

**PIGMEN MERAH SEMULA JADI DENGAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA  
DARIPADA PENCILAN BAKTERIA MARIN TEMPATAN,  
*Serratia marcescens* USM84**

**TEH FARIDAH NAZARI**

**UNIVERSITI SAINS MALAYSIA**

**JANUARI 2012**

**PIGMEN MERAH SEMULA JADI DENGAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA  
DARIPADA PENCILAN BAKTERIA MARIN TEMPATAN,  
*Serratia marcescens* USM84**

**Oleh**

**TEH FARIDAH NAZARI**

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi  
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains**

**PUSAT PENGAJIAN SAINS KAJIHAYAT  
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA  
PULAU PINANG, MALAYSIA**

**Januari 2012**

**DEDIKASI**

**ISTIMEWA BUAT SUAMI, NURFITRI AMIR BIN MUHAMMAD  
ANAK-ANAK TERSAYANG, LUQMAN AL-HAKIM DAN SUMAYYAH  
SERTA SEMUA AHLI KELUARGA  
DI ATAS  
SOKONGAN, DOA DAN PENGORBANAN**

## **PENGHARGAAN**

Dengan nama Allah, Yang Maha Pemurah, lagi Maha Mengasihani.

Alhamdulillah, syukur kepada Allah kerana dengan keizinanNya tesis ini berjaya dilengkapkan dan disempurnakan akhirnya.

Terima kasih tidak terhingga buat penyelia projek saya, Profesor Darah Ibrahim yang banyak membantu, memberi nasihat dan tunjuk ajar di sepanjang saya menyiapkan projek dan menyiapkan tesis ini. Banyak ilmu dan pengalaman berharga yang dapat saya pelajari daripada beliau.

Ucapan terima kasih juga kepada Institut Penyelidikan Perikanan, Batu Maung, Pulau Pinang (En. Ismail, Pn. Faazaz, Pn. Saadiah dan Pn. Azam Hanim) atas bantuan dan sokongan yang diberikan; juga kepada Institut Bioteknologi Marin, Universiti Malaysia Terengganu (Dr Effendy) dengan kerjasama yang dihulurkan serta kakitangan Unit Mikroskop Elektron, Pusat Pengajian Sains Kajihayat, USM (Encik Joharidan Cik Jamilah).

Tidak lupa kepada rakan-rakan daripada Makmal Penyelidikan Bioteknologi Industri (IBRL) yang banyak membantu dan selalu ada bersama-sama ketika susah atau senang. Tidak lupa juga kepada Dekan Pusat Pengajian Sains Kajihayat (USM) kerana telah memberikan kebenaran untuk menggunakan kemudahan makmal yang terdapat di USM. Semoga projek penyelidikan ini dapat diteruskan sehingga berjaya serta memberi manfaat kepada kehidupan manusia sejagat. Terima kasih untuk semua.

Teh Faridah Nazari

Januari 2012

# KANDUNGAN

	Halaman
DEDIKASI	ii
PENGHARGAAN	iii
KANDUNGAN	iv
SENARAI JADUAL	xii
SENARAI RAJAH	xiv
SENARAI GAMBARFOTO	xvi
ABSTRAK	xviii
ABSTRACT	xx

## **BAB 1: PENGENALAN**

1.1 Pendahuluan	1
1.2 Pigmen semula jadi	2
1.3 Objektif penyelidikan	6

## **BAB 2 : TINJAUAN BACAAN**

2.1 Bakteria berwarna	8
2.2 Pigmen daripada bakteria marin	9
2.3 Ekspresi pigmen oleh bakteria	10
2.4 Pigmen bersifat karotenoid	16
2.4.1 Fungsi karotenoid	17
2.4.2 Kelas karotenoid	17
2.4.3 Contoh karotenoid	18

2.5 Pigmen karotenoid bersifat antibakteria	19
2.5.1 Karotenoid bersifat prodigiosin dan <i>Serratia marcescens</i>	20
2.5.2 Penghasilan pigmen karotenoid bersifat prodigiosin secara fermentasi kultur tenggelam	24
2.6 Potensi penggunaan pigmen semulajadi khususnya daripada mikroorganisma	27
2.6.1 Farmaseutis	28
2.6.2 Pewarnaan tekstil	29
2.6.3 Produk makanan	32
2.6.4 Kosmetik	36
2.7 Mikroorganisma sebagai sumber prodigiosin	37
2.7.1 Mikroorganisma daratan	37
2.7.2 Mikroorganisma marin	38
2.8 <i>Serratia marcescens</i> sebagai bakteria marin kajian	40
2.8.1 Pengkelasan dan latar belakang	40
2.8.2 Penghasilan prodigiosin oleh <i>S. marcescens</i>	41

### **BAB 3 : BAHAN DAN KAEDAH**

3.1 Pemencilan mikroorganisma daripada sampel marin	44
3.1.1 Penyediaan sampel	44
3.1.2 Pemilihan koloni pencilan marin	45
3.1.3 Pemilihan jenis medium kaldu terbaik untuk pengkulturan pencilan	45
3.1.4 Penyelenggaraan pencilan marin	46
3.2 Aktiviti antimikrob pencilan marin ke atas mikroorganisma ujian	47
3.2.1 Sumber, kepelbagaian dan penyelenggaraan mikroorganisma ujian	47
3.2.1.1 Bakteria ujian	47

3.2.1.2 Yis ujian	49
3.2.1.3 Kulat ujian	49
3.2.2 Penyediaan saiz inokulum mikroorganisma ujian	49
3.2.2.1 Bakteria	50
3.2.2.2 Yis	50
3.2.2.3 Kulat	50
3.2.3 Tindakan aktiviti antimikrob ke atas mikroorganisma ujian	51
3.3 Penentuan pengagihan sel sebatian antibakteria oleh pencilan USM84	52
3.4 Pengecaman pencilan USM84	55
3.4.1 Pencirian morfologi koloni secara makroskopik	56
3.4.2 Pencirian morfologi koloni secara mikroskopik	56
3.4.2.1 Pemerhatian di bawah mikroskop beza fasa	56
3.4.2.2 Pemerhatian sel di bawah mikroskop elektron penskanan (SEM)	57
3.4.2.3 Pemerhatian sel di bawah mikroskop elektron transmisi (TEM)	58
3.4.3 Pencirian biokimia dan fisiologi	59
3.4.3.1 Ujian hidrolisis kasein	59
3.4.3.2 Ujian oksidase	59
3.4.3.3 Ujian katalase	60
3.4.3.4 Ujian penggunaan sitrat	60
3.4.3.5 Ujian penghasilan indol	60
3.4.3.6 Ujian penurunan nitrat	61
3.4.3.7 Ujian metil merah	61
3.4.3.8 Ujian Voges-Proskauer	61
3.4.3.9 Ujian hidrogen sulfida dan motiliti	62
3.4.3.10 Ujian oksidatif-fermentatif	62

3.4.4 Pengecaman dan pengesahan pencilan USM84 dengan penjujukan 16S rRNA	63
3.4.4.1 Pengekstrakkan DNA genom daripada pencilan USM84	63
3.4.4.2 Penulenan produk PCR	64
3.5 Pengoptimuman keadaan pengkulturan untuk pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria pencilan <i>Serratia marcescens</i> USM84	66
3.5.1 Pengoptimuman keadaan-keadaan pengkulturan	67
3.5.2 Pengoptimuman di dalam kelalang berisipadu 1.0 Liter dengan menggunakan sistem kelalang goncangan	68
3.5.3 Pengkulturan <i>Serratia marcescens</i> USM84 di dalam sistem fermenter tangki teraduk berisipadu 5 Liter	69
3.6 Kesan kesitotoksikan <i>Serratia marcescens</i> USM84 ke atas anak udang brin ( <i>Artemia salina</i> )	69
3.6.1 Kesitotoksikan biojisim <i>Serratia marcescens</i> USM84	71
3.7 Pengekstrakkan sebatian antibakteria daripada <i>Serratia marcescens</i> USM84: Kecekapan ekstraksi pelarut	74
3.8 Kesan kepekatan ekstrak sebatian antibakteria terhadap MRSA	75
3.8.1 Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) ke atas MRSA	75
3.8.2 Penentuan Kepekatan Maut Minimum (MLC) ke atas MRSA	76
3.9 Kesan tindakan ekstrak kasar ke atas sel MRSA	79
3.10 Penentuan prodigiosin	79

## **BAB 4 : KEPUTUSAN**

4.1 Pemencilan mikroorganisma terpilih	82
4.2 Pemilihan medium kaldu terbaik untuk pengkulturan	82
4.3 Penyaringan aktiviti antimikrob ke atas pelbagai jenis	84



mikroorganisma ujian	
4.4 Penentuan pengagihan sel sebatian antibakteria	86
4.5 Pencirian dan pengecaman pencilan terpilih USM84	89
4.5.1 Pencirian morfologi makroskopik	89
4.5.2 Pencirian morfologi mikroskopik	94
4.5.2.1 Pencirian di bawah mikroskop beza fasa	94
4.5.2.2 Pencirian di bawah mikroskop elektron penskanan (SEM)	94
4.5.2.3 Pencirian di bawah mikroskop elektron transmisi (TEM)	96
4.5.3 Pencirian biokimia dan fisiologi	96
4.5.4 Pengecaman dan pengesahan dengan penjujukan 16 subunit Asid Ribonukleik Ribosom (16S rRNA)	103
4.5.4.1 Analisis pohon filogenetik	103
4.6 Pengoptimuman keadaan pengkulturan bagi peningkatan penghasilan biojisim dan aktiviti antibakteria oleh <i>Serratia marcescens</i> USM84	106
4.6.1 Pengoptimuman di dalam kelalang berisipadu 250 mililiter	106
4.6.1.1 Kesan tempoh pengkulturan	106
4.6.1.2 Kesan kelajuan goncangan	109
4.6.1.3 Kesan kepekatan agar dalam medim pengkulturan	111
4.6.1.4 Kesan suhu pengkulturan	113
4.6.1.5 Kesan pH awal medium pengkulturan	115
4.6.1.6 Kesan saiz inokulum pengkulturan	117
4.6.1.7 Profil masa pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 sebelum dan selepas pengoptimuman	120

4.6.2 Pengoptimuman di dalam kelalang berisipadu 1 liter	123
4.6.2.1 Kesan tempoh pengkulturan	123
4.6.2.2 Kesan kelajuan goncangan	125
4.6.2.3 Kesan suhu pengkulturan	127
4.6.2.4 Kesan pH awal medium pengkulturan	129
4.6.2.5 Kesan saiz inokulum pengkulturan	131
4.6.2.6 Profil masa pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 sebelum dan selepas pengoptimuman	133
4.6.3 Pengoptimuman di dalam fermenter berisipadu 5 liter	137
4.6.3.1 Proses pemfermentasian penghasilan sebatian antibakteria dan pertumbuhan pada pH berbeza	137
4.6.3.2 Proses pemfermentasian penghasilan sebatian antibakteria dan pertumbuhan pada kadar pengadukan yang berbeza	140
4.6.3.3 Profil masa pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 di dalam sistem fermenter bagi sebelum dan selepas pengoptimuman	145
4.7 Ujian kesitotoksikan sebatian antibakteria daripada <i>S. marcescens</i> USM84 ke atas anak udang brin <i>Artemea salina</i>	147
4.8 Kecekapan pelarut mengekstrak sebatian antibakteria daripada <i>S. marcescens</i> USM84	150
4.9 Kesan kepekatan sebatian antibakteria ke atas pertumbuhan MRSA	158
4.9.1 Penentuan Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) ke atas MRSA	158

4.9.2 Penentuan Kepekatan Maut Minimum (MLC) ke atas MRSA	160
4.10 Kesan tindakan ekstrak kasar sebatian antibakteria ke atas sel MRSA	160
4.11 Penentuan prodigiosin	161
 <b>BAB 5 : PERBINCANGAN</b>	
5.1 Pencilan marinUSM84 sebagai mikroorganisma terpilih	164
5.2 Kandungan medium kaldu terbaik untuk pengkulturan pencilan marinUSM84	167
5.3 Penyaringan aktiviti antimikrob ke atas pelbagai jenis mikroorganisma ujian	168
5.4 Pengagihan sel sebatian antibakteria pencilan marin USM84	169
5.5 Pengecaman pencilan marin USM84	171
5.6 Kesan keadaan pengkulturan ke atas pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 di dalam sistem kelalang goncangan	176
5.7 Kesan keadaan pengkulturan ke atas pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 di dalam sistem fermenter 5.0 liter	182
5.8 Penentuan kesitotoksikan sebatian antibakteria daripada <i>S. marcescens</i> USM84 ke atas anak udang brin <i>Artemea salina</i>	184
5.9 Pelarut terbaik bagi pengekstrakan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	185
5.10 Kesan kepekatan ekstrak sebatian antibakteria ke atas pertumbuhan MRSA	186

5.11 Kemungkinan mod tindakan ekstrak kasar sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	188
---	-----

## **BAB 6 : KESIMPULAN DAN KAJIAN LANJUT**

6.1 Kesimpulan	193
6.2 Kajian lanjut	194
<b>RUJUKAN</b>	195
<b>LAMPIRAN</b>	219
<b>SENARAI KERTAS KERJA PERSIDANGAN</b>	225

## SENARAI JADUAL

	Halaman	
Jadual 1.1	Sebahagian daripada pigmen semulajadi daripada tumbuhan	3
Jadual 1.2	Pigmen semulajadi yang boleh dihasilkan oleh invertebrata	4
Jadual 2.1	Sebatian pigmen yang dipencilkan daripada bakteria marin	11
Jadual 2.2	Beberapa jenis pigmen yang dihasilkan oleh mikroorganisma	21
Jadual 2.3	Beberapa tumbuhan yang pernah digunakan untuk mewarnakan tekstil	31
Jadual 2.4	Beberapa contoh pigmen semulajadi daripada mikroorganisma yang dikomersilkan	35
Jadual 3.1	Keadaan kitaran dalam tindakbalas PCR bagi amplifikasi DNA genom	65
Jadual 3.2	Penyediaan kepekatan akhir pigmen semulajadi untuk kajian kesitotoksikan anak udang brin	73
Jadual 3.3	Penyediaan kepekatan akhir ekstrak sebatian antibakteria untuk kajian kesan kepekatan ekstrak sebatian antibakteria terhadap MRSA	77
Jadual 3.4	Penyediaan kepekatan ekstrak untuk digunakan dalam Jadual 3.3	78
Jadual 4.1	Darjah perencatan mikroorganisma ujian oleh sebatian antimikrob dalam pencilan USM84	87
Jadual 4.2	Darjah perencatan sebatian bioaktif daripada pencilan USM84 yang dijangka mempunyai aktiviti antibakteria ke atas MRSA	90
Jadual 4.3	Ciri-ciri morfologi koloni pencilan marin USM84	93
Jadual 4.4	Ciri-ciri biologi dan fisiologi USM84	102
Jadual 4.5	Ringkasan keadaan pengkulturan sebelum dan selepas pengoptimuman	122
Jadual 4.6	Ringkasan perbandingan keadaan pengkulturan optimum di dalam kelalang berisipadu 250 mililiter dengan 1.0 liter	136

Jadual 4.7	Ringkasan perbandingan penghasilan sebatian antibakteria dalam sistem kelalang goncangan dan fermenter	148
Jadual 4.8	Aktiviti antibakteria genangan dan pelet sel selepas diekstrak dengan pelbagai pelarut	157
Jadual 5.1	Perbandingan morfologi dan ujian biokimia sm1, <i>S. marcescens</i> dan <i>S.marcescens</i> USM84	175
Jadual 5.2	Kepelbagaian mod tindakan bagi antibiotik yang bersifat bakterisid dan bakterioostat	190
Jadual 5.3	Kesan antibiotik ke atas sintesis protein	192

## SENARAI RAJAH

		Halaman
Rajah 2.1	Struktur kimia nukleus induk dalam pelbagai sebatian oligopirol linear	23
Rajah 2.2	Fabrik tekstil berbilang serat yang diwarnakan dengan pigmen merah yang dihasilkan oleh <i>Vibrio</i> sp.	33
Rajah 2.3	Struktur prodiginina yang dihasilkan oleh aktinomiset (1-6) dan prodigiosin (7)	43
Rajah 3.1	Zon perencatan pertumbuhan mikroorganisma ujian	53
Rajah 4.1	Pohon filogenetik yang menunjukkan kedudukan pencilan USM84	107
Rajah 4.2	Kesan tempoh pengkulturan terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	108
Rajah 4.3	Kesan kelajuan goncangan terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	110
Rajah 4.4	Kesan kepekatan agar terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	112
Rajah 4.5	Kesan suhu pengkulturan terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	114
Rajah 4.6	Kesan pH awal medium terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	116
Rajah 4.7	Kesan saiz inokulum terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	119
Rajah 4.8	Profil masa pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 sebelum dan selepas pengoptimuman	121
Rajah 4.9	Kesan tempoh pengkulturan terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	124

Rajah 4.10	Kesan kelajuan goncangan terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	126
Rajah 4.11	Kesan suhu pengkulturan terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	128
Rajah 4.12	Kesan pH awal medium terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	130
Rajah 4.13	Kesan saiz inokulum terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	132
Rajah 4.14	Profil masa pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 sebelum dan selepas pengoptimuman	135
Rajah 4.15	Profil masa pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 dalam fermenter tanpa pengawalan pH	139
Rajah 4.16	Kesan pH terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 dalam fermenter	141
Rajah 4.17	Kesan kadar pengadukan terhadap pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 dalam fermenter	144
Rajah 4.18	Profil masa pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 sebelum dan selepas pengoptimuman	146
Rajah 4.19	Ujian kesitotosikan pigmen semula jadi daripada <i>S. marcescens</i> USM84 ke atas nauplii <i>Artemea salina</i>	151
Rajah 4.20	Penentuan prodigiosin melalui penyerapan pigmen merah semula jadi di dalam larutan berasid dan beralkali	163



## SENARAI GAMBAR FOTO

		Halaman
Gambar foto 3.1	Beberapa mikroorganisma ujian yang digunakan dalam kajian ini	48
Gambar foto 3.2	Penyaringan aktiviti antimikrob dengan pelbagai skor	54
Gambar foto 3.3	Pengkulturan <i>Serratia marcescens</i> USM84 di dalam sistem fermenter tangki teraduk berisipadu 5 L (Infors, HT Ecotron)	70
Gambar foto 3.4	Biojisim <i>Serratia marcescens</i> USM84 selepas disejukbeku keringkan	72
Gambar foto 3.5	Pemotongan agar dari tiga kawasan yang berlainan	81
Gambar foto 4.1	Pencilan marin USM84 di atas medium agar marin condong	83
Gambar foto 4.2	Pertumbuhan pencilan USM84 di dalam tiga jenis medium yang berbeza selepas 72 jam pengkulturan, 25°C suhu pengeraman dan 120 psm kelajuan goncangan	85
Gambar foto 4.3	Perencatan zon aktiviti antimikrob ke atas beberapa jenis mikroorganisma ujian pada darjah perencatan yang berbeza	88
Gambar foto 4.4	Darjah perencatan sebatian antibakteria daripada USM84 ke atas MRSA dalam beberapa keadaan	91
Gambar foto 4.5	Koloni USM84 tumbuh di atas medium agar Marin selepas 72 jam pengeraman pada suhu 25°C	92
Gambar foto 4.6	Keadaan pencilan USM84 berusia melebihi 72 jam di bawah mikroskop beza fasa wujud secara tunggal dan berpasangan	95
Gambar foto 4.7	Struktur pencilan USM84 yang berusia 24 jam di bawah mikroskop elektron penskanan berbentuk rod pendek tanpa flagelum dan silium	97
Gambar foto 4.8	Beberapa contoh keadaan pengumpulan pigmen yang sedikit pada membran sel bagi pencilan USM84 yang berusia 24 jam	98

Gambar foto 4.9	Beberapa contoh keadaan pengumpulan pigmen yang tebal pada membran sel bagi pencilan USM84 yang berusia 48 jam	99
Gambar foto 4.10	Pertumbuhan pencilan USM84 di dalam medium Marinsepara pepejal(0.2% agar) selepas 48 jam pengeraman	101
Gambar foto 4.11	Keputusan ujian biokimia yang dihasilkan oleh pencilan marin USM84	104
Gambar foto 4.12	DNA genom pencilan USM84 terhasil daripada elektroforesis gel agaros	105
Gambar foto 4.13	Penulenan produk PCR terhasil daripada elektroforesis gel agaros	105
Gambar foto 4.14	Biojisim <i>Serratia marcescens</i> USM84 selepas disejukbeku kering	149
Gambar foto 4.15	Keadaan nauplii udang brin yang telah digunakan dalam ujian kesitotoksikan	152
Gambar foto 4.16	Ekstrak-ekstrak kasar sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84 yang terhasil dari pengekstrakan dengan pelbagai pelarut polar dan tidak-polar	153
Gambar foto 4.17	Aktiviti antibakteria pelbagai pelarut yang digunakan dalam eksperimen kecekapan pelarut mengekstrak sebatian antibakteria <i>S. marcescens</i> USM84	155
Gambar foto 4.18	Aktiviti antibakteria ekstrak kasar <i>S. marcescens</i> USM84 yang diekstrak dengan beberapa jenis pelarut	156
Gambar foto 4.19	Tindakan ekstrak sebatian antibakteria ke atas MRSA pada kepekatan yang berlainan	159
Gambar foto 4.20	Morfologi sel MRSA di pinggir zon perencatan yang bersempadan dengan kawasan pertumbuhan yang baik	162

# PIGMEN MERAH SEMULA JADI DENGAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA DARIPADA PENCILAN BAKTERIA MARIN TEMPATAN, *Serratia marcescens* USM84

## ABSTRAK

Alam marin telah terbukti menyimpan pelbagai khazanah yang tidak ternilai harganya. Terdapat banyak kajian ke atas sumber marin telah dilakukan sehingga akhirnya berjaya diaplikasikan. Justeru itu, kajian ini dijalankan untuk mengkaji dan mempertingkatkan pertumbuhan dan penghasilan sebatian antibakteria daripada pencilan terpilih USM84. Keputusan yang diperolehi menunjukkan pencilan USM84 mempunyai aktiviti antibakteria berspektrum luas ke atas bakteria Gram positif dan negatif. Sebanyak 22.73% daripada mikrob yang diuji memberikan keputusan zon perencatan yang terbaik iaitu melebihi 12.0 mm diikuti perencatan zon sederhana iaitu antara 7.0 mm sehingga 12.0 mm sebanyak 31.82% daripada 22 mikroorganisma ujian. Pencilan USM84 telah dikenalpasti sebagai *Serratia marcescens* melalui penjujukan subunit 16 Asid Ribonukleik Ribosom (16S rRNA). Pengoptimuman keadaan fizikal medium pengkulturan mencadangkan *S. marcescens* USM84 tumbuh dan menghasilkan sebatian antibakteria secara optimum memerlukan 2% saiz inokulum pada suhu 25°C dengan goncangan 150 psm di dalam medium kaldu Marin separa pepejal (0.3% agar) dengan pH awal 7.0 selama 48 jam tempoh pengkulturan di dalam sistem kelalang goncangan. Manakala di dalam sistem fermenter memerlukan 2% saiz inokulum pada suhu 25°C dengan kadar pengadukan 100 psm di dalam medium kaldu Marin separa pepejal (0.3% agar) dengan pengawalan pH pada 6.0 selama 48 jam tempoh pengkulturan. Pengoptimuman telah meningkatkan penghasilan sebatian antibakteria sebanyak 25.07-35.07 U/ml (39.89%) dan 26.66-35.07 U/ml (31.55%) daripada sistem kelalang goncangan berisipadu 250 mililiter dan 1.0 liter berbanding dengan sistem fermenter. Peningkatan aktiviti antibakteria di dalam sistem fermenter adalah sebanyak 12.37-35.05 U/ml (183.51%).

Pemerhatian di bawah mikroskop transmisi elektron (TEM) menunjukkan pengumpulan pigmen pada membran sel dan tersimpan secara intrasel. Pigmen merah semula jadi yang terhasil tidak bersifat toksik dengan  $LC_{50}$  29.17 mg/ml (12 jam pendedahan) dan 6.96 mg/ml (24 jam pendedahan). Sementara itu, nilai MIC yang dicapai pada kepekatan 6.5  $\mu$ g/ml dan ekstrak kasar antibakteria dari *S. marcescens* USM84 menunjukkan aktiviti bakteriostat ke atas sel MRSA.

**NATURAL RED PIGMENT WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY FROM A LOCAL MARINE BACTERIUM ISOLATE, *Serratia marcescens* USM84**

**ABSTRACT**

Marine world has been proven to save many treasures that are priceless. There are many of researches on marine resources have been done and were successfully applied. Therefore, this study was conducted to investigate and improve the growth and production of antibacterial compounds from isolate USM84. The results obtained showed that isolate USM84 has broad-spectrum antibacterial activity on Gram positive and Gram negative bacteria. A total of 22.73% of microbial inhibition zones tested gave the best results of more than 12.0 mm, followed by moderate zone of inhibition ranging from 7.0 mm to 12.0 mm by 31.82% from 22 test microorganisms. USM84 isolate were identified as *Serratia marcescens* by Ribonucleic acid sequencing Ribosome subunit 16 (16S rRNA). Optimization of culture medium physical condition suggests *S. marcescens* USM84 grow and produce the optimum antibacterial compounds requires 2% the size of the inoculum at a temperature of 25°C with 150 rpm shaking in a semi-solid marine broth medium (0.3% agar) with initial pH 7.0 for 48 hours of cultivation in shaking flask system. While in the fermenter system requires 2% inoculum size at 25°C with 100 rpm stirring rate in the semi-solid marine broth medium (0.3% agar) by controlling the pH at 6.0 for 48 hours of culture. Optimization has increased the production of antibacterial compounds 25.07-35.07 U/ml (39.89%) and 26.66-35.07 U / ml (31.55%) of the shaking flask volume of 250 milliliters and 1.0 liters compared to the fermenter. Optimization has increased antibacterial activity in the fermenter system of 12.37-35.05 U/ml (183.51%). Observation under transmission electron microscopy (TEM) showed that accumulation of pigment in the cell membrane and intracellular stored. Natural red pigment produced is non-toxic to LC<sub>50</sub> 29.17 mg/ml (12 hours exposure) and 6.96 mg/ml (24 hour exposure).

Meanwhile, the MIC is achieved at a concentration of 6.5 µg/ml and crude antibacterial extract from *S. marcescens* USM84 showed bacteriostatic activity on the MRSA cell.

## **BAB 1: PENGENALAN**

### **1.1 Pendahuluan**

Pigmen adalah suatu sebatian yang terdiri daripada bahan organik atau bukan organik atau campuran keduanya yang mampu menyerap, membalikan atau memindahkan cahaya tampak pada jarak gelombang antara 400-800 nm. Keadaan ini bergantung kepada struktur atau kandungan molekul sebatian pigmen yang mengandungi pelbagai kumpulan kromofor yang hadir di dalam sesuatu sebatian berwarna. Terdapat banyak bahan yang mampu menyerap secara memilih pada jarak gelombang tertentu dan keadaan ini membuatkan ianya sesuai untuk mewarnakan bahan-bahan lain. Namun begitu, sesuatu pigmen itu harus mempunyai kekuatan melindungi yang tinggi bagi sesuatu bahan dan stabil dalam bentuk pepejal pada suhu bilik (Joshi *et al.*, 2003).

Pigmen mempunyai banyak kegunaannya seperti dalam bidang industri khususnya industri makanan dan minuman, akuakultur, kosmetik, farmaseutis, perubatan, cat dan bahan pewarna, tekstil dan sebagainya. Kebanyakan pigmen di pasaran adalah yang dihasilkan secara sintesis menggunakan bahan kimia. Misalnya sebatian kadmium dan terbitannya memberikan warna kuning, merah, jingga dan hijau, manakala warna hitam pula diasaskan oleh sebatian berkarbon dan terbitannya sementara warna biru pula diasaskan kepada kobalt dan terbitannya. Penghasilan pigmen secara sintesis kimia sememangnya lebih ekonomi dan menjimatkan kos dengan produktiviti yang tinggi serta lebih menguntungkan, akan tetapi ianya dihasilkan berasaskan sumber minyak fosil yang tidak boleh diperbaharui. Tambahan pula terdapat banyak

laporan tentang kesitotoksikan pigmen sintetik ke atas penggunaannya termasuk kemusnahan alam sekitar dan gangguan kesihatan kepada manusia serta haiwan. Oleh itu, pigmen semula jadi adalah amat diperlukan untuk menggantikan pigmen sintesis khususnya dalam bidang pembuatan makanan dan minuman, akuakultur, kosmetik, farmaseutis dan perubatan (Santamaria *et al.*, 1988).

Sekarang ini pigmen semula jadi telah mendapat tempat di pasaran dan di kalangan pengguna kerana ia lebih selamat digunakan dan mesra alam. Secara biologinya, pigmen semula jadi adalah berasaskan sifat biologi dan pigmen secara biologinya ditakrifkan sebagai sesuatu bahan atau sebatian berwarna yang disintesiskan oleh tumbuhan, haiwan dan mikroorganisma. Pigmen semula jadi ini dikenali sebagai biokrom atau pigmen biologi.

## **1.2 Pigmen semula jadi**

Pigmen semula jadi boleh diperolehi daripada pelbagai sumber hidupan seperti tumbuhan, haiwan dan mikroorganisma. Tumbuhan seperti kunyit dan mambu masing-masing menghasilkan pigmen berwarna kuning dan perang-merah (Jadual 1.1), sementara haiwan seperti serangga kocinel menghasilkan warna merah kocinel. Di samping itu beberapa moluska dan karang laut juga dilaporkan memberikan warna pigmen semula jadi. Jadual 1.2 menunjukkan sebahagian daripada pigmen semulajadi yang dihasilkan oleh invertebrata dan protozoa.

Pigmen semula jadi boleh diperolehi melalui dua sumber utama iaitu tumbuhan dan mikroorganisma. Sumber tumbuhan memberikan banyak kekurangan seperti ketidakstabilan



**Jadual 1.1: Sebahagian daripada pigmen semula jadi daripada tumbuhan  
(Chengaiian *et al.*, 2010)**

<b>Tumbuhan</b>	<b>Bahagian Tumbuhan</b>	<b>Warna</b>	<b>Pigmen</b>
<i>Acacia catechu</i>	Kulit	Perang/ hitam	Katecin; asid katecutanik
<i>Acanthophonax trifoliatum</i>	Buah	Hitam	Akantrifosida; nevadensia
<i>Adhatoa vasica</i>	Daun	Kuning	Asid adhafodik; karoten; kuercetin
<i>Aloe barbadensis</i>	Seluruh tumbuhan	Merah	Barbaloin; aloe emodin
<i>Azadirachta indica</i>	Kulit	Perang	Nimbin; nimbinin; nimbidin
<i>Butea monosperma</i>	Bunga	Kuning/jingga	Butirin
<i>Capsicum annum</i>	Buah	Merah	Kapsathin; kapsorubin
<i>Curcuma longa</i>	Rizom	Kuning	Kurkumin
<i>Eugenia jambolana</i>	Kulit; daun	Merah	Asid elagik; jambolina
<i>Galium aparine</i>	Akar	Ungu	Aspevulosida; Akumina
<i>Garcinia mangostana</i>	Kulit buah	Hitam	Mangostina; gartanina
<i>Lawsonia inermis</i>	Daun	Jingga-merah	Lawsona
<i>Punica granatum</i>	Buah	Kuning	Punikalgina; Isopelleiteina
<i>Pterocarpus santalinus</i>	Kayu	Merah	Santalia
<i>Ruhia cordifolia</i>	Akar	Merah	Purpurina; rubiacordone
<i>Solanum lycopersicum</i>	Buah	Merah	Likopena

**Jadual 1.2: Pigmen semula jadi yang boleh dihasilkan oleh invertebrata**

<b>Phylum/ Kelas</b>	<b>Warna</b>	<b>Pigmen</b>
Echinodermata Tapak Sulaiman; landak laut	Hitam	Karotenoid, kuinon dan melanin
Moluska Siput; Bivalva; Sotong	Hitam	Melanin, forfirin, ommokrom, haemosianin
Serangga Kumbang koncinel	Merah/ jingga	Karotenoid, flavonoid, mlanin, ommokrom, pterin, flavin, bilin, kuinon polisiklik
Malakostraka Lipan; ulat gonggok	Hitam	Melanin, karotenoid, Haemosianin
Krustasea Ketam; udang; udang karah	Perang/merah/hitam	Karotenoid, bilin, melanin, pterin, flavin, haemosianin
Araknida Labah-labah; kala jengking	Hitam	Karotenoid, pterin, kuinon, haemosianin
Porifera Span marin	Perang	Karotenoid

terhadap cahaya, haba atau pH, mempamerkan keterlarutan air yang rendah dan bekalan yang tidak mencukupi. Tambahan pula tumbuhan menghasilkan jumlah pigmen yang sangat rendah dan kurang berkesan serta pengekstrakan pigmennya adalah tidak mesra alam kerana sisa atau residunya yang tinggi.

Oleh itu, pigmen daripada mikroorganisma adalah yang paling sesuai memandangkan pigmen yang dihasilkan oleh mikroorganisma adalah stabil dan ia boleh dihasilkan secara pengkulturan di dalam fermenter atau bioreaktor sepanjang masa dengan teknologi terkini. Secara kimianya, pigmen bakteria terdiri daripada kumpulan pirol, fenazina, karotenoid, xantofil, kuinon dan sebagainya. Antara kebaikan penghasilan pigmen oleh mikroorganisma secara fermentasi adalah penggunaan medium pengkulturan yang murah, mudah diperolehi dan dilakukan, pertumbuhan mikroorganisma yang cepat, tidak dipengaruhi oleh iklim dan sebagainya. Mikroorganisma seperti bakteria, yis dan kulat mampu menghasilkan pelbagai pigmen termasuk karotenoid, melanin, flavin, kuinon, prodigiosin dan sebagainya dengan penghasilan pigmen yang tinggi dan residu yang sedikit, berbanding dengan tumbuhan. Biosintesis pigmen semula jadi oleh mikroorganisma boleh menjadi pembekal utama sebatian kromofor yang boleh digunakan untuk pengubahsuaian lanjutan, yang akhirnya akan menghasilkan lebih banyak warna untuk pasaran. Di samping memberikan warna, pigmen semula jadi juga ada yang mempunyai sifat antibakteria. Misalnya warna merah yang dihasilkan oleh bakteria marin, *Vibrio ruber* mempunyai sifat antibakteria prodigiosin (Wan Norhana dan Darah, 2005), sementara sebatian seperti antrakuinon yang juga mempunyai sifat antibakteria terdapat pada pigmen merah terang yang dihasilkan oleh bakteria (Khanafari *et al.*, 2006). Ini adalah ciri pigmen semulajadi yang diingini untuk digunakan dalam industri pembuatan

makanan dan minuman, akuakultur, kosmetik, farmaseutis dan perubatan (Gupta *et al.*, 2007; Dharmaraj *et al.*, 2009). Hal ini kerana di samping memberikan warna pigmen semulajadi, ia juga dapat menjadi pengawet kepada produk yang bakal dihasilkan.

### 1.3 Objektif Penyelidikan

Secara praktikalnya fermentasi menggunakan mikroorganisma dapat menghasilkan pigmen yang tinggi, dan ia telah menarik perhatian ramai penyelidik. Biosintesis penghasilan pigmen oleh mikroorganisma juga dapat membekalkan sebatian kromofor untuk modifikasi secara kimia bagi penghasilan pewarna utama lain yang mempunyai spektrum warna yang lebih luas. Dalam usaha mencari sebatian berpigmen dengan ciri antimikrobnya, penyelidikan ini telah dilakukan dengan objektif mengkaji sebatian semula jadi pigmen merah daripada *Serratia marcescens* USM84. Untuk mencapai objektif ini beberapa aktiviti penyelidikan telah dirancang iaitu;

- i. Mengenalpasti pencilan USM84 yang mampu menghasilkan pigmen merah yang bersifat antibakteria
- ii. Menentukan aktiviti antibakteria, Kepekatan Perencatan Minimum (MIC) dan Kepekatan Maut Minimum (MLC) pigmen pencilan USM84 ke atas mikroorganisma ujian dan kesannya ke atas degenerasi sel bakteria ujian terpilih
- iii. Menentukan kesitotoksikan pigmen pencilan USM84 ke atas anak udang brin, *Artemia salina*

iv. Meningkatkan penghasilan biojisim sel dan pigmen dengan menggunakan medium pengkulturan yang sesuai dan menambabbaikan keadaan pengkulturannya di dalam sistem kelalang dan fermenter tangki teraduk.

## **BAB 2 : TINJAUAN BACAAN**

### **2.1 Bakteria berwarna**

Bakteria adalah sejenis mikroorganisma dan ia terdapat di mana sahaja di muka bumi ini seperti di daratan, di dalam tanah, air tawar, air laut dan sebagainya. Ia juga dapat dikumpulkan kepada bakteria psikrofil, mesofil dan termofil termasuk ekstremofil, bergantung kepada suhu dan habitat mereka. Terdapat bakteria yang tidak menghasilkan warna dan yang menghasilkan warna. Warna yang dihasilkan adalah terdiri daripada sekumpulan sebatian yang dipanggil kumpulan kromofor, dan sering disebut sebagai pigmen. Tujuan pigmen dihasilkan adalah untuk melindungi sesuatu bakteria daripada kesan sinaran matahari khususnya ultralembayung. Oleh itu, bakteria berpigmen juga dikenali sebagai kromobakteria. Bakteria yang berpigmen adalah bakteria aerob obligat dan anaerob fakultatif yang mana oksigen diperlukan untuk sintesis penghasilan pigmen.

Pembentukan atau keupayaan mensintesis pigmen oleh bakteria adalah berkait dengan ciri morfologi sesuatu sel bakteria, aktiviti sel, patogenesis, perlindungan sel dan juga kelangsungan hidup mereka. Pigmen bakteria memainkan peranan penting dalam melindungi sel dengan menyerap radiasi ultralembayung yang dikeluarkan oleh sinaran matahari, ataupun memusnahkan radikal oksigen bebas. Oleh itu, tidak hairanlah pigmen bakteria khususnya karotenoid sering dikaitkan dengan aktiviti antioksidan yang tinggi, yang dapat memerangkap dan memusnahkan radikal bebas. Bakteria ekstremofil misalnya, sering menghasilkan sejenis pigmen berwarna terang pada keadaan suhu yang tinggi dan keadaan persekitaran yang stres,

yang mana pigmen tersebut turut diperlukan untuk proses respirasi dan fotosintesis selnya. Malah, pigmen juga dilaporkan berfungsi dalam mengekalkan integriti dan kestabilan membran sel. Sintesis pigmen juga bergantung kepada pelbagai faktor seperti cahaya, pH, suhu dan jenis medium. Terdapat pelbagai jenis warna pigmen yang dihasilkan oleh bakteria yang berlainan, antaranya hitam, putih, coklat, keemasan, perak dan hijau, kuning atau biru floresen. Beberapa contoh bakteria berpigmen adalah seperti *Staphylococcus aureus* yang menghasilkan warna keemasan, *Spirillum rubrum* (ungu), *Xanthomonas campestris* (kuning), *Serratia marcescens* (merah), *Rhizobium etli* (coklat) dan *Prevotella melaninogenica* (hitam) (Sonali, 2011).

## **2.2 Pigmen daripada bakteria marin**

Lebih daripada separuh bakteria marin adalah kromogenik dan menghasilkan pelbagai warna pigmen. Kajian ke atas beberapa ribu koloni bakteria yang dipencilkan daripada sampel marin, mendapati sebanyak 31.3% koloni berwarna kuning, 15.2% berwarna jingga, 9.9% berwarna perang, dan 5.4% berwarna merah atau merah jambu (ZoBell dan Feltham, 1934). Kajian selanjutnya telah menemui 60 spesies baru bakteria marin, yang di antaranya terdapat 19 spesies berwarna kuning, 5 berwarna perang, 5 berwarna merah jambu, 4 berwarna jingga dan 1 berwarna merah (ZoBell dan Upham, 1944). Satu aktiviti pemencilan bakteria berpigmen telah dilakukan di pantai Tuticorin dengan mengutip pelbagai sampel marin seperti air laut, sedimen dan tumbuhan laut. Daripada 162 jumlah bakteria berpigmen, didapati sebanyak 62 pencilan menunjukkan aktiviti antagonis ke atas bakteria penunjuk iaitu *Lactobacillus*, *Arthrobacter* dan *Micrococcus* (Jayanth *et al.*, 2002). Kebanyakan bakteria marin yang telah dikenalpasti adalah daripada spesies *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*,

*Xanthomonas* dan *Achromobacter* (Gauthier *et al.*, 1975; Austin, 1989; Bernan *et al.*, 1997). Bakteria marin menjadi tarikan kepada penyelidik kerana mikroorganisma tersebut berpotensi untuk menghasilkan sebatian dengan sifat-sifat biologi yang unik (Fenical, 1993). Jadual 2.1 menunjukkan pelbagai pigmen bioaktif yang dihasilkan oleh bakteria marin.

### **2.3 Ekspresi pigmen oleh bakteria**

Sesetengah kumpulan bakteria menghasilkan pelbagai pigmen pada peringkat pertumbuhan yang berbeza. *Cryptococcus neoformans*, sejenis yis, menghasilkan pigmen melanin yang memainkan fungsi sebagai agen antioksidan yang penting. Kerintangan sel kriptokokus ini terhadap oksigen dan nitrogen oksida adalah lebih tinggi berbanding dengan sel yang tidak menghasilkan melanin (Wang dan Casadevall, 1994). Bakteria *Azotobacter chroococcum* pula didapati mampu menghasilkan pigmen melanin yang berfungsi untuk memberikan perlindungan daripada spesies oksigen reaktif (Shivprasad dan Page, 1989), dan pengikatan ferum oleh melanin di dalam sel *Azotobacter salinestris* boleh melindungi sel bakteria tersebut daripada kerosakan yang disebabkan oleh hidrogen peroksida. Pengeluaran pigmen oleh kumpulan beta-*Streptococcus* juga memberikan kerintangan terhadap tekanan oksidatif, termasuk hidrogen peroksida dan superoksida (Keith *et al.*, 2007).

Bakteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* didapati mengandungi iodinin iaitu suatu terbitan daripada fenazina (Trutko *et al.*, 2005). Karotenoid, iaitu suatu sebatian yang bersifat isoprenoid, telah dikesan di dalam *Agromyces ramosus* (Collins dan Bradbury, 1991) dan dua spesies *Leifsonia sensulato* (Reddy *et al.*, 2003) yang secara filogenetiknya menyamai



**Jadual 2.1: Sebatian pigmen yang dipencilkan daripada bakteria marin**

<b>Pigmen</b>	<b>Aktiviti</b>	<b>Strain Bakteria</b>	<b>Rujukan</b>
1. Undesilprodigiosin	Antikanser	<i>Streptomyces ruber</i>	Gerber, (1975)
2. Sikloprodigiosin	Immunosupresif Antikanser Antimalaria	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	Kim <i>et al.</i> , (1999); Yamamoto <i>et al.</i> , (1999); Kawauchi <i>et al.</i> , (1997)
3. Heptilprodigiosin	Antiplasmodia	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	Lazaro <i>et al.</i> , (2002)
4. Prodigiosin	Antibakteria Antikanser Algisida	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> <i>Hahellachejuensis</i>	Gerber dan Gauthier, (1979) Kim <i>et al.</i> , 2007
5. Astaxanthin	Anti-oksida	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Misawa <i>et al.</i> , (1995)
6. Violacein	Antibiotik Antiprotozoa Antikanser	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>  <i>Pseudoalteromonas tunicate</i> <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 520P1 <i>Collimonas</i> CT	MacCarthy <i>et al.</i> , (1985); Novick dan Tyler, (1985); Gauthier, (1976)  Matz <i>et al.</i> , (2004) Yada <i>et al.</i> , (2008) Hakvag <i>et al.</i> , (2009)
7. Metil saphenat (terbitan phenazin)	Antibiotik	<i>Pseudonocardia</i> sp. B6273	Maskey <i>et al.</i> , (2003)
8. Terbitan fenazina	Sitotoksik	<i>Bacillus</i> sp.	Li <i>et al.</i> , (2007)
9. Piosianina dan piorubrina	Antibakteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Saha <i>et al.</i> , (2008)
10. Asid Fenazin-1-karboksilik	Antibiotik	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nansathit <i>et al.</i> , (2009)
11. Fridamisin D, Himalomisin A, Himalomisin B	Antibakteria	<i>Streptomyces</i> sp. B6921	Maskey <i>et al.</i> , (2003)

*Rhodoglobus* sp.. Beberapa spesies *Alteromonas* pula didapati menunjukkan pigmentasi berwarna lemon-kuning hingga ke violet. Kebanyakan ahli daripada famili *Microbacteriaceae* menunjukkan kehadiran warna kuning, jingga atau merah yang berbeza dari segi intensiti dan titernya, sementara warna ditentukan oleh isoprenoid (karotenoid), kuinon, prodigiosin dan antrasiklinon, iaitu terbitan fenazina, serta lain-lain sebatian heterosiklik lagi (Trutko *et al.*, 2005). Isoprenoid disintesis melalui laluan bukan-mevalonat atau mevalonat, yang masing-masing direncat oleh fosmidomisin dan mevinolin (Lichtenthaler, 2000; Kuzuyama, 2002). Penindasan pigmentasi oleh perencat ini pada kepekatan yang lebih rendah daripada perencat-perencat lain yang menghalang proses pertumbuhan boleh bertindak sebagai petunjuk (bersama-sama dengan keputusan analisis kimia) bahawa pigmentasi adalah disebabkan oleh isoprenoid (Venil dan Lakshmanaperumalsamy, 2009). Pigmen merah dan kuning juga dilaporkan telah ditemui di dalam spora *Bacillus megaterium* KM (Ellar dan Postgate, 1974). Manakala spora *B. megaterium* QM B1551 pula mengandungi pigmen merah yang berasosiasi dengan membran spora (Racine dan Vary, 1980; Swerdlow dan Setlow, 1984).

Pigmentasi melanin adalah salah satu proses yang universal untuk organisma hidup. Melanin bercas negatif, hidrofobik (Butler dan Day, 1998) dan mempunyai berat molekul yang tinggi. Pigmen ini boleh larut dalam kedua-dua jenis pelarut air dan organik, tetapi amat sukar untuk mengkaji struktur sebatian ini sama ada melalui teknik biokimia konvensional atau biofizik (Piatelli *et al.*, 1965). Begitu juga dengan pengetahuan tentang melanin yang terdapat pada mikroorganisma (Plonka dan Grabacka, 2006) dan mikroorganisma marin adalah terhad (Sanchez-Amat *et al.*, 2010).

Terdapat tiga jenis melanin di dalam kulit patogen yaitu eumelanin yang terbentuk daripada kuinin dan radikal bebas, faeomelanin daripada tirosin dan sistein manakala allomelanin terhasil daripada prekursor bebas nitrogen (Hamilton dan Gomez, 2002). Eumelanin dan feomelanin lebih banyak ditemui pada kulit dan bulu haiwan, tetapi boleh juga ditemui di dalam mikroorganisma. Kedua-duanya dihasilkan melalui laluan Raper-Mason yang melibatkan proses o-hidroksilasi asid amino L-tirosin oleh L-dopa dan L-dopaquinon (Breakefield *et al.*, 1978). Penghasilan eumelanin adalah lebih besar dan berwarna lebih gelap iaitu coklat kehitaman berbanding dengan feomelanin yang lebih sedikit dan berwarna kuning kemerahan berserta pigmen yang mengandungi sulfur (Sanchez-Amat *et al.*, 2010). Allomelanin adalah kumpulan pigmen melanin yang paling kurang diselidiki. Kumpulan ini biasanya berwarna gelap dan umumnya dicirikan tidak mengandungi nitrogen (Nicolaus, 1968). Terdapat juga allomelanin yang berwarna kemerahan sebagai contoh yang terhasil daripada gamma-L-glutaminyl-4-hidroksibenzena yang terdapat pada cendawan atau dari asid homogentisik yang terdapat pada pelbagai jenis sel termasuk cendawan dan bakteria (Sanchez-Amat *et al.*, 1998; Schmalzer-Ripcke *et al.*, 2009).

Melanin mempunyai potensi yang besar dalam industri pertanian, kosmetik, dan farmasi. Hasil penyelidikan menunjukkan bahawa melanin yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. menunjukkan aktiviti perlindungan cahaya dan pemusnahan nyamuk melalui *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis (Liu *et al.*, 1993). Di samping itu, melanin juga merupakan heteropolimer polifenol yang mempunyai julat warna dan aplikasi yang luas. Berdasarkan struktur dan komposisi kimia, melanin mempunyai sifat fiziko-kimia yang membolehkan ia bertindak sebagai penyerap sinar ultralembayung, penukar kation, pembawa ubat, semikonduktor

amorfus, penyerap sinar-X dan sinar- $\gamma$ , dan dalam sesetengah keadaan, ia dapat bertindak sebagai substrat dengan aktiviti antioksidan dan antivirus (Riley, 1997; Lagunas-Munoz *et al.*, 2006). Biasanya bakteria didapati boleh menghasilkan 3,4-dihidroksifenilalanina-melanin, sama ada feomelanin atau eumelanin, dan pigmen seperti melanin yang terhasil daripada fenol tanpa nitrogen iaitu allomelanin atau feomelanin (Gibson dan George, 1998). Akan tetapi tidak semua bakteria yang berpigmen perang dan hitam itu adalah melanin sebenar. Penghasilan melanin oleh *E. coli* secara rekombinan bermanfaat dalam industri pemprosesan. Oleh itu, pembangunan perpustakaan metagenom bagi mikroorganisma sedimen marin laut bagi mengenalpasti gen baru yang terlibat dalam sintesis melanin adalah diperlukan (Huang *et al.*, 2009).

Violacein (3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroksi-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pirol-3-ylidene]-1,3-dihidro-2H-indol-2-satu) merupakan pigmen berwarna biru kehitaman yang terhasil daripada indol serta telah dikenalpasti pada tahun 1882. Tulang belakang karbon violacein dihasilkan daripada dua molekul L-triptofan dan molekul oksigen diperlukan bagi penghasilan pigmen ini (DeMoss dan Evans, 1959; DeMoss dan Evans, 1960; Momen dan Hoshino, 2000). Peranan penghasilan violacein dalam bakteria masih tidak difahami, tetapi terdapat saranan yang menyatakan bahawa violacein memberi manfaat dalam kelangsungan hidup bagi persaingan dengan mikroorganisma yang lain dalam persekitaran (Matz *et al.*, 2008). Cadangan lain termasuk penglibatan dalam perlindungan terhadap radiasi nampak dan peraturan penghasilan triptofan yang bersifat racun terhadap bakteria pada kepekatan yang tinggi (Antonio dan Creczynski-Pasa, 2004). Violacein dihasilkan oleh beberapa spesies bakteria, termasuk spesies Gram negatif *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, *Pseudoalteromonas*

*luteoviolacea*, *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 dan *Pseudoalteromonas* sp. 710P1 (Rettori dan Duran, 1998; Pantanella *et al.*, 2007; Yada *et al.*, 2008).

Kluster gen bagi biosintesis violacein telah diunjukkan daripada beberapa penghasil violacein termasuk *Chromobacterium violaceum* dan DNA persekitaran (August *et al.*, 2000; Brady *et al.*, 2001). Terdapat 8 kb dan 6.7 kb kluster violacein telah dilaporkan mengandungi empat gen (vioA-D) yang bertanggungjawab untuk penghasilan violacein dan deoxyviolacein (DeMoss dan Evans, 1959). Violacein juga telah menunjukkan aktiviti anti-protozoa (Leon *et al.*, 2001; Matz *et al.*, 2004), antikanser (Ferreira *et al.*, 2004; Kodach *et al.*, 2006), anti-virus (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2003), antibakteria (Lichstein dan van De Sand, 1946; Nakamura *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2006) dan antioksidan (Konzen *et al.*, 2006). Aktiviti antibakteria termasuk merencat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Mycobacterium* dan *Pseudomonas*.

Berdasarkan sifat tersebut, violacein memiliki nilai komersial yang menarik untuk kegunaan di dalam bidang terapeutik dan telah dicadangkan bagi tujuan dermatologi (Antonio dan Creczynski-Pasa, 2004). Violacein juga perlu dianggap sebagai sebatian *in vitro* genotoksik ke atas sel-sel mamalia kerana kesitotoksikan yang ditunjukkannya pada sel Vero dan-FRhK 4. Walau bagaimanapun, penyelidikan yang lebih lanjut dan mendalam diperlukan sebelum membuat sebarang kesimpulan terhadap potensi violacein di dalam bidang farmaseutik pada hari mendatang (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2006).

## 2.4 Pigmen bersifat karotenoid

Karotenoid dianggap sebagai kumpulan pigmen utama dan paling banyak ditemui, malah ia telah menjadi perhatian ramai kerana ciri pigmennya yang memberikan kesan baik ke atas kulit manusia (Sandman, 2001). Karotenoid dihasilkan oleh pelbagai jenis organisma, daripada prokariot bukan fototrof sehingga tumbuhan peringkat tinggi. Pigmen ini menghasilkan pelbagai warna sama ada kuning, jingga, atau merah dan biosintesis rangka karbonnya adalah berdasarkan kondensasi unit isoprenil. Kepelbagaian struktur yang terbentuk adalah disebabkan oleh pelbagai pengubahsuaian tulang belakang karbon melalui proses seperti pengoksidaan, hidroksilasi dan sebagainya. Oleh kerana mempunyai warna yang menarik dan bersifat antioksidan, karotenoid digunakan secara komersil sebagai pewarna makanan, tambahan makanan haiwan dan, baru-baru ini dikembangkan dalam bidang nutrasetik untuk tujuan kosmetik dan perubatan. Namun, pada masa kini sebahagian besar pengeluaran karotenoid secara komersil berdasarkan pengekstrakan pada tisu tumbuhan atau sintesis kimia. Walau bagaimanapun, bagi meluaskan pasaran di seluruh dunia, mikroorganisma mempunyai potensi yang besar dan baik dari segi kecekapan pengeluaran dan kepelbagaian struktur karotenoid (de Haan *et al.*, 1991; Vandammen, 1992; Vazquez dan Martin, 1997; Buzzini dan Martin, 1999; Buzzini, 2001; Frengova *et al.*, 2003). Mikroorganisma yang berupaya menghasilkan karotenoid dipanggil mikroorganisma karotenogen.

### **2.4.1 Fungsi karotenoid**

Karotenoid memainkan fungsi yang penting dalam metabolisme makula dan retina mata seperti mana yang dilakukan oleh  $\beta$ -karoten dan xantofil. Astaxantin, iaitu sejenis pigmen xantofil boleh didapati dengan banyak terutamanya dalam udang, ketam, udang karah dan salmon. Tambahan pula, ia menghasilkan pewarnaan merah di dalam beberapa jenis burung seperti burung bangau dan flamingo. Ada juga bukti yang menunjukkan xantofil juga berfungsi sebagai pelindung kimia. Selanjutnya, xantofil lain seperti adonirubin dan astaxanthin, juga bertindak sebagai bahan nutraseutis yang menghalang penghasilan kanser melalui sifat antioksidan, anti-radikal bebas dan lain-lain mekanisme lagi. Dalam hal nutraseutis ini juga, xantofil berguna untuk menghalang serangan jantung dan angin ahmar (Long, 2004)

### **2.4.2 Kelas karotenoid**

Karotenoid tergolong kepada kategori tetraterpenoid yang mengandungi 40 atom karbon. Dari segi struktur pigmen, ia wujud dalam bentuk rantai poliena yang kadang-kala ditamatkan oleh cecincin. Terdapat lebih 600 karotenoid telah diketahui yang dapat dipisahkan kepada dua kelas utama iaitu xantofil dan karoten. Xantofil yang mengandungi molekul oksigen boleh terdiri daripada lutein,  $\alpha$ -kriptoxanthin,  $\beta$ -kriptoxanthin, astaxanthin, zeaxanthin dan kantaxanthin, manakala karoten pula adalah bebas oksigen seperti alfa-karoten, beta-karoten dan likopen. Karoten yang lazim hanya mengandungi karbon dan hidrogen sahaja.

### 2.4.3 Contoh karotenoid

Karotenoid adalah pigmen organik yang disintesis secara semulajadi di dalam kromoplasma tumbuhan dan turut dihasilkan oleh beberapa organisma fotosintesis seperti alga, kulat dan bakteria. Haiwan tidak boleh menghasilkan karotenoid dengan sendiri dan dengan yang demikian pigmen ini perlu dibekalkan di dalam makanan haiwan tersebut. Sebagai contoh, warna merah jambu pada burung flamingo dan ikan salmon serta warna merah pada udang karah menunjukkan kehadiran karotenoid. Dalam tumbuh-tumbuhan pula, lutein xantofil adalah karotenoid yang paling banyak dan peranannya dalam mencegah penyakit mata yang berkaitan dengan usia masih dalam kajian. Lutein dan pigmen karotenoid yang lain yang terdapat di dalam daun adalah tidak jelas kelihatan kerana terdapatnya kehadiran pigmen lain seperti klorofil. Begitu juga dengan karotenoid yang ditemui dalam daun adalah likopen yang berwarna merah dan xantofil berwarna kuning. Karotenoid wujud di dalam kebanyakan tumbuhan hidup sementara penghasilannya tidak memerlukan cahaya matahari. Karotenoid juga terurai dengan lebih perlahan berbanding dengan klorofil (Helmenstine, 2011).

Akhir-akhir ini, pengeluaran karotenoid telah menjadi salah satu kegiatan yang paling berjaya dalam bidang bioteknologi mikroalga. Permintaan karotenoid yang diperolehi daripada sumber-sumber alam semula jadi semakin meningkat (Das *et al.*, 2007). Hal ini telah menyebabkan usaha besar untuk meningkatkan pengeluaran karotenoid daripada sumber hidup dan bukannya sintesis kimia (Del Campo *et al.*, 2007). Menurut laporan yang diterbitkan oleh Komunikasi Perniagaan pada Mac 2008, pasaran global untuk semua karotenoid yang telah dikomersilkan direkodkan sebanyak 766 juta dolar Amerika, dan dijangka meningkat menjadi



919 juta dolar Amerika pada tahun 2015. Secara khususnya, keluasan pasaran beta-karoten pada tahun 2007 adalah 247 juta dolar Amerika, dan dijangka mencapai 285 juta dolar Amerika pada tahun 2015. Selain likopen dan beta-karoten, lutein xantofil, astaxanthin dan kantaxanthin turut menjadi karotenoid yang berharga dan mendapat permintaan yang tinggi di pasaran. Keluasan pasaran astaxanthin dalam bidang akuakultur pada tahun 2009 adalah 260 juta dolar Amerika iaitu sekitar 2500 dolar Amerika per kilogram (USD2500 kg<sup>-1</sup>). Selain itu, keluasan pasaran lutein pada tahun 2010 adalah sekitar 190 juta dolar Amerika. Keadaan ini menunjukkan karotenoid mengalami pertumbuhan paling cepat dalam pasaran (Fernandez-Sevilla *et al.*, 2010). Mikroalga yang mengandungi karotenoid mempunyai kegunaan yang luas dalam pelbagai kegiatan komersil (Martin *et al.*, 2008; Vilchez *et al.*, 2011).

## **2.5 Pigmen karotenoid bersifat antibakteria**

Terdapat pigmen karotenoid bakteria bersifat antibiotik yang aktif menentang bakteria, kulat dan yis patogen. Antaranya pigmen karotenoid berprodigiosin yang dihasilkan oleh *Serratia*, eritromisin (*Streptomyces*), spirilloxantin (*Spirillum*), piosianin, pioverdin dan piochelin daripada *Pseudomonas* berpotensi sebagai pigmen antibiotik (Sonali, 2011). Karotenoid berprodigiosin atau lebih kerap disebut sebagai prodigiosin adalah pigmen merah yang dihasilkan oleh pelbagai mikroorganisma seperti *Serratia marcescens*, *Vibrio psychroerythrus*, *Vibrio ruber*, *Streptomyces griseoviridis* dan *Hahella chejuensis*. Hasil kajian telah membuktikan pigmen karotenoid berprodigiosin mempunyai aktiviti antibakteria, antikulat, imunomodulator, anti-kanser dan anti-malaria (Frustner, 2003). Pigmen ini juga mempunyai aktiviti perencatan berspektrum luas menentang pelbagai spesies bakteria, kulat dan protozoa

(Demain, 1995). Jadual 2.2 menunjukkan pigmen karotenoid bersifat antibakteria yang dihasilkan oleh beberapa yis dan bakteria.

### **2.5.1 Karotenoid bersifat prodigiosin dan *Serratia marcescens***

Sebahagian besar strain jenis liar *Serratia marcescens* menghasilkan sebatian metabolit sekunder iaitu pigmen karotenoid berprodigiosin (PG) berwarna merah, yang merupakan pigmen tripirol linear serta mempunyai berat molekul yang rendah iaitu 323.4 Dalton dan hanya terhasil pada tahap akhir (fasa pegun) pertumbuhan bakteria. Pigmen karotenoid berprodigiosin ini juga telah dipencilkan daripada beberapa spesies lain seperti *Serratia plymuthica*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas magnisorubra*, *Hahella chejuensis*, *Vibrio gazogenes* dan *Vibrio psychroerythreus* (Bennett dan Bentley, 2000; Kim *et al.*, 2007). Pigmen ini tidak mempunyai takrifan peranan secara fisiologi bagi strain yang menghasilkan, tetapi telah dilaporkan mempunyai aktiviti antikulat, antibakteria, algisid, antiprotozoa atau antimalaria, immunosupresif dan anti-kanser (D'Alessio *et al.*, 2000; Isaka *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2005; Someya *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2006). *Serratia marcescens* juga merupakan patogen oportunistik yang boleh memberi ancaman kepada kesihatan masyarakat (Gargallo-Viola, 1989). Walaupun bersifat patogen, pigmen merah larut air yang dihasilkan oleh *S. marcescens* masih dianggap menarik kerana telah dilaporkan mempunyai aktiviti antibiotik (Tsuji *et al.*, 1990; Kataoka *et al.*, 1992; Tsuji *et al.*, 1992; Songia *et al.*, 1997). *S. marcescens* juga menghasilkan pigmen ungu kemerahan yang larut air dengan aktiviti mimesis-dismutase superoksida (Hardjito *et al.*, 2002). Karotenoid berprodigiosin juga telah dilaporkan berupaya mengaruh apoptosis di dalam pelbagai jenis sel kanser, seperti kanser haematopoitik, kolorektum dan perut (Diaz-Ruiz *et al.*, 2001;

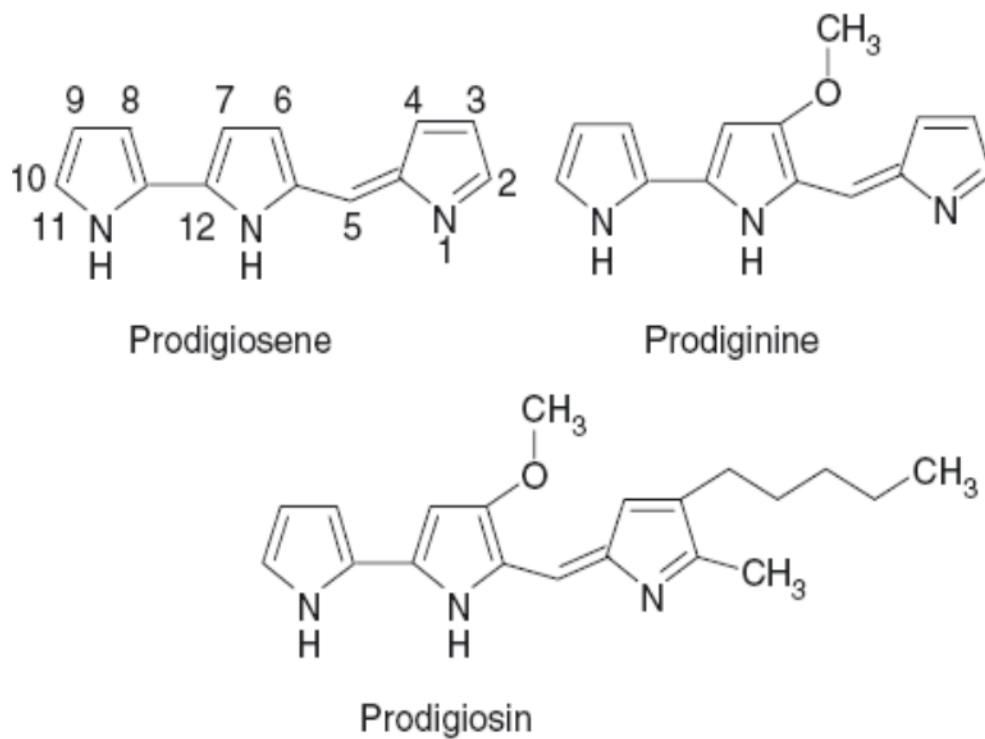
**Jadual 2.2: Beberapa jenis pigmen yang dihasilkan oleh mikroorganisma**

<b>Mikroorganisma</b>	<b>Pigmen</b>	<b>Warna</b>	<b>Rujukan</b>
<i>Serratia marcescens</i>	Prodigosin	Merah	Kraft, (1902)
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Indigoidine	Biru	Starr, (1958)
<i>Monascus roseus</i>	Kanthaxanthin	Oren Merah jambu	Cooney <i>et al.</i> , (1966)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaxanthin	Kuning	Hammond & White, (1970)
<i>Rugamonas rubra</i>	Pigmen seperti prodigosin	Merah	Gerber, (1975)
<i>Streptoverticillium rubr-reticuli</i>	Pigmen seperti prodigosin	Merah	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pikosianin	Biru Hijau	Baron & Rowe, (1981)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin	Merah	Kobayashi <i>et al.</i> , (1993)
<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ -karoten	Oren	Jacobson & Wasileski, (1994)
<i>Bradyrhizobium</i>	Kanthaxanthin	Oren	Lorquin <i>et al.</i> , (1997)
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xanthomonadin	Kuning	Rajagopal <i>et al.</i> , (1997)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxanthin	Merah	Florencio <i>et al.</i> , (1998)
<i>Serratia rubidaea</i>	Pigmen seperti prodigosin	Merah	Moss, (2002)
<i>Vibrio gaogenes</i>	Pigmen seperti prodigosin	Merah	
<i>Alteromonas rubra</i>	Pigmen seperti prodigosin	Merah	
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violacien	Ungu	Matz <i>et al.</i> , (2004)

Montaner dan Perez-Tomas, 2001). Kegunaan pigmen karotenoid berprodigiosin di dalam industri tekstil pula adalah masih baru. Namun, terdapat pigmen seperti karotenoid berprodigiosin yang dihasilkan oleh bakteri marin *Serratia* sp. BTWJ8 dan pengoptimuman keadaan pertumbuhannya telah dilakukan termasuk komposisi medium pengkulturan bagi pengeluaran maksimum karotenoid berprodigiosin yang boleh digunakan sebagai pewarna dalam industri tekstil (Krishna *et al.*, 2011).

Biosintesis karotenoid berprodigiosin ( $C_{20}H_{25}N_3O$ ) adalah proses bercabang di mana prekursor monopirol 2-metil-3-n-amilpirol (MAP) dan bipirol 4-metil-2, 2-bipirol-5-carboxyaldehyde (MBC) disintesis secara berasingan dan kemudian langkah terakhirnya adalah melibatkan enzim (PCE) kondensasi (PG) yang memadatkan MAP dan MBC bersama-sama. Gen yang mengkodkan biosintesis (PG) terletak sama ada di kromosom sel (Dauenhauer *et al.*, 1984) atau di plasmid ataupun di kedua-duanya sekali (Harris *et al.*, 2004).

Terdapat kajian lain yang turut mengesahkan bahawa prodigiosin adalah dari keluarga molekul antibiotik tripirol yang dipanggil prodiginina, serta mempunyai potensi sebagai agen anti-kanser atau immunosupresif (Williamson *et al.*, 2006). Sebatian ini turut dihasilkan oleh aktinomiset dan pelbagai strain eubakteria (Furstner, 2003). Prodiginina tripirol linear berwarna merah yang dihasilkan oleh *S. marcescens*, juga dikenali sebagai prodigiosin (2-metil-3-amil-6 metoksiprodigosene). Ia mempunyai beberapa siri relatif yang dekat pada teras prodigosena yang sama tetapi dengan gantian alkil yang berbeza. Rajah 2.1 menunjukkan struktur kimia nukleus induk dalam pelbagai sebatian oligopirol linear (prodigosena, prodiginina dan prodigiosin). Struktur rangka pirolilpirrometena umum bagi prodigiosin dan pigmen seperti



**Rajah 2.1: Struktur kimia nukleus induk dalam pelbagai sebatian oligopirol linear (Hearn *et al.*, 1970)**

prodigiosin dipanggil prodigiosena (Hearn *et al.*, 1970). Prodiginina pula adalah nama yang dicadangkan untuk 6-metoksiprodigiosena (Gerber, 1969), manakala prodigiosin boleh disebut sebagai 2-metil-3-amil-6-metoksiprodigiosena atau 2-metil-3-amilprodiginina (Kim *et al.*, 2007).

### **2.5.2 Penghasilan pigmen karotenoid bersifat prodigiosin secara fermentasi kultur tenggelam**

Sekarang ini penghasilan karotenoid utama adalah menerusi fermentasi kultur tenggelam dan juga fermentasi keadaan pepejal. Pigmen karotenoid bersifat antibakteria boleh diperolehi daripada mikroorganisma karotenogen seperti *Dunaliella salina*, *Xanthomyces dendrorhous*, *Hematococcus pluvialis* dan *Blakeslea trispora* yang telahpun dikulturkan di dalam fermenter skala industri (Olaizola, 2000; Raja *et al.*, 2007). Kini, bakteria *Serratia marcescens* pula sedang dikulturkan dalam skala besar untuk tujuan mendapatkan bekalan karotenoid berprodigiosin yang mempunyai sifat antibakteria.

*Serratia*, seperti ahli *Enterobacteriaceae* lain, berupaya tumbuh pada medium biasa dalam keadaan anaerob dan aerob. Ia juga tumbuh dengan baik pada medium sintetik menggunakan pelbagai sebatian sebagai sumber karbon tunggal. *S. marcescens* adalah pengeluar utama prodigiosin (Furstner, 2003). Medium konvensional yang digunakan oleh strain *S. marcescens* untuk biosintesis prodigiosin adalah medium kompleks yang kaya dengan pelbagai nutrien (Yamashita *et al.*, 2001; Furstner, 2003; Giri *et al.*, 2004). Terdapat keperluan nutrisi tertentu seperti tiamina dan asid ferik (Wai dan Chen, 2005) yang sangat penting untuk penghasilan

prodigiosin, sedangkan fosfat (Witney *et al.*, 1977), trifosfat adenosin dan ribosa (Lawanson dan Sholeye, 1975) pula mempunyai kesan perencatan terhadap penghasilan prodigiosin.

Giri *et al.* (2004) telah menguji prestasi beberapa siri medium dan mendapati bahawa medium kaldu segar kacang tanah dapat meningkatkan penghasilan prodigiosin secara signifikan. Kajian dalam perbandingan awal telah dilakukan dengan menggunakan kaldu serbuk bijan di dalam air, kaldu nutrien dan kaldu pepton gliserol sebagai medium pertumbuhan *S. marcescens*. Pemerhatian menunjukkan kaldu bijan memberikan hasil yang lebih baik daripada segi perbandingan biosintesis prodigiosin. Kajian lanjutan dilakukan dengan sumber yang lebih murah tersedia ada seperti kacang tanah dan kelapa. Minyak bijan, minyak kacang dan minyak kelapa juga dibandingkan dengan kesemua medium tersebut. Hasil kajian menunjukkan bahawa asid lemak berperanan sebagai substrat bagi peningkatan pengeluaran prodigiosin. Pelbagai komponen pada biji benih sebagai substrat boleh merangsang kepadatan sel dan mengakibatkan pengumpulan regulator positif yang lebih tinggi di dalam sel sehingga mencetuskan pengeluaran pigmen yang lebih banyak.

Penghasilan prodigiosin oleh *S. marcescens* boleh dipengaruhi oleh suhu dan penghasilan pigmen akan terencat pada suhu yang lebih tinggi dari 37°C. Didapati medium kacang tanah menyokong biosintesis prodigiosin walaupun suhu mencecah 37°C, akan tetapi tidak berlaku di dalam medium kaldu nutrien atau kaldu pepton gliserol, dengan atau tanpa gula. Medium kaldu bijan memberikan hasil maksimum prodigiosin pada suhu 28°C - 37°C jika dibandingkan dengan kaldu nutrien dan kaldu pepton gliserol. Hasil prodigiosin yang maksimum diperhatikan pada suhu 28°C dan 30°C di dalam kaldu nutrien. Akan tetapi pada suhu 37°C, *S. marcescens* tidak