

PENGARUH IRADIASI GAMMA TERHADAP *SOLANUM NIGRUM L* DAN EFEKTIVITASNYA SEBAGAI ANTI KANKER

Ermin K. Winarno^{1*}, Indira Radana Reswari², Susanto¹ dan Hendig Winarno¹

¹Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN)
Jalan Lebak Bulus Raya No 49, Pasar Jumat, Jakarta Selatan 12440

²Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila
Jalan Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan

*Email: erminkk@batan.go.id

Diterima: 13-10-2017

Diterima dalam bentuk revisi: 24-01-2018

Disetujui: 20-02-2018

ABSTRAK

PENGARUH IRADIASI GAMMA TERHADAP *SOLANUM NIGRUM L* DAN EFEKTIVITASNYA SEBAGAI ANTI KANKER. Buah leunca (*Solanum nigrum L*) merupakan tanaman dari suku *solanaceae* yang dipercaya dapat mengatasi kanker. Leunca yang termasuk jenis buah dapat diawetkan dengan cara iradiasi gamma. Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh perlakuan dosis iradiasi gamma terhadap buah leunca dan efeknya terhadap khasiat anti kanker leukemia L1210. Dosis iradiasi yang diberikan adalah 5; 7,5; 10; dan 15 kGy, masing-masing dengan 2 ulangan. Ekstraksi dilakukan secara bertahap dengan *n*-heksan, etil asetat, dan etanol. Fraksi aktif dari etil asetat saja yang diuji sitotoksiknya. Hasil menunjukkan bahwa dosis iradiasi maksimum dengan sumber gamma ⁶⁰Co untuk buah leunca adalah sebesar 7,5 kGy dengan tidak merusak khasiatnya sebagai anti kanker.

Kata kunci: *Solanum nigrum L*, Sel kanker L 1210, Iradiasi gamma, Sitotoksik

ABSTRACT

EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON *SOLANUM NIGRUM L* AND ITS ANTICANCER EFFECTIVITY. Leunca is a plant from family of a *solanaceae* that presumed possesses anticancer activity. Gamma irradiation can be applied for leunca preservation. This study aims to study the effect of gamma irradiation dose on the leunca fruit and its leukemia L1210 cancer effect. Doses of irradiation was varied at 5; 7.5; 10; and 15 kGy, respectively with 2 replications. Extraction was carried out with *n*-hexane, ethyl acetate, and ethanol, successively. Ethyl acetate extract was further tested for its cytotoxic property. Result indicates that the maximum irradiation dose of 7.5 kGy with gamma ⁶⁰Co resource on leunca fruit shows no damage against L1210 Leukemia cell.

Keywords: *Solanum nigrum L*, Cancer cell L1210, Gamma irradiation, Cytotoxic

1. PENDAHULUAN

Buah leunca (*solanum nigrum L*) termasuk spesies dalam genus *solanum* merupakan tanaman asli yang berasal dari Eurasia yang diperkenalkan di Amerika, Australia dan Afrika selatan. *Solanum nigrum L* biasanya dianggap sebagai gulma, meskipun demikian bagian tanaman ini

sangat potensial sebagai obat tradisional terutama bagian daun dan buahnya (1). *Solanum Nigrum L* merupakan tanaman yang biasa di konsumsi oleh masyarakat Indonesia sebagai lalapan (2). Sammani melaporkan bahwa buah leunca (*Solanum nigrum L*) mengandung steroidal alkaloid dan dipercaya oleh masyarakat sebagai

analgesik, diuretik, antibakteri, dan antikanker (3). Lai dkk melaporkan bahwa ekstrak *Solanum nigrum* L telah menunjukkan efek anti tumor pada berbagai jenis sel kanker seperti melanoma, servik dan kanker payudara (4). Penelitian lain yang dilakukan oleh El-hawary dkk mengatakan ekstrak metanol *Solanum nigrum* L memiliki efek anti kanker pada sel kanker hati (5).

Hasil penelitian Ashwani menunjukkan bahwa kandungan utama dari tanaman *Solanum nigrum*, L antara lain flavonoid, phenolic, alkaloid, terpenoid, dan minyak essensial (6). Dona dkk melaporkan bahwa kandungan spesifik dari alkaloid yang sudah pernah diisolasi adalah solasonine, solasodine, solamargine, dan solanine. Senyawa-senyawa tersebut menghambat pertumbuhan sel kanker dan dapat memodulasi protein pada sel tumor sehingga memacu kematian pada sel (7). Untuk mempertahankan khasiatnya sebagai anti kanker, buah leunca sebagai produk sayuran yang tidak tahan lama, perlu diawetkan. Pendinginan 7-10°C dapat mengawetkan sampai 1 minggu. Dengan sistem atmosfer terkendali yaitu penggunaan konsentrasi 3% O₂ tanpa CO₂ pada suhu 13°C, buah leunca dapat bertahan sampai 6 minggu menurut Samad (8). Pengeringan langsung di bawah sinar matahari mengawetkan buah leunca sampai 5 bulan (9). Ghadi menyatakan bahwa iradiasi gamma untuk pengawetan makanan dan obat herbal bertujuan menjaga kualitas dan mengurangi kerugian akibat kontaminasi mikroba dan serangga (10). Hasil penelitian Kavitha bahwa pengawetan dengan cara iradiasi pada buah-buahan adalah salah

satu strategi dalam pasca panen yang dapat menolong penundaan proses pematangan dan pembusukan (11).

Sel Kanker leukemia L1210 merupakan jenis sel kanker yang biasa digunakan sebagai skrining awal untuk pengujian senyawa bahan alam yang berpotensi sebagai obat anti kanker. Tujuan penelitian ini difokuskan pada pengaruh perlakuan dosis iradiasi gamma terhadap buah leunca dan efeknya terhadap khasiat anti kanker leukemia L1210.

2. METODE

2.1. Persiapan simplisia

Buah leunca yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), dikeringkan di ruangan berpendingin pada 24°C, diserbukkan, dan ditimbang 200 gram simplisia di vakum dengan *sealer*

2.2. Iradiasi

Simplisia di iradiasi dengan iradiator gamma IRKA sebagai sumber ⁶⁰Co dengan dosis 5; 7,5; 10; dan 15 kGy (laju dosis 4,85 kGy/jam). Masing-masing dosis iradiasi ada 2 ulangan.

2.3. Ekstraksi

Setelah diiradiasi, sampel direndam berturut-turut dengan *n*-heksan, etil asetat, dan etanol. Perendaman dengan masing-masing pelarut dilakukan 5-6 kali. Masing-masing filtrat diuapkan menggunakan rotavapor (35°C) hingga diperoleh ekstrak kental, dipekatkan di dalam desikator, dan ditimbang. Hanya ekstrak etil asetat yang difraksinasi dan diuji lebih lanjut karena

ekstrak etil asetat mengandung fraksi aktif berdasarkan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Reswari (12).

2.4. Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak etil asetat dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel 60 (70-230 mesh). Pemisahan dilakukan dengan beberapa pelarut yaitu *n*-heksan, *n*-heksan : etil asetat, etil asetat : metanol dan metanol sesuai dengan metode yang digunakan oleh Reswari (12). Setiap fraksi di tampung sebanyak 150 mL dan dipekatkan dengan alat rotavapor kemudian ditimbang. Fraksi aktif yang didapat kemudian dilihat pola bercak nya menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan lempeng silika gel GF₂₅₄ yang dielus dengan pelarut kloroform:metanol (3:1). Lempeng silika diamati pada lampu UV λ 254 dan λ 366 nm, kemudian disemprot dengan penampak bercak serum sulfat 1% dalam asam sulfat pekat 10% lalu dipanaskan pada pemanas (*hot plate*) sampai terlihat bercak.

2.5. Uji Sitotoksisitas Terhadap Sel Leukemia L1210

Uji sitotoksik fraksi aktif dengan variasi 1, 2, 4, 8, dan 16 ppm dilakukan terhadap sel leukimia L1210. Sample uji di tempatkan pada *multiwall plate tissue's culture* 24 sumuran yang berisi 1 mL suspensi sel leukemia L1210 dan media RPMI 1640 yang mengandung *calf bovine serum* 10% yang diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% (37°C, 48 jam) menurut Winarno (13). Penghitungan sel yang hidup

dilakukan dengan mikroskop (pembesaran 40x,) yang dinyatakan dengan:

$$\text{Persentasi inhibisi} = (1 - A/B) \times 100\%$$

A : Jumlah sel hidup dalam media yang mengandung zat uji

B : Jumlah sel hidup dalam media yang tidak mengandung zat uji (kontrol)

Nilai IC₅₀ diperoleh dari perhitungan persentasi inhibisi yang di plotkan dengan nilai probit sebagai sumbu Y dan nilai log konsentrasi sebagai sumbu x. (14).

2.6. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Fraksi Aktif

Analisis KCKT buah leunca dilakukan menggunakan alat Shimadzu SPD-20A, dengan detektor UV menggunakan kolom C-18. Fraksi aktif dilarutkan dengan metanol (3000 ppm), diinjeksikan sebanyak 20 μ l pada λ 210 nm, dengan fasa gerak metanol:air (8:2) dengan kecepatan alir pelarut 1 ml/ menit. Pengukuran pada λ 210 nm didasarkan pada hasil pemeriksaan spektrofotometer yang menunjukkan serapan tertinggi pada λ 210 nm. Injeksi diulang 3 kali dengan kondisi yang sama. Data yang dihasilkan dianalisis secara Anova menggunakan SPSS 24 untuk mengetahui perubahan luas area dari puncak kromatogram.

2.7. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometer dari Fraksi Aktif

Untuk mengetahui luas puncak dari masing-masing kromatogram, fraksi aktif dianalisis menggunakan KLT-densitometer. Penotolan fraksi aktif etil asetat 10 μ L (3000

ppm) pada lempeng silika gel GF₂₅₄. Dielusi dengan pelarut kloroform: metanol (3:1). pada λ 210 nm dengan jarak rambat 10 cm. Luas area selanjutnya dianalisis secara Anova menggunakan SPSS 24.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

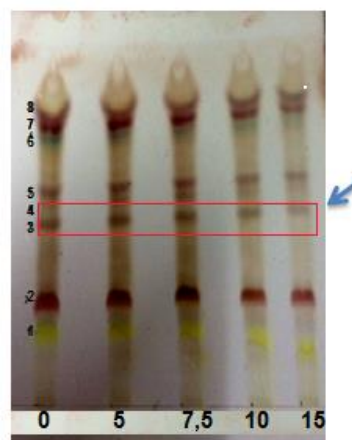
Rendemen dari hasil perendaman dapat dilihat pada Tabel 1. Terlihat bahwa iradiasi gamma tidak berpengaruh terhadap rendemen dan warna dari masing-masing ekstrak.

3.1. Fraksinasi Fraksi Aktif dengan Kromatografi Kolom dan KLT

Hasil fraksinasi ekstrak etil asetat buah leunca dapat dilihat pada Tabel 2, Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Reswari mengatakan bahwa hasil fraksinasi ekstrak etil asetat dari leunca yang tidak diiradiasi gamma diperoleh 5 fraksi, fraksi ke-4 merupakan fraksi yang paling aktif dengan nilai IC₅₀ paling kecil dalam menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 (12). Nilai IC₅₀ pengujian sitotoksik terhadap sel L1210 fraksi 4 untuk dosis 0 kGy adalah sebesar 1,61 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nilai IC₅₀ fraksi terkecil yang akan dilakukan analisis dengan KLT, Uji sitotoksik dari tiap dosis radiasi, KCKT dan KLT-Densitometri.

Berdasarkan hasil uji sitotoksitas dengan sel L1210 menunjukkan bahwa fraksi

no. 4 merupakan fraksi aktif, untuk itu perlu dilakukan pengujian terhadap kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil KLT dari fraksi aktif etil asetat setelah dipanaskan menunjukkan bahwa pada fraksi aktif terdapat 8 bercak utama yang di dominasi oleh senyawa alkaloid yang menimbulkan warna orange hingga coklat dan flavonoid menimbulkan warna kuning (15). Pada dosis 10 kGy bercak no. 3 memudar (Gambar 1). Hal ini diakibatkan karena terjadi penurunan jumlah komponen senyawa alkaloid akibat dosis 10 dan 15 kGy. Energi iradiasi gamma sebesar 10 dan 15 kGy diduga mampu menyebabkan perubahan ikatan pada struktur kimia senyawa aktif, terlihat pada penurunan intensitas warna pada spot KLT.



Gambar 1. Pola kromatogram fraksi aktif etil asetat dari variasi 0;5;7,5;10 dan 15 kGy dengan fasa gerak kloroform:metanol (3:1) setelah dipanaskan

Tabel 1. Berat dan warna ekstrak etil asetat dari berbagai dosis radiasi

Ekstrak	Dosis iradiasi (kGy)	Warna ekstrak	Rendemen (%)
Etil asetat	0	hijau kehitaman	3,47
	5	hijau kehitaman	3,22
	7,5	hijau kehitaman	3,44
	10	hijau kehitaman	3,51
	15	hijau kehitaman	3,58

Tabel 2. Berat dan warna fraksi ekstrak etil asetat

No Fraksi	Eluen / Fase gerak	Warna Fraksi	Berat fraksi (g)
1	<i>n</i> -heksan : Etil asetat (10:1)	Bening	0,0535
2	<i>n</i> -heksan : Etil asetat (5:1)	Hijau	0,0640
3	Etil Asetat	Hijau	0,1189
4	Etil asetat : Metanol (5:1)	Kuning kehijauan	0,1708
5	Metanol	Kuning coklat	0,3947

3.2. Uji Sitotoksitas Fraksi Aktif Terhadap Sel Leukemia L1210

Nilai IC₅₀ dari hasil uji sitotoksik fraksi aktif dengan beberapa dosis radiasi pada variabel konsentrasi 1, 2, 4, 8, dan 16 µg/mL dapat dilihat pada Tabel 3. Meningkatnya dosis radiasi menurunkan nilai IC₅₀ karena iradiasi akan menurunkan jumlah alkaloid dan flavonoid sesuai laporan Carocho (16).

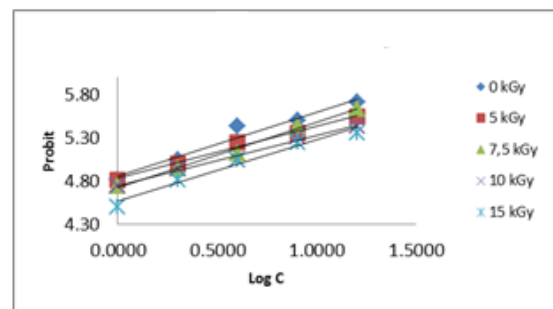
Tabel 3. Nilai IC₅₀ fraksi aktif terhadap pertumbuhan Sel Leukemia L1210

Dosis (kGy)	IC ₅₀ (µg/mL)
0	1,61
5	2,04
7,5	2,25
10	2,90
15	4,15

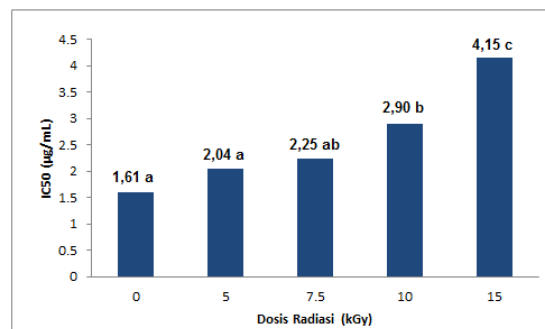
Penentuan nilai IC₅₀ dari tiap dosis iradiasi didapatkan dari nilai regresi pada Gambar 2.

Dari uji SPSS 24 dengan metode Anova pada taraf kepercayaan 95% (α=0,05) terjadi perbedaan yang signifikan pada dosis radiasi 10 kGy (Gambar 3) yang disebabkan oleh penurunan nilai IC₅₀ dari fraksi yang diiradiasi terhadap nilai kontrol. Perbedaan yang signifikan ini akan menyebabkan penurunan khasiat anti

kanker dari buah leunca yang diiradiasi ≥ 10 kGy jika dibandingkan dengan tanpa iradiasi.



Gambar 2. Grafik hubungan antara log konsentrasi dan probit fraksi aktif

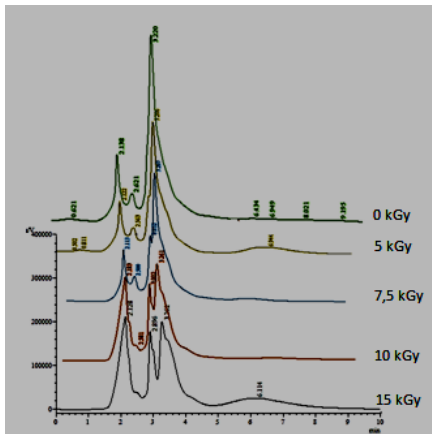


Gambar 3. Grafik kenaikan nilai IC₅₀ dari fraksi aktif

Menurunnya nilai IC₅₀ disebabkan oleh meningkatnya radikal bebas yang menyebabkan menurunnya zat aktif sehingga akan menurunkan nilai aktivitas antioksidan sebesar 50% (EC₅₀). Walaupun terjadi perbedaan yang signifikan dengan nilai kontrol, IC₅₀ pada dosis maksimal 15

kGy tergolong aktif sebagai obat anti kanker karena nilainya $\leq 20 \mu\text{g/mL}$ (14).

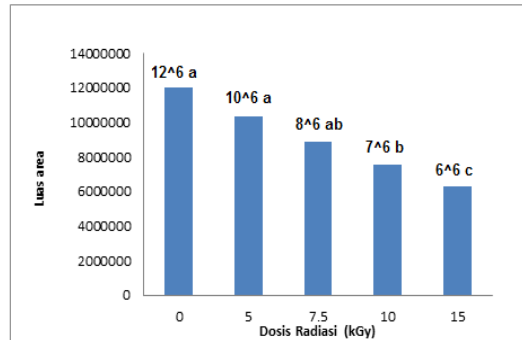
Dari hasil analisis KCKT fraksi aktif didapatkan 3 buah puncak dengan 1 buah puncak utama dengan waktu retensi 3,2 menit. Terlihat makin tinggi dosis radiasi gamma luas puncak makin turun dan menimbulkan puncak baru. Makin tinggi dosis radiasi, radikal bebas meningkat tetapi menurunkan jumlah alkaloid dan flavonoid, sehingga akan menurunkan nilai IC_{50} . Pada dosis $\geq 7,5$ kGy timbul senyawa baru karena radikal bebas yang dihasilkan bereaksi dengan komponen utamanya. Profil fraksi aktif dari variasi dosis radiasi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Profil kromatogram KCKT fraksi aktif

Luas puncak area dari fraksi aktif menurun seiring dengan meningkatnya dosis radiasi (Gambar 5). Hasil uji analisis statistik menggunakan metode Anova SPSS 24 pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa pada dosis $\leq 7,5$ kGy masih memiliki persamaan yang nyata dengan kontrol sedangkan pada dosis 10 kGy sudah ada perbedaan yang signifikan dengan kontrol. Penurunan luas

area ini di duga karena adanya degradasi komponen-komponen yang mempunyai serapan pada $\lambda 210$ nm (14).



Gambar 5. Diagram batang pengaruh radiasi terhadap luas area fraksi aktif pada profil kromatogram KCKT

3.3. Pemeriksaan KLT-Densitometer dari Fraksi Aktif.

KLT-Densitometer fraksi aktif dari data kromatogram dilakukan pada $\lambda 210$ nm.. Hasil pemeriksaan dengan KLT-densitometri menunjukkan terjadinya penurunan luas puncak area dari 5 sampai 15 kGy.

Fraksi aktif dari etil asetat hasil KLT-Densitometri dan KCKT memiliki 3 puncak dengan 1 puncak utama. Masing-masing hasil KLT-Densitometri dapat dilihat pada Tabel 4. Peningkatan dosis radiasi akan menurunkan jumlah alkaloid dan flavonoidnya, serta mengubah senyawa utama menjadi senyawa kedua pada total fenolik atau total flavonoidnya (11). Luas dan tinggi puncak KLT-Densitometri turun karena diduga puncak utama fraksi aktif adalah jenis golongan alkaloid atau flavonoid.

Berdasarkan hasil analisis beberapa parameter diatas menggunakan SPSS secara annova menyatakan bahwa pada

Tabel 4. Data luas puncak kromatogram fraksi aktif beberapa dosis radiasi

Puncak ke	Rf	Luas puncak kromatogram				
		0 kGy	5 kGy	7,5 kGy	10 kGy	15 kGy
1	0,27 – 0,43	4906,2	2113,5	1747,7	999,2	765,3
2	0,45 – 0, 52	4579,0	2808,9	1309,6	1581,9	1342,1
3	0,66 – 0,95	17870,3	11043,3	5909,7	3094,1	1928,1

dosis ≥ 10 kGy sudah mengurangi khasiatnya sebagai anti kanker dikarenakan ada perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol. Dosis iradiasi 7,5 kGy merupakan dosis maksimum yang digunakan untuk pengawetan buah leunca kering tanpa mengurangi khasiatnya sebagai anti kanker.

4. KESIMPULAN

Dosis iradiasi gamma $\leq 7,5$ kGy pada buah leunca (*Solanum nigrum L*) tidak merusak khasiat sitotoksiknya terhadap sel Leukimia L1210. Iradiasi gamma dengan dosis yang lebih tinggi, menurunkan alkaloid dan flavonoid sebagai senyawa anti kanker pada buah leunca.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada PAIR-BATAN yang telah menyediakan fasilitas dan sarana penelitian, para staf Balai Iradiasi Elektromekanika dan Instrumentasi (BIEI) yang telah melakukan iradiasi buah leunca, dan saudara Suryadi yang telah membantu bagi keberhasilan dan kelancaran kegiatan penelitian.

6. DAFTAR PUSTAKA

1. Sharma M, Romana M, Menaria J, Devi S, and Sheikh MA. In Vitro Antioxidant Potential of Various

Extracts of *Solanum Nigrum L*. The Pharmaceutical and Chemical Journal. 2014; 1 (1): 6–9.

2. Rumiya, Muna LN, Hidayati DN, and Jenie RI. Acute Toxicity and Genotoxic Activity of Leunca (*Solanum Nigrum L*.) Herb Ethanolic Extract. Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention, 2015, 6(1): 30-34.
3. Sammani, Ahmad, Shammaa E, and Chehna F. Qualitative and Quantitative Steroidal Alkaloids of *Solanum* Species Distributed Widely in Syria by TLC and HPLC. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2013; 23 (2): 23–27.
4. Lai, Jang Y, Tai CJ, Wang CW, Choong CY, Lee BH, Shi YC, and Tai CJ. Anti-Cancer Activity of *Solanum Nigrum* (AESN) through Suppression of Mitochondrial Function and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Breast Cancer Cells. Molecules (Basel, Switzerland). 2016; 21 (5).
5. Seham S, El-Harawai, Mohammed R, Abouzid SF, Mostafa E, and Sayed AM. 2015. Cytotoxicity of *Solanum Nigrum L* Green Fruits on Breast (MCF-7) and Liver (HepG-2) Cancer Cell Lines The Pharma

- Innovation Journal. 2015; 3 (11): 87–89.
6. Kumar A, Sagwal S, Niketa and Rani S. 2012. An Update Review On Molecular Genetic, Phytochemistry, Pharmacology, and Phisiology of Black Nightsade (*Solanum Nigrum*). *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2012; 3 (9): 2956–77.
 7. Rahma D, Sulistyani N, and Nurani LH. Uji Sitotoksitas Dan Antiproliferatif Ekstrak Etanol Daun Leunca (*Solanum Nigrum* , L .) Terhadap Sel Raji. *Pharmaciana*. 2016; 6 (2): 181–90.
 8. Samad, Yusuf M. Pengaruh Penanganan Pasca Panen Terhadap Mutu Komoditas Holtikultura. *Jurnal Sains Dan Teknologi Indonesia*. 2006; 8 (1): 31–36.
 9. Van KJ. Food Preservation by Irradiation. *Radiation and Agriculture*.1981; 23 (3): 33–36
 10. Ghadi FE, Ghara AR, and Ghanbari T. Effect of Gamma Irradiation on the Total Phenolic Content and Free Radical-Scavenging Activity of Iranian Date Palm Mazafati (*Phoenix Dactylifera* L .) *International Journal of Latest Research in Science and Technology*. 2015; 4 (5): 149-153
 11. Kavitha C, Kuna A, Supraja T, Sagar SB, Padmavathi TV, and Prabhakar N.. Effect of Gamma Irradiation on Antioxidant Properties of Ber (*Zizyphus Mauritiana*) Fruit. *Journal of Food Science and Technology*. 2015; 52 (5): 3123–28..
 12. Reswari IR. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Dan Fraksi Aktif Buah Leunca (*Solanum nigrum* L) Terhadap Sel Leukimia L1210. Skripsi. 2016
 13. Winarno H, dan Katrin E. Benzophenone glucoside isolated from the ethy; acetate extract of the bark Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) and its inhibitory activity on leukemia L1210 cell line. *Indo J. Chem*.2009; 9 (1): 142–45
 14. Winarno EK, Fauzia S, Susanto, and Winarno H. Kemampuan Sitotoksik Dan Profil Kromatogram Umbi Sarang Semut (*Myrmecodia Pendans* Merr . & Perry) Setelah Diiradiasi Gamma Cytotoxic Potencial and Chromatogram Profile O F Sarang Semut Tuber (*Myrmecodia Pendans* Merr . & Perry) After. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop Dan Radiasi* 2015; 11 (2): 137–52
 15. Anjali S, Sanjay G, Indira I, and Reema I. *Solanum Nigrum* Current Perspectives on Therapeutic Properties. *Alternative Medicine Review*.2011;16 (3): 78
 16. Carocho M, Antonio AL, Barros L, Bento A, Botelho ML, Kaluskal , and Isabel C F R Ferreira. Comparative Effects of Gamma and Electron Beam Irradiation on the Antioxidant Potential of Portuguese Chestnuts (*Castanea Sativa* Mill.).*Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 3452–55.