

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

---

**Submission date:** 15-May-2020 01:51PM (UTC+0700)  
*by Endang Kusdiyantini*

**Submission ID:** 1324807860

**File name:** C47\_OK.pdf (148.23K)

**Word count:** 2069

**Character count:** 12647

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

**Mia Tri Wardani<sup>1</sup>, Endang Kusdiyantini<sup>1</sup>, Anto Budiharjo<sup>1</sup>**  
<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690  
email : [carolinemiaa10@gmail.com](mailto:carolinemiaa10@gmail.com)

**Abstract**

**Abstrak**

## PENDAHULUAN

*Monascus* sp. adalah kapang yang tergolong dalam famili Monascaceae dari filum Ascomycota. *Monascus* memiliki lebih dari 20 spesies yang telah di<sup>6</sup>ui 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 meng<sup>5</sup>ng 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 ( $C_{21}H_{24}O_4$ ). *Monascus* diketahui juga dapat memproduksi citrinin mikotoksin seperti monascopiridin yang baik sebagai metabolit toksik (Rashmi, 2013).

Pigmen alami berwarna merah merupakan <sup>8</sup>asil 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  $\beta$  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).<sup>9</sup> 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 <sup>13</sup>acteriology, UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro dan laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan M<sup>18</sup>matika, Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2017 sampai dengan Mei 2017. Bahan yang digunakan meliputi: isolat *Monascus* sp. koleksi laboratorium Bi<sup>15</sup>knologi, Departemen Biologi FSM UNDIP; media *Potato Dextrose Agar*

(PDA); media *Potato Dextrose Broth* (PDB); NaOH; HCl; saponin 0,5 % dalam *Phosphat Buffer Saline* (PBS); ddH<sub>2</sub>O; 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 cotton 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 <sup>20</sup> *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'-TCCTCCGCTT<sup>10</sup>TGATATGC-3'). Reaksi PCR menggunakan 50  $\mu$ l yang terdiri dari 25  $\mu$ l Kapa, 2  $\mu$ l masing-masing primer ITS, 6  $\mu$ l DNA *template*, dan 15  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Siklus PCR yang digunakan yaitu denaturasi awal 94°C selama 2<sup>14</sup> 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  $\times$  pengenceran/ berat kering pigmen (g)

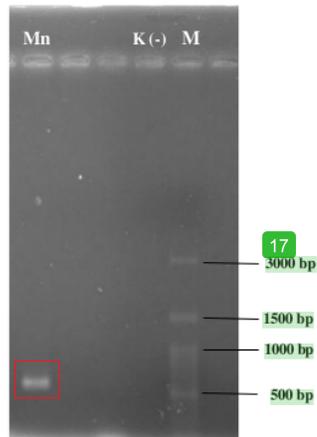
#### Pengukuran Pigmen Intraseluler.

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.

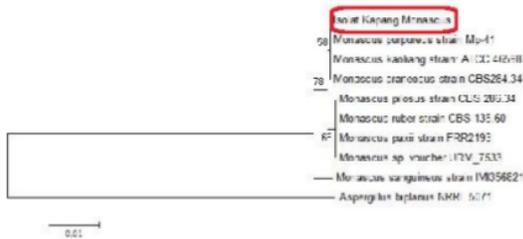
```
GGAAAAAGAGCGGTCCTTCGTGGGACCCAACCTCCACCCGTGAT
TATTGTACCTCCTGTTCCTTCGGCGCGGCCCTGGGGCCGCGGGA
GACATCTTCTCGAACGCTGTCTTGAAGGATTGCTGTGAGTAA
ACATACCAAATCGGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTCCG
GCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTAATTGC
AGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGACGACATTCGCCCCCTG
GTATTCGGGGGCATGCCTGTCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAG
CGCGGCTTGTGTGTTGGGCGCGTCCCCTGCGCTCCGGGCAACG
GGGACGGGCGGAAAGGCAGTGGCGCGCCGCTCCGGTCTCGA
CGTATGGGGCTTGTACCCGCTCAGTAGGTCGGCCGGGGCCTT
GCCCTTCCAACCTTTTTCCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA
```

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%.

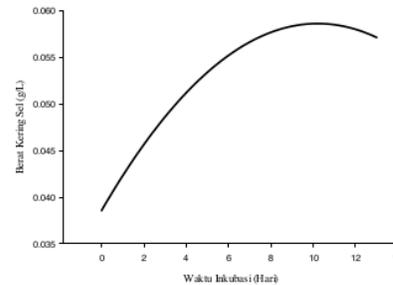


Gambar 3. Pohon Filogenetik berdasarkan *Internal Transcribed Spacer* yang berasal dari isolat kapang *Monascus* menggunakan analisis *Neighbour-Joining* dan uji filogeni *Bootstrap 1000 replicates*

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

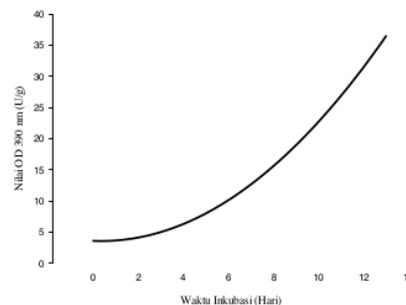
(Gambar 4.) menunjukkan grafik pertumbuhan sel kapang *Monascus*. Kurva pertumbuhan sel kapang *Monascus* yang diperoleh menunjukkan terjadinya fase logaritmik, fase stasioner, serta fase kematian. Fase adaptasi tidak dialami oleh kultur karena medium yang digunakan antara medium starter dan produksi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



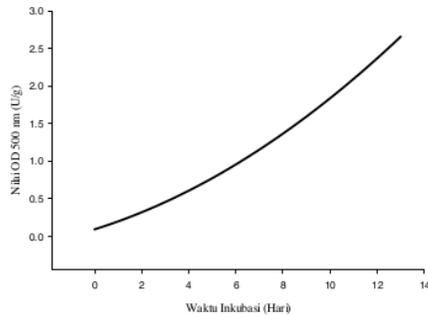
Gambar 4. Kurva pertumbuhan kapang *Monascus* berdasarkan berat kering selama inkubasi 13 hari

### 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**





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

## ORIGINALITY REPORT

23%

SIMILARITY INDEX

20%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

7%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	<a href="https://repository.unpas.ac.id">repository.unpas.ac.id</a> Internet Source	5%
2	<a href="https://media.neliti.com">media.neliti.com</a> Internet Source	4%
3	<a href="https://repository.ipb.ac.id">repository.ipb.ac.id</a> Internet Source	3%
4	<a href="https://docobook.com">docobook.com</a> Internet Source	2%
5	Submitted to Universitas Sanata Dharma Student Paper	1%
6	<a href="https://crmb.aizeonpublishers.net">crmb.aizeonpublishers.net</a> Internet Source	1%
7	Submitted to Sriwijaya University Student Paper	1%
8	<a href="https://www.scribd.com">www.scribd.com</a> Internet Source	1%

9	<a href="https://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Internet Source	1%
10	Submitted to Program Pascasarjana Universitas Negeri Yogyakarta Student Paper	1%
11	<a href="https://fr.scribd.com">fr.scribd.com</a> Internet Source	1%
12	Submitted to Padjadjaran University Student Paper	1%
13	<a href="https://ejournal2.undip.ac.id">ejournal2.undip.ac.id</a> Internet Source	1%
14	Submitted to Universitas Islam Negeri Mataram Student Paper	1%
15	<a href="https://text-id.123dok.com">text-id.123dok.com</a> Internet Source	<1%
16	<a href="https://www.shopback.co.id">www.shopback.co.id</a> Internet Source	<1%
17	<a href="https://link.springer.com">link.springer.com</a> Internet Source	<1%
18	<a href="https://eprints.uny.ac.id">eprints.uny.ac.id</a> Internet Source	<1%
19	Submitted to iGroup Student Paper	<1%

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off

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

---

## GRADEMARK REPORT

---

FINAL GRADE

**/0**

GENERAL COMMENTS

**Instructor**

---

PAGE 1

---

PAGE 2

---

PAGE 3

---

PAGE 4

---

PAGE 5

---

PAGE 6

---

PAGE 7

---

PAGE 8

---