

Kaedah mudah mengesan kandungan nitrat dan nitrit dalam makanan

(Simple method to determine nitrate and nitrite content in food)

Hasnisa Hashim, Mohd Nazrul Hisham Daud, Dr. Mohamed Shafit Hussain, Mohamed Nazim Anvarali, Nur ilida

Mohamad, Sharizan Ahmad, Nurul Nabilah Mohd Fiteri dan Nazarifah Ibrahim

Pengenalan

Nitrat (NO_3) dan nitrit (NO_2) ialah bahan bukan organik yang terdiri daripada nitrogen dan oksigen. Nitrat ialah nutrien penting kepada tumbuhan dan haiwan yang didapati di dalam tanah, udara, air permukaan serta air bawah tanah dan merupakan substrat atau produk daripada proses metabolismik mikrob, tumbuhan serta haiwan dan diserap oleh organisme tumbuhan sebagai nutrien yang digunakan dalam pelbagai proses bakteria seperti proses penyahnitrit anaerob atau proses pengurangan nitrat kepada ammonia (DNRA). Proses ini meningkatkan kandungan ammonia dalam ekosistem sedia ada. Nitrit (NO_2) pula merupakan bentuk peralihan antara ammonia dan nitrat (nitrifikasi) di mana ammonia yang teroksida akan membentuk nitrit. Cecair tumpahan baja ammonia boleh membentuk nitrat dan mampu mengalirkan nitrat melalui tanah kepada air bawah tanah dan juga mencemari sistem pengairan/air permukaan.

Sistem kumbahan yang tidak diselenggara dengan baik juga boleh mencemarkan air bawah tanah dengan nitrat. Kandungan nitrit yang tidak stabil bersifat toksik kepada organisme dan juga manusia kerana tahap nitrit yang tinggi juga boleh menunjukkan kehadiran bahan pencemar lain seperti bakteria atau racun perosak. Kandungan maksimum pencemaran nitrat dan nitrit dalam air minuman masing-masing tidak boleh melebihi 10 mg/liter dan 1 mg/liter (WHO 2011). Oleh itu, pengukuran kepekatan nitrat dan nitrit dalam sistem pengairan merupakan satu aspek penting dalam kebanyakan kajian yang berkaitan kitaran nitrogen untuk menentukan kadar pengeluaran dan penggunaannya.

Selain itu, nitrat dan nitrit juga digunakan dalam industri makanan sebagai bahan pengawet terutamanya dalam produk berasaskan daging. Penggunaan bahan pengawet bertujuan mengurangkan atau mencegah pertumbuhan mikroorganisma seperti bakteria, kulat dan ragi. Pengawet berupaya mencegah pertumbuhan mikroorganisma yang mengakibatkan makanan berbau busuk dan basi. Kombinasi pengawet nitrat dan nitrit dalam produk daging dapat meningkatkan jangka hayat makanan, mengelak pertumbuhan mikrob dan memberi warna merah yang seragam pada produk daging yang diawet. Namun demikian, penggunaan bahan pengawet ini tidak selalunya selamat

terutamanya jika digunakan dalam kuantiti yang berlebihan. Menurut Akta Makanan 1983 dan Peraturan-peraturan (2013), produk daging yang dikon, diawet, dijeruk atau diasin boleh mengandungi natrium nitrit, kalium nitrit, natrium nitrat atau kalium nitrat sendirinya atau dalam kombinasi sebagai bahan pengawet yang dibenarkan dengan syarat hasil terakhir tidak mengandungi lebih daripada 200 ppm (bahagian per juta) jumlah nitrat dan nitrit dihitung bersama sebagai natrium nitrit.

Kesan nitrat dan nitrit kepada kesihatan

Pendedahan komponen nitrat dan nitrit kepada tubuh manusia boleh berlaku melalui air minuman dan diet harian manusia. Sumber terbesar nitrat dalam air berpunca daripada baja berasaskan nitrogen yang masuk ke dalam telaga air minuman yang cetek (biasanya di kawasan luar bandar) dan nitrat lain boleh masuk ke dalam air daripada buangan haiwan dan juga daripada sistem pembetungan yang lemah. Diet harian juga mempunyai kebarangkalian yang tinggi dicemari oleh nitrat dan nitrit. Contohnya pemakanan yang mengandungi nitrat dan nitrit sebagai bahan pengawet seperti produk daging yang diproses melebihi kadar yang dibenarkan. Ikan, produk tenusu, sayur-sayuran dan buah-buahan juga mengandungi nitrat dan nitrit. Jumlah nitrat dan nitrit dalam sayur-sayuran berbeza mengikut jenis sayur, bagaimana ia disimpan dan disediakan untuk dimakan. Bunga kubis, bayam, *collard* hijau, brokoli dan ubi sayuran (kentang, lobak dan lain-lain) mengandungi nitrat dan nitrit secara semula jadi lebih tinggi daripada sayuran lain.

Nitrat dan nitrit boleh menyebabkan masalah kesihatan, termasuk kanser gastrousus jika dimakan dalam jumlah yang besar. Pengawet nitrit boleh mengakibatkan beberapa kesan yang tidak diingini seperti rasa mual, muntah-muntah, pening kepala dan tekanan darah menjadi rendah. Sekiranya terdapat sebahagian kecil nitrit di dalam perut, ia boleh membentuk nitrosamina yang diketahui boleh menyebabkan kanser pada haiwan ujian. Bagi bahan pengawet nitrat pula, kesakitan pada bahagian perut boleh berlaku di samping muntah-muntah, lemah otot serta kadar nadi tidak menentu. Pengawet nitrat boleh bertukar menjadi nitrit apabila makanan basi atau ditukar oleh bakteria di dalam perut yang kemudiannya boleh menghasilkan nitrosamina (bersifat karsinogenik).

Bahan makanan yang terlalu tinggi kandungan nitrat yang digunakan dalam penyediaan makanan bayi dan sup boleh menyebabkan masalah kesihatan yang serius pada bayi. Selain itu, keracunan nitrat boleh berlaku apabila air minuman yang tercemar dengan nitrat digunakan untuk mencairkan susu formula. Tahap nitrat dan nitrit yang tinggi boleh menyebabkan methemoglobinemia. Bayi terdedah kepada kesan nitrat dalam air minuman disebabkan perut bayi yang beralkali (pH tinggi) yang akan meningkatkan pertukaran nitrat kepada nitrit.

Kaedah penentuan nitrat dan nitrit

Banyak kaedah untuk penentuan nitrat dan nitrit boleh didapati dalam sumber rujukan penyelidikan. Kaedah yang sangat sensitif adalah berdasarkan penurunan nitrat kepada oksida nitrik yang ditentukan melalui *chemiluminiscence* atau kepada nitrus oksida dengan menggunakan teknik kromatografi sama ada kromatografi gas, ion dan cecair prestasi tinggi. Walau bagaimanapun, kedua-dua teknik ini memerlukan peralatan mahal dan khusus. Kaedah-kaedah lain melibatkan penggunaan asid kuat pada suhu tinggi yang melibatkan pengendalian dan analisis sampel yang rumit. Sebaliknya, kaedah yang paling mudah digunakan melibatkan penurunan nitrat kepada nitrit di mana pengukuran dijalankan menggunakan reagen Griess (melibatkan perubahan warna sampel). Kaedah ini mempunyai had/takat pengesanan rendah, ketepatan yang tinggi dan kekhususan (*specificity*) yang tinggi tanpa menggunakan alat mahal atau prosedur yang kompleks. Langkah penting bagi penentuan tepat nitrat adalah tindak balas penurunan nitrat kepada nitrit yang berkesan. Teknik pengesanan spektrofotometrik menggunakan larutan vanadium triklorida (VCl_3) bagi menurunkan nitrat kepada nitrit di mana sampel ditindakbalaskan dengan reagen Griess dan diukur/ditetulkan melalui perubahan warna. Pengesanan kandungan nitrat dan nitrit boleh menggunakan *Spectro UV-Vis Double Beam PC Scanning Spectrophotometer* (Model UVD-2950; Labomed, USA) (Gambar 1).



Gambar 1. UV-Spektrofotometer

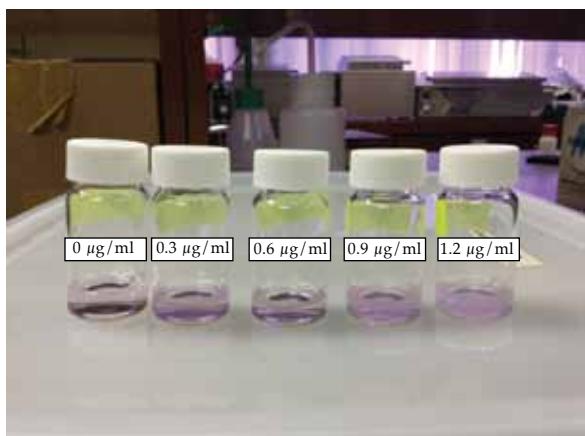
Penyediaan reagen

Air yang digunakan dalam analisis ini ditulenkannya menggunakan unit penyahion berskala komersial untuk memastikan tiada pencemaran nitrat atau nitrit (air ternyahion). Asid hidroklorik (HCl 20%) disediakan dengan menyukat 1,080 ml HCl pekat (37%, w/w) dan dicairkan kepada 2 liter dalam kelalang isi padu menggunakan air ternyahion. Prosedur ini perlu dijalankan dalam kebuk wasap. Larutan vanadium triklorida (VCl_3 , 0.1%, w/v) disediakan dengan mlarutkan 0.10 g vanadium (III) klorida di dalam 100 ml 20% HCl. Larutan hijau yang terhasil stabil untuk beberapa minggu (disimpan sejuk dingin).

Reagen Carrez disediakan dengan mlarutkan 30.0 g kalium hexacyanoferate (II) trihidrat dalam air ternyahion dan dicairkan kepada 200 ml (Carrez I). Larutan ini stabil dan boleh disimpan selama beberapa bulan jika tiada cahaya dan disimpan sejuk dingin. Zink asetat dihidrat (46.0 g) dilarutkan dalam air

ternyahion dan dicairkan kepada 200 ml (Carrez II) dan disimpan sejuk dingin. Reagen Griess pula disediakan secara berasingan di mana 5 g sulfanilamida dilarutkan dalam 10 ml HCl pekat dan dicairkan kepada 500 ml dengan air ternyahion. Reagen ini adalah stabil untuk beberapa bulan pada suhu 4 °C. Sebanyak 0.5 g N-1-naphthyl-ethylenediamine dihidroklorida dilarutkan dalam 250 ml air ternyahion. Larutan ini disimpan selama satu bulan di dalam botol gelap bagi mengelakkan pendedahan kepada cahaya. Gabungan reagen Griess hanya disediakan sebelum analisis dilakukan dengan mencampurkan 100 ml larutan sulfanilamida dan 20 ml larutan N-1-naphthyl-ethylenediamine dihidroklorida.

Larutan stok piawai nitrat (1 mg / ml) disediakan dengan melarutkan 0.1629 g kalium nitrat (yang mengandungi 100 mg NO₃) dalam 100 ml air ternyahion. Begitu juga dengan larutan stok piawai nitrit, 0.1850 g kalium nitrit (yang mengandungi 100 mg NO₂) dilarutkan dalam 100 ml air ternyahion. Larutan stok piawai nitrat dan nitrit ini disimpan di dalam peti sejuk dan digantikan secara bulanan. Untuk penyimpanan yang lebih lama, larutan stok piawai diasingkan dan dibekukan pada suhu -20 °C. Selain itu, larutan piawai boleh disediakan daripada garam natrium menggunakan 0.1371 g natrium nitrat dan 0.1500 g natrium nitrit. Larutan piawai NO₃ dan NO₂ dengan kepekatan 10 mg / ml disediakan harian melalui pencairan 1 ml setiap



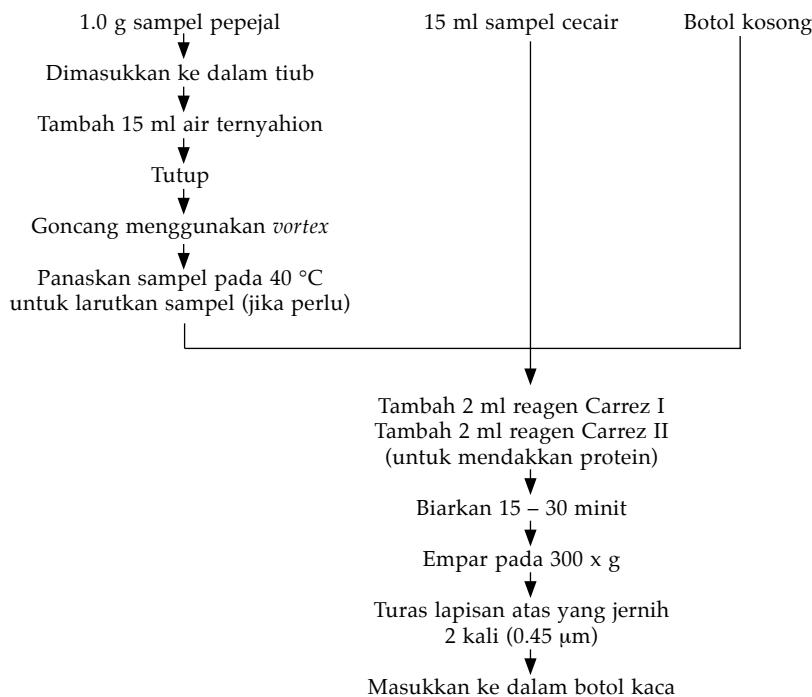
Gambar 2. Siri kepekatan larutan piawai nitrat (0 – 1.2 µg/ml)

stok piawai ke dalam 100 ml kelalang isi padu. Pencairan larutan stok piawai perlu dilakukan ke dalam 10 ml kelalang isi padu untuk menyediakan lima bacaan pada graf kalibrasi dalam julat 0 – 1 µg / ml (Gambar 2).

Penyediaan sampel makanan

Penyediaan atau pengekstrakan sampel makanan ditunjukkan seperti dalam *Carta alir 1*. Sampel makanan pepejal seperti daging, sayur dan susu formula ditimbang sebanyak 1.0 g ke dalam tiub pengempar polipropilena. Kemudian 15 ml air ternyahion dimasukkan ke dalam tiub pengempar dan ditutup. Campuran sampel digoncang menggunakan *vortex* untuk melarutkan sampel. Jika perlu, campuran dipanaskan pada suhu 40 °C untuk melarutkan sampel sepenuhnya. Bagi sampel cecair pula (contohnya susu dan air minuman), 15 ml sampel dimasukkan ke dalam tiub pengempar dan ditutup.

Sebanyak 2 ml reagen Carrez I ditambah ke dalam sampel diikuti 2 ml Carrez II untuk memendakkan protein. Campuran



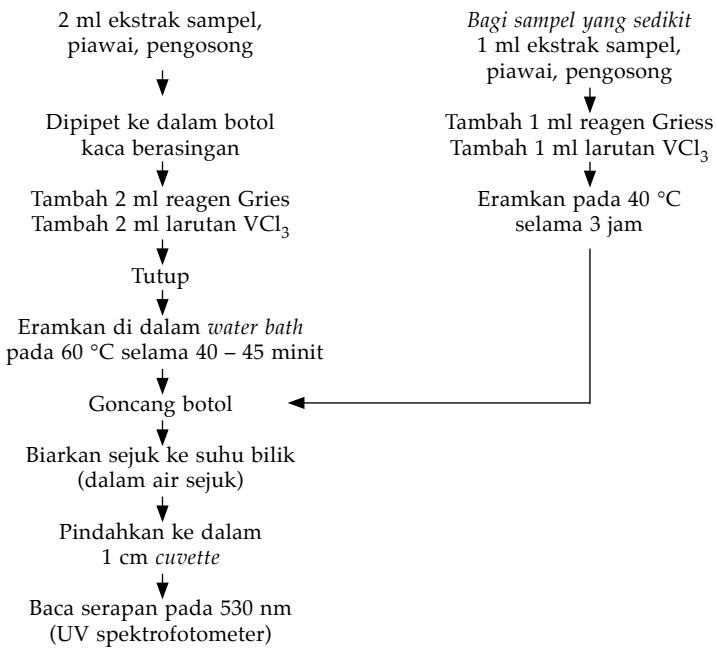
Carta alir 1. Pengekstrakan sampel makanan

dibiarkan selama 15 – 30 minit seterusnya diempar pada 300 x g untuk menghasilkan lapisan jernih. Sekiranya lapisan jernih tidak diperoleh, 2 ml reagen Carrez I dan II perlu ditambah dan diempar semula. Seterusnya, lapisan atas yang jernih dituras menggunakan membran 0.45 µm sebanyak dua kali ke dalam botol kaca atau tabung uji. Dua sampel kosong disediakan tanpa menggunakan sampel makanan, tetapi setiap reagen digunakan.

Penentuan kandungan nitrat (NO_3^-) dan nitrit (NO_2^-)

Sebanyak 2 ml ekstrak sampel, piawai dan sampel kosong dipipet ke dalam botol kaca berasingan. Untuk setiap satu botol kaca, 2 ml reagen Griess ditambah diikuti 2 ml larutan vanadium klorida. Botol kaca ditutup dengan ketat untuk mengelak penyejatan dan dieram pada suhu 60 °C di dalam *water bath* selama 40 – 45 minit. Tindak balas boleh dilihat oleh perubahan warna merah/merah jambu. Botol kemudian digoncang, disejukkan ke suhu bilik di dalam air sejuk dan larutan dipindahkan ke dalam 1 cm *cuvette* kuarza. Serapan dibaca pada jarak gelombang 530 nm terhadap air ternyahion menggunakan spektrofotometer.

Bagi sampel yang sedikit, suhu yang lebih rendah diperlukan semasa pengeraman untuk mengelak kehilangan jumlah isi padu (sampel) melalui penyejatan. Prosedur alternatif dijalankan di mana 1 ml sampel, piawai serta sampel kosong, 1 ml reagen Griess dan 1 ml larutan vanadium triklorida dicampur di dalam *cuvette* yang bertutup dan dieram pada suhu 40 °C selama 3 jam



Carta alir 2. Penentuan nitrat

atau dibiarkan semalaman pada suhu 25 °C. Kaedah penentuan nitrat ditunjukkan seperti dalam *Carta alir 2*.

Kandungan nitrit ditentukan dengan cara yang sama, kecuali vanadium triklorida digantikan dengan asid hidroklorik dan pemanasan juga tidak diperlukan (*Carta alir 3*). Tindak balas sesuai dijalankan secara langsung dalam *cuvette* di mana 1 ml setiap turasan sampel, piawai atau sampel kosong dicampur dengan 1 ml reagen Griess dan 1 ml asid hidroklorik. Selepas 10 – 15 minit, serapan diukur pada jarak gelombang 530 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

Pengiraan

Daripada dua graf kalibrasi yang diperoleh, kecerunan terbaik graf linear dikira dan digunakan untuk menentukan kepekatan NO_x⁻ dalam setiap sampel (mg/kg) dengan menggunakan persamaan (1).

$$\text{mg/kg} = \left[\frac{\text{serapan sampel} - \text{sampel kosong}}{\text{kecerunan graf kalibrasi}} \right] \times \frac{\text{DF}}{\text{berat sampel (g)}} \quad (1)$$

Faktor pencairan (DF) semasa pencairan sampel dikira sebagai 19 (15 ml air ditambah 2 ml setiap reagen Carrez). Pencairan semasa adalah sama untuk piawai dan sampel. Kepekatan NO₃⁻ ditentukan melalui perbezaan (pembetulan berat molekul) jumlah NO_x⁻ dan NO₂⁻ menggunakan persamaan (2).

$$\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ NO}_3 = \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ NO}_x - [1.35^* \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ NO}_2] \quad (2)$$

Contoh penentuan nitrit dalam sarang burung walit

Sarang burung walit (EBN) ialah tonik makanan berharga yang terkenal dalam masakan Cina dan perubatan tradisional sejak dinasti Tang (618 AD). EBN kaya dengan protein, karbohidrat, besi, garam bukan organik air dan juga serat. Pengambilan makanan berasaskan EBN sangat popular di kalangan masyarakat Cina. Kini, EBN telah berkembang menjadi pelbagai produk makanan termasuk minuman, bahan tambahan makanan dan juga bahan kosmetik.

Pasaran eksport EBN Malaysia telah merosot pada tahun 2011 akibat kandungan nitrit dalam EBN yang tidak memenuhi piawaian kesihatan China. Menurut Kementerian Kesihatan Malaysia (KKM), nitrit tidak boleh ditambah sebagai bahan tambahan semasa pemprosesan dan pengeluaran EBN. Kehadiran nitrit disebabkan oleh beberapa faktor seperti kehadiran semula jadi nitrit dalam air liur burung, pembentukan ammonia di dalam sarang burung, kehadiran ammonia daripada najis burung di rumah atau burung persekitaran gua yang akhirnya ditukar kepada nitrit dalam EBN dan najis burung yang mengandungi nitrit yang mencemarkan EBN (MOH 2012). Berhubung isu ini, China dan Malaysia telah bersetuju bahawa hanya EBN yang mengandungi tahap nitrit bawah 30 ppm sahaja yang boleh dieksport ke China.

Bagi menentukan kandungan nitrit dalam EBN, sarang burung walit yang diperoleh dari rumah burung dihancurkan (*Gambar 3 dan 4*). Kemudian 1.0 g sarang burung walit ditimbang dan dimasukkan ke dalam tiub pengempar. Pengekstrakan sampel EBN dan penentuan kandungan nitrit dijalankan seperti ditunjukkan dalam *Carta alir 3* dan *Carta alir 4*.

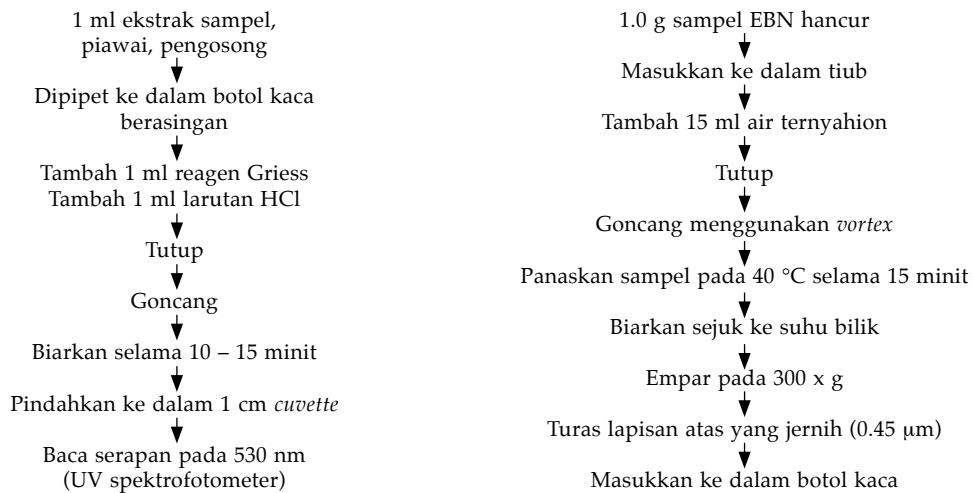
Daripada graf kalibrasi piawai nitrit yang diperoleh (*Rajah 1*), kecerunan terbaik graf linear dikira dan digunakan untuk menentukan kepekatan nitrit dalam sampel EBN (mg/kg) menggunakan persamaan (1). Faktor pencairan (DF) semasa pencairan sampel dikira sebagai 15 (15 ml air yang digunakan untuk pengekstrakan sampel). Pencairan semasa adalah sama



Gambar 3. EBN mentah

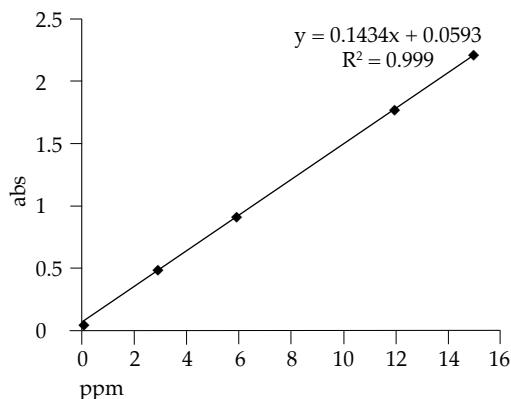


Gambar 4. EBN yang dihancurkan



Carta alir 3. Pengekstrakan sarang burung walit

Carta alir 4. Penentuan nitrit



Rajah 1. Contoh graf kalibrasi piawai nitrit terbaik (bacaan R^2 menghampiri 1.0)

untuk piawai dan sampel. Daripada analisis yang dijalankan, kandungan nitrit dalam EBN mentah adalah sebanyak 89.12 mg/kg (ppm).

$$\text{mg/kg} = \left[\frac{\text{serapan sampel} - \text{sampel kosong}}{\text{kecerunan graf kalibrasi}} \right] \times \frac{\text{DF}}{\text{berat sampel (g)}} \quad (1)$$

di mana:

serapan sampel	= 1.042
serapan pengosong	= 0.190
kecerunan graf kalibrasi	= 0.1434
berat sampel	= 1.00 g
DF	= 15

Kesimpulan

Analisis penentuan nitrat dan nitrit boleh dilakukan menggunakan teknik spektrofotometer. Dalam kaedah ini, pengekstrakan sebatian kimia nitrat dan nitrit tidak menggunakan pelarut organik dan hanya menggunakan air sebagai pelarut dan reagen tertentu untuk bertindak balas. Penggunaan air ternyahion amat penting bagi mengelak pencemaran/kontaminasi ion nitrat/nitrit kerana ion nitrat/nitrit sendiri wujud di dalam air.

Bibliografi

- Anon. (2013). Akta Makanan 1983 (Akta 281) dan Peraturan-peraturan. Selangor: International Law Book Series
- (2012). Standard operating procedure on the control of nitrite level in edible bird's nest. Kuala Lumpur: Ministry of Health Malaysia
- Benowitz, N.L. (2007). *Nitrates and nitrites in poisoning and drug overdose*. (Olson, K.R., ed.). New York: Mc-Graw Hill Companies, Inc.
- Garcia-Robledo, E., Corzo, A. dan Papaspyrou, S. (2014). A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry* 162: 30 – 36
- Miranda, K.M., Espey, M.G. dan Wink, D.A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 5(1): 62 – 71
- Moorcroft, M.J., Davis, J. dan Compton, R.G. (2001). Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta* 54: 785 – 803
- Narayana, B. dan Sunil, K. (2009). A spectrophotometric method for the determination of nitrate and nitrite. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* 4(2): 204 – 214
- Schnetger, B. dan Lehnert, C. (2014). Determination of nitrate plus nitrite in small volume marine water samples using vanadium (III) chloride as a reduction agent. *Marine Chemistry* 160: 91 – 98
- Woolard, D.C. dan Indyk, H.E. (2014). Colorimetric determination of nitrate and nitrite in milk and milk powders – use of vanadium (III) reduction. *International Dairy Journal* 35: 88 – 94

Ringkasan

Satu kaedah mudah diterangkan untuk menentukan nitrat dan nitrit dalam sampel makanan sebagai satu alternatif kepada kaedah lain yang sangat sensitif berdasarkan penurunan nitrat kepada oksida nitrik yang dinilai melalui *chemiluminescence* atau nitrus oksida (diukur menggunakan teknik kromatografi). Teknik ini memerlukan peralatan yang mahal dan khusus. Kaedah mudah melibatkan penurunan nitrat kepada nitrit adalah pengukuran melalui kolorimetri (penentuan perubahan warna) menggunakan tindak balas reagen Griess. Penggunaan larutan vanadium (III) telah dicadangkan sebagai agen penurunan yang sesuai untuk menurunkan NO_3^- kepada NO_2^- semasa analisis menggunakan spektrofotometri. Penentuan kuantitatif NO_2^- diukur serentak dengan tindak balas reagen Griess. Penambahan larutan VCl_3 (0.1%) dan 20% HCl dalam sampel yang sama dan tindak balas pada suhu 60 °C selama 40 minit menghasilkan penurunan NO_3^- kepada NO_2^- yang berkesan (juga dikesan oleh reagen Griess). Kaedah ini mempunyai had pengesanan rendah, ketepatan yang tinggi dan kekhususan yang tinggi tanpa menggunakan alat mahal atau prosedur yang kompleks. Analisis ini boleh dilakukan dalam kumpulan sampel yang besar dengan menggunakan jumlah sampel yang kecil (≤ 2 ml) untuk penentuan kedua-dua NO_3^- dan NO_2^- dalam masa kurang daripada 1 jam.

Summary

A simple method is described for the determination of nitrate and nitrite in food samples. Its alternative to other highly sensitive methods that are based on the reduction of nitrate to nitric oxide, which is quantified by chemiluminescence or nitrous oxide, with the later quantified by chromatography technique. These techniques require expensive and specialised equipment. The simplest method involves the reduction of nitrate to nitrite followed by measurement by colorimetry using the Griess reaction. The use of vanadium (III) in solution has been proposed recently as a suitable agent for the reduction of NO_3^- to NO_2^- during spectrophotometric analysis. NO_2^- quantitation is carried out concurrently with reaction by Griess reagent. The subsequent addition of 0.1% VCl_3 solution and 20% HCl in the same sample and the reaction at 60 °C for 40 minutes results in an efficient reduction of the NO_3^- to NO_2^- which is also detected by Griess reagents. The method has low detection limit, high accuracy and high specificity without using expensive instruments or complex procedures. The analysis can be performed in large batches (in less than 1 hour) by using small sample volumes (≤ 2 ml) for the determination of both NO_3^- and NO_2^- .

Pengarang

Hasnisa Hashim

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor
E-mel: hasnisa@mardi.gov.my

Mohd Nazrul Hisham Daud, Dr. Mohamed Shafit Hussain, Mohamed Nazim
Anvarali, Nur ilida Mohamad, Sharizan Ahmad, Nurul Nabilah Mohd Fiteri dan
Nazarifah Ibrahim
Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor