

FERMENTASI DAN KARAKTERISASI BERBAGAI ZAT WARNA *Monascus* YANG DIISOLASI DARI ANGKAK

Astiningsih Diah Pravitasari*, Tiana Milanda

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran Jl. Raya Bandung Sumedang km 21 Jatinangor 45363

Email korespondensi: Astiningsih16001@mail.unpad.ac.id

Diserahkan 04/07/2019, diterima 27/01/2020

ABSTRAK

Angkak adalah produk fermentasi beras oleh kapang *Monascus* sp., yang mengandung berbagai metabolit sekunder. Salah satu metabolit, yaitu zat warna *Monascus*, terdiri dari 3 (tiga) kelompok utama, yaitu zat warna merah (rubropunktamin dan monaskorubramin), jingga (rubropunktatin dan monaskorubrin) serta kuning (monaskin dan ankaflavin). Zat warna ini memiliki aktivitas antiproliferasi, antitumor potensial, antidiabetes, antioksidatif stres, anti-inflamasi dan antiobesitas. Banyaknya aktivitas farmakologi zat warna *Monascus*, menyebabkan perlu dilakukan studi literatur mengenai proses fermentasi dan karakterisasi zat-zat warna tersebut dalam berbagai jurnal elektronik, baik jurnal nasional maupun internasional bereputasi. Hasil penelusuran pustaka menunjukkan bahwa zat warna *Monascus* dapat dihasilkan melalui fermentasi padat dalam medium PDA atau *cornmeal* serta medium cair, yang mengandung surfaktan atau MSG. pH medium di bawah 4,00 akan menyebabkan pembentukan zat warna terkonsentrasi dalam cairan intraseluler, sedangkan pH medium mendekati netral (5,5-6,5) menyebabkan pembentukan zat warna terkonsentrasi dalam cairan ekstraseluler. Seluruh zat warna tersebut dikarakterisasi menggunakan metode HSCCC, HPLC-MS, spektroskopi NMR, *flow cytometry*, spektrofotometer UV/Vis serta Kromatografi Lapis Tipis/KLT.

Kata kunci: Angkak, Zat warna *Monascus*, Fermentasi, Karakterisasi

ABSTRACT

Angkak is one of mold fermented product from Monascus genus that produces various metabolites. Monascus pigments as the example, consists of three main group, red pigment (rubropunctamine and monaskorubramine), orange pigment (rubropunctatine and monaskorubine) and yellow pigment (monascine and ankaflavin). These pigments has functions as anti proliferation, potent anti tumor, antidiabetic, anti oxidative stress, anti-inflammation and antiobesity. The large number of pharmacological activities in Monascus pigments had led to the literature study about fermentation and characterization of these pigments in various electronic journal, both reputable national and international journals. The result show that Monascus pigments can be obtained through solid phase fermentation in PDA or cornmeal medium and liquid phase fermentation, contained surfactant and MSG. Medium pH below 4,00 would make the pigments concentrated in intracellular fluid, while medium pH close to neutral pH (5,5 – 6,5) would make the pigments concentrated in extracellular fluid. These pigments can be characterized through HSCCC method, HPLC-MS, NMR Spectroscopy, Flow Cytometry, UV/Vis Spectrophotometer and Thin Layer Chromatography.

Keywords: Angkak, *Monascus* pigments, Fermentation, Characterization

Pendahuluan

Angkak atau *red fermented rice*/RFR atau koji merah, beras angkak, Beni-Koji, Hong Qu dan Hung-Chu merupakan hasil fermentasi beras oleh jamur *Monascus* sp. *Monascus* sp. merupakan jamur dari genus *Monascus*,

keluarga Monascaceae dan kelas Ascomycetes (Kuo, *et al.*, 2009; Liu, 2006). Angkak telah lama digunakan sebagai bahan tambahan untuk pewarna, penambah aroma serta penyedap rasa pada makanan di Jepang, Cina dan negara-negara Asia Tenggara (Yang, *et al.*, 2014).

Dalam angkak terkandung berbagai metabolit sekunder yang telah teridentifikasi, seperti *Monascus pigments* (MPs), monakolin K, asam γ -aminobutirat (GABA), monaskodilon, sitrinin dan asam dimerumat (Liu, *et al.*, 2011; Cheng, *et al.*, 2011). *Monascus* sp. memproduksi tiga kelompok zat warna, yaitu zat warna jingga, merah dan kuning, yang masing-masingnya terdiri dari dua atau lebih senyawa turunan poliketida (Mukherjee and Singh, 2010), yaitu monaskin dan ankaflavin (kuning), monaskorubramin dan rubropuntamin (merah), serta monaskorubrin dan rubropuntatin (jingga) (Patakova, 2013). Kebanyakan zat warna tersebut dihasilkan dari jalur metabolisme poliketida, walaupun mekanisme pembentukan masih perlu diteliti (Feng, *et al.*, 2012). Zat

Pokok Bahasan

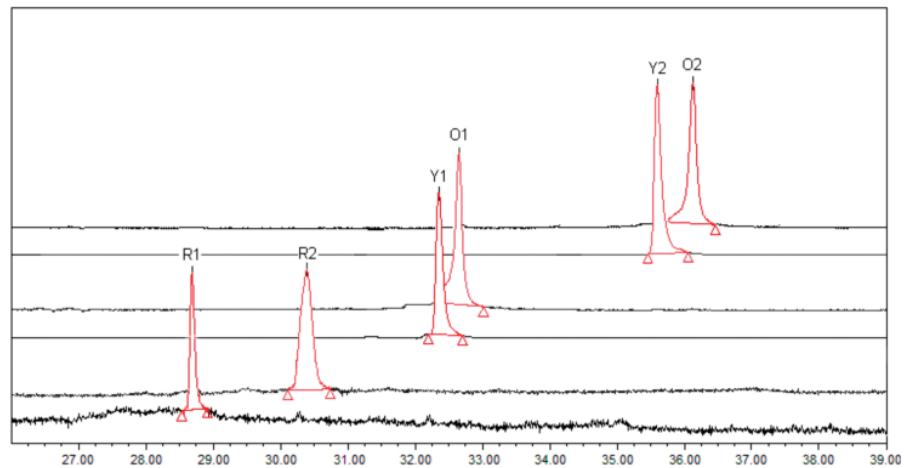
Zat warna *Monascus* dapat dihasilkan melalui beberapa metode fermentasi, yaitu fermentasi fase padat menggunakan medium *potato dextrose agar* (PDA) (Kuo, 2009; Mukherjee, 2011) dan medium beras (Vidyalakshmi, *et al.*, 2009).

Pada penelitian Zheng, *et al.* (2010), zat warna yang diisolasi dari ekstrak etanol 70% angkak dari fermentasi *Monascus* sp. galur FZU04 dapat diidentifikasi menggunakan metode HSCCC (*High-Speed Counter-current Chromatography*). Struktur

warna ini juga mempunyai aktivitas antiproliferasi (Zheng, *et al.*, 2010), antitumor potensial (Hsu, *et al.*, 2011), antidiabetes, anti-oksidatif stres (Shi, *et al.*, 2012), anti-inflamasi (Hsu, *et al.*, 2012; Hsu, *et al.*, 2013) dan antiobesitas (Lee, *et al.*, 2013).

Berdasarkan banyaknya aktivitas farmakologi dari berbagai zat warna *Monascus*, maka perlu dilakukan studi literatur mengenai proses fermentasi dan karakterisasi zat-zat warna yang diisolasi dari angkak. Metode yang digunakan adalah metode deskriptif berdasarkan *literature review*. Data didapatkan secara on line dari berbagai jurnal elektronik seperti ScienceDirect, Schelvier, NCBI dan situs lainnya menggunakan berbagai kata kunci. Data-data tersebut disusun menjadi pokok bahasan, lalu ditarik kesimpulannya.

zat warna tersebut ditentukan menggunakan HPLC-MS (*High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*) dan spektroskopi NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*). Hasil identifikasi menunjukkan 6 (enam) struktur berbeda, yaitu monaskin dan ankaflavin (zat warna kuning), rubropunktatin dan monaskorubrin (zat warna jingga), serta rubropunktamin dan monaskorubramin (zat warna merah) (Gambar 1). Kesamaan dari keenam zat warna ini terletak pada rantai 4-karbonil dan ikatan rangkap terkonjugasi dalam struktur trisiklik.

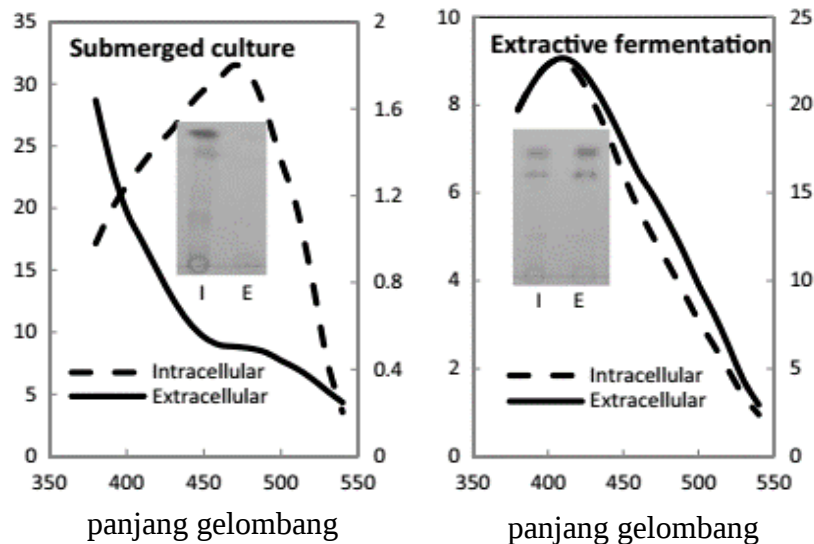


Gambar 1. Kromatogram HPLC dari berbagai zat warna *Monascus*. Gradien elusi: eluen A (air/HAC= 100:10), eluen B (asetonitril/HAC= 100:10): 0 menit, 80% A dan 20% B; 25 menit, 50% A dan 50% B, 26 menit, 15% A dan 85% B (Zheng, *et. al.*, 2010).

Keenam zat warna tersebut diujikan terhadap sel tumor manusia, antara lain sel karsinoma hepatoseluler-HepG2, sel neuroblastoma-SH-SY5Y, sel kanker kolon-HT-29 serta sel adenokarsinoma gaster-BGC-823, AGS dan MKN45 untuk menentukan potensi antiproliferasinya. Apoptosis sel-sel kanker tersebut diwarnai menggunakan annexin V-EGFP/PI, lalu dideterminasikan menggunakan *flow cytometry*. Kedua zat warna jingga, yang dinotasikan dengan huruf O1 dan O2, menunjukkan efek inhibisi yang paling signifikan pada proliferasi sel BGC-823 dibanding zat warna lainnya, bahkan terhadap taksol (senyawa antikanker alami yang paling efisien) sebagai kontrol positif. Perbedaan kemampuan tiga kelompok zat warna dalam mengapoptosis sel kanker memang berhubungan erat dengan struktur kimianya. Zat warna jingga, rubropunktatin, memiliki gugus 6-interval eter, 4-karbonil dan ikatan rangkap terkonjugasi yang terikat pada struktur trisiklik. Struktur seperti inilah yang umumnya

menghasilkan efek antikanker (Zheng, *et al.*, 2010).

Xiong, *et al.* (2014) mengisolasi zat warna *Monascus* sp. dari dua metode fermentasi yang berbeda, yaitu *submerged culture* dan fermentasi ekstratif. Pada *submerged culture*, fermentasi dilakukan dalam air, sedangkan fermentasi ekstraktif dilakukan dalam larutan surfaktan, dengan penambahan Triton X-100. Triton X-100 ini ditambahkan ke dalam medium sebagai surfaktan nonionik, yang akan mengkondisikan kepolaran medium. Kedua proses fermentasi ini menghasilkan akumulasi zat warna jingga dalam cairan intraseluler, yang dapat dipisahkan dengan zat warna kuning dalam cairan ekstraseluler melalui sentrifugasi. Transmittan kedua cairan ini diukur menggunakan densitometer. Hasil pengukuran membentuk puncak-puncak pada panjang gelombang 410 dan 470 nm. (Gambar 2).

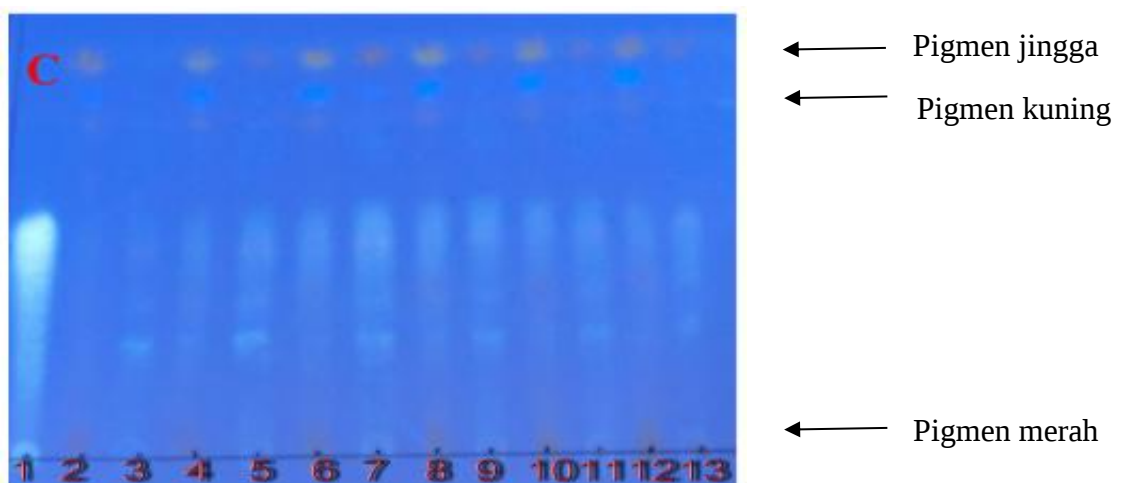


Gambar 2. Hasil pengukuran transmitan cairan intraseluler dan ekstraseluler dari hasil fermentasi *Monascus sp* pada panjang gelombang 410 nm (Xiong, *et. al.*, 2014).

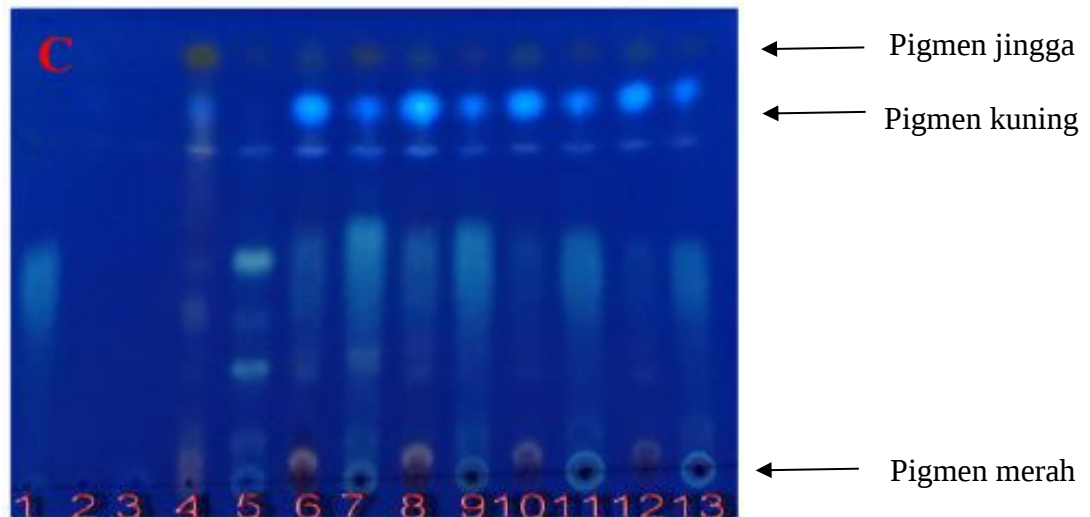
Perbedaan kedua metode fermentasi ini mempengaruhi akumulasi zat warna. Hasil pengukuran menunjukkan adanya *peak* pada panjang gelombang 470 nm, sebagai tempat keberadaan zat warna jingga, yang terakumulasi lebih banyak dalam cairan intraseluler *submerged culture*. Hasil fermentasi ekstraktif menampilkan *peak* pada panjang gelombang 410 nm, yang menunjukkan adanya akumulasi zat warna

kuning pada cairan ekstraseluler (Xiong, *et al.*, 2014).

Pada penelitian Kang, *et al.* (2014), berbagai zat warna *Monascus* dihasilkan dari kultur dalam medium *cornmeal* dan medium MSG, dengan variasi pH awal yang rendah, lalu dikarakterisasi melalui metode kromatografi lapis tipis (Gambar 3 dan Gambar 4). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH terhadap pembentukan zat warn.



Gambar 3. Efek variasi pH awal (2,5, 3,0, 3,5, 4,5, 5,5, dan 6,5) pada fermentasi *Monascus sp.* dalam medium *cornmeal* (Kang, *et. al.*, 2014)



Gambar 4. Efek variasi pH awal yang rendah (2,5, 3,0, 3,5, 4,5, 5,5, dan 6,5) pada fermentasi *Monascus sp.* dalam medium MSG (Kang, *et. al.*, 2014)

Monascus sp difermentasi dengan pH awal yang bervariasi, yaitu pH 2-7,5. Produk fermentasi disentrifugasi, lalu dipisahkan menjadi *extracellular broth* dan *intracellular biomass*. Karakterisasi zat warna dilakukan menggunakan panjang gelombang yang spesifik, yaitu 410 nm untuk zat warna kuning, 470 nm untuk zat warna jingga dan 510 nm untuk zat warna merah, yang divalidasi menggunakan kromatografi lapis tipis. Hasil fermentasi menunjukkan bahwa pH awal mempengaruhi pembentukan dan komposisi zat warna antara cairan intraseluler dan ekstraseluler. Semakin rendah pH yang digunakan, maka pembuatan zat warna semakin terkonsentrasi pada cairan intraseluler, yang ditandai dengan tingginya absorbansi pada 470 nm serta adanya noda pada nR_f 0,95.

Pada pH 5,5, zat warna yang dihasilkan terkonsentrasi pada zat warna ekstraseluler, yang ditandai dengan tingginya absorbansi pada 410 nm serta noda pada R_f 0,7. Hasil ini menunjukkan bahwa zat warna jingga merupakan komponen utama dalam fraksi intraseluler dan zat warna kuning dalam fraksi ekstraseluler (Kang, *et al.* 2014).

Penelitian Kang, *et al.* (2014) diperkuat oleh penelitian Shi, *et al.*, (2015). Karakterisasi zat warna dari *Monascus anka* GIM 3.592 dilakukan menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 350-550 nm dan divalidasi menggunakan kromatografi lapis tipis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin rendah pH awal (pH <4,0), maka pembentukan zat warna akan terkonsentrasi

pada zat warna intraseluler. Pada pH mendekati nilai netral (pH >6,5), zat warna

yang dihasilkan akan terkonsentrasi pada zat warna ekstraseluler.

Simpulan

Angkak mengandung berbagai metabolit sekunder, antara lain berupa tiga kelompok utama zat warna, yaitu zat warna merah (rubropunktamin dan monaskorubramin), jingga (rubropunktatin dan monaskorubrin) serta kuning (monaskin dan ankaflavin). Zat warna ini dapat diperoleh melalui metode fermentasi fase padat dalam media PDA dan *cornmeal* serta fase cair dalam media surfaktan dan MSG. yang pembentukan zat warnanya dipengaruhi oleh pH awal medium.

pH medium di bawah 4,00 akan menyebabkan pembentukan zat warna terkonsentrasi dalam cairan intraseluler, sedangkan penggunaan pH mendekati netral (5,5-6,5) akan menyebabkan pembentukan zat warna terkonsentrasi dalam cairan ekstraseluler. Seluruh zat warna tersebut dapat dikarakterisasi menggunakan metode HSCCC, HPLC-MS, spektroskopi NMR, *flow cytometry*, spektrofotometer UV/Vis serta Kromatografi Lapis Tipis/KLT.

Ucapan Terima Kasih

Dalam penulisan artikel ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih Rizky Abdulah, Ph.D., Apt sebagai dosen pengampu mata kuliah Metodologi Penelitian, juga berbagai pihak lain yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan review artikel ini.

Daftar Pustaka

- Cheng, M. J., Wu, M. D., Chen, I. S., Tseng, M., and Yuan, G. F. 2011. Chemical constituents from the fungus *Monascus purpureus* and their antifungal activity. *Phytochemistry Letters*, 4: 372-376.
- Feng, Y., Shao, Y., and Chen, F. 2012. *Monascus* pigments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96: 1421-1440.
- Hsu, L. C., Hsu, Y. W., Liang, Y. H. and Pan, T. M. 2011. Anti-tumor and anti-inflammatory properties of ankaflavin and monaphilone A from *Monascus purpureus* NTU 568. *J. Agric Food Chem* Volume 59, pp. 1124-1130.
- Hsu, W. H., Lee, B. H., Liao, T. H., Hsu, Y. W., and Pan, T. M. 2012. *Monascus*-fermented metabolite monascin suppresses inflammation via PPAR- γ regulation and JNK inactivation in THP-1 monocytes. *Food Chem Toxicol.*, 50: 1178-1186.
- Hsu, L. C., Liang, Y. H., Hsu, Y. W., Kuo, Y. H., and Pan, T. M. 2013. Anti-inflammatory properties of yellow and orange pigments from *Monascus purpureus* NTU 568. *J Agric Food Chem*, 61: 2796-2802.
- Kang, B., Zhang, X, Wu, Z., and Wang, Z. 2014. Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. *Enzyme and Microbial Technology*, 50: 50-57.
- Kuo, C. F., Chyau, C. C., Wang, T. S., Li, C. R., and Hu, T. J. 2009. Enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Monascus pilosus* fermented products by addition of turmeric to the medium. *J. Agric. Food. Chem.*, 57: 11397-11405.
- Lee, C. L., Wen, J. Y., Hsu, Y. W., and Pan, T. M. 2013. *Monascus*-fermented yellow pigments monascin and ankaflavin showed antiobesity effect via the suppression of differentiation and lipogenesis in obese rats fed a high-fat diet. *J Agric Food Chem*, 61: 1493-1500.
- Lin, C. P., Lin, Y. L., Huang, P. H., Tsai, H. S., and Chen, Y. H. 2011. Inhibition of endothelial adhesion molecule

- expression by *Monascus purpureus*-fermented rice metabolites, monacolink, ankaflavin, and monascin. *J. Sci Food Agric.*, 91: 1751–1758.
- Liu, J. 2006. Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*) for primary hyperlipidemia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Chinese Medicine*, 1:. 1–13. doi: 10.1186/1749-8546-1-4.
- Mukherjee, Gunjan and Singh, Sanjay Kumar. 2011. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 46: 188-192.
- Patakova, P. 2013. *Monascus* secondary metabolites: Production and biological activity. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40: 169-181.
- Shi, Y. C., Liao, V. H. C., and Pan, T. M. 2012. Monascin from red mold dioscorea as a novel antidiabetic and antioxidative stress agent in rats and caenorhabditis elegans. *Free Radic Biol Med.* 52: 109-117.
- Shi, Y. C. and Pan, T. M. 2011. Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented products: A review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90: 1207–1217.
- Visyalakshmi, R, Paranthaman, R, Muruges, S and K. Singaravadivel. 2009. Simulation of *Monascus* pigments by intervention of different nitrogen sources. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(1): 25-28.
- Xiong, X., Zhang, X., Wu, Z., and Wang, Z. 2014. Accumulation of yellow *Monascus* pigments by extractive fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous. *Appl. Microbiol Biotechnol*
- Yang, T., Liu, J., Luo, F., and Lin, Q., 2014. Anticancer properties of *Monascus* metabolites. *Anticancers drugs*, 25(7): 735-744.
- Zheng, Y. Q., Xin, Y. W., Shi, X. N., and Guo, Y. H. 2010. Cytotoxicity of *Monascus* pigments and their derivatives to human cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9523-9528.