

PENINGKATAN KADAR LOVASTATIN ANGKAKOLEH *Monascus purpureus*
KO-KULTUR DENGAN *Endomycopsis burtonii*¹
[Improvement of Lovastatin Angkak Production by *Monascus purpureus* Strains
Co-Cultured with *Endomycopsis burtonii*]

Danik D Asadayanti^{2,3*}, B Sri Laksmi Jenie³, Harsi D Kusu aningrum³ dan Novik Nurhidayaf

²Departemen Agroindustri, Pusat Pengembangan dan Pemberdayaan Pendidik dan
Tenaga Kependidikan Pertanian, Cianjur

³Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fateta-IPB, Bogor

⁴Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong

*e-mail: ddasadayanti@yahoo.com

ABSTRACT

Lovastatin is a bioactive material of statin groups and has been used to reduce cholesterol through inhibiting HMG Co-A reductase enzyme activities. Three indigenous strains of *Monascus purpureus* and three mutants were used in this study produced lovastatin at the range of 0,1 - 1,42%. The objectives of this study were to increase lovastatin productions by co-cultured with several concentrations of *Endomycopsis burtonii*. *M. purpureus* (10⁷cfu/ml) was co-cultured with various concentrations of *E. burtonii* (10M0⁵) cfu/ml at three different feeding times (day 2, 4, and 6). Feeding times and concentrations of *E. burtonii* significantly increased production of lovastatin by four strains of *M. purpureus* (JMBA5K, AID, JMBA and TOS). The highest production of lovastatin was achieved by *M. purpureus* TOS co-cultured by *E. burtonii* at 10⁴ cfu/ml added at day 6. Expression of the genes that responsible for lovastatin production were analyzed by PCR and RT-PCR method. The phenotypic character of *M. purpureus* TOS with high lovastatin production was conformed by the high intensity of its gene expression.

Kata kunci/ keywords: Lovastatin, angkak, *Monascus purpureus*, *Endomycopsis burtonii*

PENDAHULUAN

Angkak merupakan produk fermentasi *Monascus purpureus* pada substrat yang mengandung karbohidrat, seperti beras, jagung, onggok dan sebagainya. *M. purpureus* merupakan fungi yang tidak patogen dan sudah lama digunakan oleh masyarakat Cina untuk produksi pigmen angkak (Kohama *et al*, 1987; Chiu *et al*, 2006; Lee *et al*, 2006). Pigmen angkak sudah cukup lama digunakan oleh masyarakat Cina sebagai pewarna alami pada produk pangan seperti pada olahan daging, ikan dan yoghurt. Selama fermentasi angkak, selain pigmen, juga diproduksi metabolit sekunder lainnya yaitu lovastatin. Lovastatin merupakan bahan bioaktif kelompok statin yang sangat penting dalam perkembangan biomedis. Lovastatin sudah lama digunakan sebagai senyawa penurun kolesterol dengan melakukan penghambatan enzim HMG-CoA reduktase (3-hidroksi metilglutaril CoA reduktase) yang berperan penting dalam biosintesis kolesterol (Alberts *et al*, 1980; Hajjaj *et al*, 2001). Potensi angkak sebagai pewarna alami dengan

kandungan lovastatin, sangat prospektif untuk dikembangkan sebagai bahan pangan fungsional.

Penelitian-penelitian yang dilakukan untuk produksi lovastatin dan angkak selama ini, dilakukan secara monokultur menggunakan spesies-spesies *Monascus*. Kandungan lovastatin angkak yang dihasilkan juga masih relatif rendah, berkisar antara 0.2-0.9% (Su *et al*, 2003; Miyake *et al*, 2005; Lee *et al*, 2006; Chiu *et al*, 2006). Kenyataan di alam, proses fermentasi beberapa produk pada substrat padat, biasanya terjadi secara kultur campuran dengan melibatkan spesies-spesies fungi yang berbeda (*mixed cultures*). Selama fermentasi kultur campuran, dapat membantu menyediakan substrat yang lebih baik, sehingga dapat menghasilkan biomasa dan produksi metabolit sekunder yang lebih baik pula (Panda *et al*, 2010). Beberapa peneliti melaporkan bahwa ko-kultur dengan spesies-spesies fungi menyebabkan peningkatan enzim, produksi asam organik, dan reaksi biokonversi secara mikrobial (Banerjee *et al*, 2005; Pandey *et al*, 1999; Temudo *et al*, 2007).

Produksi lovastatin dalam angkak masih potensial untuk ditingkatkan. Salah satu upaya adalah dengan melakukan ko-kultur *M. purpureus* dengan menggunakan khamir indigenus penghasil amilase, yaitu *E. burtonii*. Danuri (2008) melaporkan, enzim amilase sebagai enzim hidrolitik, dapat meningkatkan hidrolisis komponen karbohidrat menjadi glukosa. Glukosa dibutuhkan sebagai sumber energi selama pengembangan produksi metabolit sekunder.

Tujuan penelitian ini adalah meningkatkan produksi lovastatin angkak menggunakan enam strain *M. purpureus* ko-kultur dengan *E. burtonii*. *E. burtonii* merupakan khamir indigenus penghasil enzim amilase. Penelitian dilakukan dengan melalui beberapa tahapan meliputi pemilihan strain *M. purpureus*, pemilihan konsentrasi dan waktu penambahan *E. burtonii* yang optimal dalam memproduksi lovastatin. Hasil fermentasi *M. purpureus* yang menghasilkan lovastatin tertinggi, dilanjutkan dengan pengujian ekspresi gen untuk mengetahui korelasi antara sifat fenotip dengan intensitas ekspresi gen.

BAHANDAN METODE

Kultur kapang dan khamir

Kapang yang digunakan pada penelitian ini adalah enam strain *M. purpureus* koleksi laboratorium Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Cibinong, Bogor, dapat dilihat pada Tabel 1.

Khamir yang digunakan adalah *E. burtonii* (koleksi laboratorium Ilmu Hayati, ITB, Bandung). Peremajaan *M. purpureus* TOS, JMBA 5K, AID, JMBA3M, AS3K dilakukan pada agar miring MEA (*Malt Extract Agar*). Agar miring yang telah digores diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Pada hari ke

7 jumlah spora mencapai 2.25×10^7 cfu/ml. Biakan agar miring tersebut kemudian disimpan dalam lemari pendingin sebagai kultur stok. Strain khamir diremajakan pada media agar miring *Yeast Malt Agar* (YM agar). Agar miring yang telah digores diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Biakan khamir yang telah tumbuh disimpan dalam lemari pendingin sebagai stok kultur.

Ko-kultur *M.purpureus* dengan *E. burtonii*

Produksi angkak menggunakan enam strain *M. purpureus* (10^7 cfu/ml) dilakukan dengan fermentasi padat menggunakan substrat beras IR 42. Ko-kultur dilakukan dengan menambahkan *E. burtonii* pada hari fermentasi ke 2, 4, dan 6 dengan variasi konsentrasi 10×10^4 , 10^5 cfu/ml. Fermentasi dilakukan pada suhu $\pm 30^\circ\text{C}$ selama 12 hari. Setelah 12 hari dilakukan pemanenan, kemudian dikeringkan pada suhu 60°C selama ± 12 jam.

Analisis. Analisis yang dilakukan meliputi kadar lovastatin (Miyake *et al.*, 1984), dan ekspresi gen penghasil lovastatin tertinggi (Sambrook, 1989; Chomezynski dan Sacchi, 1987).

Pengujian Ekspresi Gen

Isolasi RNA total: pemecahan dinding sel *M. purpureus*, homogenisasi, separasi dan presipitasi RNA

Monascus purpureus diisolasi dari angkak hasil ko-kultur terbaik dan ditumbuhkan pada media MEA (*Malt Extract Agar*). Kultur berumur 3-4 hari dibekukan di dalam *deep freezer* suhu $\pm -79^\circ\text{C}$ selama ± 20 menit kemudian digerus dengan mortar sampai halus. Sampel ditambah 1 ml reagen TRIzol, sentrifugasi pada 12.000 x g (10 menit, pada suhu 2-8°C). Supernatan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 15-30°C. Sampel ditambah

Tabel 1. Kultur kapang yang digunakan pada penelitian.

| Nama strain | Keterangan |
|-------------|---------------------------------|
| JMBA | Diisolasi dari daerah Jember |
| TOS | Diisolasi dari daerah Pontianak |
| AID | Diisolasi dari daerah Medan |
| JMBA5K | Hasil mutasi dengan sinar UV |
| JMBA3m | Hasil mutasi dengan sinar UV |
| AS3K | Hasil mutasi dengan sinar UV |

kloroform 0,2 ml, ditutup rapat dan dikocok pelan selama 15 detik kemudian diinkubasi lagi selama 15 menit pada 15-30 °C. Sentrifugasi dilakukan pada 12.000 x g selama 15 menit pada 2-8 °C. Presipitasi RNA dilakukan dengan mencampur bagian yang tidak berwarna dengan 0,5 ml isopropil alkohol (isopropanol). Sampel diinkubasi pada 15-30 °C selama 10 menit. Sampel disentrifugasi (12.000xg) selama 10 menit pada 2-8 °C. Jika belum terbentuk endapan pelet, sampel disimpan selama 1 malam atau lebih di dalam pendingin.

Pencucian dan pelarutan kembali RNA

Pelet RNA dicuci dengan etanol 75%, kemudian dikering-anginkan. RNA dilarutkan dalam akuades bebas Rnase (akuades perlakuan DEPC: *diethylpyrocarbonate*) 0,01% (v/v), dikehendaki nilai absorbansi setelah pelarutan lebih dari 1.6 ($A_{260/280} > 1,6$). Inkubasi dilakukan selama 10 menit pada 55-60°C. Sampel dianalisis kemurnian dan konsentrasi RNA dengan spektrofotometer pada X260 dan λ 280. Rasio serapan pada A, 260/280 lebih dari 1,8, menunjukkan bahwa RNA total hasil isolasi adalah murni (Sambrook, 1989). Konsentrasi RNA total dihitung dengan rumus sebagai berikut $[RNA\ total] = A_{260} \times 40\ \mu g/ml \times fp$, A_{260} = nilai absorbansi RNA pada panjang gelombang 260 nm, $40\ \mu g/ml$ = nilai faktor konversi (1 unit absorbansi pada 260 nm sebanding dengan $40\ \mu g$ RNA per ml, fp = faktor pengenceran (Wilson dan Walker, 2000).

Elektroforesis

Komposisi gel agarosa 1% : agarose 1 gram, TAE IX (Tris-acetate-EDTA) ditambahkan sampai volume 100 ml, Etidium Bromida (EtBr) 5 μ l. Elektroforesis (*running gel*) dilakukan dengan tegangan 90 Volt selama 1 jam. Setelah selesai, gel divisualisasi pada lampu ultraviolet (UV) dan difoto dengan kamera Polaroid.

PCR dan RTPCR (*Polymerase Chain Reaction and Reverse Transcriptase-PCR*)

Reaksi RT-PCR terdiri atas dua tahap, yaitu sintesis cDNA (*complementary DNA*) dan PCR dalam satu tabung dengan menggunakan primer spesifik gen yang diinginkan. Primer yang digunakan dalam reaksi adalah sebagai berikut:

Primer *lav B R*: 5'-CTTGCCCTAAACGGG AGAGT-3' (R: antisense primer)

Primer *lov B F*: 5'-AGGGAGCCATGTTGGACTT-3' (F: sense primer)

Program RT-PCR dilakukan pada suhu 50°C selama 30 menit untuk sintesis cDNA. Pengaturan suhu dan siklus PCR dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: Satu siklus pre denaturasi (96°C, 4 menit), satu siklus denaturasi (96°C, 30 detik), 40 siklus penempelan (*annealing*) (55°C, 30 detik), 1 siklus pemanjangan (*elongasi*) (72°C, 2 menit), dan 1 siklus pemanjangan tambahan (72°C, 7 menit).

Pengukuran intensitas ekspresi gen penghasil Iovastatin dengan *CS Analyzer*

Foto hasil elektroforesis gel agarosa dimasukkan ke dalam file komputer, kemudian dilakukan penghitungan intensitas ekspresi gen penghasil Iovastatin menggunakan program *CS Analyzer*.

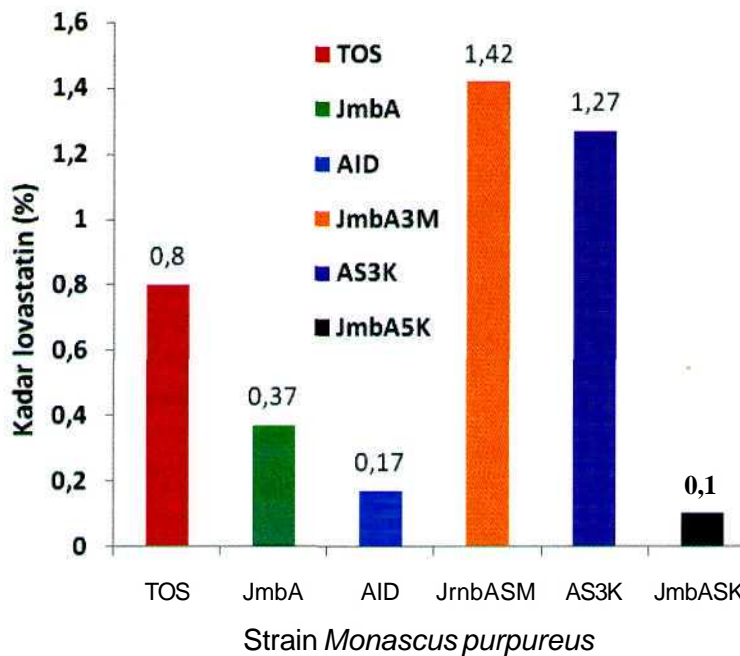
HASIL

Produksi Iovastatin angkak oleh enam strain *Monascus purpureus*

Kadar Iovastatin angkak yang diproduksi menggunakan strain *M. purpureus* TOS, JMBA5K, AID, JMBA3M, JMBA dan AS3K disajikan pada Gambar 1. Pengukuran kadar Iovastatin dilakukan setelah fermentasi hari ke 14 dan dilakukan pengeringan. Gambar 1 menunjukkan bahwa strain-strain tersebut memiliki kemampuan yang berbeda dalam memproduksi Iovastatin. Strain JMBA3M dan strain AS3K secara statistik tidak berbeda nyata (α : 5%) dalam hal kemampuan memproduksi Iovastatin. Kedua strain tersebut memiliki kemampuan yang lebih tinggi dan berbeda nyata dibanding strain lainnya. Selanjutnya akan diteliti pengaruh ko-kultur dengan *E. burtonii* terhadap kadar Iovastatin angkak yang diproduksi oleh enam strain *M. Purpureus*.

Pengaruh ko-kultur *M. purpureus* dengan *E. burtonii* terhadap kadar Iovastatin angkak

Kadar Iovastatin angkak hasil ko-kultur enam strain *M. purpureus* dengan *E. burtonii* disajikan pada Gambar 2. Kadar Iovastatin hasil analisis menggunakan HPLC menunjukkan respon yang bervariasi di antara



Gambar 1. Kadar lovastatin angkak yang diproduksi oleh enam strain *M. Purpureus*.

keenam strain *M. purpureus* terhadap penambahan *E. burtonii* dengan jumlah dan waktu yang divariasikan. Strain JMBA5K dan AID penambahan *E. burtonii* pada berbagai konsentrasi dan waktu, memberikan pengaruh peningkatan produksi lovastatin yang cukup signifikan. Pada strain JMBA dan TOS pengaruh variasi waktu dan jumlah penambahan *E. burtonii* menyebabkan peningkatan maupun penurunan produksi lovastatin. Strain JMBA mengalami peningkatan produksi lovastatin pada penambahan *E. burtonii* hari ke-2 dengan jumlah 10^4 cfu/ml, hari ke-4 cfu/ml dengan jumlah 10^3 , 10^4 cfu/ml, dan hari ke-6 dengan jumlah 10^4 cfu/ml.

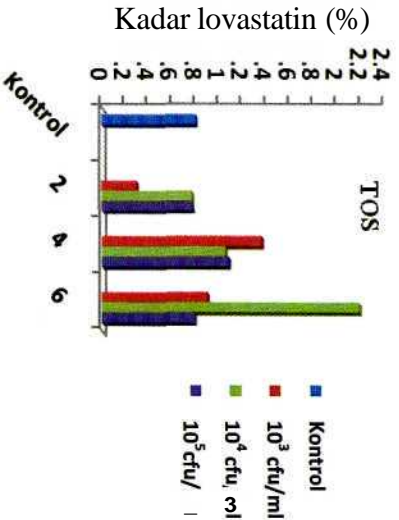
Untuk strain TOS peningkatan produksi lovastatin terjadi pada penambahan *E. burtonii* hari ke-4 dengan jumlah $10^3, 10^4, 10^5$ cfu/ml dan hari ke-6 pada jumlah $10^3, 10^4$ cfu/ml. Kadar lovastatin tertinggi dihasilkan oleh Strain TOS dengan perlakuan penambahan *E. burtonii* pada hari ke-6 dengan jumlah 10^4 cfu/ml. Khusus untuk strain JMBA3M dan AS3K, penambahan *E. burtonii* pada berbagai variasi waktu dan jumlah, menyebabkan penurunan produksi lovastatin dibanding kontrol.

Eksresi gen yang bertanggungjawab pada biosintesis lovastatin

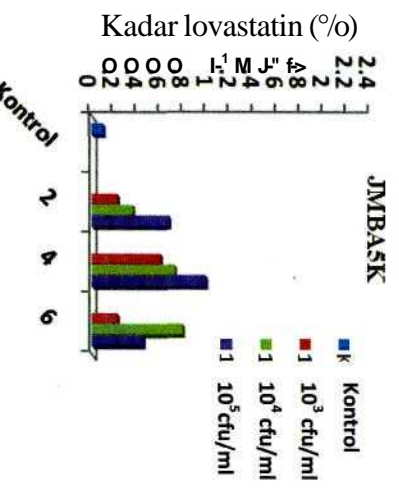
Tiga strain *M. purpureus* yang menghasilkan kadar lovastatin tertinggi setelah ko-kultur dengan *E. burtonii*, diisolasi dan ditumbuhkan pada media MEA. Strain-strain tersebut yakni JMBA H4103, AID H210³ dan TOS H610⁴ dan masing-masing strain kontrol tanpa ko kultur yaitu JMBA (k), AID (k) dan TOS (k). Setelah terbentuk pigmen secara optimal (7 hari), kapang diremajakan untuk diisolasi RNA pada pertumbuhan kapang yang masih muda (3-4 hari). Isolasi RNA kapang berumur muda diharapkan fase pertumbuhan kapang pada fase logaritmik. Pada fase pertumbuhan logaritmik, terdapat banyak asam nukleat terutama RNA.

Total RNA yang diperoleh dari semua strain yang dianalisis mempunyai rasio A_{260nm}/A_{280nm} sebesar 2,1 kecuali strain TOS kontrol yang mempunyai nilai sebesar 1,9 (Tabel 2). Total RNA hasil isolasi tersebut merupakan RNA yang sudah murni dan tidak terkontaminasi oleh fragmen protein maupun DNA.

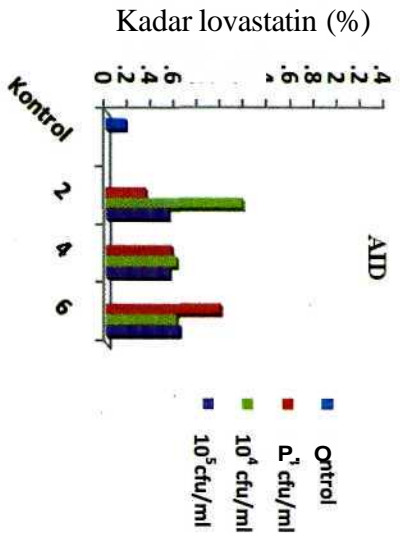
Kemurnian total RNA diperlukan berkaitan dengan analisis konsentrasi, amplifikasi dan intensitas



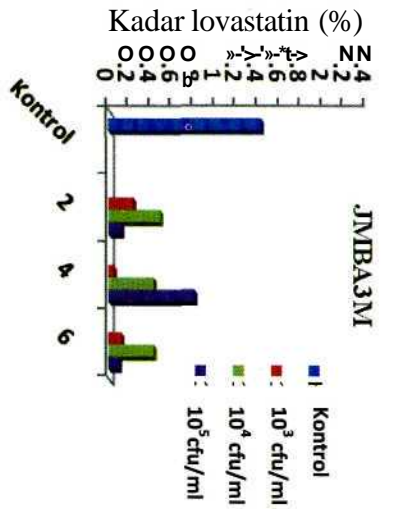
Hari penambahan *E. burtonii* (cfu/ml)



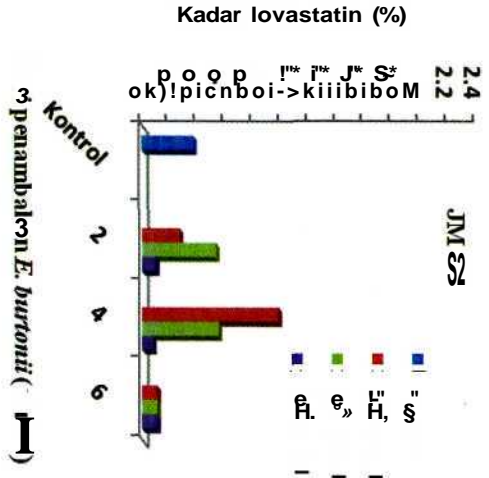
Hari penambahan *E. burtonii* (cfu/ml)



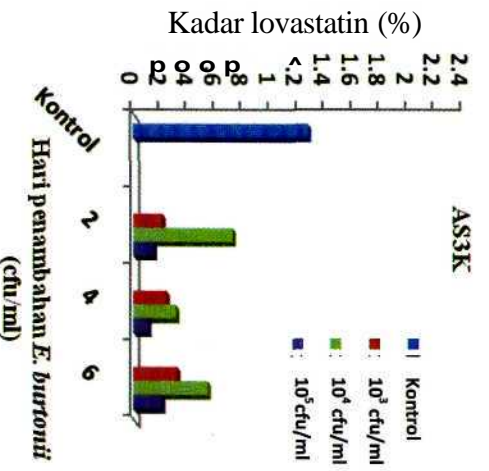
Hari penambahan *E. burtonii* (cfu/ml)



Hari penambahan *E. burtonii* (cfu/ml)



Hari penambahan *E. burtonii* (cfu/ml)



Hari penambahan *E. burtonii* (cfu/ml)

Gambar 2. Pengaruh konsentrasi penambahan *E. burtonii* terhadap kadar lovastatin pada enzim strain *M. purpureus*

Tabel 2. Tingkat keraurnian total RNA (A_{260nm}/A_{280nm}) dari strain *M. purpureus* yang diisolasi dari angkak hasil fermentasi ko-kultur dengan *E. Burtonii*.

| Sampel | Absorbansi | | Rasio |
|-----------------------|------------|----------|---------------|
| | A(260nm) | A(280nm) | A 260nm/280nm |
| TOS (kontrol) | 0,137 | 0,075 | 1,9 |
| TOSH610 ⁴ | 0,465 | 0,246 | 2,1 |
| JmbA (kontrol) | 0,167 | 0,091 | 2,1 |
| JmbAH410 ³ | 0,133 | 0,064 | 2,1 |
| AID (kontrol) | 0,242 | 0,135 | 2,1 |
| ATDH210 ⁴ | 0,255 | 0,149 | 2J |

Tabel 3. Pengaruh ko-kultur *M. purpureus* dengan *E. burtonii* terhadap konsentrasi total RNA.

| Sampel | Konsentrasi total RNA (fig/ml) |
|-----------------------|---------------------------------|
| TOS (kontrol) | 668 |
| TOSH610 ⁴ | 1860 |
| JMBA (kontrol) | 548 |
| JMBAH410 ³ | 968 |
| AID (kontrol) | 532 |
| AIDH210 ⁴ | 1020 |

ekspresi gen diharapkan benar-benar menggambarkan ekspresi dari gen yang bertanggung jawab pada produksi lovastatin bukan dari komponen-komponen lain yang tidak bertanggung jawab pada produksi lovastatin.

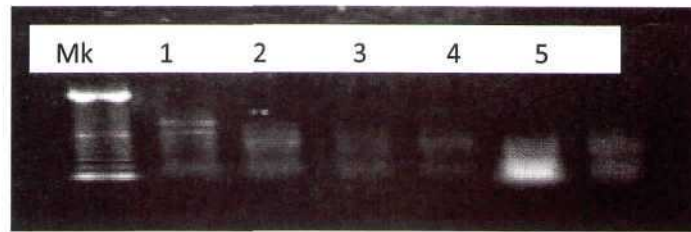
Hasil pengukuran konsentrasi total RNA yang diisolasi dari strain *M. purpureus* ko-kultur dengan *E. burtonii* disertai kontrol disajikan pada Tabe 13. Semua isolat yang diisolasi dari angkak setelah fermentasi ko-kultur dengan *E. burtonii*, menunjukkan konsentrasi yang lebih tinggi dari kontrolnya, dan tertinggi ditunjukkan oleh isolat TOS H610⁴.

Konsentrasi total RNA pada Tabel 4 memperkuat hasil elektroforesis RNA yang diisolasi dari strain *M. purpureus* (Gambar3). Konsentrasi total RNA tertinggi oleh strain TOS H610⁴, pada Gambar 3 strain tersebut juga menunjukkan pita yang paling tebal.

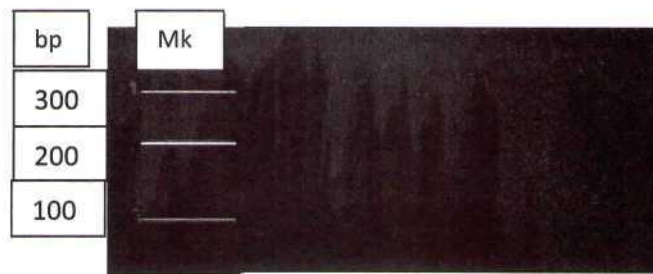
Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan.

Visualisasi hasil isolasi total RNA strain-strain *M. purpureus* JmbA, JmbA H410³, AID, AIDH210³, TOS H610⁴, dan sampel TOS pada gel agarosa pada Gambar 3 memperlihatkan pita-pita yang cukup jelas. Pita-pita yang terbentuk merupakan hasil pergerakan migrasi RNA dari kutub negatif ke kutub positif pada gel agarosa yang disebabkan oleh adanya efek elektroendosmosis. Proses ini disebabkan karena terjadinya ionisasi kelompok asam (biasanya sulfat) yang menempel pada matriks polisakarida dari gel agarosa.

Elektroforesis hasil amplifikasi cDNA pada gel agarosa disajikan pada Gambar 4. Primer yang digunakan dalam reaksi PCR dan RTPCR {*Polymer ase Chain Reaction and Reverse Transcriptase- PCR*} adalah primer *lov B*. Sampel satu sampai dengan enam menunjukkan ekspresi gen *lov B* yakni gen penghasil lovastatin pada *M. purpureus* strain JmbA (1), JmbA H410³ (2), AID (3), AID H210³ (4), TOS H610⁴ (5), TOS (6). Ekspresi gen *lov B* yang ditunjukkan berukuran 200 pb (pasang basa).



Gambar 3. Hasil isolasi total RNA strain *M. purpureus* ko-kultur dengan *E. burtonii* (MK: marker {Sharp DNA Ladder Marker}, 1: JmbA, 2: JmbAH410³, 3: AID, 4: AIDH210³, 5: TOSH610⁴, 6: TOS.



Gambar 4. Pola ekspresi gen (*lov B*) pada *M. purpureus* hasil ko-kultur menggunakan *E. burtonii*. Mk: marker {Sharp DNA Ladder Marker, 100bp, CRBC}, 1: JmbA(k), 2: JmbAH410³, 3: AID(k), 4: AIDH210³, 5: TOSH610⁴(k), 6: TOS.

Untuk mengetahui intensitas ekspresi gen (*lov B*) strain *M. purpureus* ko-kultur dengan khamir *E. burtonii*, dilakukan analisis menggunakan *CS analyser* terhadap produk hasil RT-PCR. Intensitas ekspresi gen penghasil lovastatin tertinggi dihasilkan sampel TOS H610⁴:11691 kemudiandiikuti sampel AID H210³:9531, TOS (k): 8910, JmbAH410³: 5994, AID(k): 5940 dan JmbA(k):3537.

PEMBAHASAN

Peningkatan kadar lovastatin angka setelah perlakuan ko-kultur *Monascus purpureus* dengan *Endomycopsis ZwfwVk* kemungkinan disebabkan oleh pengaruh enzim amilase yang dihasilkan oleh *E. burtonii*. Enzim amilase akan membantu mendegradasi substrat menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana seperti glukosa. Senyawa-senyawa sederhana yang terbentuk lebih mudah dikonsumsi *M. purpureus* untuk kebutuhan pertumbuhannya (Danuri, 2008). *E. burtonii* juga membutuhkan substrat untuk pertumbuhan. Kebutuhan akan substrat untuk pertumbuhan, memungkinkan terjadinya kompetisi antara *M. purpureus* dan *E. burtonii*. Kondisi kompetisi memicu kapang *M. purpureus* memproduksi

metabolit-metabolit sekunder untuk mempertahankan diri.

Danuri (2008), juga melaporkan bahwa semua strain *M. purpureus* mempunyai kemampuan memproduksi enzim amilase. Jumlah enzim amilase yang semakin banyak, baik amilase yang dihasilkan oleh *M. purpureus* maupun oleh *E. burtonii*, menyebabkan semakin banyak pula amilosa dalam substrat yang dihidrolisis menjadi glukosa. Glukosa dibutuhkan sebagai sumber energi selama pengembangan produksi metabolit sekunder. Dengan demikian semakin banyak pula lovastatin yang diproduksi selama fermentasi angka ko-kultur *M. purpureus* dengan *E. burtonii*.

Peningkatan kadar lovastatin angka oleh pengaruh ko-kultur menggunakan *E. burtonii* menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan penelitian-penelitian yang dilakukan sebelumnya. Kadar lovastatin strain TOS H₆10⁴ yakni sebesar 2,19% menunjukkan peningkatan signifikan dibanding TOS kontrol (0,8%). Penelitian oleh Danuri (2008) yang melakukan optimasi produksi pigmen dan lovastatin angka oleh *M. purpureus*, melaporkan bahwa konsentrasi lovastatin angka tertinggi, diperoleh pada perlakuan penambahan Tween 80. Rata-

rata kandungan lovastatin 5 ulangan $254,934 \pm 9.656$ ppm atau meningkat 40,78% dibanding kontrol. Sedangkan Panda *et al.* (2010) melakukan optimasi parameter-parameter fermentasi untuk meningkatkan produksi lovastatin angkak melalui ko-kultur *M. purpureus* MTCC 369 dan *Monascus ruber* MTCC 1880. Fermentasi dilakukan menggunakan beras lokal india sebagai substrat padat. Optimasi dilakukan pada parameter-parameter proses fermentasi seperti temperatur, waktu fermentasi, volume inokulum, dan pH medium, dengan metodologi respon permukaan dari desain faktorial Box-Behnken. Produksi lovastatin tertinggi diperoleh sebesar 2,83 mg/g. Walaupun kadar lovastatin hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan peningkatan dibanding kontrol, tetapi masih jauh lebih rendah dibandingkan kadar lovastatin angkak hasil ko-kultur *M. purpureus* dengan *E. burtonii*.

Penurunan produksi lovastatin akibat penambahan *E. burtonii* pada awal fermentasi kemungkinan disebabkan hal-hal berikut. Kondisi awal fermentasi merupakan fase kritis pertumbuhan mikroba. Pada tahap awal mikroba membutuhkan fase adaptasi terhadap lingkungan pertumbuhannya. Penambahan khamir pada tahap awal fermentasi dapat mengganggu pertumbuhan *M. purpureus*. Lim *et al.*, (2000) melaporkan bahwa kehadiran khamir pada awal pertumbuhan dapat menjadi kompetitor bagi kapang. Masalah utama pada teknik ko-kultur, produksi pigmen dan lovastatin dapat menurun disebabkan khamir (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat menekan pertumbuhan *M. purpureus* ketika penambahan *S. cerevisiae* terlalu awal dan dalam jumlah yang terlalu tinggi.

Isolasi terhadap total RNA *M. purpureus* dilakukan pada umur kapang yang masih muda (3-4 hari) atau pada fase pertumbuhan logaritmik. Pada fase tersebut, terdapat banyak asam nukleat terutama RNA. Umur kapang yang sudah tua (7-10 hari), tidak cocok untuk tujuan isolasi RNA, karena sudah menghasilkan pigmentasi yang mengakibatkan berkurangnya kandungan asam nukleat (Handayani, 2006).

Total RNA hasil isolasi merupakan RNA yang sudah murni dan tidak terkontaminasi oleh fragmen protein maupun DNA, ditunjukkan dengan hasil analisis terhadap sampel, mempunyai rasio $A_{260nm}/$

A_{280nm} sebesar 2,1 kecuali strain TOS kontrol yang mempunyai nilai sebesar 1,9. Sambrook *et al.*, (1989) menyatakan bahwa RNA yang murni mempunyai rasio serapan pada absorbansi 260/280 lebih dari 1,8.

Konsentrasi total RNA hasil isolasi yaitu strain TOS H610⁴ (strain TOS hasil ko-kultur dengan penambahan *E. burtonii* pada penambahan hari ke 6 dengan konsentrasi 10⁴) menunjukkan konsentrasi tiga kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol. Konsentrasi yang ditunjukkan oleh TOS H610⁴ ini sesuai dengan kadar lovastatin yang diproduksi oleh strain TOS H610⁴ sebagai pengaruh dari ko-kultur dengan *E. burtonii*. Demikian juga untuk strain AID H210⁴ dan JMBA H410³ memiliki konsentrasi total RNA sekitar dua kali lebih tinggi dibanding kontrol. Konsentrasi total RNA dengan produksi lovastatin yang tinggi pada strain TOS H610⁴ kemungkinan berkaitan dengan hal-hal berikut. Total RNA didalamnya terkandung fragmen mRNA atau messeng NA yang berfungsi sebagai pembawa pesan atau informasi dalam sebuah gen untuk disampaikan kepada mesin pembuat protein atau enzim. Tiap-tiap mRNA dipergunakan sebagai cetakan untuk membentuk molekul yang sesuai. Dengan semakin banyak jumlah mRNA ditunjukkan dengan konsentrasi total RNA yang tinggi, maka akan semakin banyak pula molekul yang sesuai yang akan diproduksi (Murray *et al.*, 2003). Konsentrasi total RNA pada Tabel 3 memperkuat hasil elektroforesis RNA yang diisolasi dari strain *M. purpureus* (Gambar 3). Konsentrasi total RNA tertinggi oleh strain TOS H610⁴, pada Gambar 3 strain tersebut juga menunjukkan pita yang paling tebal.

Sifat fenotipik *M. purpureus* TOS H610" hasil ko-kultur menggunakan *E. burtonii* berkaitan produksi lovastatin tinggi, sejalan dengan sifat genotipik ditunjukkan dengan tingginya intensitas ekspresi gen penghasil lovastatin. Intensitas ekspresi gen penghasil lovastatin yang tinggi pada sampel TOS H610⁴ hasil ko-kultur berkaitan erat dengan peran amilase yang dihasilkan oleh *E. burtonii*. Amilase akan memecah substrat karbohidrat menjadi unit-unit glukosa. Glukosa merupakan sumber karbon dan dapat mendorong kompleks regulasi pada ekspresi gen dan aktivitas enzim untuk mensintesis poliketida (Hajjay *et*

al, 2001). Semakin banyak glukosa yang terbentuk, dorongan terhadap kompleks regulasi pada ekspresi gen dan aktivitas enzim untuk mensintesis poliketida (lovastatin) akan semakin banyak pula, sehingga lovastatin yang disintesispun akan semakin banyak. Glukosa yang terbentuk dari aktivitas amilase, berperan sebagai signal bagi DNA untuk mentransfer informasi genetik kepada RNA (proses transkripsi) yang merupakan tahap awal proses ekspresi gen.

KESIMPULAN

Aplikasi ko-kultur dengan *E. burtonii* pada enam strain *M. purpureus*, memberikan respon yang berbeda terhadap produksi lovastatin. Waktu penambahan dan konsentrasi *E. burtonii* mampu meningkatkan produksi lovastatin terhadap 4 strain *M. purpureus* (JMBA5K, AID, JMBA dan TOS). Waktu penambahan *E. burtonii* yang terbaik yang menghasilkan produksi lovastatin tertinggi adalah hari ke-6 fermentasi pada konsentrasi *E. burtonii* 10^4 cfu/ml pada *M. purpureus* strain TOS. Sifat fenotipik *M. purpureus* strain TOS yang menghasilkan lovastatin tertinggi sesuai dengan intensitas ekspresi gen.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Pusat Pengembangan dan Pemberdayaan Pendidik dan Tenaga Kependidikan Pertanian, Cianjur yang telah membiayai studi. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong yang memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts AW, J Chen, G Kuron, V Hunt, J Huff and C Hoffman. 1980. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase and cholesterol lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(7), 3957-3961.
- Banerjee R, G Mukherjee and KC Patra. 2005. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. *Bioresource Technology* 96(8), 949-953.
- Chiu CH, NiKH Guu, YK TM Pan. 2006. Production of red mold rice using a modified Nagata type Koji marker. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(2), 297-304.
- Chomczynski P and N Sacchi. 1987. Single step methods of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162,156-159.
- Danuri H. 2008. Optimizing angkak pigment and lovastatin production by *Monascus purpureus*. *Hayati - Journal of Bioscience* June, 61-66.
- Handayani WR. 2006. Penurunan ekspresi gen *pho85* sel apoptosis *Saccharomyces cerevisiae* oleh ekstrak air daun ciplukan 33NHR dan *Geobacillus* sp. 22a. Bogor. Thesis, IPB, Bogor.
- Hajjaj H, P Niedberger and P Duboc. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6), 2596-2604.
- Kohama Y, S Matsumoto, T Mimura, N Tanabe, A Inada and T Nakanishi, T. (1987). Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice. In: *Chemical and pharmaceutical Bulletin* 35(6), 2484-2489.
- Lee CL, JJ Wong, SL Kuo and TM Pan. 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agents-monacolin K and antiinflammation agent-monascin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(6), 1254-1262.
- Lim HS, SK Yoo, CS Shin and YM Hyun. 2000. *Monascus* red pigment overproduction by co-culture with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting glucoamylase. *The Journal of Microbiology*, March, 48-51.
- Miyake T, A Mori, T Kii, T Okuno, Y Usui and S Fumihiko. 2005. Light effect on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32(3), 103-108.
- Miyake T, S Ohno and S Sakai. 1984. Process for the production of *Monascus* pigment. *United States Patern* 4442, 209.
- Murray, K Robert, K Daryl, Granner, A Petter, Mayes, W Victor and Rodwell. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26. New York: Me Graw-Hill Companies.
- Panda BP, S Javed and M Ali. 2010. Optimization of fermentation parameter for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Food Bioprocess Technology* 3: 373-378.
- Pandey A, P Selvakumar, CR Socool and P Nigam. 1999. Solid-state fermentation for production of industrial enzymes. *Current Science* 77(1), 149-162.
- Sambrook J. 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory manual*. Ed ke-1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Shin CS, HJ Kim, MJ Kim and JY Ju. 2005. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering* 59, 576-581.
- Su YC, JJ Wang, TT Lin and TM Pan. 2003. Production of secondary metabolites, γ -amino butyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30(1), 41-46.
- Termudo MF, R Kleerebezem and M Loosdrecht. 2007. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. *Biotechnology and Bioengineering* 98(1), 69-79.
- Wilson K and J Walker. 2000. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. London. Cambridge University.