

**UJI TOKSISITAS TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA
DAN KAPASITAS ANTIOKSIDAN PADA RENDANG
STERIL IRADIASI : IN VITRO**

Zubaidah Irawati¹, Kamalita Pertiwi² dan Fransiska Rungkat-Zakaria²

¹Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta 12440

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan,
Fakultas Teknologi Pertanian,
Institut Pertanian Bogor

Diterima 30 Desember 2009; disetujui 22 April 2010

ABSTRAK

UJI TOKSISITAS TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA DAN KAPASITAS ANTIOKSIDAN PADA RENDANG STERIL IRADIASI : IN VITRO. Keamanan pangan olahan siap saji tradisional yang diiradiasi dengan dosis tinggi masih mengundang pertanyaan dan keengganan sehingga dapat menghambat perkembangan komersialisasi pada umumnya. Masyarakat masih saja mengkhawatirkan bahwa radiasi dapat menyebabkan terbentuknya zat radioaktif pada produk yang disinari akibat pembentukan radikal bebas dan turunannya. Oleh karena itu, perlu dipelajari tentang kemungkinan adanya pengaruh iradiasi pada bahan pangan terhadap sistem biologi tubuh manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meyakinkan keamanan pangan olahan siap saji yang diiradiasi dengan dosis tinggi melalui uji toksisitas menggunakan limfosit dan eritrosit darah manusia, dan menentukan kapasitas antioksidan rendang yang disterilisasi dengan sinar gamma pada dosis 45 kGy. Metode penelitian yang digunakan adalah persiapan ekstraksi sampel rendang, persiapan media biakan, isolasi limfosit, pengujian proliferasi limfosit menggunakan garam tetrazolium MTT, pengujian hemolisa eritrosit, menentukan kapasitas antioksidan, dan pengukuran kadar malonaldehid. Sampel rendang steril iradiasi yang diuji terdiri dari 4 macam yang berbeda waktu pembuatan dan sudah disimpan selama 6 - 18 bulan pada suhu 28-30°C. Sampel tersebut adalah sampel yang diiradiasi di PATIR BATAN pada tanggal 11 Nopember 2006 (sampel A), sampel yang diiradiasi tanggal 14 Juni 2007 (sampel B), "tanpa label" tanggal 14 Juni 2007 (sampel C), dan rendang yang tidak diiradiasi sebagai kontrol. Hasil yang diperoleh pada uji proliferasi menunjukkan bahwa baik pada kontrol, maupun pada seluruh sampel yang diiradiasi tidak menyebabkan terjadinya proliferasi secara nyata. Pada umumnya, laju hemolisa dari seluruh sampel yang diamati menunjukkan peningkatan dengan meningkatnya konsentrasi atau sebaliknya, pengenceran tidak menyebabkan peningkatan laju hemolisa ataupun hemolisa pada eritrosit secara nyata. Hasil pengujian kapasitas antioksidan sampel rendang yang diiradiasi lebih tinggi dibandingkan kontrol sedangkan perlakuan iradiasi tidak berpengaruh pada kadar malonaldehid rendang yang diteliti.

Kata kunci : rendang iradiasi, proliferasi limfosit, kapasitas antioksidan, hemolisis eritrosit

ABSTRACT

TOXICITY TEST ON MALONDIALDEHYDE CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF IRRADIATION STERILIZATION *RENDANG* : IN VITRO. The safety of irradiated ethnic ready to eat food at high doses raises many questions, and recognized as one of great obstacles in the development of commercialization of food irradiation globally. People are still worried that food treated with irradiation would have induced radioactivity because free radical and its complex derivatives are formed in the irradiation process. Therefore, this study is needed to help understanding the effect of irradiated food on biological system in order to understand the possible effect to human body. The aimed of this research work was to secure the safety of irradiated food at high dose by conducting a toxicity assay using lymphocytes and erythrocytes human blood, and to determine antioxidant capacity of gamma - sterilized *rendang* at 45 kGy. The methods used were extraction and preparation of *rendang* samples, culture medium preparation, lymphocytes isolation, the assays on lymphocytes proliferation, erythrocytes hemolysis,, antioxidant capacity, and malonaldehyde, respectively. The tested samples were irradiated at PATIR BATAN on 11th November 2006 (sample A), on 14th June 2007 (sample B), and "No Label" on 14th June 2007 (sample C), respectively and non-irradiated *rendang* as control was also prepared. The results of proliferation assay showed that irradiated samples did neither inhibit nor induce proliferation significantly. Obviously, hemolysis rate of all samples showed increasing rate with increasing concentration or inversely correlated with dilution neither caused an increase in erythrocytes hemolysis rate nor inhibition in erythrocytes hemolysis significantly. Antioxidant capacity assay in irradiated samples showed higher value than in non-irradiated sample while irradiation treatment did not influence malondialdehyde content in *rendang*.

Keywords : irradiated *rendang*, lymphocytes proliferation, antioxidant capacity, erythrocytes hemolysis

PENDAHULUAN

Minat akan pemanfaatan iradiasi pada bahan pangan semakin meningkat karena semakin meningkatnya kerusakan produk pangan yang terjadi akibat infestasi, kontaminasi dan pencemaran. Disamping itu, kepedulian masyarakat terhadap penyakit yang ditularkan melalui pangan (*food-borne disease*) dan persyaratan perdagangan internasional produk pangan yang ketat semakin meningkat pula. Pada tahun 1980, *Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Food* (JECFI) menyimpulkan bahwa iradiasi terhadap komoditas pangan sampai dosis rata-rata 10 kGy tidak memberikan bahaya toksikologi dan tidak ada masalah dalam kandungan nutrisi maupun mikrobiologis [1]. Sementara itu, iradiasi dosis tinggi (di atas 10 kGy) digunakan untuk menghasilkan daging steril, daging unggas, hasil laut, pangan olahan siap saji dan pangan steril.

Studi yang berkaitan dengan aspek keamanan pangan pada bermacam-macam komoditas bahan pangan segar, kering dan olahan yang diiradiasi dengan dosis di atas 10 kGy telah dilakukan secara intensif oleh negara-negara yang bergabung di dalam *Joint FAO/IAEA/WHO Study Group on High-Dose Irradiation*. Studi tersebut menyimpulkan bahwa iradiasi dosis tinggi pada bahan pangan dinyatakan aman sebagaimana halnya proses sterilisasi termal yang berlangsung sampai saat ini [2]. Berdasarkan hal tersebut, di Indonesia telah dikembangkan iradiasi pangan olahan siap saji berbasis resep tradisional dosis tinggi 45 kGy. Akan tetapi, data pendukungnya masih sangat terbatas, sehingga masih diperlukan kajian teknis untuk produk tersebut.

Rendang iradiasi yang menjadi sampel dalam penelitian ini diproduksi oleh Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi Badan Tenaga Nuklir Nasional (PATIR BATAN). Iradiasi rendang dilakukan pada suhu proses sekitar -40°C dengan cara menggunakan CO_2 padat (-79°C) yang diletakkan di dalam kotak *styrofoam* berisi sampel rendang. Proses radiasi dengan cara tersebut antara lain ditujukan untuk mengeliminasi spora bakteri *Clostridium botulinum* dan bakteri pembentuk spora lain seperti *Bacillus spp.* yang bersifat patogen, tanpa menurunkan kualitas produk akhir [3].

Respon proliferasi limfosit secara *in vitro* digunakan untuk menggambarkan fungsi limfosit dan status imun individu. Proliferasi merupakan fungsi biologis, yaitu proses diferensiasi dan pembelahan sel secara mitosis [4]. Sel limfosit juga dapat berproliferasi secara nonspesifik jika dikultur dengan senyawa mitogen [5] sehingga banyak dipakai untuk menguji aktivitas sel limfosit.

Eritrosit dipilih sebagai model *in vitro* untuk mempelajari interaksi oksidan/antioksidan karena membrannya kaya akan asam lemak tidak jenuh yang sangat rentan terhadap peroksidasi yang diperantarai oleh radikal bebas, dan dianggap dapat mewakili membran plasma secara umum [6].

Analisis malonaldehida merupakan metode analisis radikal bebas secara tidak langsung dan merupakan analisis yang cukup mudah untuk menentukan jumlah radikal bebas yang terbentuk. Analisis radikal bebas secara langsung sangat sulit dilakukan, karena radikal ini merupakan senyawa yang tidak stabil dan cenderung untuk merebut elektron senyawa lain agar menjadi lebih stabil. Reaksi ini berlangsung

sangat cepat sehingga pengukurannya sangat sulit bila dalam bentuk senyawa radikal bebas [7].

Salah satu faktor yang mempengaruhi kecepatan adopsi teknologi iradiasi adalah pemahaman publik dan penerimaan proses. Penelitian ini bertujuan untuk meninjau keamanan dan menambah data mengenai keamanan rendang iradiasi dengan melakukan uji toksisitas pada sel limfosit dan eritrosit, mengetahui adanya aktivitas antioksidan pada ekstrak rendang iradiasi, serta mengukur kadar malonaldehida ekstrak sampel rendang iradiasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Sampel yang diuji dalam penelitian ini adalah rendang yang diiradiasi di PATIR BATAN pada tanggal 11 November 2006 (A), sampel rendang iradiasi 14 Juni 2007 (B), sampel rendang iradiasi "No label" 14 Juni 2007 (C) dan sampel kontrol non-iradiasi sebagai pembanding. Bahan lain yang digunakan adalah bahan-bahan untuk ekstraksi, yaitu kertas saring dan akuades. Untuk analisis proliferasi limfosit dan hemolisis eritrosit, yaitu darah dari donor sehat, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA), HCl-isopropanol 0,04 N; gentamisin, medium Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma, USA), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), H₂O₂ 0,5% dan larutan mitogen (*Lipo Poly Saccharides/LPS* dan *Pokeweed*). Bahan kimia untuk analisis kadar malonaldehida antara lain 1,1,3,3 tetraetoksipropana (TEP), *Thio Barbituric Acid* (TBA) 0,38 % - *Trichloro Acetic Acid* (TCA) 15 % - *Butylated hydroxyl toluene* (BHT) 0,5 % dalam HCl 0,25 N dingin, dan bahan untuk analisis kapasitas antioksidan adalah *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil radical* (DPPH[•]), metanol, natrium asetat, asam asetat, dan asam askorbat.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Spectrophotometer microplate reader*, tabung *vacutainer* yang berisi campuran K₃-EDTA 0.1%, tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi, tabung *Eppendorf*, membran steril 0,22 µm, sentrifugasi berulang, lempeng mikrokultur 96 sumur, haemasitometer, mikropipet, inkubator VWR Scientific 37°C, dan spektrofotometer UV-VIS.

Metode

Tahap awal yang dilakukan adalah melakukan ekstraksi sampel menggunakan akuades steril. Supaya mendekati kondisi sebenarnya ketika sampel dikonsumsi pada umumnya. Perbandingan akuades dan bahan (daging rendang) adalah 1:1 (berat/volume). Pengecilan ukuran pertama dilakukan dengan cara menghaluskan sampel menggunakan mortar dengan penambahan akuades steril 1:1. Setelah dihaluskan, sampel rendang disaring menggunakan kain saring dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi kemudian disentrifugasi selama 30 menit pada 3500 rpm. Proses sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan bagian padat dan lemak dari bagian cairan ekstrak. Cairan ekstrak kemudian diambil secara hati-hati dan disaring kembali menggunakan kertas saring Whatman no. 1 kemudian disaring dengan membran steril 0,20 μm . Ekstrak yang diperoleh dari setiap 20 g sampel rendang masing-masing sekitar 3 ml. Ekstrak yang digunakan dalam pengujian sampel terdiri dari tiga jenis pengenceran dengan akuades yaitu pengenceran satu kali(1x) atau tanpa pengenceran, pengenceran dua kali (2x) atau pengenceran 1:1, dan pengenceran empat kali (4x) atau pengenceran 1:3. Sebelum dilakukan perhitungan, kultur sel ditambah dengan HCl-isopropanol.

Sebelum dilakukan analisis proliferasi menggunakan MTT assay, limfosit diisolasi dari darah donor sehat menurut metode Nurrahman dkk. [8], dan analisis proliferasi limfosit manusia dilakukan sesuai metode Meiriana [9] yaitu dengan mereaksikan 80 μl suspensi limfosit dengan 20 μl ekstrak sampel. Enam jam sebelum pengukuran dengan spektrofotometer, ke dalam sumur ditambahkan 10 μl MTT, dan sebelum waktu pembacaan ditambahkan 100 μl HCl-isopropanol. Absorbansi dibaca pada $\lambda = 570 \text{ nm}$.

Hemolisis eritrosit diamati dengan menggunakan metode seperti yang dikembangkan oleh Nike *et al.* [10] dan Zhu *et al.* [11]. Sebanyak 800 μl suspensi eritrosit ditambah dengan 200 μl ekstrak sampel kemudian diinkubasi pada 37°C selama 5 jam. Pada setiap jam pengamatan 100 μl suspensi dipipet dan dibaca absorbansinya pada $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Metode DPPH dilakukan seperti yang dikerjakan dalam Kubo *et al.* [12]. Buffer asetat ditambahkan kedalam methanol dan DPPH, kemudian direaksikan dengan sampel. Setelah diinkubasi 20 menit dalam ruang gelap, absorbansi dibaca pada $\lambda = 517$ nm.

Untuk mengukur kadar malonaldehida digunakan metode Seligman *et al.* [13]. Sebanyak 2 ml sampel ditambah dengan 2 ml HCl 0,25 N yang sudah mengandung TCA, TBA dan BHT, dipanaskan, disentrifugasi, kemudian supernatan diambil untuk diukur absorbansinya pada $\lambda = 532$ nm.

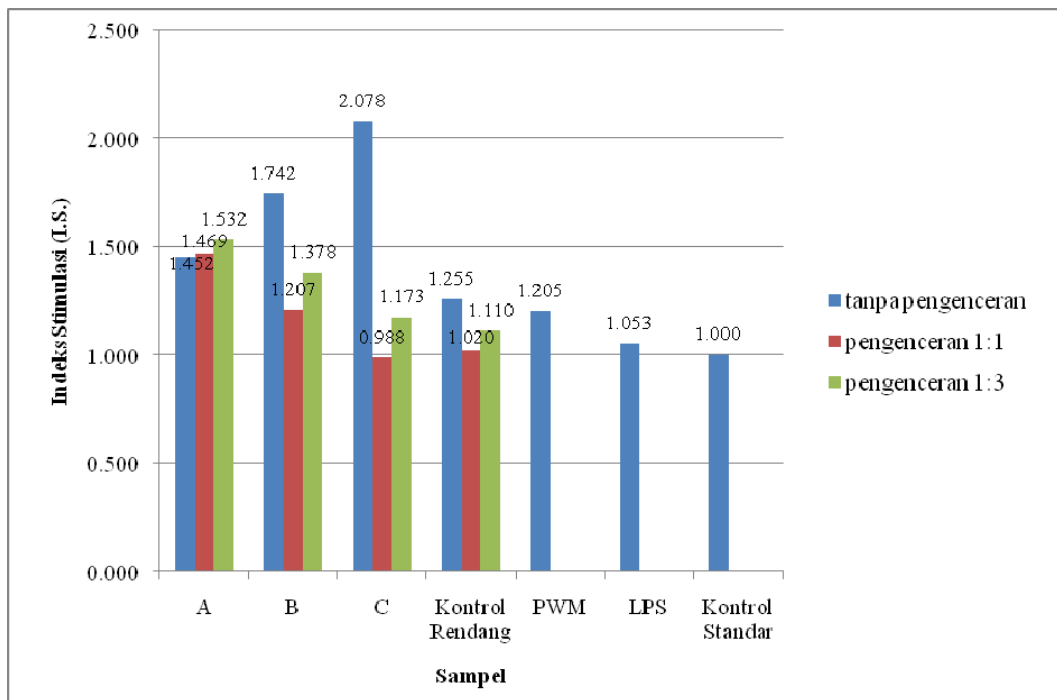
HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan sentrifugasi pada sampel ditujukan untuk memisahkan bagian padat dan lemak dari bagian cairan ekstrak. Adapun metode MTT diterapkan berdasarkan penyerapan warna biru dari kristal *formazan blue* merupakan hasil reaksi antara enzim suksinat dehidrogenase dengan garam tetrazolium (MTT). Tujuan penambahan HCl-isopropanol pada kultur sel untuk melarutkan kristal biru formazan yang terbentuk dan berfungsi untuk menguraikan sel limfosit [14].

Hasil absorbansi yang didapatkan dari pembacaan pada *Spectrophotometer Microplate Reader* kemudian diolah sehingga menghasilkan data Indeks Stimulasi (I.S), yang disajikan pada Gambar 1. Pada Gambar tersebut terlihat bahwa pada tahapan tanpa pengenceran, sampel yang memiliki indeks stimulasi tertinggi adalah sampel C (2,078) diikuti oleh B (1,742), A (1,452), kontrol rendang (1,255), kontrol positif Pokeweed Mitogen (PWM) (1,205) dan nilai IS terendah adalah kontrol positif LPS (1,053). Secara umum terlihat bahwa faktor penyimpanan tidak berpengaruh secara nyata pada nilai IS. Pola IS terhadap pengenceran umumnya menurun, kecuali pada sampel A. Sampel A memiliki pola respon indeks stimulasi terhadap pengenceran yang berbeda di antara sampel yang lain, termasuk sampel kontrol rendang. Pola indeks stimulasi sampel ini meningkat dengan menurunnya konsentrasi ekstrak sampel. Hal ini berarti dengan menurunnya konsentrasi ekstrak sampel pada kultur, maka limfosit berproliferasi semakin tinggi. Semakin tinggi nilai IS, maka semakin banyak jumlah sel limfosit yang hidup.

Proses iradiasi dapat menghasilkan radikal bebas. Elektron yang berenergi tinggi menjadikan molekul air sebagai target. Sinar gamma dapat memecah molekul air menjadi radikal bebas dan ion. Interaksi dengan radikal bebas yang dihasilkan oleh radiolisis air dapat meningkatkan pembentukan hidrogen peroksida [15].

Pengenceran sampel secara bertingkat merupakan simulasi yang setara dengan kuantitas konsumsi pangan siap saji. Semakin tinggi pengenceran, maka kuantitas pangan siap saji yang dikonsumsi semakin kecil.



Gambar 1. Grafik perbandingan Indeks Stimulasi proliferasi limfosit.

Apabila masih terdapat radikal bebas dalam matriks pangan iradiasi sampai berapapun jumlahnya, maka penambahan air akibat pengenceran tersebut dapat menggambarkan kondisi substrat yang relatif lebih kecil menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat menghambat proliferasi limfosit. Studi yang dilakukan oleh Nelson *et al.* [16] menunjukkan efek penghambatan oleh mannan khamir terhadap

respon proliferasi limfosit akibat adanya produksi hidrogen peroksida yang ditingkatkan oleh kompleks mannan-tembaga.

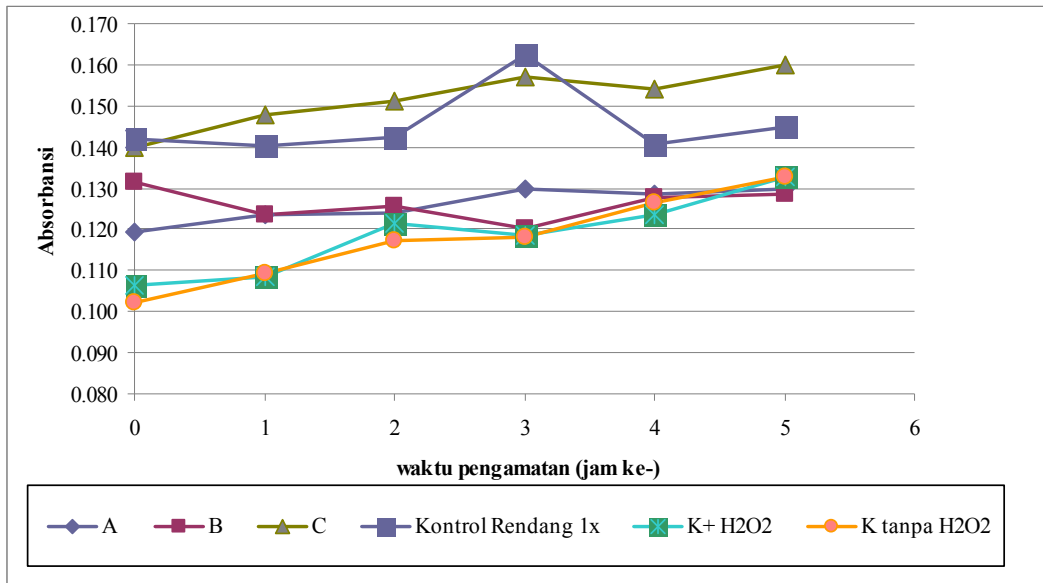
Dari pengujian ekstrak rendang terhadap limfosit terlihat bahwa sampel iradiasi tidak menghambat proliferasi sel limfosit manusia, dan tidak meningkatkan proliferasi limfosit secara signifikan dibandingkan dengan kontrol rendang non-iradiasi pada ekstrak sampel tanpa pengenceran dengan selang kepercayaan 99%.

Eritrosit adalah model yang cocok digunakan untuk menganalisis respon sel dan membrannya terhadap berbagai faktor luar. Hal ini disebabkan oleh strukturnya yang sederhana sehingga memudahkan pengamatan [17].

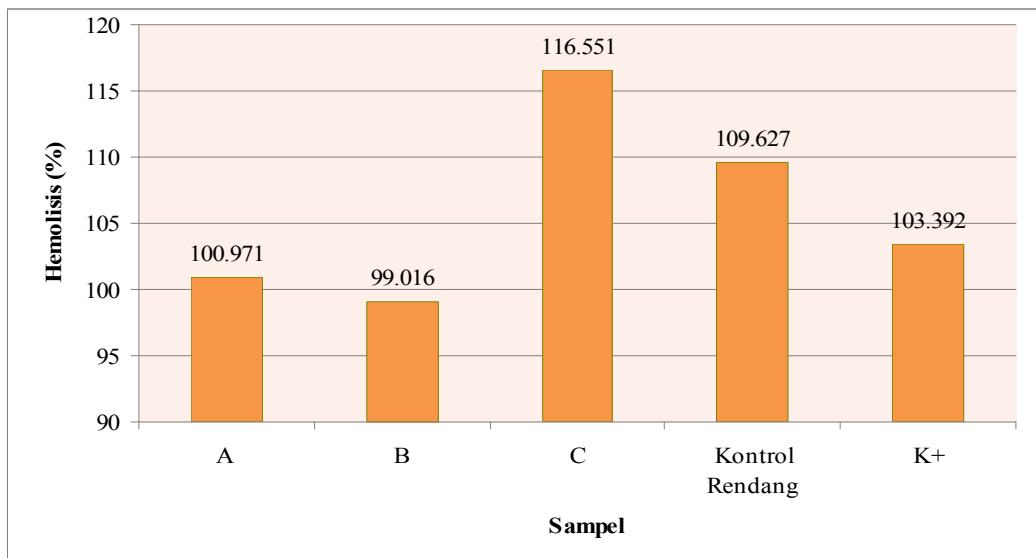
Gambar 2 menunjukkan perbandingan pengaruh ekstrak sampel baik iradiasi maupun non-iradiasi tanpa pengenceran terhadap absorbansi eritrosit tiap jam pengamatan. Grafik tersebut menunjukkan bahwa sampel C memiliki absorbansi yang paling tinggi dibandingkan sampel-sampel lainnya sejak awal masa inkubasi, kemudian diikuti oleh sampel kontrol rendang, sampel A, sampel B, kontrol positif dan yang terendah kontrol negatif. Pada jam ke-lima nilai absorbansi tertinggi dimiliki oleh sampel C (0,160), diikuti oleh sampel rendang kontrol (0,145), A (0,130), B (0,129), dan absorbansi untuk kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan nilai yang sama (0,133).

Absorbansi pada jam ke-5 tersebut kemudian diolah menjadi data persentase hemolisis dengan membandingkannya dengan absorbansi kontrol negatif. Perbandingan data persentase hemolisis ini kemudian ditampilkan dalam bentuk diagram seperti pada Gambar 3.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa persentase hemolisis terbesar ada pada sampel C, dengan nilai sebesar 116,551%, diikuti oleh sampel kontrol rendang dengan persentase hemolisis sebesar 109,627%, kemudian kontrol positif sebesar 103,392%, A sebesar 100,971% dan B sebesar 99,016%. Dari grafik tersebut dapat diamati bahwa sampel yang menyebabkan persentase hemolisis paling sedikit adalah sampel B, sementara sampel yang persentasenya paling banyak adalah sampel C.

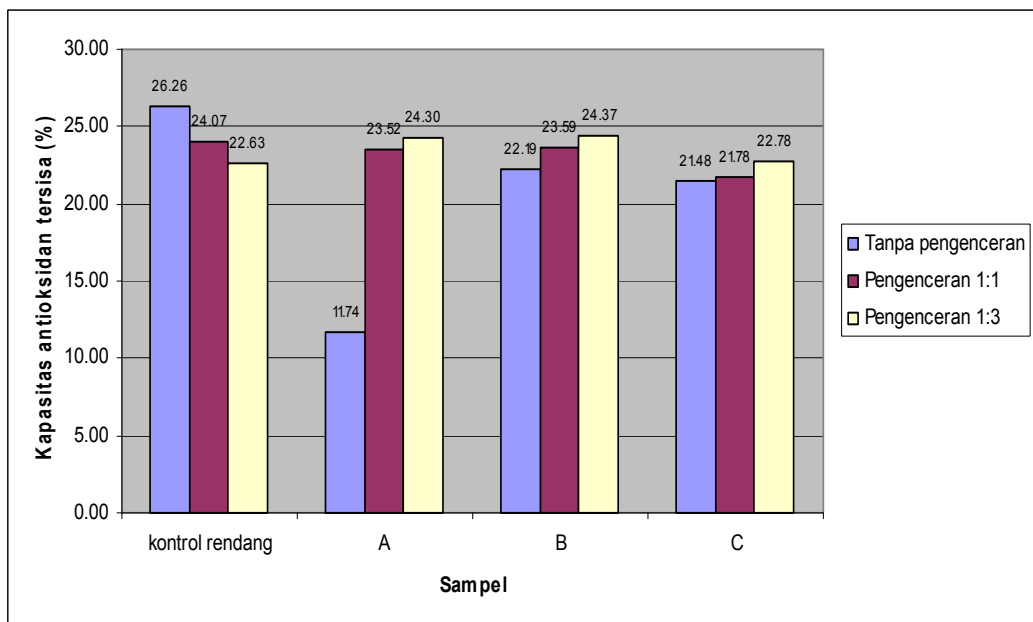


Gambar 2. Hubungan absorbansi dan waktu pengamatan pada pengaruh ekstrak sampel terhadap hemolisis eritrosit.



Gambar 3. Persentase hemolisis eritrosit pada berbagai jenis sampel rendang.

Berdasarkan uji statistika dengan selang kepercayaan 95% maupun 99%, persentase hemolisis antara sampel-sampel iradiasi maupun non iradiasi tidak berbeda nyata yang dapat diartikan bahwa penambahan ekstrak sampel iradiasi tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap laju hemolisis eritrosit, atau penambahan ekstrak sampel iradiasi tidak meningkatkan atau menghambat laju hemolisis eritrosit secara nyata. Tidak adanya perbedaan yang nyata antara sampel yang diiradiasi dengan yang tidak diiradiasi diduga disebabkan oleh perlakuan sampel rendang iradiasi yang dikemas vakum 80%, sehingga terekspos minimal dengan oksigen. Teknik pengemasan secara vakum dan jenis bahan pengemas kedap cahaya yang diterapkan pada pangan olahan siap saji berbasis lemak dan protein tinggi seperti pada rendang merupakan persyaratan yang ditentukan oleh *IAEA Guideline for irradiated shelf-stable foods* [18].

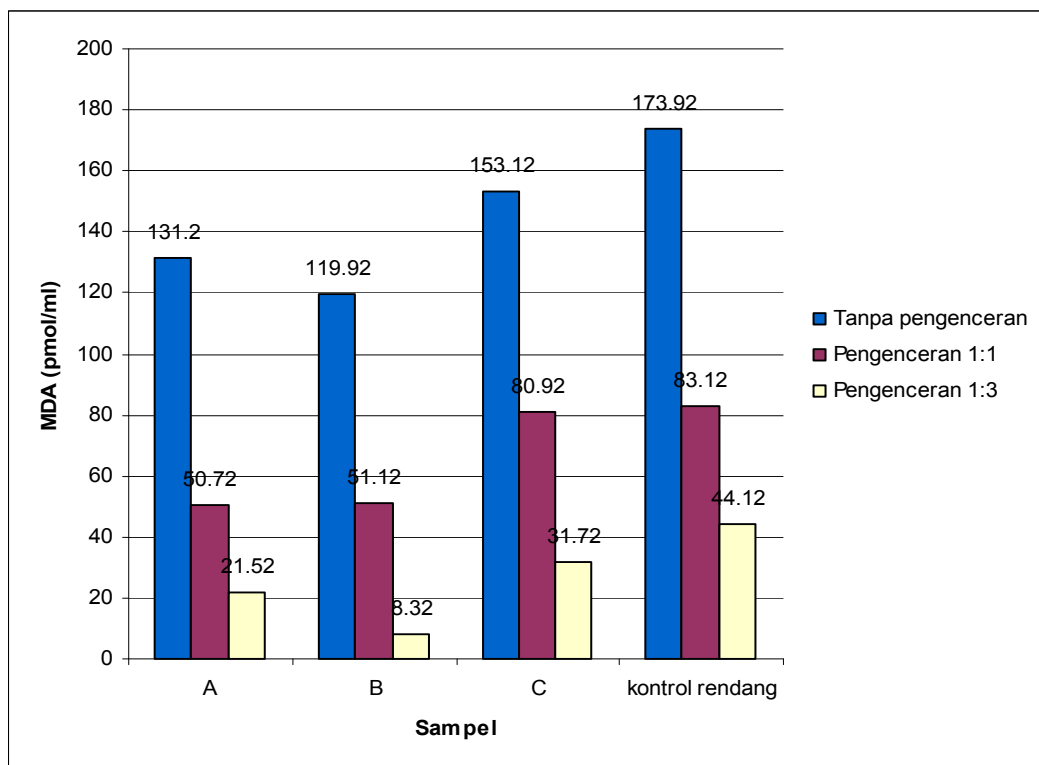


Gambar 4. Perbandingan kapasitas antioksidan sampel iradiasi dan non-iradiasi

Gambar 4 menunjukkan bahwa dengan semakin meningkatnya pengenceran maka kapasitas antioksidan yang dimiliki ekstrak sampel cenderung semakin besar, kecuali pada sampel kontrol rendang yang menurun dengan semakin meningkatnya

pengenceran yaitu pengenceran 1x. Kapasitas antioksidan terbesar adalah ekstrak sampel kontrol rendang tanpa pengenceran (26,26%), kemudian diikuti oleh sampel B (22,19%), sampel C (21,48%), dan paling kecil adalah sampel A (11,74%).

Dari Gambar tersebut juga terlihat bahwa satu-satunya sampel yang cenderung berbeda dengan meningkatnya pengenceran adalah sampel kontrol atau rendang yang tidak diiradiasi. Selain faktor pengenceran, penggunaan rempah sebagai bumbu pada pembuatan rendang memiliki peranan yang nyata terhadap nilai kapasitas antioksidan di dalam sampel yang diteliti.



Gambar 5. Perbandingan konsentrasi malonaldehida antara sampel rendang iradiasi dan non-iradiasi.

Pada Gambar 5 terlihat bahwa sampel yang memiliki konsentrasi malonaldehida (MDA) (pmol/ml) paling tinggi dibandingkan sampel-sampel yang lain yang diukur pada

pengukuran kadar malonaldehida ini adalah sampel kontrol. Ekstrak sampel kontrol rendang tanpa pengenceran memiliki kadar malonaldehida sebesar 173,92 pmol/ml, ekstrak sampel C tanpa pengenceran menunjukkan kadar malonaldehida terbesar kedua yaitu 153,12 pmol/ml, sementara itu ekstrak sampel A tanpa pengenceran memiliki kadar malonaldehida sebesar 131,20 pmol/ml. Analisis statistik yang dilakukan terhadap kadar malonaldehida ekstrak sampel-sampel iradiasi dan kontrol non-iradiasi menunjukkan hasil bahwa sampel-sampel iradiasi dan kontrol non-iradiasi tidak berbeda nyata kadar malonaldehidanya.

Salah satu kepedulian mengenai daging iradiasi adalah efeknya pada oksidasi lipida, warna dan produksi *off-odor* [19]. Iradiasi dapat menghasilkan sejumlah besar radikal hidroksi pada daging karena lebih dari 75% sel otot terdiri dari air [15]. Al-Kahtani *et al.* [20] dan Hampson *et al.* [21] melaporkan bahwa iradiasi gamma pada dosis 1,5 sampai 10 kGy meningkatkan nilai TBARS pada daging kalkun dan ikan.

Nilai TBA menyatakan derajat ketengikan produk dan menurut penelitian Kose *et al.* [22] yang mengukur nilai TBA produk ikan, nilai di atas 3-4 mg malonaldehida/kg daging menunjukkan kualitas yang buruk dari produk. Hasil keseluruhan terlihat, bahwa baik sampel rendang yang tidak diiradiasi maupun yang diiradiasi dengan dosis 45kGy nilai TBA yang terukur masih jauh dibawah nilai tersebut (3mg malonaldehida/kg daging). Proses oksidasi yang dapat menyebabkan ketengikan produk tersebut telah diminimalisasi dengan teknik pengemasan dan kondisi iradiasi yang tepat.

KESIMPULAN

Sampel rendang iradiasi tidak menurunkan jumlah kultur sel limfosit dan tidak menaikkan secara signifikan/menginduksi terjadinya proliferasi. Sampel rendang yang diiradiasi dengan dosis 45 kGy menunjukkan kecenderungan bahwa dengan peningkatan pengenceran dapat mengakibatkan penurunan nilai indeks stimulasi proliferasi limfosit.

Tidak ada perbedaan nyata antara nilai persen hemolisis antara semua sampel yang diuji pada selang kepercayaan 95% maupun 99% menunjukkan bahwa penambahan sampel yang diuji tidak menyebabkan kenaikan hemolisis maupun penghambatan hemolisis secara nyata pada eritrosit.

Semakin encer, kapasitas antioksidan pada sampel yang diiradiasi semakin besar. Konsentrasi malonaldehida baik pada sampel rendang iradiasi maupun sampel rendang kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada selang kepercayaan 95%. Hal ini menyatakan bahwa konsentrasi malonaldehida sampel rendang iradiasi tidak dipengaruhi oleh dosis iradiasi 45 kGy.

DAFTAR PUSTAKA

1. ANONYMOUS, Wholesomeness of Irradiated Food, Technical Report Series 659, World Health Organization, Geneva (1981).
2. ANONYMOUS, High Dose Irradiation: Wholesomeness of Food Irradiated at Doses above 10 kGy: Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, Tech. Rep. Ser. 890, WHO, Geneva (1999).
3. IRAWATI, Z., MAHA,M., ANSORI,N., NURCAHYA,C.M. and ANAS,F., Development of Shelf-Stable Foods Fish *Pepes*, Chicken and Meat Dishes Through Radiation Processing", Radiation Processing for Safe, Shelf-Stable and Ready to Eat Food, Proceedings of a Final Research Co-ordination Meeting, Montreal, Canada 10-14 July 2000, IAEA-TECDOC-1337, International Atomic Energy Agency, Vienna, 85-99 (2003).
4. FLETCHER, M.A., KLIMAS, N., MORGAN, R., and GJERSET. G., Lymphocyte Proliferation, *In: Manual Clinical Laboratory Immunology*, (4th edition), N.R. ROSE, E.C. DEMACARIO, J.L. FAHEY, H. FRIEDMAN, and G.M. PENN (Eds.), (1994).
5. ZAKARIA, F.R., BELLEVILLE, F., NABET, P., and LINDEN. G., Allergenicity of bovine casein: I. Specific lymphocyte proliferation and hystamine accumulation in the mastocyte as result of casein feeding in mice, *Food Agr. Immunol*, **4**, 41-51 (1992).
6. SHIVA SHANKAR REDDY, C.S., SUBRAMANYAM, M.V., VANI, R., and DEVI, S.A., In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements, *Toxicol. In Vitro*, **21**, 1355-1364 (2007).

7. GUTTERIDGE, J.M.C., Lipid peroxidation and antioxidant as biomarkers on tissue damage, *Clin. Chem.*, **41** (12), 1819-1828 (1995).
8. NURRAHMAN, ZAKARIA, F.R., SAYUTHI, D. dan SANJAYA, Pengaruh Konsumsi Sari Jahe Terhadap Perlindungan Limfosit dari Stress Oksidatif pada Mahasiswa Pondok Pesantren Ulil Al Baab, Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan, PATPI & MENPANGHOR, Jakarta (1999).
9. MEIRIANA, Y., Pengaruh ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) terhadap aktivitas proliferasi sel limfosit manusia secara *in vitro*, Skripsi, Fateta IPB, Bogor (2006).
10. NIKE, E., KOMURA, E., TAKAHASHI, M., URANO, S., ITO, E. and TERAO, K., Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers, *J. Biol. Chem.*, **263** (36), 19809-19814 (1988).
11. ZHU, Q.Y., HOLT, R.R., LAZARUS, S.A., OROZCO, T.J., and KEEN, C.L., Inhibitory effect of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis, *Exp. Biol. Med.*, **22** (5), 321-329 (2002).
12. KUBO, I., MASUOKA, P., and HARAGUCHI, H., Antioxidant activity of dodecyl gallate, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3533-3539 (2002).
13. SELIGMAN, M.L., FLAMM, E.S., GOLDSTEIN, B.D., POSER, R.G., DEMOPOULOS, H.B., and RANSOHOFF, J., Spectrofluorescent detection of malonaldehyde as a measure of lipid free radical damage in response to ethanol potentiation of spinal cord trauma, *Lipids*, **12** (11), 945-950 (1977).
14. KASUGAI, S., HASEGAWA, N., and OGURA, H., A simple *in vitro* cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5) dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A), *Jpn. J. Pharmacol.*, **52**, 95-100 (1990).
15. THAKUR, B.R., and SINGH, R.K., Food irradiation chemistry and applications, *Food Rev. Int.*, **10** (4), 437-473 (1994).
16. NELSON, R.D., HERRON, M.J., Mc.CORMACK, R.T., and GEHRZ, R.C., Two mechanisms of inhibition of human lymphocyte proliferation by soluble yeast mannan polysaccharide, *Infect. Immun.*, **43** (3), 1041-1046 (1984).
17. DEUTICKE, B., GREBE, R., and HAEST, C.W.M., Action of drugs on the erythrocyte membrane, *In: Blood Cell Biochemistry*, vol. 1. Erythroid Cell, J.R. HARRIS, (Ed.), Plenum Press, New York (1990).

18. ANONYMOUS, Shelf-stable Foods Through Irradiation Processing, IAEA-TECDOC-843, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Vienna, (1995).
19. AHN, D.U., and JO, C., Lipid oxidation, volatiles, and off-odor production of aerobic-packaged pork patties irradiated and stored in refrigerated or frozen conditions, 1999 ISU Swine Research Report: Meat Section, Iowa Pork Industry Center, (1999). <http://www.ipic.iastate.edu/reports/99swinereports/asl-1710.pdf>. (21 Jun 2009).
20. AL-KAHTANI, H.A., ABU-TARBOUSH, H.M., BAJABER, A.S., ATIA, H., ABOU-ARAB, A.A., and EL-MOJADDIDI, M.A, Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in tilapia and Spanish mackerel, *J. Food Sci.*, **61**, 729-733 (1996).
21. HAMPSON, J.W., FOX, Jr., J. B., LAKRITZ, L., and THAYER, D.W., Effect of low dose gamma radiation on lipids in five different meats, *Meat Sci.*, **42**, 271-276 (1996).
22. KOSE, S., KARACAM, H., KUTLU, S., and BORAN, M., Investigating the shelf-life of the anchovy dish called "hamsikusu" in frozen storage at $-18 \pm 1^\circ\text{C}$, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **25**, 651-656 (2001).