

## Pengaruh Iradiasi Gamma Terhadap Sitotoksitas Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada Sel Leukemia L1210

### *Effects of Gamma Irradiation on Cytotoxicity Against Leukemia L1210 Cells and Chromatogram Profile of Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Leaves*

Ermin Katrin<sup>1)</sup>\*, Dede Komarudin<sup>2)</sup>, Susanto<sup>1)</sup> dan Hendig Winarno<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN

Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta Selatan 12440

<sup>2)</sup> Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila

Jl. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan

\* Email : ermin@batan.go.id

Diterima 13 September 2013; Disetujui 04 November 2013

#### ABSTRAK

**Pengaruh Iradiasi Gamma Terhadap Sitotoksitas Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada Sel Leukemia L1210.** Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) merupakan tanaman yang mengandung flavonoid, tanin, minyak atsiri dan secara empiris telah digunakan sebagai obat tradisional. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh iradiasi gamma pada aktivitas sitotoksitas daun sirih merah terhadap sel leukemia L1210 dan profil kromatogramnya. Daun sirih merah kering (kadar air 8,03%) diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 5; 7,5; 10 dan 15 kGy dengan sumber kobalt-60. Kemudian masing-masing sampel dimaserasi dalam tiga jenis pelarut secara bertahap, yaitu *n*-heksan, etil asetat dan etanol, sehingga diperoleh tiga jenis ekstrak. Uji aktivitas sitotoksitas ekstrak terhadap sel leukemia L1210 dilakukan dengan metode langsung dengan pewarnaan menggunakan tripan biru. Ekstrak etanol merupakan ekstrak yang paling aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 (IC<sub>50</sub> sebesar 13,12 µg/mL), selanjutnya difraksinasi dengan kolom kromatografi, diperoleh 7 fraksi. Fraksi 2 merupakan fraksi yang paling aktif menghambat sel leukemia L210 dengan IC<sub>50</sub> 4,12 µg/ml. Aktivitas sitotoksik fraksi 2 daun sirih merah sampai 7,5 kGy tidak mengalami perubahan bermakna dibandingkan dengan kontrol, tetapi pada dosis ≥ 10 kGy aktivitas sitotoksik fraksi 2 mengalami penurunan yang bermakna. Kromatogram KLT fraksi 2 dari daun sirih merah yang tidak dan yang diiradiasi sampai dosis 7,5 kGy tidak terlihat adanya perubahan, tetapi pada KLT-Densitometri dan spektrum GC-MS daun sirih merah terlihat adanya perubahan. Berdasarkan hasil aktivitas sitotoksik fraksi 2 terhadap sel leukemia L1210 dan profil KLT disimpulkan bahwa dosis 7,5 kGy merupakan dosis maksimum untuk iradiasi serbuk daun sirih merah tanpa mengubah bioaktivitasnya.

**Kata kunci :** iradiasi gamma, sitotoksitas, kromatogram, sirih merah, *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

#### ABSTRACT

***Effects of Gamma Irradiation on Cytotoxicity Against Leukemia L1210 Cells and Chromatogram Profile of Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Leaves.*** Sirih merah leaves *Piper crocatum* Ruiz & Pav. is a plant that contains flavonoids, tannins, volatile oil and empirically has been used as traditional medicine. This research aimed to study the effect of gamma irradiation on the cytotoxicity activity of *sirih merah* leaves against L1210 leukemia cells and their chromatograms profile, respectively. Dried *sirih merah* leaves (water content 8.03%) were irradiated with doses of 5, 7.5, 10 and 15 kGy using a cobalt-60 source. Then the samples were macerated in three kinds of solvent gradually, namely *n*-hexane, ethyl acetate, and ethanol, thus obtained three kinds of extracts. Cytotoxicity activity test were performed

against L1210 leukemia cells by the direct method using trypan blue staining. The most active extracts inhibited the growth of leukemia L1210 cells was ethanol extract ( $IC_{50}$  of 4.12  $\mu\text{g/ml}$ ), then fractionated by column chromatography, obtained 7 fractions. Fraction 2 was the most active fraction inhibited L210 leukemia cells with  $IC_{50}$  value 13.12  $\mu\text{g/ml}$ . Cytotoxic activity of fraction 2 of *sirih merah* leaves up to 7.5 kGy did not change significantly compared with the unirradiated sample, but at doses  $\geq 10$  kGy cytotoxic activity of fraction 2 were significantly decreased. TLC chromatogram of fraction 2 unirradiated and irradiated to a dose of 7.5 kGy were not seen any change, but the TLC-densitometric and GC-MS spectrum indicated changes. Based on the results of the cytotoxic activity of fraction 2 against L1210 leukemia cells and concluded that the TLC profiles of 7.5 kGy dose is the maximum dose for irradiation of *sirih merah* leaves without changing their bioactivity.

**Keywords :** gamma irradiation, cytotoxicity, chromatogram, *sirih merah*, *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

## PENDAHULUAN

Sejalan dengan tren 'back to nature' yang berkembang pada masyarakat, kebutuhan akan obat tradisional makin meningkat, baik untuk pengobatan suatu penyakit maupun pemeliharaan kesehatan. Menurut peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan (Badan POM) Indonesia, Obat herbal terstandar adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah (1,2). Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) antara lain mengandung metabolit sekunder yaitu senyawa flavonoid, alkaloid, senyawa polifenolat, tanin dan minyak atsiri yang sangat bermanfaat untuk pengobatan. Secara empiris ekstrak daun sirih merah mampu membasmi peradangan akut pada organ tubuh tertentu, luka yang sulit sembuh, kanker payudara dan kanker rahim, leukemia, TBC, radang pada lever, jantung koroner, darah tinggi, dan asam urat (3).

Daun sirih merah dapat berfungsi sebagai antikanker dan telah dibuktikan secara ilmiah melalui uji sitotoksik ekstrak metanol daun sirih merah terhadap sel kanker payudara (T47D) diperoleh nilai  $IC_{50}$  yaitu 44,25  $\mu\text{g/ml}$  (4). Ekstrak etanol daun sirih merah dengan konsentrasi 7,81-500  $\mu\text{g/ml}$  mempunyai aktivitas inhibisi dengan nilai  $IC_{50}$  123,18  $\mu\text{g/ml}$  terhadap sel kanker payudara (T47D) (5). Akan tetapi sedikit penelitian yang mempelajari efek iradiasi gamma terhadap sitotoksik simplisia sebagai

obat yang berpotensi sebagai anti kanker, khususnya pada daun sirih merah.

Penanganan paska panen (proses pengumpulan, penyimpanan, dan pengolahan bahan) tanaman obat harus ditangani dengan baik. Pada setiap proses kontaminasi mikroba dapat terjadi, oleh karena itu diperlukan teknik pengawetan simplisia. Salah satu teknik yang digunakan yaitu iradiasi gamma untuk memperpanjang masa simpan simplisia. Teknik iradiasi pada dosis 2,5 - 10 kGy untuk memperpanjang masa simpan simplisia bahan kosmetik maupun obat tradisional (6).

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas sitotoksik dari ekstrak maupun fraksi dari daun sirih merah menggunakan sel leukemia L1210, dan dilakukan pengecekan profil kromatogram menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan GC-MS (*Gas Chromatograph Mass Spectrometry*) untuk mengetahui adanya perubahan yang terjadi akibat iradiasi gamma sampai dosis 15 kGy. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari sampai seberapa jauh (besar dosis) iradiasi gamma yang digunakan dapat merusak aktivitas sitotoksik dan profil kromatogram ekstrak dan fraksi aktif daun sirih merah.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper*

*crocatum* Ruiz & Pav.) yang telah dideterminasi di Herbanium Bogoriense, Bogor. Daun kering dipotong-potong kasar (kadar air 8,03%) dan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat. Sel leukemia L1210 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi Laboratorium Kimia PATIR - BATAN yang mulanya berasal dari *The Institute of Physical and Chemical Research Jepang* (RIKEN).

Peralatan yang digunakan yaitu Iradiator Karet Alam dengan sumber  $^{60}\text{Co}$ , spektrofotometer uv-vis HP8453, kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu LC 9-A), densitometer, timbangan analitik, penguap putar vakum (Buchi), inkubator, otoklaf, desikator hampa, lampu UV (254 nm), alat kromatografi lapis tipis, *multi well plate tissue's culture*, *haemocytometer Neubauer improved*, *hot plate*, pencuci ultrasonik, dan alat-alat gelas.

#### Penyiapan bahan untuk iradiasi gamma

Sampel daun sirih merah seberat 100 gram yang sudah dimasukkan ke dalam kantong plastik poli etilen (10 kantong sampel). Delapan kantong sampel masing-masing selanjutnya diiradiasi dengan sumber gamma  $^{60}\text{Co}$  pada dosis 5; 7,5; 10; 15 kGy, masing-masing dosis dilakukan 2 kali ulangan. Laju dosis sebesar 10 kGy/jam. Iradiasi dosis 5; 7,5; 10; dan 15 kGy masing-masing diiradiasi selama 30 ; 45; 60 dan 90 menit. Dua kantong sampel tidak diiradiasi, selanjutnya digunakan sebagai kontrol.

#### Pembuatan ekstrak dan pemisahan ekstrak dengan kolom kromatografi

Sebanyak 100 g serbuk daun tanpa iradiasi dan yang telah diiradiasi pada dosis bervariasi masing-masing diekstrak dengan pelarut etil asetat 2 liter selama 48 jam secara maserasi 3 kali pada suhu kamar (26°C). Filtrat disaring dan diuapkan dengan penguap putar vakum untuk mendapatkan ekstrak kering. Ekstrak yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah pada suhu *freezer* (-18°C). Selanjutnya dengan cara yang sama pelarut diganti berturut-turut dengan etil asetat dan etanol.

Ketiga ekstrak yang diperoleh diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210. Ekstrak yang paling aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 dipilih untuk difraksinasi dengan kolom kromatografi menggunakan fase diam silika gel 60. Sebanyak 1 gram ekstrak etanol dimasukkan ke dalam kolom kromatografi. Pemisahan dilakukan dengan pengeluan sistem landaian (gradien) diklorometan : metanol (30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1) dan metanol. Masing-masing fraksi dikumpulkan dengan volume 150 ml. Fraksi yang diperoleh dipekatkan kemudian dikeringkan dalam desikator vakum hingga diperoleh bobot konstan. Kemudian terhadap tiap fraksi dilakukan pemeriksaan KLT. Fraksi-fraksi yang memiliki pola KLT yang sama digabung menjadi satu fraksi.

#### Analisis kromatografi lapis tipis

Ekstrak yang paling aktif dari daun sirih merah yaitu etanol dan fraksi-fraksi hasil fraksinasi dari ekstrak paling aktif dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Masing-masing larutan sampel dibuat dengan konsentrasi yang sama 1600 µg/ml etanol. Lalu ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler pada lempeng lempeng silika gel GF<sub>254</sub> nm. Fraksi 1 sampai 7 dielusi dengan fase gerak diklorometan: metanol berturut-turut dengan perbandingan 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 1:1, dan 1:2. Setelah elusi, bercak diamati dan ditandai di bawah sinar UV 254 nm, lempeng disemprot dengan pereaksi 1% serum sulfat dalam 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lalu dikeringkan di atas pemanas listrik (*hot plate*) hingga terbentuk bercak yang tetap.

#### Pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210

Pembuatan media dilakukan dengan melarutkan RPMI-1640 yang telah mengandung L-glutamin dan NaHCO<sub>3</sub> dalam air steril (7). Sampel yang diuji aktivitas sitotoksiknya yaitu ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol dari sampel kontrol dan yang diradiasi. Variasi konsentrasi bahan uji yang digunakan yaitu: 5, 10, 20, 40 dan 80

$\mu\text{g}$  ekstrak/ml, sedangkan untuk fraksi dengan variasi konsentrasi yang lebih kecil yaitu 1, 2, 4, 8 dan 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pengujian aktivitas sitotoksik dilakukan sesuai prosedur yang digunakan oleh Winarno (7).

### Analisis KLT-Densitometri

Ekstrak etanol dan fraksi paling aktif dari daun sirih merah yang tidak dan yang diradiasi dengan konsentrasi 1600 ppm ditotolkan sebanyak 60  $\mu\text{l}$  pada lempeng silika gel GF<sub>254</sub>, kemudian masing-masing dielusi dengan diklorometan : metanol : air (7: 3 :1) dan diklorometan : metanol (20:1). Profil kromatogramnya diperiksa pada panjang gelombang 210 nm dengan alat KLT-Densitometer.

### Analisis GC-MS (Gas Chromatograph Mass Spectrometry)

Fraksi paling aktif (fraksi 2) ekstrak etanol dari sampel kontrol dan yang diiradiasi dengan dosis maksimum (terbaik) dianalisis dengan GC-MS HP5 (Gas Chromatograph Mass Spectrometry) untuk mengetahui komponen senyawanya. Dibuat konsentrasi yaitu 0,1684 g/ml dalam pelarut etanol 99 % dan diinjeksikan sebanyak 1  $\mu\text{l}$ . Kondisi GC-MS menggunakan kolom kapiler HP-5 (Agilent 199091J-433: 0,25 mm x 30 m x 0,25  $\mu\text{m}$  mengandung 5% difenil 95% dimetilpolisilosan), laju alir yang digunakan adalah 1,0 ml/menit dengan suhu injeksi 300 °C mode split, dan tekanan 10,47 psi. Gas pembawa yang digunakan adalah He (Helium). Kondisi MS adalah suhu MS *quad*, 150-200 °C dan suhu MS *source*, 250-300° C. Hasil kromatogram dianalisis dengan *database* untuk menentukan komponen senyawa yang terkandung di dalamnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pembuatan Ekstrak

Hasil ekstraksi serbuk kering daun sirih merah yang tidak diiradiasi (kontrol) maupun yang diiradiasi 5; 7,5; 10; 15 kGy masing-masing diperoleh rendemen dengan bobot antara 2,6 - 2,8 % (ekstrak *n*-heksan),

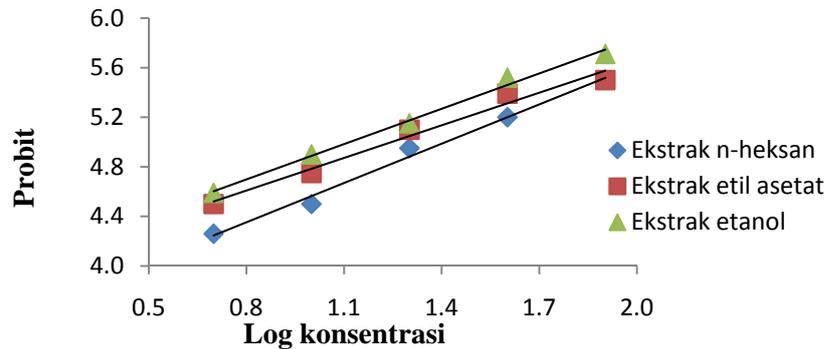
3,7 - 3,8 % (ekstrak etil asetat) dan 4,2 - 4,5 % (ekstrak etanol). Ekstrak etanol memiliki rendemen yang paling banyak dibandingkan ekstrak *n*-heksan dan etil asetat. Pelarut etanol bersifat lebih polar dibandingkan dengan *n*-heksan dan etil asetat, sehingga lebih banyak menarik komponen-komponen yang bersifat semipolar dan polar dalam daun sirih. Rendemen di dalam etanol paling tinggi, terkait dengan jenis komponen daun sirih bersifat semipolar dan polar banyak terekstraksi dalam etanol. Hasil analisis berat rendemen ekstrak etanol dengan uji anova satu arah menggunakan SPSS 16 pada taraf kepercayaan 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) menunjukkan bahwa dosis iradiasi gamma dengan berbagai dosis tidak mempengaruhi bobot rendemen dan juga tidak ada perbedaan bobot rendemen antara sampel yang diiradiasi dengan yang tidak diiradiasi.

### Uji sitotoksitas ekstrak terhadap sel leukemia L1210

Ketiga ekstrak daun sirih merah yang tidak diiradiasi diuji aktivitas sitotoksiknya untuk mengetahui ekstrak mana yang paling aktif. Berdasarkan hasil perhitungan sel leukemia L1210 dibuat grafik probit vs log konsentrasi bahan uji (Gambar 1), dari persamaan garis linier maka diperoleh nilai IC<sub>50</sub> dari masing-masing ekstrak. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol masing-masing 17,63 dan 13,12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , hal ini menunjukkan bahwa kedua ekstrak tersebut berpotensi sebagai anti kanker. Suatu ekstrak dikategorikan aktif menghambat sel leukemia L1210 jika IC<sub>50</sub>  $\leq$  20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (8). Ekstrak etanol merupakan ekstrak paling aktif dibandingkan ekstrak *n*-heksan (IC<sub>50</sub> 26,55  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dan etil asetat dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 13,12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### Pemisahan ekstrak etanol dengan kolom kromatografi

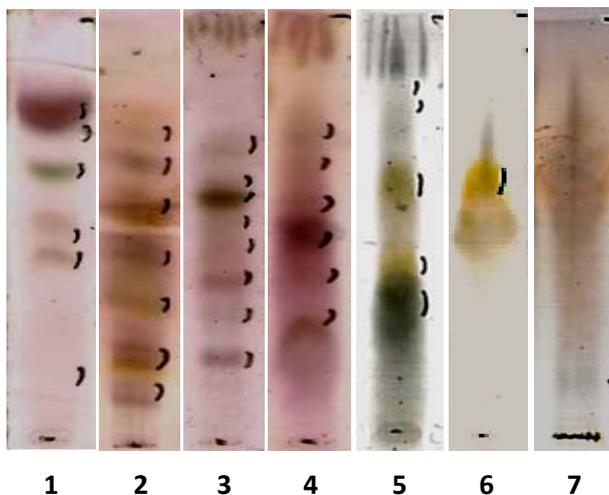
Setelah diketahui bahwa ekstrak etanol merupakan ekstrak yang paling aktif dari daun sirih merah, maka dilakukan kolom kromatografi terhadap ekstrak etanol. Fraksi-fraksi yang ditampung berjumlah 25 fraksi. Dari hasil penggabungan berdasarkan



**Gambar 1.** Grafik hubungan antara log konsentrasi dan probit ekstrak daun sirih merah yang tidak diiradiasi

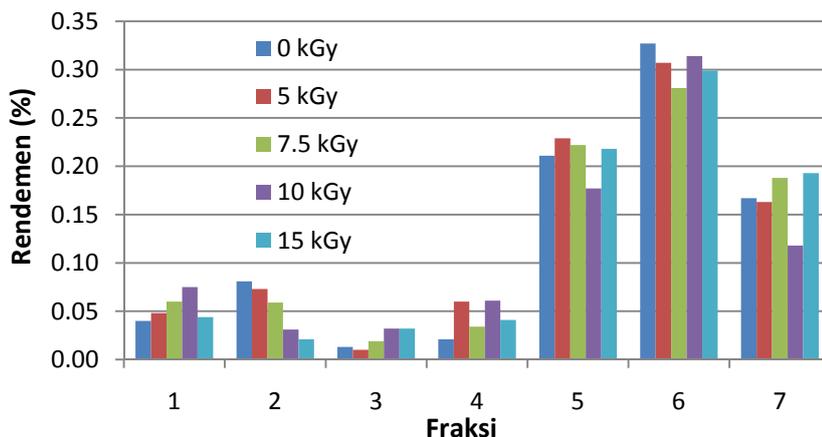
kesamaan pola KLT fraksi-fraksi tersebut, maka diperoleh 7 fraksi dari masing-masing sampel ekstrak etanol sampel yang tidak dan yang diiradiasi. Gambar pola kromatogram fraksi 1 sampai 7 dari ekstrak etanol daun sirih merah yang tidak diiradiasi disajikan pada Gambar 2 dan rendemen fraksi disajikan pada Gambar 3. Bercak paling banyak terdapat pada fraksi 2, 3 dan 4, banyak mengandung komponen-komponen yang bersifat semipolar. Seiring meningkatnya kepolaran fase gerak, komponen-komponen yang terbawa juga yang bersifat makin polar, terlihat pada fraksi 5, 6 dan 7 namun jumlah komponennya makin berkurang.

Rendemen bobot fraksi 1 sampai fraksi 7 dari sampel 0 kGy (yang tidak diiradiasi) dan yang diiradiasi bervariasi antara 0,01 % sampai 0,33 %. Hasil rendemen bobot fraksi menunjukkan bahwa fraksi 3 merupakan rendemen terkecil sedangkan fraksi 6 merupakan rendemen bobot paling besar. Rendemen setelah iradiasi ada yang meningkat (fraksi 1,3, 4 dan 7), ada juga yang menurun bobotnya (fraksi 2 dan 6). Berat fraksi 5 relatif stabil kecuali pada dosis 10 kGy mengalami penurunan bobot. Hal ini diduga disebabkan adanya pengaruh iradiasi gamma terhadap komponen-komponennya yang mengalami perubahan struktur atau perubahan gugus fungsinya sehingga terjadi



Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>  
 Fase gerak :  
 Fr 1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (30:1)  
 Fr 2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (20:1)  
 Fr 3 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (10:1)  
 Fr 4 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (5:1)  
 Fr 5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (4:1)  
 Fr 6 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (1:1)  
 Fr 7 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (1:2)  
 Deteksi : sinar UV 254 nm  
 Penampak bercak : 1% serum sulfat dlm asam sulfat 10%

**Gambar 2.** Kromatografi KLT fraksi 1 s.d 7 ekstrak etanol dari daun sirih yang tidak diiradiasi

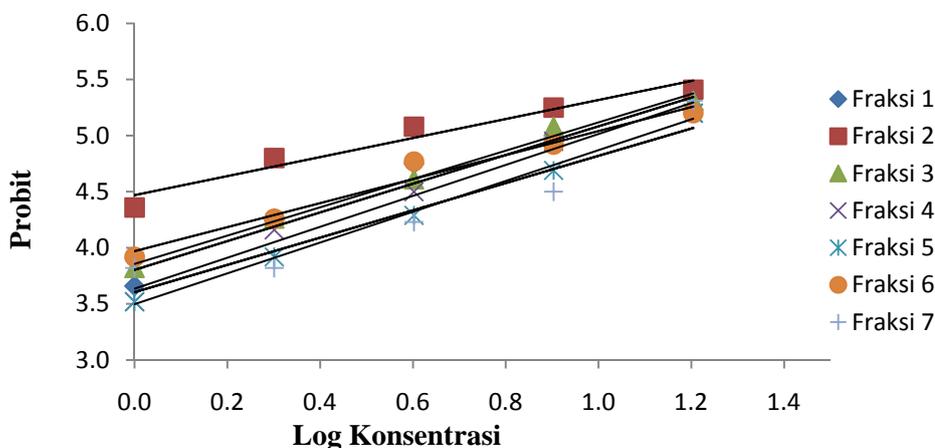


**Gambar 3.** Rendemen fraksi 1 sampai 7 dari ekstrak etanol yang berasal dari daun sirih yang tidak dan yang diiradiasi

perbedaan bobot komponen-komponen yang terekstrak ke dalam pelarut etanol selama maserasi. Hal yang sama juga terjadi pada penelitian terdahulu dengan bahan benalu teh iradiasi, berat fraksi 1 meningkat setelah iradiasi dosis  $\geq 5$  kGy, fraksi 2 berkurang setelah iradiasi  $\geq 7,5$  kGy dan fraksi 3 berkurang pada dosis  $\geq 5$  kGy, dan berat fraksi 4 tidak ada perbedaan bermakna dibandingkan dengan kontrol (9). Khususnya fraksi 2 dari ekstrak etanol daun sirih akibat iradiasi gamma terjadi penurunan berat fraksi, pengaruh terhadap aktivitas sitotoksiknya dibahas lebih lanjut.

**Uji sitotoksitas fraksi-fraksi (dari sampel yang tidak diiradiasi) dan fraksi aktif terhadap sel leukemia L1210**

Uji aktivitas sitotoksik fraksi terhadap sel leukemia L1210 hanya dilakukan pada fraksi 1 sampai 7 dari ekstrak etanol sampel yang tidak diiradiasi untuk mengetahui fraksi mana yang paling aktif. Hasil uji sitotoksitas ditampilkan pada grafik hubungan antara log konsentrasi pada Gambar 4. Dari hasil uji aktivitas sitotoksitas fraksi 1 sampai 7 berdasarkan grafik tersebut diperoleh nilai  $IC_{50}$  berturut-turut 8,62; 4,22; 8,06; 9,76; 12,44; 9,18 dan



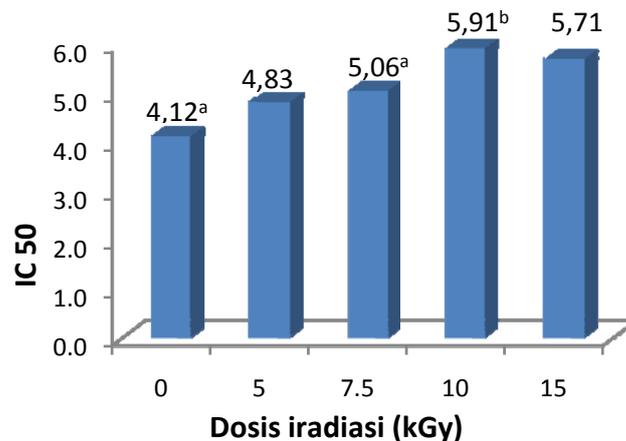
**Gambar 4.** Grafik antara log konsentrasi dan probit fraksi 1 sampai 7 dari ekstrak etanol daun sirih merah yang tidak diiradiasi

14,07 µg/ml, masing-masing fraksi tergolong sangat aktif ( $IC_{50} \leq 20$  µg/ml). Menurut *American National Cancer Institute* oleh Fathiah Abdullah, ekstrak dengan  $IC_{50} \leq 20$  µg/ml, dinyatakan aktif menghambat pertumbuhan sel kanker (8). Fraksi 2 merupakan fraksi paling aktif karena memiliki nilai  $IC_{50}$  paling kecil yaitu 4,22 µg/ml. Fraksi 2 dipilih untuk dianalisis lebih lanjut.

Uji aktivitas sitotoksik selanjutnya hanya dilakukan terhadap fraksi 2 dari sampel yang diiradiasi, untuk mengetahui apakah iradiasi mempengaruhi sitotoksitas dari fraksi 2. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh disajikan pada Gambar 5. Hasil uji aktivitas fraksi 2 dari sampel yang diiradiasi menunjukkan bahwa fraksi tersebut mengalami penurunan aktivitas sitotoksik

bermakna antara kontrol dan yang diiradiasi. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 5, nilai  $IC_{50}$  memiliki notasi huruf yang sama antara kontrol dengan dosis 5 kGy dan 7,5 kGy. Pada dosis 10 kGy dan 15 kGy nilai  $IC_{50}$  memiliki notasi huruf berbeda dengan sampel yang tidak diiradiasi, hal ini berarti bahwa aktivitas sitotoksiknya telah mengalami perubahan yang bermakna dibandingkan dengan sampel yang tidak diiradiasi.

Aktivitas sitotoksik fraksi 2 pada dosis iradiasi  $\geq 10$  kGy mengalami penurunan, hal ini sesuai dengan berat rendemen fraksi 2 menurun dengan kenaikan dosis iradiasi. Efek kimia radiasi tergantung komposisi bahan dan besar energi yang diberikan. Penyebabnya diduga karena adanya efek langsung radiasi gamma pada molekul



angka dengan notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata

**Gambar 5.** Diagram batang pengaruh dosis iradiasi pada nilai  $IC_{50}$  fraksi 2

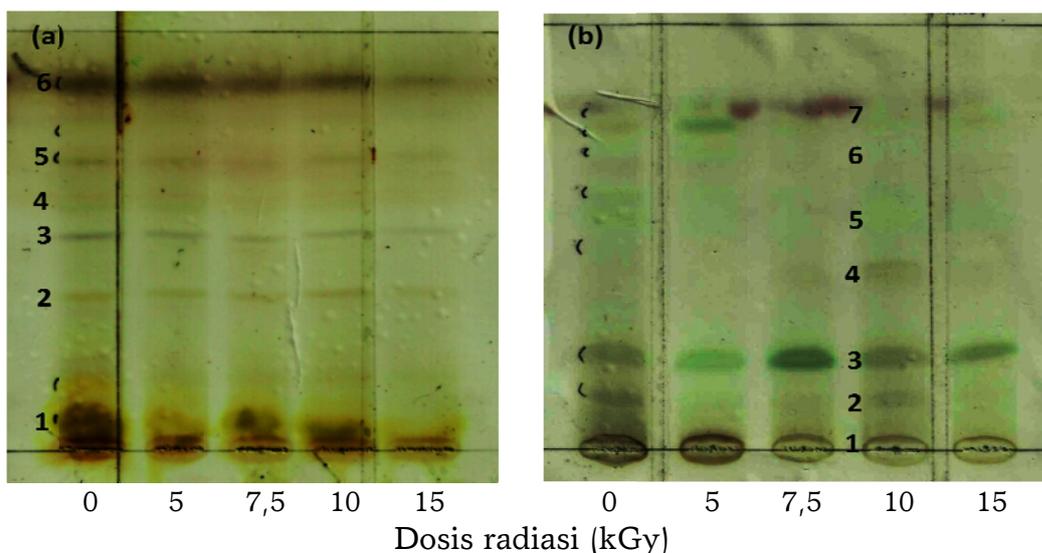
terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210 seiring dengan peningkatan dosis iradiasi. Hal ini ditunjukkan oleh peningkatan nilai  $IC_{50}$ , namun masih dapat dikatakan sangat aktif karena nilai  $IC_{50} \leq 20$  µg/ml. Hasil analisis data  $IC_{50}$  ekstrak etanol dengan uji anova satu arah menggunakan SPSS 16 pada taraf kepercayaan 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) menunjukkan bahwa dosis iradiasi gamma  $\leq 7,5$  kGy menurunkan aktivitas sitotoksik fraksi 2, namun tidak ada perubahan yang

organik, makin besar dosis yang diberikan, energi eksitasi sinar gamma secara acak menyerang ikatan molekul yang lemah (10). Kerusakan ini menyebabkan terjadinya perubahan fisika dan kimia dari komponen dalam daun sirih merah. Perubahan ini berdampak pada penurunan bioaktivitas komponen-komponen dalam daun sirih merah. Perubahan fisika seperti pada *Curcuma longa* dan *aromatica* mengalami perubahan warna dari kuning tua menjadi

kuning muda setelah diiradiasi 15 kGy (11), demikian juga warna hijau tua daun sirih merah mengalami pemucatan warna dari hijau tua kemerahan menjadi hijau kusam setelah diiradiasi 10 dan 15 kGy. Perubahan bioaktivitas terlihat pada kenaikan dosis iradiasi pada *Lupin seeds (Lupinus Polyphyllu)* menyebabkan penurunan antioksidan (12), demikian juga pada kenaikan dosis iradiasi pada lada hitam 5-30 kGy menyebabkan kemampuan *scavenging* radikal DPPH menurun secara bermakna (13). Pengaruh iradiasi gamma dosis 7,5 kGy pada aktivitas sitotoksitas beberapa ekstrak herbal terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210 menunjukkan bahwa tidak ada perubahan yang bermakna dibandingkan dengan kontrol. Beberapa herbal tersebut adalah

### Analisis ekstrak etanol dan fraksi 2 dari ekstrak etanol secara KLT dan KLT-Densitometri

Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak etanol dan fraksi 2 ekstrak etanol dengan penampak bercak serum sulfat, berturut-turut ditunjukkan pada Gambar 6. Kromatogram ekstrak etanol daun sirih merah yang tidak diiradiasi memiliki 6 bercak (Gambar 6a). Setelah iradiasi tidak terlihat adanya perbedaan jumlah bercak antara kontrol yang tidak diradiasi dengan yang diradiasi sampai 7,5 kGy, hal ini didukung oleh rendemen ekstrak etanol tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan kontrol. Profil kromatogram ekstrak etanol menunjukkan adanya pemudaran bercak 1 dan 6 pada



Fase gerak :  $\text{CHCl}_2$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  (7 : 3 : 1)      Fase gerak :  $\text{CHCl}_2$  : MeOH (20:1)  
Fase diam : Silika gel GF<sub>254</sub>  
Deteksi : Sinar UV 254 nm  
Penampak bercak : 1% serum sulfat dalam asam sulfat 10%

**Gambar 6.** Kromatogram lapis tipis ekstrak etanol (a) dan fraksi 2 ekstrak etanol (b)

daun kering mahkota dewa (14), daun keladi tikus (15), benalu teh (9), temu putih (16), daun sambiloto (17), dan daun sirsak (18). Iradiasi gamma tidak melebihi dosis 10 kGy disarankan untuk iradiasi daun sambung nyawa (19). Selanjutnya sifat kimia fraksi 2 dapat dijelaskan melalui profil KLTnya.

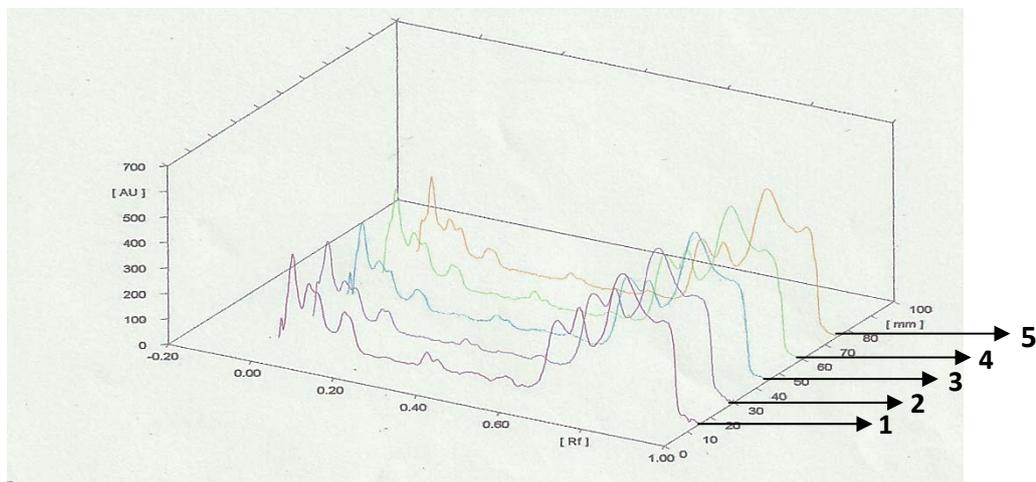
dosis 15 kGy, sedangkan pemudaran bercak 5 mulai terjadi pada dosis  $\geq 10$  kGy. Pada dosis 5; 7,5 dan 15 kGy bercak 2 memudar, tetapi pada dosis 10 kGy masih terdapat bercak 2.

Profil kromatogram lapis tipis ekstrak etanol dari daun sirih yang tidak diiradiasi

maupun yang diiradiasi dianalisis dengan KLT- Densitometri pada  $\lambda$  210 nm disajikan pada Gambar 7. Pada ekstrak etanol terdeteksi 19 puncak utama dan minor, dan luas area puncak hasil densitometri ditunjukkan di Tabel 1. Puncak-puncak utama (1, 2, 3, 4, 5 dan 6) tidak mengalami perubahan setelah diiradiasi, tetapi mengalami penurunan luas area. Hal ini diduga karena adanya kerusakan komponen akibat iradiasi gamma, yang menyebabkan senyawa mengalami degradasi. Pada Gambar 6b dosis radiasi 10 kGy terdapat bercak 4 tetapi pada sampel kontrol dan

yang diiradiasi 5; 7,5; dan 15 kGy tidak terdapat bercak tersebut, hal ini menunjukkan adanya komponen baru yang terbentuk.

Pada Gambar 6b fraksi 2 etanol dari daun sirih merah yang tidak diiradiasi mempunyai 7 bercak. Perubahan bercak terjadi mulai dosis 5 sampai 15 kGy. Walaupun banyak bercak yang menghilang atau memudar namun bila dilihat dari nilai  $IC_{50}$ , fraksi 2 masih dalam kategori aktif  $\leq 20 \mu\text{g/ml}$ , kecuali mulai dosis 10 kGy terjadi perubahan bermakna. Hal ini diduga bahwa komponen-komponen (bercak 2) yang



Keterangan :

1. Merah untuk sampel yang tidak diiradiasi atau kontrol
2. Ungu untuk 5 kGy
3. Biru untuk 7,5 kGy
4. Hijau untuk 10 kGy
5. Jingga untuk 15 kGy

**Gambar 7.** Profil 3D ekstrak etanol pada serapan  $\lambda$  210 nm

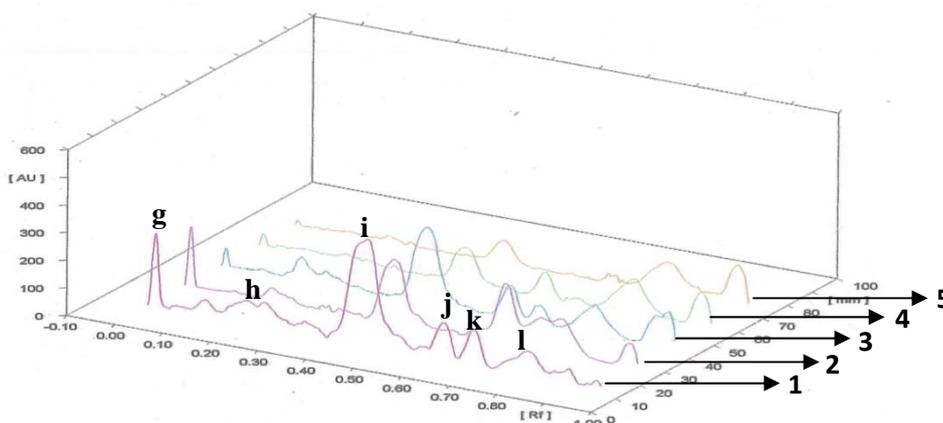
**Tabel 1.** Data KLT-Densitometri Ekstrak Etanol

Puncak	Rf	Luas area				
		0 kGy	5 kGy	7,5 kGy	10 kGy	15 kGy
1	0,06-0,07	7815 $\pm$ 16	8323 $\pm$ 24	7400 $\pm$ 42	10171 $\pm$ 81	7452 $\pm$ 52
2	0,14-0,16	10113 $\pm$ 19	1370 $\pm$ 85	2474 $\pm$ 29	2951 $\pm$ 42	-
3	0,66-0,67	14001 $\pm$ 28	15609 $\pm$ 12	14745 $\pm$ 58	14649 $\pm$ 67	13677 $\pm$ 96
4	0,71-0,72	13245 $\pm$ 11	12726 $\pm$ 107	10625 $\pm$ 73	124578 $\pm$ 62	10070 $\pm$ 78
5	0,82-0,83	52086 $\pm$ 22	50161 $\pm$ 42	54783 $\pm$ 100	50057 $\pm$ 62	49274 $\pm$ 85
6	0,91-0,93	14200 $\pm$ 20	19848 $\pm$ 37	10925 $\pm$ 39	17244 $\pm$ 52	15988 $\pm$ 130

menghilang setelah sampel diiradiasi bukanlah komponen-komponen yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210. Perubahan kimia komponen juga terjadi pada kayu manis yang diiradiasi 10 kGy dan menyebabkan kadar senyawa fenolik meningkat sedangkan tannin terdegradasi (20). Iradiasi dosis 2,5 - 30 kGy pada biji kacang velvet (*Mucuna pruriens*) menyebabkan asam lemak tidak jenuh menurun secara bermakna, asam linoleat yang semula tidak ada sebelum iradiasi, kemudian terdeteksi setelah iradiasi (21).

Hasil analisis KLT - densitometri terhadap fraksi 2, baik yang tidak diiradiasi

mapun yang diiradiasi, densitogramnya disajikan di Gambar 8 dengan jumlah puncak utama dan minor sebanyak 18, sedangkan luas area puncaknya ditampilkan di Tabel 2. Secara umum profil densitogram pada  $\lambda$  210 nm, setelah iradiasi dosis  $\geq 7,5$  kGy terjadi perubahan luas area puncak-puncak seperti penurunan luas puncak 1 dan 3. Ada pula yang mengalami peningkatan luas area, diduga akibat iradiasi gamma terjadi perubahan sifat pada suatu komponen yang menyebabkan kepolarannya berubah. Komponen yang berubah ini bergabung dengan komponen lain yang kepolarannya sama, sehingga terlihat intensitas bercak meningkat (luas area



**Gambar 8.** Profil 3D serapan pada  $\lambda$  210 nm fraksi 2 daun sirih merah

- Keterangan :
1. Warna merah untuk 0 kGy atau kontrol
  2. Warna ungu untuk 5 kGy
  3. Warna biru untuk 7,5 kGy
  4. Warna hijau untuk 10 kGy
  5. Warna jingga untuk 15 kGy

**Tabel 2.** Data KLT-Densitometri fraksi 2 daun sirih merah

Puncak	Rf	Luas area				
		0 kGy	5 kGy	7,5 kGy	10 kGy	15 kGy
1	0,01-0,03	3436 ± 21	2202 ± 77	516 ± 13	435 ± 10	65 ± 1
2	0,20-0,23	3931 ± 44	331 ± 28	1374 ± 23	435 ± 7	588 ± 14
3	0,43-0,46	22825 ± 84	11981 ± 222	14142 ± 60	6243 ± 10	3404 ± 36
4	0,60-0,63	4219 ± 36	-	3855 ± 46	2861 ± 44	-
5	0,67-0,68	3748 ± 52	926 ± 34	1895 ± 10	445 ± 8	368 ± 5
6	0,78-0,80	4798 ± 41	5424 ± 56	5434 ± 37	7872 ± 52	7561 ± 49

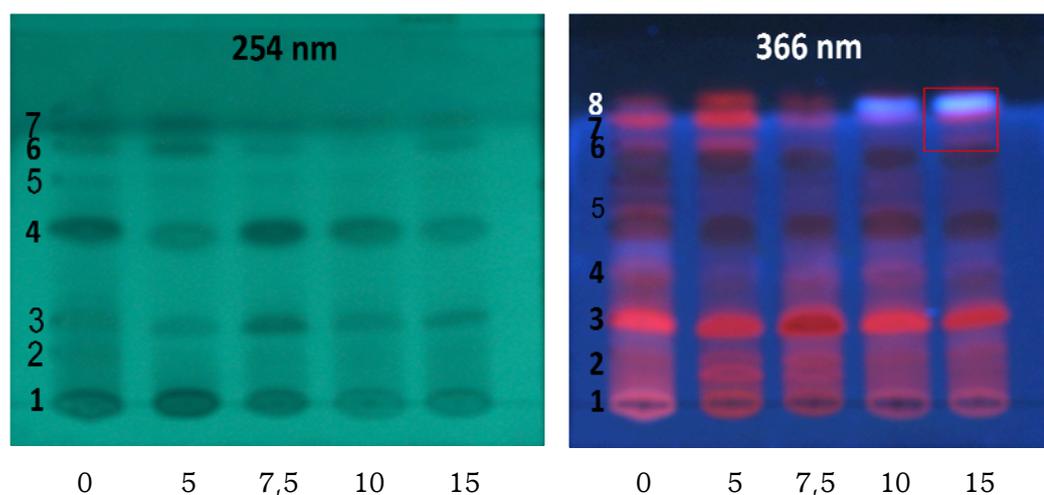
meningkat). Pengaruh iradiasi terhadap komponen aktif tanaman obat agak sulit disimpulkan, karena kadang terjadi penurunan atau kadang terjadi peningkatan kadarnya (22). Kadar total fenol dan aktivitas antioksidan buah delima yang diiradiasi 5-25 kGy dan kulit almond (dosis 16,3 kGy) meningkat seiring dengan meningkatnya dosis sampai 10 kGy (23,24). Kadar zat-zat yang bersifat oksidatif dalam cengkeh meningkat secara proporsional seiring meningkatnya dosis iradiasi 5-30 kGy (25). Iradiasi dosis 10 kGy secara bermakna menurunkan total askorbat dalam lada hitam, kayu manis, nutmeg (pala), oregano, dan sage (*Salvia officinalis*), juga menurunkan karotenoid dalam kayu manis, oregano, parsley (peterseli), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), bird pepper (*Capsicum*) dan sage (26). Meskipun pada dosis 5 dan 7,5 kGy telah terjadi perubahan pada komponen dalam fraksi 2, namun hal ini tidak menyebabkan perubahan bermakna pada khasiatnya dalam menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210.

Gambar 9 memperlihatkan kromatogram KLT fraksi 2 pada  $\lambda$  254 nm yang menunjukkan adanya 7 bercak dan tidak berubah pada sampel yang diiradiasi sampai dosis 15 kGy. Pada  $\lambda$  366 nm terlihat

adanya 8 bercak dan perubahan bercak terjadi setelah iradiasi 5 kGy, bercak 4 memudar dan bercak 8 menjadi semakin jelas. Efek kimia radiasi dapat menyebabkan kerusakan struktur kimia zat aktif dalam sampel (27). Pada dosis 10 dan 15 kGy terjadi pemudaran cahaya pada bercak 7 dan 8. Hal ini disebabkan adanya kerusakan komponen akibat iradiasi gamma. Pemudaran intensitas warna pada KLT diduga adanya kerusakan struktur molekul pada komponen-komponen dalam daun sirih merah akibat iradiasi gamma. Pada daun keladi tikus yang diiradiasi 10 dan 15 kGy bercak yang tidak muncul, sedangkan pada kontrol dan yang diiradiasi sampai dosis 7,5 kGy bercak komponen tersebut masih ada (15). Pada dosis 10 dan 15 kGy, muncul komponen baru yang berfluoresensi, namun tidak terlihat pada sampel kontrol dan yang diiradiasi 5 dan 7,5 kGy. Hal ini terjadi akibat suatu komponen daun sirih menyerap energi iradiasi gamma menyebabkan komponen tersebut dapat berfluoresensi.

#### Analisis Fraksi Aktif (fraksi 2 etanol) dengan GC-MS

Kromatogram fraksi 2 etanol daun sirih merah dengan dosis 0 kGy dan 7,5 kGy dapat dilihat pada Gambar 10 dan 11, serta

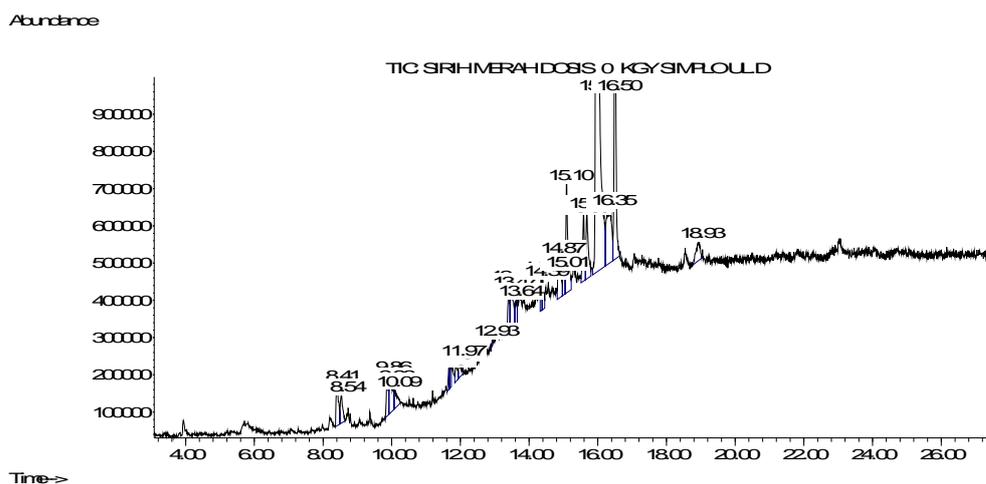


**Gambar 9.** Foto KLT fraksi 2 pada  $\lambda$  254 dan 366 nm

Fase gerak : Diklorometan : metanol (20:1)  
Fase diam : Silika gel GF<sub>254</sub>

data base Willey 7 pada Tabel 3 dan 4. Pada kromatogram fraksi 2 etanol dari daun sirih yang tidak diiradiasi (Gambar 10) terdapat 2 puncak yang mempunyai kemiripan di atas 90 (Data Base Wiley 7). Senyawa pertama pada waktu retensi 8,4 menit dengan luas area 1,89 % dan puncak dengan kemiripan 93 diduga sebagai senyawa loliolida. Senyawa loliolida ini mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (28). Puncak di waktu retensi 10,09 menit adalah senyawa yang mirip dengan asam palmitat menurut Data Base Wiley 7. Pada kromatogram fraksi 2 etanol yang diiradiasi dengan dosis 7,5 kGy (Gambar 11), teramati adanya puncak dengan waktu retensi 8,42 menit sesuai dengan senyawa loliolida (kemiripan 92).

diiradiasi sampai dosis 7,5 kGy masih menunjukkan tidak ada perubahan yang bermakna. Pada dosis iradiasi 10-25 kGy senyawa mudah menguap dalam kayumanis berkurang setelah diiradiasi (29), demikian juga setelah diiradiasi 2,5 - 10 kGy persentase asam lemak tak jenuh dalam jintan hitam berkurang dan asam lemak trans meningkat (30). Penelitian yang mendalam untuk mempelajari pengaruh iradiasi gamma pada bioaktivitas dan komponen aktif obat herbal perlu dilakukan untuk menentukan dosis optimum setiap jenis obat herbal, karena efek radiasi gamma berbeda-beda pada setiap tanaman. Hal-hal lain yang berpengaruh yaitu bentuk sampel (padat, cair atau kering, berapa kadar



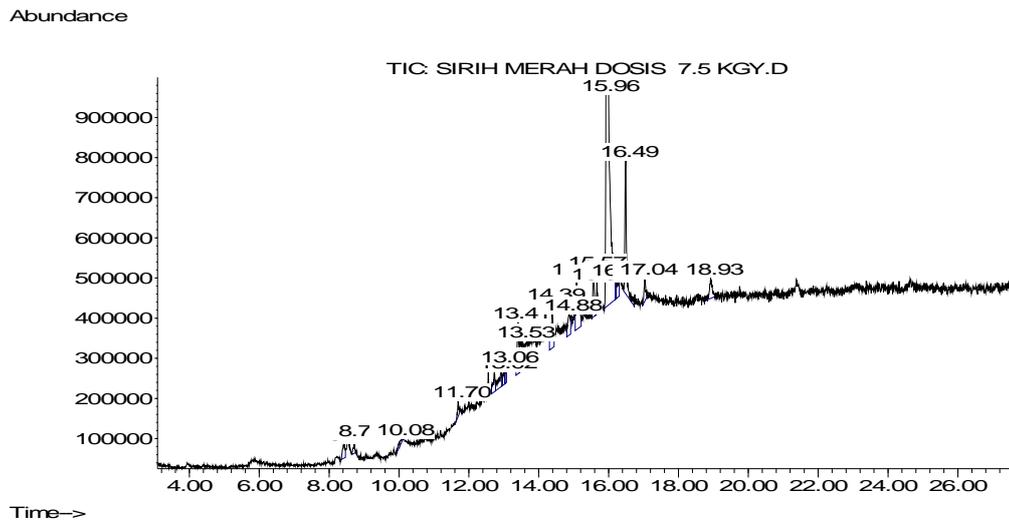
**Gambar 10.** Kromatogram GC-MS Fraksi 2 dari daun sirih yang tidak diiradiasi

**Tabel 3.** Data Base Wiley 7 fraksi 2 etanol dari sampel yang tidak diiradiasi

Peak	RT	Senyawa	Area (%)	Kemiripan
1	8,40	Loliolida	1,89	93
2	10,09	Asam palmitat	1,04	93

Dari kromatogram yang sama tidak terlihat adanya senyawa asam palmitat di waktu retensi sekitar 10.09 menit, hal ini diduga senyawa tersebut mengalami kerusakan akibat radiasi. Meskipun demikian hasil analisis uji sitotoksik fraksi 2 etanol yang

airnya), proses iradiasi (laju dosis, suhu selama sampel diiradiasi) dan prosedur percobaan (metode ekstraksi, pelarut, penyimpanan, dan kemasan) yang dibutuhkan (23).



**Gambar 11.** Kromatogram GC-MS Fraksi 2 dari daun sirih yang diiradiasi 7,5 kGy

**Tabel 4.** Data Base Wiley 7 fraksi 2 etanol dari sampel yang diiradiasi 7,5 kGy

Peak	RT	Senyawa	Area (%)	Kemiripan
1	8,42	Loliolida	1,24	92

## KESIMPULAN

Aktivitas sitotoksik fraksi 2 etanol daun sirih merah yang diiradiasi sampai 7,5 kGy tidak mengalami perubahan bermakna dibandingkan dengan kontrol, tetapi pada dosis  $\geq 10$  kGy aktivitas sitotoksiknya mengalami perubahan yang bermakna. Kromatogram KLT fraksi 2 etanol dari daun sirih merah yang tidak dan yang diiradiasi sampai dosis 7,5 kGy tidak menunjukkan adanya perubahan, sedangkan KLT-Densitometri dan spektrum GC-MS memperlihatkan adanya perubahan. Hasil uji aktivitas sitotoksik fraksi 2 etanol terhadap sel leukemia L1210 dan profil KLT dari fraksi tersebut dapat disimpulkan bahwa dosis 7,5 kGy merupakan dosis maksimum untuk iradiasi serbuk daun sirih merah tanpa mengubah bioaktivitasnya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. BPOM R.I., Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. : HK.00.05.41.1384 tentang Kriteria dan tata laksana pendaftaran Obat Tradisional, Obat Herbal terstandar dan fitofarmaka, 2 (2005).
2. WASITO, H., Obat Tradisional Kekayaan Indonesia, Yogyakarta, Graha Ilmu, 1-13 (2011).
3. SUDEWO, B., Basmi penyakit dengan Sirih Merah Revisi. Jakarta, Agro Media Pustaka, 1-45 (2010).
4. WICAKSONO, B.D., HANDOKO, Y.A., ARUNG, T.E., Antiproliferative Effect of the Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells *In-vitro*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, August, 8 (4), 345-352 (2009).
5. YULIANTI, E., RAHAYU, T., MERCURANI, I.S., Potensi Ekstrak Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Sebagai Antikanker.

- Universitas Negeri Yogyakarta; Yogyakarta. Diambil dari: [http://www.scribd.com/doc/44534193/Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah Piper Crocatum Sebagai Obat Alternatif Antikanker Payudara](http://www.scribd.com/doc/44534193/Potensi-Ekstrak-Daun-Sirih-Merah-Piper-Crocatum-Sebagai-Obat-Alternatif-Antikanker-Payudara). Diakses tanggal 13 Mei 2011.
6. JANUWATI, M., Peran Teknik Nuklir Dalam Argoindustri Tanaman Obat. Risalah Seminar Ilmiah Apikasi Isotop dan Radiasi. Jakarta: BATAN, 8-27 (2006).
  7. KATRIN, E., YULIANTI, M., and WINARNO, H., Effectiveness of gamma irradiation for decontamination of microbes on tea parasite herb *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans, *Atom Indonesia*, **37** (3), 107-112 (2011).
  8. SUFFNESS, M. and PEZZUTO, J.M., Assay related to cancer drug, Method in plant biochemistry, Editor by Harbone J.B., Dey P.M., New York, Academic Press, 84 (1991).
  9. KATRIN, E., YULIANTI, M., and WINARNO, H., Effectiveness of gamma irradiation for decontamination of microbes on tea parasite herb *Scurulla atropurpurea* (Bl.) Dans, *Atom Indonesia*, **37** (3), 107-112 (2011).
  10. <http://jol.liljenzin.se/KAPITEL/CH07NY3.PDF>, LILJENZIN, J.O. Chapter 7 Radiation Effects on Matter, p. 167. Diakses 7 Oktober 2013.
  11. KIM, J.K., JO, C., HWANG, H.J., PARK, H.J., KIM, Y.J., and BYUN, M.W., Color improvement by irradiation of *Curcuma aromatica* extract for industrial application, *Radiation Physics and Chemistry*, **75**, 449-452 (2006),
  12. LAMPARTS-SZEZAPA, E., KOREZAK, J., NOGALA-KALUCKA, M., and ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R., Antioxidant properties of lupin seed Products, *J. Food Sci.*, **83**, 279-285 (2003).
  13. SUHAJ, M., RACOVA, J., POLOVKA, M., and BREZOVA, V., Effect of g-irradiation on antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.), *Food Chem.*, **97**, 696-704 (2006).
  14. KATRIN, E., SELVIE and WINARNO, H., Chomatogram profiles and cytotoxic activity of irradiated mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) leaves, *Atom Indonesia*, **37** (1), 17-23 (2011).
  15. KATRIN, E., NOVAGUSDA, F.N., SUSANTO dan WINARNO, H., Karakteristika dan khasiat daun keladi tikus (*Typhonium divaricatum* (L.) Decne), *J. Aplikasi Isotop dan Radiasi*, **8** (1), 31-42 (2012).
  16. KATRIN, E., ALBERT, J.R., TAMAT, S.R., SUSANTO dan WINARNO, H., Sitotoksitas terhadap sel leukemia L1210 dan profil kromatogram dari serbuk temu putih *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. yang diiradiasi, *J. Ilmu Kefarmasian Indonesia*, **10** (1), 57-64 (2012).
  17. WINARNO, H., LESTARI, I.G.A.W., SUSANTO, dan KATRIN, E., Kualitas daun sambiloto *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees yang telah diiradiasi, sedang dalam proses publikasi.
  18. KATRIN, E., AMALIAH, R., AZIZ, Z. dan WINARNO, H., Pengaruh Iradiasi gamma pada bioaktivitas dan profil kromatogram daun sirsak (*Annona muricata* L.), sedang dalam proses publikasi.

19. WINARNO, H., SUSANTO, WIDIATMOKO, W. dan KATRIN, E., Pengaruh Iradiasi gamma pada profil kromatogram dan sitotoksitas daun sambung nyawa *Gynura procumbens* (Lour.) Merr., sedang dalam proses publikasi.
20. VARIYAR, P.S., BANDYOPADHYAY, C. and THOMAS, P., Effect of gamma-irradiation on the phenolic acids of some Indian spices, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **33**, 533-537 (1998).
21. BHAT, R., SRIDHAR, K.R. and SEENA, S., Nutritional quality evaluation of velvet bean seeds (*Mucuna Pruriens*) exposes to gamma irradiation, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **59**, 261-278 (2008).
22. THONGPHASUK, P. and THONGPHASUK, J., Effects of irradiation on active components of medicinal plants : A review, *Rangsit Journal of Arts and Sciences*, **2** (1), 57-71 (2012).
23. MALI, A.B., KHEDKAR, K., and LELE, S.S., Effect of gamma irradiation on total phenolic pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels, *Food Nut. Sci.*, **2**, 248-433 (2011).
24. HARRISON, K. and WERE, L.M., Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of almond skin extracts, *Food Chem.*, **102**, 932-937 (2007).
25. SUHAJ, M. and HORVATHOVA, J., Changes in antioxidant activity induced by irradiation of clove (*Syzygium aromaticum*) and ginger (*Zingiber officinale*), *Food Nut. Res.*, **46**, 112-122 (2007).
26. CALUCCI, L., PINZINO, C., ZANDOMENEGHI, M. CAPOCCHI, A., GHIRINGHELLI, S., SAVIOZZI, F., TOZZI, S., and GALLESCHI, L., Effects of gamma irradiation on the free radical and antioxidant content in nine aromatic herbs and spices, *J. agric. Food Chem.*, **51**, 927-934 (2003).
27. [https://www.jlab.org/div\\_dept/train/rad\\_guide/effects.html](https://www.jlab.org/div_dept/train/rad_guide/effects.html), Radiation Biological Effects, p. 2, diakses 15 November 2013.
28. XIUDANG, Y., KANG, M.C., LEE, K.W., Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp., *Coreanum. Algae*, **26** (2), 201-208 (2011).
29. SALUM, D.C., ARAUJO, M.M., FANARO, G.B., PURGATTO, E., and VILLAVICENCIO, A.L.C.H., Determination of volatiles produced during radiation processing in *Laurus cinnamomum*, *Radiat. Phys. Chem.*, **78**, 635-637 (2009).
30. ARICI, M., COLAK, F.A. and GECGEL, U., Effect of gamma irradiation on microbiological and oil properties of black cumin (*Nigella sativa* L.), *Grasas y aceites*, **58**, 339-343 (2007).

