

Efek minuman coklat (*Theobroma cacao L.*) terhadap peningkatan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin tikus putih anemia

Arisanty Nur Setia Restuti*, Adhiningsih Yulianti, Dewi Lindawati

ABSTRACT

Background : Anemia is a condition when the body do not have enough healthy red blood cells. Laboratory sign of anemia is decreases of erythrocytes and haemoglobin (Hb) level. Anemia can be caused by deficiency of nutritional intake.

Objectives : The purpose of this study was to determine changes in the number of erythrocytes and Hb levels of anemia rats which were intervened with chocolate drinks.

Methods : The design of this study was an experiment with a pretest-posttest control group design. The samples in this research were 21 male wistar rats. Rats were induced by NaNO_2 25mg/gBB for 18 days, then followed by an intervention of chocolate drink 4.3ml / day for 14 days. The results will be tested using one way ANOVA test and paired T-Test.

Results : The results of this study showed that there were significant differences in the number of erythrocytes and Hb levels between groups before the intervention ($p = 0.00$) and ($p = 0.011$), so also after the intervention there is significant differences in the number of erythrocytes and Hb levels between groups ($p = 0.00$) and ($p = 0.01$). Paired T-Test results showed that there were significant differences in the number of erythrocytes and Hb levels before and after the study in the intervention group given chocolate drink ($p = 0.00$) and ($p = 0.02$).

Conclusion : Chocolate drinks have an effect on increasing the number of erythrocytes and Hb levels in anemia rats.

Keywords: anemia; chocolate; erythrocytes number; hemoglobin

ABSTRAK

Latar Belakang : Anemia lebih dikenal sebagai penyakit kurang darah yang ditandai dengan berkurangnya jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin (Hb) hingga dibawah normal. Anemia dapat disebabkan oleh defisiensi asupan gizi dari makanan.

Tujuan : Penelitian ini ingin mengetahui perubahan jumlah eritrosit dan kadar Hb tikus anemia yang diintervensi minuman coklat.

Metode : Desain penelitian ini adalah eksperimen dengan pretest-posttest control group design. Jumlah sampel yang digunakan yaitu 21 ekor tikus putih jantan galur wistar yang terdiri dari 3 kelompok. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok tikus normal, sedangkan kelompok kontrol positif adalah kelompok tikus anemia, sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok tikus anemia yang diintervensi minuman coklat 4,3ml/hari selama 14 hari. Induksi menggunakan NaNO_2 25mg/gBB selama 18 hari supaya tikus menjadi anemia. Hasil penelitian akan di uji beda antar kelompok menggunakan uji one way ANOVA sedangkan uji beda sebelum dan setelah perlakuan dalam kelompok menggunakan uji paired T-Test.

Hasil : Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan signifikan jumlah eritrosit dan kadar Hb antar kelompok perlakuan sebelum intervensi ($p=0,00$) dan ($p=0,011$) hal ini menunjukkan bahwa pada tikus yang diinduksi sudah mengalami anemia, begitu juga setelah intervensi ditemukan perbedaan yang signifikan jumlah eritrosit dan kadar Hb antar kelompok perlakuan ($p=0,00$) dan ($p=0,01$).

Hasil uji paired T- Test menunjukkan terdapat perbedaan signifikan jumlah eritrosit dan kadar Hb sebelum dan setelah penelitian pada kelompok perlakuan yang diberi intervensi minuman coklat ($p=0,00$) dan ($p=0,02$).

Kesimpulan : Minuman coklat berefek terhadap peningkatan jumlah eritrosit dan kadar Hb tikus anemia.

Kata kunci : anemia; coklat; jumlah eritrosit; hemoglobin

PENDAHULUAN

Anemia atau penyakit kurang darah ditandai dengan berkurangnya eritrosit hingga dibawah normal¹. Hemoglobin (Hb) merupakan komponen eritrosit dan protein konjugasi yang berfungsi untuk membawa oksigen ke seluruh jaringan tubuh². Anemia menyebabkan transportasi oksigen terganggu sehingga jaringan tubuh orang yang mengalami anemia akan mengalami kekurangan oksigen¹.

Penderita anemia zat besi diperkirakan mencapai 30%, dimana prevalensi tertinggi berada di negara berkembang seperti di Indonesia, India dan Malaysia. Prevalensi anemia adalah sekitar 8-44%, dengan prevalensi tertinggi pada laki-laki usia 85 tahun atau lebih³. Hasil studi lainnya dilaporkan bahwa prevalensi anemia pada laki-laki adalah 27-40% dan wanita adalah 16-21%⁴. Prevalensi anemia di Indonesia sendiri yaitu 21,7% dengan penderita anemia berumur 5-14 tahun sebesar 26,4% dan 18,4% penderita berumur 15-24

tahun⁵. Data Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2012 menyatakan bahwa prevalensi anemia pada balita sebesar 40,5%, ibu hamil sebesar 50,5%, ibu nifas sebesar 45,1%, remaja putri usia 10-18 tahun sebesar 57,1% dan usia 19-45 tahun sebesar 39,5%⁶.

Hemoglobin yang rendah menunjukkan terjadinya anemia. Anemia ditandai dengan gejala berupa tubuh cepat lelah, jantung berdebar, mual dan muntah, mata berkunang-kunang, rambut rontok, perubahan bentuk kuku, penurunan sistem imun, sering pingsan, sesak nafas, kulit terlihat pucat, kelopak mata tampak pucat, sakit kepala atau pusing. Kadar Hb dapat dipengaruhi oleh tersedianya oksigen pada tempat tinggal, misalnya Hb meningkat pada orang yang tinggal di tempat yang tinggi dari permukaan laut. Hb juga dipengaruhi oleh posisi pasien (berdiri, berbaring), dan variasi diurnal (tertinggi pagi hari)⁷. Anemia kronis dapat menyebabkan anoksia pada jaringan dan organ, sehingga dapat menghambat kerja organ dan produksi energi dari sel⁸. Flavonoid merupakan senyawa aktif polifenol yang berperan sebagai antioksidan, yang dapat meningkatkan eritropoiesis (proses pembentukan eritrosit) dalam sumsum tulang dan memiliki efek immunostimulan. Sifat antioksidan ini dapat menjaga haeme iron tetap dalam bentuk ferro yang berhubungan dengan produksi methemoglobin. Dengan adanya flavonoid saat terdapat bentuk ferryl Hb diperkirakan dapat mencegah setengah dari molekul oxyHb teroksidasi menjadi metHb. Sehingga hemoglobin tetap dapat menjalankan fungsinya untuk mengikat oksigen karena tetap terdapat dalam bentuk oxyHb⁴.

Cokelat (*Theobroma cacao L.*) berpotensi besar sebagai pemasok bahan antioksidan dengan kandungan total flavonoid 316,9 mg/l yang tersusun dari beberapa molekul fenol^{9,10,11}. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berperan sebagai antioksidan, yang di dalam sel darah dapat bertindak sebagai penampung radikal hidroksil dan superoksida sehingga melindungi lipid membran dan mencegah kerusakan sel darah merah¹². Penelitian tentang uji aktivitas senyawa flavonoid total dari *Gynura Segetum* (Lour) terhadap peningkatan eritrosit memberikan pengaruh nyata terhadap kenaikan eritrosit, hal tersebut diduga adanya kandungan senyawa flavonoid dari daun dewa¹². Penelitian lain mengenai pemberian biji *Garcinia kola* yang

mengandung bahan aktif flavonoid dapat meningkatkan kadar Hb, jumlah eritrosit serta hematokrit. Akan tetapi, studi tentang minuman cokelat (*Theobroma cacao L.*) dan kaitannya dengan anemia masih sangat terbatas di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek minuman cokelat terhadap jumlah eritrosit dan kadar Hb tikus putih (*Rattus norvegicus*) anemia¹³.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan rancangan *pretest-posttest control group design*. Penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai November 2018 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling*. Penelitian menggunakan 21 ekor tikus jantan, usia 2-3 bulan, dan berat badan 200-300 gram. Tikus terbagi dalam 3 kelompok tikus yaitu kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus normal yang diberi diet standart (pakan dan air), kelompok kontrol positif yaitu kelompok tikus anemia yang diberi diet *standart* (pakan dan air), dan kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus anemia yang diberi diet *standart* serta di intervensi dengan minuman cokelat sebanyak 4,3 ml/ekor selama 14 hari. Induksi anemia pada kelompok tikus kontrol positif dan kelompok perlakuan menggunakan sonde Natrium Nitrit (NaNO₂) sebanyak 25 mg/gBB selama 18 hari, hal ini dilakukan agar tikus menjadi anemia. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah jumlah eritrosit dan kadar Hb. Pengukuran jumlah eritrosit dan kadar Hb sebelum dan setelah intervensi dengan pengambilan darah melalui sinus orbitalis mata. Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-18 dan hari ke-32 tanpa puasa.

Data yang diperoleh di uji normalitas menggunakan *shapiro-wilk.*, Uji *one way ANOVA* dan *post hoc bonferroni* digunakan untuk menganalisis perbedaan antar kelompok sebelum dan sesudah perlakuan dan untuk menganalisis efek minuman cokelat terhadap perubahan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin antar kelompok. Uji *paired T-Test* digunakan untuk menganalisis perbedaan sebelum dan sesudah perlakuan. Analisis data dilakukan dengan *SPSS Statistics* versi 22. Penelitian ini sudah mendapatkan

persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Politeknik Negeri Jember dengan No 8770/PL17/LL/2018 tanggal 24 Juli 2018.

HASIL

Jumlah eritrosit dan kadar Hb (*pre test*) setelah pemberian NaNO₂ selama 18 hari menunjukkan penurunan pada kelompok kontrol positif dan perlakuan dibandingkan kontrol negatif. Hasil uji normalitas menggunakan *shapiro wilk*

menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang artinya data jumlah eritrosit dan kadar Hb terdistribusi normal. Uji perbedaan jumlah eritrosit dan kadar Hb antar kelompok menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji beda jumlah eritrosit *pretest* antar kelompok perlakuan diperoleh nilai $p = 0,000$ (tabel 1), artinya terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *one way ANOVA* dilanjutkan menggunakan uji *post hoc bonferroni*.

Tabel 1. Perbedaan Jumlah Eritrosit Antar Kelompok Sebelum Perlakuan (*Pre Test*)

Perlakuan	Mean ± Standar Deviasi (juta/UI)	p value	Post hoc bonferroni
Kontrol negatif	8,9±0,6		a
Kontrol positif	7,01±0,67	0,000*	b
Perlakuan (P)	6,97±0,61		b

Keterangan : *uji *One way ANOVA* ($p < 0,05$) (Data Primer, 2018)

Tabel 2. Perbedaan Kadar Hb Antar Kelompok Sebelum Perlakuan (*Pre Test*)

Perlakuan	Mean ± Standar Deviasi (g/dl)	p value	post hoc bonferroni
Kontrol Negatif	16±1,06		a
Kontrol Positif	13,9±1,8	0,011*	b
Perlakuan	14,1±1,03		b

Keterangan : *uji *One way ANOVA* ($p < 0,05$) (Data Primer, 2018)

Tabel 3. Perbedaan Jumlah Eritrosit Antar Kelompok Setelah Perlakuan (*Post Test*)

Perlakuan	Mean ± Standar Deviasi (Juta/UI)	p value	post hoc bonferroni
Kontrol Negatif	8,9 ± 0,66		a
Kontrol Positif	7,3 ± 0,59	0,000*	b
Perlakuan	9,3 ± 0,78		a

Keterangan : *uji *One way ANOVA* ($p < 0,05$) (Data Primer, 2018)

Tabel 4. Perbedaan Kadar Hb Antar Kelompok Setelah Perlakuan (*Post Test*)

Perlakuan	Mean ± Standar Deviasi (g/dl)	p value	post hoc bonferroni
Kontrol Negatif	16,3 ± 0,37		a
Kontrol Positif	14,56 ± 1,16	0,001*	b
Perlakuan	16,2 ± 0,72		a

Keterangan : *uji *One way ANOVA* ($p < 0,05$) (Data Primer, 2018)

Hasil uji *post hoc bonferroni* jumlah eritrosit *pretest* didapatkan pada kelompok yang diinduksi NaNO₂ (kontrol positif dan perlakuan) menunjukkan perbedaan signifikan dibandingkan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa penginduksian NaNO₂ sebanyak 0,8 gram dapat menurunkan jumlah eritrosit secara signifikan pada kelompok perlakuan dan kontrol positif (tabel 1).

Hasil uji beda *one way ANOVA* kadar Hb *pretest* antar kelompok perlakuan diperoleh nilai $p = 0,011$ (tabel 2), artinya terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *one way ANOVA* dilanjutkan menggunakan uji *post hoc bonferroni*.

Hasil uji *post hoc bonferroni* kadar Hb *pretest* adalah terdapat perbedaan signifikan antara kelompok yang diinduksi NaNO₂ dibandingkan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa penginduksian NaNO₂ 0,8 gram dapat menurunkan kadar Hb secara signifikan pada kelompok kontrol positif dan perlakuan (tabel 2).

Hasil analisis uji beda jumlah eritrosit antar kelompok sesudah pemberian minuman coklat diperoleh nilai $p = 0,00$ artinya terdapat perbedaan signifikan jumlah eritrosit pada antar kelompok perlakuan. Hasil uji *one way ANOVA* dilanjutkan ke uji *post hoc bonferroni*. Dari hasil uji *post hoc bonferroni* dapat diketahui bahwa pemberian minuman coklat memberikan pengaruh terhadap

peningkatan jumlah eritrosit pada kelompok perlakuan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal tersebut ditunjukkan dengan jumlah eritrosit pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif (tabel 3).

Hasil analisis *One Way Anova* pada kadar Hb sesudah pemberian minuman cokelat diperoleh nilai $p < 0,001$ artinya bahwa terdapat perbedaan kadar Hb antar kelompok perlakuan. Hasil uji *one*

way ANOVA dilanjutkan ke uji *post hoc bonferroni*.

Berdasarkan hasil dari uji *post hoc* dapat diketahui bahwa pemberian minuman cokelat memberikan pengaruh terhadap peningkatan kadar Hb pada kelompok perlakuan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal tersebut ditunjukkan dengan kadar Hb pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol positif (tabel 4).

Tabel 5. Perbedaan Jumlah Eritrosit Sebelum dan Sesudah Intervensi

Kelompok	Pre Test (juta/UI)	Post Test (juta/UI)	p value
Kontrol Negatif	8,9 ± 0,68	8,94 ± 0,66	0,941
Kontrol Positif	7,01 ± 0,67	7,3 ± 0,59	0,008*
Perlakuan	6,97 ± 0,62	9,23 ± 0,77	0,000*

Keterangan : uji *paired T Test* (* signifikan, $p < 0,05$) (Data Primer, 2018)

Tabel 6. Perbedaan Kadar Hb Sebelum dan Sesudah Intervensi

Kelompok	Pre Test (g/dL)	Post Test (g/dL)	p
Kontrol Negatif	16,2 ± 1,01	16,3 ± 0,37	0,688
Kontrol Positif	13,9 ± 1,78	14,6 ± 1,16	0,069
Perlakuan	14,12 ± 1,03	16,2 ± 0,72	0,002*

Keterangan : uji *paired T Test* (* signifikan, $p < 0,05$) (Data Primer, 2018)

Berdasarkan hasil analisis statistik maka diketahui bahwa jumlah eritrosit pada kontrol positif dan perlakuan menunjukkan perbedaan signifikan antara sebelum dan sesudah intervensi. Seharusnya pada kelompok kontrol positif tidak mengalami peningkatan jumlah eritrosit, hal tersebut dimungkinkan karena pada saat intervensi induksi NaNO_2 dihentikan sehingga menyebabkan tikus kembali kepada keadaan normal. Meskipun demikian, kenaikan jumlah eritrosit tidak sebanyak pada kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan mengalami peningkatan jumlah eritrosit yang signifikan setelah diberikan minuman cokelat dengan dosis 4,3 ml/ hari selama 14 hari. Jumlah eritrosit pada kelompok perlakuan mengalami peningkatan sebanyak 2,258 juta/UI (tabel 5).

Berdasarkan hasil analisis statistik diketahui bahwa kadar Hb pada kelompok kontrol negatif dan kontrol positif tidak terdapat perbedaan signifikan antara sebelum dan sesudah intervensi. Kelompok perlakuan mengalami peningkatan kadar Hb yang signifikan setelah diberikan minuman cokelat dengan dosis 4,3 ml/ hari selama 14 hari. Peningkatan kadar Hb pada kelompok perlakuan sebanyak 2,11 g/dL (tabel 6).

PEMBAHASAN

Jumlah eritrosit dan kadar Hb pada kelompok kontrol positif dan perlakuan mengalami penurunan secara signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif (tabel 1 dan 2) setelah pemberian NaNO_2 selama 18 hari. NaNO_2 merupakan bahan pengawet yang dapat mempengaruhi kemampuan eritrosit untuk membawa oksigen, menyebabkan anemia dan membentuk nitrosamin yang bersifat karsinogenik¹⁴. Nitrit yang masuk kedalam tubuh dapat mempengaruhi kemampuan eritrosit dalam membawa oksigen. Kemampuan eritrosit yang berkurang untuk membawa oksigen terjadi karena Hb dalam eritrosit berikatan dengan NO membentuk nitrosohemoglobin. Ikatan antara nitrit dan Hb dapat menginduksi pembentukan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) dan menyebabkan stres oksidatif pada membran sel eritrosit sehingga eritrosit mengalami hemolisis¹. Nitrit juga bisa menyebabkan anemia dengan adanya penelitian yang menunjukkan hasil penurunan angka eritrosit dan Hb pada penggunaan nitrit secara berlebihan. Peningkatan pembentukan ROS yang berujung pada stres oksidatif akan menyebabkan berbagai kerusakan hepar, yang merupakan target utama dari ROS¹⁵. Stres oksidatif yang terjadi pada sel darah merah mengakibatkan kadar eritropoietin

turun dan mengganggu sintesis Hb¹⁶. Selain itu stres oksidatif juga mengakibatkan integritas sel darah merah menjadi lemah sehingga sel darah merah menjadi sangat sensitif dan mudah lisis¹⁷.

Pemberian minuman cokelat terbukti meningkatkan jumlah eritrosit dan kadar Hb secara signifikan pada kelompok perlakuan. Hal tersebut disebabkan karena minuman cokelat mengandung flavonoid yang merupakan antioksidan untuk melawan ROS. Flavonoid yang terkandung dalam bubuk cokelat dapat melawan ROS pada tikus diabetes melitus yang ditandai dengan penurunan kadar gula darah puasa¹⁴.

Penelitian tentang uji aktivitas senyawa flavonoid total dari *Gynura Segetum (Lour)* memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah eritrosit³. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berperan sebagai antioksidan, yang di dalam sel darah dapat bertindak sebagai penampung radikal hidroksil dan superoksida sehingga melindungi lipid membran dan mencegah kerusakan sel darah. Penelitian lain menyatakan bahwa ekstrak etanol meniran dapat meningkatkan jumlah eritrosit dan membuktikan ada peningkatan jumlah eritrosit pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar sebelum dan sesudah pemberian air seduhan kelopak bunga rosela merah¹⁷. Air seduhan kelopak rosela merah dapat meningkatkan jumlah eritrosit karena mengandung pigmen antosianin (flavonoid) yang berperan sebagai antioksidan. Hasil penelitian tentang pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari mampu memperbaiki kadar Hb dalam darah tikus putih¹⁷.

Pada kelompok kontrol positif juga terjadi peningkatan jumlah eritrosit yang signifikan meskipun tidak diintervensi apapun. Hal ini tidak sesuai harapan, peningkatan jumlah eritrosit pada kelompok kontrol positif dikarenakan proses eritropoiesis sudah terjadi. Pembentukan eritrosit diatur oleh suatu hormon glikoprotein yang disebut eritropoietin. Pembentukan eritrosit ini juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain yaitu protein¹⁵. Akan tetapi, kadar Hb pada kelompok kontrol positif tidak mengalami peningkatan yang signifikan. Hal tersebut dikarenakan proses pembentukan Hb yang lebih lama dibandingkan peningkatan jumlah eritrosit. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya dimana pemberian bubuk kakao sebanyak 2,6 gram dapat meningkatkan kadar Hb pada tikus anemia secara signifikan¹⁸. Pada proses

hematopoiesis yang pertama terbentuk adalah eritrosit yang diatur oleh hormon glikoprotein yang disebut eritropoietin. Sel pertama yang diketahui sebagai rangkaian pembentukan eritrosit disebut proeritroblas. Sel-sel baru dari generasi pertama ini disebut sebagai basofil eritroblas sebab dapat dicat dengan warna basa. Sel-sel ini mengandung sedikit sekali Hb. Pada tahap berikutnya baru akan mulai terbentuk cukup Hb yang disebut polikromtofil eritroblas¹⁵.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa minuman cokelat berefek terhadap peningkatan jumlah eritrosit dan kadar Hb tikus anemia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Purbadewi L, Ulvie YN. Hubungan Tingkat Pengetahuan Tentang Anemia Dengan Kejadian Anemia Pada Ibu Hamil. *Jurnal Gizi*. 2013;2(1).
2. Ambarwati R. Effect of Sodium Nitrite (NaNO₂) to Erythrocyte and Hemoglobin Profile in White Rat (*Rattus norvegicus*). *Folia Medica Indonesiana*. 2012;48(1):1-5. <http://journal.unair.ac.id/filerPDF/fmi0f8e2803b5fnull.pdf>. [diakses: 13 Maret 2019].
3. World Health Organization (WHO). *Global Prevalence of Anaemia*. Geneva. 2015.
4. Sundaryono. Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Total dari *Gynura segetum (Lour)* Terhadap Peningkatan Eritrosit Dan Penurunan Leukosit Pada Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Exacta*, 2011;(9)2:8-16.
5. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta. 2013.
6. Li S, Tan H, Wang N, Zhang Z, Lao L, Wong C, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. 2015;10:26087–124.
7. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med*. 2015; 7;372(19):1832-43.
8. Yue Y, Wang Y, Li D, Song Z, Jiao H, Lin H. A central role for the mammalian target of rapamycin in LPS-induced anorexia in mice. *J. Endocrinol*. 2015;1;224:37-47.
9. Mita N. Formulasi Krim dari Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Berkhasiat Antioksidan. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. 2015;30;3(1):12-21.
10. Restuti, A. N. S., Yulianti, A., Oktafa, H., Alfafa, DN., Yani, FN., Kurniati, M., Wulandari, P., Analisis Aktivitas Antioksidan dan Uji

- Organoleptik Minuman Cokelat (*Theobroma cacao* L. Prosiding Seminar Nasional INAHCO. 2019:13-18.
<https://publikasi.polije.ac.id/index.php/inahco/article/view/1763/1105>.
11. Restuti, A. N. S., Yulianti, A., Nuraini, N. Intervensi Bubuk Kakao terhadap Perubahan Kadar Gula Darah Puasa Tikus Sprague dawley Diabetes Melitus. *Jurnal Riset Kesehatan*. 2018;7(2):57–60. <http://ejournal.poltekkes-smg.ac.id/ojs/index.php/jrk/article/view/3646/946>.
 12. Mazhar M, Faizi S, Gul A, Kabir N, Simjee SU. Effects of naturally occurring flavonoids on ferroportin expression in the spleen in iron deficiency anemia in vivo. *RSC Adv*. 2017;7(38):23238-45.
 13. Fibach E, Rachmilewitz E. The Role of Oxidative Stress in Hemolytic Anemia. *Current Molecular Medicine*. 2008;609–19. DOI : 10.2174/156652408786241384. <http://www.eurekaselect.com/67891/article> (diakses 13 Maret 2019)
 14. Unigwe, C.R. dan P.E. Nwakpu. 2009. Effect of Ingestion of *Garcinia kola* Seed on Erythrocytes in Rabbits. *Continental Journal. Veterinary Sciences* 2009;3:7-10
 15. Lin CY, Hsiao WC, Huang CJ, Kao CF, Hsu GS. Heme oxygenase-1 induction by the ROS–JNK pathway plays a role in aluminum-induced anemia. *J Inorg Biochem*. 2013;1(128):221-8.
 16. Yuningsih. Keracunan nitrat-nitrit pada ternak ruminansia dan upaya pencegahannya. Bogor : Balai Besar Penelitian Veteriner. 2007
 17. Zulkifli., Maruni, W.D., Yunan, J., Laksmi, S. Jumlah Eritrosit Darah Tepi Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Yang Diberikan Air Seduhan Kelopak Bunga Rosela Merah (*Hibiscus sabdariffa*). *Media Bina Ilmiah*. 2014;8(4):11-17. <https://studylibid.com/doc/142500/2-jumlah-eritrosit-darah-tepi-hewan-coba-tikus>
 18. Farikhah,A., Indriani, F., Yulianti, A., Restuti, ANS. Intervensi Bubuk Kakao Terhadap Kadar Hemoglobin Tikus Putih Galur Wistar Anemia. Prosiding Seminar Nasional INAHCO. 2019:80-91. <https://publikasi.polije.ac.id/index.php/inahco/article/view/1771/1113>.