

Produksi dan Kestabilan Pigmen Merah Kapang *Monascus* sp. Menggunakan Media Tepung Kulit Singkong dengan Penambahan Bekatul pada Konsentrasi yang Berbeda

Sona Fatimah, Agung Suprihadi¹, Endang Kusdiyantini¹

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

ABSTRACT

The used of synthetic dyes have a various of negative effects on human health. Pigment produced by *Monascus* sp. can be used as an alternative natural coloring food. The purpose of this research is to produce pigment *Monascus* sp. using the substrate cassava peels flour with the addition of rice bran at various concentrations. The study was conducted by growing *Monascus* sp. on medium cassava peels flour with the addition of rice bran in various concentrations (0%, 2.5%, 5% and 10%). Measured parameter is the production of red pigment and pigment stability against temperature, water content, solubility and pH. Red pigment production was measured using a spectrophotometer with a wavelength of 500 nm. Analysis of the data using One Way ANOVA and Duncan test. The results showed that the highest production of red pigment (5.6 CVU / gds) and water content of 47% was obtained on medium cassava peels flour with rice bran addition of 10%. Pigment stability towards heat are 0,39 at 30^oC, 0,35 at 60^oC, 0,27 at 121^oC, and 0,22 at 150^oC , stability pH 3 are 0,37 (0 hours incubation) dan 0,26 (12 hours incubation) whereas pH 7 are 0,38 (0 hours incubation) dan 0,36 (12 hours incubation).

Keywords: Fermentation, Cassava peels flour, Rice bran, Monascus, Pigment intensity, stability

ABSTRAK

Penggunaan pewarna sintesis memiliki berbagai efek negatif terhadap kesehatan manusia. Pigmen yang dihasilkan oleh kapang *Monascus* sp. dapat digunakan sebagai alternatif pewarna alami makanan. Tujuan penelitian ini adalah memproduksi pigmen kapang *Monascus* sp. menggunakan substrat tepung kulit singkong dengan penambahan bekatul pada berbagai konsentrasi. Penelitian dilakukan dengan menumbuhkan *Monascus* sp. pada medium tepung kulit singkong dengan penambahan bekatul pada berbagai konsentrasi (0%, 2,5%, 5% dan 10%). Parameter yang diukur adalah produksi pigmen merah dan kestabilan pigmen terhadap suhu, kadar air, kelarutan serta pH. Produksi pigmen merah diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Analisis data menggunakan *One Way Anova* dan *uji Duncan*. Hasil menunjukkan bahwa produksi pigmen merah tertinggi (5,6 CVU/gds) dan kadar air 47% diperoleh pada media tepung kulit singkong dengan penambahan bekatul 10%. Pigmen yang dihasilkan memiliki stabilitas terhadap suhu 0,39 (30^oC), 0,35 (60^oC), 0,27 (121^oC), dan 0,22 (150^oC) serta stabilitas terhadap pH 3 adalah 0,37 (jam ke-0) dan 0,26 (jam ke-12); sedangkan pH 7 adalah 0,38 (jam ke-0) dan 0,36 (jam ke-12).

Kata kunci: Fermentasi, Tepung kulit singkong, Bekatul, Monascus, Intensitas pigmen, Stabilitas

PENDAHULUAN

Makanan merupakan salah satu kebutuhan pokok manusia yang harus terpenuhi. Dewasa ini industri makanan mengalami perkembangan yang luas dengan munculnya produk-produk makanan yang baru. Persaingan produk makanan di Indonesia semakin meningkat seiring dengan kemajuan teknologi di bidang pangan. Para produsen makanan berlomba-lomba menciptakan sebuah produk yang menarik dari segi penampilan dan cita rasa di lidah masyarakat Indonesia, sehingga para produsen makanan menggunakan bahan tambahan makanan, khususnya pewarna makanan.

Pewarna makanan yang lebih banyak digunakan oleh produsen makanan biasanya pewarna sintesis, karena lebih ekonomis, mudah di dapat, memiliki kelebihan mudah larut dalam air, tahan terhadap suhu tinggi, dan memiliki spektrum warna yang luas. Padahal, bahan pewarna sintesis dapat menimbulkan efek yang berbahaya bagi tubuh apabila dikonsumsi dalam kadar yang berlebih. Penggunaan bahan pewarna sintesis dapat menimbulkan efek lebih lanjut, yaitu timbul gangguan pada ginjal dan penyakit kanker (Ait dan Ida, 2010).

Managemen keamanan pangan menjadi salah satu aspek penting yang perlu diperhatikan oleh para produsen makanan, bukan hanya mementingkan segi penampilan dan cita rasa, namun juga memiliki kualitas yang baik serta dapat bersaing di pasaran. Apabila melihat kenyataan di lapangan, ternyata tidak semua makanan memenuhi standar keamanan pangan. Pada tahun 2003 Balai POM meneliti 19.465 jenis jajan anak di berbagai sekolah di Jakarta ditemukan sedikitnya ada 185 item makanan mengandung bahan pewarna berbahaya, 94 item mengandung boraks, 74 item mengandung formalin dan 52 item mengandung benzoat atau pengawet. Semua bahan berbahaya tersebut terdapat dalam kadar yang berlebih, sehingga dapat mengganggu kesehatan.

Keanekaragaman mikroba di Indonesia dapat menjadi alternatif pengganti pewarna sintesis. Banyak mikroba yang memiliki potensi menghasilkan bahan bioaktif, salah satunya kapang sebagai penghasil pigmen Merah yaitu *Monascus*. Pigmen Merah yang dihasilkan oleh kapang *Monascus* ini, dapat disebut juga sebagai

pigmen angkak. Angkak tersebut merupakan pewarna alami yang memiliki warna konsisten, stabil serta mudah diaplikasikan pada bahan makanan. Angkak sangat aman digunakan karena tidak adanya dampak negatif terhadap kesehatan, mudah diproduksi dan harganya terjangkau. Pigmen Merah (Angkak) telah lama digunakan sebagai pewarna makanan di negara-negara Asia seperti Cina, Indonesia, Jepang dan Filipina. Umumnya digunakan sebagai makanan pelengkap, menu diet, dan mewarnai berbagai produk makanan seperti produk ikan, keju, kedelai, piket sayuran, daging, anggur dan minuman beralkohol lainnya (Muharni dkk., 2013; Shi and Pan, 2011). Pigmen Merah dapat digunakan untuk berbagai keperluan, antara lain sebagai pewarna kue, yogurt, daging, sosis, dan untuk pengawet buah, sayur, serta produk ikan. Pigmen *Monascus* juga digunakan untuk pewarna "lipstik", pemutih atau pelindung kulit, dan pewarna kain sutra (Sheu *et al.*, 2000). Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut sehingga pewarna dari angkak dapat digunakan untuk menggantikan pewarna sintesis. Genus spesies *Monascus* sp. dapat diisolasi dari produk angkak yang dijual di berbagai pasaran, seperti di kota Semarang.

Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap produksi pigmen adalah jenis medium yang digunakan. Medium yang baik akan berpengaruh terhadap intensitas pigmen yang dihasilkan. Beras merupakan substrat yang sering digunakan dalam proses fermentasi oleh kapang *Monascus* untuk menghasilkan kadar pigmen merah optimum. Selain beras terdapat substrat lain yang digunakan sebagai medium seperti gandum dan jagung (Carvalho *et al.*, 2005).

Mengingat beras, gandum dan jagung merupakan bahan makanan pokok di Indonesia, maka perlu dicari alternatif lain sebagai pengganti substrat. Beberapa penelitian telah dilakukan dalam pemanfaatan bahan alternatif selain beras, diantaranya yaitu menggunakan ampas tahu dan dedak padi (Kusumawati dkk., 2004). Substrat lain yang dapat digunakan yaitu tepung kulit singkong (Renawati, 2005). Potensi kulit singkong di Indonesia sangat melimpah, seiring dengan eksistensi negara sebagai salah satu penghasil singkong terbesar di dunia dan terus mengalami peningkatan produksi setiap tahunnya, dari setiap berat singkong akan dihasilkan limbah

kulit singkong sebesar 16 % dari berat tersebut (Badan Pusat Statistik, 2012). Kulit singkong basah memiliki kandungan karbohidrat yang cukup tinggi yaitu sekitar 4,55 %. Kandungan karbohidrat pada kulit singkong inilah yang dapat digunakan sebagai sumber energi bagi mikroorganisme.

Pigmen alami merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba, proses produksinya dipengaruhi oleh beberapa faktor fisik seperti suhu, pH, kelarutan, salinitas medium kultur (Bhat *et al.*, 2013). Menurut Timotius (2004), pertumbuhan mikroba penghasil pigmen dipengaruhi oleh karbon, nitrogen, vitamin, mineral dan faktor lingkungan seperti oksigen, pH, kelembaban, dan suhu. Peningkatan intensitas pigmen alami juga dapat dilakukan dengan memodifikasi media pertumbuhan dengan menambahkan bekatul sebagai vitamin tambahan dalam proses fermentasinya.

Kebutuhan pigmen alami yang meningkat di pasaran dan peluang pemanfaatan limbah agroindustri, maka perlu dilakukan penelitian mengenai produksi dan kestabilan pigmen yang dihasilkan oleh isolat kapang *Monascus* pada substrat tepung kulit singkong dengan penambahan bekatul pada konsentrasi yang berbeda.

METODOLOGI

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Analisis Proksimat dilakukan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian & Peternakan Universitas Diponegoro, Semarang. Waktu penelitian dilakukan dari bulan Mei sampai Agustus 2014.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah biakan murni *Monascus* sp. koleksi laboratorium Biokimia jurusan biologi FSM Undip, tepung kulit singkong, bekatul, NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaOH 1 M, HCL 0.1 M, NaCl , akuades, alkohol 70%, medium PDA, methanol 96%, buffer pH 3 dan buffer pH 7.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu autoklaf, erlenmeyer 250 mL, botol fermentasi, bunsen, mikropipet, tip mikropipet skala 100-1000 μL , pipet tetes, gelas ukur, gelas beker, spektrofotometer *Spectronic-20*, cuvet, cawan petri, haemositometer, *hand counter*, vortex, tabung reaksi, sumbat kasa, oven, inkubator, *rotary shaker*, neraca analitik, pisau, blender, ayakan, kertas saring, alumunium foil, desikator, termometer, batang pengaduk, label, ose, pH indikator, rak tabung reaksi dan mikroskop.

Cara Kerja

Pembuatan Medium PDA

Potato Dextrose Agar (PDA) instan dalam bentuk serbuk sebanyak 4 gram dilarutkan 100 mL akuades. Bahan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer, selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dengan tekanan 2 atm. Medium tersebut dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL dan tabung reaksi sebanyak 5 mL, kemudian dibiarkan sampai memadat. Media tersebut dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar sebelum digunakan sebagai medium peremajaan isolat kapang.

Peremajaan Kapang

Isolat kapang *Monascus* diperoleh dari koleksi Laboratorium Biokimia Jurusan Biologi, FSM Undip. Isolat *Monascus* sp. dibuat subkultur pada medium PDA pada cawan petri dan tabung reaksi dengan cara diambil menggunakan ose secara aseptis kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 8 hari. Kultur siap digunakan sebagai kultur kerja (Sheu *et al.*, 2000).

Persiapan Inokulum

Isolat kapang yang sudah diremajakan diinokulasikan ke medium PDA miring steril, diinkubasi pada suhu ruang selama 8 hari. Akuades steril sebanyak 5 mL ditambahkan ke dalam kultur kapang pada akhir inkubasi, spora dilepaskan menggunakan ose. Suspensi spora dipindahkan ke dalam erlenmeyer 10 mL steril secara aseptik dan ditambah akuades steril sebanyak 5 mL sehingga diperoleh volume sebanyak 10 mL (Babitha *et al.*, 2006). Suspensi spora yang telah dibuat kemudian divorteks hingga homogen dan dihitung jumlah sporanya menggunakan haemositometer hingga mengandung $6,12 \times 10^6$. Salah satu syarat inokulum

adalah terdapat dalam jumlah optimal. Jumlah minimal sel hidup dalam inokulum yaitu 10^6 .

Perhitungan Kerapatan Spora

Permukaan hitung haemasitometer dibersihkan menggunakan alkohol dan tisu halus, kemudian kaca penutup haemasitometer diletakkan di atas haemositometer. Sebanyak satu tetes suspensi spora diteteskan pada lekukan pada tepi kaca penutup haemositometer dengan pipet dan dibiarkan sampai memenuhi ruang hitung. Diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400 kali dan dihitung jumlah spora yang terdapat pada 80 kotak kecil yang terletak di dalam kotak tengah yang berukuran 1 mm^2 . Kerapatan spora dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel & Riyatno, (1989) dalam Herlinda *et al.*, (2006) sebagai berikut:

$$C = \frac{t}{(n \times 0,25)} \times 10^6$$

Keterangan:

- C : kerapatan spora per mL larutan
- t : jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati
- n : jumlah kotak sampel (5 kotak besar \times 16 kotak kecil)
- 0,25 : faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada haemositometer

Pembuatan Tepung Kulit Singkong

Menurut Oboh (2006), tepung kulit singkong dapat dijadikan sebagai alternatif sumber glukosa, oleh karena itu dapat dijadikan sebagai media pertumbuhan *Monascus*. Kulit singkong yang digunakan dalam pembuatan tepung kulit singkong adalah bagian dalam yang berwarna putih. Pembuatan tepung kulit singkong dapat dilakukan dengan cara yang mudah dan menggunakan alat sederhana. Singkong diambil kulit bagian dalamnya lalu dicuci sampai bersih. Setelah proses pencucian, kulit singkong kemudian dipotong hingga ukurannya kecil sehingga lebih mudah dalam proses perendaman dan penjemuran. Proses penjemuran dilakukan dibawah sinar matahari selama 48 jam (Nebiyu *et al.*, 2011). Kulit singkong yang sudah kering lalu dihancurkan hingga menjadi tepung kemudian diayak menggunakan saringan.

Analisis Proksimat

Analisis proksimat meliputi penghitungan kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein, kadar serat kasar, dan kadar karbohidrat.

Persiapan dan Proses Fermentasi Substrat

Persiapan Substrat dilakukan dengan menimbang tepung kulit singkong sebanyak 10 gram ke dalam botol fermentasi dan ditambah dengan bekatul dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0, 5%, 7,5%, 10%. Campuran tepung kulit singkong dan bekatul yang telah homogen ditambahkan 4 mL larutan nutrisi dengan komposisi 2 gram KH_2PO_4 , 5 gram NH_4NO_3 , 1 gram NaCl dan 1 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kemudian diatur hingga pH 6 dengan menambahkan HCL 0.1 M atau NaOH 1 M. Selain pH, kelembaban awal substrat juga diatur mencapai 60 % dengan menambahkan aquades steril. Setelah semua proses selesai, botol fermentasi ditutup dengan sumbat kasa dan aluminium foil. Medium fermentasi yang telah diatur pHnya disterilisasi dengan autoklaf 121°C selama 15 menit. Setelah selesai sterilisasi medium didinginkan sampai suhu kamar (Babhita *et al.*, 2006). Substrat diinokulasikan dengan suspensi spora kapang *Monascus* sebanyak 1 mL dan dilanjutkan dengan proses inkubasi selama 10 hari pada suhu ruang dalam kondisi statis.

Analisa Intensitas Pigmen Merah (Babhita *et al.* 2006)

Serbuk fermentasi diambil sebanyak 1 gram diekstrak dengan 5 mL metanol 96%. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan rotary shaker 125 rpm selama 1 jam. Setelah didiamkan selama 15 menit, larutan kemudian dipisahkan dari residu dengan penyaringan menggunakan kertas saring. Ekstrak metanol dari substrat yang tidak difermentasi digunakan sebagai blanko.

Pengukuran intensitas pigmen dihitung dengan mengukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Menurut Dikshit and Tallapragada (2011), hasil pigmen (A/gram) dihitung melalui panjang gelombang hasil pengukuran () per gram substrat kering (gram). Nilai-nilai absorbansi dikonversikan menjadi unit pigmen menggunakan rumus berikut:

$$\text{Nilai Warna} = \frac{\text{O.D.} \times \text{pengenceran} \times \text{volume ekstrak}}{\text{Jumlah sampel (g)}}$$

Analisa Kadar Air (Heber *et al.*, 2000)

Serbuk fermentasi sebanyak 2 gram ditimbang pada cawan petri yang telah diketahui beratnya. Sampel kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 60°C selama 6 jam kemudian

didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sampel kemudian dimasukkan oven kembali selama 30 menit dan didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang. Perlakuan diulang sampai diperoleh berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg).

Menurut Desrosier (2008), kadar air dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{B - C}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan:

A: Berat cawan kosong (dalam gram)

B: Berat cawan + sampel awal

C: Berat cawan + sampel kering

Uji Kelarutan Pigmen Merah *Monascus* dalam Air (Indrawati, 2010)

Empat tabung reaksi masing-masing diisi dengan air sebanyak 10 mL bersuhu 25^oC, 60^oC, 80^oC dan 100^oC. Pada masing-masing tabung reaksi ditambahkan 0,6 gram serbuk fermentasi dan divortex selama 30 detik. Larutan kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan filtrat yang diperoleh kultur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

Uji Pengaruh Suhu terhadap Pigmen Merah *Monascus* (Indrawati, 2010)

Serbuk fermentasi sebanyak 0,6 gram dilarutkan dalam 50 mL air dan diaduk selama 1 menit kemudian larutan disaring. Filtrat kemudian dipindahkan kedalam 4 tabung reaksi dimana masing-masing diisi dengan 10 mL larutan filtrat. Masing-masing tabung kemudian dipanaskan dalam oven bersuhu 30^oC, 60^oC, 121^oC dan 150^oC selama 1 jam dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

Uji Pengaruh pH terhadap Pigmen Merah *Monascus* (Jenie dkk, 1997)

Serbuk fermentasi sebanyak 0,6 gram dilarutkan dalam 50 mL air dan diaduk selama 1 menit. Larutan kemudian disaring dan filtrat dipindahkan ke dua tabung reaksi yang masing-masing berisi 1 mL larutan. Masing-masing

tabung kemudian ditambah dengan 9 mL buffer Na-sitrat pH 3 dan tabung lainnya dengan 9 mL buffer Na-fosfat pH 7. Intensitas pigmen diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm setiap interval 4 jam.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial, terdapat dua variabel dalam penelitian ini yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah penambahan bekatul sedangkan variabel terikat adalah produksi pigmen kapang. Kadar bekatul yang diberikan sebanyak 5%, 7,5%, dan 10%. Perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh diolah menggunakan software minitab dan SAS. Langkah pertama yang dilakukan adalah uji normalitas. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak, kemudian dilanjutkan uji homogenitas variansi untuk mengetahui variansi data. Apabila data yang diperoleh normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji parametrik, untuk menguji hipotesis dilakukan uji ANOVA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan tepung kulit singkong sebagai media pertumbuhan dengan menambahkan bekatul dengan konsentrasi yang berbeda pada kapang *Monascus* sp. Hasil menunjukkan bahwa kapang ini dapat tumbuh dengan baik pada media tersebut. Pengamatan morfologi pertumbuhan dilakukan selama 8 hari terhadap kapang tersebut yang ditumbuhkan pada medium PDA. Awal Pertumbuhan diawali dengan adanya miselia yang tipis seperti kapas padat, berwarna merah kekuningan dengan pembentukan serabut hifa di bagian tengah koloni, dasar koloni berwarna merah bata. Gambar 1 menunjukkan morfologi koloni *Monascus* sp.



Gambar 1. *Monascus* pada medium PDA inkubasi 8 hari pada suhu ruang (Dok. Pribadi, 2014).

1. Produksi Pigmen Merah *Monascus*

Produksi pigmen merah *Monascus* sp. dilakukan dengan menggunakan media tepung kulit singkong sebagai substrat dengan menambahkan bekatul pada konsentrasi 0%, 5%, 7,5% dan 10% untuk memproduksi pigmen merah. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa intensitas pigmen merah meningkat seiring dengan banyaknya penambahan bekatul. Gambar 2 menunjukkan produksi pigmen merah pada substrat.



Gambar 2. Pigmen merah *Monascus* hasil ekstraksi dari substrat tepung kulit singkong dengan penambahan bekatul pada konsentrasi yang berbeda (Dok. Pribadi, 2014).

Pemanfaatan tepung kulit singkong sebagai media fermentasi dengan penambahan bekatul mampu meningkatkan intensitas pigmen merah yang dihasilkan oleh *Monascus*. Hal ini diduga karena tepung kulit singkong dan bekatul mengandung nutrisi yang dapat dimanfaatkan *Monascus* dalam pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder (pigmen merah). *Monascus* memerlukan unsur karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral. Pembentukan pigmen *Monascus* dimulai pada fase pertumbuhan lambat dan mulai meningkat pada fase pertumbuhan stasioner. Bill *et al.* (2008), menyatakan bahwa keberhasilan

dalam produksi produk alami mikroba adalah dengan manipulasi nutrisi dan lingkungan yang mendukung biosintesis metabolit sekunder. Variasi kecil dalam nutrisi dan lingkungan memiliki potensi untuk mempengaruhi kuantitas produk fermentasi. Rerata produksi pigmen merah dengan penambahan bekatul pada konsentrasi yang berbeda disajikan pada Gambar 3. Pigmen merah meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi bekatul.

Gambar 3. Pengaruh penambahan bekatul terhadap produksi pigmen merah

Beras merupakan substrat yang sering digunakan untuk menghasilkan pigmen merah optimum namun mengingat beras merupakan bahan pangan, substrat pengganti berupa tepung kulit singkong terbukti dapat menjadi substrat pengganti beras yang baik untuk menghasilkan pigmen merah. Tepung kulit singkong memiliki sumber karbon yang cukup tinggi yang dapat dimanfaatkan oleh *Monascus*, sumber karbon masuk dalam jalur glikolisis yang akan menghasilkan energi untuk pertumbuhan, setelah pertumbuhan mencapai maksimal maka metabolit sekunder (pigmen merah) mulai diproduksi. Sumber karbon dari tepung kulit singkong ini dimanfaatkan secara optimal oleh *Monascus* sehingga dapat tumbuh dengan baik dan pigmen merah yang dihasilkan juga maksimal. Hal ini terlihat dari produksi pigmen merah pada substrat tepung kulit singkong tanpa penambahan bekatul sebesar 2,7 cvu/gds. Produksi pigmen merah dengan substrat tepung kulit singkong dapat juga menggantikan substrat beras karena kandungan nutrisinya yang cocok untuk pertumbuhan, tepung kulit singkong memiliki kadar karbohidrat 87,51%, nilai ini selisih sedikit dengan kadar karbohidrat beras sebesar 87,71%. Menurut Timotius (2004), karbohidrat yang dimiliki tepung kulit singkong ini akan dipecah pada tahap glikolisis sehingga terbentuk asetil KoA dan malonil KoA. reaksi antara keduanya akan

menghasilkan pigmen oranye yang jika bereaksi dengan asam amino (hasil dari pemecahan protein) dapat menghasilkan pigmen merah. Hasil Analisis proksimat tepung kulit singkong dan beras dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Analisis Proksimat Tepung Kulit Singkong dan Beras

Tipe Substrat	Kadar dalam 100% bahan kering				
	Air %	Abu %	Lemak %	Serat Kasar %	Protein %
Tepung Kulit Singkong	15,17	4,42	1,56	13,72	6,50
Beras	13,98	0,60	1,38	1,40	10,31

Modifikasi media fermentasi dengan bekatul terbukti mampu meningkatkan intensitas pigmen merah. Penambahan bekatul hingga 10% mampu meningkatkan intensitas pigmen merah yang dihasilkan oleh *Monascus* dibandingkan dengan kontrol tanpa penambahan bekatul. Hal ini diduga karena bekatul memiliki banyak mikronutrien yang dapat dimanfaatkan oleh *Monascus*. Hasil Analisis proksimat bekatul dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Analisis Proksimat Bekatul

Tipe Substrat	Kadar dalam 100% bahan kering				
	Air %	Abu %	Lemak %	Serat Kasar %	Protein %
Bekatul	11,28	11,46	9,93	20,15	12,15

Peningkatan intensitas pigmen merah dengan media fermentasi yang diperkaya bekatul diduga disebabkan oleh adanya vitamin B1, asam amino, dan zinc pada bekatul. Vitamin B1 (*Thiamin Pyrophosphate*) merupakan koenzim atau gugus prostetik dalam kompleks enzim piruvat dehidrogenase yang mengkatalisis konversi piruvat menjadi asetil KoA dalam metabolisme glukosa. Pigmen *Monascus* diproduksi melalui jalur poliketida dan membutuhkan asetil KoA. Oleh karena itu, secara tidak langsung vitamin B1 berpengaruh dalam produksi asam piruvat dari glukosa selama proses biosintesis pigmen, semakin tingginya jumlah vitamin B1 dalam substrat maka pigmen yang dihasilkan juga semakin tinggi (Danuri, 2008). Penambahan bekatul pada konsentrasi 0 %, 5%, 7.5% dan 10% mengalami peningkatan intensitas pigmen merah dengan baik, jika konsentrasi

penambahan bekatul ditingkatkan lagi dikhawatirkan akan menghambat pertumbuhan sehingga berakibat pada produksi pigmen merah. Menurut Jenie dkk (1997) penurunan intensitas pigmen pada perlakuan penambahan bekatul lebih dari 10% disebabkan oleh jumlah mineral yang terlalu banyak dalam media fermentasi, yang dapat menghambat pertumbuhan *Monascus*. Vitamin B1 serta unsur mineral lain dalam produksi pigmen dibutuhkan dalam jumlah yang cukup untuk aktifasi enzim dan biosintesis pigmen.

Tabel 2 menunjukkan bahwa bekatul juga memiliki kadar abu yang menggambarkan kadar mineral, lemak kasar yang merupakan campuran dari lemak, minyak, asam organik dan vitamin A D E K serta protein kasar yang cukup tinggi sehingga berpengaruh terhadap produksi pigmen. Kandungan lemak kasar dan protein kasar yang tinggi akan menghasilkan asam amino serta asam lemak dan gliserol yang tinggi pula sehingga menyebabkan reaksi yang lebih besar dalam pembentukan pigmen merah. Hal tersebut terbukti bahwa substrat tepung kulit singkong dengan penambahan bekatul 10% menunjukkan hasil produksi pigmen yang tertinggi sebesar 5,6 cvu/gds.

Hal ini menunjukkan bahwa Komposisi substrat yang memiliki kandungan nutrisi lengkap, efektif untuk menghasilkan pigmen merah tertinggi. Menurut Yongsmith (2000), produksi pigmen oleh *Monascus* dipengaruhi tipe substrat yang digunakan dan kondisi selama produksi pigmen merah, adanya 1-10% bahan-bahan sumber karbon dan 0,1-0,5% sumber nitrogen pada substrat, dapat meningkatkan produksi pigmen. Carvalho *et al.* (2007) juga menyatakan bahwa substrat yang memiliki kandungan karbohidrat, protein, atau fosfor lebih tinggi dapat menjadi media atau substrat fermentasi *Monascus* yang lebih baik.

2. Kadar Air Pigmen Merah *Monascus*

Kandungan air suatu bahan pangan akan menentukan kesegaran dan daya tahan bahan pangan (Winarno, 2008). Bahan pangan yang disimpan pada suhu yang tinggi akan mengalami dehidrasi yang mengakibatkan kadar air pada bahan pangan menurun. Rerata kadar air yang dihasilkan dari fermentasi tepung kulit singkong dengan berbagai penambahan bekatul berkisar antara 35% - 55%. Rerata kadar air yang

diperoleh untuk masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Rerata pengaruh penambahan bekatul terhadap kadar air pigmen merah *Monascus*.

Hasil analisis kadar air menunjukkan tidak tampak adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan yang diberikan. Hal ini diduga karena kesamaan proses selama perlakuan yaitu jumlah massa serbuk fermentasi yang sama sebesar 2 gram serta proses pengeringan yang dilakukan selama 6 jam pada oven dengan suhu 60°C.

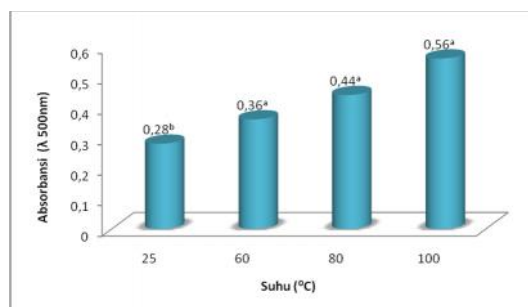
Kecepatan pengeringan dari suatu bahan tergantung pada luas permukaan bahan, kecepatan udara mengalir dan suhu. Makin besar luas permukaan dan makin berpori-pori permukaan suatu bahan pangan, maka kecepatan pengeringannya akan semakin tinggi. Bila kecepatan udara yang mengalir melalui bahan meningkat, maka kecepatan pengeringan juga akan meningkat. Semakin tinggi suhu udara, dan semakin besar perbedaan suhu, maka laju pengeringan akan semakin cepat (Desrosier, 2008).

3. Uji Kelarutan Pigmen Merah dalam Air

Produk serbuk fermentasi yang dihasilkan dari tepung kulit singkong dengan penambahan bekatul pada konsentrasi yang berbeda perlu dilakukan uji kelarutan pigmen Merah dalam air untuk mengetahui tingkat kelarutan pigmen dari serbuk fermentasi. Pengujian kelarutan pigmen dari serbuk fermentasi dilakukan pada air pada berbagai suhu yaitu 25°C, 60°C, 80°C, dan 100°C. Kelarutan serbuk fermentasi ditentukan dengan melihat nilai OD (*Optical Density*) larutan serbuk fermentasi pada panjang gelombang 500 nm.

Pengujian kelarutan pigmen dari serbuk fermentasi dalam air perlu dilakukan karena pada umumnya penggunaan Pigmen Merah (angkak) biasanya dengan cara melarutkan angkak dalam air hangat atau panas. Larutan angkak yang

didapat baru kemudian ditambahkan ke dalam makanan yang akan diwarnai. Menurut Jenie dkk (1997) penggunaan air hangat atau panas bertujuan untuk meningkatkan kelarutan warna angkak dalam produk. Gambar 5 menunjukkan bahwa kelarutan pigmen merah mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan suhu pemanasan.



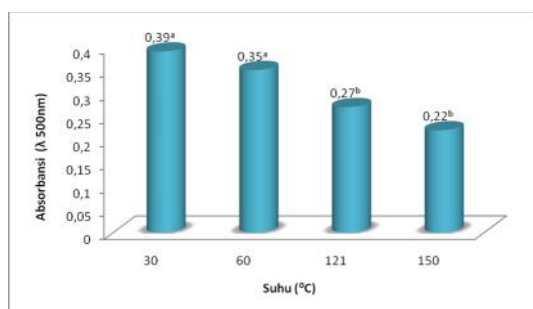
Gambar 5. Kelarutan pigmen merah *Monascus* dalam air pada berbagai suhu.

Berdasarkan Gambar 5 peningkatan kelarutan pigmen sejalan dengan peningkatan suhu yang diberikan. Hal ini dapat disebabkan oleh terjadinya peningkatan energi kinetik partikel pada saat terjadi pemanasan. Partikel yang memiliki energi kinetik yang lebih besar akan menyebabkan terjadinya tumbukan yang lebih banyak sehingga kelarutan meningkat. Suhu tinggi menyebabkan partikel-partikel akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan suhu rendah sehingga kontak antara partikel pigmen dengan air menjadi lebih sering dan lebih efektif, inilah yang menyebabkan pigmen Merah *Monascus* lebih mudah larut pada suhu tinggi. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Jenie dkk (1997) yang menyatakan bahwa mekanisme kelarutan pigmen akibat pemanasan terjadi adanya energi kinetik dari panas.

Rerata kelarutan pigmen merah *Monascus* terendah pada suhu 25°C yaitu sebesar 0,28 sedangkan kelarutan tertinggi pada suhu 100°C sebesar 0,56. Dilihat dari nilai absorbansi yang didapat bahwa suhu tinggi 100°C, serbuk fermentasi mempunyai intensitas warna yang cenderung tinggi dibandingkan pada suhu rendah, hal ini menunjukkan bahwa stabilitas warna dipengaruhi oleh suhu. Pernyataan ini didukung oleh pendapat Helianti (1994), yang melaporkan bahwa pengaruh suhu dapat menyebabkan cepat lambatnya kontak partikel angkak dengan air sehingga semakin tinggi suhu serbuk angkak semakin larut.

4. Uji Pengaruh Suhu Terhadap Pigmen Merah *Monascus*

Secara umum laju reaksi kimia akan meningkat dengan adanya peningkatan suhu. Deteriorisasi atau kerusakan produk pangan umumnya terjadi karena proses kimia maka dalam penelitian ini telah diuji pengaruh suhu terhadap pigmen merah *Monascus* yang dihasilkan dari proses fermentasi. Suhu yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 30°C, 60°C, 121°C dan 150°C, serbuk fermentasi sebanyak 0,6 gram dilarutkan di dalam air lalu dioven pada masing-masing suhu yang telah ditentukan selama 1 jam. Pengaruh suhu terhadap serbuk fermentasi ditentukan dengan melihat nilai OD (*Optical Density*) larutan serbuk fermentasi pada panjang gelombang 500 nm. Hasil uji pengaruh suhu menunjukkan bahwa terjadi penurunan nilai absorbansi pigmen merah *Monascus* pada suhu tinggi yang ditandai dengan penurunan pada intensitas warna produk.



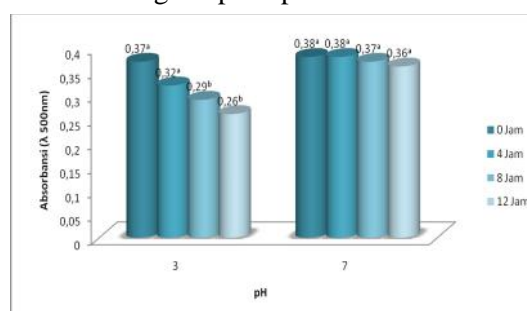
Gambar 6. Pengaruh suhu terhadap pigmen merah *Monascus*

Gambar 6 menunjukkan adanya penurunan intensitas pigmen diduga dikarenakan kerusakan pigmen dan perubahan struktur gugus kromofor pigmen. Nilai absorbansi tertinggi didapat pada suhu 30°C sebesar 0,39 sedangkan nilai absorbansi terendah pada suhu 150°C sebesar 0,22. Kerusakan pigmen ini terjadi karena pigmen mengalami dekomposisi dan perubahan struktur gugus kromofor akibat adanya energi kinetik dari panas. Menurut pernyataan Asadayanti dkk (2010) bahwa pigmen merah tersusun gugus fungsional yang membentuk gugus kromofor dan beberapa ikatan rangkap serta gugus-gugus lainnya. Akibat adanya perlakuan panas, gugus kromofor akan mengalami kerusakan seperti terlepasnya gugus fungsional yang membentuk gugus kromofor atau lepasnya ikatan rangkap pada gugus fungsional yang menyusun gugus kromofor sehingga menyebabkan penurunan intensitas pigmen merah. Hal ini juga didukung oleh penelitian

Fabre *et al.* (2003), yang menyatakan bahwa pigmen merah mengalami degradasi sebesar 55% bila dipanaskan pada suhu 100°C selama 8 jam sedangkan Jenie dkk (1997), menyatakan bahwa suhu lebih dari 150°C selama 1 jam terjadi penurunan yang sangat nyata dari intensitas warna pigmen merah.

5. Uji Pengaruh pH terhadap Pigmen Merah *Monascus*

Hasil analisis pengaruh pH menunjukkan bahwa pigmen merah *Monascus* lebih stabil pada pH netral dibandingkan pada pH asam.



Gambar 7. Pengaruh pH terhadap pigmen merah *Monascus*

Gambar 7 menunjukkan bahwa intensitas warna dari pengaruh pH, maka pigmen merah *Monascus* dapat dikatakan lebih stabil pada kondisi netral (pH 7) dibanding pada kondisi asam (pH 3) yang nilai absorbansinya mengalami penurunan, hal ini terjadi diduga karena pH 3 (asam) banyak mengandung elektron-elektron (H⁺) dibanding pada pH 7 (netral) sehingga pH asam lebih kuat menyerang gugus kromofor dari pigmen dan penurunan intensitas warna lebih besar. Penurunan kestabilan pigmen merah juga dikarenakan percepatan interaksi air dengan pigmen oleh adanya asam seperti putusnya ikatan ester pada pigmen merah *Monascus* sehingga terjadi kerusakan gugus kromofor. Menurut Jenie dkk (1997), zat warna angkak pada kondisi pH netral lebih stabil dari pada kondisi asam. Hal ini didukung oleh penelitian Fabre *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa pigmen angkak paling sensitif terhadap pH asam dan lebih stabil pada pH netral, dimana semakin rendah pH maka penurunan warna akan semakin tinggi, karena dengan pH yang relatif rendah akan terjadi kerusakan gugus kromofor.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan substrat tepung kulit singkong dapat digunakan sebagai media dalam memproduksi pigmen, serta penambahan bekatul mampu meningkatkan intensitas pigmen. Intensitas pigmen merah *Monascus* tertinggi diperoleh dari fermentasi substrat tepung kulit singkong dengan penambahan bekatul sebanyak 10%.

Stabilitas pigmen merah *Monascus* menunjukkan bahwa kelarutan pigmen dalam air dipengaruhi oleh suhu, stabilitas terhadap suhu mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya suhu serta pigmen merah *Monascus* lebih stabil pada pH netral dibandingkan pada pH asam.

DAFTAR PUSTAKA

- Ait, M dan Ida, N. 2010. Penggunaan Zat Additive Alami dan Non Alami di Desa Situ Udik dan Desa Cimanggi Kecamatan Cibubulang kabupaten Bogor. *Jurnal Penyuluhan Pertanian* Vol. 5: hal. 16-23.
- Asadayanti, D., Jenie BSL., Kusumaningrum HD dan Nurhidayat, N. 2010. Peningkatan Kadar Lovastatin Angkak oleh *Monascus purpureus* Ko-kultur dengan *Endomycopsis burtonii*. *Jurnal Ilmu Hayati* 10(3): 313-321.
- Babhita, S., C. R. Soccol and A. Pandey. 2006. Jackfruit seed- a novel substrate for the production of *Monascus* pigments through solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (4) 465-471.
- Badan Pusat Statistik. 2012. *Produksi Buah-buahan Menurut Provinsi*. http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?tabel=1&daftar=1&id_subyek=55¬ab=2 3 April 2014.
- Bhat, S. V., S. S. Khan and T. Amin. 2013. Isolation and characterization of pigmen producing bacteria from various foods for their possible use as biocolours. *Int. J. of Recent Sci. Res.* 4: 1605-1609.
- Bill, G.F., Platas G., Fillola A., Jimenez M.R., Collando J., Vicente F., Martin J., Gonzales., Bur-Zimmermann J., Tormo J.R., and Pelaez F. 2008. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. *J. App. Microbiol.* 104: 1644-1658.
- Carvalho, J. C., B. O. Oishi, A. Pandey and C. R. Soccol. 2005. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48 (6): 885-894.
- Danuri, H. 2008. Optimizing Angkak Pigment and Lovastatin Production by *Monascus purpureus*. *Journal of Biosciences.* p: 61-66.
- Desrosier, N.W. 2008. *Teknologi Pengawetan Pangan*. UI press. Jakarta.
- Fabre, CE., Goma, G., and Blanc PJ. 2003. Production and Food Applications of The Red Pigments *Monascus ruber*. *J Food Sc.* 58 (5): 1099-1102.
- Helianti. 1994. Pemanfaatan Ampas Tahu, Onggok, Dedak unyuk Produksi Pigmen Angkak oleh *Monascus purpureus* BC 88202 dengan Sistem Fermentasi Padat. *Skripsi*. Fateta-IPB, Bogor.
- Herlinda, S., M. D. Utama, Y. Pujiastuti dan Suwandi. 2006. Kerapatan dan viabilitas spora *Beauveria bassiana* (Bals.) akibat subkultur dan pengayaan media, serta virulensinya terhadap larva *Plutella xylostella* (Linn.). *J. HPT Tropika.* 6(2): 70-78.
- Indriati, N dan Andayani, F. 2012. Pemanfaatan angkak sebagai pewarna alami pada terasi udang. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi* (7) 1: 11-20.
- Jenie, B.S.L, Mitrajayanti, K.D, dan Fardiaz, S. 1997. Produksi Konsentrat dan Bubuk Pigmen Angkak dari *Monascus purpureus* serta Stabilitasnya selama Penyimpanan. *Bul. Teknol. Dan Industri Pangan* 8(2):39-46.
- Kusumawati.T.H, Suranto dan S. Ratna. 2004. *Kajian Pembentukan Warna pada Monascus-Nata Kompleks dengan Menggunakan Kombinasi Ekstrak Beras, Ampas tahu dan DedakPadi sebagai Media*. Biodiversitas ISSN: 1412-033X Volume 6, Nomor 3.

- Jurusan Biologi FMIPA Universitas
Sebelas Maret (UNS). Surakarta.
- Nebiyu, A. And Getachew E. 2011. Soaking
and Drying of Cassava Roots Reduced
Cyanogenic Potential of Three
Cassava Varieties at Jimma.
Southwest Ethiopia.
- Oboh, G. 2006. Nutrient enrichment of
cassava peels using a mixed culture of
Saccharomyces cerevisiae and
Lactobacillus spp. solid media
fermentation techniques. *J Biotechnol*
9: 46-49.
- Renawati, J. 2005. Ubi Kayu. Penerbit
Kanisius. Yogyakarta.
- Sheu, F., Wang, C.L., and Shyu, Y.T. 2000.
Fermentation of *Monascus purpureus*
on bacterial cellulose-nata and the
color stability of *Monascus-nata*
complex. *J. Food Science* 65 (2): 342-
345.
- Shi, Y. C. and T. M. Pan. 2011. Beneficial effects
of *Monascus purpureus* NTU 568-
fermented products. *Appl. Microbiol.*
Biotechnol. 90(1): 1207–1217.
- Timotius, K. H. 2004. Produksi pigmen angkak
oleh *Monascus*. *Jurnal Teknol. dan*
Industri Pangan. 15(1): 79-86.
- Winarno, F.G. 2008. Kimia Pangan dan Gizi.
PT. Gramedia, Jakarta.
- Yongsmith, B., Kitprechavanich, V.,
Chitradon, L., Chaisrisook, C., and
Budda, N. 2000. Color mutants of
Monascus sp. KB9 and their
comparative glucoamylases on rice
solid culture. *J. Mol. Catalysis B:*
Enzymatic 10: 263-272.