

IDENTIFIKASI ISOLAT *MONASCUS* SP. HASIL ISOLASI ANGKAK BERDASARKAN GEN INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) DAN PENGUKURAN KANDUNGAN PIGMEN

Mia Tri Wardani¹, Endang Kusdiyantini¹, Anto Budiharjo¹

¹Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690
email : carolinemiaa10@gmail.com

Abstract

The Identification of Monascus based on their morphological characteristic, this methods is very problematic due to several specimens share similarity on morphology and colours. Nowadays, the identification of molecular based organisms has been done to complement morphological identification, for example mold identification using the Internal Transcribed Spacer (ITS) gene. The objectives of study were to identify of Monascus isolates the result of angkak isolation using Internal Transcribed Spacer (ITS) gene, phylogenetic analyzing, determination cell growth and determination of production pigment content. Sequences of ITS Monascus were amplified using PCR and the molecular phylogenetic analyses was using Neighbor Joining (NJ) method. Based on homology search by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program and phylogenetic tree analyses, mold of isolates were identified as the Monascus purpureus (100%). The amplified DNA fragments were about 553 bp. Determination of Monascus mold cell growth were carried out by the method of dry weight cell. Determination of pigment by using spectrophotometer at 390 nm wavelength for yellow pigment and 500 nm for red pigment. The result of determination of Monascus mold pigment content show that have increased during fermentation time until day 13. The amount of yellow extracellular pigment production is 37.358 U / g; While the red color pigment of 2.6545 U / g. The amount of red intracellular pigment production is 7.4175 U / g, while the yellow pigment is 30.176 U / g.

Keywords: Monascus, angkak, molecular phylogenetic, pigment

Abstrak

Identifikasi kapang *Monascus* hanya berdasarkan karakter morfologi sangat rentan terhadap kesalahan identifikasi, karena persamaan bentuk dan warna. Dewasa ini, identifikasi organisme berdasarkan molekuler telah dilakukan untuk melengkapi identifikasi secara morfologi, misalnya identifikasi kapang menggunakan gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Tujuan dari penelitian ini yaitu mengidentifikasi isolat kapang *Monascus* yang diisolasi dari angkak dengan menggunakan gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS), melakukan analisis hubungan kekerabatan, melakukan pengukuran pertumbuhan sel dan produksi kandungan pigmen. Sekuens ITS *Monascus* diamplifikasi menggunakan PCR dan analisis filogenetik molekuler menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ). Berdasarkan persamaan homologi melalui metode *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan analisis pohon filogenetik, isolat kapang teridentifikasi sebagai *Monascus purpureus* sebesar 100%. Fragmen hasil amplifikasi DNA sebesar 553 bp. Pengukuran pertumbuhan sel kapang *Monascus* dilakukan berat kering sel. Pengukuran pigmen dilakukan menggunakan *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 390 nm untuk pigmen kuning dan 500 nm untuk pigmen merah. Hasil pengukuran kandungan pigmen kapang *Monascus* menunjukkan nilai yang mengalami peningkatan selama waktu fermentasi hingga hari ke-13. Jumlah produksi pigmen ekstraseluler warna kuning sebesar 37,358 U/g; sedangkan pigmen warna merah sebesar 2,6545 U/g. Jumlah

produksi pigmen intraseluler warna merah sebesar 7,4175 U/g, sedangkan pigmen warna kuning 30,176 U/g.

Kata kunci: Monascus, angkak, ITS, filogenetik molekuler, pigmen

PENDAHULUAN

Monascus sp. adalah kapang yang tergolong dalam famili Monascaceae dari filum Ascomycota. *Monascus* memiliki lebih dari 20 spesies yang telah diakui secara internasional, diantaranya meliputi: *M. pilosus*; *M. ruber*; *M. purpureus*; *M. floridanus*; *M. eremophilus*; *M. pallens*; *M. sanguineus*; *M. lunisporas*; dan *M. Argentinensis*. Jamur *Monascus* di Asia telah lama digunakan sebagai pewarna dan perasa makanan. Pigmen merah *Monascus* aman digunakan sebagai pewarna makanan dalam industri. Pigmen *Monascus* telah banyak digunakan di China Selatan, Jepang, dan berbagai negara di Asia Tenggara terutama untuk membuat anggur beras merah, keju kedelai merah, dan anka (beras merah). Pigmen *Monascus* umumnya mengandung 6 pigmen azaphilone utama, meliputi pigmen kuning: monascin ($C_{21}H_{26}O_5$), ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$); pigmen oranye: monascorubrin ($C_{23}H_{26}O_5$), rubropunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$); dan pigmen merah: monascorubramine ($C_{23}H_{27}NO_4$), rubropuntamine ($C_{21}H_2O_4$). *Monascus* diketahui juga dapat memproduksi citrinin mikotoksin seperti monascopiridin yang baik sebagai metabolit toksik (Rashmi, 2013).

Pigmen alami berwarna merah merupakan hasil metabolit sekunder dari kapang *Monascus* yang mulai terbentuk pada fase pertumbuhan lambat dan semakin meningkat pada fase pertumbuhan stasioner (Roosheroe, 2014). Pigmen *Monascus* berasal dari kelompok metabolit jamur disebut azaphilon, yang disintesis dari kromopor poliketida dan asam keto melalui proses esterifikasi. Pigmen jamur juga dimanfaatkan untuk produksi molekul seperti antibiotik, enzim, dan asam organik. Faktor yang dapat mempengaruhi produksi pigmen *Monascus*, meliputi: udara, agitasi dan aerasi, sumber karbon dan nitrogen (Silveira, 2008). Pigmen *Monascus* stabil pada rentang pH 2-10. *Monascus* tahan terhadap panas dan dapat di autoklaf. *Monascus* memiliki kelarutan air rendah serta warna pigmen dapat memudar jika

terkena cahaya (Liong, 2015). Pigmen *Monascus* menurut Timotius (2004) dibedakan menjadi dua, yaitu pigmen intraseluler (tidak larut air), dan pigmen ekstraseluler (larut air).

Isolasi *Monascus* dari angkak telah dilakukan oleh Anwar (2013), tetapi belum diketahui spesiesnya. Kapang *Monascus* dapat ditemukan pada produk makanan seperti angkak. Identifikasi terhadap *Monascus* di dalam angkak pada umumnya dilakukan secara mikroskopis dan makroskopis. Berdasarkan perkembangan teknologi, identifikasi tersebut belum cukup untuk memperoleh data secara detail. Hal tersebut menjadi alasan perlu dilakukannya identifikasi secara molekuler.

Langkah awal untuk melakukan identifikasi secara molekuler adalah melakukan isolasi DNA, dilanjutkan dengan tahap amplifikasi DNA *Monascus* sp., elektroforesis produk PCR dan melakukan pengurutan DNA (sekuensing). Isolasi DNA kapang *monascus* dilakukan dengan menggunakan metode *Chelating Ion Exchange* (Chelex).

Penelitian ini bertujuan untuk identifikasi spesies secara molekuler terhadap isolat *Monascus* sp. yang diisolasi dari angkak berdasarkan gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS), melakukan analisis hubungan kekerabatan antar spesies, melakukan pengukuran pertumbuhan dan produksi kandungan pigmen dengan menggunakan spektrofotometer.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dilaksanakan di Laboratorium *Bacteriology*, UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro dan laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2017 sampai dengan Mei 2017. Bahan yang digunakan meliputi: isolat *Monascus* sp. koleksi laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi FSM UNDIP; media *Potato Dextrose Agar*

(PDA); media *Potato Dextrose Broth* (PDB); NaOH; HCl; saponin 0,5 % dalam *Phosphat Buffer Saline* (PBS); ddH₂O; chelex 20 %; gel agarosa; aquades; *Ethidium Bromida* (EtBr); Buffer TAE; kapa kit; *primer forward* dan *primer reverse* (ITS 1 dan ITS 4); *DNA template*; *marker* (*DNA ladder*); alkohol 70%; *loading dye*; kertas whatman ukuran No. 42; metanol 95%, *lactophenol catton blue*, minyak imersi, dan tissue.

Peremajaan Kapang *Monascus* sp.

Isolat kapang *Monascus* ditumbuhkan pada agar miring PDA. Biakan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 14 hari.

Identifikasi Molekuler *Monascus* sp.

Isolat kapang *Monascus* diisolasi dengan menggunakan 20% Chelex 100 (Walsh *et al*, 1991). Uji kuantitatif DNA dilakukan dengan menggunakan nanodrop untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA. Menurut White *et al* (1990), amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dan ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Reaksi PCR menggunakan 50 µl yang terdiri dari 25 µl Kapa, 2 µl masing-masing primer ITS, 6 µl *DNA template*, dan 15 µl ddH₂O. Siklus PCR yang digunakan yaitu denaturasi awal 94°C selama 2 menit, sebanyak 40 kali siklus meliputi: denaturasi 94 °C selama 15 detik, annealing 56 °C selama 30 detik, ekstensi 68 °C, dan final ekstensi 68 °C selama 10 menit 40 detik. Keberhasilan PCR diuji melalui elektroforesis dengan gel agarosa 1% dan marker *DNA Ladder* 100 bp.

Analisis Sekuen dan Pembutan Pohon Filogenetik. Sekuensing dilakukan menggunakan jasa perusahaan Biologi Molekuler PT. Genetika *Science* Indonesia. Penjajaran sekuen dilakukan dengan menggunakan ClustalW dan kontruksi pohon filogenetik menggunakan MEGA 6.0 dengan *Construct/Test Neighbor Joining Tree* dan *Bootstrap method* dan *No. of Bootstrap Replications* 1000.

Pembuatan Inokulum atau Starter.

Suspensi spora dibuat dengan cara memasukkan aquades steril sebanyak 3 ml ke dalam biakan miring dalam tabung reaksi. Permukaan biakan

agar miring dikikis sehingga didapatkan suspensi spora.

Pengukuran Pertumbuhan Sel Kapang *Monascus* sp. Metode yang digunakan dalam pengukuran pertumbuhan yaitu berat kering. Pengukuran berat kering dilakukan dengan mencuci sel dengan aquades 1 ml sebanyak 2 kali dengan sentrifuge kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Pelet yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 80°C selama 18 jam.

Pengukuran Pigmen Ekstraseluler.

Substrat kapang *Monascus* sebanyak 4 ml disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit. Pelet yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan menggunakan methanol 95% sebanyak 4 ml, dan divortex. Selanjutnya disentrifuge kembali. Pengukuran pigmen dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang 500 nm untuk pigmen merah, sedangkan panjang gelombang 390 nm untuk pigmen kuning. Menurut Chen (2013) nilai absorbansi dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Nilai pigmen = OD × pengenceran/ berat kering pigmen (g)

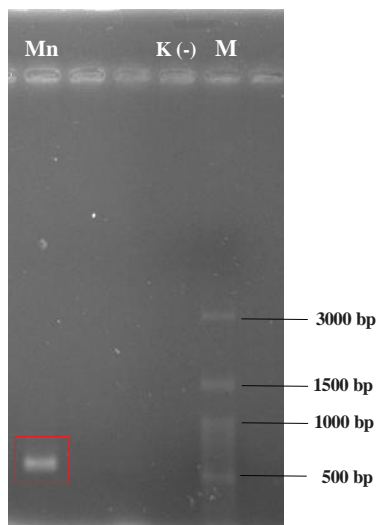
Pengukuran Pigmen Intraseluler.

Miselium yang telah kering ditumbuk, kemudian ditimbang sebanyak 0,2 g, selanjutnya diekstrak dengan 4 ml methanol 95% dan dilakukan pengocokan (*shaker*) selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Ekstrak pigmen kemudian disaring dengan menggunakan kertas Whatmann No 42. Pengukuran pigmen dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang 500 nm untuk pigmen merah, sedangkan panjang gelombang 390 nm untuk pigmen kuning..

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Molekuler

Gambar 1 menunjukkan hasil amplifikasi DNA pada panjang *Base pair* antar 500-600.



Gambar 1. Visualisasi produk PCR kapang *Monascus* dalam 1% agarosa dengan *marker low mass ladder* Marker: 100 bp DNA ladder

Keterangan:

Mn : isolat kapang *Monascus* sp.

K(-) : Kontrol negatif

M : Marker

: Pita DNA target

Pita DNA yang lebih dekat dengan sumuran gel memiliki berat molekul yang lebih tinggi dibandingkan pita yang letaknya lebih jauh dari sumuran gel. Hal ini disebabkan karena molekul yang lebih berat bergerak lebih lambat didalam media gel elektroforesis. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Atmaja (2014) bahwa keberadaan pita DNA berukuran 550 bp menunjukkan gen ITS spesifik untuk jamur. Produk amplifikasi DNA pada penelitian ini menunjukkan ukuran yang sesuai, sehingga dilanjutkan proses sekuensing.

Keberhasilan amplifikasi DNA lebih didasarkan pada kesesuaian primer serta efisiensi dan optimasi proses PCR. Hasil visualisasi DNA yang akan dilakukan sekuensing harus memiliki kualitas yang bagus, yaitu tidak smear, tidak terpotong-potong dan tidak mengandung zat lain.

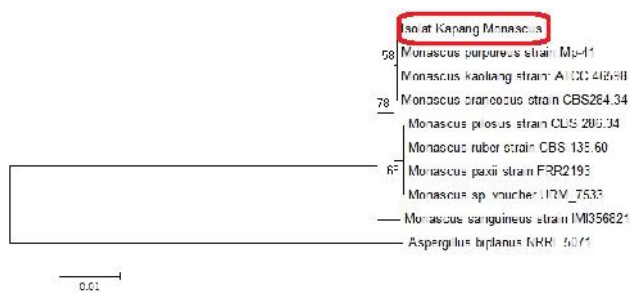
```
GGAAAAAAGAGCGGTCTTCGTGGGACCCAACCTCCCACCCGTGAT
TATTGTACCTCCTGTGCTTCGGCGCGCCCTGGGGCCCGCCGGA
GACATCTTCTCGAACGCTGTCTTTGAAAAGGATTGCTGTCTGAGTAA
ACATACCAAATCGGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCCCCTG
GTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAG
CGCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGCTCCCTGCGCCTCCGGGCAACG
GGGACGGGCCGAAAGGCAGTGGCGGCGCCGCTCCGGTCTCTGA
GCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCAGTAGGTCGGGCCGGGCCTTT
GCCCTCCAACTTTTTTTCCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA
```

Gambar 2. Sekuen DNA isolat kapang *Monascus*. Keterangan: A= Adenin, G= Guanin, C= Sitosin, dan T= Timin.

Penyejajaran dilakukan dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs NCBI. BLAST merupakan program untuk mencari dan menganalisis kehomologian sekuen suatu organisme. Hasil penyejajaran isolat kapang *Monascus* dengan primer ITS 1 menunjukkan hasil bahwa isolat kapang *Monascus* memiliki *Query length* sebesar 553 bp.

Menurut Isda (2013) analisis BLAST dilakukan dengan melihat parameter skor lebih dari 150 dan *E. value* yang kurang dari 10^{-4} atau mendekati nilai nol (0), maka tingkat homologi yang dihasilkan cukup baik. Semakin tinggi skor (bits), maka tingkat homologinya semakin baik, semakin rendah *E. value* maka semakin baik pula tingkat homologinya. *Query cover* yang menunjukkan keselarasan *query*, menunjukkan nilai tertinggi sebesar 97% pada spesies *Monascus purpureus* strain MP-41. Menurut Nuryadi (2016) *Query* merupakan spesies yang memiliki kemiripan atau kesamaan dengan urutan basa DNA isolat sampel. Tingkat homologi juga dapat dilihat dari garis berwarna merah pada grafik hasil BLAST.

Tingkat kemiripan tertinggi dimiliki oleh spesies *Monascus purpureus* dengan *Max score* dan *total score* sama yaitu 998. *E. value* 0.0 yang diperoleh menunjukkan penjajaran yang signifikan berarti pencarian sekuen spesimen penelitian ini identik yaitu dari genus yang sama bahkan sampai pada tingkat spesies. Berdasarkan hasil tersebut dapat diperoleh kesimpulan bahwa isolat kapang *Monascus* merupakan *Monascus purpureus* karena memiliki nilai kemiripan 100%.

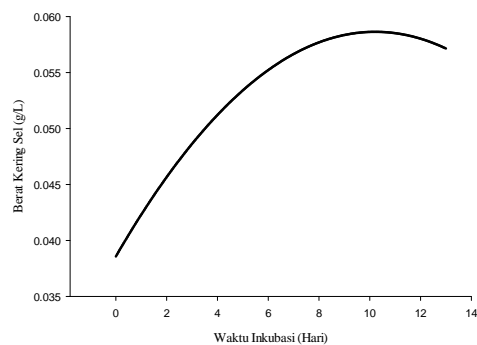


Gambar 3. Pohon Filogenetik berdasarkan *Internal Transcribed Spacer* yang berasal dari isolat kapang *Monascus* menggunakan analisis *Neighbour-Joining* dan uji filogeni *Bootstrap* 1000 replicates

Hasil analisis filogenetik dengan menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) menunjukkan bahwa isolat kapang *Monascus* memiliki nilai kesamaan (*identities*) yang tinggi dengan *Monascus purpureus* sebesar 100%. Isolat kapang *Monascus* dengan *Monascus kaoliang*, *Monascus purpureus*, dan *Monascus araneosus* berada dalam satu *clade* yang sama (Gambar 3). Pohon filogenetik dengan *scale bar* 0,01 menunjukkan adanya jarak genetik dengan perubahan nukleotid sebanyak 1 kali dalam setiap 100 bp. Menurut Lemey *et al.*, (2009) nilai *bootstrap* lebih besar dari 70 menunjukkan bahwa data relative stabil sehingga baik dalam analisis NJ.

Pengukuran Pertumbuhan Sel

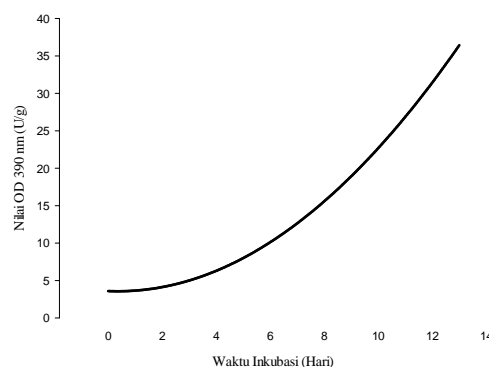
(Gambar 4.) menunjukkan grafik pertumbuhan sel kapang *Monascus*. Kurva pertumbuhan sel kapang *Monascus* yang diperoleh menunjukkan terjadinya fase logaritmik, fase stasioner, serta fase kematian. Fase adaptasi tidak dialami oleh kultur karena medium yang digunakan antara medium starter dan produksi sama yaitu *Potato Dexrose Broth* (PDB), sehingga kapang tidak mengalami adaptasi dan memasuki fase pertumbuhan log.



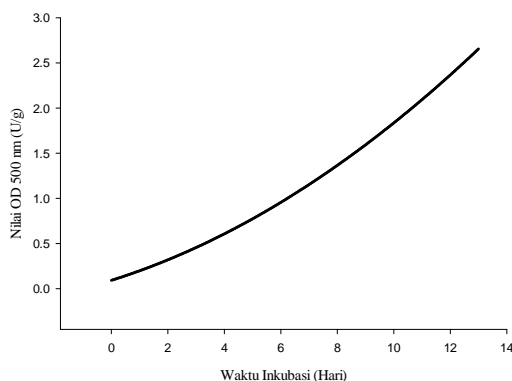
Gambar 4. Kurva pertumbuhan kapang *Monascus* berdasarkan berat kering selama inkubasi 13 hari

Produksi Pigmen *Monascus* ekstraseluler

Pertumbuhan kapang *Monascus* sp. menjadi indikator kunci dalam sintesis metabolit pigmen. Kapang pada tahap akhir pertumbuhan menggunakan produk yang dihasilkan pada tahap pertama untuk memproduksi metabolit sekunder. Hasil analisis pengukuran pigmen merah dan kuning dengan menggunakan konsentrasi starter 5% dapat dilihat pada (Gambar 5.)



Gambar 5. Nilai absorbansi pigmen ekstraseluler warna kuning kapang *Monascus* sp. dari hari ke-0 sampai hari ke-13.



Gambar 6. Nilai absorbansi produksi pigmen ekstraseluler warna merah kapang *Monascus* sp. dari hari ke-0 sampai hari ke-13.

Hasil pengukuran pigmen ekstraseluler merah dan kuning pada kapang *Monascus* sp. terjadi peningkatan jumlah setiap waktunya, dimana semakin tinggi konsentrasi starter dan lama waktu fermentasi yang digunakan maka semakin tinggi intensitas warna yang dihasilkan. Hasil pengukuran jumlah pigmen ekstraseluler tertinggi baik pigmen warna merah dan kuning terjadi pada hari ke-13, dimana pigmen warna kuning sebesar 37,358 U/g; sedangkan pigmen warna merah sebesar 2,6545 U/g. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Irdawati (2010) yang menyatakan bahwa, jumlah konsentrasi starter yang tepat akan menghasilkan hasil yang baik dalam proses fermentasi, serta kadar pigmen akan semakin meningkat dengan meningkatnya waktu fermentasi sampai waktu fermentasi tertentu.

Produksi Pigmen *Monascus* Intraseluler

Hasil pengukuran pigmen intraseluler, yaitu pigmen yang tersimpan didalam miselia, dilakukan pada hari ke-13 dimana hasil yang diperoleh yaitu pigmen merah 7,4175 U/g, sedangkan pigmen kuning 30,176 U/g.

Pengukuran pigmen intraseluler dan ekstraseluler memerlukan pelarut berupa methanol, hal ini bertujuan untuk memecah hifa dan spora sehingga pigmen merah dan kuning yang berada di dalam sel akan terurai. Menurut Pattanagul (2008) Pigmen *Monascus* mudah larut dalam etanol dan sedikit larut dalam air. Monascorubrin larut dalam ether, methanol, ethanol, benzene, chloroform, asam asetat danaseton akan tetapi tidak larut dalam air dan petroleum eter.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis molekuler diketahui bahwa isolat kapang *Monascus* merupakan spesies *Monascus purpureus*.

Produksi pigmen merah dan kuning yang dihasilkan oleh kapang *Monascus* mengalami peningkatan selama waktu fermentasi sampai hari ke-13. Jumlah produksi pigmen ekstraseluler warna kuning sebesar 37,358 U/g; sedangkan pigmen warna merah sebesar 2,6545 U/g. Jumlah produksi pigmen intraseluler warna merah sebesar 7,4175 U/g, sedangkan pigmen warna kuning 30,176 U/g.

Daftar Pustaka

- Anwar, Nugraha,., Soni. 2013. Produksi Pigmen oleh Isolat Kapang Hasil Isolasi dari Angkak Komersial di Semarang Pada Sumber N dan pH Berbeda. *Skripsi*. Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- Atmaja, Fuad., Dwi. 2014. Amplifikasi *Internal Transcribed Spacer* dan *-tubulin* Pada Tanaman *Jacobaea* sp. (Asteraceae) setelah Perlakuan Fungisida Sistemik. *Skripsi*. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Chen, Jiang., and Zhu, Yang. 2013. *Fermented Foods and Beverage Series: Solid State for Foods and Beverages*. CRC Press. New York.
- Lemey, P., M. Selemi and A.M. Vandamme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A*

- Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press.Uk.
- Liong, Min-Tze. 2015. *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals*. Springer Science Business Media. Germany.
- Irdawati. 2010. Pengaruh Jumlah Starter dan Waktu Fermentasi Terhadap Pigmen yang Dihasilkan oleh *Monascus purpureus* Pada Limbah Ubi Kayu (*Manihot utilisima*). *Eksata.*, 1: 19-24.
- Isda, Mayta, Novaliza., dan Chaidamsari, Tetty. 2013. Analisis Sekuen Gen Proteinase Inhibitor (*TcPIN*) Terkait dengna Ketahanan Terhadap Penggerek Buah Kakao. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*.
- Nuryadi, Wahyu., Rakhmawati, Anna., dan Prihatini, Istiana. 2016. Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit dari Pohon Sengon Provenan Kepulauan Solomon Berdasarkan Morfologi dan Molekuler (Analisis rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*))., 5(6): 15-27.
- Pattanagul, Patcharee., Pinthong, Renu., Phianmongkhol, Aphirak., and Tharatha, Somsak. 2008. Mevinolin, Citrinin, and Pigments of Adlay Angkak Fermented by *Monascus* sp.. *Internasional Journal of Food Microbiology.*, 126: 20-23.
- Rashmi, Dikshit., and Padmavathi, Tallapragada. 2013. Exploring *Monascus sanguineus* as a Potential Natural Source for Pigment Production. *International Research Journal of Biologica Sciences.*, 2(5): 59-67.
- Roosheroe, indrawati., Gandjar., Sjamsuridzal, Wellyzas., dan Oetari, Ariyanti. 2014. *Mikologi: Dasar dan Terapan* (ed 2). Yayasan Pustaka Obor. Jakarta.
- Silveira, Silvana. T., Daroit, Daniel. J., and Brandelli, Adriano. 2008. Pigment Production by *Monascus purpureus* in Grape Waste Using Factorial Design. *Journal of Food Science and Technology.*, 41: 170-174.
- Walsh P.S., D.A., Metzger, R. Higuchi. 1991. Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques.*, 10:506-513.

