

Aspek Keamanan Pangan : Uji Toksisitas Secara *In Vitro* Pepes Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Disterilkan dengan Iradiasi Gamma

Food Safety Aspect : Toxicity Test of Gold Fish Pepes Sterilized by Gamma Irradiation In Vitro

Zubaidah Irawati¹, Kallista Rachmavika Putri² dan Fransiska
Rungkat Zakaria²

¹ Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN
Jl. Lebak Bulus No. 49 Jakarta Selatan 12440
e-mail : irakoenari@yahoo.com

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

Diterima 14 Juli 2011; Disetujui 13 Oktober 2011

ABSTRAK

Aspek Keamanan Pangan : Uji Toksisitas Secara *In Vitro* Pepes Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Disterilkan dengan Iradiasi Gamma. Iradiasi pengion merupakan salah satu teknik fisika untuk pengawetan bahan pangan yang menggunakan proses ionisasi tanpa mengubah secara nyata karakteristik fisiko-kimia dan kandungan gizi dari bahan yang diiradiasi. Pembentukan senyawa radikal bebas dan senyawa radiolitik dalam produk akibat iradiasi dikhawatirkan akan membentuk senyawa yang bersifat toksik, mutagenik, ataupun karsinogenik sehingga membahayakan konsumen. Uji toksisitas yang merupakan bagian dari uji keamanan pangan pada sampel pepes ikan mas (*Cyprinus carpio*) di dalam kemasan secara vakum dan diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 45 kGy dalam kondisi beku dilakukan melalui uji proliferasi limfosit dan pengukuran kandungan malonaldehida. Limfosit merupakan sel yang berfungsi terhadap respon imun spesifik dan sensitif terhadap ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan di dalam tubuh manusia, sedangkan kadar malonaldehida merupakan indikator keberadaan radikal bebas sekaligus berfungsi sebagai indikator kerusakan oksidatif di dalam matriks suatu material biologis. Baik pada sampel kontrol (K) maupun pada sampel yang diiradiasi dalam waktu penyinaran yang berbeda yaitu pada tanggal 11 November 2006 (A), 14 Juni 2007 (B), pada tanggal 5 April 2008 (C), dan pada tahun 2008 (kode: "no label") (D), masing-masing dilakukan pengenceran pada tingkat yang berbeda. Proliferasi sel limfosit diukur berdasarkan Nilai Indeks Stimulasi (IS), sedangkan kadar radikal bebas diukur berdasarkan kadar malonaldehida (pmol/ml) terhadap seluruh sampel yang diamati. Hasil pengukuran IS pada sampel tanpa pengenceran, menunjukkan bahwa nilai tertinggi terdapat pada sampel B (1,356), yang terendah terdapat pada kontrol (K) (1,161); pada pengenceran 1x nilai tertinggi dicapai oleh sampel D (1,344), terendah pada B (1,084) bila dibandingkan dengan kontrol (1,259). Pada pengenceran 2x nilai tertinggi terdapat pada Kontrol (1,293), tetapi nilai terendah pada sampel D (0,984). Hasil pengukuran kadar malonaldehida (pmol/ml) menunjukkan bahwa tanpa pengenceran, nilai tertinggi terdapat pada sampel A (0,1182 pmol/ml), terendah pada sampel C (0,1178 pmol/ml) apabila keduanya dibandingkan dengan kontrol (0,1180 pmol/ml). Ekstrak sampel tanpa pengenceran dari seluruh pepes ikan mas yang diiradiasi 45 kGy tidak menghambat proliferasi dari sel limfosit ketika dibandingkan dengan sampel kontrol ($p < 0.01$). Baik sampel kontrol maupun sampel iradiasi tidak menginduksi proliferasi sel limfosit bila dibandingkan dengan kontrol standar ($p < 0.01$). Konsentrasi malonaldehida sampel ikan tersebut masih dapat diterima dan tidak berbahaya bila dibandingkan dengan sampel pepes kontrol ($p < 0.01$). Berdasarkan pengujian proliferasi limfosit dan pengukuran kadar malonaldehida ekstrak sampel, pepes ikan mas yang diiradiasi dengan dosis 45 kGy dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi.

Kata kunci : pepes ikan mas, proliferasi limfosit, kadar malonaldehida, iradiasi pangan, senyawa radiolitik

ABSTRACT

Food Safety Aspect : Toxicity Test of Gold Fish Pepes Sterilized by Gamma Irradiation *In Vitro*. Ionizing radiation is a physical preservation technique for foods using ionizing energy without impairing the products either natural characteristics or nutritive contents. Formation of free radicals and radiolytic products in irradiated foods may produce toxic substances, mutagen or carcinogenic that can affect the consumer health. Toxicity test as a part of food safety assays on gold fish (*Cyprinus carpio*) pepes in a package and irradiated at the dose of 45 kGy under cryogenic condition was conducted through lymphocyte proliferation because lymphocyte cell is responsible for specific immune response and sensitive to unbalance condition between oxidant and anti oxidant in human body. Malonaldehyde content in the irradiated fish was also measured bearing in mind that malonaldehyde content could be used as indicator in the presence of free radicals and as oxidative damage indicator within the matrix of biological material. Dilution steps was done in all samples both in control and irradiated. Irradiation was conducted at three different times i.e., sample irradiated on 11 November 2006 (A), 14 June 2007(B), 5 April 2008 (C) and in 2008 (code: "no label") (D), respectively. Proliferation of lymphocyte cell was assayed based on Stimulation Index value (SI), and free radical content of all samples was calculated based on malondialdehyde content (pmol/ml). The measurement of SI in sample without dilution showed that the highest value was found in sample B (1.356), but the lowest value was obtained in control (1.161); at one time dilution the highest value was obtained in sampel D (1.344), the lowest was found in sample B (1.084) compared to control (1.259). At twice time dilution, the highest value was found in control (1.293), but the lowest was in sample D (0.984). The results of malonaldehyde content (pmol/ml) showed that sample without dilution has the highest quantity was found in sample A (0.1182 pmol/ml), but the lowest was in sample C (0.1178 pmol/ml) for both samples compared to control (0.1180 pmol/ml). The extract of irradiated gold fish pepes without dilution did not disturb proliferation of lymphocyte cell in comparison with those in control ($p < 0.01$). Both in unirradiated and irradiated samples did not induct proliferation of the cell compared to standard control ($p < 0.01$). Concentration of malonaldehyde content of irradiated gold fish pepes samples was still acceptable and safe compared to unirradiated one ($p < 0.01$). Based on the obtained results in lymphocyte proliferation assays and the measurement of malonaldehyde content of the samples, gold fish pepes irradiated at the dose of 45 kGy was safe for consumption.

Key words : gold fish pepes, lymphocyte proliferation, malonaldehyde content, food irradiation, radiolytic compounds

PENDAHULUAN

Pangan olahan siap saji merupakan produk yang mudah rusak sehingga memiliki masa simpan yang terbatas. Di Indonesia, khususnya PATIR BATAN telah melakukan penelitian dan pengembangan secara intensif iradiasi terhadap berbagai jenis pangan olahan siap saji berbasis ikan, daging dan unggas. Komoditi tersebut masing-masing diolah menjadi makanan siap santap seperti pepes ikan mas, rendang sapi, opor dan kare ayam. Setiap jenis produk olahan tersebut dikemas dan disterilkan dengan metode iradiasi pada dosis 45 kGy dalam kondisi beku (-79°C) yang selanjutnya disimpan pada suhu kamar ($28-30^{\circ}\text{C}$) dan mutunya dapat dipertahankan selama

1,5 tahun [1]. Kendala yang ada dalam penerapan teknologi iradiasi pangan pada umumnya adalah keraguan dalam masyarakat mengenai keamanan pangan produk iradiasi akibat pembentukan radikal bebas dan senyawa radiolitik produk dari proses tersebut. Adanya senyawa radikal bebas dalam produk dikhawatirkan akan membentuk senyawa yang bersifat toksik, mutagenik, ataupun karsinogenik di dalam tubuh manusia [2]. Meskipun CODEX Alimentarius Commission rev.1-2003 [3] telah menetapkan bahwa iradiasi pada bahan pangan pada dosis sampai 10 kGy dan bahkan di atasnya dinyatakan aman untuk dikonsumsi manusia, namun data kajian teknis mengenai keamanan pangan iradiasi dosis tinggi 45 kGy pada jenis pangan

olahan siap saji khas Indonesia masih merupakan persyaratan BPOM untuk dipenuhi apabila akan dikomersialisasikan [4]. Iradiasi dosis 45 kGy merupakan dosis sterilisasi komersial yang dapat mematikan bakteri berspora *Clostridium botulinum* sebagai persyaratan baku proses tersebut pada jenis pangan olahan siap saji berbasis daging dan ikan yang akan disimpan jangka panjang pada suhu kamar [5].

Pepes ikan adalah hidangan tradisional khas Indonesia yang terdiri dari sepotong ikan yang sudah diolah dengan berbagai macam bumbu, dibungkus dengan daun pisang, kemudian dimasak. Bumbu dasar yang biasanya digunakan dalam pengolahan pepes ikan antara lain adalah bawang merah, bawang putih, kemiri, cabai, kunyit, jahe, lengkuas, garam, dan gula pasir.

Proses ionisasi pada bahan pangan yang diiradiasi dengan radiasi pengion dapat menyebabkan eksitasi pada atom jaringan pangan dan menyebabkan beberapa perubahan pada produk, seperti oksidasi lipid, pelunakan jaringan, terbentuknya beberapa senyawa radikal bebas dan radiolitik yang senantiasa dikhawatirkan dapat memberikan dampak negatif pada konsumennya. Sebagai upaya untuk meyakinkan konsumen, maka dilakukan uji keamanan pangan secara menyeluruh yaitu uji mikrobiologi, fisiko kimia, *in vitro* dan *in vivo* terhadap jenis pangan olahan siap saji tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data kajian teknis dengan mengamati pengaruh iradiasi dosis 45 kGy pada sampel pepes ikan mas dengan masa simpan yang berbeda, terhadap proliferasi sel limfosit manusia secara *in vitro* serta mengukur kadar malonaldehida yang terkandung dalam produk tersebut.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan baku utama adalah pepes ikan mas yang disterilkan dengan radiasi yang

dibuat sesuai metode yang dikembangkan dan dibakukan oleh Irawati dkk [1].

Pepes ikan mas dibuat dan diiradiasi pada waktu yang berbeda, yaitu sampel tanggal 11 November 2006 (A), tanggal 14 Juni 2007 (B), tanggal 5 April 2008 (Pepes C), dan tanpa label diiradiasi pada tahun 2008 (D) serta sampel pepes ikan mas yang tidak diiradiasi sebagai kontrol standar yang dipersiapkan segar, pada saat akan dilakukan analisis. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi sampel adalah *aquadest* (air suling), kertas saring Whatman 40, sedangkan bahan baku untuk analisis proliferasi limfosit adalah darah manusia golongan AB dari donor yang sehat. Bahan lain yang digunakan adalah histopaque (Sigma, USA), RPMI-1640 (Sigma, USA), NaHCO₃ anhidrous, gentamycin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA), HCl-isopropanol 0,04N, Lipo Poly Sacharides (LPS) dan larutan mitogen (Con A dan Pokeweed). Bahan kimia untuk pengukuran kadar malonaldehida, adalah larutan standar 1,1,3,3 tetraetoksipropana (TEP) (Sigma, USA), larutan *phosphate buffer saline* (PBS), larutan TBA 0,38 % - *Tri Chloro Acetic acid* (TCA) 15 % - *Butylated Hydroxy Toluene* (BHT) 0,5 % dalam HCl 0,25 N dingin [2].

Peralatan yang digunakan dalam persiapan sampel adalah pisau, mortar, corong, kain saring, gelas ukur, gelas piala, *syringe*, membran steril 0,20 µm, dan sentrifuse. Alat yang digunakan dalam analisis proliferasi limfosit adalah *vacutainer* darah dan serum, tabung sentrifuse (*Cognic*), mikropipet eppendorf 10-100 µl dan 100-1000 µl, sentrifus, *laminar air flow*, *microplate reader*, lempeng mikrokultur (*Cognic*), *waterbath*, dan inkubator 37°C dengan atmosfer 5% CO₂, O₂ 95% dan RH 96%. Sedangkan alat yang digunakan dalam pengukuran kadar malonaldehida adalah tabung reaksi, mikropipet, labu takar, *waterbath*, sentrifus, tabung sentrifus, dan spektrofotometer UV-VIS.

Metode

Ekstraksi Sampel. Bagian daging (*edible portion*) sampel pepes ikan mas iradiasi dan kontrol yang akan diujikan masing-masing diambil dan dipisahkan yaitu sebanyak 15 g untuk pengujian proliferasi limfosit, dan sebanyak 10 g untuk pengukuran kadar malonaldehida. Sampel A yang sudah melewati batas masa simpan (*expired*) hanya digunakan untuk pengecekan kadar malonaldehida saja, dan tidak dilakukan uji proliferasi limfosit. Sampel kemudian diekstrak menggunakan aquades (perbandingan 1:1) dan dihancurkan dengan mortar. Hancuran sampel kemudian disaring menggunakan kain saring dan dimasukkan dalam tabung sentrifus kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit.

Bagian supernatan sampel pasca sentrifugasi dipisahkan dari lemak dan minyak lalu disaring, kemudian dilewatkan pada membran steril dengan ukuran pori 0,20 μm . Pada pengujian proliferasi limfosit digunakan ekstrak steril, namun pada pengukuran kadar malonaldehida cukup digunakan ekstrak yang lolos kertas saring. Penggunaan membran steril dalam proses pemisahan dilakukan karena mikroorganisme yang dapat mengontaminasi dapat tertahan di membran.

Ekstrak yang akan diuji kemudian diperlakukan seperti yang telah secara rinci dikemukakan oleh PUTRI [2].

Proliferasi Limfosit

a. Persiapan Media Kultur Sel

Media yang dipergunakan untuk kultur sel limfosit adalah RPMI-1640 yang mengandung L-glutamine. Sebanyak 10,42 g bubuk RPMI dilarutkan dalam *aquabidest* sebanyak 1000 ml sehingga diperoleh 1000 ml larutan RPMI-1640 selanjutnya ditambahkan 2 g NaHCO_3 yang berfungsi sebagai *buffer* dan 10 ml gentamycin untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme pada media. Campuran larutan tersebut kemudian dilewatkan pada membran steril 0,22 μm hingga menjadi steril [2].

b. Pengujian limfosit darah tepi , dan aktivitas proliferasi sel limfosit menggunakan serum darah golongan AB

Pengujian limfosit darah tepi dan serum darah golongan AB masing-masing dilakukan menurut metode NURRAHMAN dkk. [6].

Sel limfosit yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari darah seorang donor sehat secara profesional dan aseptis di klinik Farfa Dramaga dengan menggunakan tabung *vacuntainer* steril. Darah tersebut kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifus, yang dilakukan di dalam *laminar hood*.

c. Pengujian aktivitas proliferasi dari suspense sel limfosit

Pengujian dilakukan dengan metode MTT menurut MEIRIANA [7]. Nilai Indeks Stimulasi (I.S) dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{I.S.} = \frac{\text{Absorbansi ekstrak sampel}}{\text{Absorbansi kontrol standar}}$$

Penetapan kadar malonaldehida.

Kadar Malonaldehida ditetapkan menurut metode SELIGMAN *et al.* [8].

Analisis Statistik. Analisis statistik yang digunakan adalah ANOVA dengan nilai selang kepercayaan 99% yang diikuti dengan uji Duncan [9].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, ekstraksi dilakukan pada bagian daging ikan yang umum dikonsumsi oleh masyarakat (*edible portion*). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah air suling. Hal ini dilakukan dengan asumsi bahwa masyarakat mengkonsumsi pepes, dan mengkonsumsi air biasa sebagai minuman. Pada uji proliferasi limfosit digunakan sampel yang dilewatkan melalui membran steril, untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme agar tidak menyebabkan kesalahan terhadap parameter yang diuji. Pengenceran dengan

taraf yang berbeda ditujukan untuk membedakan intensitas dalam konsumsi pepes ikan mas iradiasi. Semakin rendah taraf pengenceran, berarti frekwensi seseorang dalam hal mengkonsumsi ikan dianggap semakin tinggi. Uji toksisitas secara *in vitro* yang dilakukan selama ini terbatas pada sel bakteri dan sel mamalia juga terbatas pada efek mutagenik dari senyawa radiolitik yang terdapat pada produk iradiasi, misalnya senyawa 2-Alkyl Cyclo Butanones (ACB) dan 2-Deoxy alkyl Cyclo Butanone (DCB). ASHLEY *et al.* [10] melaporkan bahwa, dari 19 penelitian yang dilakukan secara *in vitro* terhadap efek mutagenik sel, ada 7 penelitian yang menyatakan bahwa produk dapat menyebabkan mutagenik maupun sitotoksik sel. Namun hal ini dianggap tidak berbahaya karena sumber mutagenik yang ada dianggap tidak menyebabkan tumor atau kanker. Sementara itu dari 26 penelitian dan studi studi *in vitro* yang dilakukan, hanya empat penelitian yang menyatakan bahwa pemberian ransum iradiasi pada tikus menyebabkan mutasi sel. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh penyimpangan sifat histo patologi hewan tersebut yang sulit dideteksi sebelum pemberian ransum tersebut.

Ekstraksi sampel

Pada penelitian ini, ekstraksi dilakukan pada bagian daging ikan yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat (*edible portion*). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah air suling. Hal ini dilakukan dengan asumsi bahwa masyarakat mengkonsumsi pepes, dan mengkonsumsi air biasa sebagai minuman. Pada uji proliferasi limfosit digunakan sampel yang dilewatkan melalui membran steril, untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme agar tidak menyebabkan kesalahan terhadap parameter yang diuji. Pengenceran dengan taraf yang berbeda ditujukan untuk membedakan intensitas dalam konsumsi pepes ikan mas radiasi. Semakin rendah taraf pengenceran, berarti frekwensi

seseorang di dalam mengkonsumsi ikan dianggap semakin tinggi.

PROLIFERASI LIMFOSIT

Model uji toksisitas kultur limfosit *in vitro* pada pepes ikan mas iradiasi

Metode *in vitro* memerlukan kondisi lingkungan pertumbuhan yang sama seperti keadaan di dalam tubuh (*in vivo*) agar proses biologis yang terjadi di dalam kultur sel berlangsung mendekati keadaan sebenarnya di dalam tubuh. Kondisi lingkungan yang perlu dikontrol, yaitu temperatur, pH, asupan nutrisi yang diberikan, tekanan osmotik, ataupun fase gas yang sesuai [11]. Keuntungan dari metode *in vitro* adalah keadaan lingkungan pertumbuhan yang cenderung lebih stabil karena dapat diamati dan diatur secara langsung, selain itu karakteristik dari sel yang ingin ditumbuhkan juga dapat diatur [12].

Kultur sel limfosit dapat digunakan sebagai model uji toksisitas karena limfosit adalah sel yang bertanggung jawab terhadap respon imun spesifik, dimana sel tersebut mempunyai kemampuan untuk mengenal berbagai macam antigen yang berbeda [13]. Limfosit mempunyai fungsi yang paling beragam dibandingkan semua sel dalam sistem imun dimana lebih dari satu juta struktur antigenik dapat dibedakan karena kemampuan pengenalan yang dimiliki limfosit. Selain itu limfosit sebagai sel imun cenderung sensitif terhadap ketidakseimbangan oksidan-antioksidan dalam tubuh karena struktur membran plasma sel limfosit banyak mengandung asam lemak tidak jenuh yang mudah teroksidasi. Selain mempengaruhi sel limfosit, ketidakseimbangan oksidan-antioksidan dalam tubuh juga mempengaruhi integritas dan fungsi plasma membran sel, protein selular, DNA, dan mengganggu transduksi sinyal dalam replikasi DNA [14]. Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam

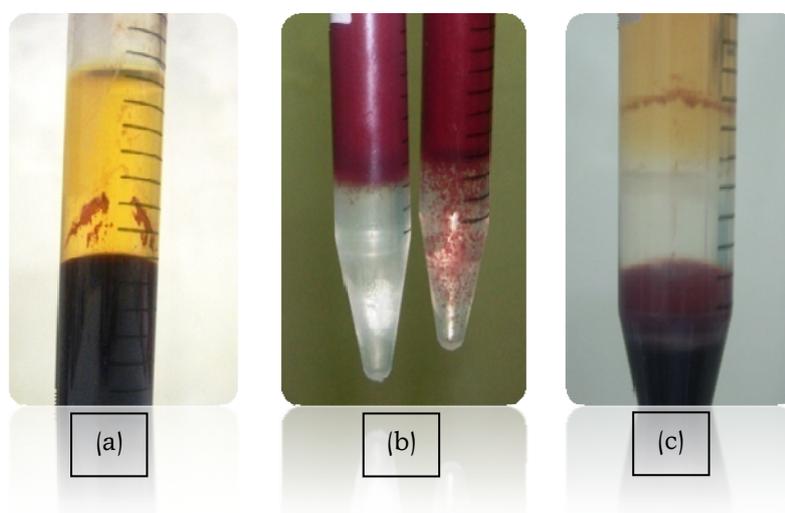
lingkungan pertumbuhan sel limfosit dapat menghambat proliferasi dari sel limfosit.

Larutan *histopaque* mampu menahan sel-sel agranulosit yang berdensitas rendah seperti limfosit sehingga tetap berada di bagian atas, sementara sel eritrosit yang berdensitas tinggi berada di bagian dasar. Menurut BALABAN, *et al.* [15], Metode pemisahan dengan menggunakan larutan *histopaque* dapat memisahkan lebih dari 90%

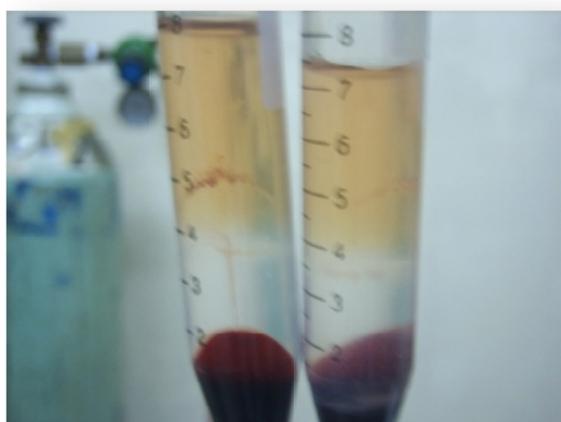
limfosit hidup yang terkandung dalam darah.

Proses dan hasil isolasi sel limfosit dan hasil pemisahan sel limfosit menggunakan larutan *Histopaque* masing-masing disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Pada penelitian ini digunakan senyawa mitogen sebagai kontrol positif. Senyawa mitogen dapat memicu terjadinya proliferasi non spesifik dari sel limfosit karena senyawa



Gambar 1. (a) Darah setelah disentrifuse dan terpisah menjadi bagian plasma, *buffycoat*, dan eritrosit, (b) Lapisan *buffycoat* dan larutan *Histopaque*, (c) Setelah disentrifuse, terjadi pemisahan eritrosit, *histopaque*, dan limfosit.



Gambar 2. Hasil pemisahan limfosit menggunakan *Histopaque*.

ini dapat mengaktivasi hormon tirosin kinase yang merupakan faktor pertumbuhan dari sel. Hormon tirosin kinase bertanggung jawab untuk mengirimkan sinyal-sinyal yang mempengaruhi faktor transkripsi dan aktivasi gen sehingga terjadi proliferasi sel [16].

Senyawa mitogen yang digunakan pada penelitian ini adalah pokeweed (PWM) dan lipopolisakarida (LPS). PWM adalah senyawa mitogen yang diekstrak dari tanaman *pokeweed* (*Phytolacca americana*) dan mengandung protein lektin yang berasal dari tumbuhan. Lektin mampu mengenali perbedaan glikoprotein pada permukaan setiap sel, termasuk sel limfosit. PWM dapat

menginduksi proliferasi sel limfosit T dan B secara bersama-sama [17], sedangkan senyawa mitogen LPS berasal dari komponen dinding sel bakteri gram standar seperti *Salmonella typhi*. LPS dapat memicu proliferasi dari sel B. Konsentrasi mitogen yang digunakan adalah 10 µg/ml. Penentuan konsentrasi ini dipilih berdasarkan penelitian KRISMAWATI [12].

Hasil yang diperoleh di dalam penelitian ini menunjukkan bahwa nilai Indeks Stimulasi (IS) kontrol positif lebih tinggi bila dibandingkan dengan kontrol standar. Hal ini menunjukkan mitogen yang digunakan berfungsi dengan baik sehingga dapat memicu terjadinya proliferasi sel limfosit. Nilai IS kontrol standar dianggap 1, sementara nilai IS sel yang dikultur dengan mitogen Con A adalah 1.54 dan nilai IS yang dikultur dengan mitogen LPS adalah 1.27.

Jumlah sel limfosit hidup tersebut ditentukan melalui asumsi bahwa sel limfosit akan mampu bertahan hidup dan melewati siklus hidupnya selama waktu inkubasi 72 jam. Pemilihan waktu inkubasi 72 jam dilakukan karena kultur sel limfosit manusia hanya bisa bertahan selama tiga hari, bila lewat dari waktu tersebut maka sel yang dikultur akan mati secara perlahan [18]. Pemilihan waktu inkubasi 72 jam juga disesuaikan dengan asumsi berkurangnya zat-zat nutrisi yang ada untuk mendukung proses pertumbuhan sel. Medium pertumbuhan sel limfosit hanya berfungsi secara maksimal selama tiga hari, tetapi, untuk pembuatan kultur yang lebih lama, harus dilakukan penyegaran media dan penambahan glutamin.

Pengujian aktivitas proliferasi dilakukan dengan membandingkan antara jumlah sel limfosit yang hidup tanpa penambahan ekstrak dengan sel yang ditambahkan ekstrak melalui peningkatan ataupun penurunan jumlahnya setelah inkubasi selama 72 jam.

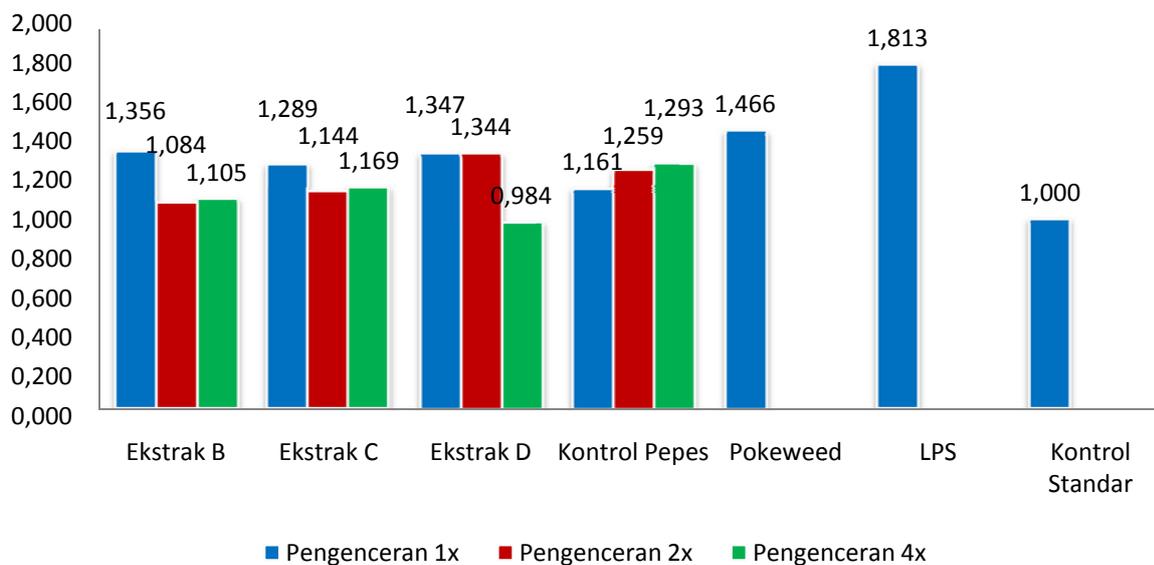
Pengaruh ekstrak pepes iradiasi pada proliferasi limfosit

Berdasarkan hasil yang didapatkan dari nilai pembacaan kultur tampak bahwa

nilai IS yang didapatkan bervariasi dan menunjukkan pola tertentu untuk tiap pengenceran. Nilai indeks kultur limfosit ini merupakan nilai rata-rata dari hasil pembacaan sampel pada dua *batch* dengan tiga kali ulangan. Kontrol positif LPS dan Pokeweed menunjukkan nilai IS lebih besar dibandingkan dengan kontrol standar maupun sampel lain yang diuji, dimana nilai IS LPS adalah 1,813 dan nilai IS Pokeweed adalah 1,466 dari nilai kontrol standar yaitu 1,000. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa mitogen yang digunakan masih berfungsi dengan baik untuk menginduksi proliferasi dari limfosit yang diuji. Perbandingan nilai IS kultur limfosit pada masing-masing sampel dengan berbagai pengenceran dapat dilihat pada Gambar 3.

Perbandingan antara sampel pepes ikan mas iradiasi dan sampel pepes kontrol pada pengenceran 1x menunjukkan bahwa sampel-sampel pepes iradiasi memiliki nilai IS lebih besar dibandingkan dengan sampel pepes kontrol. Nilai IS dari sampel pepes kontrol sebesar 1,161, sampel pepes B sebesar 1,356, sampel pepes C sebesar 1,289, dan sampel pepes D sebesar 1,347. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa masing-masing sampel pepes iradiasi pengenceran 1x memiliki nilai IS yang tidak berbeda nyata dengan sampel pepes kontrol dan kontrol standar pada selang kepercayaan 99%. Hal ini menunjukkan bahwa baik sampel pepes iradiasi maupun sampel pepes kontrol tidak menginduksi proliferasi dari limfosit dan tidak membunuh sel (non-sitolitik).

Pada pengenceran 2x terlihat bahwa ekstrak pepes kontrol dengan nilai IS 1,259 memiliki nilai lebih besar dari pada sampel pepes iradiasi B (1,084) dan C yaitu dengan (1,144). Nilai IS tertinggi dicapai oleh sampel D (1,344). Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa nilai IS pada sampel pepes iradiasi dan sampel pepes kontrol pada taraf pengenceran 2x tidak memiliki perbedaan yang nyata pada selang kepercayaan 99%. Hal ini menyatakan bahwa baik sampel pepes iradiasi maupun sampel pepes kontrol



Gambar 3. Indeks stimulasi (IS) proliferasi kultur limfosit.

tidak menginduksi proliferasi dari limfosit maupun membunuh sel (non-sitolitik).

Hasil pada taraf pengenceran 4x, menunjukkan bahwa nilai IS sampel pepes kontrol adalah 1,293, lebih besar daripada sampel pepes iradiasi, bahkan nilai IS pada sampel pepes D menunjukkan nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol standar. Nilai IS pada masing-masing sampel adalah pada pepes B sebesar 1,105, pepes C sebesar 1,169, dan pepes D sebesar 0,984. Hasil uji ANOVA yang menunjukkan bahwa pada taraf pengenceran ini, nilai IS sampel pepes iradiasi, sampel pepes kontrol, dan sampel kontrol standar tidak memiliki perbedaan yang nyata pada selang kepercayaan 99%. Berdasarkan hal ini dapat dikatakan bahwa baik sampel pepes iradiasi maupun sampel pepes kontrol tidak menginduksi proliferasi dari limfosit dan sampel pepes D tidak mengurangi jumlah sel limfosit yang dikulturkan.

Pada penelitian ini tampak bahwa ekstrak pepes ikan iradiasi tidak menyebabkan penghambatan proliferasi sel limfosit selama masa inkubasi 72 jam. Hal ini membuktikan bahwa dalam lingkungan tumbuh sel limfosit tidak terdapat senyawa yang bersifat toksik, termasuk ekstrak

sampel pepes iradiasi. Menurut DIEHL [19], energi yang dihasilkan dari radiasi gamma sumber radioaktif cobalt-60 terlalu kecil untuk menginduksi radioaktivitas elemen dalam matriks pangan. Hal serupa juga dinyatakan oleh DOYLE [20].

Salah satu kekhawatiran atas keamanan pangan iradiasi juga akibat adanya dugaan pembentukan produk radiolitik berbahaya dalam produk iradiasi. Besar kecilnya keberadaan produk radiolitik ini di dalam produk tergantung pada dosis iradiasi yang diaplikasikan, kadar air bahan, dan keberadaan oksigen [19]. Bahkan menurut NAWAR [21], pembentukan senyawa radiolitik yang terjadi akibat proses pemasakan panas bisa lebih besar dibandingkan dengan proses iradiasi. Kombinasi pembekuan dan kondisi vakum pada produk juga mencegah terbentuknya rantai radikal bebas pada produk. Pada suhu -20°C sampai -40°C , radikal bebas yang terbentuk akibat energi ionisasi akan terperangkap dan tidak dapat bergerak sehingga tidak mampu menyerang substrat pangan yang ada dan tidak menyebabkan terjadinya rantai radikal bebas dalam produk. Radikal bebas yang terperangkap akan mengalami pembelahan diri dalam

waktu nanodetik sehingga tidak akan tersisa dalam produk. Pembekuan juga menurunkan keberadaan air bebas sehingga meminimalkan pembentukan senyawa radikal hidroksi, hidrogen peroksida, maupun hidrogen reaktif.

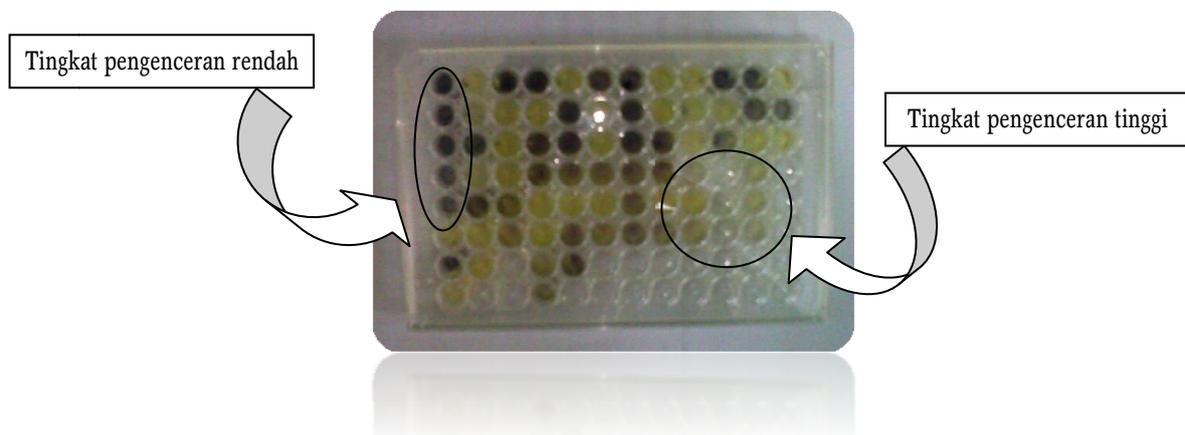
Pengaruh variasi pengenceran terhadap proliferasi limfosit

Berdasarkan pada grafik perbandingan nilai IS sampel terlihat bahwa pada sampel pepes kontrol, peningkatan nilai IS berbanding lurus dengan tingkat pengenceran, tetapi pada pepes iradiasi menunjukkan hasil sebaliknya. Walaupun berdasarkan pada pengujian ANOVA nilai yang didapatkan tidak berbeda nyata, namun hal ini menunjukkan bahwa adanya interaksi tertentu antara air dengan ekstrak sampel. Perbandingan hasil pewarnaan kultur limfosit dengan menggunakan MTT dapat dilihat pada Gambar 5. Tampak bahwa dengan semakin meningkatnya pengenceran, warna biru yang dihasilkan memudar bahkan hilang.

keberadaan air. Radikal hidroksi maupun hidrogen peroksida dapat menyebabkan oksidasi pada membran sel limfosit yang kaya akan asam lemak tak jenuh sehingga mengganggu proses proliferasi dari limfosit, kemungkinan hal ini dapat menurunkan nilai IS.

KADAR MALONALDEHIDA

Analisis malonaldehida dilakukan sebagai pengukuran tidak langsung bagi radikal bebas karena untuk menentukan jumlah radikal bebas secara langsung sangat sulit. Hal ini disebabkan radikal bebas bersifat tidak stabil dan cenderung cepat mengambil elektron dari molekul lain [22]. Malonaldehida merupakan produk peroksidasi asam lemak tak jenuh yang banyak ditemukan dalam matriks biologis. Oleh karena itu, pengukuran kadar malonaldehida juga berfungsi sebagai indikator kerusakan oksidatif di dalam material biologis.



Gambar 5. Hasil pewarnaan kultur limfosit menggunakan MTT

Pada produk iradiasi biasanya banyak ditemukan hidrogen peroksida dan radikal hidroksi sebagai oksidator kuat. Saat dilakukan pengenceran maka semakin meningkat pula pembentukan radikal hidroksi ataupun hidrogen peroksida akibat

Menurut NAWAR [23], metode TBARS banyak digunakan untuk mengukur keberadaan radikal bebas dan peroksidasi lipid karena memiliki kepekaan yang cukup tinggi. Selain itu, metode ini mudah

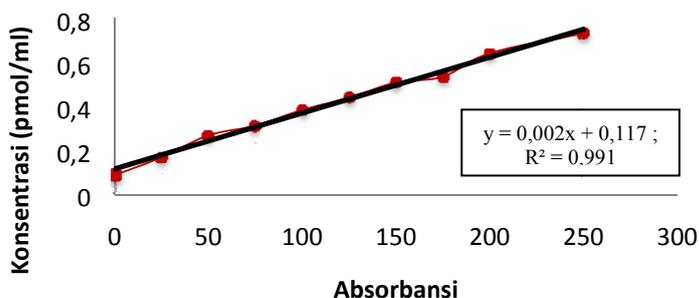
diaplikasikan untuk berbagai sampel pada berbagai tahap oksidasi.

Ekstrak pepes ikan baik yang diiradiasi maupun pepes ikan kontrol direaksikan dengan larutan campuran TBA, TCA, dan BHT. Larutan trichloroacetic acid (TCA) berfungsi untuk mengendapkan protein yang ada pada sampel, sementara butylated hydroxytoluene (BHT) berfungsi sebagai antioksidan. Pemanasan yang dilakukan berfungsi untuk menghidrolisis peroksida lipid sehingga dapat membebaskan malonaldehida yang terikat dalam kompleks. Sampel yang digunakan pada penelitian ini

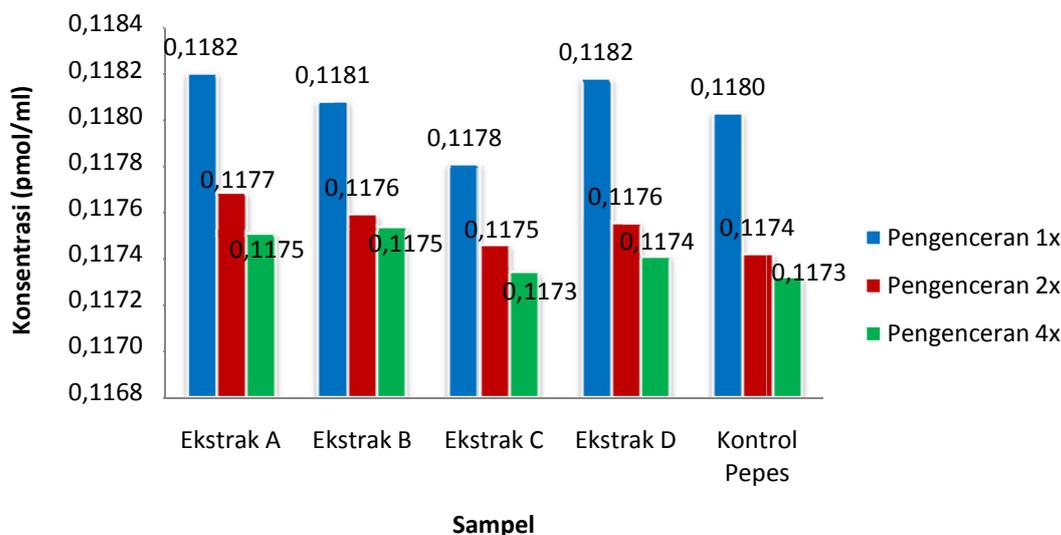
adalah sampel pepes iradiasi A, B, C, D, dan sampel pepes kontrol.

Untuk mengetahui konsentrasi malonaldehida dalam sampel digunakan larutan standar TEP (1,1,3,3 tetraetoksipropana). Pada suasana asam, TEP dapat terhidrolisis dan menghasilkan hemiasetal dan etanol. Hemiasetal yang terbentuk kemudian terdekomposisi menjadi etanol dan malonaldehida. Kurva standar larutan TEP dari malonaldehida (Gambar 6) diperlukan untuk mengetahui secara pasti konsentrasi malonaldehida dalam sampel. Berdasarkan hasil pengukuran terlihat

Kurva Standar Larutan TEP



Gambar 6. Kurva standar larutan TEP



Gambar 7. Perbandingan konsentrasi malonaldehida

bahwa konsentrasi malonaldehida yang terkandung di dalam sampel baik pepes iradiasi maupun pepes kontrol dalam berbagai pengenceran menunjukkan nilai yang tidak berbeda jauh yaitu dengan kisaran 0,1173-0,1182 pmol/ml (Gambar 7).

Pada sampel tanpa pengenceran (1x), sampel A dan D memiliki konsentrasi sebesar 0,1182 pmol/ml, sampel B sebesar 0,1181 pmol/ml, sampel C sebesar 0,1178 pmol/ml, dan sampel pepes kontrol sebesar 0,1180 pmol/ml. Pada taraf pengenceran 2x terlihat bahwa sampel pepes A memiliki nilai konsentrasi tertinggi (0,1177 pmol/ml), sampel pepes B dan sampel D masing-masing memiliki konsentrasi sebesar 0,1176 pmol/ml, dan sampel C sebesar 0,1175 pmol/ml, sementara sampel pepes kontrol memiliki konsentrasi sebesar 0,1174 pmol/ml. Pada taraf pengenceran 4x, terlihat bahwa sampel pepes A dan sampel pepes B masing-masing memiliki konsentrasi sebesar 0,1175 pmol/ml, sampel D sebesar 0,1174 pmol/ml, sedangkan sampel C dan sampel pepes kontrol masing-masing sebesar 0,1173 pmol/ml. Secara keseluruhan, hasil uji ANOVA dari berbagai tingkat pengenceran menunjukkan bahwa masing-masing sampel pepes iradiasi memiliki konsentrasi malonaldehida yang tidak berbeda nyata dengan sampel pepes kontrol pada selang kepercayaan 99%. Berdasarkan hal tersebut, dapat dinyatakan bahwa kadar malonaldehida pada sampel pepes ikan mas iradiasi masih dapat diterima dan tidak berbahaya.

CRAWFORD *et al.* [24] melakukan penelitian tentang dosis letal malonaldehida pada tikus adalah sebesar 632 ppm, sementara penelitian mengenai dosis letal malonaldehida pada manusia belum ada. Data mengenai pengukuran kadar malonaldehida pada produk ikan siap saji yang mengalami proses γ -iradiasi pada dosis tinggi masih terbatas. Sebagai perbandingan, data hasil pengukuran kadar malonaldehida (mg/kg) pada sampel ikan *Sea Bream* yang diiradiasi gamma pada dosis 1 kGy dan 3 kGy menunjukkan bahwa selama masa simpan selama 21 hari, kadar

malonaldehida sampel meningkat. Pada awal penyimpanan, kadar malonaldehida sampel berkisar antara 0,5-0,6 mg/kg sampel dan pada akhir penyimpanan sampel kontrol (non-iradiasi) memiliki konsentrasi sebesar 4.9 mg/kg, sampel iradiasi 1 kGy dan 3 kGy masing-masing memiliki konsentrasi sebesar 5,2 mg/kg, dan sebesar 6,8 mg/kg [25]. Produk pangan berbasis ikan, mengandung kadar air, protein serta lemak cukup tinggi. Perlakuan iradiasi pada produk pangan dapat menyebabkan beberapa perubahan pada matriks pangan. Pada umumnya dengan semakin meningkatnya dosis iradiasi maka perubahan yang terjadi pada komponen pangan pun meningkat, dan pembentukan malonaldehida merupakan hasil dari oksidasi lipid pada komponennya. Oksidasi lipid pada pangan iradiasi berasal dari efek radiasi langsung akibat adanya pemutusan ikatan rangkap pada komponennya. Autooksidasi dari lipid pada peristiwa ionisasi juga dapat terjadi akibat keberadaan oksigen [19]. Teknik pengemasan dan kondisi iradiasi yang diterapkan pada sampel pepes ikan mas dalam penelitian ini ditujukan untuk mencegah terjadinya oksidasi lipid dan komponen pangan lainnya.

Menurut ASTRACK *et al.* [26], pengukuran kadar peroksida minyak ikan makarel yang dilakukan sesaat setelah proses iradiasi, tidak menunjukkan adanya perbedaan antara sampel iradiasi dan sampel non-iradiasi. Namun selama proses penyimpanan, tampak perbedaan nyata pada sampel yang mengalami perlakuan iradiasi. Hal ini mungkin terjadi karena selama proses ionisasi yang berlangsung terbentuk hidrogen peroksida yang berasal dari sistem *aqueous* matriks pangan. Selama penyimpanan, hidrogen peroksida akan berkurang secara berkala, namun menyebabkan substrat lain dalam bahan pangan teroksidasi.

Senyawa-senyawa yang terbentuk selama proses iradiasi disebut sebagai senyawa radiolitik. Beberapa peneliti terdahulu telah menemukan bahwa radiasi tidak menyebabkan pembentukan cincin

aromatik dan cincin heterosiklik, serta tidak menyebabkan kondensasi dari cincin aromatik [19]. Senyawa cincin aromatik dan heterosiklik diketahui bersifat karsinogen dan biasanya terbentuk akibat proses pemasakan suhu tinggi. Menurut NAWAR [21], perubahan kimia yang terjadi akibat proses panas lebih besar daripada proses iradiasi. Iradiasi yang dilakukan pada asam amino murni dan peptida pada dosis 60 kGy membentuk senyawa volatil yang jauh lebih sedikit dibandingkan dengan proses pemasakan pada suhu 170°C selama satu jam.

Selain itu dari beberapa studi yang dilakukan pada daging yang diiradiasi menyimpulkan bahwa protein atau kompleks protein-karbohidrat mampu berfungsi sebagai antioksidan yang melindungi oksidasi lipid dengan meningkatnya dosis iradiasi [19]. Menurut KARADAG and GUNES [27], penggunaan antioksidan, bumbu, dan rempah pada produk juga dapat menghambat oksidasi lipid pada produk. Pada produk pepes ikan mas dalam penelitian ini, digunakan berbagai macam bumbu dan rempah yang mengandung berbagai komponen bioaktif yang dapat berfungsi sebagai antioksidan dan menurunkan oksidasi lipid akibat proses iradiasi. Oleh karenanya, pepes iradiasi dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi masyarakat.

KESIMPULAN

Baik pada sampel kontrol tanpa penyimpanan, maupun sampel dengan perlakuan kombinasi antara kondisi iradiasi dan pengemasan pada pembuatan pepes ikan mas yang diiradiasi dengan dosis 45 kGy pada 4 taraf penyinaran yang berbeda yang disimpan selama 6-12 bulan, tidak berpotensi menghambat dan menginduksi proliferasi maupun menurunkan jumlah kultur sel limfosit darah yang diuji. Kadar malonaldehida pada pepes iradiasi nilai yang diperoleh masih berada jauh dibawah batas ambang yang diijinkan untuk bahan pangan

(5 mg malonaldehida/kg sampel). Berdasarkan kedua hasil pengamatan tersebut, dapat dinyatakan bahwa pepes ikan mas yang diiradiasi dengan dosis 45 kGy dan disimpan selama 6-12 bulan dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi.

DAFTAR PUSTAKA

1. 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*, In: Radiation processing for safe, shelf-stable and ready to eat food, Proceedings of a final Research Co-ordination Meeting held in Montreal, Canada, 10-14 July 2000, IAEA-TECDOC-1337, International Atomic Energy Agency, Vienna, 85-99 (2003).
2. PUTRI, K.R., Proliferasi limfosit dan kadar malonaldehida pada produk pepes ikan iradiasi, Skripsi, Fateta, IPB, Bogor (2009).
3. ANONYMOUS, "Codex General Standard for Irradiated Foods", (Codex Stan 106-1983 -Rev. 1-2003) Codex Alimentarius Commission, Geneva, (2003).
4. DEPKES RI., Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.701/MENKES/PER/VIII/2009, tentang pangan iradiasi (2009).
5. NURRAHMAN, F., ZAKARIA, 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).

6. MEIRIANA, Y., Pengaruh ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) terhadap aktivitas proliferasi sel limfosit manusia secara *In Vitro*, Skripsi, Fateta, IPB, Bogor (2006).
7. 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, *Jurnal Lipids*, **12**, (11), (1977).
8. STEEL, R.G.D. dan TORRIE, J.H., "Prinsip dan prosedur statistika, Suatu pendekatan biometric, Terjemahan oleh : Bambang Sumantri, Gramedia, Jakarta (1980).
9. ASHLEY, B.C., BIRCHFIELD, P.T., CHAMBERLAIN, B.V., KOTWAL, R.S., MCCCELLAN, S.F., MOYNIHAN, S., PATNI, S.B., SALMON, S.A. and AU, W.W., Health concerns regarding consumption of irradiated food, *Int. J. Environ. Health.*, **207**, 493-504 (2004).
10. DAVIS, J.M., "Basic cell culture : A practical approach", Oxford University Press, New York (1994).
11. HARRISON, M.A. and RAE, I.F., *General Techniques of Cell Culture*, Cambridge University Press, Cambridge (1997).
12. KRISMAWATI, A., Pengaruh ekstrak tanaman ceremai, delima putih, jati belanda, kecombrang dan kemuning secara *in vitro* terhadap proliferasi sel limfosit manusia, Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor (2007).
13. AW, T.Y. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*, **70**, 557-565 (1999).
14. BALABAN, E.P., SIMON, T.R. and FRENKEL, E.P., Toxicity of indium-111 on the radiolabeled lymphocyte, *J. Nucl. Med.*, **28**, 229-233 (1987).
15. DECKER, J.M., "Introduction to Immunology", Blackwell Science, Inc., Massachusetts, (2001).
16. TIZARD, I., "Pengantar Imunologi Veteriner", Airlangga University Press, Surabaya, (1988).
17. PAUL, J., "Cell and Tissue Culture", Churchill livingstone, London, (1972).
18. DIEHL, J.F., "Safety of Irradiated Foods", Marcel Dekker. Inc., New York, (1990).
19. DOYLE, M.E., "Food Irradiation", Food Research Institute, UW-Madison, (1999).
20. NAWAR, W.W., Volatiles from food irradiation, *Food Revs. Internat.*, **2**, 45 (1986).
21. GUTTERIDGE, J.M.C., Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damages, *Clin. Biochem.*, **41**, 1819-1828 (1995).
22. NAWAR, W.W., *Lipids*, In: *Principles of Food Chemistry*, (O.R. FENNEMA, ed.), Marcell Dekker. Inc., New York, (1985).
23. CRAWFORD, D.L., SINNHUBER, R.O., STOUT, F.M., OLDFIELD, J.E. and KAUFMES, J., Acute toxicity of malonaldehyde. *J. Elsevier Inc.*, **7**, (6) 826-832 (1965).

-
24. CHOULIARA, I., SAVVAIDIS, I.N., RIGANAKOS, K. and KONTOMINAS, M.G. Shelf-life extension of vacuum-packaged sea bream (*Sparus aurata*) fillets by combined γ -irradiation and refrigeration: microbiological, chemical and sensory changes, J. Sci. Food. Agric., **85**, 779-784 (2005).
25. ASTRACK, A., SORBYE, O., BRASCH, A. and HUBER, W., Effects of high intensity electron burst upon various vegetable and fish oils, Food Res., **17**, 570 (1952).
26. KARADAG, A. and GUNES, G., The effects of gamma irradiation on the quality of ready-to-cook meatballs, Turk., J. Vet. Anim. Sci., **32**, (4), 269-274 (2008).
-