

**PENURUNAN KADAR GLUKOSIDA
SIANOGENIK BIJI KORO BENGUK
(*MUCUNA PRURIENS*, D.C.) OLEH AKTIVITAS
FERMENTASI
ASPERGILLUS ORYZAE, *A. SOJAE*, *RHIZOPUS
OLIGOSPORUS* DAN *R. ORYZAE***

**THE DECREASE OF CYANOGENIC GLUCOSIDE CONTENT OF
VELVET BEANS (*Mucuna pruriens*, D.C.) AS A RESULT OF
FERMENTATION ACTIVITIES OF *Aspergillus oryzae*,
A sojae, *Rhizopus oligosporus* AND *R. oryzae***

Sri Wedhastr^{*)}

Abstract

Aspergillus oryzae, *A. sojae*, *Rhizopus oligosporus* and *R. oryzae* have been used as inoculants for fermentation of velvet beans (*Mucuna pruriens*). The degradation of cyanogenic glucoside during fermentation was evaluated by measuring the concentration of HCN in the fermented beans.

The results showed that the longer the fermentation, the lower cyanogenic glucoside content, suggesting that the molds have the β -glucosidase activities. It was also found that the β -glucosidase activity of *Aspergillus* spp. was higher than that of *Rhizopus* spp.

Intisari

Aspergillus oryzae, *A. sojae*, *Rhizopus oligosporus* dan *R. oryzae* digunakan untuk mengurangi kadar glukosida sianogen biji koro benguk (*Mucuna pruriens*).

Biji koro benguk dididihkan selama 1 jam dengan penambahan air (1:10) dan kemudian dikuliti. Biji bebas kulit selanjutnya direndam semalam. Setelah perendaman, biji dipotong-potong dan disterilkan di dalam cawan petri (50 g/cawan). Biji steril selanjutnya diinokulasi dengan spora jamur (10^6 spora/g biji) dan diinkubasikan selama 7 hari. Penurunan kadar glukosida sianogen selama fermentasi dievaluasi dengan mengukur kadar HCN dalam biji.

Enzim β -glukosidase kasar yang dihasilkan oleh *A. oryzae*, *A. sojae*, *R. oligosporus* dan *R. oryzae* selama fermentasi diekstraksi dengan 0,1 M bufer asetat pH 5,5. Untuk uji aktivitas enzim digunakan substrat biji koro benguk dan p-nitrofenil β -D glukosida.

^{*)}Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.

Hasil yang diperoleh adalah kadar glukosida sianogen pada biji koro benguk semakin kecil dengan lamanya proses fermentasi oleh jamur-jamur tersebut, karena adanya enzim β -glukosidase yang dihasilkan. Enzim β -glukosidase *A. oryzae* dan *A. sojae* mempunyai aktivitas tertinggi pada hari kedua dan pertama, sedangkan enzim β -glukosidase *R. oligosporus* dan *R. oryzae* pada hari ketiga dan keenam. Enzim β -glukosidase *A. oryzae*, *A. sojae*, *R. oligosporus* mempunyai pH optimum 6,8. Enzim β -glukosidase *A. oryzae*, *A. sojae*, dan *R. oligosporus* mempunyai suhu optimum 30°C, sedangkan *R. oryzae* 28°C.

Pengantar

Tanaman koro benguk merupakan tanaman legum yang mempunyai potensi untuk dikembangkan karena kandungan proteinnya cukup tinggi yaitu 27% – 30% (Gandjar dan Slamet, 1974), dan dapat tumbuh pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan.

Biji koro benguk biasanya dikonsumsi dalam bentuk tempe terutama di daerah di mana tanaman koro benguk banyak dibudidayakan (Harini, 1979).

Koro benguk mengandung toksikan glukosida sianogen yang disebut *phaseolunatin* atau linamarin (Makfoeld, 1979). Linamarin 2-(β -D-glucophyranosyloxy)-2-methyl propanenitrile, mempunyai rumus molekul $C_{10}H_{17}NO_6$ (Bennet, 1974, Windholz *et al.*, 1983). Senyawa ini dapat terhidrolisis oleh enzim β -glukosidase menjadi glukosa, aseton dan HCN (Makfoeld, 1979). HCN inilah yang dapat menimbulkan keracunan.

Beberapa cara telah dilakukan untuk menghilangkan toksikan tersebut, yakni dengan merendam biji yang ukurannya sudah diperkecil, dan direbus selama 40 menit terlebih dahulu (Anonim, 1977). Tempe yang dihasilkan dari fermentasi biji koro benguk oleh usar diketahui tidak mengandung glukosida sianogen (Anonim, 1979).

Usar merupakan inokulum tempe tradisional yang mengandung terutama jamur *Rhizopus spp.*, *Aspergillus sp.*, bakteri dan khamir (Jutono and Sri Wedhastri, 1983). Gandjar (1977) mendapatkan bahwa *R. oligosporus* dan *R. oryzae* hampir selalu dapat diisolasi dari sampel tempe benguk.

Penelitian ini dikerjakan untuk mengetahui kemampuan *A. oryzae*, *A. sojae*, *R. oligosporus* dan *R. oryzae* dalam mengurangi kandungan glukosida sianogen biji koro benguk selama proses fermentasi.



Bahan dan Metode

Bahan

Biji koro benguk yang digunakan berwarna putih abu-abu diperoleh dari Wonosari, Gunung Kidul.

Mikroorganisme

Biakan murni jamur *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *Rhizopus oligosporus* diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Fakultas Teknologi Pertanian UGM, sedangkan *R. oryzae* dari Fakultas MIPA, UI.

Metode Fermentasi

Fermentasi dilakukan dengan 2 cara, yaitu fermentasi jamur terhadap substrat biji koro benguk dan fermentasi jamur terhadap media sintetik.

Fermentasi Biji Koro Benguk

Untuk perlakuan pendahuluan biji diperlakukan sesuai dengan metode yang telah dikerjakan sebelumnya (Anonim 1977). Kemudian biji dipotong-potong dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Biji steril diinokulasi dengan 50×10^6 spora jamur (Srivastava *et al.*, 1987). Hasil inokulasi diinkubasikan pada suhu kamar selama 7 hari.

Fermentasi Jamur pada Media Sintetik

Tiap 100 ml media sintetik (Wang *et al.*, 1980) diinokulasi dengan 100×10^6 spora jamur. Hasil inokulasi diinkubasikan pada suhu kamar selama 3 hari (72 jam) dengan digojog (150 rpm).

Analisis HCN

Satu gram hasil fermentasi biji koro benguk ditambah 15 ml 0,2 M bufer fosfat pH 6,8 digojog 15 menit, dan disaring. Filtrat dikembalikan ke volume semula dengan bufer yang sama. Larutan inilah yang ditentukan kadar HCN-nya.

Hidrolisis glukosida sianogen dilakukan dengan menambah 1 ml larutan sampel dengan 1 ml NaOH 0,1 M dan diinkubasikan pada

suhu kamar selama 30 menit (Okoh *et al.*, 1988). Untuk deteksi HCN digunakan metode pikrat basis (Ikediobi *et al.*, 1980). Larutan akhir diamati absorbansinya dengan Spektroskop 21 pada panjang gelombang 490 nm. Konsentrasi HCN dihitung dengan memplot data pada kurva baku. Kurva baku dibuat dari larutan baku KCN dengan kisaran (CN⁻) 0,32 – 32 ug/ml.

Uji Aktivitas enzim β -glukosidase Kasar Jamur

Ekstraksi enzim hasil fermentasi substrat padat dilakukan sesuai dengan metode Ikediobi *et al.*, (1980). Aktivitas β -glukosidase diukur dengan menggunakan substrat p-nitrofenil β -D-glukopiranosida (pNPG) sesuai dengan metode Bernier dan Stutzenberger (1989).

Penentuan pH Optimum Aktivitas β -glukosidase Kasar Jamur

Uji aktivitas enzim dilakukan dengan bufer fosfat 0,2 M pada pH 6; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; dan 7,8 pada suhu 30°C.

Penentuan Suhu Optimum Aktivitas β -glukosidase Kasar Jamur

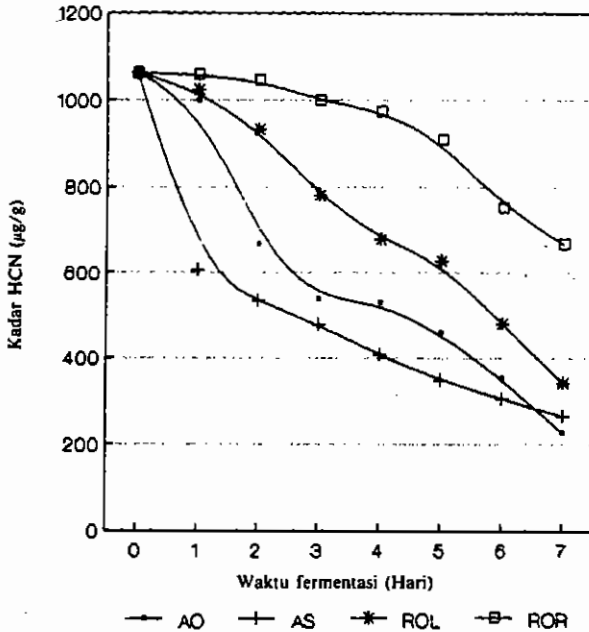
Uji aktivitas dilakukan pada suhu kamar (28°C); 30°C, 40°C, 50°C dan 60°C dengan bufer fosfat 0,2 M pH 6,8.

Hasil dan Pembahasan

Perubahan Kadar HCN Selama Fermentasi

Perubahan kadar HCN yang terjadi selama fermentasi dapat dilihat pada gambar 1. Dari keempat jamur yang digunakan di dalam penelitian ini *A. oryzae*, mempunyai potensi tertinggi pada pengurangan kadar HCN biji (78,66%), kemudian diikuti berturut-turut *A. sojae*, (75,04%), *R. oligosporus* (67,79%) dan *R. oryzae* (37,20%).

Pada penggunaan *A. oryzae*, pengurangan kadar HCN tertinggi terjadi pada hari kedua, *A. sojae* terjadi pada hari pertama, *R. oligosporus* pada hari ketiga dan *R. oryzae* pada hari keenam fermentasi. Ada dugaan bahwa pada hari pertama dan kedua fermentasi, *A. sojae* dan *A. oryzae* sudah mampu memecah cukup banyak ikatan glukosidik pada linamarin, sedangkan *R. oligosporus* dan



Gambar 1. Kadar HCN ($\mu\text{g/g}$ berat kering) biji koro bengkul selama fermentasi oleh: *Aspergillus oryzae* (AO), *A. sojae* (AS), *R. oligosporus* (ROL) dan *R. oryzae* (ROR).

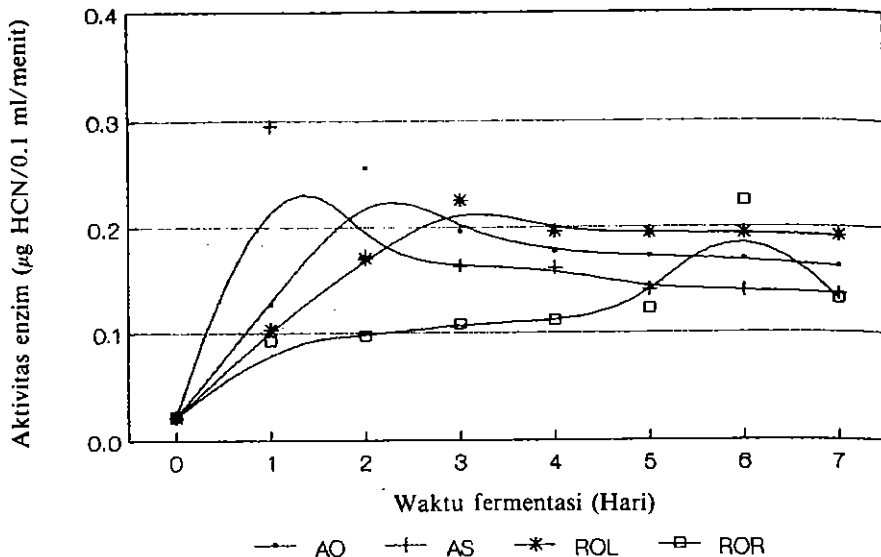
R. oryzae baru pada hari berikutnya, sehingga HCN terbebaskan.

HCN yang bebas ini diduga menguap, karena HCN mempunyai titik didih yang rendah (Montgomery, 1969). Jamur diduga tidak akan menggunakan HCN yang bebas sebagai sumber N, karena HCN merupakan senyawa yang mempunyai potensi dapat menghambat sitokrom oksidase (enzim *respiratory terminal*) bagi organisme yang aerob (Hodgson dan Guthrie, 1980). HCN ini juga dapat menghambat enzim-enzim katalase, peroksidase, asam askorbat oksidase, karbonil anhidrase, nitrat reduktase, alkalin fosfatase, aldolase dan alkohol dehidrogenase (Whitaker, 1972).

Aktivitas larutan enzim β -glukosidase kasar jamur hasil fermentasi substrat padat dan media sintesis dengan substrat para nitrofenil β -D-glukopiranosida.

Hasil pengujian aktivitas β -glukosidase pada fermentasi substrat padat dapat dilihat pada gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa *A. oryzae* dan *A. sojae* mempunyai aktivitas β -glukosidase yang lebih tinggi dibandingkan dengan *R. oligosporus* dan *R. oryzae*. Hal ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Mega dan Matsushima (1983) yang mendapatkan bahwa *A. oryzae* mempunyai aktivitas β -glukosidase yang tinggi. Hasil yang ditunjukkan pada gambar 2 juga memberi-



Gambar 2. Aktivitas enzim β -glukosidase enzim *A. oryzae* (AO), *A. sojae* (AS), *R. oligosporus* (ROL) dan *R. oryzae* (ROR) pada hasil fermentasi substrat padat. Waktu inkubasi 15 menit.

kan indikasi bahwa *R. oryzae* dan *R. oligosporus*, merupakan penghasil β -glukosidase.

Pada penggunaan *A. oryzae*, aktivitas β -glukosidase tertinggi didapatkan pada hari keempat (18,773 μg nitrofenol/0,1 ml/menit), *A. sojae* pada hari kelima (20,076 μg nitrofenil/0,1 ml/menit), *R. oligosporus* pada hari ketiga (10,957 μg nitrofenol/0,1 ml/menit), dan *R. oryzae* pada hari kelima (10,114 μg nitrofenol/0,1 ml/menit).

Hasil pengujian aktivitas enzim β -glukosidase pada fermentasi media sintetik dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas enzim β -glukosidase kasar *A. oryzae* (AO), *A. sojae* (AS), *R. oligosporus* (ROL) dan *R. oryzae* (ROR) dari hasil fermentasi media sintetik.

Spesies Jamur	μg nitrofenol/0,1 ml/menit*
<i>A. oryzae</i>	0,2603 \pm 0,0011
<i>A. sojae</i>	0,3257 \pm 0,0044
<i>R. oligosporus</i>	0,2143 \pm 0,0034
<i>R. oryzae</i>	0,1071 \pm 0,0065

* Angka-angka tersebut merupakan rerata dari tiga ulangan

- Waktu fermentasi pada media sintetik: 72 jam

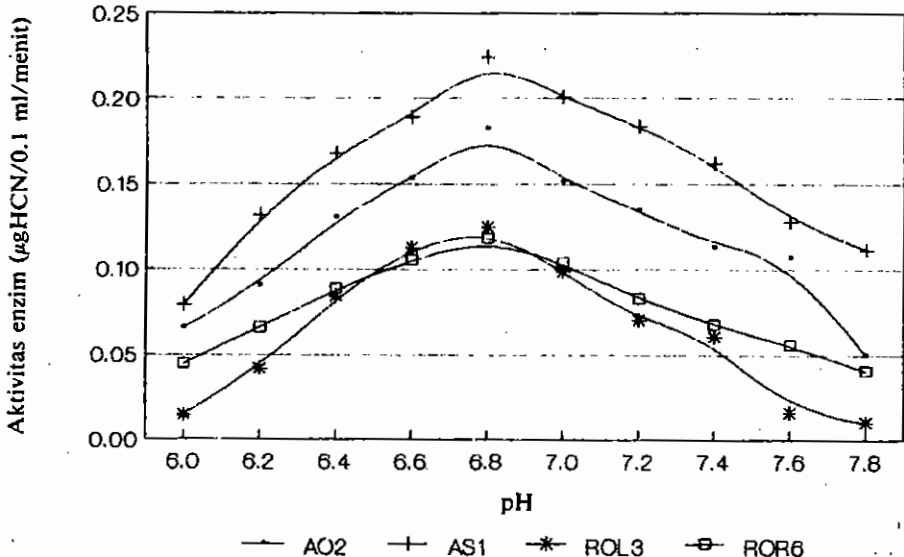
- Waktu inkubasi uji aktivitas: 15 menit.

Tabel 1 menunjukkan bahwa *A. oryzae* dan *A. sojae* mempunyai aktivitas β -glukosidase yang lebih tinggi daripada *R. oligosporus* dan *R. oryzae*. Oleh karena pada media sintetik yang digunakan hanya terdapat sumber C glukosa, maka ada dugaan bahwa enzim kasar β -glukosidase jamur-jamur ini bersifat konstitutif. Dugaan ini didukung hasil penelitian Srivastava *et al.*, (1987) yang mendapatkan bahwa enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh *A. wentii* bersifat konstitutif (tidak memerlukan induser di dalam produksinya).

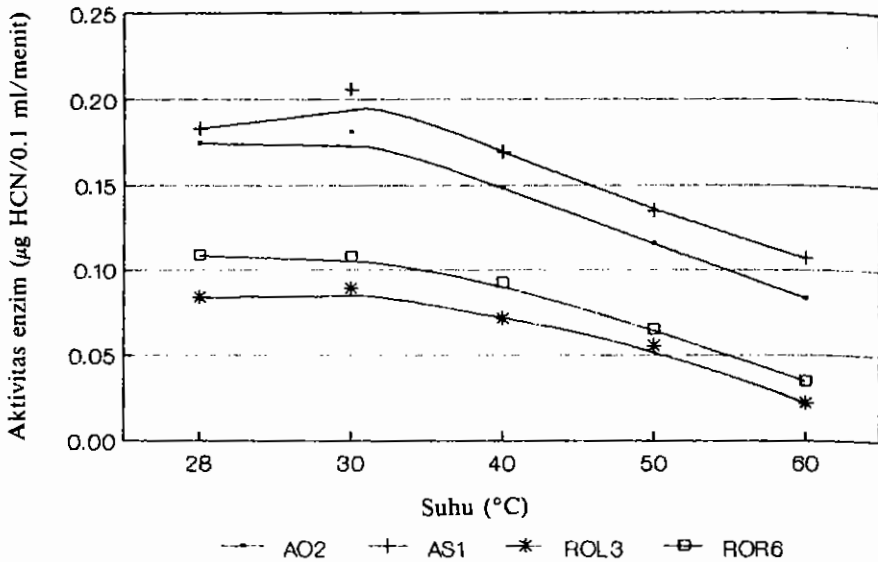
pH dan suhu optimum aktivitas enzim β -glukosidase kasar jamur hasil fermentasi substrat padat.

Hasil pengujian aktivitas β -glukosidase dari keempat jamur menunjukkan bahwa aktivitas enzimatis tertinggi dari masing-masing jamur didapatkan pada periode fermentasi yang berbeda. *A. oryzae* mempunyai aktivitas enzimatis β -glukosidase yang tertinggi pada hari ke 2, *A. sojae* pada hari pertama, *R. oligosporus* pada hari ketiga dan *R. oryzae* pada hari keenam.

pH dan suhu optimum aktivitas β -glukosidase keempat jamur pada saat mencapai tingkat aktivitas enzimatis tertinggi dapat dilihat pada gambar 3 dan 4. Hasil yang disajikan pada gambar 3 menunjukkan bahwa pH optimum untuk aktivitas β -glukosidase keempat jamur tersebut adalah 6,8. Suhu optimum untuk aktivitas β -glukosidase (gambar 4) masing-masing jamur adalah 30°C untuk *A. oryzae*, *A. sojae* dan *R. oligosporus*, serta 28°C untuk *R. oryzae*.



Gambar 3. pH optimum aktivitas enzim β -glukosidase kasar *A. oryzae* (AO₂), *A. sojae* (AS₁), *R. oligosporus* (ROL₃) dan *R. oryzae* (ROR₆) hasil fermentasi substrat padat.



Gambar 4. Suhu optimum enzim β -glukosidase kasar *A. oryzae* (AO₂), *A. sojae* (AS₁), *R. oligosporus* (ROL₃) dan *R. oryzae* (ROR₆) hasil fermentasi substrat padat.

Hasil penelitian yang disajikan pada gambar 3 dan gambar 4 menunjukkan bahwa enzim-enzim yang dihasilkan oleh *A. oryzae*, *A. sojae*, *R. oligosporus* dan *R. oryzae* tersebut mempunyai pH dan suhu optimum yang mirip dengan pH dan suhu optimum untuk aktivitas enzim linamarase (β -glukosidase indogen) yang diisolasi dari ketela pohon (Ikediobi *et al.*, 1980).

Kesimpulan

Hasil-hasil penelitian yang telah dibahas di atas menunjukkan bahwa *A. oryzae*, *A. sojae*, *R. oligosporus* dan *R. oryzae* mempunyai aktivitas enzimatik yang mampu menurunkan kandungan glukosidase sianogenik pada biji koro benguk. Hasil pengujian aktivitas enzim pada berbagai pH dan suhu memberikan dugaan bahwa enzim-enzim yang dihasilkan oleh keempat jamur tersebut mempunyai aktivitas yang mirip dengan aktivitas linamarase.

Ucapan Terima Kasih

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan kepada Dr. Ir. Slamet Sudarmadji dan Dr. Ir. Kapti Rahayu Kuswanto atas bimbingan dan saran-saran yang diberikan

hingga tersusunnya tulisan ini. Penelitian ini merupakan bagian dari hasil penelitian untuk tesis S-2 di Fakultas Pasca Sarjana UGM.

Daftar Pustaka

1. Ahluwalia, A; J.K. Gupta, D.V. Vadehra and P. Sharma. (1989). Production of β -Glucosidase by *Cladosporium resinae*. *MIRCEN J.* 5: 205-215.
2. Anonim (1977), *Progress Report on the GMU-IDRC Velvet Bean Project*. Faculty of Agricultural Technology, GMU, Yogyakarta Indonesia.
3. Anonim (1979). Pemanfaatan Biji Koro Benguk dalam bentuk Tempe. *Laporan Lomba Karya Inovatif Produktif*. Kelompok PERMAHAMI II Fakultas Pertanian UGM.
4. Bennett, H. (1974). *Concise Chemical and Technical Dictionary*. 3rd.ed. Chemical Publishing Co., Inc. New York. 1175p.
5. Bernier, R. and F. Stutzenberger. (1989). β -Glucosidase biosynthesis in *Thermonospora curvata*. *Mircen J.* 5: 15-25.
6. Bisset, F and D. Sternberg. (1978). Immobilization of *Aspergillus* β -glucosidase on chitosan. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (4): 750-755.
7. Gandjar, I. dan D.S. Slamet (1974). The Nutrient Content of Fermented *Mucuna pruriens* Seed. *First Asean Workshop on Grain Legumes*. January 15-20. Bogor Indonesia.
8. Gandjar, I (1977), Fermentasi Biji *Mucuna pruriens*, DC. dan pengaruhnya terhadap Kualitas Protein. *Disertasi*. Penerbit-Universitas ITB, Bandung.
9. Harini, P. (1979). Pertanaman Koro Benguk dan Produknya di Kecamatan Wuryantoro. (Peninjauan Mendalam dari segi Mikrobiologi: Masalah Tempe Benguk). *Laporan Kerja Nyata*. Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta.
10. Hodgson, E. and F.E. Guthrie. (1980). *Introduction to Biochemical Toxicology*. Elsevier, New York. pp. 386-387.
11. Ikediobi, C.O.; G.O.C. Onyia and C.E. Eluwah (1980) A. Rapid and Inexpensive Enzymatic Assay for Total Cynide in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and Cassava Products. *Agric. Biol. Chem.*, 44(12): 2803-2809.
12. Jutono and Sri Wedhastri (1983). The Potency of "Usar" as Inoculum for Tempe Fermentation from Various Substrates and Admixtures. *Paper presented at the Third ASEAN Workshop in Solid Substrate Fermentation*. Cebu City, Philippines (3-9 October).

13. Kuswanto, K.R. (1988). *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
14. Liener, I. (1979). Significance for Humans of Biologically Active Factors in Soybean and Other Food Legumes. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 56:121-129.
15. Makfoeld, D. (1979). *Toksikan Nabati dalam Bahan Makanan*. Fakultas Teknologi Pertanian, UGM, Yogyakarta.
16. Mega, T. and Y. Matsushima. (1983). Energy of Binding of *Aspergillus oryzae* β -Glucosidase with the substrat and the Mechanism of Its Enzymic Action. *J. Biochem.* 94: 1637-1647.
17. Montgomery, R.D. (1969). Cyanogens. *Dalam: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs* (ed. Liener I.E.) Academic Press, New York and London.
18. Okoh, P.N.; C.O. Ikediobi and O. Olugboji. (1988). The Fate in the Rat of Ingested Dhurrin Present in Sprouted Sorghum Grain. *Food Chem.* 29 (4): 299-307.
19. Srivastava, S.K., K.S. Gopalkrishnan, and K.B. Ramachandran. (1987). The Production of β -glucosidase in Shake-flasks by *Aspergillus wentii*. *J. Ferment. Technol.* 65 (1): 95-99.
20. Sudarmadji, S. & P. Markakis. (1977). The Phytate and Phytase of Soybean Tempeh. *J. Sci. Food. Agric.* 28: 381-383.
21. Wagenknecht, A.C., L.R. Mattick, L.M. Lewin, D.B. Hand, and K.H. Steinkraus (1961). Changes in Soybean Lipids During Tempeh Fermentation. *J. Food Sci.* (26): 373-376.
22. Wang, H.L.; E.W. Swain, and C.W. Hesseltine. (1980). Phytase of Molds used in Oriental Food Fermentation. *J. Food. Sci.* 45: 1262-1265.
23. Whitaker, J.R. (1972). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker, Inc. New York.
24. Windholz, M., S. Budavari, R.F. Blumetti and E.S. Otterbein. (1983). *Dalam: The Merck Index, and Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 10th ed. Published by Merck & Co., Inc. Rahway, New York, U.S.A. pp. 788.
25. Workman, W.E. and D.F. Day, (1982). Purification and Properties of β -Glucosidase from *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (6): 1289-1295.
26. Yokotsuka, T. (1977). Japanese Shoyu. Koikuchi, Usukuchi and Tamari: Chinese Chiang Yiu. *Dalam: Steinkraus, K.H. (ed.). 1983. Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker Inc., New York.