

AKTIVITAS FITASE PADA TAHAP—TAHAP PEMBUATAN TEMPE DARI KARA BENGUK, GUDE DAN KARA PUTIH MENGGUNAKAN USAR

Oleh:

Tranggono*, Sutardi* dan Meta Mahendradatta**

Abstrak

Penelitian dilakukan untuk mengkaji perubahan aktivitas fitase selama proses pembuatan tempe kara benguk, gude dan kara putih dengan menggunakan usar. Ekstrak kasar fitase dipersiapkan melalui beberapa tahap isolasi dan pemurnian, sedangkan aktivitas fitase diukur berdasarkan jumlah fosfat anorganik yang dibebaskan dari substrat natrium fitat pada kondisi pengujian yang ditetapkan. Suhu dan pH optimum untuk fitase kara benguk dan kara putih berturut-turut 60°C dan 4,8 sedangkan untuk gude berturut-turut 50°C dan 5,0.

Hasil yang diperoleh menunjukkan penurunan aktivitas fitase selama perlakuan perendaman pada kara benguk dan kara putih, berturut-turut dari 129,56 — 48,73 μ mol dan 169,30 — 77,92 μ mol. Pada gude tidak dilakukan pengujian aktivitas fitase selama perlakuan perendaman. Pada tahap fermentasi 0 — 24 jam, terjadi kenaikan aktivitas fitase berturut-turut dari 0 — 193,23 μ mol, 0 — 96,24 μ mol dan 5,56 — 46,33 μ mol untuk kara benguk, gude dan kara putih. Setelah 24 jam fermentasi, aktivitas fitase turun menjadi berturut-turut sebesar 60,72 μ mol, 59,56 μ mol dan 7,68 μ mol. Selama fermentasi 36 — 48 jam, aktivitas fitase naik lagi berturut-turut sebesar 164,76 μ mol, 118,59 μ mol dan 9,27 μ mol untuk kara benguk, gude dan kara putih. Selama proses pembuatan tempe kandungan asam fitat turun berturut-turut dari 0,37 — 0,14%, 0,42 — 0,10% dan 2,26 — 0,16% masing-masing dalam berat kering untuk kara benguk, gude dan kara putih.

Pendahuluan

Keberadaan asam fitat atau mio-inositol 1,2,3,4,5,6, heksakis (dihidrogen) fosfat

dalam kacang-kacangan, menjadi faktor penghambat pemanfaatan kacang-kacangan tersebut karena peranannya sebagai senyawa anti gizi. Kandungan asam fitat dalam kacang-kacangan sangat tergantung antara lain jenis tanaman, berkisar antara 0,9% — 6,4% (Graf, 1983). Di alam, fitat berikatan dengan ion logam, khususnya Mg^{++} dan Ca^{++} , membentuk senyawa kompleks yang tidak larut yang disebut fitin (O'Dell dkk, 1964).

Manusia dan hewan tidak mempunyai fitase yang dapat menghidrolisis asam fitat, oleh sebab itu ion logam polivalen yang terikat oleh asam fitat tidak dapat dicerna atau diserap oleh sistem pencernaan manusia dan hewan (O'Dell and Savage, 1960). Namun demikian beberapa mikrobia seperti jamur *Rhizopus oligosporus* yang banyak digunakan dalam pembuatan tempe, mengandung fitase (Sudarmadji and Markakis, 1977) yang besar peranannya dalam pemecahan asam fitat. Usar sebagai inokulum tradisional yang digunakan untuk pembuatan tempe ternyata ditumbuhi berbagai macam mikrobia seperti jamur *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus cohnii* dan *Rhizopus oryzae* dan beberapa bakteri aerob (Hadisepoetro, 1978).

Fitase (mio-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase EC.3.1.3.8/EC.3.1.3.26) yang tergolong fosfatase, baik yang terdapat dalam kacang-kacangan maupun mikrobia merupakan enzim yang potensial dalam

* Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian UGM.

** Alumni FTP-UGM.

penurunan kandungan asam fitat selama pembuatan tempe kedele (Sudarmadji and Markakis, 1977; Sutardi, 1988). Tabekhia dan Luh (1980) melaporkan bahwa asam fitat pada beberapa kacang-kacangan (kacang tolo, kacang merah, buncis dan kacang hijau) turun selama berlangsungnya perkecambahan. Hal ini disebabkan oleh aktivitas fitase yang terdapat dalam kacang-kacangan itu sendiri.

Untuk pengujian aktivitas fitase diperlukan ekstrak fitase yang dimurnikan secara parsial (crude extract). Penyiapan ekstrak fitase meliputi ekstraksi bahan menggunakan pelarut (misalnya garam CaCl_2 2%) yang diikuti fraksinasi menggunakan amonium sulfat 35% dan 80% jenuh dan akhirnya dilakukan dialisis dalam larutan buffer tris-maleat 0,01 M pH 6,5 dalam ruang dingin.

Seperti halnya enzim lain maka aktivitas fitase dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim dan ada tidaknya inhibitor. Suhu dan pH optimum untuk aktivitas fitase dari sumber tanaman yang berbeda sedikit bervariasi. Menurut Lolos dan Markakis (1977) suhu dan pH optimum untuk kacang buncis berturut-turut adalah 50°C dan 5,3; sedangkan menurut Sutardi (1986) suhu dan pH optimum untuk fitase kedele berturut-turut adalah 60°C dan 4,8.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perubahan aktivitas fitase selama proses pembuatan tempe kara benguk, gude dan kara putih yang diinokulasi dengan usar serta hubungannya dengan penurunan kandungan asam fitat.

Bahan dan Cara Penelitian

Kara benguk dan gude dibeli di pasar Wonosari, sedangkan kara putih dibeli di pasar Prambanan. Usar dibeli di pasar Kranggan, Yogyakarta.

Pembuatan Tempe

Tempe kara benguk, gude dan kara putih karena sifat-sifat kimiawi dan fisiknya berbeda, agar diperoleh tempe yang baik maka dibuat dengan cara yang berbeda. Pembuatan tempe kara benguk dan kara putih mengikuti cara Retnawati (1988) sedangkan tempe gude dibuat dengan cara seperti yang dianjurkan oleh Widowati (1985). Cara membuat tempe untuk ketiga kacang tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Beberapa cara pembuatan tempe kara benguk, gude dan kara putih

No.	Cara pembuatan tempe		
	Kara benguk	Gude	Kara putih
1.	Perendaman I	Perebusan	perendaman I
2.	Perebusan	Pengulitan	Perebusan
3.	Pengulitan	Perendaman	Pengulitan
4.	Perendaman II	Pengukusan	Perendaman II
5.	Perendaman III	Penirisan	Perendaman III
6.	Pengukusan	Pendinginan	Pengukusan
7.	Penirisan	Inokulasi	Penirisan
8.	Pendinginan	Fermentasi	Pendinginan
9.	Inokulasi	—	Inokulasi
10.	Fermentasi	—	Fermentasi

Keterangan:

- Perendaman = kacang : air = 1:4, selama 24 jam
 Perebusan = kacang : air = 30 menit selama 30 menit
 Pengukusan = 25 menit
 Inokulasi = 3 lembar inokulum tradisional (usar) untuk 200 gram bahan kering udara hasil pengukusan
 Fermentasi = pada suhu kamar selama 48 jam dalam kantong plastik berlubang.

Preparasi Ekstrak Enzim Kasar

Kacang-kacangan kering (kara benguk, gude dan kara putih) setelah digiling kemudian diayak menggunakan ayakan 60 mesh sedangkan kacang-kacangan hasil perendaman dan yang telah difermentasi menjadi

tempe, dihaluskan dengan blender (merek National) kemudian digerus dalam cawan porselen.

Ditimbang sebanyak 5 gram sampel, diekstraksi dengan CaCl_2 2% dengan perbandingan bahan dan pelarut sebesar 1:10. Ekstraksi dilakukan dengan penggojok mekanik selama 45 menit, 160 rpm, kemudian disentrifugasi selama 30 menit pada suhu 4°C , dan kecepatan 4000 rpm. Filtrat yang diperoleh disaring kemudian dilakukan fraksionasi pertama dengan penambahan ammonium sulfat sampai diperoleh kejenuhan 35% (dengan menggunakan Tabel Fraksionasi Ammonium Sulfat). Fraksionasi dilakukan pada suhu 4°C selama 30 menit dan dilakukan pengadukan, kemudian disentrifugasi selama 30 menit pada suhu 4°C , 4000 rpm. Filtrat yang diperoleh dilakukan fraksionasi kedua dengan penambahan ammonium sulfat, sampai kejenuhan 80%, selama 30 menit pada suhu 4°C dan dilakukan pengadukan. Hasil fraksionasi kedua disentrifugasi dan filtratnya dibuang. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer tris-maleat secukupnya kemudian dilakukan dialisis dalam kantong cellophan selama 48 jam pada suhu 4°C . Sampel hasil dialisis yang merupakan ekstrak kasar fitase, siap digunakan untuk pengujian aktivitasnya.

Pengujian Enzim

Aktivitas fitase diuji dengan mengukur kenaikan jumlah fosfat anorganik (P_i) yang dibebaskan dari substratnya selama pengujian menggunakan metode Watanabe dan Olsen (1965). Pengujian enzim dilakukan dalam tabung reaksi tertutup yang diisi dengan campuran 0,2 ml air suling yang dideionisasi; 0,2 ml buffer asetat dengan pH yang sesuai dengan pH optimum untuk fitase masing-masing bahan; 0,6 ml natrium fitat 5 mM dengan pH yang sesuai dengan pH optimum fitase masing-masing bahan dan pengaturannya menggunakan HCl 1 N;

0,2 ml sampel enzim (ekstrak kasar). Waktu inkubasi adalah 30 menit pada suhu yang sesuai dengan suhu optimum masing-masing kacang. Setelah reaksi enzimatik selesai, campuran diendapkan proteinnya dengan 1 ml TCA 1,54 M. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada suhu kamar dan kecepatan 4000 rpm. Filtrat yang diperoleh yang siap ditentukan kandungan P_i , dimasukkan dalam labu takar 25 ml yang diisi dengan 1 ml sampel enzim, 20 ml air suling yang dideionisasi dan 4 ml reagen B (1,056 gram asam askorbat/200 ml reagen A) Reagen A terdiri atas 12 gram ammonium molibdat dan 0,2908 gram antimoni kalium tartrat dalam 2 liter H_2SO_4 2,5 N. Volume dicukupi dengan air suling yang dideionisasi sampai batas kemudian digojok sampai rata. Kontrol disiapkan dari sampel enzim yang telah dididihkan terlebih dahulu. Setelah didiamkan (\pm 30 menit) diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 840 nm dan hasilnya dihitung dengan membandingkannya dengan kurva standar P.

Penentuan Protein Terlarut

Protein terlarut ditentukan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu (Lowry dkk, 1951). Lima ml reagen C (campuran 50 ml reagen A dan 1 ml reagen B, harus dibuat baru) ditambah 1 ml sampel enzim (ekstrak kasar), dicampur dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Ditambah 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dua kali, kemudian digojok dengan vortex mixer. Setelah 30 menit, absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Sebagai larutan standar digunakan BSA (Bovine Serum Albumin). Reagen A terdiri atas Na_2CO_3 2% dalam NaOH 0,1 N sedangkan reagen B terdiri atas CuCO_3 5 H_2O 0,5% dalam kalium tartrat 1%.

Penentuan Kadar Asam Fitat

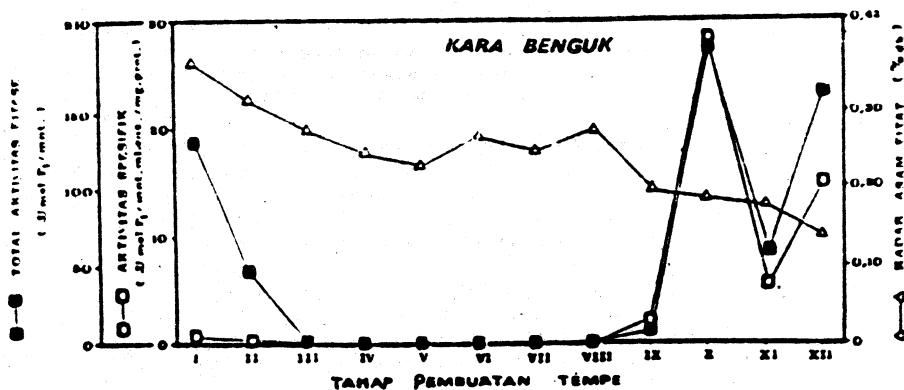
Kadar asam fitat ditentukan dengan menggunakan metode Wheeler dan Ferrel (1971) yang dimodifikasi.

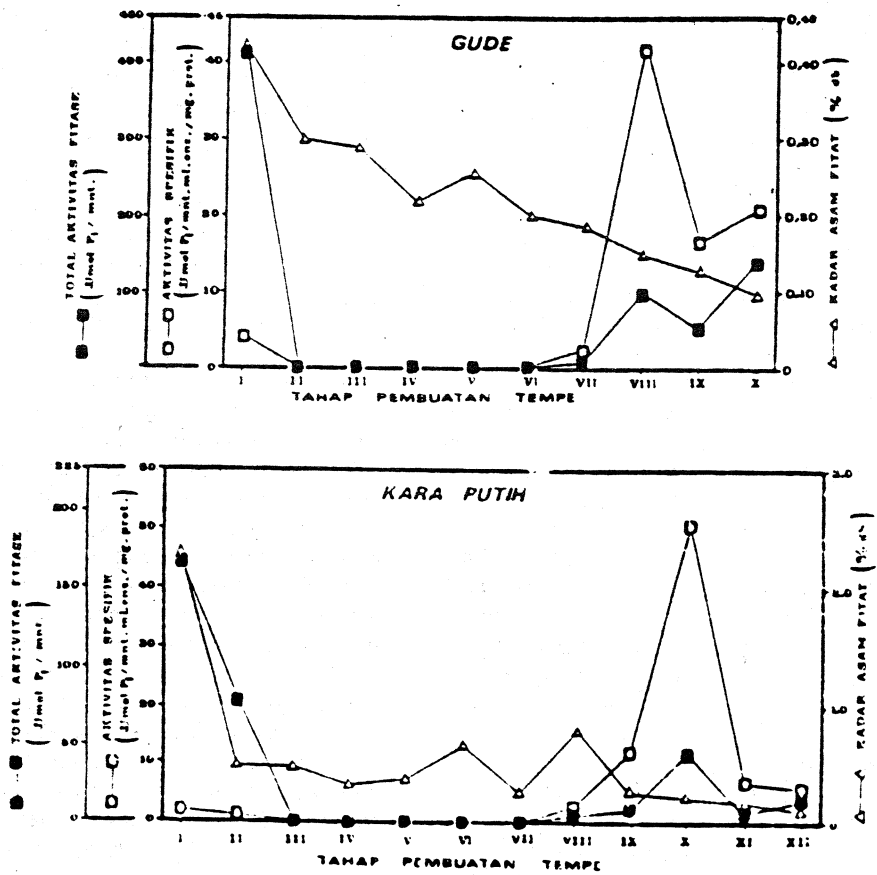
Hasil dan Pembahasan

Aktivitas fitase dinyatakan sebagai jumlah μ mol fosfat anorganik (P_i) yang dibebaskan dari hidrolisis natrium fitat per menit pada kondisi pengujian yang telah ditetapkan. Dalam penelitian ini telah dilakukan penentuan suhu dan pH optimum untuk aktivitas fitase setiap jenis kacang. Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa aktivitas fitase kara bengkok dan kara putih mempunyai suhu dan pH optimum berturut-turut 60°C dan 4,8, sedangkan untuk gude diperoleh suhu dan pH optimum berturut-turut 50°C dan 5,0. Suhu dan pH optimum yang diperoleh ternyata berada pada kisaran suhu dan pH optimum fitase dari jenis kacang-kacangan lain yang telah diteliti sebelumnya. Dwarf bean mempunyai suhu dan pH optimum fitase berturut-turut 40°C dan 5,2 (Gibbins and Norris, 1963), buncis mempunyai suhu dan pH optimum berturut-turut 50°C dan 5,3 Lolos and Markakis,

(1977), sedangkan kedede mempunyai suhu dan pH optimum fitase berturut-turut 60°C dan 4,8 (Sutardi, 1986). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa suhu dan pH optimum fitase bervariasi tergantung jenis sumbernya.

Pengujian aktivitas fitase tidak dilakukan pada semua tahap pembuatan tempe melainkan pada tahap-tahap tertentu yang perubahan aktivitasnya dapat diamati yaitu bahan mentah, tahap perendaman dan fermentasi. Menurut Sutardi (1988), perebusan dapat menginaktivkan bahkan merusak fitase sehingga aktivitasnya tidak teramati. Demikian juga dengan tahap pengukusan. Pada setiap tahap fermentasi, aktivitas fitase dapat diamati lagi sebagai aktivitas fitase jamur yang berasal dari inokulum. Inokulum yang digunakan adalah inokulum tradisional (usar) yang selain mengandung jamur seperti *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus cohnii* dan *Rhizopus oryzae*, juga mengandung beberapa bakteri aerob (Hadisepoetro, 1978). Setelah dilakukan uji aktivitas fitase perlu dilakukan penentuan total protein terlarut untuk mengetahui aktivitas spesifik fitase (aktivitas fitase setiap mg protein). Total aktivitas dan aktivitas spesifik fitase untuk masing-masing bahan dapat dilihat pada Gambar 1.





Gambar 1. Aktivitas fitase dan perubahan kadar asam fitat selama pembuatan tempe kara bengkok, gude dan kara putih menggunakan usar.

Keterangan kara bengkok dan kara putih: I = bahan mentah; II = perendaman I; III = perebusan; IV = pengulitan; V = perendaman II; VI = perendaman III; VII = pengukusan; VIII = fermentasi 0 jam; IX = fermentasi 12 jam; X = fermentasi 24 jam; XI = fermentasi 36 jam; XII = fermentasi 48 jam.

Keterangan gude: I = bahan mentah; II = perebusan; III = pengulitan; IV = perendaman; V = pengukusan; VI = fermentasi 0 jam; VII = fermentasi 12 Jam; VIII = fermentasi 24 jam; IX = fermentasi 36 jam; X = fermentasi 48 jam.

Dari hasil penyiapan dan pemurnian parsial ternyata biji kara benguk, gude dan kara putih mempunyai aktivitas fitase. Lolas dan Markakis (1977) melaporkan hasil yang memuaskan pada ekstraksi enzim fitase menggunakan larutan CaCl_2 2% karena dapat memisahkan enzim fitase dari asam fitat. Untuk memperoleh ekstrak kasar enzim, ekstrak CaCl_2 dimurnikan melalui dua kali tahap fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda yaitu 35 dan 80% (menggunakan Tabel Fraksinasi Ammonium Sulfat), kemudian dilakukan dialisis dalam buffer tris-maleat 0,01 M pH 6,5 selama 48 jam dalam ruang dingin ($\pm 4^\circ\text{C}$). Ammonium sulfat konsentrasi tinggi sudah digunakan secara luas dengan hasil yang memuaskan untuk mengendapkan enzim dari kontaminan seperti gula, asam amino bebas dan nukleotida (Sutardi, 1988), sedangkan dialisis suhu rendah dapat mempertahankan aktivitas fitase (Scopes, 1982).

Bahan Mentah

Ketiga jenis kacang-kacangan yang diteliti ternyata memiliki aktivitas fitase cukup tinggi yaitu berturut-turut 129,56; 418,76 dan 169,30 μ mol. Dari ketiga bahan tersebut yang aktivitasnya tertinggi adalah fitase gude. (418,76 μ mol). Aktivitas fitase bahan bervariasi tergantung dari macam, umur dan distribusi dalam bahan. Menurut Graf (1986) meskipun kacang-kacangan mengandung banyak asam fitat namun belum tentu mempunyai aktivitas fitase. Menurut Peers (1953), dalam biji gandum enzim fitase lebih merata tersebar di antara lapisan aleuron, endosperm dan skutelum daripada substratnya (fitat) yang terutama terpusat pada lapisan aleuron.

Perendaman

Pada tahap perendaman, ternyata ketiga jenis kacang-kacangan yang diteliti

masih menunjukkan aktivitas fitase (pada kara benguk dan kara putih berturut-turut 48,73 dan 77,92 μ mol) yang erat kaitannya dengan penurunan kandungan asam fitat. Pada gude tidak dilakukan pengujian aktivitas fitase karena fitasenyanya telah mati akibat perlakuan perebusan. Penurunan asam fitat selama perendaman selain disebabkan oleh aktivitas fitase (endogenus) juga karena sebagian asam fitat larut dalam air rendaman (Setyono, 1987; Sutardi, 1988). Larutnya sebagian asam fitat kacang-kacangan ke dalam air telah ditunjukkan bahwa air rendaman (air ledeng) yang semula tidak mengandung asam fitat, setelah perendaman selesai mengandung asam fitat (Sutardi, 1988). Pada tahap perendaman ketiga untuk ketiga tempe tersebut terjadi sedikit peningkatan kandungan asam fitat. Meskipun demikian, kandungan asam fitat cenderung turun selama tahap penyiapan pembuatan tempe (perendaman dan perebusan). Kenaikan aktivitas fitase selama perendaman (Lolas and Markakis, 1977; Chang dkk., 1977) berarti dapat membantu penurunan kandungan asam fitat. Oleh sebab itu apabila dimungkinkan diusahakan agar aktivitas fitase semaksimal mungkin dengan cara mengatur kondisi perendaman (misalnya pH dan suhu) sesuai dengan kondisi yang dikehendaki oleh fitase. Namun pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa aktivitas fitase mengalami penurunan selama perendaman (Gambar 1). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kondisi perendaman yang kurang sesuai untuk aktivitas optimum fitase (pada suhu kamar dan pH tidak diatur). Selain itu juga dimungkinkan larutnya sebagian fitase kacang-kacangan dalam air rendaman seperti telah dibuktikan oleh Sutardi (1988) yang meneliti aktivitas fitase air rendaman kegede.

Fermentasi

Keberadaan mikroorganisme pada usar mempunyai peranan yang penting khusus-

nya dalam membantu menurunkan kandungan asam fitat. Telah diidentifikasi oleh Hesseltine (1965) bahwa mikroorganisme yang dominan dalam tempe adalah jamur *Rhizopus oligosporus*. Menurut Sutardi dan Buckle (1985) *Rhizopus oligosporus* memproduksi baik intra maupun ekstra-seluler fitase.

Pada tempe kara benguk dan gude tidak ditunjukkan adanya aktivitas fitase pada awal fermentasi (0 jam) sedangkan kara putih menunjukkan aktivitas fitase meskipun kecil ($5,56 \mu \text{ mol}$). Bahan yang siap diinokulasi berasal dari pengukusan bahan maka seperti halnya bahan setelah tahap perebusan, fitasanya tidak aktif atau rusak. Sedangkan pada kara putih pada awal fermentasi terdapat aktivitas fitase yang kemungkinan berasal dari jamur inokulumnya yang sudah memproduksi fitase. Peningkatan kandungan asam fitat pada kara putih pada awal fermentasi (0 jam) belum diketahui secara pasti penyebabnya, kemungkinan karena fitat spesifik kacang tersebut.

Pada fermentasi 12 dan 24 jam, aktivitas fitase pada ketiga macam tempe mengalami peningkatan yang disebabkan oleh makin banyaknya pertumbuhan vegetatif jamur tempe. Peningkatan aktivitas fitase untuk kara benguk, gude dan kara putih berturut-turut dari $7,48 - 193,23 \mu \text{ mol}$, $1,77 - 96,24 \mu \text{ mol}$ dan $7,19 - 46,33 \mu \text{ mol}$. Kenaikan aktivitas fitase selama fermentasi 12 - 24 jam diikuti dengan penurunan kandungan asam fitat (pada kara benguk, gude dan kara putih berturut-turut dari $0,20 - 0,19\%$ (db), $0,19 - 0,15\%$ (db), $0,25 - 0,24\%$ (db) yang sesuai dengan penjelasan Sutardi (1988).

Setelah fermentasi berlangsung 24 jam aktivitas fitase mengalami penurunan pada ketiga tempe yang kemungkinan disebabkan oleh turunnya aktivitas jamur untuk menghasilkan fitase. Tetapi pada fermentasi 48 jam tampak bahwa aktivitas fitase sedikit

naik. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh aktivitas fitase bakteri yang tumbuh baik setelah jamur tempe menurun pertumbuhannya. Sudarmadji (1975); Sudarmadji dan Markakis (1978) dalam Kasmidjo (1988) mengamati pertumbuhan *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus cereus* pada tempe sesudah fermentasi 24 - 36 jam. Menurut Kasmidjo (1988), bakteri jenis *Bacillus* terdapat pada tempe yang mulai busuk. Sedangkan Powar dan Jagannathan (1967) melaporkan adanya aktivitas fitase dalam *Bacillus subtilis*. Dengan demikian aktivitas fitase yang teramati pada fermentasi 48 jam adalah aktivitas fitase yang kemungkinan besar disebabkan oleh bakteri yang terdapat dalam tempe tersebut mengingat inokulum yang digunakan dalam bentuk usar yang selain mengandung jamur juga mengandung beberapa jenis bakteri (Hadisepoetro, 1978).

Selama fermentasi pada pembuatan tempe, enzim fitase yang dihasilkan oleh jamur tempe menghidrolisis asam fitat dalam bahan sehingga kandungannya secara nyata turun. Penurunan kandungan asam fitat dari bahan mentah yang berupa biji kering sampai menjadi tempe setelah fermentasi 48 jam berturut-turut $0,37 - 0,14\%$ (db), $0,42 - 0,10\%$ (db) dan $2,26 - 0,16\%$ (db) yang dapat dilihat pada Gambar 1. Hal ini berarti terjadi penurunan kandungan asam fitat berturut-turut sebesar $62,16\%$, $76,19\%$ dan $92,92\%$, untuk kara benguk, gude dan kara putih. Suatu penurunan yang sangat berarti ditinjau dari peranan asam fitat sebagai zat anti gizi.

Kesimpulan

Kacang-kacangan kering (kara benguk, gude dan kara putih) selain mengandung asam fitat juga mengandung fitase. Pada perendaman selain terjadi penurunan aktivitas fitase juga terjadi sedikit kenaikan kandungan asam fitat.

Aktivitas fitase pada tempe kara bengkuk, gude dan kara putih yang diinokulasi dengan inokulum tradisional (usar) mempunyai kecenderungan meningkat pada tahap fermentasi 0 — 24 jam. Setelah 24 jam fermentasi, aktivitas fitase turun dan selama fermentasi 36 — 48 jam naik lagi.

Sejalan dengan peningkatan aktivitas fitase selama fermentasi maka kandungan asam fitat turun secara nyata. Ditinjau dari kandungan asam fitatnya maka ketiga jenis kacang-kacangan yang diteliti, menjadi lebih baik untuk dikonsumsi dalam bentuk tempe-nya.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada **HITACHI SCHOLARSHIP FOUNDATION** yang telah memberikan bantuan dana untuk penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Chang, R., S. Schwimmer and H.K. Burr. 1977. *Phytate: Removal from Whole Dry Beans by Enzymatic Hydrolysis and Diffusion*. J. Food Sci., 42: 1098 — 1101.101.
- Gibbins, L.N. and F.W. Norris. 1963. *Phytase and Acid Phosphatase in Dwarf Bean (Phaseolus vulgaris)*. Biochem. J. 86:67.
- Graf, E. 1983. *Application of Phytic Acid*. J. Am. Oil. Chemists. Soc., 60: 1861 — 1867.
- Graf, E. 1986. *Phytic Acid: Chemistry and Application*. Mineapolis: Pilatus Press.
- Hadisepoetro, E.S.S., N. Takada and Y. Oshima. 1978. *Microflora in Ragi and Usar*. J. Ferment. Technol., 57: 251 — 259.
- Hesseltine, C.W., 1965. *A Millennium of Fungi, Food and Fermentation*. Mycologia 57: 149 — 197.
- Kasmidjo, R.B. 1988. *The Microbiology and Biochemistry of Soyben Soaking for Tempe Fermentation*. Thesis Submitted for the Degree of Doctor of Phyllosophy. Department of Food Science and Technology. The University of New South Wales.
- Lolas, G.M. and P. Markakis. 1977. *The Phytase of Navy Beans (Phaseolus vulgaris)*. J. Food Sci., 42: 1094 — 1097.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. *Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent*. J. Biol. Chem., 193: 265.
- O'Dell, B.L. and J.E. Savage, 1960. *Effect of Phytic Acid on Zinc Availability*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103: 304.
- O'Dell, B.L., J.M. Yahe and J.E. Savage. 1964. *Zinc Availability in The Chick as Affected by Phytate, Calcium and Ethylene Diamine Tetraacetate*. Poultry Sci., 43: 415.
- Peers, F.G. 1953. *The Phytase of Wheat*. Biochem. J. 53: 102.
- Powar, V.K. dan V. Jagannathan. 1967. *Phytase from Bacillus subtilis*. Ind. J. Biochem., 4: 184 — 187.
- Reddy, N.R., C.V. Balakrishnan and D.K. Salunkhe. 1978. *Phytate Phosphorus and Mineral Changes during Germination and Cooking of Black Gram (Phaseolus mungo) Seed*. J. Food Sci., 43: 540 — 543.
- Retnawati, S.A. 1989. *Perubahan Asam Fitat dan Protein Terlarut Bungkil Kacang, Ampas Tahu dan Kara Bengkuk selama Fermentasi dalam Pembuatan Tempe*. Jurusan Pengolahan Hasil Pertanian, FTP UGM, Yogyakarta.
- Scopes, R.K. 1982. *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer - Verlag, New York.
- Setyono, A. 1987. *Perilaku Asam Fitat dalam Kedele pada Waktu Diolah*. Disertasi

- Program S3 dalam Ilmu dan Teknologi Pangan UGM, Yogyakarta.
- Sudarmadji, S. and P. Markakis. 1977. *The Phytate and Phytase of Soybean Tempeh*. J. Sci. Food Agric., 28: 381 — 383.
- Sutardi and Buckle. 1986. *The Characteristics of Soybean Phytase*. J. Food Bio., 10: 197 — 216.
- Sutardi. 1988. *Phytase Activity during Tempe Production*. Thesis Submitted for The Degree of Doctor of Philosophy. Department of Food Science and Technology The University of New South Wales.
- Tabekhia, M.M. and B.S. Luh. 1980. *Effect of Germination, Cooking, and Canning on Phosphorus and Phytate Retention in Dry Beans*. J. Food Sci., 45: 406 — 408.
- Watanabe, F.S. and S.R. Olsen. 1965. *Test of an Ascorbic Acid Method for Determining Phosphorus in Water and NaHCO₃ Extracts from Soil*. Soil Sci Soc Am. Proc. 29: 677 — 678.
- Widowati, S. 1985. *Gude yang polos dan yang Blirik*. Maj, Tarik th. V no. 42: 29.

Abstr

T
oryza
soybe
night
sterili
ocula
a co
prepa
lasted

F
oryza
tiona
A. so
with
A. or

oligo
day.
usin
tyros
120

oryz
33%
weig
com
1.4
pH
ble

Intr

foo
hyc
ma
ext

GM

Ap