

ANALISIS CITRININ, LOVASTATIN, DAN PIGMEN PADA ANGKAK HASIL FERMENTASI BERAS IR 42 DENGAN *MONASCUS PURPUREUS* HASIL MUTAGENESIS ETIDIUM BROMIDA

¹ Evi Triana, ² Titin Yulinery, dan ³ Novik Nurhidayat

^{1, 2, 3} Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Jl. Raya Bogor Km.46, Cibinong 16911

e-mail: ¹ewitriana03@yahoo.com, ²tyulinery@yahoo.co.id, ³noviknur@yahoo.com

Abstrak. *Monascus purpureus* adalah kapang yang telah lama dikenal dan digunakan untuk membuat angkak. Angkak merupakan hasil fermentasi beras oleh *M. purpureus*. Karena kandungan pigmen dan senyawa-senyawa aktif, terutama lovastatin, angkak banyak dimanfaatkan sebagai bahan pewarna makanan dan obat. Namun kandungan citrinin yang bersifat toksik sebagai salah satu produk metabolitnya, dapat menjadi faktor pembatas. Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk menurunkan kadar citrinin sekaligus meningkatkan kadar pigmen dan lovastatin pada angkak dengan cara mutagenesis menggunakan etidium bromida (EtBr). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan etidium bromida dapat menghasilkan kadar lovastatin dan pigmen yang lebih tinggi serta kadar citrinin yang rendah dibandingkan tanpa mutagenesis. Seleksi terhadap potensi isolat mutan mendapatkan mutan *Monascus purpureus* As Eb⁺K yang potensial untuk dikembangkan dalam pembuatan angkak karena mengandung kadar citrinin yang sangat rendah, yaitu 0,0001% dan kadar lovastatin relatif tinggi sebesar 0,892%, serta pigmen merah 0,6175%, dan pigmen kuning 0,613%. Oleh karena itu diharapkan isolat ini dapat dikembangkan untuk menghasilkan angkak yang efektif sebagai pewarna dan bahan obat alternatif yang aman.

Kata kunci: citrinin, lovastatin, *Monascus purpureus*, etidium bromide

1. Pendahuluan

Monascus purpureus merupakan kapang merah yang dapat dikultur pada substrat yang mengandung pati (Dominguez-Espinoza & Webb, 2003). Oleh karena itu, *M. purpureus* telah dikenal secara luas dalam pembuatan angkak. Angkak merupakan produk fermentasi beras oleh *M. purpureus*. Angkak juga disebut *beni koji* (Jepang), *hung-chu*, *hong qu* (China), *rotschimmelreis* (Eropa) dan kapang merah/*red mould* (USA) (Pattanagul *et al.*, 2007). Dalam proses fermentasi angkak, dihasilkan berbagai metabolit sekunder, misalnya pigmen merah, kuning dan oranye, agen antihiperkolesterolemia (Monakolin K, lovastatin), dan antibakteri (Monascidin A). Oleh karena itu, angkak telah digunakan sejak dahulu sebagai pewarna makanan, preservatif/pengawet, serta obat tradisional untuk berbagai penyakit infeksi, mencegah pembendungan darah (*blood blockage*) dan mengobati hiperkolesterolemia (Takemoto *et al.*, 2001; Pattanagul *et al.*, 2007).

Hiperkolesterolemia merupakan merupakan kondisi dimana kadar kolesterol pada darah melebihi batas normal. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk membuktikan pengaruh lovastatin untuk pengobatan hiperkolesterolemia dan penyakit yang disebabkan kondisi tersebut. Menurut Heber *et al.* (1999), lovastatin dapat menurunkan kadar kolesterol darah sebesar 11–32 % dan kadar trigliserida sebesar 12–19%. Sedangkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Kasim *et al.* (2006) menunjukkan bahwa pemberian angkak yang mengandung lovastatin mampu menekan kenaikan kadar kolesterol total darah tikus sebesar 49,28%.

Lovastatin bekerja menghambat HMG-CoA reduktase (*Hydroxy-methyl-glutaryl Coenzyme A*), yaitu enzim yang mengontrol jalur biosintesis kolesterol di dalam hati. Penghambatan HMG-CoA reduktase akan mencegah pembentukan mevalonat dan kolesterol. Zat ini merupakan salah satu zat yang bersifat kompetitor kuat terhadap HMG-CoA-reduktase dalam mengontrol jalur biosintesis kolesterol. Selain itu, lovastatin berperan dalam meningkatkan reseptor LDL dalam hati, sehingga katabolisme kolesterol meningkat (Brown & Goldstein, 1991; Grundy, 1991).

Namun demikian penggunaan angkak harus hati-hati karena secara alami angkak menghasilkan citrinin. Citrinin merupakan zat yang bersifat toksik, terutama terhadap ginjal (nefrotoksik). Agar tidak membahayakan penggunaannya, perlu diketahui kandungan citrinin pada sediaan angkak. Namun demikian, umumnya angkak yang beredar di pasaran tidak menginformasikan kadar citrinin, mengingat hal tersebut penting sebagai pertimbangan apakah angkak masih dalam batas aman dikonsumsi. Pada produk komersial *Monascus*, konsentrasi citrinin berkisar 0,2 – 1,71 ug/g. Konsentrasi serendah ini tidak menyebabkan gangguan kesehatan. Di Jepang, konsentrasi maksimum yang diijinkan adalah 200 ng/g, sedangkan di Cina dan Eropa masih diperdebatkan (Pattanagul *et al.*, 2007). Namun demikian, umumnya peneliti mendukung gagasan untuk mengendalikan konsentrasi citrinin pada angkak. Dalam produksi pigmen dan lovastatin secara komersial untuk digunakan pada makanan dan pengobatan, penggunaan strain-strain *M. purpureus* yang tidak menghasilkan citrinin mutlak diperlukan (Shimizu *et al.*, 2005). Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk memperoleh sediaan angkak yang memiliki kadar pigmen dan lovastatin tinggi dan kadar citrinin rendah.

Kapang *Monascus purpureus* JMBA dan AS yang merupakan bagian dari keanekaragaman mikroba Indonesia, memiliki potensi biomedis yang dapat dikembangkan, karena menghasilkan pigmen merah (*monascorubrin*) dan pigmen kuning (*monascin*) juga menghasilkan senyawa aktif golongan statin, yaitu lovastatin yang cukup tinggi. Untuk memberikan nilai lebih terhadap angkak hasil fermentasi isolat *M. purpureus* tersebut, dibandingkan angkak-angkak lain yang telah beredar luas, dilakukan upaya untuk menurunkan kadar citrinin sekaligus meningkatkan kadar pigmen dan lovastatinnya. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah dengan cara mutagenesis terhadap isolat *Monascus purpureus*.

Mutagenesis/mutasi buatan dapat dilakukan untuk menghasilkan mutan baru dengan karakteristik atau produk metabolit baru yang berbeda dengan organisme asal. Mutagenesis akan dilakukan pada isolat *M. purpureus* terseleksi dengan menggunakan etidium bromida. Etidium bromida akan berinterkalasi diantara pasangan basa pada utas DNA atau RNA yang menyebabkan pembentukan ulang molekul, atau menghambat pembentukan ulang molekul alaminya, sehingga dapat menekan atau mencegah berbagai proses biologi yang terjadi pada DNA atau RNA, misalnya replikasi atau sintesis protein. Oleh karena itu etidium bromida bersifat toksik, karena mengubah sifat protein atau mencegah sintesis protein yang dapat mempertahankan siklus hidup sel (Reha *et al.*, 2003). Diharapkan dari hasil mutagenesis tersebut, akan diperoleh varian-varian yang memiliki kadar citrinin yang rendah, sekaligus kadar pigmen dan lovastatin yang tinggi. Dengan demikian, khasiatnya sebagai bahan alternatif untuk pengobatan berbagai penyakit dapat lebih optimal.

2. Metode

2.1 Peremajaan dan Pembuatan Suspensi *M. Purpureus* JMBA dan *Monascus Purpureus* As

Isolat ditumbuhkan pada media MEA miring dalam tabung reaksi sebanyak 1 ose, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 14 hari. Sebanyak 2 ml akuades steril dimasukkan ke dalam tabung berisi biakan tersebut. Biakan digores/digosok agar askospora terlepas sehingga diperoleh suspensi askospora *M. purpureus*.

2.2 Mutagenesis Suspensi Askospora *Monascus Purpureus* JMBA dan *Monascus Purpureus* As dengan Etidium Bromida

Ke dalam suspensi ditambahkan 0,1 ml etidium bromida, divorteks dan disimpan selama 24 jam. Sebanyak 100 ul larutan tersebut diinokulasi ke medium MEA dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 14 hari.

2.3 Pembuatan Angkak Menggunakan Isolat Hasil Mutagenesis

Beras IR 42 direndam selama 30 menit, kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang. Sebanyak 25 gr beras ditempatkan pada cawan petri, dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan. Setelah dingin, beras diinokulasi dengan 2cm x 2cm kultur *M. purpureus* hasil mutagenesis, diaduk secara aseptik hingga homogen. Campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 14 hari. Setelah selesai masa inkubasi, angkak dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40-45°C selama 2 hari. Angkak kering dihaluskan dengan mortar.

2.4 Pengukuran Kadar Pigmen, Lovastatin dan Citrinin

Pigmen merah dan kuning diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 390nm dan 500 nm. Kadar lovastatin dan citrinin dianalisa dengan metode HPLC, menggunakan kolom Shimadzu C-8, kecepatan alir 1 ml/menit, pada panjang gelombang 235 nm, suhu kolom 45°C.

3. Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan beras IR 42 yang memiliki kadar amilosa tinggi, sekitar 27% (Gusnimar, 2003). Kandungan amilosa tinggi, menyebabkan beras tidak lengket setelah dimasak. Adanya ruang di antara butiran beras menyebabkan pertumbuhan kapang menjadi optimal, sehingga tiap butir beras dapat tertutup miselium kapang secara sempurna.

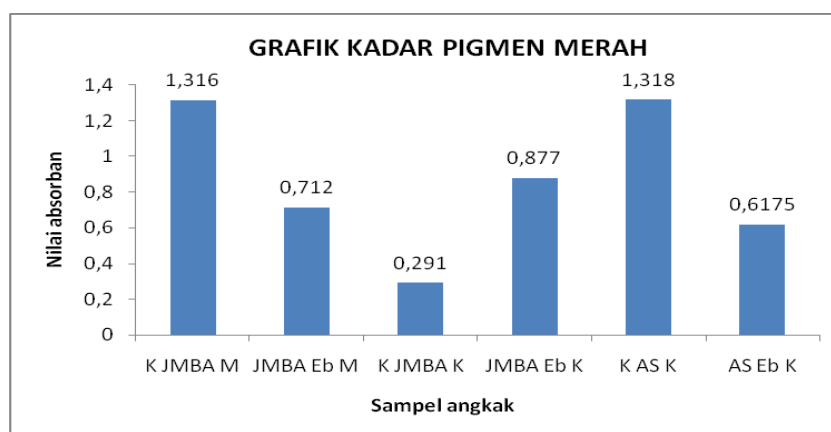
Isolat-isolat *Monascus purpureus* yang digunakan untuk membuat angkak pada penelitian ini adalah isolat asli JMBA M, JMBA K, dan AS K serta isolat-isolat turunannya hasil mutagenesis dengan etidium bromida, yaitu JMBA Eb M, JMBA Eb K, dan AS Eb K. Isolat-isolat hasil mutagenesis tersebut selanjutnya disebut isolat mutan. Menurut Reha *et al.* (2003), etidium bromida termasuk agen pengkhelat (*chelating agent*), yang menyisip (*insert*) di antara basa-basa DNA. Oleh karena itu mutasi yang disebabkan termasuk mutasi insersi.

Sebagai agen interkalasi, kemampuan etidium bromida menyisip di antara basa-basa pada untai ganda DNA dimungkinkan oleh struktur cincin etidium bromida yang bersifat hidrofobik dan menyerupai cincin pada basa-basa DNA. Etidium membentuk ikatan van der Waals dengan pasangan-pasangan basa dan karena itu dapat berikatan dengan bagian hidrofobik molekul DNA. Pada akhirnya, ikatan tersebut menyebabkan

distorsi pada untai ganda, karena terjadi perubahan struktur rangka gula fosfat dan pemanjangan rantai DNA, sehingga mengubah karakter DNA. Oleh karena itu, etidium bromida berpotensi sebagai mutagen (Reha *et al.*, 2003).

3.1 Pengukuran Kadar Pigmen

Angkak hasil fermentasi beras IR 42 dengan *Monascus purpureus* berwarna merah kekuningan karena mengandung pigmen merah dan kuning. Kadar pigmen merah dan kuning pada angkak hasil fermentasi *Monascus purpureus* mutan diukur dengan spektrofotometer, kemudian dibandingkan dengan *Monascus purpureus* kontrol, yaitu isolat *M. purpureus* asal, yang tidak dimutasi. Hasil pengukuran nilai absorbansinya disajikan pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Pigmen merah pada angkak hasil mutagenesis

Keterangan:

- K JMBA M = kontrol, Jember A, merah
- K JMBA K = kontrol, Jember A, kuning
- K AS K = kontrol, Aneka Sakti, kuning
- JMBA Eb M = Jember A, etidium bromida, merah
- JMBA Eb K = Jember A, etidium bromida, kuning
- AS Eb K = Aneka Sakti, etidium bromida, kuning

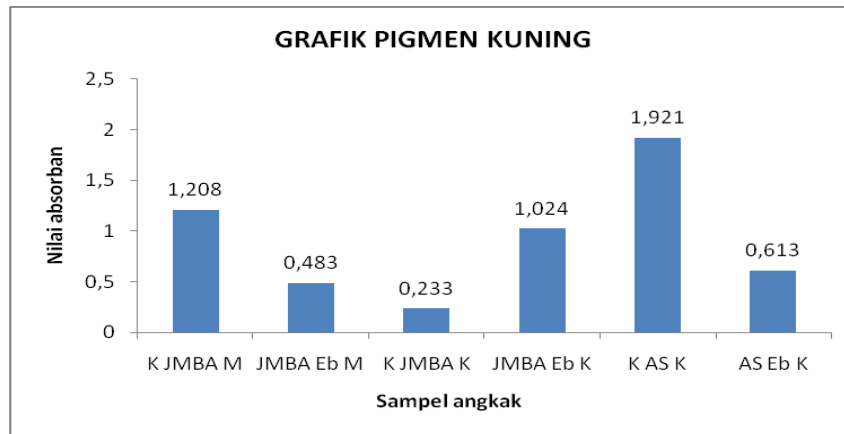
Hasil pengukuran absorbansi pigmen merah (500 nm) pada Gambar 1. menunjukkan bahwa pigmen merah yang dihasilkan isolat *M. purpureus* asal/kontrol, yaitu K JMBA M (1,316) dan K AS K (1,318) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat-isolat hasil mutagenesis oleh etidium bromida, yaitu JMBA Eb M (0,712) dan AS Eb K (0,6175). Data tersebut menunjukkan bahwa penambahan etidium bromida pada *M. purpureus* JMBA M dan AS menyebabkan pembentukan/sintesis pigmen merah pada JMBA Eb M dan AS Eb K menurun.

Kecenderungan yang sama terlihat pada Gambar 2. Hasil pengukuran absorbansi pigmen kuning (390 nm) menunjukkan bahwa pigmen kuning yang dihasilkan isolat *M. purpureus* asal/kontrol, yaitu K JMBA M (1,208) dan K AS K (1,921) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat-isolat hasil mutagenesis oleh etidium bromida, yaitu JMBA Eb M (0,483) dan AS Eb K (0,613). Data tersebut menunjukkan bahwa pemberian

etidium bromida juga menyebabkan penurunan kadar pigmen kuning yang dihasilkan oleh *M. purpureus* JMBA Eb M dan AS Eb K.

Penurunan kadar pigmen merah dan kuning yang dihasilkan oleh isolat JMBA Eb M dan AS Eb K dibandingkan dengan isolat-isolat asal/kontrol terjadi karena pembentukan pigmen terganggu. Kondisi tersebut mungkin disebabkan mutasi oleh etidium bromida yang terjadi pada isolat-isolat tersebut, menghalangi atau menghambat proses sintesis pigmen. Etidium bromida berinterkalasi dengan untai ganda DNA sehingga mengakibatkan perubahan struktur molekul DNA. Kondisi ini dapat menyebabkan interferensi terhadap proses-proses yang berlangsung pada DNA, misalnya replikasi dan transkripsi DNA, DNA *repair*, dan rekombinasi DNA (Reha *et al.*, 2003).

Hal yang sebaliknya terjadi pada isolat JMBA K dan mutan turunannya JMBA Eb K. Isolat mutan menghasilkan pigmen merah (0,877) dan kuning (1,024) lebih tinggi daripada isolat asal. Mutasi yang disebabkan oleh etidium bromida pada *M. purpureus* JMBA K justru menyebabkan sintesis pigmen merah dan kuning meningkat. Berarti mutan JMBA Eb K mengalami over ekspresi (*up-regulation*) pada gen-gen yang mengatur pembentukan pigmen merah dan kuning.



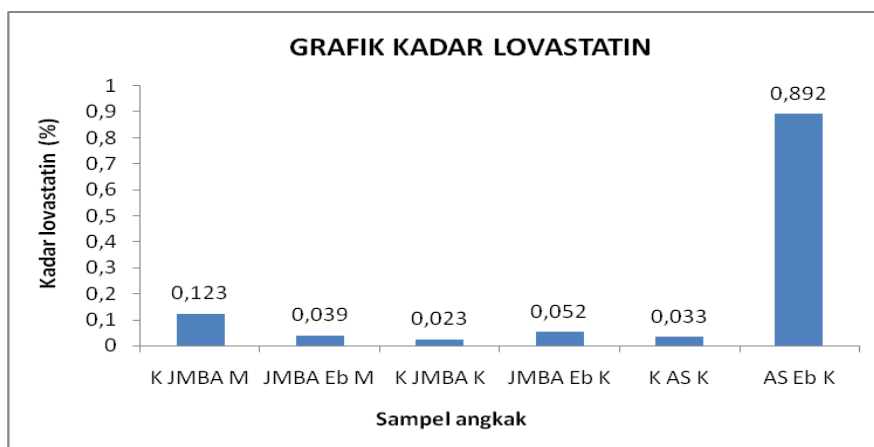
Gambar 2. Pigmen kuning pada angkak hasil mutagenesis

Keterangan:

- K JMBA M = kontrol, Jember A, merah
- K JMBA K = kontrol, Jember A, kuning
- K AS K = kontrol, Aneka Sakti, kuning
- JMBA Eb M = Jember A, etidium bromida, merah
- JMBA Eb K = Jember A, etidium bromida, kuning
- AS Eb K = Aneka Sakti, etidium bromida, kuning

3.2 Pengukuran Kadar Lovastatin

Kadar lovastatin yang terkandung di dalam angkak hasil fermentasi beras IR 42 dengan berbagai isolat *M. purpureus* dianalisis menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hasil pengukuran kadar lovastatin pada angkak yang dihasilkan oleh strain-strain *M. purpureus* mutan dibandingkan dengan *M. purpureus* asal, sebagai kontrol. Kadar lovastatin yang diperoleh, disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kadar lovastatin pada angkak hasil mutagenesis

Keterangan:

K JMBA M = kontrol, Jember A, merah

K JMBA K = kontrol, Jember A, kuning

K AS K = kontrol, Aneka Sakti, kuning

JMBA Eb M = Jember A, etidium bromida, merah

JMBA Eb K = Jember A, etidium bromida, kuning

AS Eb K = Aneka Sakti, etidium bromida, kuning

Kadar lovastatin yang dihasilkan oleh isolat mutan JMBA Eb K (0,052%) dan AS Eb K (0,892%) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat asalnya/kontrol, yaitu K JMBA K (0,023%) dan K AS K (0,033%). Hal ini disebabkan etidium bromida menginterferensi proses-proses yang terjadi pada DNA. Pada JMBA K dan AS K, interferensi tersebut justru menyebabkan sintesis lovastatin meningkat. Mutasi kemungkinan terjadi pada bagian operon, dimana operon tersebut mengalami penekanan sehingga terjadi over ekspresi (*up-regulation*) dari gen-gen yang mensintesis lovastatin.

Sementara data yang berlawanan diperoleh dari hasil analisis lovastatin pada isolat JMBA M dan mutan turunannya, yaitu JMBA Eb M. Lovastatin yang dihasilkan mutan JMBA Eb M lebih rendah (0,039%) daripada kontrol (0,123%). Diduga mutasi menyebabkan sintesis lovastatin menurun. Berarti terjadi penghambatan (*down-regulation*) pada gen-gen yang mensintesis lovastatin pada JMBA Eb M.

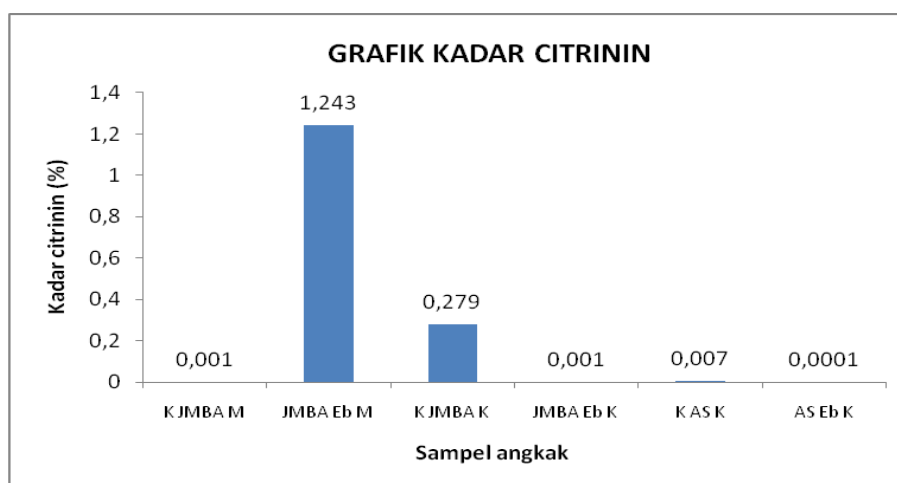
3.3 Pengukuran Kadar Citrinin

Sebagaimana dengan lovastatin, kadar citrinin juga diukur menggunakan HPLC. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kadar citrinin pada angkak yg difermentasi *M. purpureus* hasil mutagenesis yaitu JMBA Eb K (0,001%) dan AS Eb K (0,0001%) memiliki kadar citrinin yang rendah dibandingkan dengan kontrolnya *M. purpureus* K JMBA K (0,279%) dan K AS K (0,007%). Hal ini mungkin terjadi karena penambahan etidium bromida pada K JMBA K menyebabkan proses pembentukan citrinin terhambat sehingga pembentukan citrinin menurun.

Kondisi tersebut mungkin disebabkan etidium bromida yang menyisip di antara basa-basa pada DNA mengakibatkan pembentukan ulang molekul DNA, sehingga terjadi perubahan struktur pada untai ganda DNA. Kondisi ini dapat menyebabkan penghambatan terhadap proses-proses biologi yang berlangsung pada DNA, misalnya

replikasi dan transkripsi DNA. Bila terjadi pada gen-gen yang mengatur sintesis citrinin, maka kadar citrinin yang dihasilkan akan menurun.

Data yang berlawanan juga diperoleh dari hasil analisis citrinin pada isolat JMBA M dan mutan turunannya, yaitu JMBA Eb M. Citrinin yang dihasilkan mutan JMBA Eb M lebih tinggi (1,234%) daripada kontrol (0,001%). Diduga mutasi menyebabkan sintesis citrinin meningkat. Berarti terjadi over ekspresi (*up-regulation*) pada gen-gen yang mensintesis citrinin pada JMBA Eb M.



Gambar 4. Kadar citrinin pada angkak hasil mutagenesis

Keterangan:

- K JMBA M = kontrol, Jember A, merah
- K JMBA K = kontrol, Jember A, kuning
- K AS K = kontrol, Aneka Sakti, kuning
- JMBA Eb M = Jember A, etidium bromida, merah
- JMBA Eb K = Jember A, etidium bromida, kuning
- AS Eb K = Aneka Sakti, etidium bromida, kuning

Hasil penelitian/analisis di atas menunjukkan bahwa etidium bromida menginduksi pola ekspresi yang berbeda pada *Monascus purpureus* tertentu dalam hal produksi pigmen, lovastatin dan citrinin. Selain itu, etidium bromida juga menginduksi pola ekspresi berbeda pada proses metabolisme dari metabolit sekunder tertentu pada isolat-isolat *M. purpureus* yang berbeda.

Bagaimana mutagen yang sama mempengaruhi regulasi metabolisme pada produksi metabolit sekunder tertentu sehingga menyebabkan pola ekspresi yang berbeda pada isolat-isolat *Monascus*, serta menginduksi pola ekspresi yang berbeda pada berbagai proses metabolisme dari metabolit sekunder pada *M. purpureus* tertentu, masih belum dapat dijelaskan.

Berdasarkan analisis kadar pigmen, lovastatin dan citrinin di atas, mutagenesis dengan etidium bromida dapat diterapkan untuk mengubah karakteristik tertentu dari *M. purpureus* asal untuk memperoleh isolat mutan unggul yang karakteristiknya sesuai dengan yang diharapkan. Sebagai hasil dari penelitian ini, diperoleh isolat AS Eb K yang memiliki potensi yang paling besar untuk dimanfaatkan sebagai isolat unggulan untuk memproduksi angkak. Hal tersebut disebabkan isolat ini menghasilkan bahan

bioaktif lovastatin tertinggi dan kadar citrinin terendah dibandingkan dengan isolat mutan lainnya, sehingga berpotensi untuk dikembangkan dalam produksi angkak yang berkualitas baik dan relatif aman dikonsumsi.

4. Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil mutagenesis *Monascus purpureus* JMBA dan AS menggunakan etidium bromida, diperoleh mutan potensial, yaitu *Monascus purpureus* AS Eb K. Angkak hasil fermentasi beras IR 42 dengan isolat mutan tersebut memiliki kadar lovastatin relatif tinggi (0.892%) dan kadar citrinin yang sangat rendah (0.0001%). Dengan demikian, khasiat angkak tersebut sebagai bahan alternatif untuk pengobatan berbagai penyakit dapat lebih optimal.

Daftar Pustaka

- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1991). *Drugs Used in The Treatment of Hiperlipoproteinemia: Pharmacological basis of therapeutics*, Ed.8th. New York: Mc.Graw Hill Book.
- Dominguez-Espinoza R. and Webb, C. (2003). Submerge fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 329-336.
- Gusnimar, 2003. Teknik analisis kadar amilosa dalam beras. *Buletin Teknik Pertanian*, 8(2). 41
- Grundy, S.M. 1991. Multifactorial etiology of hipercholesterolemia: implication for prevention of coronary heart disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11. 1619 – 1635.
- Heber, D., Yip, I., and Ashley, J.M. (1999). Cholesterol-lowering Effects of a proprietary Chinese Red-Yeast-Rice Dietary Supplement. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69. 231-236.
- Kasim, E., Kurniawati, Y., and Nurhidayat, N. (2006). Pemanfaatan isolat lokal *Monascus purpureus* untuk menurunkan kolesterol darah pada tikus putih galur Sprague Dawley. *Biodiversitas*, 7(2). 122-124.
- Pattanagul P, Pinthong, R., Phianmongkhol, and Leksawasdi, N. (2007). Review of angkak production (*Monascus purpureus*). *Chiang Mai J. Sci*, 34(3). 319-328.
- Reha, D., Kabelác, M., Ryjáček, F., Sponer, J., Sponer, J.E., Elstner, M., Suhai, S., and Hobza, P. (2003) Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between intercalators (ethidium, daunomycin, ellipticine, and 4',6-diaminide-2-phenylindole) and DNA base pairs. Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potential study. *J. Am. Chem. Soc*, 124. 3366-76
- Shimizu T, Kinoshita, H., Ishihara, S., Sakai, K., Nagai, S., and Nihira, T. 2005. Polyketide synthetase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 71(7). 3453-3457.
- Takemoto, M., Node, K., Nakagami, H., Liao, Y., Grimm, M., Takemoto, Y., Kitakaze, M., and Liao, J.K. (2001). Statin as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest*, 100. 1429-1437.