RESPONS HORMONAL- IMUNITAS WANITA PREMENOPAUSE YANG DIINTERVENSI MINUMAN FUNGSIONAL BERBASIS SUSU SKIM YANG DISUPLEMENTASI DENGAN 100 mg ISOFLAVON KEDELAI DAN 8 mg Zn-sulfat (SUSUMENO)

[Hormone- Immunity Response of Premenopausal Women Intervened with Skim Milk Based Functional Drink Supplemented with 100 mg Soy Isoflavone and 8 mg Zn-sulfate (Susumeno)]

H. Winarsi [1], D. Muchtadi [2], F.R. Zakaria [2], dan B. Purwantara [3]

[1] Staf Pengajar Fak. Biologi UNSOED Purwokerto, Jl. Dr. Soeparno Karangwangkal, Purwokerto 53123
[2] Staf Pengajar Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, FATETA-IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor 16002
[3] Staf Pengajar Departemen Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan-IPB, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor

Diterima 20 November 2003 / Disetujui 28 April 2004

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the effect of intervention of skim milk based functional drink supplemented with 100 mg of soy isoflavone and 8 mg of Zn-sulfate (susumeno) on serum estradiol and thymulin hormones levels of premenopausal women. After 2 month of intervention, the estradiol levels did not change, and the levels were in the range of 39,16 – 41,99 pg/ml. However the thymulin hormone levels increased significantly from 2,37 μg/ml to 3,31 μg/ml. Increase in thymulin levels shows that the disfunction of immune sistem of premenopausal could be improved by the functional drink.

Key words : *Estradiol, thymulin, soy isoflavone, Zn, premenopausal women*

PENDAHULUAN

Premenopause merupakan suatu keadaan fisiologis wanita yang telah memasuki proses penuaan, yang ditandai dengan menurunnya produksi hormon estrogen ovarium (Speroff et al., 1999). Pada keadaan kekurangan estrogen sering timbul berbagai sindrom yang sangat mengganggu aktivitas kehidupan para wanita, yang disebut sindrom menopause (Patten et al., 2002; Baziad, 2002). Sindrom menopause melanda banyak wanita yang sedang memasuki premenopause hampir di seluruh dunia, misalnya kejadian *hot flushes* dialami oleh 70-80% wanita menopause di Eropa, 60% di Amerika, 57% di Malaysia, 18% di China, dan 10% di Jepang (Umpalis et al., 2000; Washburn et al., 1999). Sirkulasi hormon estrogen (estradiol) berfluktuasi dari 40 hingga 200-400 pg/ml, tetapi akan menurun hingga di bawah 20 pg/ml setelah menopause (Jones, 1992; DPC, 2002).

Sistem immunitas pada wanita premenopause juga menurun, sebagai akibat kelenjar timus mengalami atrofi karena usia (Subowo, 1993). Sistem imunitas yang terganggu terutama yang diperantarai limfosit T, termasuk berkurangnya limfosit T dan disfungsinya sel Th (Cakman et al., 1996). Timus merupakan organ utama sistem imunitas, karena potensinya mensekresikan senyawa peptida timus yang bersifat hormonal, yaitu Timulin. Timulin dilaporkan dapat meningkatkan kematangan sel-sel prekursor menjadi sel T immunokompeten (McDade et al., 2001). Namun seiring dengan meningkatnya umur wanita, kelenjar timus mengalami atrofi secara bertahap, sehingga sekresi hormon juga menurun (McDade et al., 2001; Subowo, 1993).

Meydani et al., (1995) menyatakan bahwa dengan meningkatnya usia, pembentukan radikal bebas juga meningkat. Radikal bebas merupakan senyawa donor elektron dimana elektron terluarnya tidak berpasangan. Reaktifitasnya sangat tinggi untuk berpasangan dengan molekul penting dalam tubuh seperti lipida, protein maupun asam nukleat, sebagai akibatnya integrasi sel akan terganggu. Kerusakan sel akibat reaktivitas senyawa radikal mengawali timbulnya berbagai penyakit degeneratif seperti, kanker, infeksi, penyakit jantung koroner, rematik, penyakit respiratorik, katarak, hati dan penuaan (aging) (Meydani, 2000).

Isoflavon kedelai, diketahui bersifat antioksidatif karena mampu meredam aktivitas radikal bebas, dengan cara mengikat dan mencegah amplifikasinya (Kameoka et al., 1999). Kemiripan struktur isoflavon kedelai dengan estrogen endogen, mengakibatkan isoflavon dapat terikat oleh reseptor estrogen yang ada dalam jaringan reproduksi wanita, kemudian mengendalikan aktivitas estrogen secara agonis maupun antagonis (Brzozowski et al., 1997).

Integritas sel dapat dipertahankan oleh Zn, karena Zn diketahui berperan dalam maturasi dan diferensiasi limfosit T (Driessen et al., 1994), serta menginduksi aktivitas biologis hormon kelenjar timus (Dardenne et al., 1982). Defisiensi seng menyebabkan atrofi timus, melemahkan sensitifitas kulit yang diperantarai sel dan limfopenia, menurunkan respon antibodi primer dan sekunder, khususnya terhadap antigen yang memerlukan peran sel Th. Defisiensi Zn dicirikan oleh menurunnya aktivitas timulin dan melemahnya respons limfosit terhadap fitohemaglutinin dan fungsi netrofil (Chandra, 1980).

"Susumeno" merupakan minuman fungsional berbasis susu skim yang disuplementasi dengan 100 mg isoflavon kedelai dan 8 mg Zn, diberikan kepada wanita premenopause untuk memperbaiki respons hormonalnya.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh minuman fungsional berbahan dasar susu skim yang disuplementasi dengan isoflavon kedelai dan Zn terhadap perubahan kadar hormon estrogen dan timulin wanita premenopause.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan adalah susu skim (Indomilk), tepung kedelai dengan kandungan 10% isoflavon yang diperoleh dari SoyLife Extra ORFFA BELGIUM NV, Ambachtsstraat 6-B-1840 LONDERZEEL, Zn sulfat (Merck), aspartam, sukrosa, dan bubuk coklat.

Bahan kimia yang digunakan adalah asam fosfat, KH_2PO_4, $NaH_2PO_4.2H_2O$, H_2O_2, NaCl, Na_2HPO_4, *monoclonal anti human IgG alkaline phosphatase conjugate*, 4-nitrophenil fosfat, BSA (Bovine Serum Albumin), Na_2CO_3, $NaHCO_3$, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4, NaN_3, dietanolamin, serta *estradiol kits.*

Peralatan untuk sampling, separasi darah dan analisis adalah sarung tangan, venoject plain, tabung falcon (Conikle), tabung eppendorf, blue tip, yellow tip, freezer suhu -80°C, timbangan, microplate, vortex, ELISA reader, mikropipet single & multichanel, timer, gamma counter dan alat-alat gelas.

Metode Penelitian

Responden wanita premenopause terpilih harus memenuhi persyaratan, yaitu umur di atas 40 tahun; siklus haid rutin setiap bulan (tanpa melihat panjang pendeknya siklus maupun volume darah haid); merasakan adanya sindrom menopause; tidak menggunakan KB hormonal setahun terakhir; sehat menurut hasil pemeriksaan dokter, sukarela mengikuti jalannya penelitian, serta bersedia menandatangani *informed consent*.

Jumlah responden 33 orang, dibagi secara acak ke dalam tiga kelompok yaitu SS (kelompok kontrol yang diberi minuman susu skim tanpa isoflavon maupun Zn); SI (kelompok yang diberi minuman susu skim mengandung isoflavon); SIZ (kelompok yang diberi minuman susu skim mengandung isoflavon dan Zn). Intervensi dengan dosis 20 g atau 1 sachet/orang/hari, selama 2 bulan. Selama intervensi dilakukan pemantauan dan *recall* konsumsi pangan. Pengambilan sampel darah dilakukan tiga kali, yaitu pada *baseline* (sebelum diintervensi), serta 1 bulan dan 2 bulan setelah diintervensi. Pengambilan darah menggunakan *venoject plain*, secara intravena.

Isolasi serum

Darah dalam tabung venoject plain diambil serumnya dengan cara di sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 20 menit. Bagian atas adalah serum, dipisahkan dari bagian bawah (eritrosit), lalu disimpan ke dalam freezer suhu –80°C sampai dilakukan analisis (Castenmiller et al., 1999). Selanjutnya terhadap sampel serum dilakukan analisis hormon estradiol dan hormon timulin.

Analisis kadar hormon estradiol dengan metode RIA (Radioimmunoassay)

Ke dalam tabung NSB (Non Specific Binding) diisikan 100 μl kalibrator zero A, demikian pula ke dalam tabung standard B-G. Kemudian dimasukkan pula 100 μl sampel ke dalam tabung sampel dan kontrol. Selanjutnya ke dalam semua tabung ditambahkan 1 ml ^{25}I-estradiol, demikian pula kedalam tabung *tracer*. Semua tabung diaduk menggunakan *vortex*, lalu diinkubasi selama 3 jam pada suhu kamar. Dilanjutkan dengan dekantasi, dan pembacaan dengan gamma counter (DPC, 2002).

Analisis kadar hormon timulin dengan metode ELISA

Lempeng mikroplate diisi (*coated*) dengan anti H timulin 1 μg/ml, sebanyak 100 μl/*well*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Lalu dipersiapkan *buffer blocking*, yaitu larutan BSA 1% dalam bufer PBS I. Lempeng mikroplate diangkat dari inkubator, lalu dilakukan pencucian 3 kali menggunakan *buffer washing* sebanyak 200 µl/*well*. Kemudian mikroplate diisi dengan *buffer blocking* sebanyak 200 µl/*well*, dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

Langkah selanjutnya adalah mempersiapkan antibodi primer, yaitu serum responden yang telah diencerkan sebanyak 100 µl/*well*, dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Sementara menunggu waktu inkubasi, dipersiapkan *buffer conjugate* sebagai antibodi sekunder, yaitu larutan BSA 1% dalam bufer inkubasi di tambah IgG yang berkonjugasi alkalin fosfatase (1:3000). Mikroplate diangkat lalu dicuci 3 kali, kemudian diisi dengan antibodi sekunder sebanyak 150 µl/*well* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

Dipersiapkan substrat 0,01% 4-nitrophenilfosfat dalam bufer substrat. Mikroplate diangkat dan dicuci 3 kali, kemudian diisi substrat sebanyak 150 µl/*well*, dan diinkubasi selama 30 menit, dilanjutkan dengan pembacaan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm (Winarsi et al., 2003).

Analisa statistik

Data yang diperoleh dianalisis sidik ragam menggunakan mikrosoft excel. Bila setiap perlakuan signifikan dilanjutkan uji Duncan, untuk mengetahui perlakuan yang terbaik (Steel & Torrie, 1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Minuman fungsional berbasis susu skim yang disuplementasi dengan isoflavon kedelai dan Zn, memiliki sifat larut dalam air, dengan tingkat kesukaan antara biasa hingga suka dalam hal warna, aroma dan rasa, dalam formula kering maupun formula seduhan. Sebagai panelis dalam uji kesukaan adalah ibu-ibu berusia di atas 40 tahun (Winarsi et al., 2003).

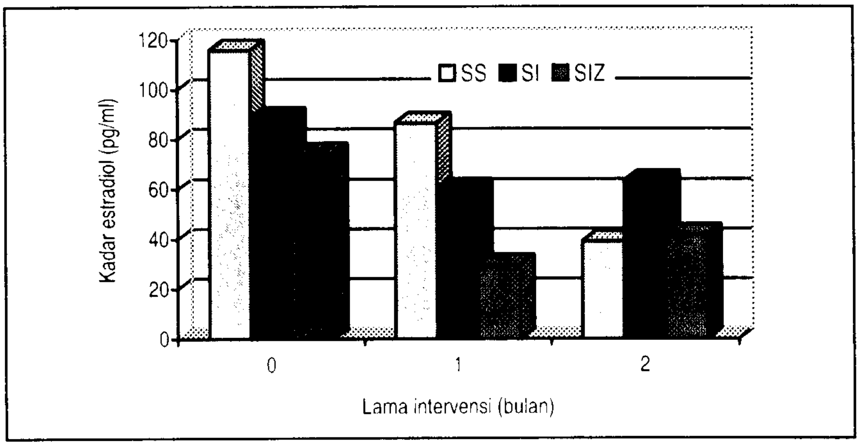
Kadar hormon estradiol (estrogen)

Hasil analisis sidik ragam antar kelompok SS, SI, dan SIZ juga tidak menunjukkan perbedaan pada saat baseline (p= 0,570) demikian pula setelah 1 bulan (p= 0,782) dan 2 bulan intervensi tidak menunjukkan perbedaan nyata (p= 0,31).

Kadar estradiol responden pada saat *baseline* berkisar antara 74,38-115,93 pg/ml, merupakan kadar kisaran normal rendah, mengingat kadar normal estradiol wanita dalam kisaran 40-400 pg/ml (Jones, 1992). Setelah 2 bulan intervensi, kadar estradiol cenderung menurun, sehingga kadarnya berkisar antara 39,16 - 63,53 pg/ml, yang juga merupakan kadar kisaran normal rendah (Gambar 1).

Hasil penelitian ini mendukung temuan Persky et al., (2002) yang memberikan suplementasi isoflavon kedelai sebanyak 56 mg/hari dan 90 mg/hari selama 6 bulan kepada 73 wanita postmenopause, tidak mengubah kadar estrogen endogen. Pemberian isoflavon sebanyak 45 mg/hari terhadap 84 pasien premenopause selama 14 hari, juga tidak mengakibatkan perubahan pada estrogen maupun progesteron (Hargreaves et al., 1999). Akan tetapi Nagata et al., (1998) berpendapat bahwa dengan mengkonsumsi susu kedelai, ternyata mampu menurunkan kadar estradiol serum wanita premenopause di Jepang.

Lu et al., (1996) juga melaporkan bahwa kadar estradiol serum menurun setelah mengkonsumsi kedelai selama 1 bulan, dan terjadi penurunan resiko kanker payudara. Selain kadar estradiol, kolesterol, progesteron*)* dan DHEAS (Dehydroepiandrosterone Sulfate) menurun, juga terjadi penekanan siklus pertengahan (*midcycle* hormon FSH dan LH, akan tetapi estradiol fase folikuler dan lamanya siklus menstruasi meningkat, setelah mengkonsumsi kedelai selama 1 bulan (Cassidy et al., 1995; Lu et al., 1996). Xu et al., (1998)



Keterangan: SS = susu tanpa isoflavon dan Zn
SI = susu mengandung isoflavon kedelai
SIZ = susu mengandung isoflavon kedelai dan Zn

Gambar 1. Pengaruh pemberian minuman fungsional berbasis susu skim terhada p kadar estradiol serum responden dan Duncan et al., (1999) juga melaporkan bahwa kadar estrogen urin,estron T3 bebas, dan DHEAS menurun secara nyata pada wanita premenopause setelah diberi isolat protein kedelai yang mengandung 129 mg isoflavon setiap hari selama 3 bulan, sementara pada kelompok wanita yang mengkonsumsi isoflavon 10 mg/hari, kadar estrogennya tidak berubah.

Isoflavon bersifat estrogenik, yang didukung oleh struktur molekulnya yang mirip dengan estrogen endogen, maka senyawa tersebut dapat berikatan dengan reseptor estrogen, dan bersifat agonis ketika kadar estrogen rendah, sebaliknya bersifat antagonis ketika kadar estrogen tinggi (Brzozowski et al., 1997). Di sisi lain, dengan terjadinya kompleks ligand antara isoflavon dan reseptor estrogen tersebut, maka isoflavon mampu menggantikan fungsi estrogen endogen. Masih banyak pendapat kontroversial berkaitan dengan pengaruh isoflavon kedelai terhadap hormon estrogen. Temuan Petrakis et al., (1996) dan Kurzer (2000) menunjukkan bahwa dengan mengkonsumsi kedelai, secara umum mampu meningkatkan kadar estrogen plasma dan menguntungkan kesehatan wanita premenopause maupun pascamenopause. Kadar SHBG (Sex hormone binding globulin) wanita pascamenopause juga meningkat setelah mengkonsumsi isolat protein kedelai yang mengandung isoflavon sebanyak 34-165 mg per hari (Brzezinski et al., 1997). Kim et al., (1998) berpendapat bahwa implikasi klinis isoflavon sangat tergantung pada jumlah reseptor, letak reseptor, dan konsentrasi estrogen endogen yang mampu bersaing.

Mengingat kadar estradiol responden masih dalam kisaran normal, meskipun dalam tingkatan rendah, diduga jumlah reseptor estrogen masih mencukupi untuk berikatan dengan estrogen endogen, oleh sebab itu ada kemungkinan potensi isoflavon dalam berkompetisi dengan estrogen endogen untuk berikatan dengan reseptor estrogen tidak optimal. Dugaan tersebut mengakibatkan isoflavon tidak mampu menunjukkan potensi agonisnya terhadap kadar estrogen endogen (Brzozowski et al., 1997), sehingga kadar estrogen tetap tidak berubah. Tidak adanya perubahan yang nyata pada kadar estradiol, diduga karena intervensi kurang lama, bila dibandingkan dengan hasil penelitian Xu et al., (1998) dan Duncan et al.. (1999), yang dilakukan selama 3 bulan.

Peran Zn terhadap produksi estradiol wanita premenopause secara langsung belum diketahui secara jelas, akan tetapi diduga perannya secara seluler mempertahankan integritas sel-sel dalam reseptor estrogen ovarium (Cakman et al., 1996; Sandstead et al., 1982; Berger dan Skinner, 1974; Ruhl dan Kirchner, 1978; Rink dan Kirchner, 2000).

Tampak disini bahwa dengan mengkonsumsi minuman fungsional berbasis susu skim yang disuplementasi dengan isoflavon kedelai 100 mg/hari/orang dan Zn sulfat 8 mg/hari/orang selama 2 bulan, tidak berpengaruh pada kadar estradiol, tetapi bila dilihat adanya kecenderungan penurunan kadar estradiol baseline hingga 2 bulan setelah intervensi, juga didukung oleh adanya penurunan nyata sindrom menopause *dryness vaginal*, penurunan daya ingat, *fatigue* dan *dyspareunia* (Winarsi et al.,2003[c]) maka kemungkinan isoflavon tidak meningkatkan kadar estrogen tetapi meningkatkan fungsi estrogen pada wanita premenopause.

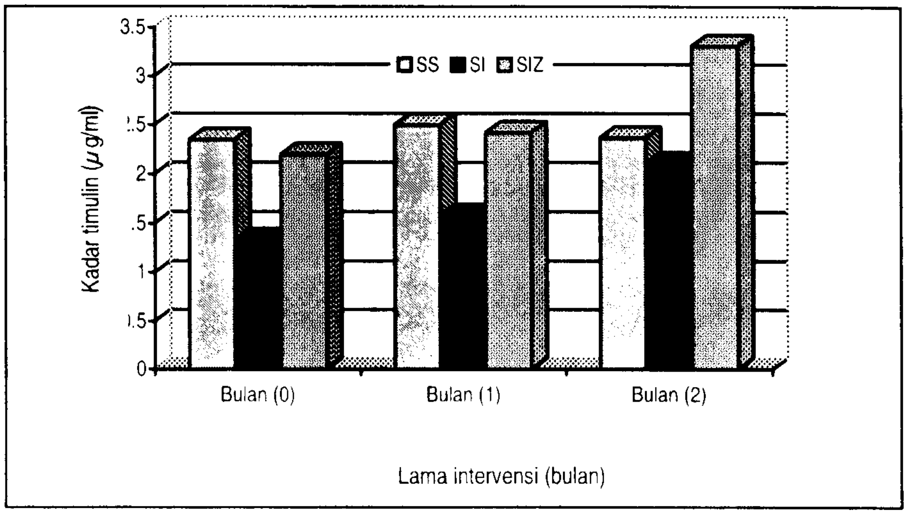
Kadar hormon timulin serum

Kadar timulin responden pada saat *baseline* berkisar antara 1,33 - 2,35 μg/ml. Sampai saat ini belum ada laporan tentang status timulin pada wanita, karena pada umumnya, peneliti mengukur timulin dengan pendekatan kadar Zn serum atau jumlah sel CD_4^+. Oleh sebab itu status timulin responden saat baseline tidak bisa disimpulkan, namun setelah 2 bulan intervensi kadar hormon tersebut mengalami peningkatan (Gambar 2).

Peningkatan tertinggi dicapai pada kelompok yang mendapat minuman fungsional dengan suplementasi isoflavon dan Zn, yaitu dari 2,11 menjadi 3,31 μg/ml. Hal ini membuktikan bahwa suplementasi isoflavon tunggal tidak mempengaruhi peningkatan kadar timulin, tetapi pemberian isoflavon dan Zn secara bersamaan, berpengaruh nyata (p=0.025) pada peningkatan kadar timulin wanita premenopause.

Hasil penelitian ini mendukung temuan Mocchegiani et al., (1995) bahwa aktivitas timulin yang berikatan dengan Zn (ZnFTS) juga meningkat, setelah dilakukan suplementasi Zn-sulfat pada penderita AIDS stadium III dan IV selama 24 bulan, yang ditunjukkan oleh meningkatnya jumlah sel CD_4^+. Suplementasi Zn dosis rendah (20 mg/hari) selama 16 minggu pada 44 orang tua, juga terbukti nyata dalam restorasi aktivitas timulin serum (Boulkaiba et al., 1993).

Peran Zn dalam perkembangan dan fungsi populasi sel limfoid menunjukkan bahwa Zn sangat dominan pada limfosit T intra maupun ekstra timus. Ketergantungan aktivitas timulin terhadap Zn juga dilaporkan oleh Prasad et al., (1988) bahwa aktivitas hormon tersebut menurun ketika tubuh mengalami defisiensi Zn. Kadar timulin juga menurun pada pasien leukemia limfoblastik akut akibat defisiensi Zn dalam plasmanya (Mocchegiani et al., 1994). Aktivitas hormon timus tertinggi dilaporkan Lewis et al,. (1978), terjadi pada usia 15-30 tahun, yaitu sebesar 15,3 ng/ml plasma sebagai hormon timopoietin, dan akan menurun seiring dengan meningkatnya usia. Peran isoflavon di tingkat seluler secara langsung adalah meningkatkan aktivitas antioksidan (Rohrdranz et al., 2002; Winarsi et al., 2003[a]).



Keterangan:
SS = susu tanpa isoflavon dan Zn
SI = susu mengandung isoflavon kedelai
SIZ = susu mengandung isoflavon kedelai dan Zn.

Gambar 2. Pengaruh pemberian minuman fungsional berbasis susu skim terhadap kadar timulin serum responden.

Dengan meningkatnya aktivitas timulin, membuktikan bahwa gangguan sistem imun pada usia lanjut sebagai akibat atrofi kelenjar timus, dapat diperbaiki dengan minuman fungsional berbasis susu skim yang disuplementasi dengan isoflavon kedelai dan Zn. Peningkatan aktivitas timulin tersebut berkorelasi positif dengan status antioksidan seluler (Winarsi et al., 2003[a]) dan sistem imunitas humoral (Winarsi et al., 2003[b]) wanita premenopause. Oleh sebab itu dapat dikatakan bahwa minuman fungsional berbasis susu skim yang disuplementasi dengan isoflavon kedelai dan Zn, bersifat imunopotensial bagi wanita premenopause.

Dengan meningkatnya kadar timulin, maka status imun wanita premenopause dapat diperbaiki, sehingga dengan mengkonsumsi minuman fungsional ini para wanita dapat menikmati hari tua, yang ditunjukkan oleh adanya sistem kekebalan yang prima.

KESIMPULAN

Pemberian minuman fungsional berbasis susu skim yang disuplementasi isoflavon kedelai sebanyak 100 mg/hari dan Zn sulfat 8 mg/hari, selama 2 bulan, kepada para wanita premenopause, secara nyata meningkatkan kadar timulin dan fungsi estrogen endogen, tetapi tidak berpengaruh pada kadar estrogen.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterima kasih kepada Ditbinlitabmas Dirjen Dikti atas pendanaan penelitian melalui proyek Hibah Bersaing XI/1 dan XI/2 tahun anggaran 2003-2004.

DAFTAR PUSTAKA

Baziad A. 2002. Estrogen dan progesterone: Dari biomolekuler menuju aplikasi klinik. Didalam: Meet the Expert. Temu Ilmiah Tahunan K-FER; Bandung; 2-6 Okt 2002.

Berger, N.A. and Skinner, M. 1974. Characterization of lymphocyte transformation induced by Zinc ions. J. Cell. Biol. 61: 45-55.

Boulkaiba, N., Flament, C., Acher, S., Chappuis, P., Piau, A., Fusselier, M., Dardenne, M. and Lemonnier, D. 1993. A Physiological amount of Zinc supplementation: Effects on nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. Am. J. Clin. Nutr. 57: 566-572.

Brzezinski, A., Adlercreutz, H., Shaoul, R., Rosler, A., Shmueli, A., Tanos, V. and Schenker, J.G. 1997. Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. Menopause. 4: 89-94.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, R., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustaffson, J.A. and Carlquist, M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. Nature (Lond).389: 753-758.

Cakman, I., Rohwer,J., Schutz, R.M., Kirchner, H. and Rink, L. 1996. Dysregulation between TH-1 and TH-2 T-cell subpopulations in the elderly. Mechan. Aging Dev. 87: 197-209.

Chandra, R.K.1980. Acrodermatitis enteropathica: Zinc levels and cell-mediated immunity. Pediatrics. 66:789-791.

DPC. 2002. Coat-A-Count Estradiol. Diagnostic Products Corporation 5700 West 96th Street. Los Angeles, CA. USA. 90045-5597.

Dardenne, M., Pleau, J.M., Nabbara, B., Lefrancier, P., Derrien, M., Choay, J. and Bach, J.F. 1982. Contribution of Zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 5370-5373.

Driessen, C., Hirv, K., Rink, L. and Kirchner, H. 1994. Induction of cytokines by Zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. Lympokine Cytokine Res. 13: 15-20.

Duncan, A. M., Merz, B. E., Xu, X., Nagel, T. C., Phipps, W. R. and Kurzer, M. S. 1999. Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84:192-197.

Hargreaves, D. F., Potten, C. S., Harding, C., Shaw, L. E., Morton, M. S., Roberts, S. A., Howell, A. and Bundred, N. J. 1999. Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. J. Clin. Endocrinol. and Metab. 84:4017-4024.[Abstract].

Jones, K.P. 1992. Estrogens and Progestins: what to use and how to use it. Clin Obstet Gynecol 32:871-873.

Kameoka, S., Leavitt, P., Chang, C. and Kuo, S.M. 1999. Expression of antioxidant proteins in human intestinal caco-2 cells treated with dietary flavonoids. Cancer Lett. 146:161-167.

Kim, H., Peterson, T.G. and Barnes, S. 1998. Mechanism of action of the soy isoflavone genistein: Emerging role of its effects through transforming growth factor beta signaling. Am. J. Clin. Nutr. 68 Suppl: 1418S-1425S.

Kurzer, M.S. 2000. Hormonal effects of soy isoflavones studies in premenopausal and postmenopausal women. J. Nutr. 130 Suppl: 660S-661S.

Lewis, V.M., Twomey, J.J., Bealmear, P., Goldstein, G. and Good, R.A. 1978. Age, thymic involution, and circulating thymic hormone activity. J. Clin. Endocrinol. 47: 145-150. [Abstract].

Lu, L.J.W., Anderson, K.E., Grady, J.J. and Nagamani, M. 1996. Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: Implications for a breast cancer risk reduction. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 5: 63-70.[Abstract].

McDade, T.W., Beck, M.A., Kuzawa, C.W. and Adair, L.S. 2001. Prenatal under nutrition and postnatal growth are associated with adolescent thymic function. J Nutr. 131:1225 -1231.

Meydani, S.N., Wu, D., Santos, M.S. and Hayek, M.G. 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: Overview of present evidence. Am. J. Clin. Nutr. 62 (6 Suppl): 1462S.

Meydani, M. 2000. Effect of Functional Food Ingredients: Vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. Am. J. Clin. Nutr. 71 (6 Suppl):1665S.

Mocchegiani, E., Paolucci, P., Granchi,D., Cavallazi,L., Santarelli, L. and Fabris, N. 1994. Plasma Zinc level and thymic hormone activity in young cancer patients. Blood. 83: 749-757.[Abstract].

Mocchegiani, E., Veccia, S., Ancarani, F., Scalise, G. and Fabris, N.1995. Benefit of oral Zinc supplementation as an adjunct to Zidovudine (AZT) therapy against opportunistic infections in AIDS. Int. J. Immunopharmacol. 17(9): 719-727.[Abstract].

Nagata C, Takatsuka N, Inaba S, Kawakami N. and Shimizu H. 1998. Effect of soymilk consumption on serum estrogen concentrations in premenopausal Japanese women. J. Natl. Cancer Inst. 90:1830–1835.

Patten, C.L.V., Oliotto,I.A., Chambers, G.K., Gelmon, K.A., Hislop, T.G., Templeton,E., Wattie,A. and Prior,J.C. 2002. Effect of soy phytoestrogens of hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: A randomized, controlled clinical trial. J. Clin. Oncol. 20 (6):1449-1455.

Persky, V.W., Mary, E.T., Ling, W.S.F., Robert, C.Jr., Stephen, B. John, E., Daniel, W.S., Leon, B.H. and Susan, P.2002. Effect of soy protein on endogenous hormones in postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 75(1): 145-153.

Petrakis, N. L., Barnes, S., King, E. B., Lowenstein, J., Wiencke, J., Lee, M. M., Miike, R., Kirk, M. and Coward, L. 1996. Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmenopausal women. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 5:785-794.[Abstract].

Prasad, A.S., Meftah, S., Abdallah, J., Kaplan, J., Brewer, G.J., Bach, J.F.and Dardenne, M. 1988. Serum thymulin in human Zinc deficiency. J. Clin. Invest. 82: 1202-1210.[Abstract].

Rink, L. and Kirchner, H. 2000. Zinc-altered immune function and cytokine production. J. Nutr. 130 Suppl:1407S-1411S.

Rohrdanz, E., Sandra, O., Quynh-Hoa, T. and Regine, K. 2002. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme sistem of rat Hepatoma H4IIE cells. J. Nutr. 132:370-375.

Ruhl, H. and Kirchner, H. 1978. Monocyte dependent stimulation of human T-cells by Zinc. Clin. Exp. Immunol. 32: 484-488.

Sandstaed, H.H., Henriksen, L.K., Greger, J.L., Prasad, A.S. and Good, R.A. 1982. Zinc nutriture in the elderly in relation to taste acuity, immune response and wound healing. Am. J. Clin. Nutr. 36:1046-1059.

Speroff, L., Glass, R.H. and Kase, N.G. 1999. Clinical Gynecological Endocrinology and Infertility 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 643-707.

Steel, R.G. and Torrie, J.H. 1989. Principle and Procedure of Statistic. Second Ed. Mc. Graw Hill. Inc.

Subowo, 1993. Imunologi Klinik. Angkasa. Bandung. pp265.

Umpalis, D.H., Lobo, R. and Bradley, L. 2000. Vasomotor symptom relief of soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women: A multicenter, double blind, randomized, placebo-controlled study. Menopause. 7:236-242.

Washburn, S., Burke, G.L., Morgan, T, and Anthony, M. 1999. Effect of soy protein supplementation on serum lipoprotein, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. Menopause. 6:7-13.

Winarsi, H., Muchtadi, D., Zakaria, FR. dan Purwanto, A. 2003. Formulasi Minuman Fungsional Berbasis Susu sapi (skim) yang Disuplementasi Isoflavon Kedelai dan Difortifikasi Zn, serta Pengukuran Respons Immun baseline Wanita Premenopause. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI/1. Fakultas Biologi Unsoed. Purwokerto.

Winarsi, H., Muchtadi, D., Zakaria, FR. dan Purwantara, B. 2003a. Status antioksidan wanita premenopause yang diberi minuman suplemen susumeno. Prosiding Seminar Nasional PATPI. Yogyakarta, 22-23 Juli.

Winarsi, H., Muchtadi, D., Purwantara, B. and Zakaria, FR. 2003b. Lymphocyte cell antioxidant enzyme status and immunoglobulin responses in premenopausal women receiving isoflavone and Zn enriched milk. Seminar Micronutrients: Molecular Basis of Health and Disease. Malaysian Borneo, July 17-20.

Winarsi, H., Muchtadi, D., Zakaria, FR., dan Purwantara, B. 2003c. Perbaikan Sindrom Menopause dengan Pemberian "SUSUMENO" (Susu Skim yang Disuplementasi Tepung Kedelai Kaya Isoflavon dan Zn). International Seminar Functional Foods and Nutraceuticals Based on Marine Products. Bogor, 23 Agustus.

Xu, X., Duncan, A. M., Merz, B. E. and Kurzer, M. S. 1998. Effects of soy isoflavone consumption on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7:1101-1108.[Abstract].