones dan radicals. GSH dalam sel bertindak sebagai inhibitor dari carcinogenesis.<sup>11</sup>

Kesimpulan dari penelitian ini adalah kopi dapat meningkatkan ekspresi GSH pada monosit yang dipapar DMBA.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ashihara H. Metabolism of Alkaloids in Coffee Plants. *Braz J Plant Physiol.* 2006, 18 (1):1-12.
- Simanihuruk K. dan Sirait J. Silase Kulit Buah Kopi Sebagai Pakan Dasar Pada Kambing Boerka Sedang Tumbuh (Coffee Pulp Silages as Basal Feed for Boerka Goats on Growth Phase). *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.* 2010.
- Naziq A. 12 Manfaat Kopi bagi Kesehatan. 8 Juli 2012.
- Henry C.A. Green Coffee Extract Has Health Benefits. *Science & Technology Concentrate.* 2013, 91(15): 20-21.
- Namboodiripad P dan Srividya K. Can Coffee Prevent Caries ? - An In-Vitro Study. *The Internet Journal of Dental Science.* 2009, 7 (2): 1-6.
- Scalbert A. dan Gary W. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *J. Nutr.* 2000, 130 (8) : 2073S-2085S
- Natella F., Nardini M., Belelli F., Pignatelli P., Di Santo S., Ghiselli A., Violi F., Scaccini C. Effect of Coffee Drinking on Platelets: Inhibition of Aggregation and Phenols Incorporation. *Br J Nutr.* 2008, 100 (6) : 1276-82.
- Coralie J.D., Agnès C.M.B., Claire S.O., Fabrice M.G.D., Marie N.M. Coffee Antioxidant Properties: Effects of Milk Addition and Processing Conditions. *Journal of Food Science.* 2006, 71(Issue 3) : S253-S258.
- Bakuradze T., Boehm N., Janzowski C., Lang R., Hofmann T., Stockis J.P., Albert F.W., Stiebitz H., Bytof G., Lantz I., Baum M., Eisenbrand G. Antioxidant-rich Coffee Reduces DNA Damage, Elevates Glutathione Status and Contributes to Weight Control: Results from An Intervention Study. *Mol Nutr Food Res.* 2011, 55(5): 793-800.
- Nosálová G., Prisenžňáková L., Paulovičová E., Capek P., Matulová M., Avarinic L., Liveranic F.S. Antitussive and Immunomodulating Activities of Instant Coffee Arabinogalactan-Protein. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011, 49(4): 493-497.
- Esposito F., Morisco F., Verde V., Ritieni A., Alezio A., Caporaso N., Fogliano V. Moderate Coffee Consumption Increases Plasma Glutathione but not Homocysteine in Healthy Subjects. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003, 17(4) : 595-601.
- Moss G. Is coffee an antioxidant ?. <https://www.bellaonline.com/article/art42426.asp>. 12 Januari 2014.
- Anonim. Coffee as Antioxidant Source. <https://www.manbir-online.com>. 12 Januari 2014.
- Simon S. Study: Coffee May Reduce Risk of Oral Cancer. <https://www.cancer.org/latest-news/study-coffee-may-reduce-risk-of-oral-cancer.html>. 12 Januari 2014.
- Hanachi P., Fauziah O., Peng L.T., Wei L.C., Nam L.L., Tian T.S. The effect of *Azadirachta indica* on distribution of antioxidant elements and glutathione S-transferase activity in liver of rats during hepatocarcinogenesis. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004, 13(Supply): S170.
- Mukherjee P.K., Maiti K., Mukherjee K. dan Houghton P.J. Leads from Indian Medicinal Plants with Hypoglycemic Potentials. *Journal of Ethnopharmacology.* 2006, 106 : 1-28.
- Halliwell B. dan Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press Inc. New York. 1999. 146-150.