

Laporan Kegiatan Penelitian

**Produksi Pigmen Merah dari Kapang
P. purpurogenum dan *M. purpureus* dengan
Fermentasi Cair secara Batch**

Anastasia Prima Kristijarti

Areistya Arlene Arbita



Jurusan Teknik Kimia
Fakultas Teknologi Industri
Universitas Katolik Parahyangan

ABSTRAK

Penicillium purpurogenum, dan *Monascus purpureus* merupakan mikroba yang dapat menghasilkan zat warna. Zat warna dari mikroba ini dapat diproduksi dengan optimum dengan ditentukan jenis substrat pertumbuhannya. Tujuan dari penelitian ini adalah zat warna yang dihasilkan dapat diproduksi dan dapat dipergunakan sebagai zat warna alami, yang aman untuk dikonsumsi dan dapat diproduksi secara massal. Serta stabilitas zat warna tersebut terhadap beberapa perlakuan dalam pengolahan makanan.

Dua jenis kapang yakni *Penicillium purpurogenum*, dan *Monascus purpureus* ditumbuhkan pada empat macam sumber karbon yakni pati jagung, pati kentang, glukosa, dan sukrosa dengan proses fermentasi cair secara batch. Analisis yang dilakukan adalah analisis berat sel kering, analisis absorban, serta analisis kestabilan. Analisis kestabilan zat warna yang dilakukan meliputi cahaya (UV dan sinar matahari), panas (autoklaf 121°C, 15 psi seta autoklaf 105°C, 17,5 psi), bahan pengawet (asam sitrat, asam askorbat, dan sodium bisulfit) dan pH.

Hasil yang didapat dari penelitian ini adalah *Monascus purpureus* menghasilkan konsentrasi zat warna merah yang lebih tinggi daripada *Penicillium purpurogenum*. Medium pertumbuhan dengan sumber karbon dari kentang merupakan medium yang baik untuk pertumbuhan sel dan menghasilkan zat warna yang lebih banyak. Zat warna yang dihasilkan stabil terhadap bahan pengawet, namun tidak stabil terhadap panas, cahaya, dan pH.

DAFTAR ISI

BAB I. PENDAHULUAN	4
1.1. Latar Belakang	4
1.2. Tujuan Khusus	4
1.3. Urgensi Penelitian	5
BAB II. STUDI PUSTAKA	6
2.1. Zat Warna Makanan	6
2.2. <i>Penicillium purpurogenum</i>	8
2.3. <i>Monascus purpureus</i>	9
2.4. Ekstraksi Zat Warna	10
BAB III. METODE PENELITIAN	12
3.1. Prosedur Percobaan	12
3.1.1. Penelitian Pendahuluan	12
3.1.2. Penelitian Utama	13
3.2. Tahap Analisis	13
3.2.1. Perhitungan Berat Sel Kering	13
3.2.2. Pengukuran Konsentrasi Zat Warna Perolehan	13
3.2.3. Analisis pH	13
3.3. Rangkaian Alat	13
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1. Penelitian Pendahuluan	15
4.2. Penelitian Utama	16
4.2.1. Ekstraksi Zat Warna Merah	16
4.2.2. Rendemen Fermentasi	20
4.3. Analisis	22
4.3.1. Perhitungan Berat Kering Sel	22
4.3.2. <i>Yield</i> Biomassa	24
4.3.2. Kestabilan Zat Warna	25
4.3.2.1. Cahaya	25
4.3.2.2. Panas dengan Autoklaf	26
4.3.2.3. Bahan Pengawet	28
4.3.2.4. pH	28
BAB V. KESIMPULAN	31
DAFTAR PUSTAKA	32

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Zat warna makanan yang banyak digunakan saat ini terbagi atas zat warna alami dan zat warna sintetis. Pewarna sintetis umumnya terbuat dari zat kimia dan banyak digunakan karena harganya yang murah serta memiliki stabilitas yang lebih baik bila dibandingkan dengan zat warna alami. Tetapi zat warna sintetis dapat membahayakan kesehatan manusia, bila ditambahkan dalam jumlah berlebih pada makanan, atau dalam jumlah kecil namun dikonsumsi secara terus menerus dalam jangka waktu lama. Selain itu juga dapat menimbulkan dampak bagi lingkungan seperti pencemaran air dan tanah yang juga berdampak secara tidak langsung bagi kesehatan manusia karena di dalamnya terkandung logam berat seperti timbal, tembaga dan seng yang berbahaya.

Selain penggunaan zat warna sintetis, saat ini banyak terjadi penyimpangan dalam penggunaan zat warna berbahaya yaitu zat warna bukan untuk makanan (non food grade), seperti zat warna tekstil yang ditambahkan pada makanan sebagai pengganti zat warna makanan. Hal ini cukup meresahkan masyarakat karena kebanyakan makanan dan minuman biasanya ditambah dengan zat warna. Penggunaan zat warna sintesis yang berbahaya dapat digantikan dengan zat warna alami. Namun, jumlah zat warna alami yang ada saat ini masih terbatas.

Produksi pigmen menggunakan mikroorganisme merupakan alternatif pembuatan zat warna makanan alami. Sel mikroorganisme itu sendiri merupakan pabrik penghasil pigmen sehingga produksi zat warna yang dihasilkan sangat menguntungkan. Zat warna dapat diperoleh jika mikroorganisme telah dimurnikan dan dikultur dalam bentuk tunggal (monokultur) maka tidak perlu mengoleksinya lagi dari alam. Pertumbuhan mikroorganisme yang sangat cepat dapat menghemat waktu dan proses produksinya dapat berlangsung secara kontinyu. Dibandingkan tumbuhan dan hewan, mikroorganisme lebih fleksibel dan mudah dikontrol. Mikroorganisme pun mampu menghasilkan berbagai macam zat warna seperti klorofil dan karotenoid, serta berbagai pigmen lainnya.

1.2. Tujuan Khusus

1. Memproduksi pigmen merah dari kapang *P. purpurogenum* dan *M. purpureus* dengan proses fermentasi cair secara batch.

2. Mengetahui kestabilan zat warna yang dihasilkan terhadap cahaya, panas, bahan pengawet, dan pH.

1.3. Urgensi Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah dapat dilakukan produksi zat warna merah oleh mikroorganisme *P. purpurogenum* dan *M. purpureus* dengan metode fermentasi cair secara batch, yang kemudian diharapkan dapat menjadi zat warna makanan yang aman untuk digunakan oleh masyarakat. Terutama sekali dapat diproduksi dan digunakan untuk pewarna makanan anak-anak dengan stabilitas yang memadai pada produk.

BAB II. STUDI PUSTAKA

2.1. Zat Warna Makanan

Penggunaan zat pewarna untuk makanan banyak ditemui disekitar kita, terutama sekali makanan untuk anak-anak. Pemakaian pewarna makanan (baik yang diizinkan maupun dilarang) diatur dalam SK Menteri Kesehatan RI No. 235/MenKes/Per/VI/79 dan direvisi melalui SK Menteri Kesehatan RI No. 722/MenKes/Per/VI/88 mengenai bahan tambahan makanan.

Zat warna dapat dibagi menjadi tiga, yaitu zat warna alami, zat warna yang identik dengan zat warna alami, dan zat warna sintetis. Zat warna alami adalah zat warna atau pigmen yang berasal dari tumbuhan, hewan, maupun mikroorganisme. Umumnya, pigmen-pigmen ini bersifat tidak cukup stabil terhadap panas, cahaya, dan pH tertentu. Akan tetapi, zat warna alami umumnya aman dan tidak menimbulkan efek samping bagi tubuh. Kelemahan penggunaan zat warna alami antara lain ketersediaannya yang masih terbatas, zat warna alami seringkali memberikan rasa dan flavor khas yang tidak diinginkan, konsentrasi pigmen yang rendah, stabilitas pigmen rendah, keseragaman warna yang kurang baik, serta spektrum warna tidak seluas seperti pada pewarna sintetis.

Zat warna yang identik dengan zat warna alami masih satu golongan dengan kelompok zat warna alami, hanya zat warna ini dihasilkan dengan cara sintesis kimia, bukan dengan cara ekstraksi atau isolasi. Jadi pewarna identik alami adalah pigmen-pigmen yang dibuat secara sintetis yang struktur kimianya identik dengan pewarna-pewarna alami. Golongan pewarna alami ini adalah karotenoid murni antara lain canthaxanthin (merah), apo-karoten (merah-oranye), beta-karoten (oranye-kuning). Semua pewarna-pewarna ini memiliki batas-batas konsentrasi maksimum penggunaan, terkecuali beta-karoten yang boleh digunakan dalam jumlah tidak terbatas. Dalam daftar FDA, pewarna alami dan pewarna identik alami tergolong dalam *uncertified color additives* karena tidak memerlukan sertifikat kemurnian kimiawi.

Zat warna sintetis diperoleh melalui proses sintesis kimia buatan yang mengandalkan bahan-bahan kimia, atau dari bahan yang mengandung pewarna alami melalui ekstraksi secara kimiawi. Contoh zat warna sintetis ialah : FD&C Blue No.1 (atau brilliant blue FCF atau E133), FD&C Red No.40 (atau allura red AC atau E129), FD&C Yellow No.5 (atau tartrazine atau E102), FD&C Blue No.2 (atau

indigotine atau E132), FD&C Green No.3 (atau fast green FCF atau E143), FD&C Red No.3 (atau erythrosine atau E127), FD&C Yellow No.6 (atau sunset yellow FCF atau E110). Kelebihan zat warna sintetis dibandingkan dengan zat warna alami adalah dapat menghasilkan warna yang lebih kuat dan stabil meski jumlah pewarna yang digunakan hanya sedikit. Warna yang dihasilkan pun akan tetap cerah meskipun telah mengalami proses pengolahan dan pemanasan sedangkan zat warna alami mudah mengalami degradasi atau pemudaran pada saat diolah dan disimpan.

Pada Tabel 2.1 ditampilkan beberapa jenis bakteri dan jamur yang dapat memproduksi zat warna beserta jenis pigmen yang dihasilkannya.

Tabel 2.1 Produksi Pigmen dari Mikroba

Molecule	Colour	Microorganism	Status*
Ankaflavin	yellow	<i>Monascus sp. (fungus)</i>	IP
Anthraquinone	red	<i>Penicillium oxalicum (fungus)</i>	IP
Astaxanthin	pink-red	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous (yeast), formerly Phaffia rhodozyma</i>	DS
Astaxanthin	pink-red	<i>Agrobacterium aurantiacum (bacteria)</i>	RP
Astaxanthin	pink-red	<i>Paracoccus carotinifaciens (bacteria)</i>	RP
Canthaxanthin	dark red	<i>Bradyrhizobium sp. (bacteria)</i>	RP
Lycopene	red	<i>Blakeslea trispora (fungus)</i>	DS
Lycopene	red	<i>Fusarium sporotrichioides (fungus)</i>	RP
Melanin	black	<i>Saccharomyces neoformans var. nigricans (yeast)</i>	RP
Monascorubramin	red	<i>Monascus sp. (fungus)</i>	IP
Naphtoquinone	deep blood-red	<i>Cordyceps unilateralis (fungus)</i>	RP
Riboflavin	yellow	<i>Ashbya gossypi (fungus)</i>	IP
Rubrolone	red	<i>Streptomyces echinoruber (bacteria)</i>	DS
Rubropunctatin	orange	<i>Monascus sp. (fungus)</i>	IP
Torularhodin	orange-red	<i>Rhodotorula sp. (yeast)</i>	DS
Zeaxanthin	yellow	<i>Flavobacterium sp. (bacteria)</i>	DS
Zeaxanthin	yellow	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens (bacteria)</i>	RP
β -carotene	yellow-orange	<i>Blakeslea trispora (fungus)</i>	IP
β -carotene	yellow-orange	<i>Fusarium sporotrichioides (fungus)</i>	RP
β -carotene	yellow-orange	<i>Mucor circinelloides (fungus)</i>	DS
β -carotene	yellow-orange	<i>Neurospora crassa (fungus)</i>	RP
β -carotene	yellow-orange	<i>Phycomyces blakesleeanus (fungus)</i>	RP
Unknown	red	<i>Penicillium purpurogenum (fungus)</i>	DS
Unknown	red	<i>Paecilomyces sinclairii (fungus)</i>	RP

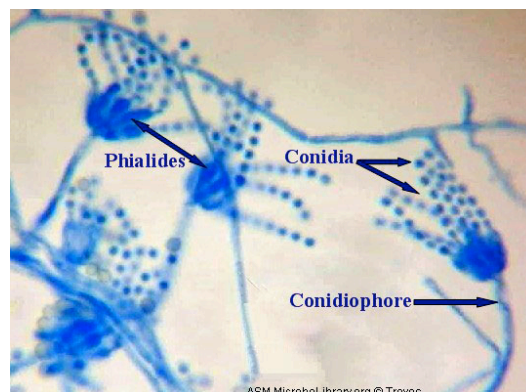
*Industrial production (IP), development stage (DS), research project (RP)

(Sumber : Dufosse, 2006)

2.2. *Penicillium purpurogenum*

Nama *Penicillium* berasal dari *penicillus* yang artinya sikat. Hal ini dikarenakan bentuk *Penicillium* yang biasanya memiliki kepala seperti sikat dan batangnya disebut *conidiophore*. *Conidiophore* bercabang pada ujungnya dan pada akhir setiap cabang terdapat sekumpulan spora yang memproduksi sel yang disebut *phialides/conidiospores*. Spora pada *Penicillium* biasa mengandung pigmen biru ataupun hijau. Spora ini memiliki diameter hanya beberapa mikron saja. (Barron, 2009)

Penicillium merupakan jamur yang hidup secara saprofit dan berkembang biak secara vegetatif dengan konidia. Pada umumnya ditemukan pada roti, kentang, kacang, atau makanan busuk lainnya. Koloni *Penicillium* tumbuh dengan cepat dan berwarna kehijauan (Fry, 2009). Sebagian besar spesies *Penicillium* menyukai temperatur dingin. *Penicillium* merupakan jamur yang mengandung enzim yang dapat memecah bahan organik. *Penicillium purpurogenum* berupa koloni spora berbentuk beludru, berwarna hijau tua dengan miselium berwarna kuning. *Penicillium purpurogenum* memproduksi pigmen merah pada substrat dimana dia tumbuh. (Sen, 1963)



Gambar 2.1 *Penicillium*

(<http://student.cbcemd.edu/courses/bio141/labmanua/lab10/pen02.html>)



Gambar 2.2 *Penicillium purpurogenum*
(<http://www.microbialcellfactories.com>)

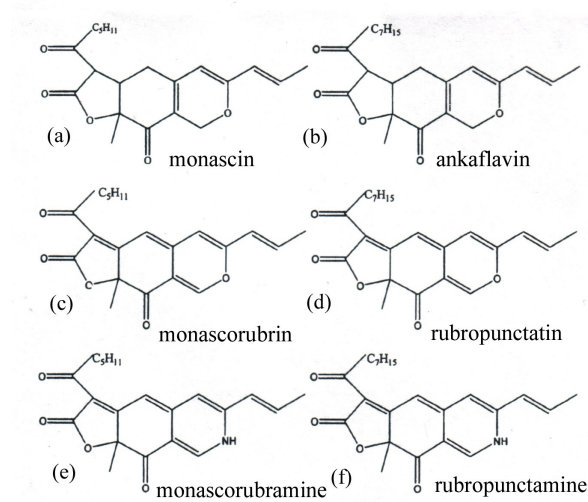
2.3 *Monascus purpureus*

Monascus purpureus mempunyai askospora yang berbentuk bola dengan diameter 5 mikron atau sedikit bulat (6 x 5 mikron). Miselium berwarna putih pada tahap awal dan dengan cepat berganti menjadi merah muda dan kemudian berubah menjadi kuning oranye. Produksi hifa kuning oranye menunjukkan peningkatan keasaman dari medium. Warna merah tua muncul ketika kultur menua.

Monascus akan mengubah substrat menjadi berbagai macam metabolit selama pertumbuhannya. Struktur pigmen yang dihasilkan merupakan metabolit sekunder dan bergantung pada jenis substrat dan faktor spesifik selama proses kultivasi, contohnya pH, temperatur dan kelembaban. Karbon (glukosa, maltosa, etanol) dan sumber nitrogen (pepton dan amonium nitrat) digunakan untuk meningkatkan produksi pigmen. *Monascus* memproduksi paling sedikit 3 tipe pigmen yakni:

- (1) pigmen kuning: monascin ($C_{21}H_{26}O_5$) and ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$)
- (2) pigmen oranye: monascorubrin ($C_{23}H_{26}O_5$) and rubropunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$)
- (3) pigmen merah: monascorubramine ($C_{23}H_{27}NO_4$) and rubropuntamine ($C_{21}H_{23}NO_4$)

Pigmen yang dihasilkan memiliki kelarutan pada air yang rendah, sensitif terhadap panas, tidak stabil pada rentang pH 2-10, memudar bila terkena cahaya. Stabilitas pigmen dipengaruhi oleh keasaman, temperatur, cahaya, oksigen, aktifitas air, dan waktu. (Pattanagul, 2007)



Gambar 2.2 Jenis-jenis Pigmen
(Sumber: Pattanagul, 2007)

2.4 Ekstraksi Zat Warna

Ekstraksi adalah pemisahan satu atau beberapa bahan yang berasal dari suatu padatan atau cairan dengan menggunakan bantuan pelarut. Pemisahan terjadi atas dasar kelarutan yang berbeda dari komponen-komponen yang dipisahkan terhadap dua pelarut yang tidak saling bercampur.

Berdasarkan bentuknya, ekstraksi dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Ekstraksi padat-cair merupakan ekstraksi dimana substansi yang diekstrak terdapat dalam campuran yang berbentuk padat. Ekstraksi cair-cair merupakan ekstraksi dimana substansi yang diekstrak terdapat dalam campuran berbentuk cairan. Ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair selalu terdiri atas sedikitnya dua tahap yaitu pencampuran secara intensif bahan ekstraksi dengan pelarut dan pemisahan kedua fasa cair itu sesempurna mungkin. (Wilujeng, 2009)

Pada saat pencampuran terjadi perpindahan massa dimana ekstrak meninggalkan pelarut yang pertama (media pembawa) dan masuk ke dalam pelarut kedua (media ekstraksi). Sebagai syarat ekstraksi ini, bahan ekstraksi dan pelarut tidak saling melarut atau hanya saling melarut dalam jumlah yang sangat sedikit. Agar terjadi perpindahan massa yang baik untuk meningkatkan performansi ekstraksi maka haruslah diusahakan agar terjadi bidang kontak yang seluas mungkin di antara kedua cairan tersebut. Salah satu cara ialah dengan melakukan pengadukan. (Rahayu, 2009)

Ekstraksi cair-cair dapat dibagi menjadi dua yaitu ekstraksi batch dan ekstraksi kontinu. Dalam ekstraksi *batch*, campuran yang akan diekstrak dicampur berulang kali

dengan pelarut segar dalam sebuah tangki pengaduk (sebaiknya dengan saluran keluar di bagian bawah). Larutan ekstrak yang dihasilkan setiap kali dipisahkan dengan cara penjernihan dengan menggunakan pengaruh gaya berat, misalnya dengan sentrifugasi. Sedangkan pada ekstraksi kontinu dapat dilaksanakan dengan sederhana karena tidak saja pelarut melainkan juga bahan ekstraksi cair secara mudah dapat dialirkan dengan bantuan pompa. Dalam hal ini bahan ekstraksi berulang kali dicampur dengan pelarut atau larutan ekstrak dalam arah berlawanan yang konsentrasinya senantiasa meningkat.

Setiap kali kedua fasa dipisahkan dengan cara penjernihan. Bahan ekstraksi dan pelarut terus menerus diumpankan ke dalam alat, sedangkan rafinat dan larutan ekstrak dikeluarkan secara kontinu. Ekstraktor yang paling sering digunakan adalah kolom-kolom ekstraksi. Di samping itu juga digunakan perangkat pencampur-pemisah (*mixer settler*). Alat-alat ini terutama digunakan bila bahan ekstraksi yang harus dipisahkan berada dalam kuantitas yang besar, atau bila bahan tersebut diperoleh dari proses-proses sebelumnya secara terus menerus. (Rahayu, 2009)

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Prosedur Percobaan

3.1.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menghitung jumlah spora jamur serta membuat kurva tumbuh jamur. Jamur yang digunakan ialah *Penicillium purpurogenum* dan *Monascus purpureus*.

- **Jumlah Spora Jamur**

Kultur dipindahkan dari media agar ke dalam labu erlenmeyer berisi 50 ml aquadest steril secara aseptik

Haemocytometer dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikeringkan

Cover glass diletakkan di atas alat hitung

Suspensi sel jamur (± 1 tetes) diteteskan pada alat hitung hingga menyebar

Alat hitung diletakkan pada mikroskop dengan perbesaran 40x10

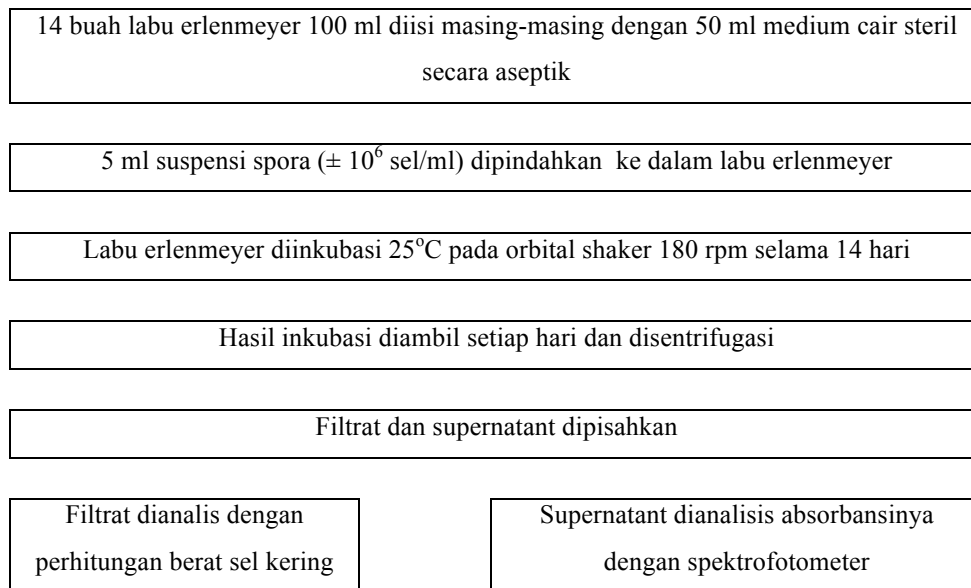
Sampel dihitung pada 5 kotak kecil

Hasil perhitungan dirata-rata kemudian dimasukkan ke persamaan
Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran.

Gambar 3.1 *Flow Chart* Penghitungan Jumlah Spora Jamur

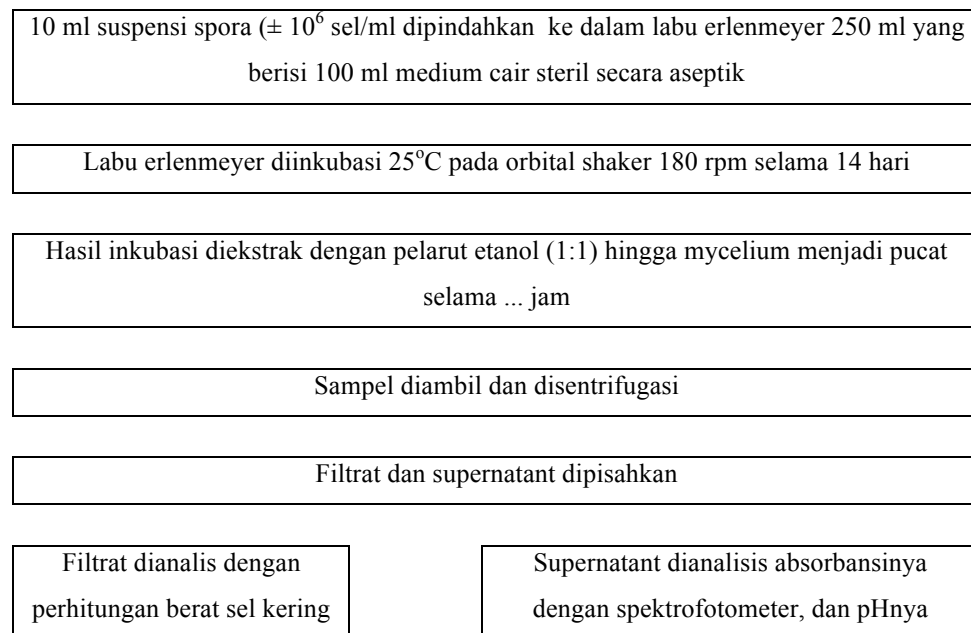
(Sumber : Pradhika, E. Indra. 2008)

- **Kurva Tumbuh Jamur**



Gambar 3.2 *Flow Chart* Kurva Tumbuh Jamur

3.1.2. Penelitian Utama



Gambar 3.3 *Flow Chart* Penelitian Utama

3.2. Tahap Analisis

Hasil dari penelitian pendahuluan dan utama dianalisis dengan menghitung berat sel kering, pengukuran absorban dengan spektrometer, analisis pH.

3.2.1. Perhitungan Berat Sel Kering

Berat sel kering dilakukan untuk membuat kurva pertumbuhan jamur dan bakteri sehingga dapat diamati waktu tumbuh yang optimum untuk memperoleh pigmen zat warna.

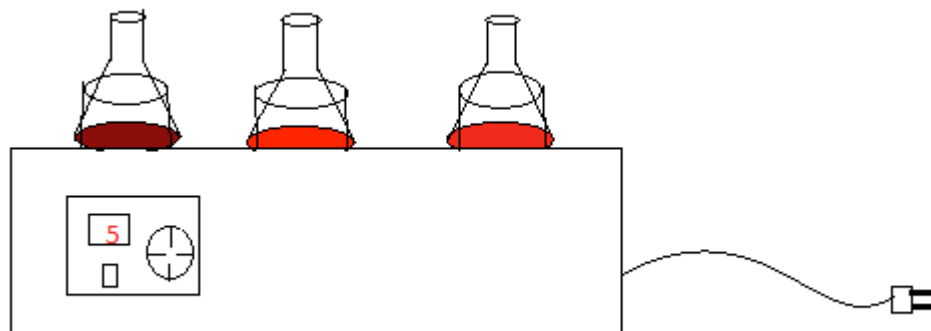
3.2.2. Pengukuran Konsentrasi Zat Warna Perolehan

Pengukuran absorban dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer untuk menganalisis konsentrasi zat warna perolehan. Sebelumnya terlebih dahulu dicari panjang gelombang maksimum dari larutan zat warna.

3.2.3. Analisis pH

Analisis pH perlu dilakukan untuk mengetahui tingkat keasaman yang mungkin terjadi selama proses ekstraksi karena zat warna yang diinginkan berada pada pH netral dimana zat warna ini diharapkan kemudian dapat digunakan pada makanan.

3.3. Rangkaian Alat

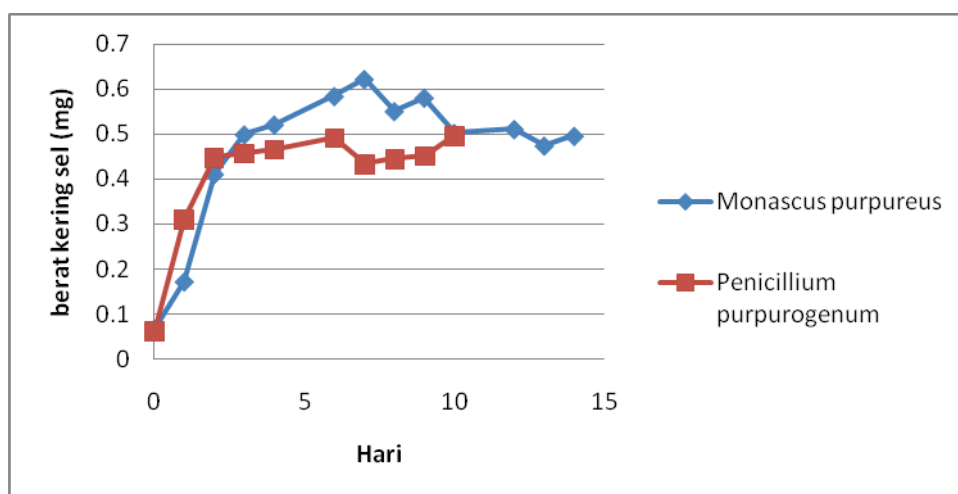


Gambar 3.4 Alat Shaker

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penelitian Pendahuluan

Kurva pertumbuhan *Penicillium purpurogenum* dan *Monascus purpureus* dapat dilihat dalam Gambar 4.1. Diperoleh waktu optimum pertumbuhan kedua kapang ialah pada hari kesepuluh, yang dihitung berdasarkan berat sel kering. *Penicillium purpurogenum* terjadi penurunan berat sel kering sangat drastis pada hari ke 15 hal ini disebabkan pertumbuhan miselium semakin banyak dan cenderung menggumpal satu dengan yang lainnya, sehingga pada saat sampling, banyak yang tidak terbawa.



Gambar 4.1. Kurva Pertumbuhan *Penicillium purpurogenum* dan *Monascus purpureus*

Penicillium purpurogenum, menghasilkan spora kapang berwarna abu-abu kehitaman. Zat warna merah dihasilkan secara ekstraseluler akan meresap pada medium pertumbuhannya. *Monascus purpureus* menghasilkan pigmen ekstraseluler berwarna merah. Warna merah ini muncul pada spora dan hifa kapang. Warna akan menjadi semakin merah dengan bertambahnya usia kultur. Semakin lama waktu fermentasi bukan saja spora dan hifa kapang yang jadi berwarna merah, melainkan medium pertumbuhan kapang juga jadi ikut berwarna merah. Zat warna yang dihasilkan oleh *Monascus purpureus* cenderung akan lebih merah dibandingkan dengan yang dihasilkan oleh *Penicillium purpurogenum*. Hal ini menunjukkan *Monascus*

purpureus lebih banyak menghasilkan zat warna merah. *Penicillium purpurogenum* dan *Monascus purpureus* menghasilkan zat warna merah sehingga standar warna yang digunakan ialah pewarna makanan sintetis berwarna merah yaitu Ponceau 4R. Dalam hal ini digunakan zat warna makanan karena zat warna yang dihasilkan dari kedua kapang ini diharapkan dapat digunakan sebagai pewarna makanan dengan kualitas warna yang sama dengan pewarna sintetis Ponceau 4R.

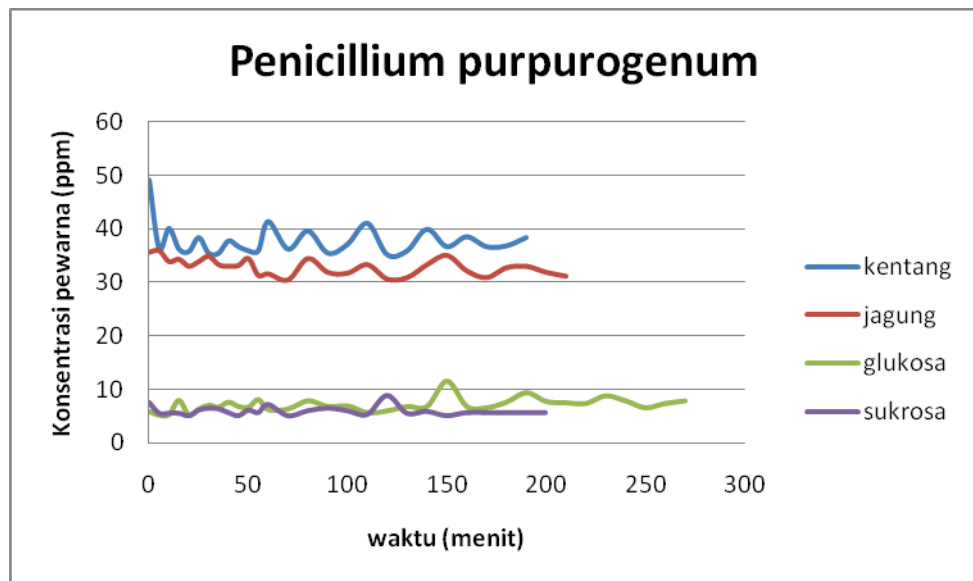
Medium pertumbuhan kapang divariasikan terhadap 4 sumber karbon, yaitu dari kentang, jagung, glukosa, dan sukrosa. Di dalam kentang dan jagung terdapat glukosa bebas yang dapat menjadi salah satu sumber makanan bagi kapang. Untuk itulah dilakukan pengecekan terhadap kandungan glukosa bebas dalam medium pertumbuhan kapang. Kandungan glukosa bebas terbesar terdapat pada medium tumbuh dengan sumber karbon glukosa, kemudian sukrosa, dilanjutkan jagung dan kentang. Namun dalam penelitian ini masih terdapat faktor – faktor lainnya untuk menganalisis pengaruh sumber karbon terhadap pertumbuhan kapang dan konsentrasi zat warna karena pada medium masih terdapat kandungan gula selain glukosa misalnya fruktosa.

4.2 Penelitian Utama

Penelitian utama bertujuan untuk mengamati perubahan konsentrasi zat warna selama proses ekstraksi yang dihasilkan oleh kapang *Penicillium purpurogenum* dan *Monascus purpureus* dalam berbagai jenis substrat. Medium yang digunakan ialah medium cair dengan variasi sumber karbon dalam substrat yaitu kentang, jagung, glukosa, dan sukrosa.

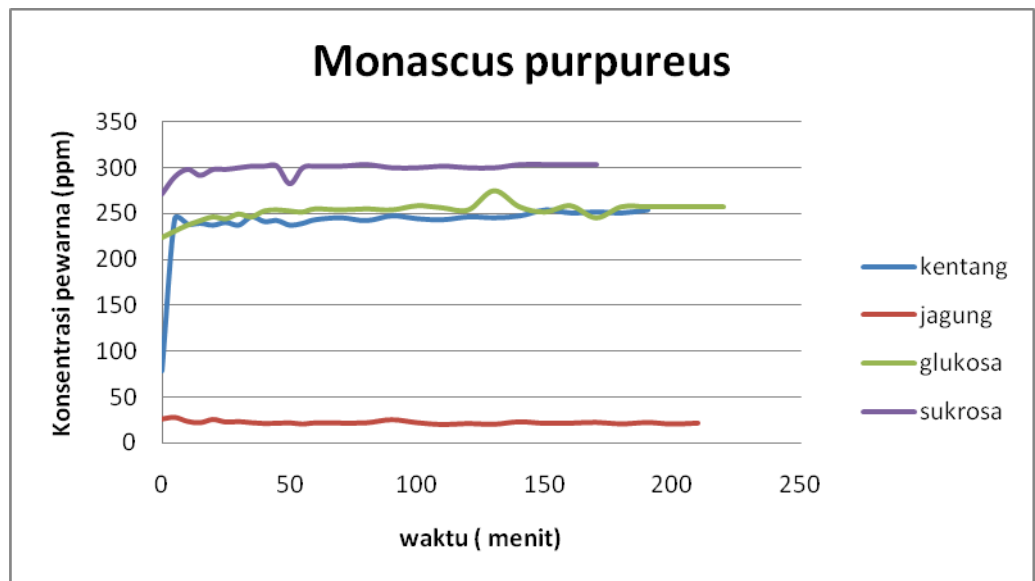
4.2.1 Ekstraksi Zat Warna Merah

Kapang *Penicillium purpurogenum*, konsentrasi pewarna paling tinggi terdapat pada kapang yang tumbuh pada medium dengan sumber karbon kentang, dilanjutkan dengan jagung, kemudian glukosa dan sukrosa. Dari grafik dapat disimpulkan bahwa kapang *Penicillium purpurogenum* tumbuh lebih baik pada pati yang merupakan polisakarida. Hal ini dapat ditemukan juga pada penelitian lain dengan hasil yang sama. (Gunasekaran,2008)



Gambar 4.2. Kurva Konsentrasi Pewarna Terhadap Waktu dalam Proses Ekstraksi pada Kapang *Penicillium purpurogenum*

Konsentrasi pewarna tertinggi terdapat pada kapang *Monascus purpureus* yang tumbuh di medium dengan sumber karbon sukrosa, dilanjutkan dengan glukosa, kemudian kentang dan jagung. Pada Gambar 4.3 dapat dilihat bahwa pada kapang *Monascus purpureus* konsentrasi pewarna paling tinggi ada pada sumber karbon sukrosa, glukosa, kentang dan jagung. Hal ini menunjukkan bahwa kapang *Monascus purpureus* lebih menyukai medium tumbuh dalam sumber karbon yang lebih sederhana. Meskipun sukrosa bukan merupakan monosakarida, tetapi mudah dipecah menjadi gula yang lebih sederhana, kapang dengan bantuan enzim dapat mengubah sukrosa menjadi monosakarida sehingga jumlah monosakarida (glukosa) hasil hidrolisis dari sukrosa menjadi lebih banyak dibandingkan dengan substrat glukosa murni.



Gambar 4.3. Kurva Konsentrasi Pewarna Terhadap Waktu dalam Proses Ekstraksi pada Kapang *Monascus purpureus*

Kentang mengandung unsur – unsur lain seperti nitrogen dan fosfor yang dapat menjadi salah satu sumber makanan bagi pertumbuhan kapang. Sedangkan pada glukosa dan sukrosa hanya ada sumber gula saja. Oleh karena itu, kapang *Penicillium purpurogenum* dapat tumbuh dengan lebih baik pada sumber karbon dari kentang.

Dari kedua gambar dapat dilihat bahwa *Monascus purpureus* secara garis besar menghasilkan konsentrasi zat warna yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Penicillium purpurogenum*. Pada medium kentang nilai konsentrasi pewarna yang didapat dari kapang *Monascus purpureus* lebih besar daripada *Penicillium purpurogenum* sebesar 58%, pada medium glukosa berbeda sebesar 94%, pada medium sukrosa berbeda sebesar 96%, pada medium jagung sebesar 0,4%. Hal ini disebabkan karena pada kentang terdapat mineral-mineral alami yang dapat berfungsi sebagai *traceelement* yang membantu pertumbuhan sel menjadi lebih baik.

Pada awal ekstraksi terjadi perubahan konsentrasi pewarna yang cukup besar pada kapang *Monascus purpureus* hingga kemudian konsentrasi pewarna cenderung konstan. Sedangkan pada kapang *Penicillium purpurogenum* konsentrasi pewarna cenderung konstan sepanjang proses ekstraksi. Dalam hal ini, maksud konstan ialah suatu kondisi di mana tidak ada lagi pewarna yang dapat diekstrak oleh etanol. Hal ini dapat terjadi

karena pada kapang *Monascus purpureus*, etanol dapat mengekstrak zat warna merah yang terdapat pada spora dan hifa kapang tersebut. Hal tersebut tidak terjadi kapang *Penicillium purpurogenum* karena spora kapang ini berwarna abu-abu kehitaman sehingga ekstraksi zat warna merah hanya terjadi pada sisa zat warna yang menempel pada permukaan spora kapang.



Gambar 4.4. Zat Warna yang Dihasilkan dari Kapang *Penicillium purpurogenum* pada Berbagai Sumber Karbon

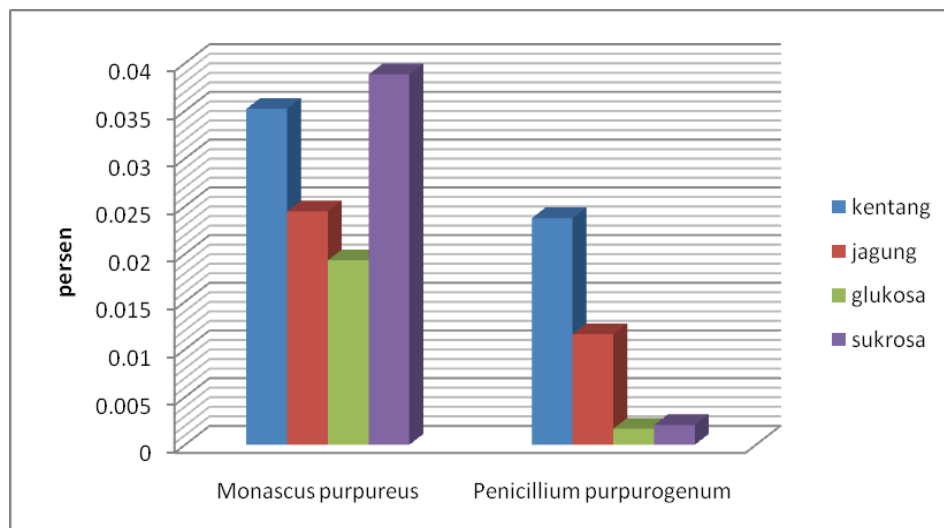


Gambar 4.5. Zat Warna yang Dihasilkan dari Kapang *Monascus purpureus* pada Berbagai Sumber Karbon

4.2.2 Rendemen Fermentasi

Dari hasil perhitungan rendemen zat warna diperoleh nilai rendemen pada *Monascus purpureus* lebih besar dibandingkan dengan rendemen pada *Penicillium purpurogenum*. Hal ini sesuai dengan konsentrasi pewarna yang diperoleh seperti terlihat pada Gambar 4.4 dan Gambar 4.5.

Pada kapang *Penicillium purpurogenum*, rendemen fermentasi lebih besar pada kapang yang tumbuh di medium dengan sumber karbon kentang dan jagung. Pada kentang dan jagung terdapat pati dimana pati merupakan polisakarida sehingga perlu dipecah terlebih dahulu sebelum dapat dikonsumsi. Pati merupakan homopolimer glukosa dengan ikatan alpha glikosidik yang terdiri dari molekul amilosa dan amilopektin. Pati pada bahan pangan berada di dalam granula pati. Granula pati tersebut bentuk dan ukurannya berbeda-beda tergantung dari sumber pati. Proses pembengkakan granula pati terjadi melalui proses gelatinisasi.



Gambar 4.6. Rendemen Hasil Fermentasi Zat Warna

Proses gelatinisasi adalah proses pemanasan larutan pati pada suhu gelatinisasi dimana ikatan H₂ menjadi putus sehingga gugus hidroksil yang bebas akan menyerap air dan menyebabkan pembengkakan granula pati sehingga pati dapat tergelatinisasi dalam air. Suhu gelatinisasi adalah suhu pada saat granula mulai mengembang sampai hampir 100% tergelatinisasi. Proses ini mengubah kristalinitas amilosa dan mengganggu struktur heliksnya yang membuat ikatan pati menjadi terbuka sehingga lebih banyak gula yang dapat dicerna oleh kapang. Molekul-molekul amilosa dan amilopektin secara fisik hanya dipertahankan oleh adanya ikatan hidrogen lemah. Atom hidrogen dari gugus hidroksil akan tertarik

pada muatan negatif atom oksigen dari gugus hidroksil yang lain. Bila suhu suspensi naik, maka ikatan hidrogen makin lemah, sedangkan energi kinetik molekul-molekul air meningkat, memperlemah ikatan hidrogen antar molekul air. (Al – Maydani, 2010)

Proses gelatinisasi dipengaruhi oleh kandungan amilosa dan amilopektin. Amilosa adalah polimer glukosa sederhana yang tidak bercabang, sehingga lebih terikat dengan kuat serta lebih sulit tergelatinisasi dan tercerna. Sementara itu, amilopektin adalah polimer glukosa sederhana yang bercabang serta memiliki ukuran molekul lebih besar dan lebih terbuka sehingga lebih mudah tergelatinisasi dan dicerna. (Jay, 2008) Kandungan amilosa pada jagung lebih besar daripada kentang. Oleh sebab itu, pati dari kentang lebih mudah dicerna daripada pati yang berasal dari jagung.

Tabel 4.1 Kandungan Amilosa dan Amilopektin pada Beberapa Sumber Pati (Wardhana, 2010)

Sumber Pati	Amilosa	Amilopektin
Jagung	26	74
Gandum	25	75
Beras	17	83
Kentang	21	79
Ubi Kayu	17	83
Singkong	17	83

Sukrosa merupakan disakarida dan glukosa merupakan monosakarida sehingga lebih mudah dikonsumsi oleh kapang. Sukrosa dapat dikonsumsi oleh *Monascus purpureus* karena enzim-enzim hidrolitik yang dimiliki kapang ini seperti α -amilase, β -amilase, glukoamilase dan α -glukosidase sehingga dapat memecah sukrosa menjadi monosakarida.

Tabel 4.2 Analisis Varians Rendemen Fermentasi

Variasi	Jumlah Kuadrat	DOF	Kuadrat Rata - rata	Fo
Perlakuan	0,0002	3	0,0001	0,8716
Blok	0,0009	1	0,0009	10,3907
Kesalahan percobaan	0,0003	3	0,0001	
Total	0,0014	7		

F tabel perlakuan = 9,28 F tabel blok = 10,13

Berdasarkan rancangan penelitian yang dilakukan dengan metode acak lengkap, ditemukan hasil bahwa jenis sumber C tidak berpengaruh dan jenis kapang berpengaruh terhadap rendemen fermentasi. Hasil analisis varians dari rendemen fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.2.

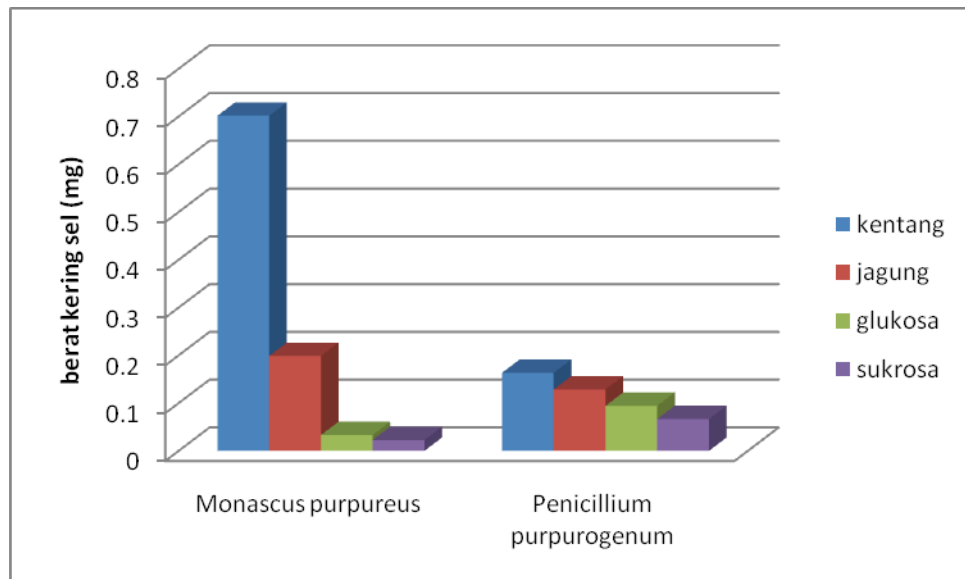
4.3 Analisis

Analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah perhitungan berat kering sel serta kestabilan zat warna. Analisis kestabilan zat warna meliputi cahaya, panas dengan autoklaf, bahan pengawet, dan pH.

4.3.1 Perhitungan Berat Kering Sel

Perhitungan berat sel kering dilakukan untuk mengetahui jumlah sel yang terdapat pada medium selama periode masa tertentu. Semakin besar nilai berat sel kering yang diperoleh menunjukkan bahwa kapang tersebut bertumbuh semakin baik. Hasil pertumbuhan ini dapat juga menunjukkan kecocokkan kapang dengan medium tumbuh pada berbagai sumber karbon.

Kapang *Penicillium purpurogenum* dan *Monascus purpureus*, keduanya tumbuh paling baik pada medium dengan sumber karbon yang terdapat pada kentang, kemudian jagung, glukosa dan sukrosa. Namun pada kedua kapang tersebut memiliki nilai berat sel kering yang berbeda. Nilai berat sel kering dapat digunakan untuk menentukan seberapa banyak kapang yang dapat tumbuh. Pada Gambar 4.7 menunjukkan bahwa *Monascus purpureus* menghasilkan berat sel kering lebih banyak dibandingkan dengan *Penicillium purpurogenum*.



Gambar 4.7. Kurva Berat Kering Sel

Kapang tumbuh lebih baik pada medium yang mengandung lebih banyak gula. Pada medium polisakarida terdapat kandungan gula yang lebih banyak dibandingkan medium lainnya, oleh karena itu hasil pertumbuhan kapang pada medium yang kandungan polisakarida lebih banyak akan semakin baik. Pada medium kentang dan jagung mengandung lebih banyak mineral yang berperan sebagai *trace element*, walaupun dalam jumlah yang relatif kecil tetapi berperan dalam pertumbuhan kapang. Hal ini tidak terjadi pada medium yang hanya mengandung gula saja (baik glukosa maupun sukrosa).

Tabel 4.3 Analisis Varians Berat Kering Sel

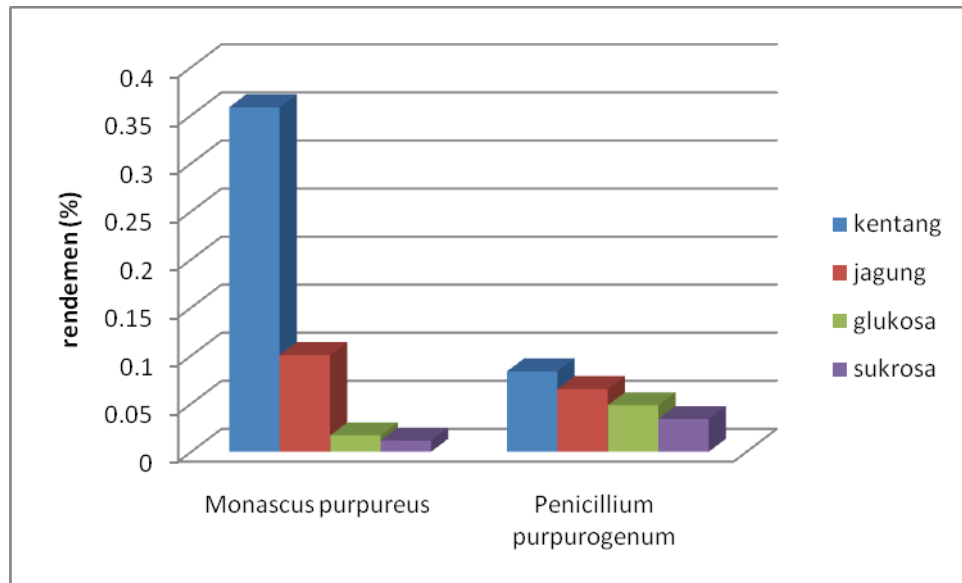
Variasi	Jumlah Kuadrat	DOF	Kuadrat Rata - rata	Fo
Perlakuan	0,1917	3	0,0639	1,6182
Blok	0,0316	1	0,0316	0,8011
Kesalahan percobaan	0,1185	3	0,0395	
Total	0,3418	7		

F tabel perlakuan = 9,28 F tabel blok =10,13

Menurut rancangan penelitian metode acak lengkap, jenis sumber C dan jenis kapang tidak berpengaruh terhadap berat sel kering. Hasil analisis varians dari berat kering sel dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.3.2 Yield Biomassa

Yield biomassa menunjukkan banyaknya substrat yang digunakan untuk proses metabolisme. Pada *Monascus purpureus* dan *Penicillium purpurogenum*, *yield* biomassa tertinggi terdapat pada sumber karbon kentang, kemudian jagung, sukrosa, dan glukosa. Demikian pula pada *Penicillium purpurogenum* diperoleh hasil yang sama.



Gambar 4.8. Yield Biomassa

Nilai *yield* biomassa *Monascus purpureus* pada sumber karbon kentang sebesar 0,358% yang artinya dari 100 gr medium dapat dikonsumsi sebesar 0,358 gr. Nilai *yield* *Monascus purpureus* pada sumber karbon jagung, glukosa, dan sukrosa berturut – turut ialah sebesar 0,101%, 0,017%, dan 0,012%. Nilai *yield* *Penicillium purpurogenum* pada sumber karbon kentang, jagung, glukosa, dan sukrosa berturut – turut sebesar 0,083%, 0,065%, 0,048%, dan 0,034%.

Tabel 4.4 Analisis Varians *Yield* Biomassa

Variasi	Jumlah Kuadrat	DOF	Kuadrat Rata - rata	Fo
Perlakuan	0,0559	3	0,0186	1,8704
Blok	0,0094	1	0,0094	0,9483
Kesalahan percobaan	0,0299	3	0,0100	
Total	0,0952	7		

F tabel perlakuan = 9,28 F tabel blok = 10,13

Berdasarkan rancangan penelitian yang dilakukan dengan metode

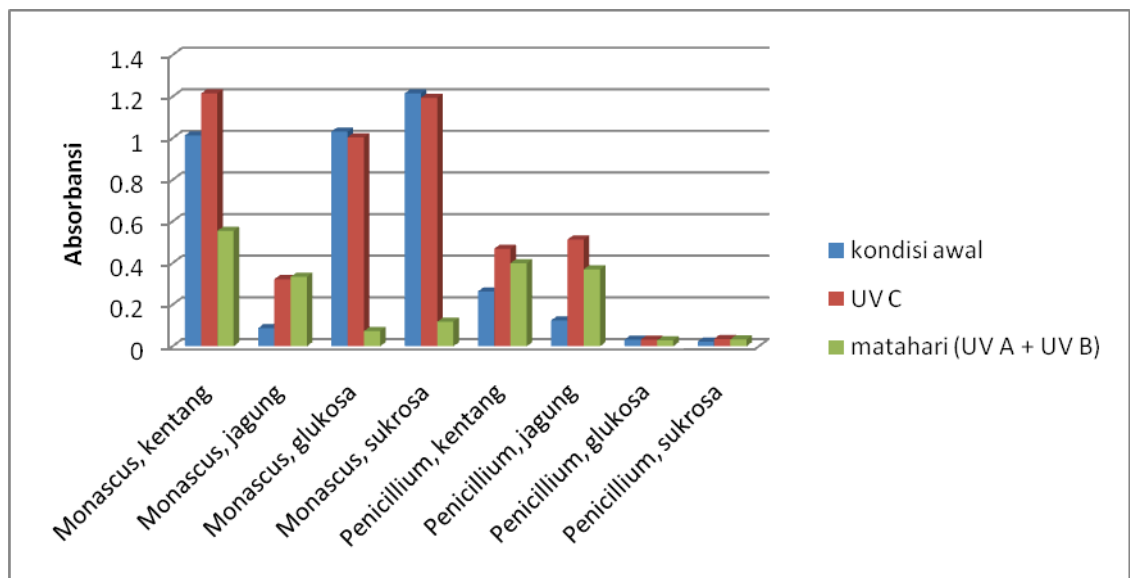
acak lengkap didapat hasil bahwa jenis kapang dan jenis sumber C tidak berpengaruh terhadap *yield* biomassa. Hasil analisis varians dari *yield* biomassa dapat dilihat pada Tabel 4.4.

4.3.3 Kestabilan Zat Warna

Zat warna yang diperoleh dianalisis kestabilannya. Uji stabilitas ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh berbagai kondisi lingkungan terhadap karakteristik zat warna. Analisis kestabilan zat warna yang dilakukan meliputi kestabilan zat warna terhadap cahaya, panas dengan autoklaf, bahan pengawet, dan berbagai kondisi pH.

4.3.3.1 Cahaya

Analisis kestabilan cahaya bertujuan untuk mengamati perubahan yang terjadi bila zat warna disimpan dalam pencahayaan tertentu. Analisis ini dilakukan pada dua kondisi, yaitu dengan sinar UV dan sinar matahari. Zat warna yang dihasilkan disinari selama 4 jam. Untuk sinar matahari dilakukan pada pukul 11.00 hingga pukul 15.00.



Gambar 4.11 Absorbansi Zat Warna Hasil Pencahayaan

Sinar UV terdiri dari tiga macam yaitu, UV A, B, dan C dengan rentang panjang gelombang berturut – turut sebesar 400 – 315 nm, 315 – 280 nm, dan 280 – 100 nm. UV B berperan dalam pembentukan vitamin D namun dapat

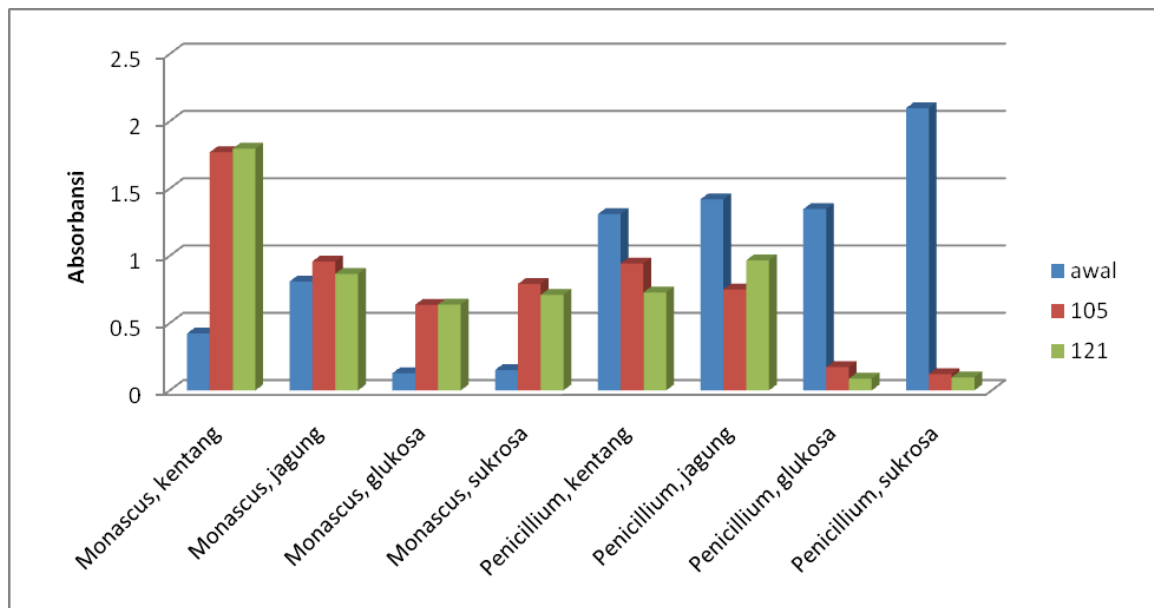
menyebabkan kulit terbakar dan penyakit kanker kulit. UV C dapat digunakan untuk proses sterilisasi karena dapat membunuh bakteri. Seluruh sinar UV dapat mengubah serat kolagen sehingga mempercepat efek penuaan kulit. UV A dan B dapat menghancurkan vitamin A tetapi UV A tidak dapat mengubah struktur DNA seperti pada UV B dan UV C. Akan tetapi, UV A dapat mengaktifkan zat radikal yang kemudian dapat menghancurkan DNA juga. (Wikipedia, 2010)

Sinar UV yang digunakan dalam penelitian ini ialah dengan menggunakan lampu UV C. Sinar matahari mengandung sinar UV A, B, dan C. Namun, sinar UV C tidak dapat menembus ke bumi karena tertahan oleh lapisan ozon. Oleh karena itu, pencahayaan dalam penelitian ini dapat dibedakan dengan sinar matahari yang terdiri dari sinar UV A dan B saja.

Pada analisis zat warna yang dihasilkan kapang *Monascus purpureus*, pencahayaan mempengaruhi konsentrasi pewarna. Zat warna yang disinari dengan sinar UV C mengalami peningkatan absorbansi sedangkan zat warna yang disinari dengan sinar UV A dan UV B mengalami penurunan absorbansi. Zat warna yang dihasilkan pada *Penicillium purpurogenum* juga menunjukkan ketidakstabilan saat disinari dengan UV A dan UV B.

4.3.3.2 Panas dengan Autoklaf

Tujuan dari analisis kestabilan terhadap panas dengan autoklaf ialah untuk mengamati perubahan yang terjadi pada zat warna bila dipanaskan. Filtrat zat warna yang diperoleh masih mengandung pelarut etanol yang mudah terbakar bila dipanaskan. Untuk mencegah hal tersebut, maka filtrat zat warna yang akan dipanaskan terlebih dahulu dipisahkan dari pelarut etanol dengan menggunakan evaporator vakum.



Gambar 4.12 Absorbansi Zat Warna Hasil Pemanasan dengan Autoklaf

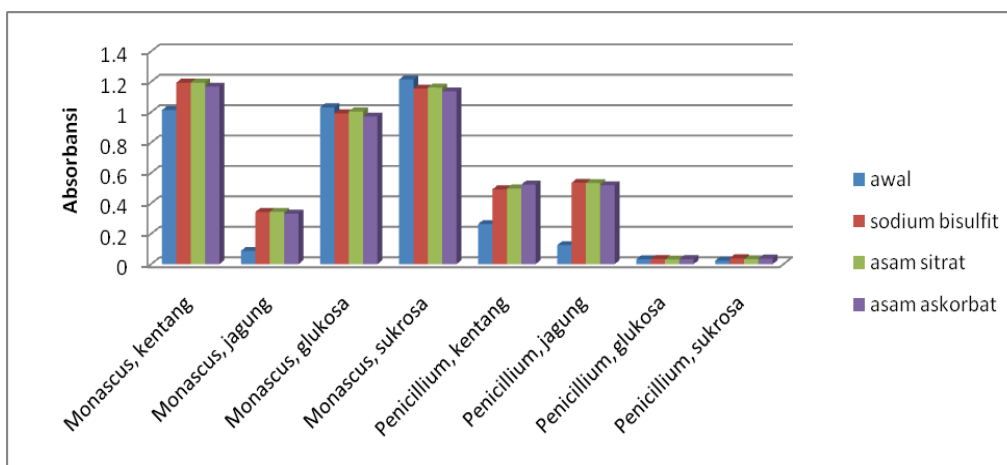
Filtrat zat warna yang telah bebas dari pelarut alkohol terlebih dahulu diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh adanya pelarut etanol dalam zat warna. Kemudian zat warna dipanaskan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 15 psi dan 105°C, 13 psi selama 20 menit. Setelah dipanaskan, sampel zat warna diukur lagi absorbansinya untuk mengetahui pengaruh pemanasan terhadap zat warna.

Zat warna memiliki limit panas tertentu dan tidak semua zat warna dapat tahan terhadap panas. Degradasi warna muncul apabila warna diproses di atas temperatur dekomposisi pigmen. Secara umum, degradasi warna merupakan perubahan yang dapat ditoleransi secara kasat mata. (Herbst, 2002)

Pemberian panas menunjukkan ketidakstabilan pada zat warna yang dihasilkan. Pada *Monascus purpureus*, pemberian panas dapat meningkatkan konsentrasi pewarna. Sedangkan pada *Penicillium purpurogenum* terjadi hal sebaliknya dimana zat warna yang dihasilkan menurun dengan terjadinya peningkatan panas. Hal ini terjadi karena pigmen mengalami dekomposisi menjadi senyawa derivat maupun senyawa kompleksnya. (Kaur, 2009)

4.3.3.3 Bahan Pengawet

Analisis ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan zat warna bila saat penggunaannya ditambahkan bahan pengawet tertentu pada suatu bahan. Bahan pengawet yang digunakan ialah sodium bisulfat, asam sitrat, dan asam askorbat. Bahan pengawet tersebut memiliki konsentrasi 0,1% w/v. Filtrat zat warna ditetesi dengan bahan pengawet kemudian setelah satu jam filtrat tersebut diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer. Secara garis besar, zat warna yang dihasilkan menunjukkan kestabilan pada ketiga bahan pengawet yang digunakan.



Gambar 4.13 Absorbansi Zat Warna Hasil Penambahan Bahan Pengawet

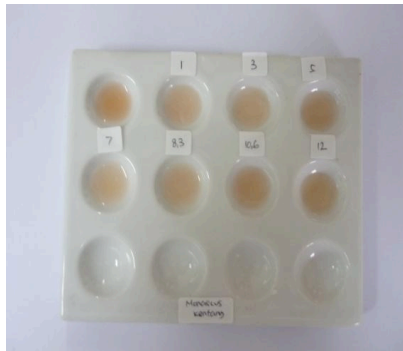
4.3.3.4 pH

Analisis pH ini bertujuan untuk mengetahui perubahan yang terjadi bila zat warna dikondisikan dalam berbagai pH tertentu dari asam, netral, hingga basa. Filtrat zat warna ditetesi dengan larutan baku dengan skala pH tertentu.

Tabel 4.5 Larutan Baku Skala pH

Larutan	pH
HCl 0,1 M	1
CH ₃ COOH 0,1 M	3
Asam borat 2%	±5
NaCl 5%	7
NaHCO ₃ 5%	8,3
Na ₂ CO ₃ 5%	10,6
NaOH 0,01 M	12

(Sumber : Suriani, 999)



(a)



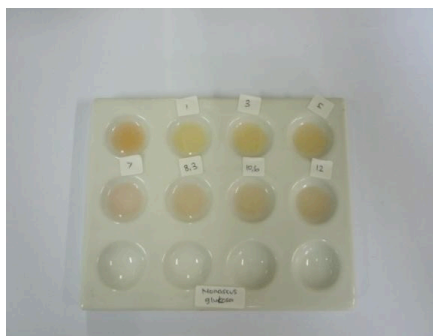
(e)



(b)



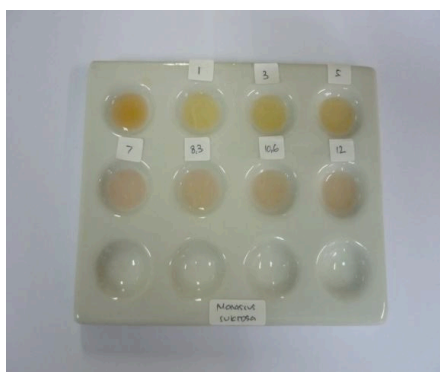
(f)



(c)



(g)



(d)



(h)

Keterangan : (a) *Monascus purpureus* sumber karbon kentang, (b) jagung, (c) glukosa, (d) sukrosa; (e) *Penicillium purpurogenum* sumber karbon kentang, (f) jagung, (g) glukosa, (h) sukrosa.

Gambar 4.14 Hasil Analisis pH

Pada kapang *Monascus purpureus* sumber karbon kentang pada pH 1; 3; 5; 7; dan 8,3 terlihat bahwa zat warna berubah menjadi semakin pudar sedangkan pada pH 10,6 dan 12 warna terlihat tetap sama dengan zat warna awal, pada pH 5 terlihat warna menjadi lebih tua dibandingkan dengan zat warna awal. Pada kapang *Monascus purpureus* dengan sumber karbon jagung, warna terlihat stabil pada pH 5 dan 12 sedangkan pada pH lainnya warna terlihat memudar. Pada kapang *Monascus purpureus* dengan sumber karbon glukosa dan sukrosa warna terlihat tidak stabil. Pada pH 1; 3; dan 5 warna berubah menjadi oranye sedangkan pada pH 7; 8,3; 10,6; dan 12 warna berubah menjadi merah muda.

Pada *Penicillium purpurogenum* sumber karbon kentang dan jagung memiliki kecenderungan yang sama yaitu pada seluruh kondisi pH menunjukkan bahwa warna memudar dibandingkan dengan zat warna awal. Pada kapang *Penicillium purpurogenum* dengan sumber karbon glukosa dan sukrosa, warna terlihat tidak mengalami perubahan dibandingkan dengan larutan awal.

Dari hasil analisis kestabilan dengan menggunakan larutan pH, dapat dikatakan bahwa zat warna yang dihasilkan tidak stabil pada berbagai tingkat keasaman. Namun, pada zat warna yang dihasilkan oleh kapang *Penicillium purpurogenum* dengan sumber karbon dari glukosa dan sukrosa, zat warna stabil pada berbagai tingkat keasaman.

BAB V. KESIMPULAN

1. Kapang *Monascus purpureus* menghasilkan konsentrasi zat warna lebih tinggi dari kapang *Penicillium purpurogenum* dengan proses fermentasi secara batch yaitu sebesar 0,358% pada substrat kentang.
2. Zat warna yang diperoleh stabil terhadap bahan pengawet namun tidak stabil terhadap cahaya, panas, dan pH.

DAFTAR PUSTAKA

1. Achmad, 2008, *Lebih Baik Pewarna Alami*, <http://www.scribd.co./doc/3116442/Lebih-Baik-Pewarna-Alami>, diakses tanggal 31 Maret
2. Anonim, *The Red Yeast Rice Story*, 2008, <http://www.lipascor.com/red2.htm>, diakses tanggal 16 April 2010
3. Anonim, *Monascus purpureus*, 2010, http://en.wikipedia.org/wiki/Monascus_purpureus, diakses tanggal 15 April 2010
4. Anonim, *Phialides at the top of a thin and septate conidiophore Penicillium sp.*, 2010, <http://www.med.univ-angers.fr/GEIHP/English/Timbres.html>, diakses tanggal 17 April 2010
5. Anonim, *Penicillium purpurogenum*, 2010, http://en.wikipedia.org/wiki/Penicillium_purpurogenum, diakses tanggal 15 April
6. Anonim, *Zat Warna Pada Obat dan Makanan*, 2010, http://www.apoteker.info/Topik%20Khusus/zat_warna_pada_obat_dan_makanan.htm, diakses tanggal 8 Januari 2010
7. Dufosse, Laurent. *Microbial Production of Food Grade Pigments*. 2006. <http://www.ftb.com.hr/44-313.pdf>
8. Djuni, Pristiyanto, *Pewarna Kue Yang Alami*, 2002, <http://www.SuaraMerdeka.Com/Harian/021/14/Ragam/Htm>, 8 Januari 2010.
9. George Barron, *Penicillium italicum and Penicillium digitatum on Orange*, 2009,
10. <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/penicill.htm>, diakses tanggal 15 April 2010
11. <http://www.microbialcellfactories.com>
12. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab10/pen02.html>
13. Kaiser, Gary E., *Conidiospores of Penicillium*, 2005, <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguid/unit1/bgm/pen.html>, diakses tanggal 15 April 2010
14. Pararaja, Arifin. *Mengenal Sekilas tentang Zat Aditif Pewarna Makanan*. 2008. <http://smk3ae.wordpress.com/2008/10/16/mengenal-sekilas-tentang-zat-aditif-pewarna-makanan/>, diakses tanggal 8 Januari 2010
15. Pattanagul, Patcharee, dkk, *Review of Angkak Production (Monascus purpureus)*, 2007, http://www.science.cmu.ac.th/journal-science/343_7_ReviewPatcha.pdf
16. Pradhika, E. Indra, 2008, *Mikro-Banget*, <http://ekmonsaurus.blogspot.com/search?q=fermentasi>, diakses tanggal 11 April 2010
17. Rahayu, Suparni Setyowati. *Ekstraksi Cair*. 2009. http://www.chem-is-try.org/materi_kimia/kimia-industri/teknologi-proses/ekstraksi-cair/, diakses tanggal 12 April 2010
18. Rahayu, Suparni Setyowati. *Ekstraktor Cair-Cair*. 2009. http://www.chem-is-try.org/materi_kimia/kimia-industri/teknologi-proses/ekstraktor-cair-cair/, diakses tanggal 12 April 2010
19. Sen, S.N., *Pigment Formation by Penicillium rubrum Stoll*, 1963, <http://www.nature.com/nature/journal/v199/n4888/abs/199071a0.html>
20. Simova, Emilina D., dkk, 2002, *Effect of Aeration on The Production of Carotenoid Pigments by Rhodotorula rubra-lactobacillus casei Subsp. casei*

- Co-Cultures* *in* *Whey* *Ultrafiltrate*,
<http://www.znaturforsch.com/ac/v58c/s58c0225.pdf>
21. Syaifuddin, Muhammad. *Makalah Zat Warna; Pewarna Sintesis "Rhodamin B"*, 2009
 22. Phillip Fry, *Penicillium Mould*, 2009,
http://www.mould.ph/penicillium_mould.htm, diakses tanggal 15 April 2010
 23. Wilujeng,dkk. 2009. *Ekstraksi dan Karakterisasi Zat Warna Alami dari Daun Mangga Serta Uji Potensinya sebagai Pewarna Tekstil*. <http://karya-ilmiah.um.ac.id/index.php/pkm/article/view/4044>, diakses tanggal 13 April 2010