

PENGARUH PENGGUNAAN KARBOHIDRAT YANG BERBEDA SEBAGAI KOMPOSISI MEDIA TERHADAP PRODUKSI ZAT WARNA MERAH *MONASCUS PURPUREUS* SECARA FERMENTASI CAIR

Anna Yuliana
Prodi S1 Farmasi STIKes BTH Tasikmalaya

ABSTRAK

Setiap galur mikroorganisme memiliki respon yang berbeda terhadap jenis sumber karbon komponen media fermentasi. Penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh jenis dan konsentrasi sumber karbon terhadap pembentukan zat warna merah menggunakan galur induk (ITBCC-HD-F001) dan mikotoksin menggunakan galur mutan (ITBCC-HD-F002) dan mengkaji penggunaan limbah cair pabrik tahu sebagai medium fermentasi kompleks. Fermentasi kedua macam galur *Monascus* (galur induk dan galur mutan) dilakukan untuk menentukan kadar glukosa sebagai sumber karbon yang optimal untuk pembentukan zat warna merah. Sumber karbon lain (fruktosa dan maltosa) dicoba menggantikan glukosa dalam fermentasi dengan konsentrasi seperti konsentrasi glukosa yang menghasilkan zat warna merah terbanyak. Fermentasi dengan sumber karbon glukosa 2% menghasilkan zat warna merah lebih banyak (nilai relatif 9,7 U.L/g sel kering) dibandingkan dengan yang 4 dan 6% (< 3 U.L/g sel kering). Fermentasi yang menggunakan maltosa 2% menghasilkan zat warna merah lebih banyak (11,56 U.L/g sel kering) dibandingkan dengan yang menggunakan glukosa dan fruktosa pada konsentrasi yang sama. Dibandingkan dengan glukosa dan fuktosa, maltosa lebih mendukung untuk pembentukan zat warna merah.

Kata kunci : *Monascus purpureus*, sumber karbon, zat warna merah.

PENDAHULUAN

Angkak atau beras merah adalah hasil akhir dari fermentasi beras dengan menggunakan *Monascus sp.* Ini telah banyak digunakan di Asia sebagai pewarna alami pada ikan, keju cina, anggur merah dan sosis. *Monascus*, organisme yang menghasilkan angkak dapat merubah substrat menjadi beberapa metabolit seperti alkohol, antibiotik, antihipertensi, enzim, asam lemak, senyawa perasa, flokulan, keton, asam organik, zat warna merah dan vitamin. Penggunaan zat warna merah *Monascus* sebagai pewarna pada makanan juga dapat memberikan rasa yang spesifik. Produk tersebut telah lama digunakan secara tradisional oleh masyarakat luas. Ini sebagai salah satu pilihan untuk penggunaan pewarna alami karena penggunaan beberapa pewarna sintesis seperti tartazin atau azorubin sangat terbatas disebabkan efek karsinogenik dan teratogenik yang ditimbulkan (Pattanagul P, et.al.,2007).

Jamur Angkak memproduksi zat warna merah, alkohol, asam-asam organik, protease, amilase, dan substrat dengan aktivitas terapeutik. Zat warna merah dari jamur ini telah diekstraksi dan dimurnikan sebagai pewarna makanan yang umum, (Y.Y. Tseng, 2000). Produksi zat warna merah sebagai metabolit sekunder tergantung dari type substrat yang digunakan dan faktor spesifik lainnya yang berpengaruh selama proses pertumbuhan seperti pH, suhu dan kelembaban (Pattanagul P, et.al.,2007). *Monascus* menghasilkan enam zat warna yang dikelompokkan menjadi tiga kelompok warna yaitu zat warna kuning (monascin dan ankaflavin), zat warna jingga (monascorubrin dan rubropunctatin) dan zat warna (monascorubramine dan rubropuntamine) (Hamano, et.al., 2006).

Produksi angkak dapat terkontaminasi oleh zat yang memiliki kandungan mikotoksin yang dikenal sebagai manascidin, dimana zat ini bisa merusak ginjal dan hati.

Analisis Spektroskopi massa memperlihatkan bahwa struktur tersebut adalah sitrinin. Efek antibakteri dari *Monascus* yaitu Monascidin A, isolasi dari *M. purpureus*, bisa digunakan untuk menghambat *Bacillus spp*, *Streptococcus spp* dan *Pseudomonas spp*. Dalam semua sampel komersial *Monascus*, kadar sitrinin yang ditemukan berkisar antara 0,2 – 1,71 µg/g.

Karbon dan nitrogen diketahui sebagai unsur yang sangat penting untuk pertumbuhan fungi. Tetapi tidak semua sumber karbon dan nitrogen bisa digunakan, pemilihan sumber karbon akan berbeda untuk setiap kelompok fungi (Omanor, et.al.,2008). Sumber karbon yang selama ini banyak digunakan adalah glukosa. Informasi penggunaan sumber karbon yang berbeda untuk pertumbuhan *Monascus purpureus* koleksi Laboratorium Bioproses – Kimia Medisinal, Sekolah Farmasi ITB belum banyak di temukan terutama kaitannya dengan produksi metabolit sekunder yang dihasilkan.

Tujuan penelitian ini adalah mengkaji pengaruh sumber karbon terhadap produksi metabolit sekunder zat warna merah dan mikotoksin sitrinin dari *Monascus purpureus* (ITBCC-HD-F001 dan ITBCC-HD-F002) secara fermentasi cair.

PROSEDUR

Mikroorganisme. Kapang *Monascus purpureus* Galur induk (ITBCC-HD-F001) dan Galur mutan albino (ITBCC-HD-F002) isolat lokal dari Sungai Cikapundung-Bandung yang merupakan koleksi Laboratorium Bioproses – Kimia Medisinal Sekolah Farmasi ITB.

Bahan: Ekstrak ragi (Difco), ekstrak malt (Oxoid), pepton (Oxoid), glukosa, fruktosa, maltosa (Difco), agar (Difco), metilen klorida, etil asetat, metanol, etanol, asetonitril, air suling, kapas berlemak, kain kertas,

aluminium pembungkus, limbah cair tahu, sitrinin (Sigma Aldrich).

Alat : Timbangan analitik (Sartorius), lemari pengering, stirrer, penghancur miselium (*potter*), lemari *laminar air flow*, autoklaf, alat pembakar Bunsen, jarum Ose, spatula logam, cawan petri, pengocok putar Junke & Kunkel KS 501D, penangas air, sonicator, pH meter Beckman 50, Spektrofotometer UV-Vis (Beckman DU650i), HPLC Agilent 1100, sentrifuge Sigma 203, mikropipet dan tip, corong pisah, botol semprot dan alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

Penyiapan Mikroorganisme. Penyiapan ini terdiri dari pembiakan kapang *Monascus sp* pada agar miring dan pembuatan suspensi kapang *Monascus sp*.

Pembiakan Kapang *Monascus sp.* pada Agar Miring. Kapang yang digunakan adalah *Monascus purpureus* galur induk dan kapang galur mutan albino hasil mutasi penelitian sebelumnya (Deden, 2004). Media agar miring YMP disiapkan dalam tabung reaksi kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Dengan menggunakan Ose bundar kapang induk dan mutan digoreskan secara aseptis pada medium agar YMP tersebut. Kapang mulai tumbuh pada hari ketiga dengan membentuk koloni bulat berwarna merah untuk yang galur induk dan berwarna putih untuk galur mutan, keduanya mempunyai lipata-lipatan atau retakan.

Pembuatan Suspensi *Monascus sp.* Miselia *Monascus purpureus* dalam agar miring yang berusia 7 hari secara aseptis dipindahkan menggunakan spatula ke dalam *potter* steril berisi 50 ml air suling steril kemudian digerus hingga homogen dengan tangkai penggerus untuk memperoleh suspensi miselium kapang yang homogen. Kepekatan suspensi diatur sampai transmisinya mencapai 25% pada serapan maksimumnya. Sebanyak 10 ml cuplikan dimasukkan ke

dalam tabung berpenutup. Untuk menghitung jumlah koloni, biakan ini diencerkan hingga 1000 kali, dari masing-masing pengenceran ditanam pada media YMP padat dalam cawan petri untuk diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar. Jumlah total koloni yang tumbuh, dihitung dan terdapat sebanyak $2,25 \times 10^4$ colony forming unit (CFU)/mL.

Fermentasi Untuk Menghasilkan Zat Warna Merah.

Fermentasi pada Media Berdasarkan Sumber karbon. Percobaan dimulai dengan menumbuhkan suspensi *Monascus purpureus* pada media percobaan yang terdiri dari media cair YMP dengan konsentrasi glukosa yang berbeda. Kemudian ditentukan konsentrasi glukosa yang dapat menghasilkan zat warna merah yang tertinggi (Percobaan I). Berdasarkan konsentrasi tersebut, dilanjutkan dengan penumbuhan dalam media cair YMP yang glukosanya diganti dengan fruktosa dan maltosa (Percobaan II).

Sebanyak 20 ml suspensi *Monascus purpureus* galur mutan dan induk dengan transmitan 25% secara aseptis dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL yang berisi 80 mL media cair YMP. Komposisi media percobaan ditampilkan dalam Tabel 1.

Media	Komposisi Media (% b/v)					
	Eksrk Malt	Ekstrk ragi	Pepton	Glu	Fruk	Mal
A	0,3	0,3	0,6	2	-	-
B	0,3	0,3	0,6	4	-	-
C	0,3	0,3	0,6	6	-	-
D	0,3	0,3	0,6	-	2	-
E	0,3	0,3	0,6	-	-	2

Tabel 1 Komposisi Media Fermentasi yang Dicoba

Media percobaan dengan suspensi *Monascus purpureus* galur induk digunakan untuk penentuan produksi zat warna merah. Dan media percobaan dengan suspensi *Monascus purpureus* galur mutan digunakan untuk penentuan kadar sitrinin.

Semua biakan diatur pada pH 5,5 kemudian dikocok menggunakan pengocok putar dengan kecepatan 150 rpm selama 168 jam pada suhu kamar. Pengambilan cuplikan sebanyak 5 g dilakukan setiap interval 24 jam. menggunakan persamaan regresi linier kadar sitrinin terhadap luas kromatogram hasil penentuan linearitas sistem KCKT yang digunakan.

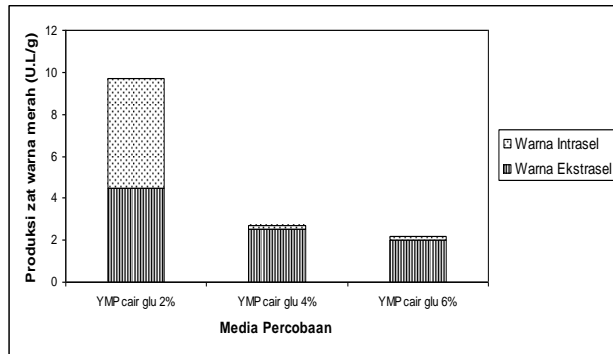
HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk menghasilkan tiap-tiap produk fermentasi yang diinginkan dibutuhkan kondisi fermentasi yang berbeda-beda dan jenis mikroba yang bervariasi juga karakteristiknya. Oleh karena itu, diperlukan keadaan lingkungan, substrat (media), serta perlakuan (treatment) yang sesuai sehingga produk yang dihasilkan tertinggi (Pattanagul, 2007).

Media yang biasa digunakan untuk fermentasi cair *Monascus purpureus* adalah YMP yang terdiri dari : ekstrak malt 0.3% b/v; ekstrak ragi 0.3% b/v; peptone 0.6% b/v; dan glukosa 2% b/v. Pada beberapa literatur kadar glukosa ini bervariasi. Untuk *Monascus purpureus* lokal koleksi Laboratorium Bioproses – Kimia Medisinal perlu di evaluasi komposisi yang tertinggi untuk menghasilkan zat warna merah dari hasil fermentasi cair. Berdasarkan variasi kadar glukosa dari beberapa penelitian sebelumnya dilakukan penumbuhan suspensi kapang pada media dengan variasi kadar glukosa (2, 4, 6%b/v) untuk memperoleh produksi zat warna merah yang tertinggi. Hasil percobaan pada media YMP cair dengan kadar glukosa berbeda dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada media percobaan A, B, C dihasilkan produksi zat warna merah berturut-turut 9,7, 2,7 dan 2,2 U.L/g. Media A yang terdiri dari media cair YMP dengan kadar glukosa 2% b/v menghasilkan produksi zat warna

merah tertinggi dibandingkan dengan media cair YMP dengan glukosa 4 dan 6% .

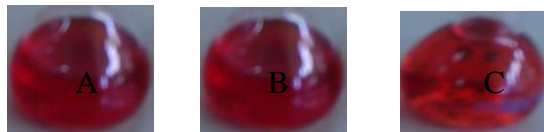


Gambar 1 Produksi zat warna merah *Monascus purpureus* galur induk dari media cair YMP yang menggunakan kadar glukosa berbeda

Produksi zat warna merah yang terbentuk adalah zat warna merah total dari zat warna merah ekstrasel dan intrasel. Perbedaan dari zat warna ekstrasel dan intrasel dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2 Zat warna ekstrasel dari media percobaan (A) Media cair YMP dengan glukosa 2% b/v (B) Media cair YMP dengan glukosa 4% b/v (C) Media cair YMP dengan glukosa 6% b/v.



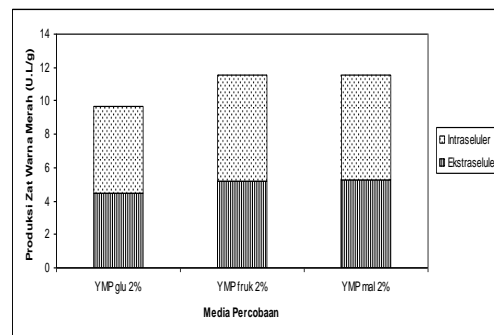
Gambar 3 Zat warna intrasel dari media percobaan (A) Media cair YMP dengan glukosa 2% b/v (B) Media cair YMP dengan glukosa 4% b/v (C) Media cair YMP dengan glukosa 6% b/v

Dari hasil variasi kadar glukosa, diperoleh bahwa media cair YMP dengan kadar glukosa yang lebih besar akan menurunkan produksi zat warna merah. Hal ini berkaitan dengan rasio karbon/nitrogen

(C/N). Sumber nitrogen dalam media cair YMP adalah peptone. Pada percobaan ini kadar peptone tetap untuk semua media percobaan sehingga dengan kadar glukosa yang semakin tinggi akan menyebabkan rasio C/N akan semakin kecil. Dalam proses fermentasi, kandungan glukosa dan protein yang sering direpresentasikan sebagai rasio karbon/nitrogen (C/N) sangat menentukan pertumbuhan mikroorganisme serta produktivitas senyawa metabolit primer dan sekunder. Rasio ini akan berbeda untuk setiap strain mikroorganisme. (Prince, 1990).

Setelah didapatkan media dengan kadar glukosa yang menghasilkan zat warna merah tertinggi, kemudian dilanjutkan pembiakan dalam media cair YMP yang glukosa nya diganti dengan fruktosa dan maltosa, untuk membandingkan produksi zat warna merah dari sumber karbon yang berbeda. Pembentukan zat warna ekstrasel dan intrasel selama 168 jam waktu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4. Perbedaan zat warna ekstrasel dan intrasel dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6.

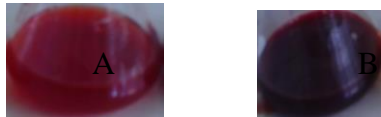
Untuk hasil produksi zat warna merah dari semua media percobaan dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 4 Produksi zat warna merah *Monascus purpureus* galur induk dari media cair YMP yang menggunakan sumber karbon berbeda



Gambar 5 Zat warna ekstrasel dari media percobaan (A) Media cair YMP dengan fruktosa 2% b/v (B) Media cair YMP dengan maltosa 2% b/v



Gambar 6 Zat warna intrasel dari media percobaan (A) Media cair YMP dengan fruktosa 2% b/v (B) Media cair YMP dengan maltosa 2% b/v

Media Percobaan	Produksi zat warna merah ekstrasel (U.L/g)	Produksi zat warna merah intrasel (U.L/g)	Produksi zat warna merah total (U.L/g)
A	4,5	5,2	9,7
B	2,5	0,2	2,7
C	2,0	0,2	2,2
D	5,20	6,32	11,52
E	5,28	6,28	11,56

Tabel 2 Produksi Zat Warna Merah dari Semua Media Percobaan

Pada media percobaan D dan E diperoleh produksi zat warna merah sebesar 11,5 dan 11,6 U.L/g. Dari hasil ini terlihat bahwa media YMP cair dengan sumber karbon maltosa 2%b/v menghasilkan produksi zat warna merah tertinggi dibandingkan dengan yang menggunakan fruktosa dan glukosa sebagai sumber karbon. Media Fermentasi cair untuk kapang *Monascus sp* yang menggunakan fruktosa sebagai sumber karbon merupakan media yang paling cocok untuk pertumbuhan spora dan untuk produksi warna, dibandingkan glukosa dan disusul dengan glukosa dan maltosa. (Y.Y.Tseng, 2000). Walaupun demikian, glukosa masih dijadikan sebagai sumber

karbon yang paling sering digunakan untuk melihat produksi warna *Monascus purpureus*. (Hamano, et.al.,2006).

Monascus purpureus galur mutan (ITBCC-HD-F002) ini merupakan hasil mutasi dari galur induk (ITBCC-HD-F002). Mutasi dilakukan dengan etil metana sulfonat. Hasil dari mutasi tersebut menghasilkan mutan albino. Pada galur mutan ini produksi zat warna merah tidak terbentuk. (Deden, 2004). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa warna mutan albino rata-rata bertahan 6-7 hari pada media YMP cair. Pada media yang menggunakan sumber karbon glukosa menyebabkan mutan tidak stabil karena terjadinya pemulihan mutan sehingga menjadi berwarna merah-ungu mendekati warna merah induknya. Mutan yang mengalami kerusakan parah pada mitokondria hanya dapat menggunakan glukosa sebagai sumber karbon karena glukosa masih memungkinkan menghasilkan ATP melalui siklus glikolisis walaupun energi yang dihasilkan relatif sedikit. (Deden, 2004).

Ketika media dipindahkan ke media YMP padat, dimana kandungan nutrisi banyak, terjadi pertumbuhan yang signifikan. Hal ini dikarenakan terjadi pemulihan nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan kapang *Monascus purpureus*.

KESIMPULAN

Media fermentasi cair dengan menggunakan sumber karbohidrat glukosa, fruktosa, dan maltosa mempunyai pengaruh yang berbeda terhadap pembentukan metabolit sekunder zat warna merah dan mikotoksin *Monascus purpureus*. Media cair YMP dengan maltosa 2% b/v menghasilkan zat warna terbanyak yaitu sebesar 11,6 UL/g.

DAFTAR PUSTAKA

- Anna Poedjiadi (1994), *Dasar Dasar Biokimia*, Universitas Indonesia, Jakarta, 8-50
- Babitha. S, Soccol, C. R, Pandey. A (2007), Effect of Stress on Growth, Pigment Production and Morphology of *Monascus* sp. in Solid Cultures, *Journal of Basic Microbiology*, 47, 118–126
- Blanc, P.J., M.O. Loret, A. L. Santerre, A. Pareilleux, D. Prome, J.P. Lussac, and G. Goma (1994), Pigments of *Monascus*, *J Food Sci*, 59 (4), 862-865
- Blanc, P.J, M.O. Lore and G. Goma (1995), Production of Citrinin by Various Species of *Monascus*, *Biotech.Let.*, 17(7), 291-294
- Blanc, P.J., Loret, M.O and G. Goma (1998), Pigments and Citrinin Production During Cultures of *Monascus* in Liquid and Solid Media, *Advanced in Solid State Fermentation*, Departement Genie Biochimique et Alimentaire, France, 393-399.
- Cesar de Carvalho. J, Oishi .B.O (2005), Pandey.A and Soccol .C.R, Biopigments from *Monascus*: Strains Selection, Citrinin Production and Color Stability, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol 48, 885-894
- Chen M., a. J (1993). Effect of pH and Nitrogen Source on Pigment Production by *Monascus purpureus*. *Appl. Microbiol Biotechnol* , 132-138.
- Deden Indra Dinata (2004), *Mutasi Kapang Monascus sp Dengan Etil Metana Sulfonat dan Analisis Kadar Sitrinin Hasil Fermentasi Cair Galur Induk dan Mutannya*, Tesis Farmasi, ITB Bandung, 30.
- Dufosse L (2006), Microbial Production of Food Grade Pigments, *Food Technol Biotechnol*, 44 (3), 313-321
- Edrogrul.O (2004), Azirax.S, Review of The Studies on The Red Yeast Rice (*Monascus purpureus*), *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, Vol 2, 37-49
- Garder, E.J (1991), *Principles of Genetics*, 8th ed., John Willey and Sons Inc., Ottawa, 288-318
- Gunasekaran. S, Poorniammal. R (2008), Optimization of Fermentation Conditions for Red Pigment Production from *Penicillium* sp. Under submerged Cultivation, *African Journal of Biotechnology* , Vol. 7 (12), 1894-1898
- Hajjaj, H., A. Kläbe, M.O. Loret, G. Goma, P.J. Blanc, and J. Francois (1999), Biosynthesis Pathway of Citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 65 (1), 311-314
- Hamano.P.S, Orozco.S.F.B and Kilikian. B.V (2005), Concentration Determination of Extracellular and Intracellular Red Pigments Produced by *Monascus* sp, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol 48., 43-49
- Hamano. P.S, and Kilikian. B.V (2006), Production Of Red Pigments By *Monascus ruber* In Culture Media Containing Corn Steep Liquor, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 23, No. 04, 443 – 449
- Lin Y.L, Wang, T. H, Lee, M. H (2008), Biologically Active Components and Nutraceuticals in The *Monascus* Fermented Rice : A Review, *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 965-973
- Martinkova.L, Juslova.P, Vesely.D (1995), Biological Activity of Polyketida Pigments Produced by The Fungus *Monascus*, *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 609-616
- Omanor. I.B,Eziashi, E.I, and Adekunle, A.A (2008), Carbon nutrition in relation to growth of three *Monascus* species isolated from decaying date fruits, *African Journal of Microbiology Research*. Vol.(2), 153-155
- Orozco Bilbao, F. S, Kilikian, V. B (2008), Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802, *World J Microbiol Biotechnol* , 24,263–268
- Pattanagul.P, Pinthong.R, Phianmongkhol. A, Leksawadi. N (2007), Review of Angkak Production (*Monascus purpureus*), *Chiang Mai J. Sci*, 34(3) : 319-328
- Pereira. D.G, Tonso. A and Kilikian, B.V (2008), Effect of Dissolved Oxygen Concentration On Red Pigment and Citrinin Production *Monascus purpureus* ATCC 36928, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 25 (02), 247 - 253
- Prince, I and D Tribe (1990). Fermentation Technology, *ASEAN-Australian Biotechnology Project*, Bangkok, 2.2-2.5, 3.2, 3.15.
- Tiana Milanda (2007), *Sistem Transformasi Genetik Yang Efisien Untuk Kapang Monascus purpureus ITBCC-HD-F001*, Desertasi Farmasi, ITB Bandung.

Y.Y. Tseng, M. C. Growth (2000), Pigment Production and Protease activity of *Monascus purpureus* as Affected by Salt, Sodium Nitrite, Polyphosphate, and Various Sugar . *Journal of Applied Microbiology* , 88, 31-37.