

UJI CEPAT SIANIDA PADA UMBI DAN TEPUNG UBI KAYU

G8/40



A. Hidayat dan D.S. Damardjati

Kerjasama :
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Pusat Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
dengan
Australian Centre for International Agricultural Research
2003

603 / 071

UJI CEPAT SIANIDA PADA UMBI DAN TEPUNG UBIKAYU

A. Hidayat dan D.S. Damardjati

Kerjasama :

**Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Dengan
Australian Centre for International Agricultural Research
2003**

UJI CEPAT SIANIDA PADA UMBI DAN TEPUNG UBIKAYU

A. Hidayat dan D.S. Damardjati,
Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik
Pertanian
Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor, Tel: 0251 337975, 339793

ISBN : 979-95627-5-9

Penanggung Jawab

Sutrisno
Kepala Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik
Pertanian

Redaktur Teknis

Novianti Sunarlin
Machmud
Ida Hanarida Somantri

Redaksi Pelaksana

Faizal Abidin
Ida N Orbani

Penerbitan Buku ini dibiayai oleh :

Australian Center for International Agricultural research,
ACIAR House, Traeger Court, Fern Hill Park, Bruce ACT

Kata Pengantar

Kebutuhan tepung terigu cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya jumlah dan ragam produksi makanan yang terbuat dari terigu, seperti supermi/noodle, makanan tradisional, kue-kue, kerupuk dll. Karena harga terigu (produk import) melonjak sangat tinggi, dengan meningkatnya nilai tukar dolar, maka tepung ubikayu, yang dalam banyak hal bisa menggantikan terigu, mulai menarik perhatian.

Kendala utama dari ubikayu adalah adanya senyawa sianida, yang bila kadarnya mencapai diatas 40 ppm CN (Standar Keamanan Makanan Indonesia), akan membahayakan bagi manusia. Telah dilaporkan beberapa kasus keracunan dan kematian di beberapa negara Afrika, termasuk Indonesia akibat mengkonsumsi ubikayu. Salah satu usaha untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan mengembangkan varietas ubikayu berkadar sianida rendah untuk konsumsi pangan, sedangkan ubikayu yang berkadar sianida tinggi hanya untuk bahan industri non pangan. Untuk pengembangan varietas berkadar sianida rendah tersebut diperlukan uji cepat sianida yang sederhana, murah, mudah dikerjakan, namun menghasilkan data yang teliti, tepat, dan dapat dipercaya.

Baru-baru ini telah dikembangkan oleh Bradbury beserta kelompoknya, metoda cepat analisis tiga bentuk senyawa sianogen pada beberapa bahan pangan, diterbitkan di empat buah jurnal internasional. Metoda tersebut cocok digunakan di lapang, karena relatif lebih praktis, sederhana, murah, dan mudah dilakukan oleh orang yang belum mempunyai pengalaman analisis, serta dapat diandalkan untuk tujuan seleksi varietas ubikayu berkadar HCN rendah, dan usaha pencegahan racun sianida ubikayu. Metoda tersebut diterjemahkan ke dalam bahasa Indonesia dan disusun kembali dengan tujuan untuk membantu program pengembangan varietas ubikayu di Indonesia.

Bila kadar sianida akan menjadi standar keamanan bahan pangan ubikayu, maka akan sangat diperlukan uji cepat berbahasa Indonesia yang sederhana, dan praktis untuk digunakan di lapang. Susunan kembali metoda ini telah mendapat ijin dari pengarangnya dan telah dipraktekkan dalam beberapa pelatihan di Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.

Akhirnya diharapkan agar tulisan ini mencapai tujuannya dan bermanfaat bagi pembacanya.

Bogor, 15 April 2003.

Kepala Balai Penelitian Bioteknologi dan
Sumberdaya Genetik Pertanian

Daftar Isi

	Kata Pengantar.....	1
	Daftar Isi.....	3
	Daftar Tabel.....	4
I.	Pendahuluan.....	5
II.	Prinsip Penetapan.....	7
	Ruang Lingkup.....	10
III.	Penetapan Total Sianogen pada Umbi Ubikayu.	
	3.1. Uji Cepat.....	11
	3.2. Pengukuran Menggunakan Spektrofotometer.....	14
	3.3. Cara membuat Kertas Bufer dan Kertas Pikrat.....	15
	3.4. Pembuatan Kertas Linamarin Standar.....	17
IV.	Penetapan Total Sianogen pada Tepung Ubikayu	
	4.1 Penetapan Total Sianogen (Uji Cepat).....	18
	4.1.1. Pengukuran Menggunakan Spektrofotometer..	19
	4.2. Penetapan Aseton Sianohidrin dan HCN/CN.....	19
	4.3. Pembuatan Kertas Linamarase dari bahan ensim Linamarase.....	21
V.	Pembuatan Ensim Linamarase dari Daun Ubikayu dan Kertas Buffer Linamarase.....	22
	5.1. Pembuatan Bufer Fosfat pH 6.0.....	23
	5.2 Uji Larutan Linamarase dan Persiapan Kertas Bufer-linamarase.....	23
VI.	Penutup.....	25
VII.	Daftar Pustaka.....	28
VIII.	Ucapan Terimakasih.....	31

Daftar Tabel

- Tabel 1. Kinerja (Performance) Metoda Uji Cepat Sianogen Potensial Ubi Kayu
- Tabel 2. Kadar Sianogen Tepung Ubikayu Hasil Analisis Uji Cepat dengan Kertas Pikrat.
- Tabel 3. Perbandingan Hasil Analisis Total Sianogen Potensial pada Umbi Ubikayu antara Metoda Uji Cepat Kertas Pikrat dengan Hidrolisa Asam.
- Tabel 4. Kadar Sianida beberapa Produk Ubikayu
- Tabel 5. Peringkat Bahaya Racun Sianida dari Bahan Pangan
- Tabel 6. Analisis Gerombol kadar Sianogen Potensial 179 Klon Ubikayu koleksi Plasma Nutfah Indonesia.
- Tabel 7. Analisis Gerombol kadar Sianogen Potensial Daun Ubikayu dari 99 Klon Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.
- Tabel 8. Kadar Sianogenik Potensial Sepuluh Terendah dan Tertinggi dari 179 Varietas/Galur Ubikayu di Indonesia.
- Tabel 9. Analisis Gerombol kadar Linamarin pada 179 Klon Ubikayu koleksi Plasma Nutfah Indonesia.
- Tabel 10. Analisis Gerombol Kadar Aseton Sianohidrin pada 179 Klon Ubikayu Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.
- Tabel 11. Analisis Gerombol Kadar HCN/CN pada 179 Klon Ubikayu Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.
- Tabel 12. Nisbah Sianogen pada 179 Klon Ubikayu Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.
- Tabel 13. Sianida pada beberapa Produk Ubi Kayu

I. Pendahuluan

Ubi kayu (*Manihot esculenta*) dikenal sebagai sumber makanan pokok yang terpenting di negara tropika, setelah beras dan jagung. Lebih dari 500 juta orang menggantungkan makanan pokoknya pada ubikayu [Cock, 1985]. Tanaman ubikayu mengandung glukosida sianogen, linamarin, sedikit lotaustralin (metil linamarin), dan enzim linamarase [Cooke, 1978]. Senyawa linamarin, dengan bantuan katalis enzim linamarase dihidrolisis secara cepat menjadi glukosa dan aseton sianohidrin, dan lotaustralin diubah menjadi sianohidrin dan glukosa. Dalam kondisi netral atau basa, asetonsianohidrin pecah menjadi aseton dan HCN/CN⁻. Dengan demikian di dalam umbi ubikayu dan tepung ubikayu terdapat tiga bentuk sianogen, yaitu linamarin (+ metil linamarin), asetonsianohidrin, dan HCN/CN⁻.

Ketiga bentuk senyawa tersebut dikenal sebagai total sianogen atau sianogen potensial. Satuan yang digunakan untuk menyatakan besarnya sianogen potensial dalam buku ini adalah ppm CN⁻ atau mg CN⁻ per kg bobot contoh segar. Kadar sianogen potensial pada umbi ubikayu dan daun ubikayu berkisar antara 2 sampai lebih dari 1000 ppm CN⁻ [Hidayat, *et al.* 1999, 2000, 2002]. Diantara ketiga bentuk senyawa tersebut, yang potensial berbahaya bagi tubuh adalah bentuk HCN/CN⁻ dan asetonsianohidrin, karena asetonsianohidrin dalam kondisi alkalin akan berubah dengan cepat menjadi ion sianida. Sedangkan linamarin, karena relatif lebih stabil, mudah keluar dari tubuh sebelum pecah menjadi senyawa-senyawa sianogen yang lebih sederhana.

Senyawa sianida bila kadarnya mencapai diatas 40 ppm CN⁻, akan membahayakan bagi manusia. Telah dilaporkan beberapa kasus keracunan dan kematian di beberapa negara akibat mengkonsumsi ubikayu dengan kadar HCN tinggi. Sianida tinggi dapat menyebabkan defisiensi iodine dalam tubuh, sehingga mengakibatkan pertumbuhan menjadi sangat terhambat (kerdil). Kelainan ini dikenal dengan nama *goitre*, *cretinism* atau *konzoo*, atau kelainan yang mengakibatkan "*irreversible spastic paralysis*" pada kedua kaki, terutama terjadi pada anak-anak dan wanita. Penyakit ini telah terjadi di Tanzania, Zaire dan Mozambique [Delange 1983.; Egan, *et al.* 1998]. Untuk mengatasi masalah tersebut telah dikembangkan ubikayu berkadar sianida rendah. Metoda analisis sianogen yang cepat, sederhana, mudah namun cukup teliti sangat diperlukan untuk pengembangan varietas ubikayu berkadar sianida rendah, dan dalam usaha pencegahan keracunan sianida ubikayu.

Baru-baru ini telah dikembangkan oleh Bradbury *et al.* metoda analisis tiga bentuk senyawa sianogen [Bradbury, *et al.* 1999]. Metoda tersebut cocok digunakan di lapang, karena sangat praktis, sederhana, murah, dan relatif mudah dilakukan oleh orang yang belum mempunyai pengalaman analisis, serta dapat diandalkan untuk tujuan seleksi varietas ubikayu berkadar HCN rendah. Metoda yang terbit di empat buah jurnal tersebut [Bradbury *et al.* 1999, Egan, 1998, Haque *et al.* 1999; Haque and Bradbury, 1999]. diterjemahkan ke dalam bahasa Indonesia dan disusun kembali dengan tujuan untuk membantu program pengembangan varietas ubikayu di Indonesia, atau digunakan sebagai seleksi ubikayu di gudang, atau di tempat penjualan tepung ubikayu (KUD-KUD). Bila kadar sianida akan menjadi standar keamanan bahan pangan

ubikayu, maka uji cepat berbahasa Indonesia sangat praktis untuk digunakan di Lapang.

Buku metoda uji cepat ini dilengkapi dengan hasil penetapan kinerja metoda yang dilakukan di laboratorium (Tabel 1), perbandingan dengan metoda laboratorium yang telah dikenal (Tabel 3), beberapa hasil analisis ubi kayu koleksi Plasma Nutfah Balitbio (Tabel 3-13) dan informasi lainnya yang penting berkaitan dengan senyawa sianogen ubikayu (Tabel 5 sampai dengan 8). Bagi yang menginginkan informasi lebih lanjut mengenai uji cepat ini, atau ingin memiliki paket uji cepat, dapat berhubungan dengan Laboratorium Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (Balitbio), Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor; Tel. 0521-337975; fax. 0251-338820.

II. Prinsip Penetapan

Metoda penetapan sianida dari umbi dan tepung ubikayu terdiri dari tiga tahap: (1) ekstraksi sianogen dari contoh dengan hidrolisa asam; (2) mengubah sianogen menjadi HCN, dan (3) penetapan HCN dengan cara kolorimetri.

Kendala dari metoda tersebut adalah penggunaan enzim linamarase sebagai katalis untuk merubah linamarin menjadi sianida. Keharusan pemakaian enzim tersebut membuat penetapan linamarin menjadi sangat tidak ekonomis dan relatif kompleks, sehingga memerlukan keahlian untuk dapat melaksanakannya.

Baru-baru ini telah dikembangkan oleh Egan *et al.* [1998] uji cepat terhadap tiga bentuk sianida pada contoh umbi dan tepung ubikayu. Mereka berhasil mengekstrak enzim linamarase dari daun ubi kayu dengan metoda yang murah dan sederhana, dan mengimobilisasi enzim linamarase pada kertas saring, sebesar kancing baju, dan membuat enzim ini stabil di dalam kertas saring. Enzim linamarase bisa dibuat secara amat sederhana yaitu dengan mengumpulkan getah tangkai daun ubikayu. Efektivitas enzim yang diperoleh cukup tinggi untuk keperluan analisis linamarin.

Prinsip penetapan:

- Senyawa HCN/CN⁻ dapat mengubah warna kuning dari asam pikrat menjadi warna kuning kecoklatan sampai coklat. Intensitas warna coklat berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa HCN/CN⁻ yang bereaksi dengan asam pikrat. Maksimum absorbansi dari warna coklat tersebut, bila diukur dengan spektrofotometer, berada pada panjang gelombang 510 nm.
- Oleh karena itu semua bentuk sianogen, harus terlebih dahulu diubah menjadi HCN/CN⁻.
- Terdapat tiga bentuk sianogen di dalam umbi dan tepung ubikayu, yaitu: (1) linamarin (+ metil linamarin), (2) asetonsianohidrin, dan (3) HCN/CN⁻. Masing-masing senyawa tersebut dapat ditetapkan dengan melakukan pemisahan sebagai berikut:

Senyawa awal	Perlakuan	Perubahan
Penetapan sianogen potensial (linamarin + asetonsianohidrin + HCN/CN⁻)		
Linamarin (+ metil linamarin)	Dengan penambahan enzim linamarase diubah menjadi asetonsianohidrin; dan pada pH 6.0.	Berubah dengan cepat menjadi HCN/CN ⁻
Asetonsianohidrin	Di dalam kondisi pH 6,0	Berubah dengan cepat menjadi HCN/CN ⁻
HCN/CN ⁻	Langsung diukur sebagai →	HCN/CN ⁻
Penetapan asetonsianohidrin + HCN/CN⁻		
Linamarin (+ metil linamarin)	Penambahan perlakuan guanidin-HCl (membuat linamarase tidak aktif)	tetap linamarin/tidak berubah dan tidak bereaksi dengan asam pikrat.
Asetonsianohidrin	pada kondisi alkalin (pH 6.0)	berubah menjadi HCN/CN ⁻
HCN/CN ⁻	Langsung bisa diukur sebagai →	HCN/CN ⁻
Penetapan HCN/CN⁻		
Linamarin (+ metil linamarin)	Penambahan 50 ml H ₂ SO ₄ 1.0 M menyebabkan enzim linamarase tidak berfungsi	tetap linamarin, tidak bereaksi dengan asam pikrat.
Asetonsianohidrin	Penambahan 50 ml H ₂ SO ₄ 1.0 M dalam suasana asam sulfat,	tetap sebagai asetonsianohidrin tidak bereaksi dengan asam pikrat
HCN/CN ⁻	+ 50 ml H ₂ SO ₄ 1.0 M	HCN/CN ⁻

Ruang Lingkup

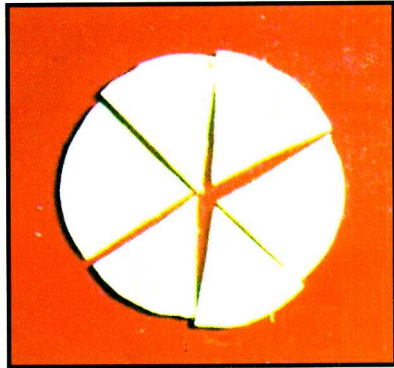
Sesuai dengan prinsip penetapan yang telah dijelaskan diatas, maka metoda uji cepat sianida ini sangat selektif, yaitu semua bentuk ion CN⁻ setelah masa inkubasi akan dalam kondisi seimbang dengan gas HCN. Hanya gas HCN yang terbentuk dapat mengubah warna kuning dari asam pikrat menjadi warna kuning kecoklatan sampai coklat, yang berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa HCN, Berdasarkan prinsip ini maka metoda uji cepat sianida ini mampu menganalisis semua bahan yang mengandung linamarin, asetonsianohidrin dan HCN/CN⁻. Metoda uji ini telah dibandingkan (divalidasi) dengan metoda hidrolisa asam dengan menghasilkan data yang tidak berbeda nyata. Kinerja metoda tersebut juga telah ditetapkan di Laboratorium Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, dengan hasil validasi seperti tercantum pada Tabel 1., dan telah digunakan untuk menganalisis potensial sianogen dari berbagai bahan pangan yang berasal dari ubikayu (Tabel 4 dan Tabel 13).

9. Kertas linamarin (21 mm) mengandung bufer pH.6.0 dan linamarase
10. Pisau dapur (G1)

Prosedur:

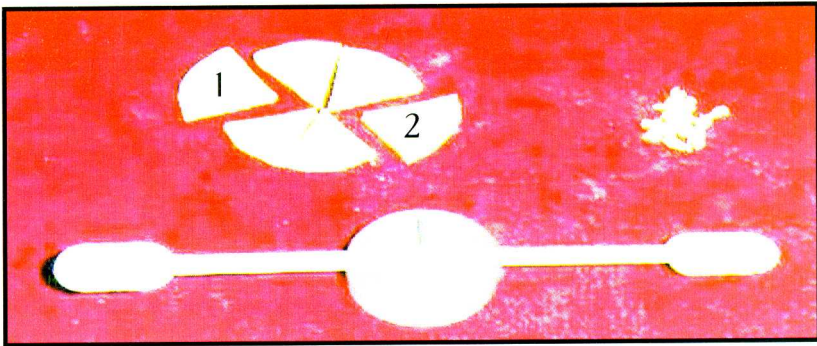
G3

G2



1. Umbi ubikayu dipotong di bagian tengah setebal 1- 2 mm kulit luar dibuang.
2. Potongan dibagi menjadi 6 sektor, dan diambil dua sektor

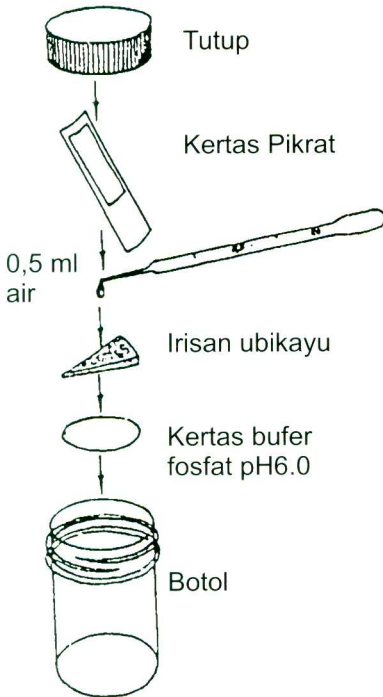
G4



3. Dua sektor tersebut dicampur dan dipotong halus (± 1 mm) dengan pisau, dan ditimbang tiga kali @ 100 mg, dengan menggunakan sendok timbang.

Setelah penimbangan sebaiknya segera dianalisis. Tidak boleh dibiarkan lebih dari 1 jam. Variasi kadar sianogen pada ubikayu antar tanaman di dalam satu varietas, maupun antar umbi di dalam satu tanaman sangat tinggi. Untuk memperoleh data yang representatif perlu dilakukan analisis secara terpisah pada tiga umbi per tanaman dari tiga tanaman per petak. Hasil analisis dirata-ratakan.

G-5

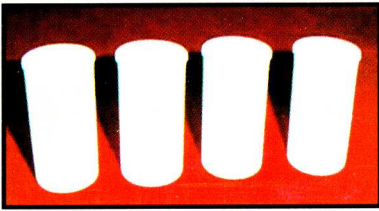


4. Masukkan kertas bufer pH 6.0 kedalam botol kit. Masukkan 100 mg contoh ubikayu diatas kertas bufer pH 6.0. Teteskan 0.5 ml air (G5). Gantungkan kertas pikrat di pinggir botol (jangan menyentuh air atau contoh), dan segera ditutup rapat (G5).
5. Untuk menentukan ketelitian (presisi) dari metoda, ulangi prosedur 4 sebanyak dua kali ulangan.
6. Ulangi prosedur 4, kali ini tanpa contoh ubi (untuk blanko).

7. Ulangi prosedur 4, kali ini untuk acuan (standar), masukkan

kertas bufer-linamarase dan kertas linamarin standar (50 ppm CN).

G6



G7



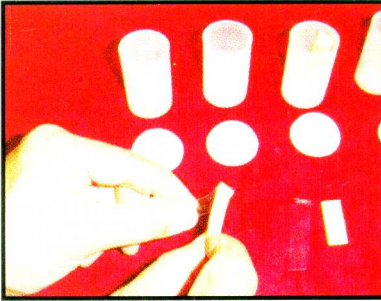
8. Diamkan (inkubasi) selama 16 - 24 jam pada suhu kamar (25 - 37°C).
9. Setelah inkubasi, botol dibuka, warna kertas pikrat dibandingkan dengan warna pada kartu standar warna.
10. Baca konsentrasi sianogen dan cari rata-rata dari 3 ulangan. Blanko harus menunjukkan 0 ppm. Standar harus sesuai dengan konsentrasi yang diharapkan (50 ppm CN).

Bila tidak menunjukkan angka yang diharapkan, mungkin disebabkan beberapa hal, antara lain aktifitas linamarase sudah sangat rendah, kertas pikrat yang digunakan tidak efektif lagi, dll. Analisis tidak bisa dilanjutkan kecuali telah ada perbaikan dari kerusakan tersebut.

3.2. Pengukuran Menggunakan Spektrofotometer.

Untuk memperoleh data yang lebih teliti, warna kertas pikrat diukur dengan spektrofotometer.

G8



G9



11. Pisahkan kertas pikrat dari plastiknya (plastik tersebut dapat digunakan lagi).
12. Rendam kertas pikrat kedalam 5.0 ml air selama 30 menit, sambil sekali-sekali digoyang
13. Ukur warna larutan pada panjang gelombang 510 nm, dengan menggunakan blanko pada prosedur 14.
14. Perhitungan:

Konsentrasi Sianogen Total (ppm) = 396 x besarnya absorbansi.

Konsentrasi sianogen yang diambil dari umbi yang sama harus menghasilkan angka yang sama. Periksa juga hasil dari standar (prosedur 7). Botol harus selalu diperiksa, jangan ada yang retak, karena gas HCN akan lolos keluar, dan hasil analisis akan rendah.

3.3 Cara Membuat Kertas Bufer dan Kertas Pikrat.

Kertas bufer dan kertas pikrat sangat praktis digunakan di lapang. Namun untuk di Laboratorium lebih mudah menggunakan 50 mL 1M bufer fosfat pH 6.0 dan 0.5 ml air (atau setara dengan 500 mM bufer fosfat pH 6.0).

Pereaksi:

1. Bufer fosfat 1 M:

80 ml asam fosfat pekat (88% H_3PO_4) diencerkan dengan 750 ml air.

2. NaOH 10 M:

Larutkan 100 g NaOH pelet dengan air dan encerkan sampai 250 ml.

Campurkan larutan NaOH dengan asam fosfat sambil diaduk sampai dicapai pH 6.0 (dibutuhkan NaOH 10 M, antara 160-190 ml).

Atau: campurkan 1 M NaH_2PO_4 dengan 1 M Na_2HPO_4 sampai dicapai campuran larutan pH 6.0.

Prosedur:

Pekerjaan ini menggunakan sarung tangan plastik.

G10



1. Teteskan (1 tetes) bufer pada kertas saring berbentuk kancing (selanjutnya disebut 'kertas kancing'). Kering udarkan.
2. Larutkan 1.4 g asam pikrat ke dalam 100 ml, 2.5% Na-karbonat. Celupkan kertas Whatman 3MM (10 x 10 cm) ke dalam larutan diatas selama 20 detik.
3. Angkat dan kering-anginkan.
4. Buang warna yang tidak merata dengan gunting.

5. Potong kertas menjadi ukuran 30 x 10 mm.

6. Lekatkan kertas pikrat pada tangkai plastik transparansi dengan lem PVA atau dengan menggunakan stapler.
7. Simpan kertas pikrat di dalam botol plastik hitam bekas wadah negatif film.

(kertas pikrat tidak boleh kena cahaya matahari atau cahaya lampu, dan bisa disimpan paling lama 1 bulan). Penyimpanan dalam jangka waktu lama harus dilakukan di dalam lemari es atau freezer.

3.4 Pembuatan Kertas Linamarin Standar

1. Untuk memeriksa metoda, digunakan kertas linamarin standar (prosedur 7).
2. Tersedia kertas linamarin standar mengandung 5 dan 40 mg HCN, atau ekuivalen dengan 50 dan 400 ppm HCN.

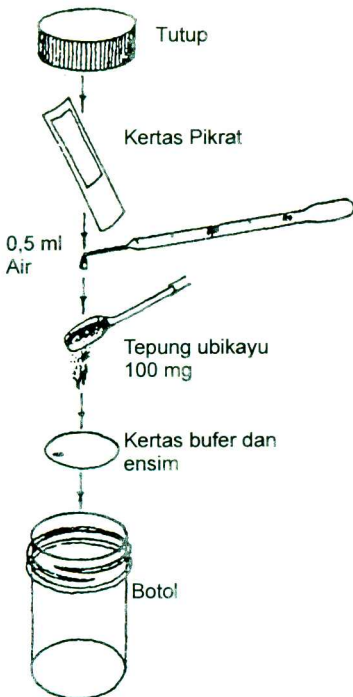
Perlu diperhatikan:

Bila kadar sianogen standar jauh lebih kecil dari 50 atau 400 ppm, maka dapat dipastikan ada kesalahan metoda. Hal tersebut mungkin disebabkan oleh:

1. Menurunnya aktifitas linamarase di dalam kertas linamarase.
2. Pecahnya senyawa linamarin di dalam kertas.
3. Kertas pikrat sudah kadaluwarsa (> 1 bulan), atau telah terkena cahaya matahari atau lampu penerangan laboratorium dalam waktu cukup lama.
4. Botol pereaksi yang bocor, sehingga uap HCN keluar.

IV. Penetapan Total Sianogen Pada Tepung Ubikayu

4.1. Penetapan Total Sianogen (Uji Cepat) (Gambar 11):



Gambar 11

1. Tambahkan tepung halus kedalam sendok timbang sampai tercapai keseimbangan. Bila ada bagian yang kasar harus dihaluskan lagi.
2. Masukkan kertas bufer pH 6.0 mengandung enzim linamarin .
3. Masukkan 100 mg contoh tepung ubikayu diatas kertas bufer tersebut.
4. Teteskan 0.5 ml air.
5. Gantungkan kertas pikrat di pinggir botol (jangan menyentuh air atau contoh)
6. Botol segera ditutup rapat.
7. Ulangi prosedur 2 - 6, kali ini tanpa contoh ubi (untuk blanko), dan untuk standar yang berisi 50 ppm HCN.
8. Biarkan selama 16 - 24 jam pada suhu kamar (25 - 37° C).Botol dibuka, warna kertas pikrat dibandingkan dengan warna pada kartu warna standar. Baca konsentrasi sianogen dan cari rataan dari 3 ulangan. Blanko harus menunjukkan 0 ppm. Standar harus sesuai dengan konsentrasi yang diharapkan (50 ppm CN).

4.1.1. Pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer

1. Pisahkan kertas pikrat dari plastiknya (plastik tersebut dapat digunakan lagi).
2. Rendam kertas pikrat kedalam 5.0 ml air selama 30 menit, sambil digoyang.
3. Ukur warna larutan pada panjang gelombang 510 nm, dengan menggunakan blanko pada prosedur 7.

4 Perhitungan:

Konsentrasi Sianogen (ppm) = 396 x besarnya absorbansi.

4.2 Penetapan Asetonsianohidrin dan HCN/CN⁻

1. Timbang contoh tepung, 100 mg.
2. Masukkan kedalam botol kertas bufer (tidak mengandung linamarase dan juga bukan kertas yang ada tanda 'spot hitam'), dan masukkan 100 mg contoh tepung.
3. Masukkan 200 mg guanidine-HCl menggunakan timbangan. Caranya dengan menimbang 2 x 100 mg guanidine-HCl ke dalam botol.
4. Tambahkan 0.5 ml air, masukkan kertas pikrat dan cepat-cepat ditutup.
5. Lakukan prosedur 1 - 4 tanpa tepung (digunakan sebagai blanko)
6. Diamkan (inkubasi) selama TEPAT 3 JAM.
7. Buka botol dan cocokkan warna dengan warna pada kartu standard.

8. Karena hasil yang diperoleh akan sangat rendah, maka untuk memperbaiki ketepatan disarankan menggunakan spektrofotometer. Lanjutkan dengan prosedur 4.1.1.
9. Kadar sianogen yang diperoleh dari pembacaan dengan kartu warna dan pembacaan dengan spektrofotometer harus tidak berbeda nyata.

Penetapan HCN/CN⁻

10. Masukkan kertas saring berisi 50 ml H₂SO₄, 1.0 M (bertanda titik merah) ke dalam botol. Tambahkan 100 mg tepung ubikayu.
11. Tambahkan 0.5 ml air.
12. Masukkan kertas pikrat dan segera ditutup rapat.
13. Ulangi prosedur 10 sampai dengan 12, tanpa contoh tepung, untuk blanko.
14. Diamkan (inkubasi) pada suhu kamar selama 3 jam.

Karena hasil yang diperoleh akan sangat rendah, maka untuk memperbaiki ketepatan disarankan menggunakan spektrofotometer. Lanjutkan dengan prosedur 4.1.1.

15. Perhitungan:

Kadar linamarine = Total sianogen - (asetonsianohidrin + HCN/CN⁻)

Asetonsianohidrin = (Asetonsianohidrin + HCN/CN⁻) - (HCN/CN⁻)

4.3 Pembuatan Kertas Linamarase dari Bahan Ensim

Linamarase

Enzim linamarase dapat dibuat dari tangkai daun ubi kayu (lihat prosedur V), atau dibeli pada perusahaan penjual bahan kimia.

1. Larutan linamarase (prosedur V) dicampur dengan 10 % Polyvinyl pyrrolidone-10 (PVP-10, 1:1 (v/v)) dan 2% gelatin (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA).
2. Teteskan, satu tetes 1 M bufer fosfat pH 6.0 (menggunakan pipet plastik) pada kertas kancing (21 mm) dan kering udarkan.
3. Teteskan (2 tetes) campuran linamarase/gelatin/PVP-10, pada kertas kancing dan kering-udarkan (kertas kancing ini diberi tanda 'spot hitam')

V. Pembuatan Enzim Linamarase dari Tangkai Daun Ubikayu dan Kertas Bufer/Linamarase

Peralatan

1. Kertas saring Whatman 3MM.
2. Kertas Linamarin 3MM mengandung 40 mg CN setara dengan 50 ppm CN.
3. Pipet plastik, 1 ml (dua buah)

Prosedur

1. Petik 10 sampai 50 (tergantung banyaknya kebutuhan), daun ubikayu yang cukup tua dengan tangkainya.
2. Kumpulkan getah batang daun tersebut ke dalam cawan timbang.
3. Timbang getah yang terkumpul, dan tambahkan air sehingga mengandung 0.1 g getah per 10 ml air.
4. Aduk larutan getah selama 5 menit.
5. Saring dengan kertas saring Whatman No:1. Larutan ini disebut larutan linamarase

Getah yang mengandung enzim linamarase tahan lama bila disimpan dalam pendingin - 20°C

5.1. Pembuatan bufer fosfat pH 6.0

Larutkan garam Na_2HPO_4 atau K_2HPO_4 dalam air. Tambahkan 2 M NaOH sampai pH 6.0 dan encerkan sampai mencapai 0.1 M.

5.2 Uji larutan linamarase dan persiapan kertas bufer-linamarase

1. Masukkan kertas saring yang mengandung linamarin setara dengan 400 ppm CN.
2. Masukkan satu tetes larutan linamarase, kemudian 0.5 ml fosfat bufer 0.1M pH 6.0
3. Kemudian segera tambahkan kertas pikrat dan segera ditutup rapat.
4. Aktivitas enzim linamarase diuji dengan membuat deret larutan 5, 10, 20, dan 40 uL larutan linamarase ke dalam 0.5 mL larutan bufer pH 6.0.
5. Lanjutkan dengan prosedur 1 sampai 3.

Catatan:

Volume tetesan harus sama. Gunakan pipet ket 1 ml. Pipet ini mempunyai volume tetesan 45 ml.

6. Teteskan (2 tetes) larutan yang konsentrasinya setengahnya, campurkan dengan 2 tetes air, sehingga konsentrasinya menjadi $\frac{1}{4}$ nya. Lanjutkan prosedur 1 - 3.

7. Teteskan 2 tetes yang konsentrasinya $\frac{1}{4}$ nya, tambahkan 2 tetes air sehingga konsentrasinya menjadi $\frac{1}{8}$ nya. Ambil satu tetes dan lanjutkan prosedur 1 - 3.
8. Setelah didiamkan (inkubasi) selama 24 jam, ukur kertas pikrat dari masing-masing konsentrasi linamarase (sebaiknya gunakan Spektrofotometer).
9. Linamarase yang akan digunakan untuk membuat kertas linamarin, harus dengan konsentrasi 2x lebih tinggi, karena di dalam kertas, aktifitas linamarase berkurang hampir setengahnya, walaupun telah digunakan penstabil gelatin dan PVP-10.

10. Contoh:

Bila diperoleh hasil sebagai berikut.:

Konsentrasi	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$
Nilai pada kartu warna	400	400	400	100

Maka untuk membuat kertas linamarase digunakan konsentrasi $\frac{1}{2}$.

Bila diperoleh hasil sebagai berikut:

Konsentrasi	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$
Nilai pada kartu warna	400	200	50	10

Maka konsentrasi linamarase tidak cukup kuat untuk membuat kertas linamarase. Bila volume linamarase ditingkatkan, kemampuan kertas terbatas dalam menyerap larutan linamarase yaitu 100 ml, sedangkan pengeringan bertahap membuat pekerjaan tidak efektif.

11. Bila konsentrasi linamarase terlalu rendah, disarankan menggunakan

Daun dari varietas yang berbeda, sehingga diperoleh konsentrasi linamarase yang tinggi.

Siapkan larutan yang mengandung 10 % PVP-10 dan 2% gelatin. Untuk melarutkan gelatin mungkin perlu pemanasan. Campurkan kedua larutan tersebut (1:1). Teteskan 1 tetes fosfat bufer 1M, pH8 pada kertas kancing, dan kering udarakan. Teteskan 2 tetes campuran larutan linamarase/gelatin/PVP-10 pada kertas kancing dan kering-udarakan.

VI. Penutup

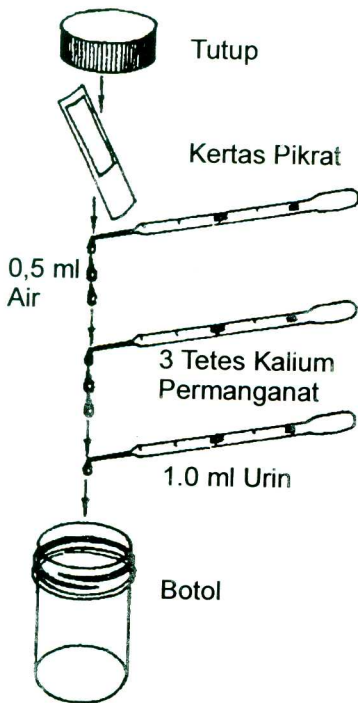
Uji cepat sianogen pada buku ini, pada prinsipnya dapat digunakan untuk bahan pertanian lainnya. Dibawah ini beberapa faktor yang perlu mendapat perhatian, sehingga pelaksanaan analisis disesuaikan.

1. Teknik pengambilan contoh untuk mendapatkan cuplikan (sub-sampling) yang representatif atau mewakili contoh yang ingin diketahui kadar sianogennya.
2. Jumlah penimbangan contoh untuk mendapatkan data analisis yang masih berada di dalam rentang deret standar (0.5 - 800 ppm CN).
3. Ada atau tidaknya enzim linamarase di dalam contoh yang akan dianalisis. Bila contoh tidak mengandung enzim linamarase, maka bufer yang mengandung enzim linamarase perlu ditambahkan, seperti pada penetapan total sianogen tepung ubikayu.
4. Uji cepat ini dapat digunakan untuk penetapan tiosianat pada contoh urine (G12 dan G13).

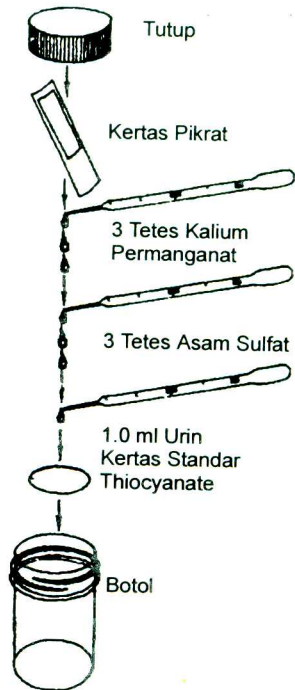
1. Contoh urin yang digunakan harus contoh baru, atau bila disimpan, harus disimpan di lemari pendingin (deep freezer), paling lama 6 bulan.
 2. Pipet 1.0 ml contoh urin ke dalam botol (Gambar 12).
 3. Tambahkan 3 tetes asam sulfat (dibuat dari 5.5 ml asam sulfat pekat (96%), diencerkan dengan akuades menjadi 100 ml.
 4. Tambahkan 3 tetes kalium permanganat (KMnO_4) (dibuat dari 100 mg KMnO_4 , dilarutkan ke dalam 5 ml akuades (larutan ini stabil dalam 2 bulan).
 5. Masukkan kertas pikrat seperti pada prosedur III No.4 hal 13., dan lanjutkan sampai dengan No. 13 hal 15.
6. Perhitungan:

Kadar tiosianat (ppm) = $78 \times \text{Absorban}$.

Kadar tiosianat $\mu\text{mol/L}$ = ppm tiosianat $\times 17.2$



Gambar 12



Gambar 13

VII. Daftar Pustaka

- Bradbury, M.G., S.V. Egan, dan M.J. Lynch. 1997. Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides. *J. Food Sci. Agric.* 55, 277-290.
- Bradbury, M.G., S.V. Egan, and J.H. Bradbury, 1999 Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all form of cyanogens in cassava product. *J.Sci. Food Agric.* 79 : 593 - 601.
- Cock, J.H. 1985. Cassava: New potential for a neglected crop. Westview Press, Boulder, Colorado, USA. p10.
- Cooke, R.D. 1978. An enzymatic assay for total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Sci. Food Agric.* 29:345-352.
- Coursey, D.G. 1973. Cassava as food, toxicity, and technology. 40-413. In chronic Cassava Toxicity. Proceedings of the Second International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia, 22-26 August, 1994. Contro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Delange, F. and Ahluwalia, R. 1983. Cassava toxicity and thyroid. Research and Public Health Issues. Ottawa. P148.
- Djazuli, M., and J. H. Bradbury. 1999. Cyanogen content of cassava roots and flour in Indonesia. *Food Chemistry*, 65. 523-525.
- Egan, S.V., H. H. Yeoh, and J. H. Bradbury. 1998. Simple picrate paper kit for determination of the sianogenic potential of cassava flour, *J. Sci. Food Agric.*, **75**, 258-262
- FAO/WHO. 1991. Joint FAO/WHO Food Standars Programme, Codex Alimentarius Commission XII. Supplement 4. FAO Rome, Italy.

- Haque, M.R. And J.H. Bradbury, 1999. Preparation of linamarase solution from cassava latex for use in the cassava cyanide kit. *J. Agric, Food Chem.* 67, 305-309
- Haque, M. R., And J. H. Bradbury. 1999. Simple method for the determination of thiocyanate in urine. *Clinical Chemistry.* 45:9, April-2000, Bogor, Indonesia.
- Hidayat, A., N. Zuraida, I. Hanarida and D. S. Damardjati. 2000. Cyanogenic content of cassava root of 179 cultivars grown in Indonesia. *Journal of Food Composition and Analysis* 13, 71-82
- Hidayat, A., Sianida pada ubikayu. 2000. *Proceeding Seminar Hasil Penelitian Tanaman Pangan Berwawasan Lingkungan, Pati, 7 November 2000.*
- Hidayat, A., N. Zuraida, and I. Hanarida 2002. The Cyanogenic potential of roots ands Leaves of ninety nine Cassava Cultivars. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 1 (3) 2002. IAARD. 25-32.
- Ikedibi, C. O., G. O. C. Onyia and C. E. Eluwah., *Agric. Biol Chem*, 44, 22 (1989), 2803 -2809.
- Nur Richana and Suami (1989), Pengaruh cara pengolahan terhadap kandungan asam sianida ubikayu. *Laporan Tahunan 1989/1990. Balai Penelitian Tanaman Pangan, Maros (South Sulawesi)*
- Sumardi, and Rumiati, S., (1990). Mutu gablek dari beberapa klon ubikayu. *Dalam Proceeding Seminar Nasional Pengkajian dan Pengembangan Teknologi pra dan pasca panen ubikayu.*

- (Wargiono, Ed.). 317-332. Lampung, 15 Februari 1990)
- Widowati, S., Damardjati D.S., And suismono (1992). Development of shredded cassava preparation on farmer in the cassava flour production system Indonesia. Paper presented at the 4th. ASEAN Food Conference, 1992. Jakarta, Indonesia.
- Wargiono, J. (1990). Peranan teknologi pra panen ubikayu dalam swasembada pangan. In Proceeding Seminar Nasional Pengkajian dan Pengembangan Teknologi pra dan pasca panen ubikayu. (Wargiono, Ed.). Lampung, 15 Februari 1990. 83-117.

VIII. Ucapan Terimakasih

Penyusun buku panduan 'Uji cepat sianida pada umbi dan tepung ubikayu' ini mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. ACIAR sebagai penyandang dana dalam penelitian pengembangan uji cepat sianida termasuk publikasi buku metoda dalam bahasa Indonesia.
2. Dr. J. H. Bradbury dan kawan-kawan yang telah mengembangkan metoda uji cepat sianida dan melatih para peneliti di Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian dalam menggunakan dan membuat kit tersebut.
3. Tim Redaksi Balitbio serta semua pihak yang terlibat di dalam pembuatan buku panduan ini.

Tabel 1. Kinerja (Performance) Metoda Uji Cepat Sianogen Potensial Ubi Kayu Cara 'Bradbury, et al'

No	Parameter	Sianogen Potensial
1	Ketelitian (precision) (% RSD)	4.8
2	Kedapat ulangan (reproducibility) (%RSD)	9.8
3	Ketepatan (%)	86.0
4	Batas deteksi (ppm CN ⁻²)	0.8
5	Kisaran linier (ppm CN ⁻²)	0.8 - 600
6	Koefisien Korelasi larutan standar (R)	0.9984
7	Kemiringan (Slope)	1.02
8	Titik potong (Intercept)	0.004

- Sumber: Hidayat, *et al.* 2000.
- Penetapan Kinerja dilakukan di Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian.
- Pengukuran larutan warna dengan spektrofotometer.

Tabel 2. Kadar Sianogen Tepung Ubikayu Hasil Analisis Uji Cepat dengan Kertas Pikrat. (ppm CN⁻ per kg Contoh Tepung)

HCN/CN ⁻	Aseton Sianohidrin	Linamarin
0.4	2.7	87
0.8	5.3	68
1.8	6.9	19
0.6	0.4	24
0.4	2.8	12
0.4	3.0	4.5

Sumber: M. G. Bradbury, *et al.* 1997.

Tabel 3. Perbandingan Hasil Analisis Total Sianogen Potensial pada Umbi Ubikayu antara Metoda Uji Cepat Kertas Pikrat dengan Hidrolisa Asam.

Varietas	ppm CN per kg contoh umbi	
	Uji Cepat Kertas Pikrat	Hidrolisa Asam
TMS 1425A	67	73
TMS 1425B	39	36
TMS 50395	41	58
TMS 63397	47	51
TMS 91934	16	17
TMS 60506	5	11

Sumber: M. G. Bradbury, *et al.*1997.

Tabel 4 Kadar Sianida beberapa Produk Ubikayu

No	Jenis Produk	Penggunaan	ppm CN
1	Tapioka	Makanan	125
2	Keripik Ubikayu (mentah)	Makanan	74
3	Vita Fufu (Bahan kue ubikayu)	Makanan	132
4	Tepung Ubikayu	Makanan	81
5	Bubur ubikayu	Pakan	109.7
6	Ubi hasil fermentasi	Pakan	264
7	Ubi kering (dijemur di panas matahari)	Pakan	144

Sumber: Ikediobi, C. O., G. O. C. Onyia and C. E. Eluwah. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 12 (1989), 2803 - 2809.

Tabel 5 Peringkat Bahaya Racun Sianida dari Bahan Pangan

Peringkat	ppm CN
Aman	< 50
Bersifat racun	50 - 100
Sangat beracun	> 100
Batas aman menurut Kesehatan Makanan Indonesia ²⁾	< 40
Batas aman menurut WHO ³⁾	< 10

Sumber : Coursey, D. G., Chronic Cassava Toxicity: An Interdisciplinary Workshop, ed. by B. Nestel and R. Macintyre, London, England, 1973, p.29.

Tabel 6 Analisis Gerombol Kadar Sianogen Potensial 179 Klon Ubikayu Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.

Kelompok	Selang	Rataan	SD	n
Sangat Tinggi	138 – 234	169.2	25.8	18
Tinggi	84 – 135	101.9	14.1	26
Sedang	56 – 82	66.1	7.9	30
Rendah	36 – 54	45.0	4.9	29
Sangat Rendah	9 – 35	25.9	6.0	71

Sumber: Hidayat, *et al.* 2000.

Tabel 7. Analisis Gerombol Kadar Sianogen Potensial Daun Ubikayu dari 99 Klon Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.

Kelompok	Selang	Rataan	SD	n
Sangat Tinggi	491 – 779	645.3	116.4	3
Tinggi	335 – 490	429.5	39.7	12
Sedang	216 – 334	283.0	35.4	16
Rendah	94 – 215	152.1	38.0	21
Sangat Rendah	9 – 93	29.8	17.4	47

Sumber: Hidayat, *et al.* 2002

Tabel 8 Kadar Sianogen Potensial (Sepuluh Klon Tertinggi dan Terendah) Ubikayu dari 179 Klon Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.

No	Klon	Mg CN/kg Bobot Umbi Begar	Klon	mg CN/kg Bobot Umbi Segar
1	W1435-68	258	L-89-7	27
2	CE-17	252	T986	25
3	W1056	239	Valenca	25
4	CH-10	228	MA-2	24
5	CH-15	227	L53	24
6	W1435-110	223	CM1428-6	21
7	Lop 48	215	H7-47	20
8	Klenteng	204	H7-3	16
9	Pop.N18	198	Chichen A,	15
10	L210	191	Dorowati	12

Sumber: Hidayat, *et al.* 2000.

Tabel 9 Analisis Gerombol Kadar Linamarin pada 179 Klon Ubikayu Koleksi Plasma Nutfah Indonesia

Kelompok	Selang	Rataan	SD	n
Sangat Tinggi	122- 210	152.1	26.2	12
Tinggi	70 - 119	88.0	14.6	23
Sedang	4 - 62	48.8	6.6	42
Rendah	21 - 38	28.1	5.2	43
Sangat Rendah	4 - 20	13.6	4.2	59

Sumber: Hidayat, *et al.* 2000.

Tabel 10 Analisis Gerombol Kadar Aseton Sianohidrin pada 179 Klon Ubikayu Koleksi Plasma Nutfah Indonesia

Kelompok	Selang	Rataan	SB	n
Sangat Tinggi	36 - 61	45.6	7.2	11
Tinggi	19 - 31	23.7	3.4	24
Sedang	11 - 18	14.1	2.2	44
Rendah	6 - 10	7.9	1.5	41
Sangat Rendah	1 - 5	3.3	1.3	57

Sumber: Hidayat, *et al.* 2000.

Tabel 11 Analisis Gerombol Kadar HCN/CN⁻ 179 Klon Ubikayu Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.

Kelompok	Selang	Rataan	SD	n
Sangat Tinggi	10 - 15	11.5	2.8	20
Tinggi	7 - 9	7.2	0.9	29
Sedang	4 - 6	5.1	0.4	37
Rendah	2 - 3	3.2	0.6	41
Sangat Rendah	0 - 2	0.6	0.7	52

Sumber: Hidayat, *et al.* 2000.

Tabel 12 Nisbah Sianogen pada 179 Klon Ubikayu Koleksi Plasma Nutfah Indonesia.

Bentuk Sianogen	Kadar Rataan (mg CN ⁻ /kg Bobot Umbi Segar)	Nisbah (%)
Linamarin	57	70
Aseton sianohidrin	19	23
CN ⁻	6	7
Total (Sianogen Potensial)	87	100

Sumber: Hidayat, *et al.* 2000.

**Tabel 13 Sianida pada beberapa Produk Ubi Kayu.
Contoh berasal dari 10 Toko/Pasar di Wilayah Bogor.**

Nama Produk	ppm CN ⁻	Nama Produk	ppm CN ⁻
Gaplek Peta ni	83	Keripik singkong	0
Tapioka	90	Timus	30
Adira 1 (dilaporkan oleh Soemardi, 1990)	29	Getuk	22
Adira 4 (dilaporkan oleh Soemardi, 1990)	78	Enye	0
Adira 1 (dilaporkan oleh Nurichana, 1989)	28	Opak	0
Adira 4 (dilaporkan oleh Nurichana, 1989)	76	Singkong bakar	0
Adira 1 (dilaporkan oleh Hidayat et al, 2000)	48	Tape	1
Adira 4 (dilaporkan oleh Hidayat et al, 2000)	92	Singkong Goreng	27
Adira 2 (dilaporkan oleh Hidayat et al, 2000)	130	Putri Noong	27
Adira 2 (dilaporkan oleh Wargiono, 1990)	124	Sayur da un singkong	55 – 256

Sumber: Hidayat, *et al.* 2000.