

Pengembangan Sistem Deteksi Senyawa Sianogen dalam Ubi Kayu
(*Manihot esculenta* Crantz) dengan Pendekatan Enzimatis
Development of Cyanogenic Compounds Detection System in Cassava
(*Manihot esculenta* Crantz) Based on Enzymatic Approach

Nunik Sulistinah, Rini Riffiani, & Bambang Sunarko

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong Science Center,
Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46. Cibinong. E-mail : listin_ar@yahoo.com

Memasukkan: Oktober 2013, Diterima: Desember 2013

ABSTRACT

Picrate paper test kit for the semi-quantitative determination of cyanogenic potential was developed in this experiment. The method is relatively simple, easy to use and might be applicable in the field by unskilled person. Paper test was attached on tubes containing sample (100 mg) in aquadest (0,5 mL) and then was immediately covered tightly and incubated overnight at room temperature. The colour of picrate paper test changed gradually towards reddish brown, and its colour was compared with standart colour chart which included 0-800 ppm cyanide that was also developed in this study. The reddish brown colour of paper test was correlated with cyanide concentration on the sample. In order to obtain a more accurate detection of cyanogenic compound the paper test was eluted with 5 mL water or aquadest and the absorbance was measured at 510 nm.

Keywords: cyanogenic potential, picrate paper test, semi-quantitative method, simple method, cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

ABSTRAK

Picrate paper test strip untuk mendeteksi dan mengestimasi kandungan senyawa sianida pada ubi kayu dan produk olahannya telah dikembangkan dalam penelitian ini. Metode ini relatif simpel, murah dan mudah diaplikasikan di lapangan, serta mampu mendeteksi keberadaan senyawa sianogen dalam waktu yang relatif singkat. *Paper test* digantungkan pada vial/tabung, berisi sampel (100 mg) dalam akuadest (0,5 ml), ditutup rapat dan kemudian diinkubasi selama 24 jam. Perubahan warna pada *picrate paper test*, secara berangsur-angsur dari kuning ke coklat kemerahan, mengindikasikan konsentrasi sianida dalam sampel. Kandungan sianida secara semi kuantitatif dapat diketahui dengan membandingkan dengan *standart colour chart*, yang juga dikembangkan dalam penelitian ini. Penentuan sianida dalam sampel yang lebih akurat dapat dilakukan dengan melarutkan *picrate paper test* dalam akuadest, mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm dan membandingkannya dengan standar kandungan sianida yang terkalibrasi.

Kata Kunci : sianogenik potensial, pikrat paper tes, metode semi kuantitatif, ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz)

PENDAHULUAN

Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) telah lama menjadi makanan pokok rakyat Indonesia setelah beras, jagung, dan sagu. Tanaman ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber karbohidrat alternatif pengganti beras. Terlepas dari potensinya sebagai bahan pangan, pakan, dan bahan baku industri, ubi kayu juga menghasilkan senyawa sianogen yang dikenal sebagai glukosida

sianogenik yang berbahaya bagi kesehatan (Cereda & Mattos 1996; Cardoso *et al.* 2005).

Dalam ubi kayu, senyawa sianogen yang dijumpai dalam daun dan akar, adalah berupa linamarin dan sejumlah kecil lotaustralin (methyl linamarin) (Egan *et al.* 1998). Linamarin akan terhidrolisis menjadi glukosa dan aseton sianohidrin dengan adanya enzim linamarase yang diproduksi oleh tanaman tersebut. Sementara aseton sianohidrin akan terdekomposisi dengan cepat dalam suasana

basa dan melepaskan asam sianida (HCN) dan ion sianida (Egan *et al.* 1998). Keberadaan ketiga senyawa tersebut (linamarin, aseton sianohidrin dan HCN) secara total disebut sebagai *cyanogenic potensial* (CP). CP pada akar dan daun ubi kayu berkisar antara 2 - > 1000 ppm HCN (mg HCN setara dengan berat segar per kg) (Cooke & de la Cruz, 1982; Bokanga 1994; Bradbury *et al.* 1991).

Konsumsi bahan pangan yang mengandung 50 mg-100 mg sianida dilaporkan menyebabkan keracunan akut dan kematian. Konsumsi lebih rendah dari konsentrasi itu, walaupun tidak menyebabkan kematian, akan memicu timbulnya masalah kesehatan serius, seperti neuropati dan kretinisme, bila dikonsumsi secara terus menerus (Mlingi *et al.*, 1992; Akintonwa *et al.*, 1994; Osuntokun 1994). Menurut FAO/WHO (1991) dalam Iglesias *et al.* (2002) bahwa kandungan total sianida yang direkomendasikan (*safe level*) pada produk olahan ubi kayu (tepung) adalah ≤ 10 ppm. Beberapa penelitian melaporkan bahwa perebusan, penjemuran dan/atau pengeringan mampu mereduksi toksisitas ubi kayu sehingga keracunan akibat konsumsi bahan pangan tersebut dapat dihindari. Dilaporkan juga oleh Nebiyu & Getachew (2011) dan Gomez *et al.*, (1984) bahwa proses penjemuran/pengeringan ubi kayu selama ≥ 48 jam mampu mereduksi sianida hingga 70-80% .

Berbagai metode deteksi telah dikembangkan untuk estimasi kandungan senyawa sianogen (*cyanogenic potential*) pada ubi kayu dan produk olahannya (Cooke 1978; Bradbury *et al.* 1991; Bradbury & Egan 1992; Brimer, 1994). Penggunaan konsep yang sama memungkinkan untuk mengembangkannya ke dalam suatu bentuk *dip-stick* yang dapat digunakan untuk mendeteksi kandungan sianogenik potensial secara semi kuantitatif atau bahkan kuantitatif dalam ubi kayu dan olahannya. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan metode deteksi sianida yang simpel, murah, dan mudah diaplikasikan di lapangan terutama oleh masyarakat pedesaan. Diharapkan hasil penelitian dapat digunakan pula sebagai model untuk

pengembangan metode sejenis.

BAHAN DAN METODE

Preparasi *cyanidel/picrate paper test*

Asam pikrat (1,4 gram) dilarutkan dalam 100 ml Na_2CO_3 2,5% (w/v), kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *stirer* selama 24 jam. Whatman paper No.1 dipotong - potong dengan ukuran 90 mm x 70 mm, dan bagian ujung dari potongan kertas tersebut dilekatkan pada plastik transparan dengan ukuran 5 x 50 mm. *Whatman paper strip* tersebut kemudian dicelupkan ke dalam larutan pikrat selama 2-3 menit dan dikeringanginkan. Setelah kering paper strip tersebut dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan dalam kotak tertutup.

Pembuatan larutan sianida standar

Larutan sianida standar disiapkan dalam berbagai konsentrasi (0, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200, 400, 800 ppm). Masing-masing larutan standar (100 μL) ditambahkan H_2SO_4 25% (100 μL) dalam tabung reaksi tertutup. Kemudian *picrate paper test* digantungkan di bibir tabung, ditutup rapat dan diinkubasi selama 16-24 jam. Setelah itu *paper test* dikeluarkan dan dipindahkan ke tabung baru, yang berisi 5 mL akuadest, dan diinkubasi selama 30 menit. Kandungan sianida dalam sampel ditentukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm (Bradbury *et al.* 1999).

Stabilitas *picrate paper test*

Pengujian stabilitas dilakukan untuk mengetahui kualitas *picrate paper test* yang disimpan dalam rentang waktu yang cukup lama. *Picrate paper test* strip dibungkus dalam aluminium foil dan dibungkus rapat-rapat menggunakan *wrapping plastic*, dimasukkan ke dalam boks tertutup dan disimpan dalam rentang waktu 1, 2, 3, dan 4 minggu pada suhu ruang dan suhu dingin (4-5 °C). Secara regular, stabilitas sampel *picrate paper test* strip tersebut diuji dengan cara warna kertas tersebut dalam akuadest. Absorban dari warna larutan tersebut kemudian diukur pada panjang gelombang 510 nm.

Preparasi "standart colour chart indicator cyanide paper test"

Preparasi *Standart colour chart* dilakukan dengan cara yang sama dengan pembuatan standar sianida dengan beragam konsentrasi (0-800 ppm). Sebanyak 100 µL dari masing-masing larutan standart tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup dan ditambahkan 100 µL 25% H₂SO₄, kemudian *picrate paper test* dimasukkan ke dalam tabung tersebut dengan cara menggantungkannya di bibir tabung dan segera tabung ditutup rapat. Setelah itu diinkubasi dan didiamkan selama 16-24 jam. Warna *paper test* yang terbentuk kemudian difoto secara digital, diproses dan dikalibrasi dengan menggunakan program Adobe. *Standart colour chart* ini mencakup 11 warna dari kuning sampai coklat kemerahan sesuai konsentrasi sianida (0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200, 400, dan 800, mg HCN setara setara/ekuivalen dengan per kilogram ubi kayu segar (ppm).

Preparasi dan deteksi senyawa sianogen

Potongan ubi kayu/daun/batang (100 mg) dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup, yang berisi 500 µL akuadest dan 500 µL buffer fosfat 1 M (pH 8,0), kemudian dihomogenkan. Selanjutnya *Picrate paper test* digantungkan di bibir tabung, ditutup rapat, dan diinkubasi selama 18-20 jam pada suhu ruang (± 28°C). Estimasi kandungan sianida secara semi kuantitatif dilakukan dengan mengamati perubahan warna pada *picrate paper test*, sedangkan penentuan sianida secara kuantitatif dilakukan dengan cara melarutkan *picrate paper test* tersebut ke dalam 5 mL akuadest dan kemudian kandungan sianida ditentukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 510 nm (Yeoh 1998).

HASIL

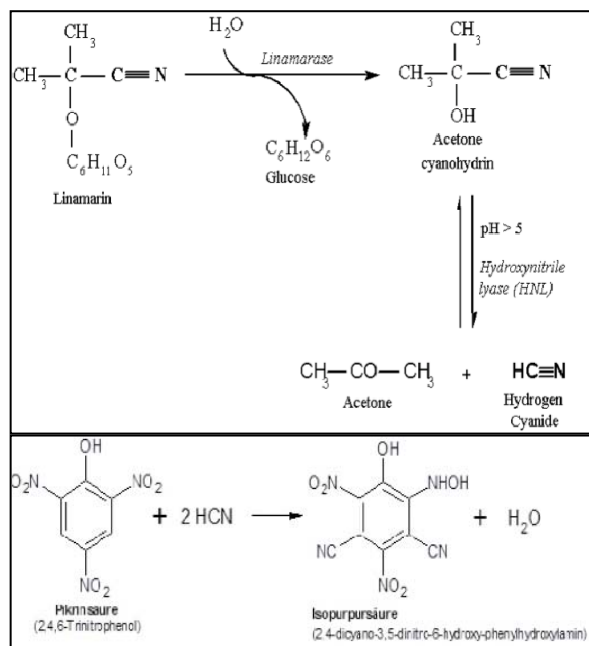
Secara prinsip metode pendeteksian sianida menggunakan *picrate paper test* atas dasar reaksi hidrolisis linamarin atau senyawa glukosida sianogenik

yang melepaskan HCN yang kemudian dideteksi dengan *picrate paper test*. Reaksi yang mendasari pendeteksian tersebut ditampilkan pada Gambar 1.

Enzim linamarase (β-glukosidase) mengkatalisis hidrolisis linamarin menjadi glukosa dan aseton sianohidrin. Aseton sianohidrin dalam suasana netral atau basa terdekomposisi menjadi aseton dan HCN/CN⁻. HCN yang dibebaskan dalam reaksi hidrolisis tersebut akan bereaksi dengan asam pikrat dalam *picrate paper test*. Preparat *cyanidel picrate paper test* (Gambar 2A) dan *Standart colour chart* (Gambar 2B) untuk estimasi sianida yang dikembangkan dalam penelitian ini.

Kalibrasi *picrate paper test*

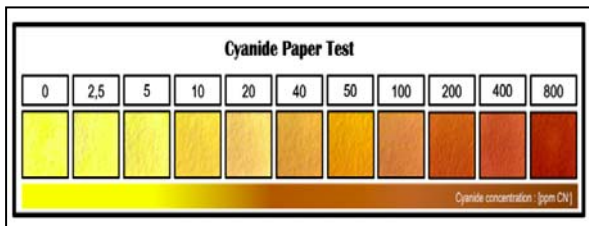
Besarnya nilai absorban berkorelasi dengan tingginya konsentrasi sianida (HCN). Semakin pekat warna yang timbul pada *picrate paper test* (coklat kemerahan) mengindikasikan semakin tinggi konsentrasi sianida. Perubahan warna yang terjadi pada *picrate paper test* merupakan reaksi antara pikrat dengan HCN. Konsentrasi HCN yang terlalu tinggi cenderung mengurangi akurasi dalam pendeteksian.



Gambar 1. Reaksi yang mendasari sistem deteksi sianida menggunakan *picrate paper test* (Yeoh & Egan 1997).



Gambar 2A. Cyanide/picrate paper test strip.



Gambar 2B. Standard colour chart untuk estimasi sianida.

Stabilitas picrate paper test untuk kalibrasi standart

Pengujian stabilitas picrate paper test yang disimpan pada berbagai suhu dan waktu penyimpanan ditampilkan pada Gambar 3-6. Tampak dalam gambar tersebut picrate paper test yang disimpan pada suhu dingin (4°C) menunjukkan kecenderungan yang lebih baik dibanding penyimpanan pada suhu ruang.

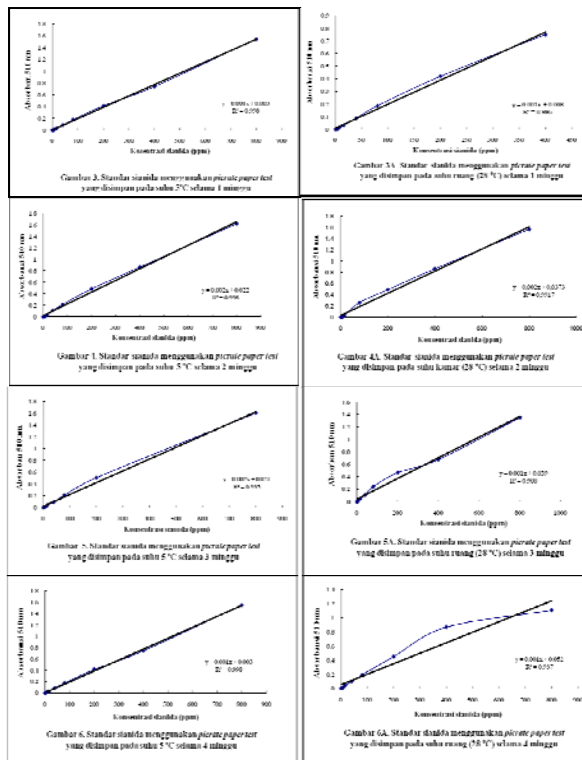
Implementasi metode deteksi senyawa sianogen.

Implementasi metode deteksi sianida pada sampel ubi kayu dan produk olahan yang berupa tepung ditampilkan pada Gambar 7 dan 8 (A & B). Tampak dalam gambar tersebut bahwa kandungan sianida pada ubi kayu sangat bervariasi dan relatif tinggi baik pada bagian umbi, batang, maupun daun ubi kayu. Kandungan sianida pada tanaman ubi kayu tergantung dari varietas ubi kayu.

PEMBAHASAN

Sistem deteksi senyawa sianogen

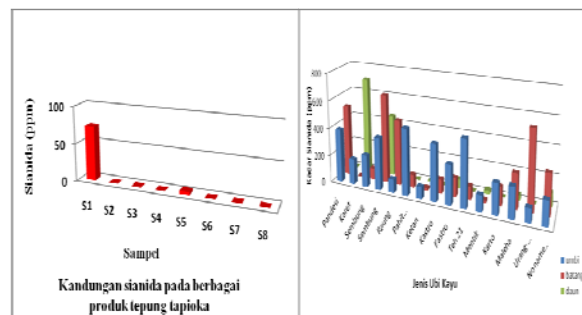
Sistem deteksi senyawa sianogen yang dilakukan dalam penelitian ini secara prinsip



Gambar 3-6. Kalibrasi standar sianida menggunakan picrate paper test yang disimpan pada suhu 5 °C dan suhu kamar (28 °C) selama 4 minggu



Gambar 7. Deteksi sianida pada bagian tanaman ubi kayu menggunakan cyanide/picrate paper test.



Gambar 8. Penentuan kadar sianida dalam tepung tapioka (A) dan ubi kayu (B).

berdasarkan atas reaksi hidrolisis senyawa glukosida sianogenik atau linamarin yang melepaskan asam sianida (Gambar 1). HCN yang dibebaskan dalam reaksi hidrolisis tersebut akan bereaksi dengan

asam pikrat yang terkandung dalam *picrate paper test*. Perubahan warna pada *picrate paper test* dari kuning menjadi coklat kemerahan mengindikasikan terbentuknya asam isopurpureat, yang proporsional dengan konsentrasi sianida yang dibebaskan. Semakin pekat warna yang timbul pada kertas pikrat tersebut mengindikasikan semakin tinggi kandungan sianida.

Kalibrasi dan Stabilitas *picrate paper test*

Hasil pengujian kalibrasi terhadap *picrate paper test* memperlihatkan bahwa nilai absorban berkorelasi dengan tingginya konsentrasi sianida. Semakin pekat warna yang timbul pada *picrate paper test* (coklat kemerahan) mengindikasikan semakin tinggi konsentrasi sianida. Dalam pendeteksian tampak bahwa konsentrasi HCN yang terlalu tinggi sangat berpengaruh terhadap akurasi dalam pendeteksian. Dengan demikian penggunaan *picrate paper test* ini hanya proporsional untuk konsentrasi sianida ≤ 200 ppm agar diperoleh pendeteksian yang akurat.

Pengujian stabilitas *picrate paper test* menunjukkan bahwa *paper test* yang disimpan pada suhu ruang (28°C) dalam rentang waktu > 30 hari menunjukkan warna yang sedikit berubah. Hal ini dapat dilihat dengan rendahnya koefisien koreksi yang sedikit lebih rendah dibandingkan dengan penyimpanan suhu dingin (Gambar 6 dan 6 A). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Egan *et al.* (1998) menunjukkan bahwa penyimpanan *picrate paper test* ditempat gelap pada suhu ruang selama 30 hari warna *picrate paper test* masih relatif stabil. Sementara di daerah tropis penyimpanan > 3 bulan tidak direkomendasikan. Hal ini mungkin disebabkan karena kelembaban di Indonesia relatif cukup tinggi sehingga berpengaruh terhadap kondisi *picrate paper test*. Dengan demikian untuk memperoleh pendeteksian secara semi kuantitatif yang akurat direkomendasikan menggunakan *picrate paper test* yang disimpan pada suhu dingin $4-5^{\circ}\text{C}$ dalam boks tertutup dan ruang gelap selama ± 4 minggu.

Implementasi metode deteksi

Metode deteksi sianida yang dikembangkan dalam penelitian ini telah diimplementasikan dalam skala laboratorium untuk estimasi kandungan senyawa sianogen pada sampel ubi kayu yang meliputi ubi kayu pahit dan ubi kayu yang umum dikonsumsi masyarakat serta produk olahannya yang berupa tepung tapioka (Gambar 7, 8A dan 8B).

Dari hasil pendeteksian tersebut tampak bahwa kandungan senyawa sianogen atau linamarin pada ubi kayu sangat bervariasi. Kandungan sianida pada ubi kayu pahit relatif lebih tinggi dibandingkan pada ubi kayu yang umum dikonsumsi masyarakat. Sedangkan produk olahan ubi kayu yang berupa tepung menunjukkan bahwa kandungan sianida di bawah 10 ppm kecuali tapioka basah-S1 (Gambar 8 A). Konsumsi bahan pangan yang mengandung 50 mg-100 mg sianida dilaporkan menyebabkan keracunan akut dan kematian. Konsumsi lebih rendah dari konsentrasi itu, walaupun tidak menyebabkan kematian, akan memicu timbulnya masalah kesehatan serius, seperti neuropatidan kretinisme, bila dikonsumsi secara terus-menerus (Akintonwa *et al.* 1994; Osuntokun 1994).

Metode deteksi ini dapat mengestimasi kandungan senyawa glukosida sianogenik/linamarin dalam ubi kayu secara cepat, mudah, simpel sehingga metode ini sangat *applicable*, terutama untuk kegiatan-kegiatan di lapangan. Sistem deteksi senyawa sianogen ini diharapkan dapat digunakan sebagai landasan untuk pengembangan ke skala yang lebih besar dan lebih praktis.

KESIMPULAN

Metode deteksi senyawa sianogen secara semi-kuantitatif dalam skala laboratorium menggunakan *picrate paper test* efektif digunakan, praktis, simpel dan mudah diaplikasikan di lapangan. Metode deteksi ini sangat membantu untuk estimasi kandungan senyawa sianogen di dalam ubi kayu dengan waktu yang relatif singkat. Konsentrasi sianida berkisar 0-200 ppm merupakan konsentrasi

yang ideal untuk dideteksi menggunakan *picrate paper test*. *Picrate paper test* strip yang disimpan pada suhu dingin (5°C) dalam boks tertutup relatif lebih stabil/tahan digunakan dalam waktu \leq 30 hari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada proyek Insentif Peningkatan Kemampuan Peneliti dan Perekayasa (PKPP) 2012 dan DIPA Tematik Tahun Anggaran 2013 yang telah memberi dana penelitian sehingga kegiatan ini dapat dilakukan. Ucapan terima kasih disampaikan juga kepada Hendra Munandar, S.Si, Suri Handayani, S.Si dan Agustina Tri Aditya atas keterlibatan dan bantuannya dalam pengumpulan data.

DAFTAR PUSTAKA

- Akintonwa, A., O.Tunwashe, & A. Onifade. 1994. Fatal and non fatal acute poisoning attributed to cassava-based meal. *Acta Hort.* 375 : 285-288.
- Bokanga, M. 1994. Processing of cassava leaves for human consumption. *Acta Hort.* 375: 203-207.
- Bradbury, JH., SV. Egan & MH. Lynch. 1991. Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosidases. *J. Sci. Food. Agric.*, 55 : 227-290.
- Bradbury, JH. & SV. Egan. 1992. Rapid screening assay of cyanide content of cassava. *Phytochem. Anal.* 3 : 91-94.
- Bradbury, MG., SV. Egan & JH. Bradbury. 1999. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. *J. Sci. Food. Agri.* 79 : 593-601.
- Brimer, L. 1994. Quantitative solid-state detection of cyanogens : from field test kits to semi-automated laboratory systems allowing kinetic measurements. *Acta Hort.*375 : 105-116.
- Cereda, MP. & MCY. Mattos. 1996. Linamarin the toxic compound of cassava. *J. Venomous Anim. Toxins* 2(1) : 6-12.
- Cooke, RD., AK. Howland & SK.Hahn. 1978. Screening cassava for low cyanide using an enzymatic assay. *Exp. Agric.* 14 : 367-372.
- Cooke, RD. & de la Cruz. 1982. The changes in cyanide content of cassava tissues during plant development. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33 : 269-275.
- Cardoso, AR., E. Mirione, M. Ernesto, F. Massaza, J.Cliff, MR. Haque, & HJ. Bradbury. 2005. Processing cassava roots to remove cyanogens. *J. Food Comp. Anal.* 18 : 451-460.
- Egan, SV., HH. Yeoh, & JH. Bradbury. 1998. Simple picrate paper kit for determination of the cyanogenic potential of cassava flour. *J. Sci. Food. Agr.* 76: 39-48.
- Gomez, G., M. Valdivieso, D. de la Costa , & K. Kawano. 1984. Cyanide content in whole-root chips of ten cassava cultivars and its reduction by oven drying or sun drying on trays. *J.Food . Tech.* 19 : 97-102.
- Iglesias, CA., T. Sanchez, HH. Yeoh. 2002. Cyanogens and Linamarase Activities in Storage Roots of Cassava Plant from Breeding Program. *J.Food Comp. Anal.* 15: 379-387.
- Mlingi, N., NH. Poulter, H. Rosling. 1992. An outbreak of acute intoxications from consumption of insufficiently processed cassava in Tanzania. *Nut. Res.* 12: 677-687.
- Nebiyu, A. & E. Getachew. 2011. Soaking and drying of cassava roots reduced cyanogenic potential of three cassava varieties at Jimma, Southwest Ethiopia. *Afri. J. Biotech.* 10(62): 13465-13469 .
- Osuntokun, BO. 1994. Chronic cyanide intoxication of dietary origin and a degenerative neuropathy in Nigerians. *Acta Hort.* 375 : 311-321.
- Yeoh, HH. & SV.Egan. 1997. An enzyme-based dip stick for the estimation of cyanogenic potential of cassava flour. *Food Chemistry* 60 (1): 119-122.
- Yeoh, HH. 1998. Enzyme-based dipstick : An easy-to-use alternative for estimation of cyanogens level in cassava roots. *Trop. Agric (Trinidad)*, 75 (2) : 305-307.