Potensi Ekstrak Air Angkak dalam Mencegah Peroksidasi Lipid dan Efeknya terhadap Organ Hati Tikus *Sprague Dawley*

Potential of Angkak Water Extract in Preventing Lipid Peroxidation and Its Effect on Sprague Dawley Mouse's Liver

Hasim^{a*}, Novena Nathasia^a, Agus Setiyono^b dan Didah Nur Faridah^{cd}

^aDepartemen Biokimia, FMIPA, IPB University
Jl. Tanjung, Gedung Biokimia, Kampus Darmaga Bogor, 16680

^bDepartemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680

^cDepartemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University
Gedung Fateta, Kampus IPB Darmaga PO BOX 220, Bogor 16002

^dSEAFast Center, IPB University
Jl. Ulin No. 1 Gedung SEAFast Center, Kampus IPB Darmaga Bogor

Riwayat Naskah:

Diterima 05 2019
Direvisi 06 2020
Disetujui 06 2020

ABSTRAK: Angkak (*red yeast rice*), bahan pangan fermentasi beras oleh kapang *Monascus purpureus* dan memiliki beberapa senyawa metabolit bersifat antioksidan. Penelitian ini bertujuan menganalisis potensi ekstrak air angkak dalam mencegah peroksidasi lipid di dalam serum dan organ hati tikus. *Sprague Dawley* yang diinduksi propiltiourasil dan diet tinggi lemak. Tikus sebanyak 25 ekor dibagi menjadi lima kelompok [normal, kontrol positif, kontrol negatif, induksi air angkak 50 mg/kg (kelompok A1), dan 100 mg/kg (kelompok A2)]. Parameter uji yang diamati adalah konsentrasi malonaldehid (MDA) serum darah dan hati, aktivitas enzim aminotransferase serum, dan gambaran mikroskopik hati. Tikus dengan induksi air angkak 100 mg/kg menunjukkan penghambatan peningkatan konsentrasi MDA pada serum dan hati serta aktivitas AST signifikan terhadap kelompok kontrol negatif. Histopatologi hati kelompok yang induksi ekstrak air angkak menunjukkan adanya perbaikan jaringan yang secara kualitatif ditandai dengan sel hepatosit utuh yang diwarnai oleh pewarna Hematoksin-eosin, susunan sel rapat dan berjajar secara radial. Induksi 100 mg/kg masih menunjukkan perbesaran vakuola atau butiran lipid yang berwarna putih yang menjadi penanda degenerasi lemak.

Kata kunci: angkak, aminotransferase, antioksidan, histopatologi hati, malondialdehid

ABSTRACT: Angkak (*red yeast rice*) is a fermented rice by mold *Monascus purpureus*, with its bioactive compounds as antioxidant activity. This study aims to investigate the effects of water extract of angkak on prevention of lipid peroxidation in serum and liver of Sprague Dawley rats induced by propylthiouracil and high-fat diet on malondialdehyde (MDA), aminotransferase, and microscopic of the rat's liver. A total of 25 rat were divided into five groups (normal, positive control, negative control, treatments with water extract of angkak at dose of 50 mg/kg (A1 group) and 100 mg/kg (A2 group). Rats with water induction of Angkak 100 mg/kg showed inhibition of increased MDA concentrations in serum and liver and significant AST activity rather than negative control group. Histopathology of liver of the extract induction group showed a tissue improvement that was qualitatively characterized by intact hepatocyte cells stained by hematoxylin-eosin dyes, dense cell arrays and radially lined. Induction of 100 mg/kg still shows an enlargement of vacuoles or white lipid granules that are markers of fat degeneration.

Keywords: angkak, aminotransferase, antioxidants, liver histopathology, malondialdehyde

* Kontributor utama
Email : hasim@apps.ipb.ac.id

1. Pendahuluan

Penyakit kardiovaskular (*cardiovascular disease/CVD*) merupakan penyakit akibat kelainan yang terjadi pada jantung dan pembuluh darah. Sebanyak 17.7 juta orang atau 31% dari total kematian di dunia meninggal akibat penyakit kardiovaskular dan pada tahun 2030 akan meningkat menjadi 23.6 juta kematian (WHO, 2017). Hiperlipidemia merupakan faktor risiko terbesar penyebab terjadinya penyakit kardiovaskular.

Kondisi hiperlipidemia, khususnya hiperkolesterolemia dapat memicu produksi radikal bebas yang disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat terjadinya oksidasi lipid, ditandai dengan meningkatnya konsentrasi malondialdehid (MDA), salah satu produk peroksidasi lipid. Peningkatan ROS dalam tubuh juga dapat memicu terjadinya inflamasi, terutama di dalam organ hati (Setiawan et al., 2016). Peroksidasi lipid dapat dihentikan oleh adanya donor atom hidrogen ke radikal lipid sehingga membentuk senyawa non-radikal. Senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogennya tanpa menjadi senyawa radikal disebut dengan antioksidan (Ayala et al., 2014).

Angkak (*red yeast rice*) merupakan pangan fermentasi beras oleh kapang *Monascus purpureus* berfungsi sebagai penguat cita rasa dan pewarna alami bahan pangan. Angkak mengandung senyawa bioaktif monakolin K (*lovastatin*) yang menghambat kerja enzim HMG-KoA reduktase. Angkak dilaporkan mampu menurunkan kadar kolesterol total, LDL (*low-density lipoprotein*) dan trigliserida (Li et al., 2014), mengandung senyawa metabolit sekunder asam γ -aminobutirat (GABA), asam dimerumat dan monasin, yang berpotensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Yamashiro et al., 2008). Kasim et al., (2012) melaporkan kandungan lovastatin angkak memiliki aktivitas antioksidan dengan meningkatkan aktivitas glutathione peroksidase (GPx). Hasanah (2016) dalam penelitiannya melaporkan fraksi air dari ekstrak etanol angkak memiliki aktivitas inhibisi tertinggi terhadap HMG-KoA reduktase secara *in vitro*, yaitu sebesar 37.37%.

Pengembangan ekstrak air angkak sebagai pengobatan alternatif pada pasien hiperkolesterolemia harus memenuhi syarat uji hepatotoksitas (Nelson & Cox, 2013). Oleh karena itu, studi analisis efek ekstrak air angkak terhadap organ hati perlu dilakukan. Parameter yang dapat digunakan sebagai indikator kerusakan hati adalah aktivitas kedua enzim aminotrasferase, yaitu alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST). Kedua enzim tersebut akan dikeluarkan dari hepatosit ke dalam darah ketika hati mengalami kerusakan, sehingga kadarnya dalam serum darah akan meningkat

(Kendran et al., 2017). Pengamatan mikroskopik hati juga dapat digunakan sebagai parameter dengan mengamati perubahan susunan, struktur dan ukuran yang terjadi pada tingkat jaringan dibandingkan kontrol normal.

Penelitian ini bertujuan untuk (1) mempelajari potensi ekstrak air angkak dalam mencegah peroksidasi lipid dengan parameter MDA pada serum dan hati; (2) menganalisis efek ekstrak air angkak terhadap organ hati tikus yang diinduksi dengan propiltiourasil (PTU) dan *high fat diet* (HFD) dengan mengukur aktivitas enzim aminotransferase serum dan pengamatan histopatologi hati.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah : 25 ekor tikus jantan galur *Sprague Dawley* berusia 4 bulan dengan bobot rata-rata 260-300 gram, angkak komersial Pazola, pakan BRAVO 512, minyak sayur, lemak kambing dan kuning telur, sekam, propil tiourasil (PTU), simvastatin, akuades, standar 1,1,3,3-tetrametoksipropana (TMP), n-butanol (Merck®), piridin, asam asetat glasial, asam tiobarbiturat (TBA) (Merck®), H₂SO₄ pekat, asam fosfotungstat, KCl, SDS, NaOH 1 M, KIT pereaksi ALT dan AST ReiGed (REF ALT: GPT-11100; AST: GOT-11100), ketamin, xilazin, buffer netral formalin 10%, pewarna rutin ematoksilin dan Eosin, etanol 70%, 80%, 90%, absolut, xilol, parafin cair dan NaCl 0.9%.

2.2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas, ayakan 40 mesh, neraca analitik (OHAUS GA200, USA), oven, kertas saring, aluminium foil, plastic wrap, *rotary evaporator* (Buchi, Belanda), *shaker*, chamber tertutup, tabung Eppendorf, (Eppendorf, Jerman) tabung sentrifus, penangas air (Mettler, Jerman), spektrofotometer Thermo Electron Corporation model Genesys 10 UV, kuvet kaca 1 mL dan 3 mL, sentrifus Beckman Model J2-21, microcentrifuge (Damon/IEC Divission), vortex (Genie G5-60E), sonikator (Selecta Ultrasons-H, Spanyol), sonde oral, kandang tikus, timbangan tikus, pipet mikro (Eppendorf, Jerman), alat Auto Check kolesterol, *tissue cassette*, *Automatic Tissue Processor* (Thermo Scientific Excelsior, USA), *frozen tissue embedding machine* (Thermofisher histostar, USA), cover glass dan mikroskop (Olympus, Jepang).

2.3. Metode

2.3.1. Penyesuaian hewan percobaan

Hewan uji yang digunakan adalah 25 ekor tikus jantan galur *Sprague Dawley* berumur 4 bulan dengan bobot rata-rata 260-300 gram. Perlakuan terhadap tikus diawali tahapan adaptasi selama 10 hari. Selama masa adaptasi, tikus diberi pakan standar BRAVO 512 sebanyak 20 gram/ekor/hari dan air minum secara ad libitum.

Tahapan perlakuan tikus dilanjutkan dengan tahapan induksi seperti Tabel 1. Selama masa induksi tikus diberi pakan hiperkolesterol kecuali kelompok kontrol normal. Pakan hiperkolesterol terdiri atas campuran 6% minyak sayur, 10% lemak kambing dan 1.5% kuning telur serta pakan standar sampai 100%. Campuran pakan ini dibentuk menjadi pelet. Selain itu tikus diinduksi dengan PTU secara oral dengan dosis 1 mg/kg BB/hari kecuali kelompok tikus normal. Masa induksi dilakukan selama 14 hari.

Bobot tikus ditimbang setiap tiga hari selama masa perlakuan. Selanjutnya, tikus dipuasakan selama 12 jam kemudian dinekropsi untuk pengambilan sampel darah dan organ hati. Setelah itu, tikus dihilangkan kesadarannya dengan menggunakan kombinasi ketamin:xilazin (6:5) kemudian dibedah. Hati tikus dimasukkan dalam gelas kimia berisi NaCl 0.9%. Organ hati yang digunakan untuk analisis MDA disimpan dalam larutan NaCl fisiologis dan dibekukan pada -20°C, sedangkan hati yang digunakan untuk analisis histopatologi disimpan dalam larutan *Buffer Neutral Formaline* (BNF) 10% pada temperatur ruang.

2.3.2. Preparasi air angkak

Angkak dipanaskan di dalam oven suhu 50 °C selama 6 jam. Setelah kering, angkak dihaluskan lalu diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh. Selanjutnya angkak dan pelarut akuades (1:10) dipanaskan selama 30 menit pada suhu 90 °C. Larutan dibiarkan hingga mencapai suhu ruang kemudian disaring dengan penyaring vakum. Filtrat yang didapatkan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60 °C. Dosis yang digunakan 50 mg/kg BB untuk kelompok A1 dan 100 mg/kg BB untuk kelompok A2.

2.3.3. Rancangan percobaan (modifikasi Yunita, 2014)

Tikus dibagi ke dalam 5 kelompok yaitu kelompok normal (NO), kontrol negatif (NE), kontrol positif (PO), A1 dan A2 dengan perlakuan berbeda-beda yang tertera pada Tabel 1.

2.3.4. Pemisahan serum darah (Washington & Hoosier, 2012)

Darah dikumpulkan dalam tabung pada suhu ruang selama 30-45 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3733 g selama 15 menit untuk memperoleh serum. Serum yang telah terpisah disimpan dalam tabung Eppendorf dan disimpan pada -20 °C hingga dianalisis. Serum dapat bertahan pada suhu -20 °C selama maksimal 90 hari.

Tabel 1.
Rancangan percobaan perlakuan tikus percobaan (n=5)

Kelompok Tikus	Perlakuan
Normal (NO)	Tidak diberi perlakuan
Kontrol negatif (NE)	Diberi pakan hiperkolesterol atau <i>High Fat Diet</i> (HFD)
Kontrol positif (PO)	Diberikan pakan hiperkolesterol dan diterapi dengan obat komersil simvastatin dengan dosis 0.8806 mg/kg BB/hari (Nair & Jacob, 2016). Masa perlakuan dilakukan selama 24 hari
A1	Diberi pakan hiperkolesterol ekstrak dan diterapi dengan ekstrak air angkak sebanyak 1 mL/hari secara oral dengan dosis 50 mg/kg BB (Yeap et al., (2014). Masa perlakuan dilakukan selama 24 hari
A2	Diberi pakan hiperkolesterol ekstrak dan diterapi dengan ekstrak air angkak sebanyak 1 mL/hari secara oral dengan dosis 100 mg/kg BB. Masa perlakuan dilakukan selama 24 hari

2.3.5. Pengukuran aktivitas enzim AST dan ALT serum darah

Pengukuran aktivitas enzim AST dan ALT serum darah menggunakan Kit ReiGed. Reagen 1 dan reagen 2 dicampurkan dengan perbandingan 4:1. Sebanyak 100 µL serum darah tikus dicampur dengan 1000 µL reagen. Kemudian campuran dihomogenisasi menggunakan vorteks lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 menit. Setelah itu, sampel diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 340 nm. Nilai absorbansi dicatat setiap menit selama 3 menit, sehingga diperoleh 3 nilai absorbansi. Aktivitas enzim dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas ALT } \left(\frac{U}{L} \right) = \frac{\text{rata-rata } \Delta A}{\text{menit}} \times 1768 \quad (1)$$

$$\text{Aktivitas AST } \left(\frac{U}{L} \right) = \frac{\text{rata-rata } \Delta A}{\text{menit}} \times 1746 \quad (2)$$

Keterangan :

U / L = Unit / Liter

ΔA= Perubahan Absorbansi

2.3.6. Pengukuran konsentrasi MDA

2.3.6.1. Analisis kadar MDA serum darah (Yagi, 1987)

Sebanyak 0.2 mL serum darah ditambah dengan 1.2 mL H_2SO_4 0.083 N kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya, ditambahkan 0.15 mL asam fosfotungstat 10% dan didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit. Hasil pencampuran tersebut disentrifugasi pada 3733 g selama 20 menit dan pelet diambil. Penambahan H_2SO_4 0.082N dan asam fosfotungstat 10% serta perlakuan sentrifugasi dilakukan dua kali. Pelet dilarutkan dalam 0.5 mL akuades dengan bantuan vortex kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya, pelet ditambahkan 0.5 mL TBA 1% dalam asam asetat 50%. Larutan dipanaskan pada suhu 95 °C selama 60 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Larutan ditambahkan 2.5 mL (n-butanol:piridin) dan disentrifugasi pada 3733 g selama 15 menit. Fase berwarna merah muda pada bagian atas diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda=532$ nm.

2.3.6.2. Analisis kadar MDA hati (Anandh et al., 2012)

Sebanyak 1 g hati dihomogenisasi dengan homogenizer dalam suasana dingin dalam 10% b/v KCL dingin 1.15%. Campuran yang diperoleh disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3733 g dan diambil bagian supernatannya. Sebanyak 0.2 mL homogenat hati diambil dan diletakkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ke dalam tabung reaksi ditambahkan 0.2 mL SDS 8.1% dan 1.5 mL asam asetat 20%. Selanjutnya pH diatur menjadi pH 3.5 dengan menggunakan NaOH 1 M. Pada tabung reaksi ditambahkan 0.7 mL akuades dan 1,5 mL TBA 1.0% dalam pelarut asam asetat 50%. Tabung berisi campuran tersebut kemudian dipanaskan pada suhu 95 °C selama 60 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Setelah itu ke dalam tabung reaksi ditambahkan akuades 1.0 mL dan 5 mL n-butanol:piridin (15:1 v/v), kemudian dihomogenkan. Selanjutnya campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4977 g. Lapisan berwarna merah adalah lapisan organik yang diambil untuk diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda=532$ nm.

2.3.7. Analisis histopatologi hati (modifikasi Makiyah & Khumaisah, 2018)

Organ hati yang diambil direndam pada larutan BNF 10% dengan pH berkisar 6.5–7.5. Perbandingan organ dan larutan adalah 1:10 dan disimpan hingga jaringan fiksatif, sampel

didehidrasi, ditanam dalam parafin. Preparat organ dibuat setebal 0.3-0.5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, lalu dimasukkan kedalam keranjang khusus. Keranjang kemudian dimasukkan ke dalam prosesor otomatis untuk proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu: etanol 70% (2 jam), etanol 80% (2 jam), etanol 90% (2 jam), etanol absolut (2 jam), etanol absolut (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam). Selanjutnya, keranjang dikeluarkan untuk proses penghilangan udara dari jaringan (vakum). Proses vakum dengan suhu 60 °C selama 30 menit. Dilanjutkan pencetakan dan pemotongan blok parafin. Blok parafin yang berisi jaringan dipotong dengan ketebalan 3–4 μ m. Pewarnaan menggunakan hematoxin eosin. Preparat diamati dengan mikroskop cahaya berkamera. Masing-masing preparat diamati pola susunan dan bentuk selnya dengan menggunakan perbesaran 100x dan 400x.

2.3.8. Analisis data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Analisis statistik terhadap kadar MDA serum, hati, aktivitas enzim ALT dan AST dilakukan menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf nyata 0.05 dan diuji lanjut menggunakan Duncan $\alpha=0.05$. Analisis data dilakukan menggunakan program perangkat lunak IBM SPSS Statistics 21. Penilaian histopatologi hati dilakukan secara kualitatif.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Konsentrasi malonaldehid serum dan hati hewan uji

Lipid merupakan salah satu molekul yang sensitif terhadap serangan radikal bebas. Lipid yang teroksidasi bersifat labil dan sangat reaktif sehingga cenderung bereaksi dengan zat di sekitarnya. Reaksi ini akan menyebabkan kerusakan pada komponen dan fungsi seluler dan dapat menginisiasi timbulnya gangguan dan penyakit (Ayala et al., 2014). Peroksida lipid pada tikus diukur berdasarkan konsentrasi MDA karena MDA merupakan salah satu produk sekunder peroksidasi lipid yang dapat terbentuk melalui reaksi enzimatis atau non enzimatis.

Rata-rata MDA serum dan hati tikus dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil analisis menunjukkan bahwa induksi PTU dan HFD mampu meningkatkan konsentrasi MDA pada serum dan hati tikus dapat diamati pada kelompok kontrol negatif. Pemberian pakan hiperkolesterol akan menyebabkan terjadinya hiperkolesterolemia yang dapat meningkatkan produksi ROS melalui modifikasi reaksi seluler sebagai akibat terjadinya kelainan atau ketidakseimbangan komposisi lipid dalam sel.

Hiperkolesterolemia dapat meningkatkan konsentrasi kolesterol bebas pada sel endotelial pembuluh darah sebesar 2 sampai 4 kali lipat (Qin et al., 2006). Ketika jumlah kolesterol di dalam tubuh yang berasal dari diet maupun hasil sintesis sel melebihi jumlah kolesterol yang dibutuhkan oleh sel untuk sintesis membran, asam empedu dan steroid, kolesterol akan terakumulasi dalam bentuk LDL di dalam plasma darah. (Nelson & Cox, 2013). Keberadaan LDL dapat meningkatkan kolesterol tidak teresterifikasi atau kolesterol bebas sebanyak 50-100% total sel (Ellsworth et al., 1986). Kolesterol bebas lebih disukai oleh endotelial sel pembuluh darah sehingga terjadi akumulasi atau penebalan oleh kolesterol dan lipid lainnya di dinding pembuluh darah yang disebut dengan lesi (*lipid raft*). Amiya (2016) melaporkan bahwa penebalan atau lesi ini dapat meningkatkan produksi ROS dan dipengaruhi oleh komposisi lipid pada lesi.

Gambar 1. Konsentrasi lipid peroksida serum darah tikus. a= sampel serum darah, b= sampel hati.

Keterangan: ^{ab} Tanda berbeda menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan pada $\alpha = 0.05$ (Duncan).
 NO: normal; PO: positif; NE: negatif; A1: ekstrak air angkak dosis 50 mg/kg BB; A2: ekstrak air angkak dosis 100 mg/kg BB

Pemberian pakan PTU mempengaruhi terbentuknya MDA karena PTU merupakan senyawa antitiroid yang dapat menghambat produksi hormon tiroid. Hormon ini diproduksi oleh kelenjar tiroid yang berperan sebagai sentral dalam mengatur metabolisme sel bersamaan dengan diproduksi hormone tiroksin. Jika ada sedikit perubahan pada hormon maka akan menyebabkan kelainan fisiologis seperti hipotiroid (Murgod & Soans, 2013). Hipotiroid dapat menyebabkan gangguan pada metabolisme lipid dan karbohidrat serta disfungsi pada rantai respiratori di mitokondria. Keadaan ini dapat mengakibatkan katabolisme dan transportasi kolesterol dalam tubuh menurun sehingga mampu memicu peningkatan peroksidasi lipid (Kumar & Kar, 2013).

Pada serum darah dapat diketahui bahwa pada kelompok hewan uji PO terjadi penurunan kadar MDA secara signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif karena pengaruh pemberian obat simvastatin. Simvastatin merupakan salah satu jenis statin yang banyak digunakan pada pasien hiperlipidemia. Statin merupakan senyawa inhibitor kompetitif HMG-KoA reduktase, yaitu enzim kunci pada biosintesis kolesterol, khususnya pada tahap pembentukan mevalonate (Armitage, 2007). Statin dilaporkan dapat berperan sebagai antioksidan dan mampu menurunkan konsentrasi MDA serum pada tikus wistar normal sebanyak 24% selama 21 hari perlakuan dengan dosis 10 mg/kg BB (Macan et al., 2015). Lovric et al., (2008) juga menyatakan bahwa pemberian simvastatin 10 mg/kg BB pada tikus Wistar hiperkolesterol dapat menurunkan konsentrasi MDA serum sebesar 31,33%.

Konsentrasi MDA serum pada kelompok A1 dan A2 secara berturut-turut sebesar 53,74% dan 70,56, signifikan lebih rendah dibandingkan dengan NE. Data ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air angkak, baik dosis 50 mg/kg BB maupun dosis 100 mg/kg BB, dapat berperan sebagai antioksidan yang dapat menurunkan konsentrasi lipid peroksida serum darah.

Rata-rata konsentrasi MDA hati tikus kelompok NO diperoleh sebesar 37,294 nmol/gram (Gambar 2). Sementara pada kelompok negatif (NE) atau hiperkolesterol diperoleh konsentrasi MDA hati sebesar 55,238 nmol/gram. Angka ini berbeda nyata ($p < 0.05$) terhadap kelompok normal yang menunjukkan bahwa perlakuan hiperkolesterolemia pada hewan coba dapat meningkatkan konsentrasi malondialdehid pada hati tikus. Kelompok kontrol positif (PO) tidak memiliki konsentrasi malondialdehid yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif, namun berbeda nyata dengan NO. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini pemberian simvastatin

pada tikus tidak dapat menurunkan konsentrasi malondialdehid hati secara signifikan ($p>0.05$).

Berdasarkan hasil pengujian, diketahui bahwa kelompok perlakuan ekstrak air angkak baik dengan dosis 50 dan 100 mg/kg menurunkan nilai MDA serum dan hati dibandingkan kelompok kontrol negatif. Penurunan konsentrasi MDA serum baik dosis 50 dan 100 mg/kg signifikan dan tidak berbeda nyata dengan kontrol positif. Sementara, penurunan signifikan konsentrasi MDA hati kelompok dosis pemberian ekstrak 100 mg/kg BB terhadap kelompok kontrol negatif dan dapat menurunkan konsentrasi MDA hingga 31,69% sehingga mendekati konsentrasi MDA hati kelompok normal. Sedangkan konsentrasi MDA hati pada kelompok perlakuan dosis 50 mg/kg BB (A1) mengalami penurunan dibandingkan kelompok kontrol negatif namun tidak menunjukkan nilai yang berbeda nyata.

Adanya penurunan konsentrasi MDA ini sesuai dengan yang telah dilakukan oleh Yeap et al., (2014) bahwa pemberian ekstrak dengan dosis 60 mg/kg BB pada tikus hiperkolesterolemia selama 2 minggu dapat menurunkan MDA hati sebesar 33,94%. Hasil yang serupa juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rajasekaran dan Kalaivani (2011), yaitu terjadi penurunan konsentrasi MDA serum hingga 40,48%.

Aktivitas antioksidan ekstrak air angkak diduga merupakan efek dari sinergitas komponen-komponen yang terkandung di dalamnya. Feng et al., (2012) melaporkan bahwa angkak mengandung 13 jenis statin (6 mg), asam lemak tidak jenuh (24 mg), 20 asam amino (25,7 mg), flavonoid (0,14 mg), ergosterin, alkaloid dan *trace element*. Salah satu jenis statin yang banyak ditemukan di dalam angkak, yaitu monakolin K, terbukti memiliki kemampuan hipolipidemik. Monakolin K (lovastatin, mevinolin dan mevacor) merupakan metabolit sekunder dari strain *Monascus* yang dapat menghambat enzim yang berperan dalam biosintesis kolesterol seperti hidroksimetilglutaril coenzyme A reductase (HMG-CoA). Penelitian yang dilakukan oleh Heinz et al., (2016) menyatakan bahwa sebanyak 3 mg monacolin dari angkak dapat menurunkan konsentrasi LDL yang sangat signifikan hingga 15 %. Senyawa aktif lainnya yang banyak terkandung di dalam angkak adalah asam γ -aminobutirat (GABA) dan asam dimerumat. GABA dikenal memiliki kemampuan hipotensif, efek diuretik dan penghambat neurotransmitter pada sistem saraf simpatik, sedangkan asam dimerumat merupakan senyawa antioksidan yang banyak terdapat pada produk fermentasi oleh kapang *Monascus* sp. (Yamashiro et al., 2008). Senyawa fenolik dan asam amino yang terdapat dalam angkak juga mampu menurunkan profil lipid sehingga dapat menurunkan tingkat peroksidasi lipid (Yeap et al., 2014).

3.2. Aktivitas enzim aminotransferase serum darah hewan uji (ALT dan AST)

Salah satu parameter yang digunakan dalam menganalisis kerusakan hati adalah dengan mengamati perubahan pada enzim indikator yang sensitif terhadap perubahan atau gangguan fungsi hati. Salah satu indikator tersebut adalah enzim aminotransferase. Terdapat dua macam enzim aminotransferase, yaitu aspartat aminotransferase (AST) atau serum glutamat oksaloasetat transaminase (SGOT) dan alanin aminotransferase (ALT) atau serum glutamat piruvat transaminase (SGPT). Hasil analisis ALT dan AST dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2. Aktivitas enzim (a) alanin aminotransferase (ALT) dan (b) aspartat aminotransferase (AST).

Keterangan: ^{ab} Tanda berbeda menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan pada $\alpha = 0.05$ (Duncan). NO: normal; PO: positif; NE: negatif; A1: ekstrak air angkak dosis 50 mg/kg BB; A2: ekstrak air angkak dosis 100 mg/kg BB

Pemberian PTU dan HFD pada tikus kelompok kontrol negatif tidak menyebabkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok normal. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Yunita (2014) pada penelitiannya dengan menggunakan 3% kolesterol

pada pakan dan 0,5 mg/kg BB PTU selama 4 minggu tidak menunjukkan aktivitas enzim aminotransferase yang signifikan. Namun, Welch-White et al., (2013) melaporkan dalam penelitiannya pemberian pakan tinggi kolesterol dan PTU 0,05% (b/v) selama 6 minggu pada tikus jantan *Sprague Dawley* dapat meningkatkan aktivitas enzim aminotransferase secara signifikan ($p < 0,05$). Penambahan PTU dan HFD dapat mengganggu homeostasis metabolisme lipid di hati sehingga memungkinkan terjadinya gangguan atau fungsi hati. Ajdari et al., (2014) menggunakan induksi kolesterol yang lebih besar dari penelitian ini, yaitu 2% kolesterol dalam pakan dan terjadi peningkatan aktivitas enzim aminotransferase hingga 70%. Hal ini menunjukkan peningkatan dosis kolesterol dan PTU yang digunakan dapat meningkatkan kerusakan fungsi hati yang diindikasikan dengan tingginya aktivitas enzim aminotransferase.

Aktivitas enzim ALT dan AST masih termasuk normal menurut Suckow et al., (2006) yang menyatakan aktivitas enzim ALT dan AST normal tikus *Sprague Dawley* jantan adalah 24-53 U/L dan 77-157 U/L. Adanya penurunan aktivitas enzim AST secara signifikan dan penurunan aktivitas enzim ALT meskipun tidak signifikan terhadap kelompok kontrol negatif mengindikasikan kemampuan hepatoproteksi atau menghambat hepatolisis kerusakan jaringan terutama hati oleh ekstrak air angkak. Peningkatan enzim ALT secara signifikan kemungkinan terjadi karena adanya indikasi kerusakan hati akibat pemberian pakan HFD dan PTU yang tidak dapat dicegah dengan baik oleh pemberian ekstrak air angkak 50 mg/kg. Sementara pada induksi ekstrak air angkak 100 mg/kg adanya indikasi hepatoproteksi yang lebih baik dapat diamati dengan menurunnya enzim ALT dibandingkan kelompok kontrol negatif. Kendati demikian, aktivitas ALT kelompok A1 induksi 50 mg/kg masih dalam rentang normal, sehingga dosis ekstrak angkak yang diberikan masih terbilang aman. Lin et al., (2005) menyatakan peningkatan aktivitas enzim aminotransferase yang tidak lebih dari tiga kali lipat aktivitas enzim normal tidak menunjukkan perubahan klinis yang berarti. Kenaikan aktivitas enzim hati dalam darah dapat diakibatkan oleh kerusakan parenkim hati atau gangguan permeabilitas membran sel hati sehingga enzim bebas ke luar sel (Hasim, 2009).

Efek hepatoproteksi ekstrak air angkak ini diduga diakibatkan oleh aktivitas antioksidan ekstrak. Rajasekaran & Kalaivani (2011) melaporkan bahwa ekstrak air angkak memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi secara *in vitro*. Secara *in vivo*, melalui pemberian ekstrak air angkak pada tikus hiperkolesterol meningkatkan konsentrasi antioksidan endogen, yaitu superoksida dismutase (SOD), glutathion (GSH) dan

katalase. Srianta et al., (2017) menyatakan bahwa angkak yang diproduksi dari beras memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan jagung dan sorgum dengan kisaran aktivitas DPPH sebesar 588-2.950 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$. Aktivitas antioksidan pada angkak memiliki korelasi positif dengan pigmen yang diproduksi oleh angkak, diduga pigmen yang berperan adalah monopilol B dan rubropunctamin. Enzim AST terukur lebih tinggi dibandingkan ALT karena enzim AST berada dalam konsentrasi yang lebih tinggi di jaringan selain hati. Oleh karena itu, enzim ALT merupakan parameter yang sensitif dan berkorelasi tinggi dengan kerusakan hati dibanding dengan AST (Kim et al., 2008). Tikus pada kelompok normal memiliki rata-rata enzim ALT dan AST sebesar 24,531 U/L dan 106,932 U/L.

Kedua enzim tersebut berperan penting dalam menghubungkan metabolisme karbohidrat dan protein dengan memindahkan gugus amino dalam reaksi transaminasi. Aspartat aminotransferase (EC 2.6.1.1) merupakan enzim yang vital dalam glikolisis aerobik dengan membawa kembali NADH yang telah dibentuk di sitoplasma kembali ke mitokondria melalui pertukaran malat. Enzim ini memindahkan gugus amino dari L-aspartat ke α -ketoglutarat membentuk oksaloasetat dan piruvat. Terdapat dua isoenzim AST pada sel hepatosit, yaitu yang terdapat di sitoplasma (cAST) dan mitokondria (mAST), dengan sebanyak 80% dari total AST hepatis merupakan mAST. Alanin aminotransferase (EC 2.6.1.2) terlibat dalam siklus alanin-glukosa dengan memindahkan gugus amino dari alanin ke α -ketoglutarat membentuk glutamat dan piruvat. ALT dapat meregenerasi glukosa yang digunakan oleh otot dengan cara yang sama seperti pembentukan glukosa dari laktat pada siklus Cori yang terjadi secara anaerobik. ALT diproduksi di sitosol sel hepatosit dan terdapat di beberapa jaringan lainnya dengan konsentrasi yang sangat rendah (Botros & Sikaris, 2013).

Pengukuran ini didasarkan pada laju oksidasi NADH menjadi NAD^+ yang dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 340 nm (Huang et al., 2006). Reaksi pengukuran kedua enzim terdiri atas 2 reaksi. Enzim ALT pada serum mengkatalisis transfer gugus amina dari L-alanin pada gugus keto α -ketoglutarat dan membentuk glutamat dan piruvat. Selanjutnya, laktat dehidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) pada kit akan mengkatalisis reaksi reduksi piruvat menjadi laktat dengan bantuan koenzim NADH yang akan teroksidasi menjadi NAD^+ . Sementara itu, enzim AST pada serum mengkatalisis transfer gugus amina dari L-aspartat pada gugus keto α -ketoglutarat dan membentuk glutamat dan oksaloasetat. Selanjutnya, malat dehidrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) mengkatalisis reaksi reduksi oksaloasetat menjadi malat. Reaksi reduksi ini juga disertai dengan oksidasi NADH

menjadi NAD⁺. Semakin tinggi aktivitas enzim aminotransferase pada sampel, jumlah NADH yang dioksidasi akan semakin banyak sehingga pembacaan absorbansi berkurang seiring berjalannya reaksi (Issam et al., 2012).

3.3. Histopatologi organ hati

Parameter lainnya yang digunakan untuk menganalisis kerusakan hati adalah dengan pengamatan secara mikroskopik. Pengamatan terhadap gambaran histopatologi hati digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak angkak terhadap pemulihan fungsi hati akibat induksi hiperkolesterol. Pengamatan dilakukan dengan mengamati keadaan unit fungsional hati secara keseluruhan, meliputi inti sel, sitoplasma, perbedaan intensitas warna dan batas antar sel. Tiga bagian yang dijadikan penanda dalam wilayah pengamatan adalah vena sentralis (1), traktus portalis (2) dan parenkima (3). Gambaran histopatologi organ hati tikus dapat dilihat pada Gambar 3.

Gambar 3. Histopatologi organ hati tikus pewarnaan HE perbesaran 100x: (NO) tidak ada kelainan spesifik, susunan hepatosit rapat dan radial, (PO) susunan hepatosit rapat, terdapat sel Kupffer di sekitar traktus portalis dan sel limfosit di midzonal, (NE) dilatasi sinusoid (*), degenerasi butir, degenerasi lemak (†), sel tanda-tanda inflamasi, (A1) susunan hepatosit sedikit renggang, terdapat sel Kupffer di sekitar traktus portalis dan midzonal, degenerasi butir, (A2): susunan hepatosit rapat, degenerasi lemak (†); (1): vena sentral; (2): traktus portalis; (3): parenkima.

Gambaran mikroskopik hati kelompok normal menunjukkan tidak adanya kelainan spesifik pada jaringan (NO). Sel hepatosit tampak utuh dan terwarnai dengan baik oleh pewarna hematoksilin. Susunan sel rapat dan berjajar secara radial mengelilingi vena sentral. Kondisi yang hampir sama terjadi pada jaringan hati tikus kelompok

positif (PO), jarak antar hepatosit rapat dan bersusun secara radial, hal ini menunjukkan simvastatin yang diberikan mampu memperbaiki jaringan hati tikus yang diinduksi PTU dan HFD.

Hasil pewarnaan pada kelompok negatif (NE) menunjukkan gambaran mikroskopik yang berbeda dengan kelompok NO dan PO. Ukuran sel tampak lebih besar dan keruh atau pucat. Jarak antar hepatosit juga terlihat berjauhan (*) dan bentuk radial di sekeliling vena sentral tidak beraturan. Kondisi sel yang membesar dan keruh ini disebut juga dengan istilah *cloudy swelling* atau degenerasi butir.

Gejala ini disebabkan oleh adanya gangguan pada fungsi membran yang meningkatkan pemasukan air dan ion Na⁺ ke dalam sel dan bersamaan dengan akumulasi protein intraseluler (Del Monte, 2005). Selain itu, ditemukan beberapa butiran lipid pada bagian parenkima yang menandakan terjadinya inflamasi dan degenerasi lemak. Jumlah sel Kupffer dan sel limfosit meningkat dan berkumpul di daerah traktus portalis dan midzonal parenkima, hal ini menunjukkan adanya usaha perlindungan oleh sel imun terhadap inflamasi yang sedang terjadi (Yerian, 2011).

Degenerasi lemak ditandai dengan adanya butiran lipid yang tampak bulat dan berwarna putih di dalam sitoplasma. Butiran lipid ini merupakan cadangan energi yang disimpan oleh sel akibat kelebihan jumlah trigliserida (Monga, 2011).

Arguello et al., (2015) menyatakan peningkatan kolesterol bebas dapat menyebabkan disfungsi sel Kupffer sebagai makrofag dan menyebabkan peradangan pada *fatty liver disease*. Hasil yang tidak jauh berbeda juga dilaporkan oleh Karamikhah et al., (2015). Induksi PTU 100 mg/kg BB menyebabkan nekrosis, pelebaran sinusoidal (edema) dan agregasi sel inflamatori pada jaringan hati tikus. Vena portal pada bagian traktus portalis (3) terlihat lebih merah dibandingkan pada gambaran kelompok normal yang menunjukkan terjadinya kongesti.

Perlakuan masing-masing kelompok pemberian ekstrak air angkak memperlihatkan gambaran mikroskopik yang berbeda. Pemberian ekstrak air angkak dengan dosis 100 mg/kg BB tampak lebih berpengaruh dalam mencegah kerusakan hati yang dapat diamati secara kualitatif melalui susunan, struktur dan ukuran jaringan hati dibandingkan kelompok kontrol negatif dan 50 mg/kg BB. Susunan sel hepatosit lebih rapat dan tidak tampak adanya agregasi sel inflamatori, baik di daerah traktus portalis maupun parenkima pada kontrol positif dan kelompok A2 induksi 100 mg/kg, meskipun pada pengamatan histologi hati kelompok A2 masih ditemukan adanya butiran lipid yang tampak bulat dan putih dalam sitoplasma. Butiran lipid ini merupakan kelebihan jumlah trigliserida yang disimpan oleh sel yang

mengindikasikan degenerasi lemak, hal ini dapat disebabkan oleh pemberian pakan HFD dan PTU pada perlakuan. Hasil pengamatan secara keseluruhan mengindikasikan bahwa secara fisiologis dan histologi ekstrak air angkak dengan dosis yang lebih tinggi memberikan dampak positif bagi kesehatan.

4. Kesimpulan

Ekstrak air angkak 100 mg/kg BB pada tikus *Sprague dawley* dapat menghambat peningkatan konsentrasi malondialdehid (MDA) serum dan hati dan aktivitas enzim AST yang diinduksi propiltiourasil dan *high fat diet* secara signifikan.

Pengamatan histopatologi hati pada induksi 100 mg/kg BB ekstrak air angkak menunjukkan adanya perbaikan kondisi jaringan hati yang lebih baik akibat pengaruh pakan *high fat diet* dan propiltiourasil.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kemenristek Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Strategis Aplikasi (PSA) pada tahun 2017.

Daftar Pustaka

- Ajdari, Z., Ghani, M.A., Ayob, M.K., Bayat, S., Mokhtar, M., Abbasi, S., et al. (2014). Hypocholesterolemic activity of Monascus fermented product in the absence of manocolins with partial purification for functional food application. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-12. Doi: 10.1155/2014/252647.
- Amiya, E. (2016). Interaction of hyperlipidemia and reactive oxygen species: Insights from the lipid-raft platform. *World Journal of Cardiology*, 8, 689-694. Doi: 10.4330/wjc.v8.i12.689.
- Anandh, T., Ramya, R., & Sudha, S. (2012). Evaluation of antioxidants and lipid peroxidation status among students. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 3(4), 291-295.
- Arguello, G., Balboa, E., Arrese, M., & Zanlungo, S. (2015). Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852, 1765-1778. Doi: 10.1016/j.bbadis.2015.05.015.
- Armitage, J. (2007). The safety of statins in clinical practice. *Lancet*, 370, 1781-1790. Doi: 10.1016/S01406736(07)60716-8.
- Ayala, A., Munoz, M.F., & Arguelles, S. (2014). Review article: lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2014(6), 1-31. Doi: 10.1155/2014/360438.
- Botros, M., & Sikaris, K.A. (2013). The De Ritis ratio: the test of time. *The Clinical Biochemist Review*, 34, 117-130.
- Del Monte, U. (2005). Swelling of hepatocytes injured by oxidative stress suggests pathological changes related to macromolecular crowding. *Medical Hypotheses*, 64(4), 818-825. Doi: 10.1016/j.mehy.2004.08.028.
- Ellsworth, J.L., Erickson, S.K., & Cooper, A.D. (1986). Very low and low density lipoprotein synthesis and secretion by the human hepatoma cell line Hep-G2: effects of free fatty acid. *The Journal of Lipid Research*, 27(8), 858-74.
- Feng, Y., Xu, H., & Chen, K. (2012). Natural polypill Xuezhikang: its clinical benefit and potential multicomponent synergistic mechanisms of action in cardiovascular disease and other chronic conditions. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 18(4), 318-328. Doi: 10.1089/acm.2011.0187.
- Hasanah, Q. (2016). Aktivitas antioksidan dan inhibisi HMG-KoA reduktase dari formula ekstrak angkak dan bekatul sebagai antikolesterolemia. Master tesis, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hasim, D. (2009). 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. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 10(1), 41-49.
- Heinz, T., Schuchardt, J.P., Moller, K., Hadji, P., & Hahn A. (2016). LDL-cholesterol-lowering effect of monacolin K from red yeast rice extract-results of randomized, placebo-controlled intervention study. *Nutrition Research*, 36(10), 1162-1170. Doi: 10.1016/j.nutres.2016.07.005
- Huang XJ, Choi YL, Im HS, Yarimaga O, Yoon E, Kim HS. 2006. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*, 6(7), 756-782.
- Issam, C., Intissar, G., Fatma, B., Yahia, H.M., Samir, H., Zohra, H., et al. (2012). Oxidative stress, biochemical and histopathological alteration in the liver and kidney of female rats exposed to low doses of deltamethrin (DM): A molecular assessment. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25(6), 672-683. Doi: 10.3967/0895-3988.2012.06.009.

- Karamikah, R., Jamshidzadeh, A., Azarpira, N., Saeedi, A., & Heidari, R. (2015). Prophyltiouracil-induced liver injury in mice and the protective role of taurine. *Pharmaceutical Sciences*, 21(2), 94-101. Doi: 10.15171/PS.2015.23.
- Kasim, E., Triana, E., Yulinery, T., & Nurhidayat, N. (2012). Pengaruh angkak hasil fermentasi beras oleh *Monascus purpureus* JMBA terhadap aktivitas antioksidan dan glutathion peroksidase (GPx) serta histopatologi hati tikus galur Sprague dawley. *Berita Biologi*, 11(2), 177-185. Doi: 10.14203/beritabiologi.v11i2.487.
- Kendran, A.A.S., Arjana, A.A.G., & Pradnyantari, A.A.S.I. (2017). Aktivitas enzim alanine-aminotransferase dan aspartate-aminotransferase pada tikus putih jantan yang diberi ekstrak buah pinang. *Buletin Veteriner Udayanana*, 9(2), 132-138. Doi:10.21531/bulvet.2017.9.2.132
- Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM, Bodenheimer HC. 2008. Serum activity of alanine aminotransferase as an indicator of health and disease. *Hepatology*, 47(4), 1363-1370.
- Kumar, N., & Kar, A. (2013). Regulation of oxidative stress and lipid peroxidation in PTU induced mice, treated with Pyrroloquinoline quinone (PQQ). *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(5), 23-31.
- Li Y, Jiang L, Jia Z, Xin W, Yang S, Yang Q, Wang L. (2014). A meta-analysis of red yeast rice: an effective and relatively safe alternative approach for dyslipidemia. *PLOS ONE*, 9(6).
- Lin, C.C., Li, T.C., & Lai, M.M. (2005). Efficacy and safety of *Monascus purpureus* Went rice in subjects with hyperlipidemia. *European Journal of Endocrinol*, 153, 679-686. Doi: 10.1530/eje.1.02012.
- Lovric, J., Mesic, M., Macan, M., Koprivanac, M., Kelava, M., & Bradamante, V. (2008). Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Periodicum Biologorum*, 110(1), 63-67. Doi: <https://hrcak.srce.hr/29090>.
- Macan, M., Vukšić, A., Žunec, S., Konjevoda, P., Lovrić, J., Kelava, M., et al. (2015). Effects of simvastatin on malondialdehyde level and esterase activity in plasma and tissue of normolipidemic rats. *Pharmacol Rep*, 67, 907-913. Doi: 10.1016/j.pharep.2015.02.005.
- Makiyah, A. & Khumaisah, L.L. (2018). Studi gambaran histopatologi hepar tikus putih strain Wistar yang diinduksi aspirin pascapemberian ekstrak etanol umbi iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) selama 7 hari. *Majalah Kedokteran Bandung*, 50(2), 93-101. <http://dx.doi.org/10.15395/mkb.v50n2.1323>
- Monga, S.P.S. (2011). *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Springer, Pennsylvania.
- Murgod, R., & Soans G. (2012). Changes in electrolyte and lipid profile in hypothyroidism. *International Journal of Life Science & Pharma Research*, 2(3), 185. ISSN 2250-0480.
- Nair, A.B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology*, 7, 27-31. Doi: 10.4103/0976-0105.177703.
- Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Freeman and Company: New York.
- Qin, C., Nagao, T., Grosheva, I., Maxfield, F.R., & Pierini, L.M. (2006). Elevated plasma membrane cholesterol content alters macrophage signaling and function. *Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology*, 26, 372-378. Doi: 10.1161/01.ATV.0000197848.67999.e1.
- Rajasekaran, A., & Kalaivani, M. (2011). Hypolipidemic and antioxidant activity of aqueous extract of *Monascus purpureus* fermented Indian rice in high cholesterol diet fed rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 41(1), 25-32. Doi: 10.3906/sag-1001-533.
- Setiawan, D.I., Tjahyono, K., & Afifah, D.N. (2016). Pemberian kecambah kacang kedelai terhadap kadar malondialdehid (MDA) dan superoxide dismutase (SOD) tikus Sprague Dawley hiperkolesterolemia. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*, 13(1), 20-26.
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Iuchi, Y., Harijono, & Yamada, M. (2016). Antioxidant activity of pigments derived from *Monascus purpureus* fermented rice, corn, and sorghum. *International Food Research Journal*, 24(3), 1186-1191.
- Suckow, M., Steven, H., & Craig, F. (2006). *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press: Burlington.
- Washington, I.M., & Van Hoosier, G. (2012). *Clinical biochemistry and hematology*. Di dalam *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, hamster, and Other Rodents*. Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP, editor. Academic Press: London.
- Welch-White, V., Dawkins, N., Graham, T., & Pace, R. (2013). The impact of high fat diets on physiological changes in euthyroid and thyroid altered rats. *Lipids in Health Disease*, 12, 100. Doi: 10.1186/1476-511X-12-100.
- [WHO] World Health Organization. (2017). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. Diunduh pada 26 Januari 2018. Tersedia pada

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
- Yagi, K. (1987). Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45, 337-351. Doi: 10.1016/0009-3084(87)90071-5.
- Yamashiro, J.I., Shiraishi, S., Fuwa, T., & Horie, T. (2008). Dimeric acid protected oxidative stress-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology*, 24(4), 283-290. Doi: 10.1007/s10565-007-9037-7.
- Yeap, S.K., Beh, B.K., Kong, J., Ho, W.Y., Yusof, H.Y., Mohamad, N.E., et al. (2014). In vivo hypocholesterolemic effect of MARDI fermented red yeast rice water extract in high cholesterol diet fed mice. *Hindawi Publishing Corporation*, 1-7. Doi: 10.1155/2014/707829.
- Yerian, L. (2011). Histopathological evaluation of fatty and alcoholic liver diseases. *Journal of Digestive Diseases*, 12, 17-24. Doi: 10.1111/j.1751-2980.2010.00472.x.
- Yunita E. (2014). Aktivitas aminotransferase dan peroksidasi lipid pada tikus hiperkolesterolemia yang diberi ekstrak jamur tiram putih. Tesis master, Institut Pertanian Bogor, Bogor.