

## ANALISIS ENZIM ALANIN AMINO TRANSFERASE (ALAT), ASPARTAT AMINO TRANSFERASE (ASAT), UREA DARAH, DAN HISTOPATOLOGIS HATI DAN GINJAL TIKUS PUTIH GALUR *Sprague-Dawley* SETELAH PEMBERIAN ANGKAK

[The Effects of Angkak Administration in *Sprague-Dawley* White Rats on Alanine Amino Transferase (ALAT) and Aspartic Amino Transferase (ASAT) Enzyme, Blood Urea, and Liver and Kidney Histopathology Test]

HASIM DANURI

Departemen Biokimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Kompleks Fapet IPB, Kampus Darmaga, Bogor, Indonesia, 16680

hasim@ipb.ac.id

Diterima 2 Agustus 2008/ Disetujui 14 Juni 2009

### ABSTRACT

Acute toxicity of angkak had been tested on 2 months aged male *Sprague-Dawley* white rats. Twenty five rats were divided into 5 groups; control, 2.5 g/kg body weight (bw), 5 g/kg bw, 10 g/kg bw and 15 g/kg bw, and each group was administered by angkak in water orally. The toxic effect of angkak to liver and kidney were tested by biochemical analysis for the activity of enzyme alanin amino transferase (ALAT/ EC 2.6.1.2), enzyme aspartate amino transferase (ASAT/ EC 2.6.1.1) and the level of urea in blood at one day before (H-1) and after (H+1) the treatment, as well as 6 days after the treatment (H+6). The mortality rate and clinical symptoms were observed after 24 hours until 6 days after treatment. The rats were necropsied to observe the lesion of liver and kidney both macroscopically and microscopically.

The result shows that all rats still survived since 24 hours to 6 days after the test. During the treatment with ad libitum rat chow contained 18% protein, the body weight of the rats were insignificantly increased ( $P > 0.05$ ). There were no changed of the appetite, eyes condition, fur, and behaviour of the rats. However, the feces of the rats which were treated with angkak are reddish. The activity of ALAT, ASAT enzyme as well as the urea level in blood were significantly increased as shown on H+1 compared to H-1 within all treatment groups, after that there were no significant changes in those parameter on H+6 compared to H+1. The histopathological result due to angkak on kidney shows less lesions and these lesions were reversible.

**Key words:** Angkak, *Monascus sp.*, Acute Toxicity, Liver and Kidney

### PENDAHULUAN

Angkak adalah produk fermentasi beras oleh kapang galur *Monascus sp.*, yaitu kapang dari kelas *Ascomycetes*, yang banyak digunakan sebagai pewarna makanan. Angkak mengandung beberapa pigmen antara lain rubropunktatin dan monaskorubrin yang berwarna merah, monaskin dan ankaflavin yang berwarna kuning, dan rubropunktamin yang berwarna ungu (Suwanto, 1985; Maolinang *et al.*, 2001). Di samping itu Carvalho *et al.*, (2005) melaporkan bahwa angkak juga mengandung sitrinin. Pigmen yang dikandung angkak mempunyai kestabilan yang lebih baik bila disimpan pada pH yang netral maupun alkali. Oleh karena itu, pigmen yang terkandung dalam angkak sangat cocok sebagai bahan tambahan pangan (Fink-Gremmels *et al.*, 1991; Fabre *et al.*, 1993; Juzvola *et al.*, 1996).

Di samping kandungan pigmen yang banyak digunakan untuk pewarna merah makanan, angkak juga mengandung metabolit yang digunakan untuk kepentingan medis yaitu monakolin K atau lovastatin (Juzvola *et al.*, 1996). Monakolin merupakan metabolit penting yang sudah diidentifikasi dari *Monascus sp.* (Endo 1979) dan telah diuji

kemampuannya dalam menghambat sintesis kolesterol (Endo 1979; Albert 1980; Endo *et al.*, 1985; 1986). Angkak dapat memperbaiki sirkulasi darah dan dapat menurunkan kadar kolesterol sebesar 11-32% dan kadar trigliserida sebesar 12-19%. Penurunan kadar kolesterol merupakan pencegahan primer terhadap penyakit jantung dan komplikasi lain dari aterosklerosis. Disamping kemampuan dalam perbaikan sirkulasi darah, angkak dipercaya mampu meningkatkan jumlah trombosit darah pada penderita penyakit demam berdarah dengue, obat asma, diare, desentri, mabuk laut, luka memar, dan anti ngompol (Wong & Koehler, 1981). Selain itu, angkak telah teruji mampu mempertahankan kualitas daging dan ikan karena adanya aktivitas antibakteri yaitu terhadap bakteri patogen dan perusak berspora seperti *Bacillus cereus* dan *Bacillus stearothermophilus* (Wong & Koehler, 1981).

Kapang penghasil pigmen merah gelap adalah *Monascus sp.* Beberapa galur yang dapat memproduksi pigmen tersebut adalah *Monascus purpureus*, *Monascus angka*, *Monascus barkeri*, *Monascus major*, serta *Monascus rubroprunus* (Carels & Shepherd, 1977).

Steinkraus (1983), melaporkan bahwa nilai *Lethal Dose 50* (LD<sub>50</sub>) angkak melalui injeksi peritoneal (IP) pada tikus putih sebesar 7 g/kg bb, sedangkan pada uji toksisitas sub-akut tidak menimbulkan kelainan pada organ. Akan tetapi Su & Wong (1977) melaporkan bahwa mengkonsumsi angkak dengan dosis 18 g/kg bb secara oral tidak menyebabkan kematian.

Atas dasar kepentingan medis, maka penelitian ini dilakukan, dan bertujuan untuk menentukan toksisitas akut LD<sub>50</sub> angkak pada tikus putih galur *Sprague-Dawley* yang dilanjutkan dengan analisis biokimia dan analisa histopatologis terhadap organ hati dan ginjal.

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Dua puluh lima ekor tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* berumur 60 hari, sehat, dan bebas patogen dipelihara pada kandang individual berukuran 30 cm x 20 cm x 20 cm di laboratorium hewan coba Departemen Biokimia, Kampus IPB Jalan Gunung Gede Bogor. Semua tikus diadaptasikan selama 40 hari sebelum perlakuan, sehingga pada awal perlakuan umur tikus 100 hari. Pada masa adaptasi tikus diberi makan dan minum *ad libitum*, serta ditimbang bobot badannya setiap hari. Pakan standar yang digunakan adalah pakan tikus yang diperoleh dari PT Indofeed Bogor dengan kandungan 18% protein. Satu hari sebelum perlakuan (H-1), semua tikus diambil darahnya untuk analisis aktivitas enzim ALAT, ASAT, dan kadar urea darah.

### Metode penelitian

Angkak yang digunakan dibuat dari beras putih IR-42 dengan fermentasi menggunakan *M. purpureus* strain 915 selama 15 hari (Danuri, 2008). Sediaan angkak disiapkan dengan cara digerus dan dilarutkan dalam akuades dengan volume pencekokan maksimal 5 ml per ekor. Tikus dikelompokkan menjadi lima kelompok. Kelompok satu digunakan sebagai kontrol hanya diberikan akuades tanpa pemberian angkak, kelompok dua diberikan angkak dengan dosis tunggal 2.5 gram/kg BB, kelompok tiga diberikan angkak dengan dosis tunggal 5 gram/kg BB, kelompok empat diberikan angkak dengan dosis tunggal 10 gram/kg BB, dan kelompok lima diberikan angkak dengan dosis tunggal 15 gram/kg BB. Pemberian angkak dilakukan secara per oral yaitu dengan cara cekok menggunakan sonde lambung pada hari ke-0 dan diamati setiap hari selama 10 hari perlakuan.

Semua hewan pada tiap kelompok diamati gejala klinisnya dan ditimbang bobot badannya setiap hari. Pengamatan gejala klinis meliputi nafsu makan, keadaan mata, feses, bulu dan tingkah laku. Hewan coba diambil darahnya melalui vena ekor mulai hari ke satu sebelum perlakuan sebagai acuan (H-1), serta pada hari pertama (H+1) dan hari keenam perlakuan (H+6). Selanjutnya contoh darah disimpan selama 24 jam di kulkas dan disentrifugasi pada 3.000 g selama 15 menit. Serum darah dipisahkan

untuk dianalisis kadar enzim ALAT, ASAT, dan urea serum darah. Analisis dilakukan dengan menggunakan metode spektroskopi enzimatik dengan kit analisis Randox. Setelah H+6, hewan dikorbankan untuk mendapatkan gambaran makroskopik dan mikroskopik organ-organ hati dan ginjal. Analisis histopatologis dilakukan di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

### Analisis kelainan hati (Bergmeyer, 1986)

Serum sebanyak 0.1 ml dicampur dengan 1 ml pereaksi ALAT. Setelah inkubasi selama 1 menit pada suhu 30°C, campuran dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 340 nm dan dilanjutkan kembali pembacaannya pada menit ke 1, 2, 3 dan 4. Analisis aktivitas enzim ASAT dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas, hanya saja pereaksi yang digunakan adalah pereaksi ASAT

Pereaksi ALAT terdiri atas buffer tris HCl, L-alanin, α-oksoglutarat, laktat dehidrogenase, dan NADH. Sedangkan pereaksi ASAT terdiri dari buffer tris HCl, L-aspartat, α-oksoglutarat, malat dehidrogenase, laktat dehidrogenase, dan NADH.

### Analisis kelainan ginjal (Kaplan & Pesce, 1989)

Sampel berupa serum darah diambil sebanyak 10 µl dan dicampur dengan 1.000 µl pereaksi urea. Setelah 30 detik pada suhu 37°C larutan dibaca absorbansinya pada 340 nm dan dilanjutkan kembali pembacaannya setelah 1; 2; 3; dan 4 menit. Standar diukur pada keadaan yang sama, hanya mengganti serum dengan larutan standar urea. Perhitungan konsentrasi urea diperoleh menggunakan persamaan berikut:

$$[\text{urea}](\text{mg/dL}) = \frac{\Delta A_{\text{sampel}}}{\Delta A_{\text{standar}}} \times [\text{standar}]$$

### Persiapan histopatologis (Humason, 1972; Kiernan, 1990)

Organ hati dan ginjal dibuat preparat histopatologis. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 X.

### Pengamatan mikroskopis

Pengamatan mikroskopis hati dan ginjal dilakukan menggunakan mikroskop cahaya. Metode skoring digunakan untuk menilai tingkat keparahan pada setiap luasan wilayah pengamatan. Kongesti, degenerasi lemak, degenerasi protein, dan nekrosis diberi skor dari 0 sampai 3. Skor dengan nilai nol berarti normal, 1 berarti terjadi perubahan 0-25%, skor 2 berarti terjadi perubahan antara 25-50%, dan skor 3 untuk perubahan lebih dari 50%.

### Analisis data (Matjik & Sumertajaya, 2000)

Rancangan yang digunakan pada penelitian adalah rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan lima kali ulangan.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Bobot badan dan keadan klinis hewan coba**

Jumlah ulangan per kelompok ditentukan berdasarkan persamaan Federer, yaitu  $(t-1) (n-1) > 15$  (Sastrosupadi, 1977). Sehingga jumlah ulangan per kelompok ditetapkan sebanyak 5 ulangan.

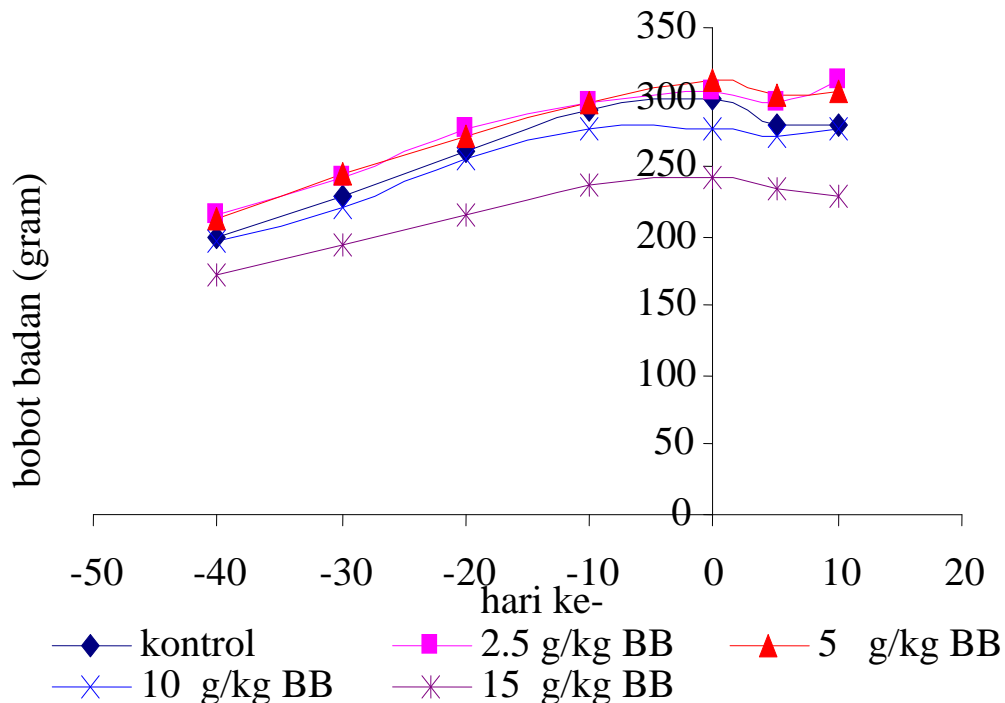
Bobot badan hewan percobaan tidak berbeda nyata antar semua kelompok selama adaptasi maupun setelah perlakuan (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa semua hewan percobaan seragam. Bobot badan selama perlakuan bagi semua kelompok tidak berbeda nyata ( $P>0.05$ ). Jadi pemberian berbagai dosis angkak tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan hewan coba.

Dosis komersial angkak pada manusia adalah 17 mg/kg bb per hari (Lin *et al.*, 2005), sehingga dosis terendah yang dicobakan pada penelitian ini adalah 145 kali dosis pada manusia. Hasil pengamatan gejala klinis semua hewan coba tidak menunjukkan perbedaan nyata, baik selama masa adaptasi maupun perlakuan. Feses berwarna merah ditemukan pada semua kelompok dengan perlakuan angkak. Pengamatan di bawah mikroskop terhadap warna merah pada feses menunjukkan bahwa dosis angkak yang cukup tinggi telah menyebabkan pigmen angkak mewarnai feses. Kematian hewan tidak ditemukan pada semua kelompok sampai pada akhir masa perlakuan, termasuk pada kelompok kontrol.

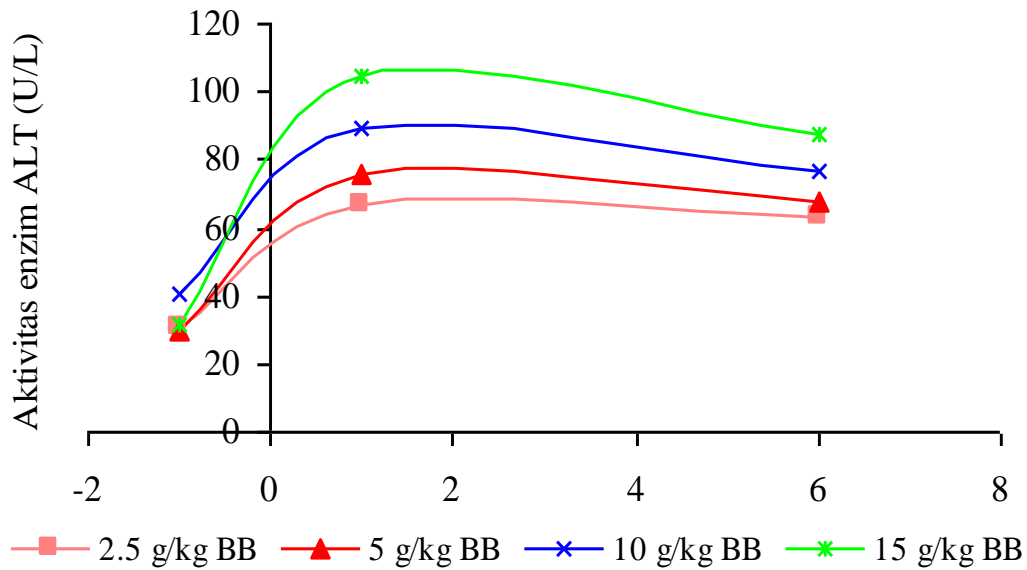
**Pengaruh angkak terhadap aktivitas enzim ALAT dan ASAT darah**

ALAT dan ASAT merupakan dua enzim yang sering dipakai untuk analisis kerusakan organ hati. Aktivitas enzim ALAT sebelum perlakuan rata-rata sebesar  $30,87 \pm 10,68$  U/l, sedangkan aktivitas enzim ASAT rata-rata sebelum perlakuan adalah sebesar  $63,00 \pm 20,99$  U/l. Hal ini sesuai dengan Altman & Dittmer (1971) yang menyatakan bahwa kisaran normal aktivitas ALAT pada tikus sebesar 17,0-30,2 U/l, sedangkan aktivitas enzim ASAT sebesar 45,7-80,8 U/l. Jadi aktivitas enzim ALAT dan ASAT tikus sebelum perlakuan masih dalam kisaran normal.

Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim ALAT pada semua kelompok perlakuan meningkat secara signifikan sejak mulai H+1 hingga H+6 dibandingkan dengan H-1 ( $P>0.05$ ). Namun bila dibandingkan dengan keadaan pada H+1, aktivitas enzim ALAT pada semua kelompok perlakuan pada H+6 menurun namun tidak signifikan. Gambar 2 menunjukkan bahwa pada H+1 ada perbedaan yang signifikan pada semua dosis ( $P>0.05$ ). Sedangkan pada H+6, kelompok 2.5 g/kg bb, 10 g/kg bb, dan 15 g/kg bb menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan dosis 5 g/kg bb ( $P>0.05$ ). Hati merupakan organ yang memiliki fungsi detoksifikasi bagi tubuh, konsentrasi enzim ALAT yang berbeda nyata pada H+1 dan H+6 perlakuan dibandingkan dengan H-1 pada semua kelompok menunjukkan bahwa dosis berpengaruh pada kerusakan sel-sel hati.



Gambar 1 Bobot badan tikus Sprague-Dawley selama adaptasi dan perlakuan



Gambar 2 Perbandingan aktivitas ALAT perlakuan pemberian angkak pada H-1, H+1, dan H+6.

Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim ASAT pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan sebelum perlakuan mengalami peningkatan secara signifikan mulai pada H+1 dan H+6 ( $P>0.05$ ). Sama seperti halnya pada ALAT, aktivitas enzim ASAT pada semua kelompok perlakuan pada H+6 mengalami kenaikan dibanding keadaan pada H+1, namun tidak signifikan.

Peningkatan aktivitas enzim ALAT dan ASAT pada semua kelompok perlakuan angkak menunjukkan kemungkinan terjadinya hepatolisis. Hal ini sesuai dengan hasil analisa histopatologis sel hati yang menunjukan adanya degenerasi lemak dan nekrosis. Peningkatan aktivitas enzim ALAT dan ASAT di dalam darah disebabkan adanya perubahan fisiologis hati, sehingga konsentrasi enzim tersebut terlepas dalam aliran darah. Kenaikan aktivitas enzim hati dalam darah dapat diakibatkan oleh kerusakan parenkim hati atau gangguan permeabilitas membran sel hati sehingga enzim bebas ke luar sel.

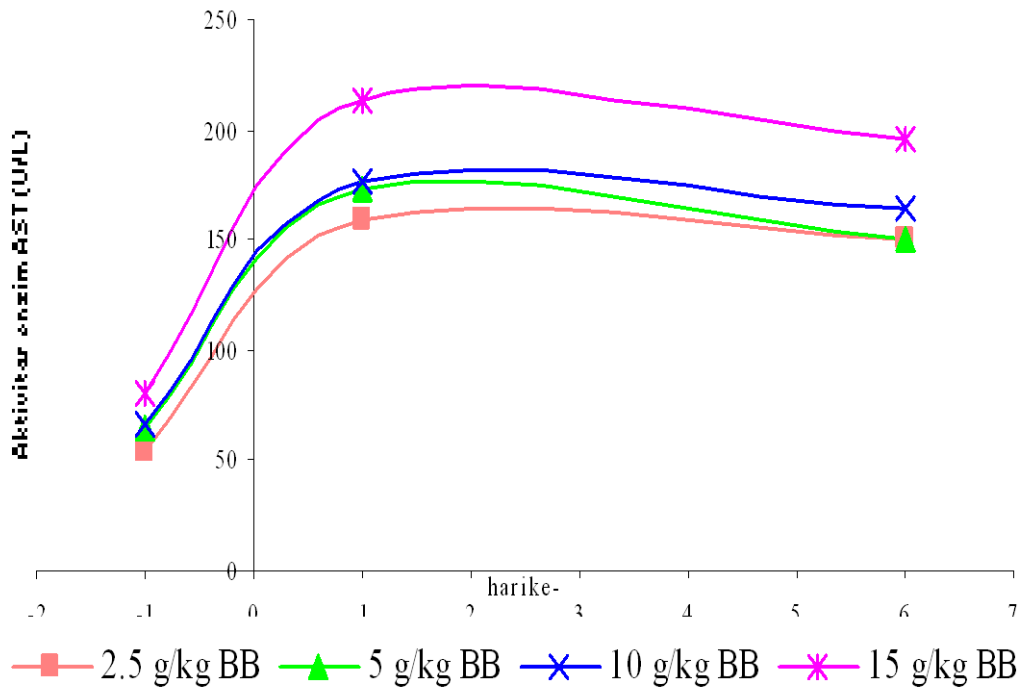
**Pengaruh angkak terhadap kadar urea darah**

Kerusakan ginjal dapat dideteksi melalui pengukuran kadar urea darah. Kadar urea darah diukur berdasarkan jumlah nitrogen yang dilepaskan sebagai konsentrasi urea dalam darah yang disebut *Blood Urea Nitrogen* (BUN). Pengukuran BUN menunjukkan jumlah urea yang terhidrolisis oleh enzim urease membentuk amonia, yang dapat diukur dengan analisis spektrofotometri. Rataan kadar urea darah tikus sebelum perlakuan adalah  $19,639 \pm 2,143$  mg/dL. Hal ini sesuai dengan Malole & Pramono (1989) yang melaporkan bahwa kadar urea darah tikus normal berkisar antara 15,0-21,0 mg/dL. Gambar 4 menunjukkan bahwa terhadap H-1, kadar urea darah pada

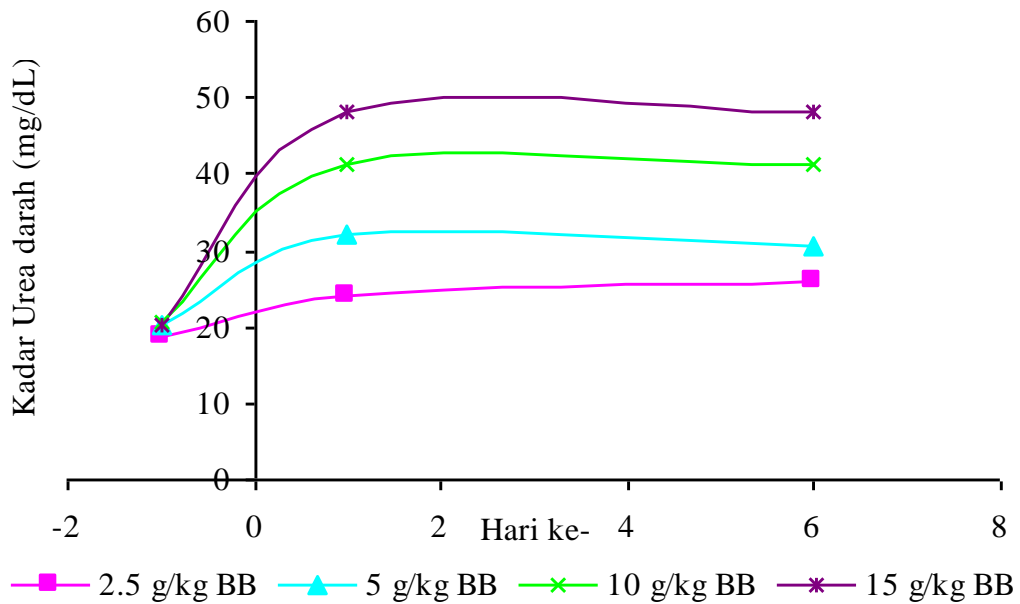
semua kelompok perlakuan meningkat secara signifikan ( $P>0.05$ ). Namun terhadap H+1, kadar urea darah pada H+6 semua kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan. Perbandingan kadar urea dalam darah pada H+1 dosis 5 g/kg BB dan 15 g/kg BB berbeda secara signifikan dengan 2.5 g/kg BB dan 10 g/kg BB. Pada H+6 antara dosis 2.5 g/kg BB dan 5 g/kg BB menunjukkan nilai yang berbeda secara signifikan dengan dosis 10 g/kg BB dan 15 g/kg BB ( $P>0.05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa dosis angkak berpengaruh pada kerusakan sel-sel ginjal.

Hal tersebut dikarenakan angkak mengandung berbagai senyawa aktif seperti lovastatin, monakolin, mevinolin, dan sitrinin yang kesemuanya merupakan xenobiotik (Danuri, 2008). Sitrinin bersifat nefrotoksik (Carvalho *et al.*, 2005). Hati sampai dengan kapasitas tertentu mampu mendetoksifikasi xenobiotik dan mengekskresikannya melalui empedu. Konsentrasi xenobiotik yang tinggi menyebabkan hati tidak mampu mendetoksifikasinya dan xenobiotik akan mengalami eksresi melalui urin via ginjal, sehingga dapat pula menyebabkan kerusakan pada ginjal.

Dalam diagnosa klinis, peningkatan kadar urea darah adalah diagnosa patognomonis terhadap kerusakan sel-sel ginjal. Hal itu didukung pada analisa histopatologis bahwa di dalam lumen tubulus terdapat akumulasi protein dan nekrosis sel tubuli. Namun disamping hal tersebut, kenaikan kadar urea darah menunjukkan jumlah protein di dalam tubuh tinggi serta tidak adanya faktor penghambat pembentukan urea dalam darah. Kenaikan nilai BUN disebabkan karena tidak adanya penghambatan kerja enzim ornitin karbamoil transferase, yang mengkatalisis reaksi kondensasi ornitin dengan karbamoil fosfat menghasilkan sitrulin dan fosfat anorganik yang selanjutnya menghasilkan ureum.



Gambar 3 Perbandingan aktivitas ASAT perlakuan pemberian angkak pada H-1, H+1, dan H+6.



Gambar 4 Perbandingan kadar urea darah perlakuan pemberian angkak pada H-1, H+1, dan H+6.

**Gambaran makro dan mikroskopis organ hati**

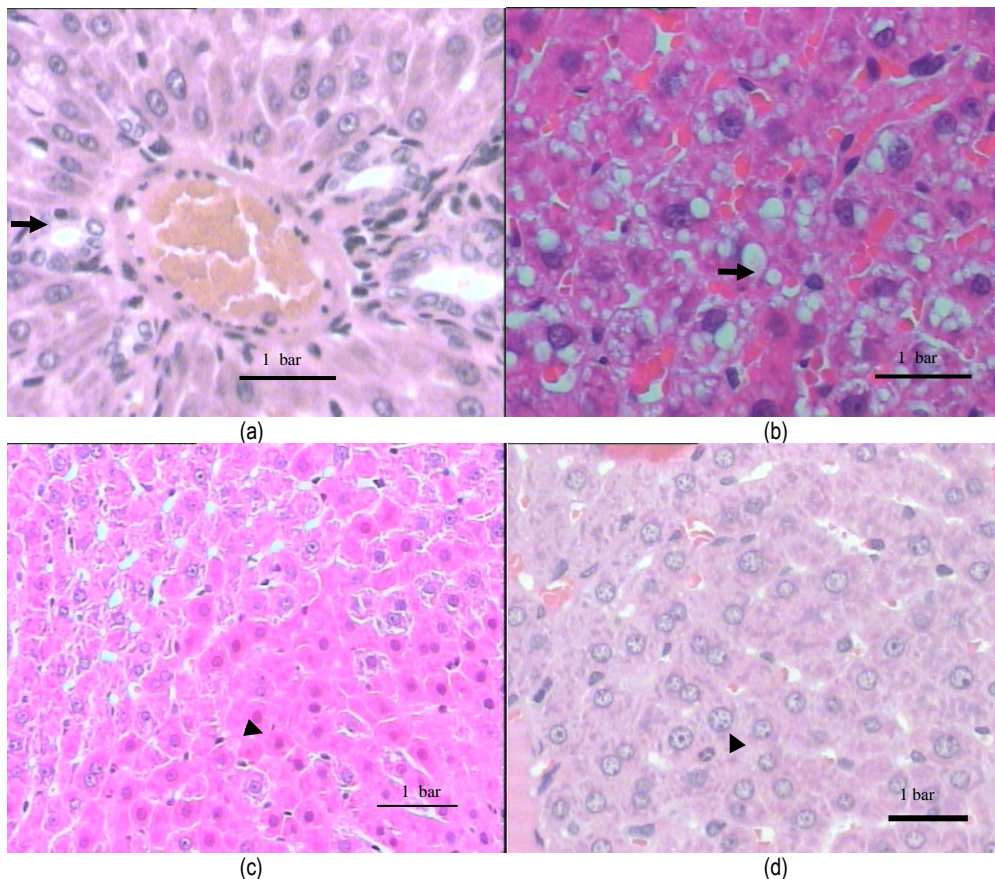
Pada pengamatan makroskopis terhadap organ hati hewan coba akibat pemberian angkak per oral tidak ditemukan kelainan yang spesifik pada semua kelompok (Gambar 5). Namun pemeriksaan secara mikroskopis terhadap preparat histopatologis hati ditemukan perubahan pada sel hepatosit pada semua kelompok perlakuan, yaitu kongesti. Sedangkan pada sel hepatosit banyak ditemukan degenerasi lemak dan nekrosis.

Gambar 5a juga menunjukkan adanya kongesti pada kelompok kontrol. Kongesti hati terjadi di vena sentralis dan sinusoid-sinusoid di sekelilingnya. Hal ini menyebabkan sinusoid mengalami dilatasi. Perubahan tersebut diperkirakan merupakan respon pembuluh darah terhadap anestesi eter sebelum nekropsis (Ganiswara, 1995). Oleh karena itu, kongesti tidak digunakan sebagai kategori kerusakan hati pada hewan coba yang diperlakukan dengan anestesi eter.

Gambar 5b dan 5c yang diambil dari kelompok dengan asupan angkak 15 g/kg bb menunjukkan adanya degenerasi lemak dan nekrosis. Degenerasi lemak merupakan gangguan metabolisme pada sel, sehingga kehilangan struktur dan fungsi normalnya. Degenerasi lemak terjadi pada sel yang hidup dan bersifat reversibel. Sel yang

mengalami degenerasi lemak ditandai dengan adanya pengumpulan produk metabolisme seperti molekul lemak, protein, dan glikogen dalam jumlah yang abnormal. Degenerasi lemak menunjukkan adanya gangguan biokimiawi sel yang disebabkan karena metabolisme abnormal dan zat kimia yang toksik. Degenerasi lemak secara mikroskopis terlihat butiran lemak pada lobulus hati terutama daerah perilobuler (Benirschke *et al.*, 1978; Lawrence & Bennet, 1992). Faktor-faktor penyebab degenerasi lemak adalah bahan toksik, kekurangan oksigen, atau kelebihan konsumsi lemak. Jadi degenerasi lemak akibat angkak mungkin terjadi karena angkak mengandung sitrinin yang dilaporkan bersifat nefrotoksik (Carvalho *et al.*, 2005).

Gambar 5d menunjukkan pada kelompok kontrol masih terlihat hepatosit yang masih baik yaitu masih berbentuk lobus yang jelas dengan vena sentralis di tengah. Sitoplasma berwarna merah muda karena mengikat zat warna Eosin dan inti sel berwarna ungu kebiruan karena mengikat zat warna Hematoksilin. Lesio yang terjadi pada organ hati kemudian dianalisis melalui skoring sehingga diberi nilai sesuai tingkat keparahan. Nilai skoring histopatologis hati (Tabel 1) menunjukkan hasil pengamatan adanya kongesti, nekrosis, dan degenerasi lemak pada organ hati.



Gambar 5 Gambaran mikroskopis hati tikus dengan pewarnaan HE yang mengalami kongesti pada (a) kelompok kontrol (1 bar = 30 µm), (b) dosis angkak 15 g/kg bb (1 bar = 30 µm), (c) 15g/kg bb (1 bar = 50 µm), dan (d) sel hati tikus normal pada kelompok kontrol (1 bar = 50 µm).



Setelah didapatkan nilai skoring histopatologis hati, kemudian nilai tersebut diuji dengan analisis Kruskal-Wallis (Tabel 2). Pada Tabel 2, lesio pada organ hati yaitu kongesti dan degenerasi lemak antara kontrol dan semua perlakuan tidak berbeda secara signifikan ( $P>0,05$ ), sedangkan nekrosis yang terjadi pada perlakuan 2,5 dan 5 g/kg bb angkak berbeda nyata dengan perlakuan 10 g/kg bb angkak ( $p<0,05$ ).

Tabel 1 Nilai skoring histopatologis hati

Perlakuan (g/ kg BB)	Pengamatan		
	Kongesti	Degenerasi Lemak	Nekrosa
Kontrol	0.333	0.400	0.333
2.5	0.267	1.267	0.533
5	0.433	1.267	0.533
10	0.233	1.233	1.000
15	0.333	1.033	0.900

Tabel 2 Hasil Uji Kruskal-Wallis histopatologis hati

Perlakuan (g/ kg BB)	Pengamatan		
	Kongesti	Degenerasi Lemak	Nekrosa
Kontrol	5.25 <sup>a</sup>	1.50 <sup>a</sup>	2.50 <sup>a</sup>
2.5	4.50 <sup>a</sup>	6.50 <sup>a</sup>	5.50 <sup>bc</sup>
5	8.25 <sup>a</sup>	7.25 <sup>a</sup>	4.50 <sup>ab</sup>
10	4.00 <sup>a</sup>	7.25 <sup>a</sup>	8.25 <sup>c</sup>
15	5.00 <sup>a</sup>	5.00 <sup>a</sup>	6.75 <sup>bc</sup>

Keterangan: nilai yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai yang berbeda nyata.

**Gambaran makro dan mikroskopis organ ginjal**

Pengamatan makroskopis terhadap organ ginjal, tidak ditemukan kelainan nyata pada semua kelompok hewan coba. Pengamatan mikroskopis preparat histopatologis organ ginjal hewan kontrol ditemukan perubahan, yaitu pada kapiler antar tubulus terjadi kongesti, sel tubulus mengalami nekrosis. Selain itu, lumen tubulus mengalami akumulasi protein. Pada kelompok yang diberi angkak dengan dosis 2,5; 5; 10; dan 15 g/kg bb ditemukan degenerasi protein dan nekrosis yang tingkat keparahannya sebanding atau linear terhadap dosis (Tabel 4). Dosis pada manusia adalah 16,7 mg/kg bb (Lin *et al.* 2005).

Gambar 6a (dosis asupan angkak 15 g/kg bb) menunjukkan adanya sel-sel nekrosis organ ginjal. Sel-sel tubulus mengalami nekrosis intinya terlihat suram dan mengalami karioreksis. Nekrosis pada sel-sel epitel tubulus terjadi pada semua perlakuan. Nekrosis dapat terjadi karena adanya senyawa hepatotoksik yang dikandung pada angkak, mungkin sitrinin (Saleh 1996; Carvalho *et al.*, 2005).

Gambar 6b (dosis asupan angkak 15 g/kg bb) menunjukkan adanya akumulasi protein di lumen tubulus. Keberadaan protein di dalam lumen tubulus dipengaruhi berbagai faktor diantaranya peningkatan permeabilitas kapiler glomerulus sehingga protein yang berukuran besar dapat lolos ke urin. Bila epitel tubulus mengalami degenerasi dan nekrosis maka protein yang lolos tidak mampu untuk diserap

kembali secara maksimal yang akhirnya tertimbun di dalam lumen (Carlton & Mc Gavin, 1995). Akumulasi protein pada tubuli ginjal kemungkinan besar karena dosis angkak yang sangat tinggi sehingga merusak sel-sel ginjal.

Nilai skoring histopatologis ginjal (Tabel 3), menunjukkan adanya kelainan pada ginjal yaitu nekrosis dan degenerasi protein. Setelah mendapatkan nilai lesio histopatologis organ ginjal kemudian nilai tersebut diuji dengan uji Kruskal-Wallis (Tabel 4) menunjukkan bahwa degenerasi protein dan nekrosis yang terjadi, berbeda nyata antara tiap kelompok perlakuan termasuk kontrol ( $P>0,05$ ). Nekrosis yang terjadi signifikan dengan naiknya dosis. Semakin tinggi dosis yang diberikan mengakibatkan nekrosis yang terjadi juga semakin besar.

Epitel ginjal merupakan bagian yang sensitif terhadap bahan-bahan yang bersifat toksik. Dalam hal ini angkak mengandung sitrinin yang bersifat nefrotoksik (Calvarho *et al.*, 2005). Senyawa toksik yang mungkin dikandung oleh angkak terutama sitrinin masuk ke ginjal melalui aliran darah dapat menimbulkan perubahan pada ginjal berupa degenerasi lemak dan nekrosis (Smith & Jones, 1974). Menurut Lu (1995), tubulus proksimal merupakan bagian yang paling mudah mengalami kerusakan akibat zat toksik. Hal itu dapat disebabkan karena pada tubulus proksimal terjadi proses absorpsi dan sekresi berbagai zat. Bila terjadi absorpsi bahan toksik pada epitel tubuli akan mengganggu metabolisme dan absorpsi. Selain itu, kadar sitokrom P-450 pada tubulus proksimal lebih tinggi untuk mendetoksifikasi atau mengaktifkan zat toksik. Jika degenerasi dan nekrosis belum begitu parah, regenerasi sel epitel mungkin terjadi setelah penyebabnya dihilangkan (Smith & Jones, 1974).

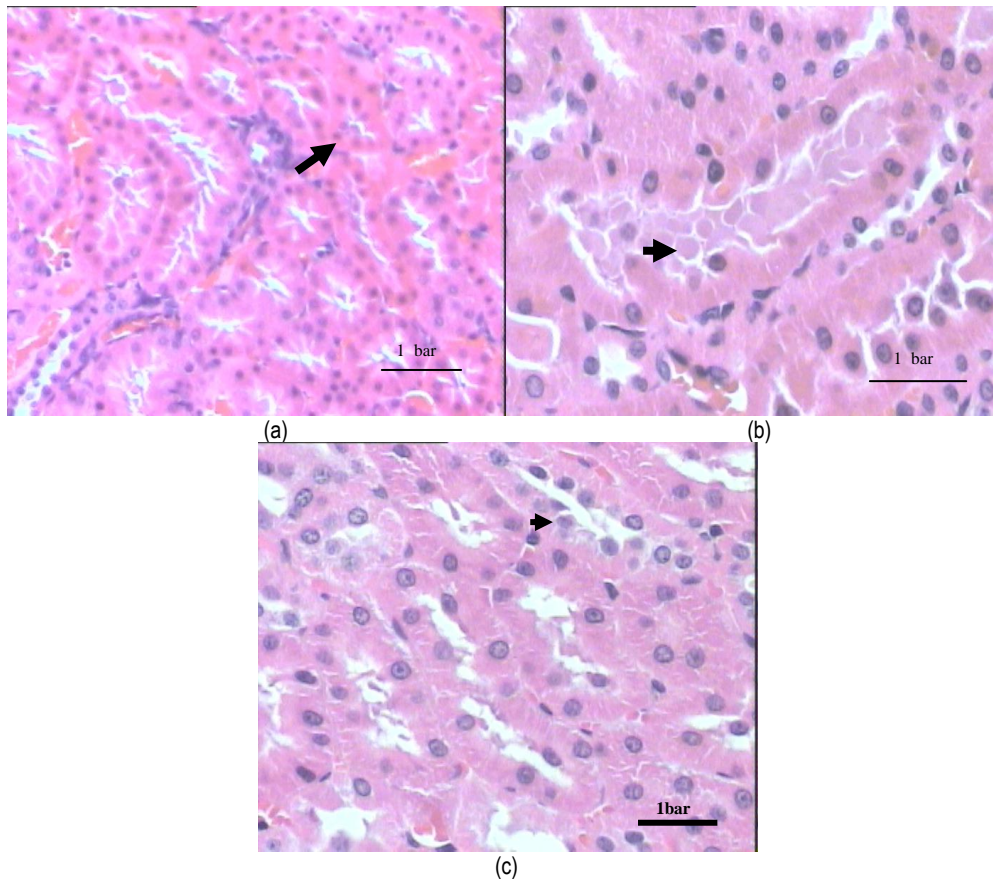
Tabel 3 Nilai skoring histopatologis ginjal

Perlakuan (g/ kg BB)	Pengamatan	
	Akumulasi Protein	Nekrosa
Kontrol	5.50	2.40
2.5	6.55	5.60
5	7.00	8.80
10	9.15	7.75
15	11.20	11.50

Tabel 4 Hasil uji Kruskal-Wallis histopatologis ginjal

Perlakuan (g/ kg BB)	Pengamatan	
	Akumulasi Protein	Nekrosa
Kontrol	1.5a	1.5a
2.5	3.5b	3.5b
5	7.5d	5.5c
10	5.5c	7.5d
15	9.5e	9.5e

Keterangan: nilai yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai yang berbeda nyata



Gambar 6 Gambaran mikroskopis ginjal tikus dengan pewarnaan HE yang mengalami (a) nekrosis pada sel tubulusnya dengan dosis 15 g/kg bb (1 bar = 50 μm), (b) akumulasi protein pada sel tubulusnya dengan dosis 15 g/kg bb (1 bar = 30 μm), dan (c) ginjal yang normal pada kelompok kontrol (1 bar = 50 μm).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian menunjukkan tidak ditemukan adanya kematian hewan coba pada semua kelompok selama perlakuan, sehingga angkak dikategorikan sebagai senyawa non toksik. Selama perlakuan, bobot badan tikus tidak mengalami kenaikan. Peningkatan aktivitas enzim ALAT, ASAT, dan kadar urea darah berbanding lurus dengan dosis. Perbedaan antar dosis tersebut menunjukkan bahwa dosis berpengaruh terhadap kerusakan organ hati dan ginjal.

Gambaran histopatologis akibat pemberian angkak pada organ hati dan ginjal menunjukkan terdapatnya lesio ringan yang tingkat keparahannya sebanding dengan dosis dan bersifat reversibel. Organ hati mengalami kongesti, degenerasi lemak dan nekrosis, sedangkan organ ginjal mengalami degenerasi protein dan nekrosis pada sel tubulusnya. Lesio tersebut tampak jelas mulai pada dosis 10 g/kg bb, sehingga dapat disimpulkan bahwa angkak aman digunakan sampai pada dosis 5 g/kg bb (300 kali dosis pada manusia).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada Ahmad Endang Zainal Hasan, Hernomoadi Huminto, dan Dimas Andrianto atas bantuan dan saran-sarannya serta terima kasih kepada Khirani Afrisha Pratiwi atas semua bantuannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albert AW. 1980. Mevinolin: a Highly Potent Competitive Inhibitor of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase and a Cholesterol-lowering Agent. *Proceedings National Academy of Sciences*. 77: 3957-3961.
- Altman PL, Dittmer DS. 1971. *Blood and Others Body Fluids*. Bethesda: Federation of American Societies for Experimental Biology.
- Benirschke KF, M Gardner, TC Johnes. 1978. *Pathology of Laboratory Animals*. New York: Academic Press.



- Bergmeyer HU, Gutmann I. 1986. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol 2. New York: Springer Verlag.
- Carels M, Shepherd. 1997. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus purpureus* with regard to quality and quantity. *J Food Sci* 45: 567-9.
- Carvalho JC, Oishi BO, Pandey A, Soccol CR. 2005. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production, and color stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48: 885-94.
- Danuri H. 2008. Optimizing Angkak Pigments and Lovastatin Production by *Monascus purpureus*. *Hayati J Biosci* 15: 61-66.
- Endo A. 1979. Monacolin K, a New Hypocholesterolemic Agent Produced by a *Monascus* Species. *Journal of Antibiotics*. 32: 852-854.
- Endo A, Hasumi K, Negishi S. 1985. Monacolin J and L, New Inhibitors of Cholesterol Biosynthesis Produced by *Monascus ruber*. *Journal of Antibiotics*. 38:420-422.
- Endo A, Komagata D, Shimada H. 1986. Monacolin M: A New Inhibitor of Cholesterol Biosynthesis. *Journal of antibiotics*. 39:1670-1673.
- Fabre CE, Santreer AL, Loret MO, Baberian R, Pareilleux A, Goma G, Blanc PJ. 1993. Production and Food Applications of The Red Pigments of *Monascus ruber*. *J Food Sci* 58(5): 1099-1102.
- Fink Gremmels J, Dresel J, Leistner L. 1991. Use of *Monascus* Extracts as an Alternative to Nitrite in Meat Products. *Fleischwirtsch*. 71: 1184-1186.
- Heber et al. 1999. Cholesterol Lowering Effects of Proprietary Chinese Red-Yeast Rice Dietary Supplement. *American Journal of Clinical Nutrition* 69(2): 231-236.
- Humason GL. 1972. *Animal Tissue Techniques*. Ed ke-3. San Francisco: WH Freeman.
- Juzlova P, Martinkova L, Kren V. 1996. Secondary Metabolites of the Fungus *Monascus*: a Review. *J Ind Microbiol* 16(3): 163-170.
- Kaplan LA, Pesce AJ. 2002. *Clinical Chemistry*. USA: Mosby.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and Histochemical Methods : Theory and Practice*. 2<sup>nd</sup> Ed. Department of Anatomy The University of Western Ontario: Pengamon.
- Lawrence DR, PN Bennet. 1992. *Clinical Pharmacology*. 7<sup>th</sup> Ed. London: Churchill Livingstone.
- Lin CC, Li TC, Lai MM. 2005. Efficacy and safety of *Monascus purpureus* Went rice with hyperlipidemia. *Eur J Endocrinol* 153: 679-86.
- Lu FC. 1995. *Toksikologi Dasar*; Asas, Organ, Sasaran, dan Penilaian Resiko. Edisi 2. Jakarta: UI.
- Malole MBM, CSR Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor: PAU-IPB.
- Maolinang Z, Zhenwen D, Shenmeng X. 2001. Study on Effective Composition of Xuezhikang. *Chinese New Drugs Journal*. <http://www.wpu.cn/english/C-3.htm>. (28 Sept 2001).
- Matjik AA, Sumertajaya M. 2000. *Rancangan Percobaan*. Bogor: IPB.
- Ressang AA. 1984. *Patologi Khusus Veteriner*. Edisi 2. Denpasar: Bali Press
- Saleh. 1996. *Patologi. Hewan: Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Kelainan Retrogresif dan Progresif*. (1): 5-7.
- Sastrosupadi A. 1977. *Experimental Design*. Malang: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Smith HA, TC Jones. 1974. *Veterinary Pathology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Steinkraus KH. 1983. *Handbook of Indigenous Fermented Food*. New York: Marcel Dekker.
- Suwanto A. 1985. Produksi Angkak sebagai Zat Pewarna Makanan. *Media Teknol dan Pangan* 1(2):8-14.
- Wong HC, PE Koehler. 1981. Mutant for *Monascus* Pigment Production. *J Food and Science* 46:956-957.