

PENURUNAN KADAR SIANIDA SINGKONG PAHIT PADA PROSES FERMENTASI CAIR BAKTERI *BREVIBACTERIUM LACTOFERMENTUM* BL-1M76

Suryana Purawisastra dan Heru Yuniati

ABSTRACT

THE REDUCTION OF THE CYANIDE CONTENT OF BITTER CASSAVA BY THE PROCESS OF LIQUID FERMENTATION USING *BREVIBACTERIUM LACTOFERMENTUM* BL-1M76

Background: Cassava is one of the important source of carbohydrate in tropical countries, that easily grows in any kind of soil. However, there is a kind of cassava containing cyanide substance, which is toxic for human consumption. This kind of cassava known as bitter cassava contains more starch, but it can't be used as food directly. Usually, people uses this cassava as raw material for producing starch known as "tapioka" by the traditional method. The cyanide substance in cassava can be degraded by bacteria known as *Brevibacterium* sp R312 that is capable to degrade about 80% of the cyanide content in cassava, since this bacteria produces some enzymes namely α -glucosidase, nitrilhydratase, and amidase, which degrade this cyanide substance. In our laboratory, has another strain of this bacteria, *Brevibacterium fermentum* BL-1 M76, which is not harmful and has potential capability in producing amino acid of lysine.

Objectives: The study was conducted to investigate the potential of the bacteria *Brevibacterium fermentum* BL-1 M76 in reducing of the cyanide substance of bitter cassava using the process of liquid fermentation.

Materials and Methods: This experiment used four kinds of bitter cassava obtained from the Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Departemen Pertanian (The Research Station of Biotechnology for Food Crops). Those cassavas are known as Adira II, Adira IV, 39.1.1 code, and 46.8 code. The liquid fermentation was conducted in the erlenmeyer flask 250 ml containing 10 ml of 10% cassava medium. The process of fermentation was done in two steps. The first step was to decide the maximum volume and concentration cell of bacteria suspension, and the duration time of the incubation at the 28°C. The observallon was done to the changes content of cyanide, and protein of the cassava medium due to the fermentation.

Results: The maximum volume of bacteria cell in the first fermentation was 5 ml for 10 ml of 10% cassava medium. In the second fermentation indicated that the achievement degradation of *Brevibacterium fermentum* BL-1 M76 cyanide substances for all kind bitter cassava was 100%. However, the protein content was not shown any different.

Conclusions: The cyanide substance contained in bitter cassava known as Adira II, Adira IV, 39.1.1 code, and 46.8 code can be degraded by the bacteria of *Brevibacterium fermentum* BL-1 M76 in the process of liquid fermentation [Penel Gizi Makan 2004,27(1): 17- 23].

Key Words: cyanide, *brevibacterium fermentum*, bitter cassava, liquid fermentation

PENDAHULUAN

Singkong adalah jenis umbi yang cukup penting sebagai bahan pangan, dan cukup besar andilnya dalam penyediaan sumber karbohidrat, walaupun selama ini makanan pokok kita masih tertumpu pada beras (1). Tanaman pangan ini dapat tumbuh di segala iklim dan daerah dengan hasil yang memuaskan. Pemeliharannya hampir tidak diperlukan, kecuali pada awal penanaman. Namun, dari jenis singkong yang ditanam terdapat jenis singkong yang mengandung senyawa sianida yang dapat menimbulkan keracunan (2). Senyawa sianida terurai

menghasilkan asam sianida (HCN), yang dapat menghambat penyerapan oksigen pada sistem pernafasan sehingga terjadi kekejangan tenggorokan yang kemudian diikuti sesak nafas, hilang kesadaran, bahkan kematian pun dapat terjadi. Dosis mematikan sianida adalah 0,5 - 3,5 mg per kg berat badan (2,3).

Jenis singkong yang mengandung senyawa sianida umumnya memiliki umbi yang besar (gemuk), umbinya tersusun rapat, tidak bertangkai dan mengandung pati yang lebih banyak (4). Jenis singkong ini tidak dikonsumsi, walaupun secara

tradisional penduduk mengolahnya sehingga jenis singkong ini dapat dikonsumsi. Namun, dengan cara pengolahan tersebut, kehilangan senyawa sianida hanya 50% (5). Walaupun tidak secara langsung dapat menimbulkan keracunan, senyawa ini juga bersifat goitrogenik, yaitu menghambat penyerapan yodium yang dapat menimbulkan kekurangan zat yodium (6). Jenis singkong yang mengandung senyawa sianida ini terasa pahit. Ia biasa digunakan untuk pembuatan tepung tapioka. Dengan proses pembuatan tapioka, senyawa sianida dapat dihilangkan sehingga tapioka yang dihasilkan tidak mengandung senyawa ini.

Senyawa sianida di dalam tanaman secara alami sebagian besar terikat dengan senyawa sakarida, berupa mono-maupun polisakarida dengan bentuk *glukosida sianogenik*. Secara alami senyawa *glukosida sianogenik* tersebut mengurai menghasilkan asam sianida (3,6). Di dalam singkong penguraian senyawa sianida terjadi karena adanya enzim *linamarase*. Enzim lain seperti yang dihasilkan mikroorganisme di dalam lambung, juga dapat menguraikan senyawa *glukosida sianogenik* apabila senyawa ini langsung dikonsumsi. Kemungkinan proses penguraian senyawa *glukosida sianogenik* di dalam lambung lebih berbahaya karena asam sianida yang dihasilkan langsung diserap tubuh. Sedangkan pada reaksi yang terjadi di luar lambung, sebagian besar asam sianida yang dihasilkan menguap, apalagi dengan pemanasan pada proses pemasakan (1).

Jenis mikroorganisme di luar lambung yang dapat menguraikan senyawa *glukosida sianogenik* antara lain bakteri *Brevibacterium*. Bakteri ini menghasilkan enzim *endosellular E-glukosidase*, *nitril hidratase*, dan *amidase* yang dapat memecah senyawa *glukosida sianogenik* (7). Dilaporkan strain bakteri *Brevibacterium* sp. R312 dapat menguraikan 70-80% senyawa *glukosida sianogenik* singkong pahit (8). Pada tulisan ini disajikan hasil penelitian penurunan kadar sianida singkong pahit pada fermentasi medium cair menggunakan strain bakteri *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76. Bakteri ini tidak patogen, dan dilaporkan mempunyai potensi untuk menghasilkan asam amino L-lisin (9).

BAHAN

Pada penelitian ini digunakan 4 jenis singkong pahit yang diperoleh dari Kebun Percobaan Balitbio (Balai Penelitian Bioteknologi) Tanaman Pangan, Dep. Pertanian, Muara-Bogor. Ke-4 jenis singkong pahit itu disebut Adira II, Adira IV, 39.1.1,

dan 46.8. Sedangkan bakteri *Brevibacterium* yang digunakan adalah strain *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76 yang diperoleh dari IPB Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian.

CARA

Preparasi medium fermentasi

Medium fermentasi adalah medium cair yang dibuat dengan mencampurkan ubi mentah singkong pahit yang telah diparut ke dalam air pada jumlah tertentu sehingga kadar total padatan singkong pahit dari medium yang diperoleh sekitar 10%. Perbandingan berat ubi singkong parut dan jumlah air yang ditambahkan adalah melalui suatu perhitungan berdasarkan kadar total padatan dari ubi singkong parut, yang ditetapkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 105°C . Medium cair singkong mentah ini tidak ada penambahan bahan lain dan tidak disterilkan.

Preparasi inokulum fermentasi

Bakteri *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76 ditumbuhkan pada media padat zat gizi agar miring dalam tabung reaksi, diinkubasi pada suhu 28°C selama 2 hari. Kemudian ke dalam satu tabung biakan ditambahkan 10 ml aquadest steril, dikocok hingga semua koloni lepas dari media agar, kemudian suspensi sel bakteri yang diperoleh dipisahkan dari media padat. Karena jumlah volume inokulum yang digunakan melebihi dari 10 ml, maka inokulum dibuat dari beberapa tabung biakan, lalu dikocok sehingga tersedia suspensi sel bakteri yang homogen.

Konsentrasi sel bakteri dalam suspensi inokulum yang diperoleh ditentukan dengan cara menghitung jumlah koloni yang ditumbuhkan pada media PCA (*plate count agar*) dalam cawan petri. Penentuan dilakukan menggunakan deret pengenceran.

Fermentasi

Fermentasi dilakukan dalam 2 tahap. Tahap pertama adalah fermentasi untuk mengetahui pengaruh volume suspensi inokulum bakteri serta waktu fermentasi terhadap penurunan kadar sianida medium cair dari salah satu jenis singkong pahit, yaitu jenis Adira II. Fermentasi dilanjutkan dengan fermentasi tahap kedua untuk menurunkan kadar sianida singkong pahit yang bertalian jenis dan kandungan sianidanya, dengan menggunakan volume

suspensi inokulum dan waktu fermentasi optimal yang diperoleh pada fermentasi tahap pertama.

Cara fermentasi dari kedua tahap adalah sama, yaitu berlangsung dalam labu erlenmeyer 250 ml pada volume 100 ml medium fermentasi. Setiap perlakuan dari kedua tahap fermentasi masing-masing dilakukan triplo (3 erlenmeyer), yaitu untuk analisis kimia medium setelah fermentasi 1 hari, 2 hari dan 3 hari. Semua erlenmeyer dikocok selama fermentasi dengan menggunakan pengocok shaker horisontal pada suhu 28° C.

Analisis kimia

Analisis kimia dilakukan pada medium cair singkong pahit sebelum fermentasi dan hasil fermentasi setelah 1, 2 dan 3 hari. Analisis kimia yang dilakukan adalah penetapan kadar air, sianida, dan protein. Kadar air ditentukan menurut AOAC (10), sianida dengan cara destilasi yang ditampung dalam larutan AgNO₃, sisa AgNO₃ dititar dengan larutan

KCNS (11). Protein ditentukan dengan metoda Biuret (12).

Uji statistik dilakukan terhadap data kadar sianida medium hasil fermentasi tahap pertama. Uji yang digunakan adalah uji-t untuk menguji pengaruh perbedaan volume suspensi inokulum terhadap penurunan kadar sianida.

HASIL DAN BAHASAN

Fermentasi Tahap Pertama

Fermentasi tahap pertama adalah untuk menentukan volume suspensi bakteri yang optimal terhadap penurunan kadar sianida yang terkandung dalam medium singkong. Hasil analisis terhadap hasil fermentasi tahap pertama ini disajikan pada Tabel 1. Terlihat pada tabel bahwa kadar sianida medium berkurang setelah fermentasi.

Tabel 1
Pengaruh volume inokulum *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76 yang ditambahkan ke dalam medium fermentasi terhadap kadar sianida dan protein selama 3 hari fermentasi

Penambahan inokulum (7,2 x10 ⁷ sel/ml)	Waktu Fermentasi (hari)	Kadar air (%)	Kadar sianida (mg/100 g)		Kadar protein (mg/100 g)	
			OB	DB	OB	DB
0	0	90,12	2,01	20,34	0,43	4,35
0	1	90,96	1,63	18,03	0,46	5,09
0	2	91,08	1,69	18,95	0,40	4,48
0	3	90,11	1,66	16,78	0,38	3,84
1	0	90,05	1,97	19,80	0,41	4,12
1	1	90,38	1,44	14,97	0,61	6,34
1	2	89,10	1,22	11,19	0,58	5,32
1	3	91,57	0,62	7,35	0,21	2,49
2	0	90,17	1,91	19,43	0,39	3,97
2	1	92,44	1,29	17,06	0,35	4,63
2	2	91,21	1,09	12,40	0,44	5,01
2	3	90,97	0,84	9,30	0,17	1,88
5	0	90,25	1,88	19,28	0,36	3,69
5	1	91,63	1,47	17,56	0,46	5,50
5	2	90,53	0,88	9,28	0,39	4,12
5	3	89,95	0,41	4,08	0,27	2,69

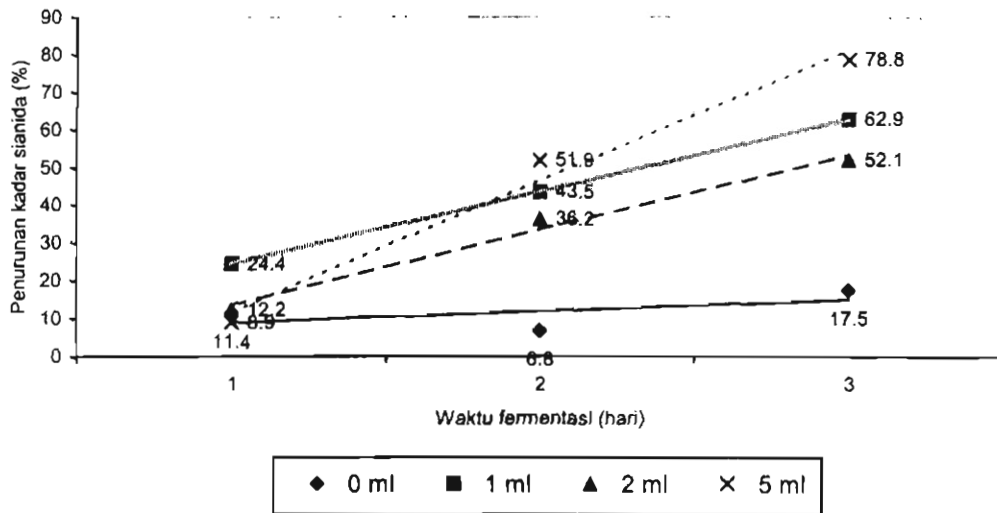
OB = Original Basis, DB = Dry Basis

Sedangkan Gambar 1 menyajikan pengaruh volume suspensi bakteri terhadap persentase pengurangan kadar sianida selama fermentasi. Setelah 1 hari fermentasi pada medium yang tidak

diinokulasi adalah 11,4%, sedangkan pada medium yang diinokulasi adalah 24,4% (1 ml suspensi inokulum), 12,2% (2 ml suspensi inokulum), dan 8,9% (5 ml suspensi inokulum). Kadar sianida ini setelah 2

hari fermentasi menurun pada medium yang tidak diinokulasi menjadi 6,8%, dan meningkat pada medium yang diinokulasi, yaitu 43,5% (1 ml suspensi inokulum), 36,2% (2 ml suspensi inokulum), dan 51,9% (5 ml suspensi inokulum). Pada hari ke-3, penurunan kadar sianida pada medium yang tidak

diinokulasi sedikit meningkat menjadi 17,5%, dan meningkat cukup banyak pada medium yang diinokulasi, yaitu 62,9% (1 ml suspensi inokulum), 52,1% (2 ml suspensi inokulum), dan 78,8% (5 ml suspensi inokulum).



Gambar 1
Persentase penurunan kadar sianida selama fermentasi

Kadar sianida pada medium yang tidak diinokulasi juga berkurang, tetapi bila diamati pengurangannya memiliki pola yang berbeda dengan medium yang ditambah inokulum bakteri. Tampak pada gambar persentase penurunan kadar sianida pada medium yang tidak ditambah inokulum bakteri (0 ml) selama fermentasi adalah fluktuasi, sehingga garis yang dihasilkan tidak linier, karena nilai R^2 dibawah satu, yaitu sebesar 0,3229. Berbeda dengan medium yang ditambah inokulum bakteri, tampak membentuk garis linier dengan nilai R^2 sebesar 1 (1 ml suspensi inokulum); 0,9864 (2 ml suspensi inokulum); dan 0,9826 (5 ml suspensi inokulum). Dengan demikian penurunan kadar sianida selama fermentasi pada medium yang tidak ditambah inokulum bakteri tidak disebabkan oleh bakteri.

Pengaruh volume suspensi inokulum bakteri terhadap penurunan kadar sianida medium fermentasi, setelah dilakukan Uji-t adalah tidak berbeda nyata. Namun pada gambar, tampaknya yang terbanyak adalah dengan penambahan 5 ml setelah 3 hari fermentasi, yang bisa mencapai penurunan sianida sebesar 78,8%. Karena itu, volume suspensi bakteri yang digunakan pada fermentasi tahap kedua adalah 5 ml.

Fermentasi Tahap Kedua

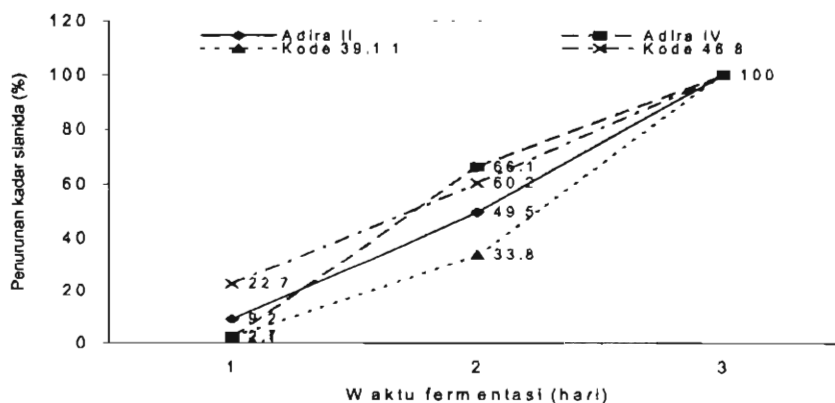
Pada fermentasi tahap kedua digunakan medium singkong pahit yang berlainan jenis dan kadar sianidanya. Sementara volume suspensi bakteri yang ditambahkan adalah sama, yaitu 5 ml suspensi dalam 100 ml medium. Hasilnya disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2
Penurunan kadar sianida dan protein hasil fermentasi *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76 pada medium cair singkong pahit berlainan jenis

Jenis singkong pahit	Waktu Fermentasi (hari)	Kadar air (%)	Kadar Sianida (mg/100 g)		Protein (g/100 g)	
			OB	DB	OB	DB
Adira II	0	93,01	2,3	32,90	0,45	6,44
	1	92,80	2,15	29,86	0,47	6,53
	2	95,24	0,79	16,60	0,46	9,66
	3	92,92	-	0,00	0,49	6,92
Adira IV	0	92,90	0,92	12,96	0,45	6,34
	1	92,86	0,90	12,61	0,43	6,02
	2	91,60	0,37	4,40	0,47	5,60
	3	91,09	-	0,00	0,51	5,72
Kode 39.1.1	0	93,60	1,57	24,53	0,41	6,41
	1	93,78	1,87	24,01	0,34	5,47
	2	96,00	0,65	16,25	0,39	9,75
	3	96,25	-	0,00	0,42	11,20
Kode 46.8	0	92,51	3,74	49,93	0,45	6,01
	1	92,25	2,99	38,58	0,38	4,90
	2	94,97	1,00	19,88	0,44	8,75
	3	90,47	-	0,00	0,48	5,04

Sebagaimana terlihat pada tabel, kadar sianida singkong pahit sebelum fermentasi dalam 100 gram bahan kering adalah 32,90 mg (jenis singkong pahit Adira II), 12,96 mg (jenis singkong pahit Adira IV), 24,53 mg (jenis singkong pahit kode 39.1.1), dan 49,93 mg (jenis singkong pahit kode 46.8). Kadar sianida setelah 3 hari fermentasi pada semua medium adalah nol %, yang berarti penghilangan kadar sianida

oleh bakteri strain *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76 dapat mencapai 100% untuk setiap jenis singkong pahit, yang memiliki kadar sianida yang berbeda. Walaupun demikian pola penurunannya pada fermentasi hari pertama dan kedua untuk setiap jenis medium singkong pahit adalah berlainan, seperti tampak pada Gambar 2.



Gambar 2
Persentase penurunan kadar sianida dari medium jenis singkong pahit yang berbeda selama 3 hari fermentasi

Setelah 1 hari fermentasi, penurunan kadar sianida tertinggi sebesar 22,7% adalah pada fermentasi jenis singkong kode 46.8 yang mengandung sianida awal tertinggi. Sedangkan penurunan kadar sianida pada jenis singkong lainnya hanya sebesar 9,2% (jenis singkong pahit Adira II), 2,7% (jenis singkong pahit Adira IV), 2,1% (jenis singkong pahit kode 39.1.1). Akan tetapi, setelah 2 hari fermentasi, penurunan kadar sianida tertinggi sebesar 66,1% yaitu pada medium jenis singkong Adira IV. Sedangkan penurunan kadar sianida pada medium jenis singkong kode 46.8 sebesar 60,2%. Kemudian 49,5% pada fermentasi jenis singkong Adira II, dan 33,8% pada fermentasi jenis singkong 39.1.1. Pada fermentasi hari ke-3, penurunan kadar sianida untuk semua jenis adalah sama, yaitu 100%.

Kadar protein medium fermentasi untuk ke-4 jenis singkong pahit (Tabel 2) selama fermentasi berlangsung tidak memperlihatkan indikasi adanya kenaikan. Secara teoritis seharusnya adanya kenaikan karena sel bakteri bertambah. Mungkin ada kenaikan tetapi persentasenya sangat rendah. Selain itu, analisis protein dengan metoda Biuret sulit dilakukan pada bahan yang mengandung karbohidrat, karena karbohidrat dengan larutan NaOH menimbulkan kekeruhan, sehingga pembacaan dengan spektrofotometer terganggu (12).

KESIMPULAN

1. Kadar sianida singkong pahit mengalami penurunan pada fermentasi cair bakteri *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76.
2. Penurunan kadar sianida dipengaruhi oleh volume suspensi inokulum dan waktu fermentasi. Penurunan kadar sianida dalam 100 ml medium cair yang diinokulasi dengan 1 ml suspensi inokulum adalah 24,4% (1 hari fermentasi), 43,5% (2 hari fermentasi), dan 63% (3 hari fermentasi). Sedangkan dalam medium yang diinokulasi dengan 5 ml suspensi inokulum adalah 8,9% (1 hari fermentasi), 51,9% (2 hari fermentasi), dan 79% (3 hari fermentasi).
3. Penurunan kadar sianida dari medium cair singkong pahit yang bertlain jenis dan kadar sianidanya adalah 100%, selama 3 hari fermentasi yang diinokulasi dengan 5 ml suspensi inokulum dalam 100 ml medium singkong pahit.
4. Kadar protein medium cair singkong pahit selama fermentasi tidak memperlihatkan perubahan.

SARAN

Mengingat bakteri *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76 mempunyai potensi untuk menghasilkan asam amino L-lisin, maka perlu diteliti potensinya ini dalam medium cair singkong pahit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Ir. Budiartman Satiawihardja, M.Sc, Ph.D IPB-Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Bogor, yang telah memberikan biakan murni bakteri *Brevibacterium lactofermentum* BL-1 M76 kepada kami sehingga penelitian ini bisa terlaksana.

RUJUKAN

1. Annon. Tepung singkong pahit: Bahan Pangan Masa Depan. *Pangan* 1990, 4(1): 63-65.
2. Bradbury J.H. & Holloway W.D. Chemistry of Tropical Root Crops: Significance for Nutrition and Agriculture in the Pacific. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1988; 101-104.
3. Conn E.E. Cyanogenic glukocides. Dalam: A.G. Van Veen (ed). Toxicants occurring naturally in foods. New York: Academic Press 1980; 299-306.
4. Lingga P. Bertanam Ubi-ubian. Jakarta: Penebar Swadaya 1993.
5. Darjanto. Chasiat, ratjun, dan masakan ketela pohon. Djakarta: Pusat Djawatan Pertanian Rakjat, 1959.
6. Montgomery D.R. Cyanogen. Dalam: I.E. Liener (ed). Toxic constituents of plant foodstuffs. New York: Academic Press, 1980; 143-157.
7. Legras J.L, Kaakeh M.R., Arnaud A., Galzy P. 1989. Purification and properties of the glucosidase from a nitrile hydratase-producing *Brevibacterium* sp. strain R312. *Journal Basic Microbiology* 1989,10; 655-669.
8. Legras J.L., Jory M., Arnaud A., Galzy P. 1990. Detoxification of cassava pulp using *Brevibacterium* sp. R312. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990, 33;529-533.

9. Satiawihardja B. Produksi L-lisin dengan kultur Fed-batch oleh mutan *Brevibacterium lactofermentum*. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 1993, 2(2);20-23.
10. Horwitz W., Sensel A., Reynold H., Pard D.L. Official method of analysis of the association of official analytical chemist, 12 nd ed. Washington D.C: AOAC, 1975; 13.
11. Busser H. Penuntun analisa jumlah. Bogor: Balai Penelitian Kimia, 1960.
12. Mitchell D.A., Gumbira Sa'id E., Greenfield P.F., Doelle H.W. Protein measurement in solid-state fermentation. *Biotechnology Techniques* 1991, 5(6):437-441.