

PRODUKSI PIGMEN OLEH ISOLAT KAPANG HASIL ISOLASI DARI ANGKAK KOMERSIAL DI SEMARANG PADA SUMBER N DAN pH BERBEDA

Soni Nugraha Anwar, Endang Kusdiyantini dan Arina Tri Lunggani

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Tembalang, Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Abstract

The development of the food processing industry led to the use of dyes have also increased, especially the type of synthetic dyes that can be harmful to consumers because of its toxicity. Natural dyes to be one of the alternatives used in the field of food. One of the natural dyes is widely used as a food coloring that is red yeast rice. Red yeast rice is rice that is overgrown by the mold *Monascus* sp. that produces pigment. This study aims to obtain pure isolates of red yeast rice molds that are in Semarang and knowing the growth and production of red pigment in the fungi isolates the different source of N and pH. The treatment is done by growing PDB (potato dextrose broth) in the medium with treatment medium pH 3,5,7 and 9 as well as optimization of the nitrogen source Ammonium chloride 1 %, Ammonium Nitrate 1 %, and Peptone 1 %. Analysis of pigments using a spectrophotometer with a wavelength () of 500 nm and analysis of dry cell weight mycelia (g/l). The results showed the highest pigment concentration at treatment pH 7 with 0.812 absorbance value and the highest value of the cell dry weight at pH 7 is 1.232 g/l. Results of optimization with different nitrogen sources showed the highest pigment levels in the addition of a nitrogen source Ammonium Chloride 1 % to the value of 0.821 absorbance and dry weight of most cells are in Ammonium Nitrate is 2.556 g/l.

Keywords: Pigment, Angkak, Isolate Fungus, pH, Nitrogen.

Abstrak

Berkembangnya industri pengolahan pangan menyebabkan penggunaan pewarna juga semakin meningkat, terutama jenis pewarna sintetik yang dapat membahayakan konsumen karena toksisitasnya. Zat pewarna alami menjadi salah satu alternatif yang digunakan dalam bidang pangan. Salah satu pewarna alami yang banyak dimanfaatkan sebagai pewarna makanan yaitu angkak. Angkak adalah beras yang ditumbuhi oleh kapang *Monascus* sp. yang menghasilkan pigmen. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat murni serta mengetahui pertumbuhan dan produksi pigmen merah isolat kapang optimal pada sumber N dan pH yang berbeda dari angkak yang berada di Semarang. Perlakuan dilakukan dengan menumbuhkan pada medium PDB (potato dextrose broth) dengan perlakuan pH medium 3, 5, 7 dan 9 serta optimasi dengan sumber nitrogen Amonium Klorid 1%, Amonium Nitrat 1%, dan Pepton 1%. Analisis pigmen dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang () 500 nm serta analisis berat kering sel miselia (g/l). Hasil penelitian menunjukkan kadar pigmen tertinggi yaitu pada perlakuan pH 7 dengan nilai absorbansi 0,812 dan nilai berat kering sel tertinggi pada pH 7 yaitu 1,232 g/l. Hasil optimasi dengan sumber nitrogen berbeda menunjukkan kadar pigmen tertinggi yaitu pada penambahan sumber nitrogen Amonium klorid 1% dengan nilai absorbansi sebesar 0,821 dan berat kering sel terbesar yaitu pada Amonium Nitrat yaitu 2,556 g/l.

Keywords: Pigmen, Angkak, Isolat Kapang, pH, Nitrogen

Pendahuluan

Berkembangnya industri pengolahan pangan menyebabkan penggunaan pewarna juga semakin meningkat, terutama jenis pewarna sintetik. Pewarna sintetik mudah diperoleh di pasaran dalam banyak pilihan, tetapi hanya sedikit yang diijinkan untuk digunakan sebagai pewarna makanan dan minuman. Hal ini dikarenakan toksisitasnya yang tinggi sehingga membahayakan kesehatan, oleh karena itu zat pewarna alami menjadi salah satu alternatif yang digunakan dalam bidang pangan.

Salah satu pewarna alami yang banyak dimanfaatkan sebagai pewarna makanan yaitu angkak. Angkak adalah produk metabolisme sekunder dari kapang *Monascus* sp. Keuntungan penggunaan angkak antara lain, tidak mengandung racun dan tidak karsinogenik. Angkak telah lama digunakan sebagai pewarna makanan di negara-negara Asia seperti China, Indonesia, Jepang dan Filipina. Umumnya angkak digunakan untuk mewarnai berbagai produk makanan seperti produk ikan, keju, kedelai, piket sayuran, daging asin, anggur dan minuman beralkohol lainnya (Shi et al., 2011).

Angkak yang merupakan produk fermentasi dari *Monascus* sp. pada beras, dalam sejarah farmakologi Cina digunakan sebagai pengobatan yang efektif untuk meningkatkan kinerja pencernaan dan metabolisme darah (Compoy et al., 2006; Liu et al., 2005). Hasil olahan pangan beras angkak merah ini telah banyak dikonsumsi di Asia. Di Indonesia, produk angkak sudah banyak dikonsumsi sebagai menu diet dan makanan pelengkap (Rindiastuti, 2008). Galur-galur yang mampu memproduksi pigmen angkak diantaranya *M. purpureus*, *M. rubropunctatus*, *M. rubiginosus*, *M. anka*, *M. major*, dan *M. bakeri*. Galur-galur tersebut yang paling umum

digunakan untuk produksi angkak adalah *M. purpureus* (Carels & Shepherd, 2001).

M. purpureus adalah kapang yang banyak ditemukan di alam dan umumnya ditemukan di produk makanan (Mortensen, 2006). *M. purpureus* ini biasa dikulturkan dan mampu tumbuh membentuk koloni pada butir beras. *M. purpureus*, mampu menghasilkan beberapa metabolit lain berupa pigmen yang berguna bagi manusia (Chiu et al., 2006; Lee et al., 2006).

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya antara lain karbon, nitrogen, vitamin, mineral dan faktor lingkungan seperti pH, oksigen, kelembaban dan suhu (Timotius 2004). Pigmen *M. purpureus* dihasilkan oleh *monascus* saat salah satu unsur habis, biasanya nitrogen atau fosfor dan pada tahap idiofase. Sumber nitrogen yang dipakai dapat menentukan pigmen yang dihasilkan (Lin et al., 2008). Stabilitas pigmen angkak dipengaruhi juga keadaan asam dan basa (pH) dengan rentang keasaman bagi produksi pigmen *Monascus* sp. adalah 3 sampai 9 (Chiu et al., 2006).

Materi dan Metode

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Media PDA (Potato Dextruse Agar), PDB (Potato dextruse Broth), Pepton, Amonium klorid (NH_4Cl), Amonium Nitrat (NH_4NO_3), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, angkak komersil diambil dari toko Gelael di Semarang, NaOH 1M, HCL 1M dan aquadest.

Metode Penelitian

a. Isolasi Kapang.

Angkak komersial diperoleh dari toko Gelael di Semarang. Penelitian ini menggunakan cawan petri yang berisi media PDA (Potato

Dextrose Agar), masing-masing petri ditanam 4 butir beras, selanjutnya di inkubasi pada inkubator dengan suhu 30°C selama 7 hari (Lee et al., 2010).

b. Identifikasi dan purifikasi isolat kapang.

Identifikasi isolat kapang dilakukan pada akhir inkubasi selama 7 hari pada cawan petri dengan media PDA. Pengamatan dilakukan secara mikroskopis dan makroskopis. Secara mikroskopis yaitu Pengamatan terhadap bentuk aleurokonidia, hifa, dan kleistotesia. Pengamatan secara makroskopis dengan melihat secara langsung warna miselia dan bentuk koloni (Lee et al., 2010).

Isolat kapang yang terpilih diinkubasi selama 7 hari kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media PDA kemudian disimpan sebagai stok untuk penelitian selanjutnya.

c. Inokulum

Medium PDA pada cawan petri dipersiapkan, kemudian diinokulasi dengan biakan isolat kapang setelah itu diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Akhir inkubasi, spora diambil dengan ose bulat dan dipindahkan kedalam tabung reaksi yang berisi aquades steril untuk dijadikan suspensi spora. Jumlah spora dihitung dengan menggunakan haemositometer dan suspensi spora dengan kepadatan 10^7 /ml spora untuk inokulum

d. Pertumbuhan Isolat Kapang pada media pH berbeda

Inokulum sebanyak 1 ml suspensi spora dengan kepadatan 10^7 /ml spora isolat kapang diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi sebanyak 150 ml media PDB dengan perlakuan pH yang berbeda. Kemudian kultur diinkubasi menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 14 hari

suhu ruang. Perlakuan tersebut diulang sebanyak 3 kali. Analisis pigmen ekstraseluler dan berat kering sel dilakukan setiap 2 hari sampai akhir inkubasi.

e. Pertumbuhan pada media dengan sumber N yang berbeda

Inokulum sebanyak 1 ml dengan kepadatan 10^7 /ml spora isolat kapang diinokulasikan ke dalam berbagai media cair dengan sumber N yang berbeda. Media cair yang digunakan yaitu media PDB dengan penambahan Amonium klorid (NH_4Cl) 1%, Amonium Nitrat (NH_4NO_3) 1%, Pepton 1% dan pH optimal yang didapat dari penelitian sebelumnya. Masing-masing media dengan volume 150 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, selanjutnya diinkubasi menggunakan rotary shaker suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm selama 14 hari (Ahmad et al., 2009). Perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Analisa berat kering sel dan pigmen dilakukan pada akhir inkubasi.

f. Analisis Pigmen Ekstraseluler

Kultur isolat kapang yang telah diinkubasi selama 14 hari disaring dengan kertas saring Whatman no 1. dan dicuci dengan aquadest sebanyak 2 kali. Supernatan hasil penyaringan miselia disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm, kemudian diukur nilai arbsorbansinya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Produksi pigmen dinyatakan dalam nilai absorbansi dikalikan dengan faktor pengenceran (Lin and Demain, 1995)

g. Analisis Data

Pengolahan data menggunakan SPSS 17.0 dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktor tunggal yaitu pH (3, 5, 7, dan 9), kemudian dilanjutkan perlakuan sumber Nitrogen Amonium klorid (NH_4Cl), Amonium Nitrat (NH_4NO_3), dan Pepton

masing-masing 3 ulangan. Sebagai variabel bebas adalah pH dan sumber nitrogen dengan variabel tergantung yaitu produksi pigmen merah dan berat kering sel.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan Pengamatan Morfologi
Isolat dari Angkak komersial di Semarang.

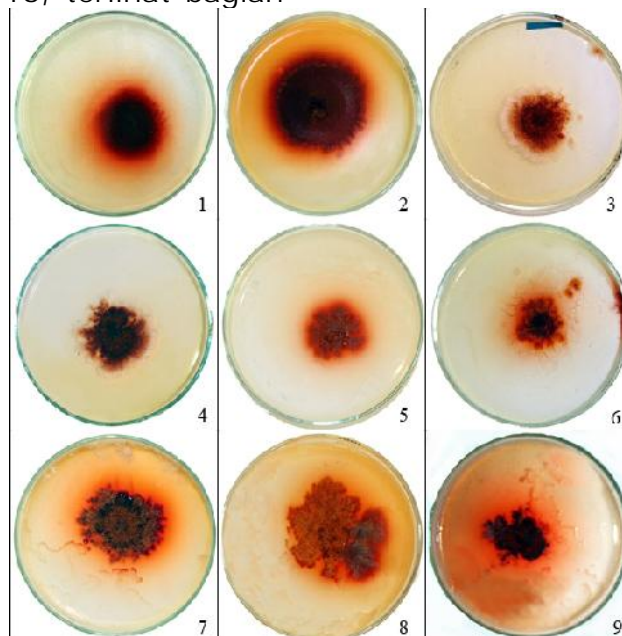
Hasil isolasi mendapatkan dari 44 butir beras dengan menggunakan PDA sebagai media isolasi kapang, didapatkan hasil 9 isolat yaitu isolat 8, 16, 26, 27, 28, 33, 34, 35 dan 36 (Gambar 1).

Berdasarkan pengamatan makroskopis pada hari ke 14 terlihat isolat 16 menghasilkan warna pigmen ekstraseluler lebih merah dibanding isolat lainnya sehingga, isolat yang digunakan untuk perlakuan selanjutnya yaitu isolat 16

Hasil pengamatan secara mikroskopis isolat 16, terlihat bagian

aleurokonidia berbentuk oval, klestotesia, askospora, askokarp berbentuk bulat dengan diameter 20 μm dan hifa bersepta.

Menurut Ungureanu (2012) pengamatan kapang *Monascus* sp. secara mikroskopis menunjukkan adanya hifa bersepta, dengan dinding hialin yang berdiameter 3-5 μm . Hifa seksual dengan askospora, ditutup oleh askokarp dan hifa aseksual dengan konidiospora. Askokarp berbentuk bulat dengan diameter 20-70 μm , bentuk askospora kekuningan, berbentuk oval - elips dan memiliki dinding hialin 5-6 x 3-4 μm . Reproduksi aseksual yang berkonidiospora rantai. Konidiospora secara umumnya berdinding tipis dan memiliki fungsi lain sebagai khlamidospora pada saat dinding konidiospora menjadi tebal.



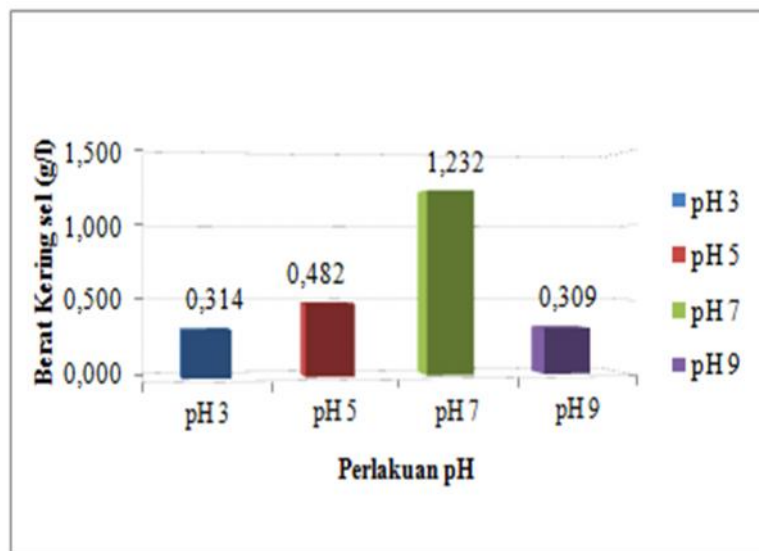
Gambar 1. Isolat kapang hasil isolasi dari angkak komersial di Semarang (1) Isolat 8; (2) Isolat 16; (3) Isolat 26; (4) Isolat 27; (5) Isolat 28; (6) Isolat 33; (7) Isolat 34; (8) Isolat 35 dan (9) Isolat 36

Pertumbuhan dan Pigmen Isolat 16 pada Ph Media yang Berbeda

a. Berat kering sel isolat 16 pada perlakuan pH berbeda.

Nilai rata-rata berat kering pada perlakuan pH terbesar pada perlakuan pH 7 yaitu sebesar 1,232 g/l, sedangkan pada pH 3 dan pH 5 memiliki nilai rata-rata berat kering sel 0,482 g/l dan 0,314 g/l. Nilai rata-rata berat kering sel terendah yaitu

pada pH 9 yaitu 0,309 g/l. Kaur et al., (2009) menyatakan bahwa kondisi optimal untuk pertumbuhan *Monascus* yaitu pH 5,5 – 7, namun pada pH terlalu asam (pH di bawah 4) atau basa (pH di atas 8) mengakibatkan kondisi lingkungan yang tidak sesuai sehingga tidak terjadi pertumbuhan sel. Rata-rata berat kering sel pada pH berbeda ditunjukkan pada (Gambar 2).



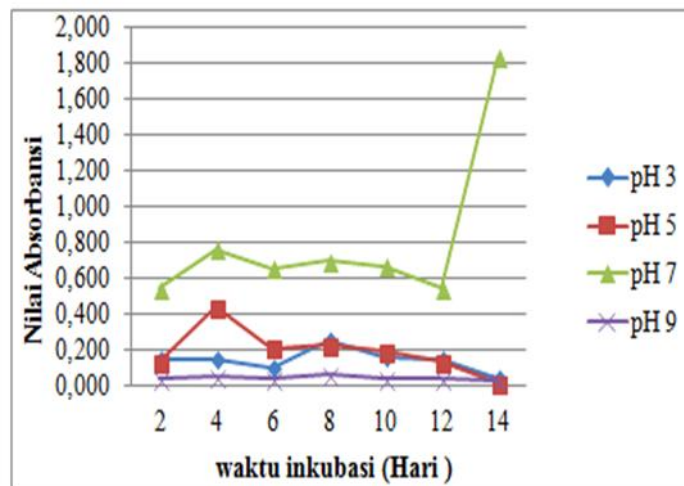
Gambar 2. Nilai rata-rata berat kering sel isolat 16 pada perlakuan pH berbeda

Hasil analisis ragam ($p < 0,05$) perbedaan pH tidak berpengaruh terhadap produksi berat kering sel isolat 16, sehingga tidak dilanjutkan dengan uji lanjut bonferroni. Berdasarkan uji kolerasi pada perlakuan pH menunjukkan bahwa kadar rata-rata pigmen berkolerasi secara nyata dengan rata-rata berat kering sel.

b. Produksi pigmen merah isolat 16 pada perlakuan pH berbeda.

Produksi pigmen merah tertinggi pada perlakuan pH 7 dengan

nilai absorbansi tertinggi pada hari ke 14 yaitu 1,829 dan selanjutnya produksi pigmen menurun berturut-turut pada perlakuan pH 5 dengan produksi pigmen merah tertinggi pada hari ke 4 dengan nilai absorbansi 0,541. Perlakuan pH 3 produksi pigmen tertinggi yaitu pada hari ke 8 dengan nilai absorbansi 0,254 dan yang terendah produksi pigmen merah yaitu pada perlakuan pH 9 dengan nilai absorbansi tertinggi pada hari ke 8 yaitu 0,062 (Gambar 3).

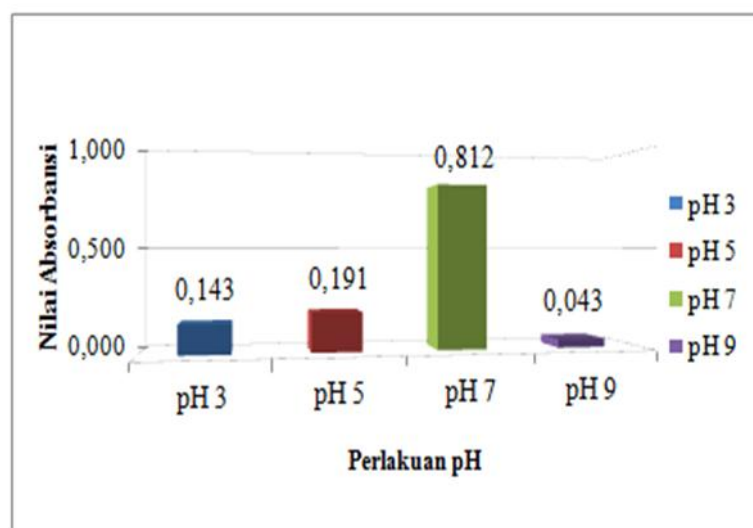


Gambar 3. Produksi pigmen merah. isolat 16 pada pH berbeda

Menurut Dikshit & Tallapragada (2011) pada pH asam mempengaruhi fisiologi, perkembangan konidia, dan sintesis pigmen merah, kisaran pH 3-5 ditemukan meningkatnya produksi konidia namun pigmen merah menunjukkan penurunan.

Hasil analisis ragam ($p < 0,05$) perbedaan pH berpengaruh nyata terhadap produksi pigmen merah isolat 16. Nilai rata-rata produksi

pigmen merah terbesar pada perlakuan pH 7 (pH netral) yaitu 0,812 sedangkan pada pH 3 dan pH 5 (pH asam) memiliki nilai rata-rata produksi pigmen merah yaitu 0,143 dan 0,191. Nilai rata-rata produksi pigmen merah terendah yaitu pada pH 9 yaitu 0,043. Nilai rata-rata produksi pigmen merah tampak pada Gambar 4.



Gambar 4. Nilai rata-rata produksi pigmen merah. isolat 16 pada pH berbeda

Optimasi Pertumbuhan dan Pigmen Isolat 16

- Berat kering sel pada perlakuan Sumber N berbeda

Nilai rata-rata berat kering sel pada perlakuan sumber nitrogen berbeda, nilai rata-rata berat kering sel terbesar pada perlakuan Amonium Nitrat (NH_4NO_3) yaitu sebesar 2,556

g/l sedangkan pada Amonium Klorid (NH_4Cl) memiliki nilai rata-rata berat kering sel 1,004 g/l. Nilai rata-rata berat kering sel terendah yaitu pada perlakuan pepton yaitu sebesar 0,300 g/l (Gambar 5).

Hasil analisis ragam ($P < 0,05$) Sumber N yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap berat kering sel isolat 16. Berdasarkan uji kolerasi pada perlakuan sumber nitrogen yang berbeda-beda kadar rata-rata pigmen tidak berkolerasi secara nyata dengan rata-rata berat kering sel.

Penambahan 1% sumber Nitrogen anorganik seperti Amonium Nitrat (NH_4NO_3) membantu pertumbuhan *Monascus* dan produksi pigmen selebihnya dimanfaatkan untuk suplemen pada fermentasi *Monascus* (Babitha et al., 2007).

- b. Produksi pigmen merah isolat 16 pada perlakuan Sumber N berbeda.

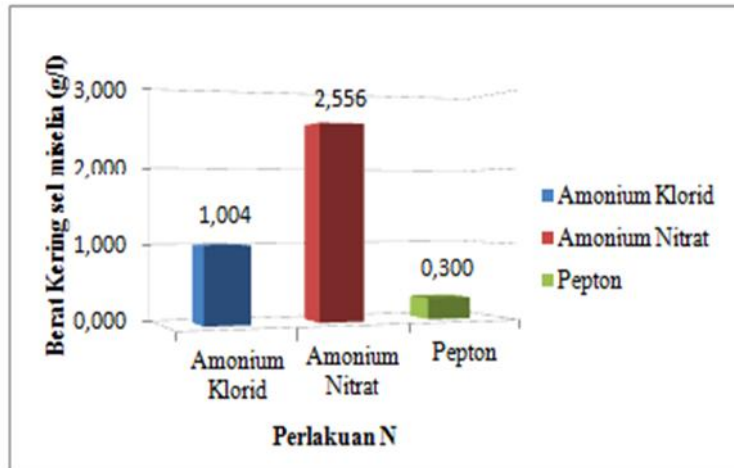
Produksi pigmen merah tertinggi pada perlakuan Amonium Klorid (NH_4Cl) dengan nilai absorbansi tertinggi pada hari ke 8 yaitu 1,236 dan selanjutnya produksi pigmen menurun berturut-turut pada perlakuan Amonium Nitrat (NH_4NO_3) dengan produksi pigmen merah tertinggi pada hari ke 6 dengan nilai absorbansi 0,749. produksi pigmen terendah dibandingkan kedua sumber nitrogen lainnya yaitu pada perlakuan pepton hari ke 4 dengan nilai absorbansi 0,689 (Gambar 6).

Menurut Irdawati (2010) Kadar pigmen merah semakin tinggi dengan semakin lamanya fermentasi,

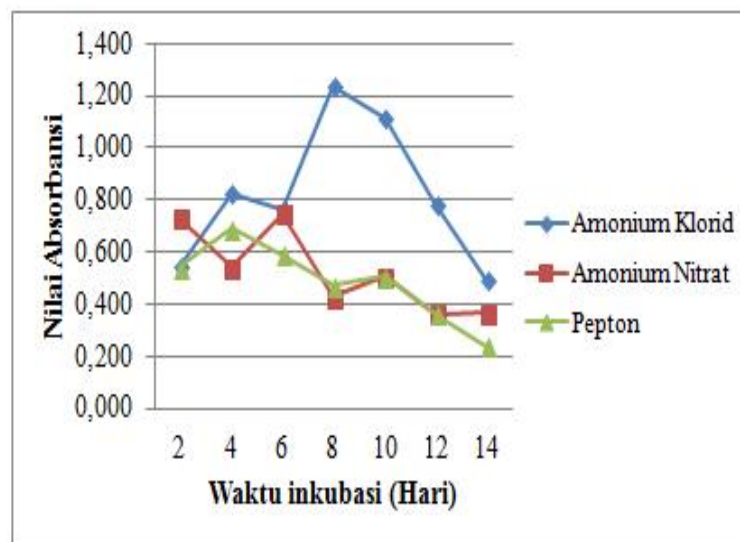
selanjutnya mengalami penurunan atau stabil. Salah satu faktor lainnya yang mengakibatkan penurunan nilai absorbansi produksi pigmen yaitu jumlah nutrisi bagi *Monascus* sudah habis sehingga terjadi perubahan struktur pigmen dan penurunan produksi pigmen intraseluler maupun ekstraseluler.

Nilai rata-rata absorbansi produksi pigmen merah isolat 16 terbesar pada perlakuan Amonium klorid yaitu 0,821, sedangkan pada perlakuan Amonium nitrat rata-rata absorbansi produksi pigmen merah dengan nilai absorbansinya sebesar 0,525. Nilai rata-rata produksi pigmen merah terendah yaitu pada perlakuan pepton dengan nilai absorbansi sebesar 0,486. Hasil analisis ragam ($p < 0,05$) perbedaan sumber nitrogen berpengaruh sangat nyata terhadap produksi pigmen merah isolat 16. Menurut Timotius (2004) jenis sumber nitrogen yang digunakan mempengaruhi pertumbuhan dan produksi pigmen. sumber nitrogen anorganik yang dapat digunakan antara lain NH_4Cl , NaNO_3 , dan NH_4NO_3 . NaNO_3 dan NH_4NO_3 tidak dapat mendukung produksi pigmen dengan baik. NH_4NO_3 menghambat produksi pigmen. Sumber nitrogen yang paling baik adalah NH_4Cl karena dapat meningkatkan sel dan pembentukan pigmen orange kekuningan.

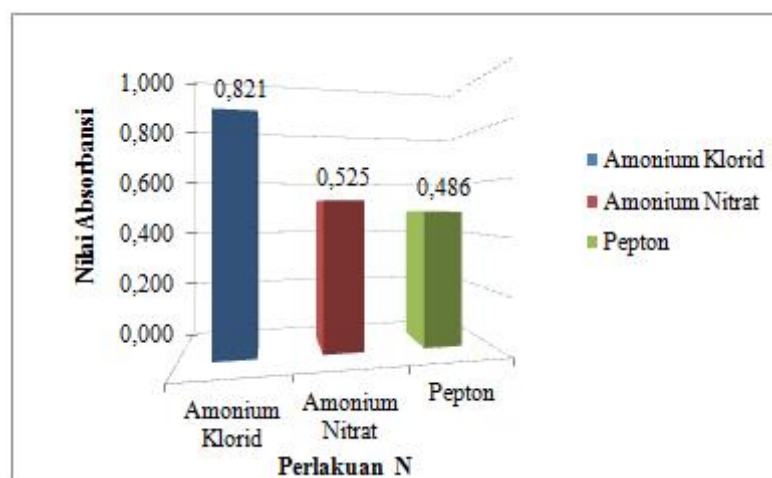
Hasil rata-rata produksi pigmen merah dengan perlakuan sumber nitrogen yang berbeda yaitu Amonium Klorid (NH_4Cl), Amonium Nitrat (NH_4NO_3) dan pepton dapat dilihat pada (Gambar 7).



Gambar 5. Nilai rata-rata berat kering sel isolat 16 pada perlakuan sumber N berbeda



Gambar 6. Produksi pigmen merah 16 pada sumber N berbeda



Gambar 7. Nilai rata-rata produksi pigmen merah isolat 16 pada perlakuan sumber N berbeda

Kesimpulan

Simpulan penelitian ini sebagai berikut:

1. Hasil isolasi kapang diperoleh 9 isolat, dan 1 isolat yang menunjukkan koloni paling merah yaitu isolat no 16.
2. Pertumbuhan isolat 16 optimal pada medium dengan pH 7 dan sumber N Amonium Nitrat, sedangkan produksi pigmen optimal pada medium pH 7 dan sumber N Amonium Klorid.

Daftar Pustaka

- Ahmad, M. M., Nomani, M. S. and Panda, B.P. 2009. Screening of Nutrient parameters for Red Pigment Production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under Submerged Fermentation using Plackett Burman Design. *Chiang Mai Journal of Science* 36(1): 104-109.
- Babitha, S., Soccol, C.R. and Pandey, A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology* 98: 1554-1560.
- Carels, M. and Shepherd, D. 2001. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged shaken culture. *Can. Journal of Microbiology* 23: 1360-1372.
- Chiu, C.H, Ni, K.H., Guu, Y.K. and Pan, T.M. 2006. Production of red mold rice using a modified Nagata type Koji marker. *Applied Microbiology and biotechnology* 73(2): 297-304.
- Compoy, S., Rumbero, A., Martin, J.F. and Liras, P. 2006. Characterization of a hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 70(11): 488-496.
- Dikshit, R and Tallapragada, P. 2011. *Monascus purpureus* A potential source for natural pigment production. *Journal of microbiology and biotechnology*. 1 (4): 164-174.
- Irdawati. 2010. Pengaruh Jumlah Starter dan Waktu Fermentasi Terhadap Pigmen yang dihasilkan oleh *Monascus purpureus* pada limbah ubi kayu (*Manihot utilissima*). *Jurnal Biologi FMIPA Universitas Padang* 1(11): 19-24.
- Kaur B, Chakraborty D and Kaur H. 2009. Production and evaluation of physicochemical properties of red pigment from *Monascus purpureus* MTCC 410. *The Internet Journal of Microbiology* 7(1)
- Lee, C. H., Lee, C. L. and Pan, T.M. 2010. A 90-D toxicity study of *Monascus* fermented products including high citrinin level. *Journal of Science Food and Agricultural* 75 (2): 91-97.
- Lee, C. L., Wong, J. J., Kuo, S. L. and Pan, T. M. 2006. *Monascus* fermentation of *dioscorea* for increasing the production of cholesterol-lowering agents-monacolin K and

- antiinflammation agent-
monascin. Applied
Microbiology and
Biotechnology 72(6): 1254-
1262.
- Lin, T.F. and Demain, A.L. 1995.
Negative effect of ammonium
nitrate as nitrogen source on
the production of water-
soluble red pigments by
Monascus sp. Applied
Microbiology and
Biotechnology 43: 701-705.
- Lin, W.Y., Chang, J.Y., Hish, C. H. and
Pan, T. M. 2008. Profiling the
Monascus pilosus proteome
during nitrogen limitation.
Journal of Agricultural and Food
Chemistry 48(3): 5220-5225.
- Liu, B. H., Wu, T. S., Su, M. C.,
Chung, C. P., and Yu, F. Y.
2005. Monascus purpureus
using liquid media. Journal of
Agricultural and Food
Chemistry 53(2): 170-175.
- Shi, Y.C. and Pan, T.M. 2011.
Beneficial effects of Monascus
purpureus NTU 568-fermented
products. Applied Microbiology
Biotechnology 90(1): 1207–
1217.
- Timotius, K. H. 2004. Produksi pigmen
angkak oleh Monascus. Jurnal
Teknologi Dan Industri Pangan
15(1).
- Ungureanu, C. 2012. Antibacterial and
antifungal activity of red rice
obtained from Monascus
purpureus. Journal of
biopharmacy 48(1): 885-894