

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI PIGMEN KAPANG *MONASCUS PURPUREUS* MUTAN ALBINO

Dewi Astriany, Syarif Hamdani, Wiwit Pamuji

Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia

Abstrak

Monascus purpureus mutan albino adalah suatu jenis kapang hasil mutasi *M. purpureus* dengan menggunakan etil metana sulfonat. Kandungan pigmen dari *M. purpureus* mutan albino belum diketahui. Penelitian diawali dengan pembiakan kapang *M. purpureus* mutan albino dalam media padat kemudian dilanjutkan dalam media cair. Ekstraksi dilakukan dengan pelarut etil asetat, etanol, air, dan n-heksan. Identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa ekstrak pigmen *M. purpureus* mutan albino memiliki dua bercak yang identik dengan *M. purpureus* standard yaitu bercak merah dan bercak yang berfluoresensi. Identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan pada ekstrak etil asetat diperoleh pigmen dengan nilai panjang gelombang 409 nm dan 534 nm, sedangkan pada ekstrak etanol diperoleh pigmen dengan panjang gelombang 393 nm dan 497 nm, dan pada ekstrak n-heksan memberikan nilai panjang gelombang 334 nm dan 468 nm.

Kata kunci: *M. purpureus* mutan albino, Kromatografi lapis tipis, Spektrofotometri UV-Vis

Abstract

Monascus purpureus mutant albino is one of mold type obtained by ethyl methane sulphonate mutation of *M. purpureus*. Pigment content of *M. purpureus* albino mutan has not been known yet. The research was initiated by cultivation of *M. purpureus* mutant albino in solid medium followed by cultivation in liquid medium. The pigment was extracted using ethyl acetate, ethanol, water, and n-hexane. Identification by thin layer chromatography showed that pigment extract of *M. purpureus* mutant albino has two spots which are equivalent with pigment extract of *M. purpureus* standard. Identified by using UV-Vis spectrophotometer showed that ethyl acetate extract have pigments with 409 nm wavelength and 534 nm. Ethanol extract showed pigment with 393 nm wavelength and 497 nm. N-hexane extract showed pigment with 334 nm wavelength and 468 nm.

Keywords: *Monascus purpureus* mutant albino, Thin layer chromatography, UV-Vis spectrophotometry

PENDAHULUAN

Monascus purpureus merupakan salah satu jenis kapang *phylum ascomycotina* yang tergolong genus *Monascus*. Hawksworth dan Pitt telah membagi genus *Monascus* menjadi 3 spesies yaitu *Monascus pilosus*, *Monascus purpureus*, dan *Monascus ruber*. *Monascus*

purpureus telah diisolasi di Pulau Jawa oleh Went sejak tahun 1895. Beberapa spesies lain juga telah diisolasi dari beberapa tempat di Cina Selatan, Jepang, dan Asia Tenggara (Blanc, *et al.*, 1998). *Monascus* menghasilkan beberapa pigmen di antaranya adalah ankaflavin dan monascin (pigmen kuning), rubropunctatin dan

monaskorubrin (pigmen jingga), serta monascorubramin dan rubropunctamin (pigmen merah). Dalam keadaan bebas, zat warna ini larut dalam lemak, sedangkan bentuk kompleksnya mudah larut dalam air. Karakteristik tersebut membuat zat warna *Monascus* dapat menggantikan zat warna sintetik untuk makanan dan kosmetik (Pastrana, *et al.*, 1995).

Pada tahun 1977, Wong dan Bau menemukan suatu senyawa antibakteri dalam supernatan kultur *Monascus* yang diberi nama Monasidin A. Karakterisasi selanjutnya oleh Blanc *et al.*, pada tahun 1995 menunjukkan bahwa Monasidin A adalah sitrinin, suatu senyawa nefrotoksik. Penemuan metabolit toksik tersebut menyebabkan keraguan akan keamanan produk-produk *Monascus*. Akan tetapi, sampai saat ini belum ditemukan cara yang efektif untuk menghilangkan metabolit toksik tersebut (Blanc, *et al.*, 1995).

Sitrinin dapat dihilangkan melalui upaya rekayasa genetik terhadap gen-gen yang mengekspresikan enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis sitrinin. Akan tetapi, sampai saat ini gen-gen tersebut belum dapat dikarakterisasi. Bahkan, sistem transformasi genetik yang diperlukan untuk karakterisasi tersebut belum pernah dilaporkan (Hendrickson, *et al.*, 1999). Upaya untuk menghilangkan sitrinin dengan cara membuat mutan kapang *Monascus purpureus* telah dilakukan dengan menggunakan Etil Metana Sulfonat. Galur mutan yang dihasilkan dianalisis

kandungan sitrininnya dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Dinata, 2004), tetapi hingga saat ini belum banyak dilakukan pengujian terhadap pigmen dari mutan tersebut.

METODOLOGI

Alat

Alat yang digunakan antara lain Spektrofotometer ultraviolet-sinar tampak (Beckman DU 600), *orbital shaker* (Janke & Kunkel), laminar air flow (Pharmec lab), timbangan analitis (Ohaus), dan alat-alat gelas standard laboratorium.

Bahan

Bahan yang digunakan untuk proses penelitian ini adalah ekstrak ragi (Oxoid), ekstrak malt (Pronadisa), pepton (Pronadisa), glukosa (Oxoid), dan bacto-agar (Oxoid), n-heksan, etanol 95 %, etil asetat, akuades, dan metilen klorida.

Pembiakan Kapang *M. purpureus* Mutan Albino Dalam Media Padat dan Cair

Kapang *M. purpureus* galur mutan dibiakkan dalam medium YMP padat (ekstrak ragi 0,3%, ekstrak malt 0,3%, pepton 0,6%, glukosa 2% dan bacto agar 2%) selama 7 hari pada suhu kamar. Untuk memperoleh suspensi spora, biakan padat tersebut diambil, digerus halus dan disuspensikan dalam akuades. Suspensi digunakan sebagai inokulum untuk biakan cair pada medium YMP cair (ekstrak ragi 0,3%, ekstrak malt 0,3%, pepton 0,6%,

glukosa 2%). Biakan cair disiapkan dengan mengocok suspensi pada medium YMP cair pada 100 rpm selama 7 hari pada suhu kamar.

Ekstraksi Pigmen

Biakan cair *M. purpureus* mutan albino disaring kemudian dicuci dengan menggunakan etanol dan dibiarkan kering. *Monascus* kering ditimbang dan dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok pertama diekstraksi dengan etil asetat, kelompok ke dua diekstraksi dengan etanol, kelompok ke tiga diekstraksi dengan air, dan kelompok ke empat diekstraksi dengan n-heksan. Semua kelompok diekstraksi dengan menggunakan *orbital shaker* pada 100 rpm selama 24 jam.

Uji Kualitatif Pigmen dengan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometer UV-VIS

Ekstrak etil asetat, ekstrak etanol, ekstrak air, ekstrak n-heksan yang diperoleh diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pengembang metilen klorida : etil asetat (3:7). Identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis juga dilakukan terhadap ekstrak etanol pigmen *Monascus purpureus* standard (*Monascus* yang belum mengalami mutasi) pada plat yang sama. Pengamatan mengacu pada nilai Rf dari masing-masing ekstrak pigmen *Monascus* mutan albino dengan *Monascus* standard. Untuk mendapatkan pigmen tunggal maka

dilakukan kromatografi lapis tipis preparatif yang kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Visibel.

Ekstrak etil asetat, ekstrak etanol, ekstrak air, ekstrak n-heksan juga diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel kemudian dibandingkan dengan *M. purpureus* standard.

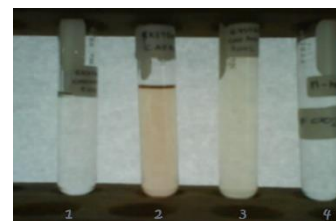
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembiakan Kapang *M. purpureus* Mutan Albino Dalam Media Padat dan Cair

Hasil pertumbuhan kapang *M. purpureus* mutan albino dalam media padat menunjukkan warna putih dengan sedikit warna merah muda, sedangkan dalam media cair menunjukkan intensitas warna merah muda yang semakin meningkat jika dibandingkan terhadap *M. purpureus* galur mutan dalam media padat.

Ekstraksi Pigmen

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan menggunakan 4 pelarut yang berbeda, sehingga diperoleh hasil ekstraksi seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil ekstraksi pigmen *M. purpureus* mutan albino. 1. pada pelarut etil asetat, 2. pada pelarut etanol, 3. pada pelarut air, 4. pada pelarut n-heksan

Untuk melihat intensitas warna dari hasil ekstraksi masing-masing pelarut pada *M. purpureus* mutan albino, maka diperlukan suatu pembandingan yaitu hasil ekstraksi *M. purpureus* standard seperti pada Gambar 2.

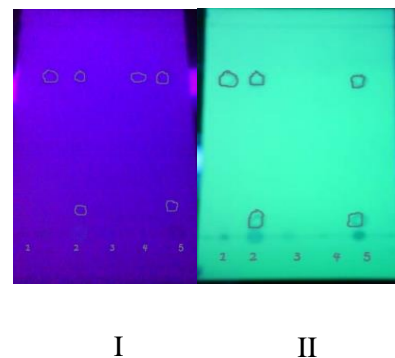


Gambar 2. Hasil ekstraksi pigmen *M. Purpureus* standard. 1. Pada pelarut etil asetat, 2. Pada pelarut etanol, 3. Pada pelarut air, 4. Pada pelarut n-heksan

Dari gambar hasil ekstraksi pigmen *M. purpureus* mutan albino dan *M. purpureus* standard diperoleh informasi bahwa secara visual warna merah pada pelarut etanol *M. purpureus* mutan albino mengalami penurunan intensitas warnanya yang menunjukkan mutasi dengan EMS (Etil Metana Sulfonat) mempengaruhi *M. purpureus* dalam menghasilkan pigmen. Dari pengamatan visual belum dapat diidentifikasi kandungan pigmen dari kapang *M. purpureus* galur mutan. Oleh karena itu, perlu proses selanjutnya, yaitu dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri UV-Vis.

Uji Kualitatif Pigmen Dengan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometer UV-Vis

Salah satu pendekatan untuk analisis kualitatif pada penelitian ini adalah perbandingan antara data retensi solut yang tidak diketahui dengan data retensi baku yang sesuai (senyawa yang diketahui) pada kondisi yang sama. Untuk kromatografi planar (kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis), faktor retardasi (nilai Rf) baku dan senyawa yang tidak diketahui dibandingkan dengan cara kromatografi secara bersama-sama untuk menghilangkan adanya variasi kondisi bahan yang digunakan. Senyawa yang belum diketahui adalah pigmen dalam *M. purpureus* mutan albino, dan senyawa baku yang digunakan adalah pigmen *M. purpureus* standard. Hasil KLT diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil KLT pada silika gel GF₂₅₄ dibawah lampu UV 254 (I) dan 366nm (II), 1.Pelarut etil asetat, 2. Pelarut etanol, 3. Pelarut air, 4. Pelarut n-heksan, 5. Pembandingan (ekstrak pigmen *M. purpureus* standard)

Dari tabel 1 dapat diamati adanya nilai Rf yang sama dengan pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dan n-heksan mengandung metabolit berflouresensi, ekstrak etanol mengandung pigmen merah dan metabolit berflouresensi.

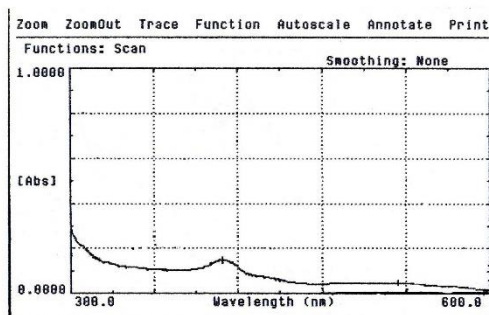
Namun demikian, semua ekstrak tidak memiliki pigmen kuning. Hilangnya pigmen kuning memberi informasi bahwa mutasi dengan zat kimia EMS (Etil Metana Sulfonat) memberikan pengaruh terhadap *M. Purpureus*.

Tabel 1. Nilai Rf hasil kromatografi lapis tipis dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm

Ekstrak	Nilai Rf		
	Bercak merah	Bercak berflouresensi	Bercak kuning
Etil asetat	-	0,78	-
Etanol	0,15	0,78	-
Air	-	-	-
n-heksan	-	0,78	-
Pembanding	0,15	0,78	0,87

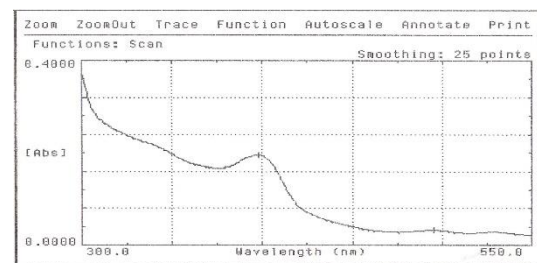
Uji kualitatif ekstrak etil asetat pigmen *M. purpureus* mutan albino menggunakan spektrofotometer UV-Visibel dilakukan dengan membandingkan spektrum *M. purpureus* standard dan *M. purpureus* mutan albino. Spektrum ekstrak etil asetat pigmen *M. purpureus* standard dan *M. purpureus* mutan albino dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.

gelombang 409 nm dengan absorbansi 0,1487 dan 534 nm dengan absorbansi 0,0475.



Gambar 5. Spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat pigmen *M. purpureus* standard

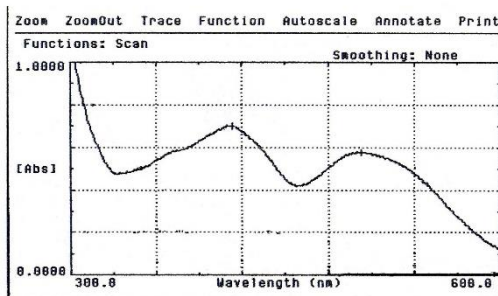
Spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat pigmen *M. purpureus* standard di atas menunjukkan dua puncak pada panjang



Gambar 6. Spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat pigmen *M. purpureus* mutan albino

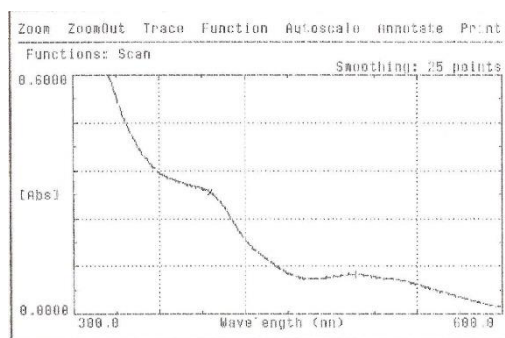
Spektrum ekstrak etil asetat pigmen *M. purpreus* mutan albino tersebut menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 398 nm dengan absorbansi 0,1952 dan 495 nm dengan absorbansi 0,0324. Hal yang sama juga dilakukan terhadap spektrum ekstrak etanol pigmen *M. purpureus* standard dan *M. purpureus*

mutan albino. Hasil spektrum dapat dilihat pada gambar 7 dan 8.



Gambar 7. Spektrum UV-Vis ekstrak etanol pigmen *M. purpureus* standard

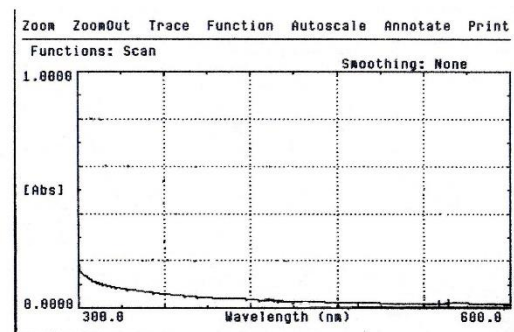
Spektrum UV-Vis ekstrak etanol pigmen *M. purpureus* standard di atas menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang pada 413 nm dengan absorbansi 0,7016 dan 503 nm dengan absorbansi 0,5750.



Gambar 8. Spektrum UV-Vis ekstrak etanol pigmen *M. purpureus* mutan albino

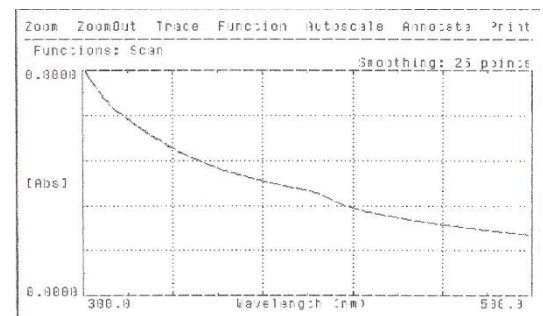
Spektrum uv-vis ekstrak etanol pigmen *M. purpureus* mutan albino di atas menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 393 nm dengan absorbansi sebesar 0,3118 dan 497 nm dengan absorbansi sebesar 0,0996. Hal yang sama juga dilakukan terhadap spektrum ekstrak air *M. purpureus* standard dan *M.*

purpureus mutan albino. Spektrum dapat dilihat pada gambar 9 dan 10.



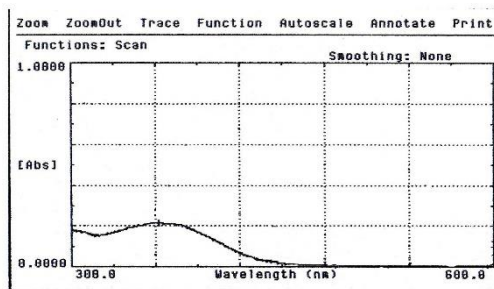
Gambar 9. Spektrum UV-Vis ekstrak air pigmen *M. purpureus* standard

Spektrum ekstrak air pigmen *M. purpureus* standard di atas menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 550 nm dengan absorbansi 0,0109 dan 557 nm dengan absorbansi 0,0230.



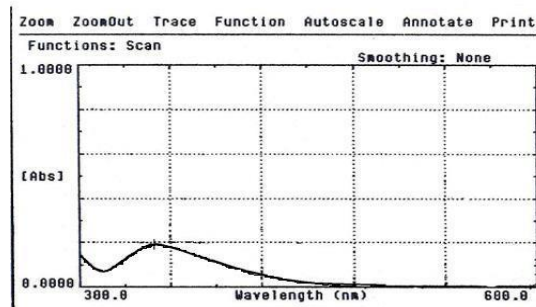
Gambar 10. Spektrum UV-Vis ekstrak air pigmen *M. purpureus* mutan albino

Spektrum ekstrak air pigmen *M. purpureus* mutan albino di atas menunjukkan satu puncak pada panjang gelombang 402 nm dengan absorbansi 0,3685. Hal yang sama juga dilakukan terhadap spektrum ekstrak n-heksan *M. purpureus* standard dan *M. purpureus* mutan albino. Spektrum dapat dilihat pada gambar 11 dan 12.



Gambar 11. Spektrum UV-Vis ekstrak n-heksan pigmen *M. purpureus* standard

Spektrum ekstrak n-heksan pigmen *M. purpureus* standard di atas menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 362 nm dengan absorbansi 0,216 dan 494 nm dengan absorbansi 0,0084.



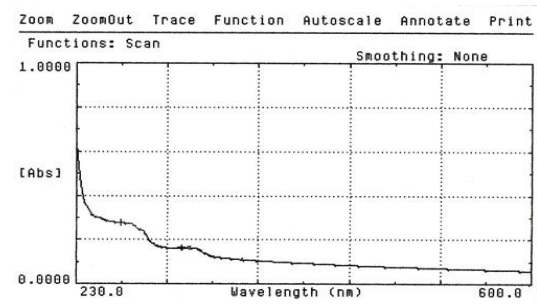
Gambar 12. Spektrum UV-Vis ekstrak n-heksan pigmen *M. purpureus* mutan albino

Spektrum ekstrak n-heksan pigmen *M. purpureus* mutan albino menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 334 nm dengan absorbansi 0,198 dan 468 nm dengan absorbansi 0,0098. Dari gambar tiap ekstrak pigmen *M. purpureus* mutan albino di atas menunjukkan serapan panjang gelombang dan absorbansi yang tidak identik dengan serapan panjang gelombang dan absorbansi tiap ekstrak pigmen *M. purpureus* standard. Hal tersebut memberikan informasi bahwa mutasi

dengan EMS diduga telah memberikan pengaruh terhadap struktur kimia pigmen *M. purpureus*.

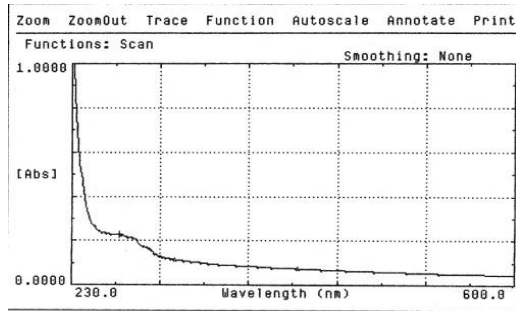
Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dan Spektrofotometri UV-Vis

Untuk mendapatkan pigmen tunggal maka dilakukan kromatografi lapis tipis preparatif terhadap ekstrak etil asetat, ekstrak etanol, ekstrak n-heksan *M. purpureus* mutan albino dan standard, yang kemudian dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Spektrum *M. purpureus* standard dan *M. purpureus* mutan albino dapat dilihat pada gambar 13 dan 14.



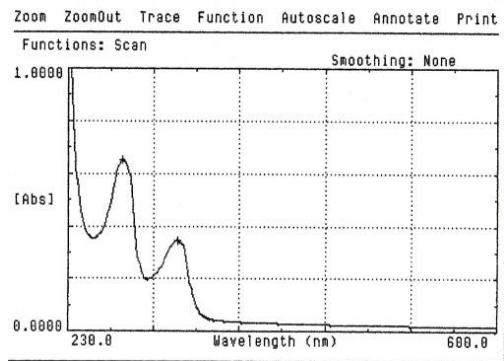
Gambar 13. Spektrum pigmen merah *M. purpureus* standard

Spektrum pigmen merah *M. purpureus* standard di atas menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 266 nm dengan absorbansi 0,2797 dan 316 nm dengan absorbansi 0,1644.



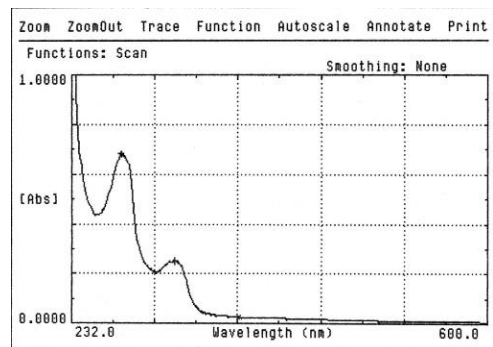
Gambar 14. Spektrum pigmen merah pada ekstrak etanol *M. purpureus* mutan albino

Spektrum pigmen merah *M. purpureus* mutan albino menunjukkan adanya dua puncak pada panjang gelombang 272 nm dengan absorbansi 0,1347 dan 371 nm dengan absorbansi 0,0242. Dari gambar spektrum pigmen merah *M. purpureus* standard dan pigmen merah pada ekstrak etanol *M. purpureus* dapat diamati bahwa bentuk spektrum pigmen merah ekstrak etanol *M. purpureus* mutan albino mempunyai kemiripan dengan bentuk spektrum pigmen merah *M. purpureus* standard, tetapi panjang gelombang dan absorbansinya mengalami pergeseran. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *M. purpureus* mutan albino mengandung pigmen merah dan diasumsikan bahwa mutasi telah mempengaruhi struktur kimia pigmen merah tersebut. Hal yang sama juga dilakukan terhadap metabolit berfluoresensi *M. purpureus* standard dan *M. purpureus* mutan albino, seperti terlihat pada spektrum Gambar 15, 16, dan 17.



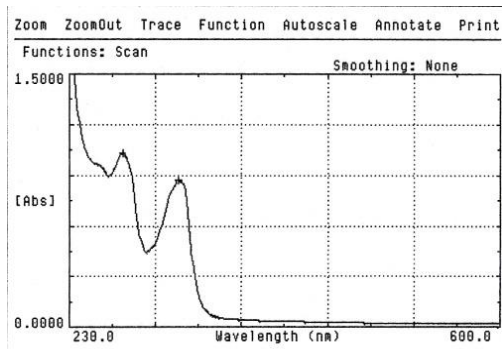
Gambar 15. Spektrum metabolit berfluoresensi pada *M. purpureus* standard

Spektrum metabolit berfluoresensi *M. purpureus* standard di atas juga menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 277 nm dengan absorbansi 0,6525 dan 325 dengan absorbansi 0,3438.



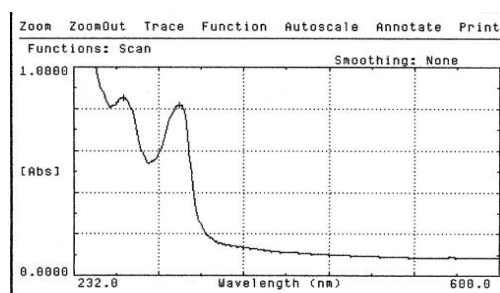
Gambar 16. Spektrum pigmen berfluoresensi pada ekstrak etil asetat *M. purpureus* mutan albino

Spektrum metabolit berfluoresensi pada ekstrak etil asetat *M. purpureus* mutan albino di atas menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 276 nm dengan absorbansi 0,6808 dan 324 nm dengan absorbansi 0,2508.



Gambar 17. Spektrum metabolit berflouresensi pada ekstrak etanol *M. purpureus* mutan albino

Spektrum metabolit berflouresensi pada ekstrak etanol *M. purpureus* mutan albino di atas menunjukkan dua puncak pada panjang gelombang 276 nm dengan absorbansi 1,0321 dan 324 nm dengan absorbansi 0,8718.



Gambar 18. Spektrum metabolit berflouresensi pada ekstrak n-heksan *M. purpureus* mutan albino

Dari tiap gambar spektrum di atas dapat diamati bahwa spektrum metabolit berflouresensi ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, ekstrak n-heksan *M. purpureus* mutan albino mempunyai serapan panjang gelombang dan absorbansi yang identik dengan serapan panjang gelombang dan absorbansi metabolit berflouresensi *M. purpureus* standard. Ini memberikan

informasi bahwa ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, dan ekstrak n-heksan *M. purpureus* mutan albino mengandung metabolit berflouresensi serta diasumsikan bahwa mutasi tidak mempengaruhi struktur kimia metabolit berflouresensi.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa *Monascus purpureus* mutan albino masih mengandung pigmen merah pada ekstrak etanol dan metabolit berflouresensi pada ekstrak etil asetat, ekstrak etanol, dan ekstrak n-heksan.

DAFTAR PUSTAKA

- Blanc, P.J, et al. 1998. "Control of Production of Citrinin by *Monascus*". *The symposium on monascus culture and applications*, Toulouse. France.
- Blanc, P.J, et al. 1995. "Production of Citrinin by Various Species Of *Monascus*". *Biotech Let.*,17(7): 291-294.
- Dinata, I.D. 2004. "Mutasi Kapang *Monascus* sp. Dengan Etil Metana Sulfonat dan Analisis Kadar Sitrinin Hasil Fermentasi Cair Galur Induk dan Mutannya". *Tesis*. Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Hendrickson, L., et al. 1999. "Lovastatin Biosynthesis in *Aspergillus terreus*, Characterization of

Blocked Mutants, Enzym Activities
and Multifunction Polyketide
Syntesis Gene". *Chemistry and
Biology*, 6(7): 429-439.

Pastrana, L.,P.J, et al. 1995. "Production of
Red Pigments by *Monascus ruber*
in Synthetic Media With a Stricktly
Controlled Nitrogen Source".
Process Biochem. 30(4): 333-341.