

# Uji toksisitas citrinin yang dihasilkan oleh angkak hasil fermentasi berbagai isolat *Monascus purpureus* terhadap larva *Artemia salina* Leach

## Toxicity test of citrinin from angkak fermented by *Monascus purpureus* isolates against *Artemia salina* Leach

EVI TRIANA<sup>♥</sup>, TITIN YULINERY

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Jl Raya Jakarta-Bogor Km 46 Cibinong Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-8765066, Fax. +62-21-8765062, ♥email: evitriana03@yahoo.com

Manuskrip diterima: 4 Desember 2014. Revisi disetujui: 1 Februari 2015.

**Abstrak.** Triana E, Yulinery T. 2015. Uji toksisitas citrinin yang dihasilkan oleh angkak hasil fermentasi berbagai isolat *Monascus purpureus* terhadap larva *Artemia salina* Leach. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (2)*: 283-288. Angkak merupakan hasil fermentasi beras oleh kapang *Monascus purpureus*. Angkak telah dimanfaatkan dan dikonsumsi sejak dahulu karena memiliki berbagai macam manfaat dan khasiat, antara lain sebagai zat pewarna makanan dan minuman, antibakteria, anti kolesterol, anti trombositopenia, dan sebagainya. Secara alami *Monascus* menghasilkan Monascidin A, yang bersifat antibiotik. Namun dalam perkembangannya diketahui bahwa zat tersebut bersifat toksik terutama terhadap ginjal dan hati. Zat tersebut kini lebih dikenal sebagai citrinin. Karena sifat toksiknya, pemanfaatan angkak, baik sebagai *food additive* maupun untuk pengobatan alternatif/tradisional, harus dilakukan secara bijak. Oleh karena itu, perlu diketahui informasi tentang toksisitas dan kadar citrinin yang terkandung di dalam sediaan angkak terutama yang tersedia secara komersial. Untuk menjawab permasalahan tersebut, telah dilakukan penelitian untuk mengetahui kadar citrinin dan toksisitasnya pada angkak hasil fermentasi beras IR 42 dengan beberapa isolat *Monascus purpureus* yang diperoleh dari berbagai daerah di Indonesia. Pada penelitian ini, kadar citrinin dalam berbagai sampel angkak dianalisis menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Kemudian dilakukan *preliminary test* terhadap toksisitas citrinin menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan citrinin pada angkak hasil fermentasi oleh *Monascus purpureus* AS, TST, dan JMBA berturut-turut adalah 41,235 µg/g, 59,946 µg/g, dan 62,636 µg/g. Sedangkan uji toksisitas citrinin menunjukkan bahwa toksisitas (LC<sub>50</sub>) angkak pada *A. salina* dari terendah hingga tertinggi, berturut-turut adalah AS, TST, JMBA sebesar 138,4841 ppm; 190,546 ppm; 295,869 ppm. Data tersebut mengindikasikan bahwa ketiga sampel angkak memiliki efek sitotoksik yang tinggi. Oleh karena itu pemanfaatannya harus disertai dengan kehati-hatian.

**Kata kunci:** Angkak, *Artemia salina*, citrinin, *Monascus purpureus*, toksisitas

**Abstract.** Triana E, Yulinery T. 2015. Toxicity test of citrinin from angkak produced by rice fermented by three *Monascus purpureus* isolates against *Artemia salina* Leach. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (2)*: 283-288. Angkak is produced from rice fermentation by *Monascus purpureus*. Angkak has been widely used and consumed since long time ago because of its beneficial properties, such as food and beverage coloring, antibacteria, anticholesterol and antithrombocytopenia. Naturally, *Monascus* produced Monascidin A that has antibiotics property. However, angkak contains a toxic substance to kidney and liver, known as citrinin. Due to its toxicity, utilization of angkak, either for a food additive or traditional medicine should be with caution. Therefore, information about the level of citrinin content and its toxicity in angkak, especially commercially available ones, is necessary. This research has been conducted to examine the level and toxicity of angkak produced from IR42-rice fermentation by three isolates of *M. purpureus*. The level of citrinin was analyzed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), and its toxicity was analyzed using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) to *Artemia salina* Leach as a preliminary test. The results showed that citrinin level of angkak produced by *M. purpureus* isolate AS, TST, and JMBA were 41.235 µg/g, 59.946 µg/g, dan 62.636 µg/g, respectively. Toxicity test (LC<sub>50</sub>) of citrinin to *A. salina* showed that the LC<sub>50</sub> of angkak from isolate AS, TST, and JMBA, was measured at 138.4841 ppm; 190.546 ppm; 295.869 ppm, respectively. These data indicated that the angkak samples have high toxicity effect. Therefore its utilization should be with precaution.

**Keywords:** Angkak, *Artemia salina*, citrinin, *Monascus purpureus*, toxicity

### PENDAHULUAN

Pola hidup sehat dengan jargon kembali ke alam (*back to nature*), meningkatkan kesadaran akan penggunaan bahan-bahan alami, baik sebagai makanan, obat, maupun tujuan lain. Agar tujuan tersebut tercapai, bahan-bahan

alami harus digunakan secara bijak. Karena itu diperlukan informasi yang memadai tentang keuntungan, kerugian dan kemungkinan penyalahgunaan obat tradisional, tanaman obat, maupun bahan-bahan yang bersifat farmakoterapi (Dorly 2005).

Pemanfaatan bahan alam sebagai obat tradisional oleh masyarakat dijamin keamanannya oleh Pemerintah, yang tertuang dalam Permenkes No.760/Menkes/Per/IX/1992 tentang obat tradisional dan fitofarmaka. Namun untuk menjamin keamanan masyarakat dalam mengkonsumsinya, setiap bahan alam harus melewati beberapa tahapan meliputi uji farmakologi eksperimental, uji toksisitas, uji klinis, uji kualitas dan pengujian lain sesuai persyaratan yang ditentukan.

Salah satu bahan alam berpotensi yang telah lama dikenal dan dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah angkak. Angkak akhir-akhir ini banyak diperbincangkan karena memiliki beberapa zat aktif yang dapat mengobati berbagai macam penyakit seperti hipertensi, kolesterol, dan trombositopenia. Dalam kitab pengobatan Cina kuno disebutkan bahwa sejak jaman dahulu, angkak dapat digunakan untuk pengobatan yang terkait dengan pencernaan, sirkulasi darah, limfa dan kesehatan perut (Heber et al. 1999; Erdogru dan Azirak 2004; Pattanagul 2007).

Angkak merupakan produk fermentasi beras oleh kapang *Monascus purpureus*. Proses metabolisme selama fermentasi, menghasilkan metabolit sekunder, misalnya pigmen dan zat anti-hiperkolesterolemia. Karena kandungan pigmennya, angkak banyak digunakan sebagai pewarna alami untuk minuman dan makanan, antara lain anggur merah, ikan, keju, dan olahan daging (Chen dan Johns 1993; Ma et al. 2000; Pattanagul et al. 2007).

Zat anti-hiperkolesterolemia yang diisolasi dari *M. purpureus*, adalah Monakolin K, yang dikenal sebagai lovastatin. Hasil penelitian Heber et al. (1999) menunjukkan bahwa lovastatin dapat menurunkan kadar kolesterol darah sebesar 11-32% dan trigliserida sebesar 12-19%. Hasil penelitian ini diperkuat oleh Kasim et al. (2006) yang menyatakan bahwa angkak dapat menekan kenaikan kadar kolesterol total darah pada tikus sebesar 49,28%.

Senyawa lain yang berhasil diisolasi dari *M. purpureus* adalah monascidin, yang memiliki berbagai aktivitas biologis, seperti antimikroba, antibiotik, fitotoksin, sitotoksik, hipokolesterolemik, dan inhibitor enzim (Wang et al. 2004; Pattanagul et al. 2008). Dalam perkembangannya, diketahui bahwa monascidin adalah citrinin, suatu mikotoksin yang bersifat nefrotoksik dan hepatotoksik, karena menyebabkan kerusakan fungsi dan struktur ginjal serta fungsi dan perubahan metabolisme di hati (Blanc et al. 1995; Wang et al. 2004). Namun tidak ada aturan spesifik tentang kadar citrinin maksimal pada produk komersial, karena sulit untuk menetapkan batasan yang dapat diterima secara luas. Alasan utamanya adalah tidak ada metode analisis rutin yang cocok dan sifat citrinin yang tidak stabil (Xu et al. 2006). Umumnya, pada produk komersial angkak, konsentrasi citrinin berkisar 0,2-1,71 ug/g. Di Jepang, konsentrasi maksimum yang diijinkan adalah 200 ng/g, sedangkan di Cina dan Eropa masih diperdebatkan. Konsentrasi serendah ini diyakini tidak menyebabkan gangguan kesehatan (Pattanagul et al. 2008).

Karena sifat toksiknya, agar angkak dapat digunakan secara bijak, baik sebagai *food additive* maupun untuk terapi/pengobatan tradisional, diperlukan informasi tentang

toksisitas dan kadar citrinin yang terkandung dalam sediaan angkak terutama yang tersedia secara komersial. Untuk menjawab permasalahan tersebut, telah dilakukan penelitian untuk mengetahui kadar citrinin dan toksisitasnya pada angkak hasil fermentasi beras IR 42 oleh beberapa isolat *Monascus purpureus* yang diperoleh dari berbagai daerah di Indonesia.

Kadar citrinin pada sampel angkak dianalisis menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Kemudian dilakukan uji toksisitas angkak terhadap *Artemia salina* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Suatu ekstrak dinyatakan toksik berdasarkan metode BSLT jika  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$  (Meyer 1982).  $LC_{50}$  didefinisikan sebagai konsentrasi tunggal suatu senyawa yang secara statistik diharapkan akan membunuh 50% populasi uji selama durasi waktu tertentu (Boyd 2005).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi tentang kandungan dan potensi toksisitas citrinin pada angkak sebagai salah satu bahan obat tradisional yang telah dikenal dan digunakan secara luas oleh masyarakat. Dengan demikian, penggunaan angkak sebagai alternatif terapi/pengobatan menjadi lebih optimal dan lebih aman.

## BAHAN DAN METODE

### Material isolat

Isolat-isolat untuk pembuatan angkak, *Monascus purpureus* AS, TST dan JMBA, diperoleh dari koleksi Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor.

### Pembuatan media kultur *Monascus purpureus*

*M. purpureus* dikultur pada media *Malt Extract Agar* (MEA), dengan komposisi 3,36 g/100 mL akuades. Campuran dikocok hingga homogen, dipanaskan hingga larut sempurna, kemudian disterilkan dengan otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah steril, media dituang ke dalam cawan petri steril, selanjutnya didiamkan hingga memadat.

### Pembuatan inokulum

Isolat *M. purpureus* yang digunakan adalah JMBA, TST, AS koleksi Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), yang diisolasi dari berbagai tempat di Indonesia. Isolat diinokulasi ke dalam media MEA sebanyak 1 ose, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 14 hari. Selesai masa inkubasi, permukaan kultur dikikis menggunakan sendok steril. Sebanyak 1 ose kapang ditumbuk dengan mortar dan ditambahkan 10 ml akuades steril, sehingga diperoleh suspensi kapang.

Sebanyak 200 g beras dicuci bersih dan direndam selama 24 jam. Beras dibilas, ditiriskan, kemudian disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin, beras dicampur dengan suspensi kapang, kemudian difermentasi selama 14 hari pada suhu 30°C. Beras yang telah difermentasi, dikeringkan kemudian

dihaluskan hingga menjadi serbuk, yang akan digunakan sebagai inokulum.

**Pembuatan angkak**

Angkak dibuat dengan cara hampir sama dengan pembuatan inokulum. Sebanyak 200 g beras dicuci bersih dan direndam selama 24 jam, kemudian dibilas, ditiriskan, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan. Sebanyak masing-masing 1% inokulum dari ketiga inokulum dan 20% akuades steril dari berat beras, dicampur hingga merata. Campuran difermentasi selama 14 hari pada suhu 30°C. Angkak hasil fermentasi dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 60°C. Setelah kering angkak dihaluskan hingga menjadi serbuk halus.

**Ekstraksi citrinin**

Sebanyak 0,125 g serbuk angkak (JMBA, TST dan AS) dicampur dengan 5 mL etanol 70% (pH 8) di dalam gelas beaker, diaduk selama 3 jam menggunakan magnetik steerer. Kemudian 1 mL dari setiap sampel angkak disaring dengan filter Whatman 0,2 µm.

**Analisis citrinin**

Larutan angkak dianalisis menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan fase gerak campuran asetonitril : akuabides : trifluoroacetic (1000/1000/1). Kecepatan alir 1,0 mL/menit. Sebagai larutan standar adalah citrinin murni dengan konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, dan 50 ppm.

**Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)**

*Penetasan telur Artemia salina Leach*

Pemilihan telur *A. salina* yang baik dilakukan dengan merendam telur dalam akuades selama 1 jam. Telur yang mengendap disisihkan untuk digunakan dalam penelitian. Larutan dengan salinitas air laut (selanjutnya disebut air laut) dibuat dengan menambahkan NaCl hingga mencapai kadar 25 b/v. Telur dimasukkan ke dalam larutan tersebut, kemudian diberi sirkulasi oksigen dan cahaya lampu. Setelah 24 jam, telur akan menetas. Larva dibiarkan hingga berumur 48 jam.

*Kelompok perlakuan*

Perlakuan terdiri dari 10 kelompok, masing-masing terdiri dari 20 larva *A. salina* dengan 6 ulangan: (i) Perlakuan 1: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 100 ppm. (ii) Perlakuan 2: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 90 ppm. (iii) Perlakuan 3: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 80 ppm. (iv) Perlakuan 4: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 70 ppm. (v) Perlakuan 5: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 60 ppm. (vi) Perlakuan 6: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 50 ppm. (vii) Perlakuan 7: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 40 ppm. (viii) Perlakuan 8: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 30 ppm. (ix) Perlakuan 9: 10 mL air laut ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 20 ppm. (x) Perlakuan 10: 10 mL air laut

ditambah angkak dengan konsentrasi akhir 10 ppm. (xi) Kontrol positif: 10 mL air laut ditambah citrinin murni dengan konsentrasi akhir 1 ppm. (xii) Kontrol negatif: 10 mL air laut tanpa penambahan angkak atau citrinin murni.

*Uji toksisitas*

Semua tabung uji pada kelompok perlakuan dan kontrol diletakkan di bawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva udang yang mati. Tingkat kematian (% mortalitas) dihitung dengan cara membandingkan jumlah larva yang mati dengan jumlah larva total, sesuai dengan rumus:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina ( mati - kontrol)}}{\text{jumlah total larva uji}} \times 100 \%$$

Selanjutnya, LC<sub>50</sub> dihitung menggunakan kurva yang menyatakan log konsentrasi ekstrak uji sebagai sumbu x, dan % mortalitas larva *A. salina* sebagai sumbu y dan memplotnya dalam persamaan regresi linier y = a + bx. Dengan menggunakan data-data yang diperoleh, nilai LC<sub>50</sub> dari citrinin pada sampel angkak dihitung dengan analisis probit.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Analisis kadar citrinin**

Kadar citrinin dianalisis menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan panjang gelombang 254 nm (Gambar 1).

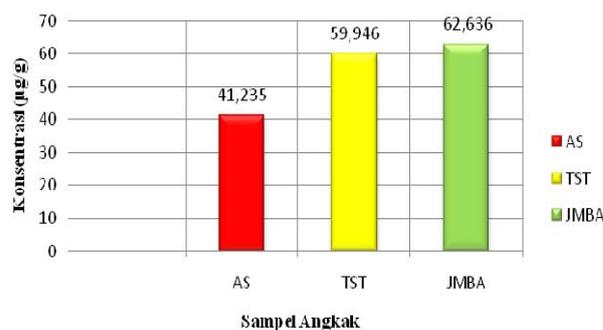
**Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)**

*Nilai mortalitas citrinin pada sampel angkak*

Nilai mortalitas sampel angkak berbeda-beda menurut konsentrasi citrinin di dalamnya. Semakin besar konsentrasi citrinin, semakin semakin tinggi mortalitasnya (Tabel 1). Nilai mortalitas pada kontrol positif dan negatif dapat dilihat pada Gambar 2.

*Nilai LC<sub>50</sub> dari sampel angkak*

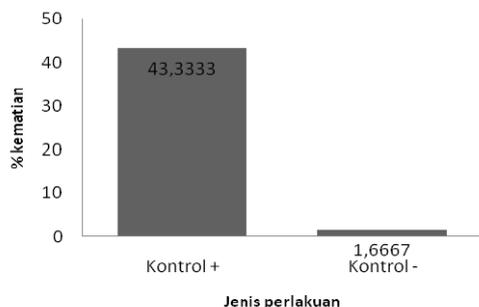
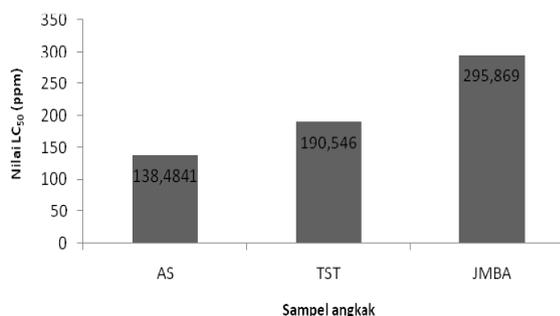
Nilai LC<sub>50</sub> dari citrinin pada angkak AS, TST, dan JMBA dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 1.** Konsentrasi citrinin dalam sediaan angkak

**Tabel 1.** Nilai persen (%) Mortalitas untuk angkak AS, TST, JMBA

Sample	Konsentrasi (ppm)	% Mortalitas
AS	100	50
	90	50,83
	80	39,16
	70	41,66
	60	36,66
	50	36,66
	40	36,66
	30	36,66
	20	31,66
	10	24,16
TST	100	46,66
	90	40,83
	80	36,66
	70	34,16
	60	30,83
	50	38,33
	40	37,5
	30	38,33
	20	36,66
	10	27,5
JMBA	100	40,83
	90	35
	80	28,33
	70	29,16
	60	22,5
	50	27,5
	40	18,33
	30	14,16
	20	15
	10	12,5

**Gambar 2.** Persentase kematian pada kontrol positif dan kontrol negatif**Gambar 3.** Nilai LC<sub>50</sub> dari citrinin pada angkak AS, TST, JMBA

## Pembahasan

*Monascus purpureus* mampu tumbuh baik pada bahan yang mengandung pati, protein atau lipid misalnya kentang, singkong, jagung, gandum, barley, oat, dan beras. Hal tersebut disebabkan kapang ini memproduksi enzim-enzim  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glukoamilase, protease, lipase, glukosidase, dan ribonuklease (Tanaka et al. 2007). Oleh karena itu, beras merupakan substrat yang baik bagi *M. purpureus* untuk pembuatan angkak.

Beras yang digunakan pada penelitian ini adalah IR 42 yang memiliki kadar amilosa sekitar 27% (Gusnimar 2003). Hal ini sesuai dengan pernyataan Santoso (1985) bahwa beras yang cocok digunakan sebagai substrat adalah beras pera yang memiliki kadar amilosa tinggi yaitu 25-30% dan amilopektin rendah. Kandungan amilosa tinggi, menyebabkan beras tidak lengket setelah dimasak. Kondisi ini menyebabkan tersedia ruang yang cukup di antara butiran beras untuk aliran oksigen sehingga pertumbuhan kapang menjadi optimal karena *Monascus* bersifat aerobik yaitu membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya. Selain itu, adanya ruang di antara butiran beras menyebabkan tiap butir beras dapat tertutup miselium secara sempurna. Beras merupakan substrat terbaik untuk produksi pigmen karena struktur mikroskopisnya yang baik untuk penetrasi hifa atau difusi pigmen (Timotius 2004).

Ketiga angkak hasil fermentasi beras oleh isolat *M. purpureus* AS, TST dan JMBA menunjukkan warna yang relatif sama yaitu warna merah kecoklatan, bentuk bulat agak lonjong seperti beras pada umumnya namun agak rapuh.

## Analisis kadar citrinin

Pada Gambar 1. terlihat bahwa angkak JMBA memiliki kadar citrinin lebih tinggi (62,636  $\mu\text{g/g}$ ) daripada AS (41,235  $\mu\text{g/g}$ ) dan TST (59,946  $\mu\text{g/g}$ ). Adanya perbedaan disebabkan sintesis citrinin dipengaruhi berbagai faktor, antara lain: strain *Monascus*, sumber karbon dan nitrogen, nutrisi, serta lingkungan (oksigen, temperatur, pH). Pada beberapa penelitian, terbukti bahwa ekstrak khamir (*yeast extract*) dapat meningkatkan sintesis citrinin sedangkan monosodium glutamat dan etanol dapat menghambat sintesis citrinin. Konsentrasi oksigen terlarut yang rendah menghambat sintesis citrinin dan sintesis pigmen merah. Sintesis citrinin juga sangat bergantung pada pH medium. Meningkatkan pH medium ke arah basa dapat mengurangi konsentrasi citrinin yang terbentuk (Blanc et al. 1995; Xu et al. 2006). Oleh karena faktor yang mempengaruhi pembentukan citrinin sangat bervariasi, dapat dipahami mengapa kandungan citrinin pada ketiga sampel angkak berbeda-beda.

Kandungan citrinin yang diperbolehkan untuk dikonsumsi maksimal sebesar 200 mg/g (Juzlova et al. 2006). Sedangkan kadar citrinin pada angkak JMBA, AS dan TST berada jauh di bawah level maksimal. Berarti angkak JMBA, AS, dan TST relatif aman untuk dikonsumsi oleh masyarakat, sebagaimana tercantum dalam Pattanagul et al. (2008) bahwa konsentrasi serendah ini diyakini tidak menyebabkan gangguan kesehatan. Level citrinin yang tinggi berpengaruh buruk terhadap hati dan ginjal. Pada ternak, simptom/gejala umum dari keracunan

citrinin antara lain meningkatnya konsumsi air dan diare. Gejala ini muncul saat konsumsi citrinin sebesar 130-260 ppm (EFSA 2012).

**Nilai mortalitas citrinin pada angkak**

Pada penelitian ini digunakan metode BSLT untuk mempelajari toksisitas sampel citrinin terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach. Metode ini dipilih karena telah diterima secara luas untuk pengujian pendahuluan toksisitas metabolit sekunder, termasuk mikotoksin. Penggunaan *A. salina* adalah dengan pertimbangan: mudah didapat karena tersedia secara komersial; metode cepat karena larva aktif dapat diperoleh dalam 1-2 hari, membutuhkan peralatan sedikit, tidak memerlukan pemeliharaan kultur/organisme hidup, dan tidak memerlukan laboratorium khusus. Metode BSLT ini merupakan uji toksisitas akut dimana efek toksik suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat, yaitu 24 jam setelah pemberian dosis uji. Agar diperoleh hasil uji toksisitas yang optimal, dilakukan uji terhadap kelompok non perlakuan sebagai kontrol, yaitu kontrol positif untuk menguji efek toksisitas dari bentuk murni senyawa, dan kontrol negatif untuk mengetahui tingkat kematian alami *A. salina*.

Berdasarkan hasil perhitungan yang disajikan pada Tabel 1, terlihat ada kecenderungan semakin tinggi konsentrasi citrinin, semakin tinggi tingkat kematian larva *A. salina*. Nilai mortalitas tertinggi dari ekstrak citrinin dengan konsentrasi 100 ppm adalah angkak AS sebesar 50,83%, TST sebesar 46,66%, dan JMBA sebesar 40,83%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa larva *A. salina* paling rentan terhadap toksisitas citrinin yang diekstrak dari angkak AS, diikuti oleh angkak TST dan paling tahan terhadap angkak JMBA.

Gambar 2. menunjukkan bahwa nilai mortalitas pada kontrol positif yang menggunakan citrinin murni 1 ppm adalah 43,33%. Bila dibandingkan dengan nilai mortalitas pada kelompok perlakuan, terlihat bahwa nilai mortalitas yang hampir sama (41,66-50,83%) dicapai oleh angkak AS dengan kadar citrinin berkisar 70-100 ppm, angkak TST berkisar 90-100 ppm, sedangkan angkak JMBA > 100 ppm. Berdasarkan data tersebut dapat diasumsikan bahwa toksisitas citrinin pada angkak hasil fermentasi *M. purpureus* AS, TST dan JMBA tidak setinggi toksisitas citrinin murni 1 ppm. Pada kontrol negatif, terjadi kematian *Artemia salina* Leach sebesar 1,6667%. Kematian pada kontrol negatif disebabkan faktor alami, misalnya: nutrisi, oksigen, temperatur, dan lain-lain (Blanc et al. 1995).

Mekanisme toksisitas citrinin masih kontroversial dan belum dipahami secara mendalam. Umumnya data diperoleh secara *in vitro* dan sangat bervariasi. Diduga renjatan oksidatif (*oxydative stress*) dengan peningkatan spesies oksigen reaktif menstimulasi pembentukan superoksida (Ribeiro et al. 1997; EFSA 2012). Kemungkinan lain adalah mengubah fungsi mitokondria sehingga mitokondria membengkak dan pecah, dengan cara menurunkan akumulasi ion kalsium pada matriks dengan menghambat influx dan meningkatkan efflux (Chagas et al. 1994; Chagas et al. 1995).

**Nilai LC<sub>50</sub> dari sampel angkak**

Untuk menghitung nilai LC<sub>50</sub> digunakan kurva yang menyatakan log konsentrasi ekstrak uji yang menyebabkan kematian terhadap 50% larva *A. salina* sebagai sumbu x, dan tingkat kematian (mortalitas) larva *A. salina* 50% setelah masa inkubasi 24 jam sebagai sumbu y, yang diplot dalam persamaan regresi linier  $y = a + bx$ . Dengan menggunakan rumus tersebut, diperoleh nilai a dan b berdasarkan data dari 10 titik konsentrasi yang digunakan. Nilai LC<sub>50</sub> ditentukan melalui analisis probit terhadap data-data yang diperoleh. Semakin kecil nilai LC<sub>50</sub> maka semakin besar aktivitas/efek toksiknya.

Data LC<sub>50</sub> dari ketiga sampel angkak disajikan sebagai grafik pada Gambar 3. Berdasarkan grafik tersebut, terlihat bahwa hasil uji toksisitas serbuk angkak yang memiliki nilai LC<sub>50</sub> tertinggi hingga terendah berturut-turut ditunjukkan oleh angkak JMBA (295,869 ppm), TST (190,546 ppm), dan AS (138,4841 ppm). Data tersebut menunjukkan ketiga sampel angkak memiliki potensi toksisitas yang tinggi, karena suatu ekstrak dikatakan toksik berdasarkan metode BSLT jika LC<sub>50</sub> < 1000 µg/ml (Meyer 1982). Hasil yang diperoleh sejalan dengan hasil penelitian terdahulu, bahwa nilai toksisitas angkak terhadap *A. salina* adalah 100 µg/ml (Harwig dan Scott 1971). Citrinin termasuk ekotoksik, yaitu senyawa yang berbahaya terhadap lingkungan. Karena itu sangat toksik untuk organisme perairan.

Walaupun berdasarkan metode BSLT ketiga sampel angkak yang diuji menunjukkan potensi toksisitas yang tinggi, namun demikian tidak bisa dilakukan ekstrapolasi terhadap manusia. Karena sebagaimana telah disebutkan di atas, kandungan citrinin pada angkak AS, TST, dan JMBA masih dibawah level maksimal yang diijinkan untuk dikonsumsi. Toksisitas citrinin terhadap manusia masih menjadi perdebatan, karena belum ada kajian yang tepat/layak tentang hal tersebut disebabkan ketidakstabilan citrinin membuatnya sulit diisolasi dan minat yang rendah karena minim aplikasi industri. Di beberapa negara, level maksimal citrinin yang diijinkan dikonsumsi masih bervariasi karena sulit untuk menetapkan batasan yang dapat diterima secara luas. Berdasarkan kajian yang dilakukan oleh EFSA (*European Food Safety Authority*) pada berbagai penelitian yang dilakukan pada hewan uji dan manusia, disimpulkan bahwa dosis yang tidak akan menyebabkan gangguan pada ginjal bagi manusia adalah 0,2 µg/kg berat badan per hari (EFSA 2012).

Selain itu, untuk meminimalkan asupan citrinin, detoksifikasi citrinin sangat penting untuk dilakukan. Penelitian tentang dekomposisi dan detoksifikasi termal menunjukkan bahwa pemanasan kering pada 175°C akan menguraikan citrinin. Sedangkan pemanasan citrinin pada 130°C dengan sedikit air menyebabkan penurunan yang berarti dalam toksisitasnya terhadap sel Hela. Setelah dididihkan dalam air, konsentrasi citrinin pada *Monascus* berkurang secara drastis. Pemanasan 20 menit dapat menurunkan konsentrasi citrinin hingga 50%. Hal ini membuktikan bahwa citrinin labil dalam larutan dan temperatur tinggi (Xu et al. 2006). Oleh karena itu, sebelum dikonsumsi sebaiknya angkak dipanaskan terlebih

dahulu untuk detoksifikasi citrinin yang terkandung di dalamnya.

Berdasarkan data-data dan informasi tersebut di atas, dapat disimpulkan bahwa walaupun kandungan citrinin pada ketiga sampel angkak masih dalam batas aman, namun citrinin memiliki potensi sitotoksik yang tinggi berdasarkan LC<sub>50</sub>. Oleh karena itu, untuk memperoleh manfaat angkak yang lebih optimal dan aman, penggunaannya harus disertai kehati-hatian dengan memperhatikan kandungan citrinin dalam angkak, dosis yang tepat, maupun cara pengolahan angkak sebelum digunakan untuk meminimalisir asupan citrinin.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. 1995. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int J Food Microbiol* 27: 201-213.
- Boyd CE. 2005. LC<sub>50</sub> calculations, help protect toxicity. *Global Aquaculture Advocate* Feb: 84-87.
- Chagas GM, Wambier Kluppel ML, Campello AP, Buchi DF, Oliveira MBM. 1994. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. *Cell Struct Funct* 19: 103-108.
- Chen M, Johns MR. 1993. Effects of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 40: 132-138.
- Ghagas GM., Oliveira MBM, Campello AP, Kluppel MLW. 1995. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria, IV. effect on Ca<sup>2+</sup> transport. *Cell Biochem Funct* 13: 53-59.
- Dorly. 2005. *Potensi Tumbuhan Obat Indonesia dalam Perkembangan Industri*. Agromedisin. Bogor.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Scientific opinion on the risk for public and animal health related to the presence of citrinin in food and food. *EFSA Journal* 10(3): 2605, 1-84.
- Erdogru O, Azirak S. 2004. Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). *Turkish Elect J Biotechnol* 2: 37-39.
- Gusnimar. 2003. Teknik analisis kadar amilosa dalam beras. *Buletin Teknik Pertanian* 8(2): 41.
- Harwig J, Scott PM. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl Microbiol* 21(6): 1011-1016.
- Heber D, Yip I, Ashley JM. 1999. Cholesterol-lowering effects of a proprietary chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr* 69: 231-236.
- Juslova P, Martinkova L, Kren V. 2006. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J Ind Microbiol* 16:164-170.
- Kasim E, Kurniawati Y, Nurhidayat N. 2006. Pemanfaatan isolat lokal *Monascus purpureus* untuk menurunkan kolesterol darah pada tikus putih galur Sprague Dawley. *Biodiversitas* 7(2): 122-124.
- Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang RM. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* 48: 5220-5225.
- Meyer HN. 1982. Brine shrimp lethality test. *Med Plant Research* 45(3): 1-34.
- Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol, Leksawasdi N. 2007. Review of angkak production (*Monascus purpureus*). *Chiang Mai J Sci* 34(3): 319-328.
- Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Tharatha A. 2008. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus sp.* *Int J Food Microbiol* 126: 20-23.
- Ribeiro SMR, Chagas GM, Campello AP, Kluppel LW. 1997. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria, effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem Funct* 15: 203-209.
- Santoso, GSB. 1985. Produksi pewarna alami angkak dengan media fermentasi beras sosoh. *Media Teknologi dan Pangan* 11(2): 34-38
- Tanaka K, Sago Y, Zheng Y, Nakagawa H, Kushiro M. 2007. Mycotoxins in rice. *Int J Food Microbiol.* 119: 59-66.
- Timotius KH. 2004. Produksi pigmen angkak oleh *Monascus*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 15(1): 79-86.
- Wang JJ, Lee CL, Pan TM. 2004 Modified mutation method for screening low citrinin-producing strains of *Monascus purpureus* on rice culture. *J Agric Food Chem* 52(23): 6977-6982.
- Xu B, Jia X, Gu L, Sung C. 2006. Review on the qualitative and quantitative analysis of mycotoxin citrinin. *Food Control* 17: 271-285.