

**Penentuan sebatian kimia toksik alkaloid  
(*dioscorine*) dalam ubian tradisional menggunakan  
Kromatografi Cecair Digabungkan dengan Jisim  
Penerbangan *Quadrupole* (LCMS-Q-ToF) dan  
Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi (HPLC)**  
(Determination of alkaloid toxic compound (*dioscorine*) from  
wild yam using Liquid Chromatography Mass Spectrometry  
Quadrupole - Time Of Flight (LCMS-Q-ToF) and High  
Performance Liquid Chromatography (HPLC))

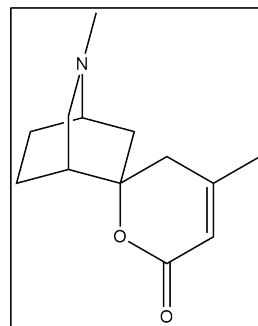
Mohd Zulkhairi Azid, Razali Mirad, Mohd Norfaizal Ghazalli,  
Abdul Muhaimin Abdul Kadir, Siti Aisyah Mohd Noor, Saidatul  
Aqilah Mohamad Yusof, Nur Daliana Yusof dan Salmaniza Salleh

**Pengenalan**

*Dioscorea* spp. merupakan tanaman ubian yang tergolong dalam famili Dioscoreaceae dan boleh ditemui di kawasan beriklim tropika. Sebanyak 600 spesies *Dioscorea* dilaporkan ditemui dengan 60 spesies boleh dimakan di Asia Tenggara. Di Malaysia, genus *Dioscorea* merupakan tanaman ubian tradisional yang kurang dikenali berbanding dengan ubian lain seperti ubi kayu (*Mahinot esculenta*), ubi keledek (*Ipomoea batatas*) dan ubi keladi (*Colocasia esculenta*). Contoh spesies yang tergolong dalam genus *Dioscorea* ialah *D. alata* (ubi badak), *D. hispida* (ubi gadong), *D. esculenta* (ubi nasi) dan *D. piscatorum* (ubi ciak).

Ubian tradisional ini banyak digunakan oleh masyarakat pedalaman seperti suku kaum orang asli dan masyarakat di Pantai Timur Semenanjung Malaysia terutama Kelantan dan Terengganu sebagai makanan alternatif. Pendedahan yang kurang meluas terhadap kepelbagaian dan khasiat ubian ini menjadi salah satu sebab ubian ini tidak mendapat perhatian pasaran. Selain itu, ubian tradisional juga mengandungi toksik iaitu *dioscorine* yang tergolong dalam sebatian kelas alkaloid (Rajah 1).

Sebatian *dioscorine* (C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>) pertama kali ditemui dan dikenal pasti pada tahun 1894 dalam spesies *D. hirsuta* dan kemudiannya dalam spesies *D. hispida* pada tahun 1937. Masyarakat orang asli mengeskrak toksik daripada ubian ini (contoh ubi gadong) sebagai pelali untuk menuba ikan dan diletakkan di dalam sumpit untuk membunuh kera dan haiwan liar di hutan. *Dioscorine* merupakan sebatian bersifat neurotoksik yang menghalang reseptor *nicotinic acetylcholine* (nAChR) terhadap tubuh badan manusia dengan memberi kesan loya, mengganggu pernafasan, pening kepala dan boleh membawa maut. Bagi tujuan mengeluarkan toksik di dalam ubi, suku kaum orang asli serta masyarakat di kawasan pantai timur terutamanya Kelantan dan



Rajah 1. Struktur kimia alkaloid *dioscorine*

Terengganu akan merendam ubi di dalam sungai yang mengalir selama seminggu. Selain itu, ia juga boleh direbus dan dibakar untuk menyingkirkan sebatian toksik tersebut. Manakala, masyarakat pedalaman di Indonesia akan menyalut ubi gadong dengan campuran garam dan abu kayu bagi tujuan yang sama.

Pengenalpastian sebatian *dioscorine* dalam spesies *D. hispida* (ubi gadong) yang dilaporkan oleh kajian terdahulu adalah melalui pelbagai kaedah kromatografi seperti Kromatografi Cecair Jisim (LCMS) dan Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi (HPLC). Instrumen seperti LCMS dan HPLC merupakan salah satu teknologi yang sering digunakan dalam mengenal pasti dan menentukan kandungan sesuatu sebatian kimia. Kaedah ini bukan sahaja pantas dan tepat, malah jumlah sampel yang diperlukan bagi analisis juga adalah sedikit (1 – 20  $\mu$ l). Kromatografi yang menggunakan kaedah pemisahan sebatian kimia tertentu akan menggunakan aliran pelarut (fasa cecair) pada turus pepejal (fasa pepejal). Pemisahan ini dibantu oleh faktor tekanan, masa dan pengesan (*detector*) tertentu.

Salah satu contoh pengesan yang digunakan ialah ultra lembayung (UV) pada bacaan gelombang tertentu (nm). Setiap sebatian kimia mempunyai respons khusus terhadap bacaan gelombang yang tertentu. Masa tahanan [(*retention time* ( $t_R$ ))] sesuatu sebatian akan ditentukan berdasarkan kehadiran sebatian tersebut dalam analisis kromatogram. Kehadiran sebatian kimia dikenal pasti melalui puncak yang terbentuk susulan daripada respons terhadap bacaan gelombang.

Kaedah penentuan sebatian *dioscorine* dalam pelbagai sampel ubian tradisional (*Dioscorea* spp.) merupakan penemuan terbaharu dalam kajian ini dan belum direkodkan. Kaedah pengenalpastian sebatian kimia menggunakan instrumentasi kromatografi bukanlah sesuatu yang asing dalam kalangan penyelidik. Meskipun kaedah ini telah lama dipraktikkan, namun pengubahsuaian parameter yang bersesuaian dengan teknologi semasa merupakan satu pembangunan kaedah dalam penyelidikan yang dijalankan ini.

### **Penyediaan sampel**

Sebanyak lima sampel ubian tradisional (ubi gadong, ubi badak putih, ubi badak ungu, ubi nasi dan ubi ciak) diperoleh dari pelbagai lokasi (*Jadual 1*). Sampel dibersihkan di bawah air yang mengalir. Sampel kemudiannya dipotong dadu dan dikeringkan di dalam ketuhar industri (Memmert GmbH, Jerman) pada suhu 50 °C selama tiga hari atau sehingga kandungan kelembapan menjadi malar. Sampel dikisar sehingga menjadi serbuk halus dengan menggunakan pengisar mikro (Model; Ika Werke MF 10 Basic, Jerman) dan ditapis menggunakan penapis bersaiz 18 *mesh*. Sampel yang telah siap dikisar dilabel dan disimpan di dalam peti sejuk pada suhu 4 °C sebelum proses pengeskrakan bagi mengelakkan sebarang pencemaran atau pertumbuhan kulat.

Jadual 1. Pengumpulan sampel kepelbagaian ubian tradisional untuk analisis pengenalanpastian sebatian *dioscorine*

| Bil. | Nama tempatan                                                                                            | Nama saintifik       | Lokasi pengumpulan                                |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------|
| 1    |  <p>Ubi gadong</p>      | <i>D. hispida</i>    | Kg. Kuala Menzing,<br>Kuala Berang,<br>Terengganu |
| 2    |  <p>Ubi badak putih</p> | <i>D. alata</i>      | Ladang Wakaf Bharu,<br>Kelantan                   |
| 3    |  <p>Ubi badak ungu</p> | <i>D. alata</i>      | Ladang Wakaf Bharu,<br>Kelantan                   |
| 4    |  <p>Ubi nasi</p>      | <i>D. esculenta</i>  | Serdang, Selangor                                 |
| 5    |  <p>Ubi ciak</p>      | <i>D. piscatorum</i> | Taman Negara Kuala<br>Koh, Kelantan               |

### Pengekstrakan *dioscorine*

Pengekstrakan *dioscorine* dijalankan berdasarkan prosedur terdahulu dengan sedikit pengubahsuaian. Sebanyak 100 g sampel kering ubi ditimbang dan diekstrak dengan 1 L pelarut organik (etanol 95%). Pengekstrakan dijalankan menggunakan kaedah ultrasonik selama 60 minit pada suhu 50 °C (Ultrasonic Cleaner 2200 ETH S3, Soltec, Itali). Campuran sampel dan larutan etanol yang telah selesai diekstrak dikeringkan dalam keadaan vakum dengan penyejat putar (Buchi Rotavapor R-200, Malaysia). Ekstrak dilarutkan dengan 50 mL asid asetik (5%) dan diemparkan menggunakan pengempar (Heraeus Multifuge X3R, Jerman) pada putaran 10,000 putaran/minit (rpm) selama 15 minit. Lapisan berasid di atas diasingkan dan nilai pH direkodkan (pH = 3.00). Beberapa titis larutan ammonia (28%) dimasukkan ke dalam larutan sehingga campuran bertukar menjadi alkali (pH = 9.00 – 10.00). Campuran alkali diekstrak melalui kaedah pemisahan cecair-cecair yang dijalankan menggunakan pelarut diklorometana. Larutan campuran diklorometana-ekstrak dipisahkan dan dikeringkan. Sebanyak 5 mL etanol tulen dan asik pikrik tepu ditambahkan ke dalam campuran ekstrak yang telah dikeringkan. Ekstrak mengandungi *dioscorine* ditapis menggunakan membran nitrat selulosa 0.22 µm sebelum analisis menggunakan LCMS-Q-ToF dan HPLC dijalankan.

### Analisis sebatian *dioscorine* menggunakan LCMS-Q-ToF dan HPLC

Penentuan *dioscorine* dalam lima sampel ubi ditentukan dengan menggunakan LCMS-Q-ToF (Agilent 1200 Infinity Series, 6540 UHD Accurate-Mass Q-ToF LC/MS) dan HPLC (Agilent chromatography 1200 Infinity Series). Pemisahan *dioscorine* adalah berdasarkan rujukan prosedur yang telah dibangunkan sebelum ini dengan sedikit pengubahsuaian. Penentuan sebatian *dioscorine* ditentukan berdasarkan data pustaka spektrometri jisim [Mass Hunter LCMS-Q-ToF (Metlin)]. Parameter pemisahan *dioscorine* dan sistem pelarut fasa cecair menggunakan LCMS-Q-ToF dan HPLC adalah seperti dalam *Jadual 2* dan *Jadual 3*. Nilai kandungan *dioscorine* ditentukan berdasarkan luas di bawah puncak (mAU\*s) sebatian tersebut.

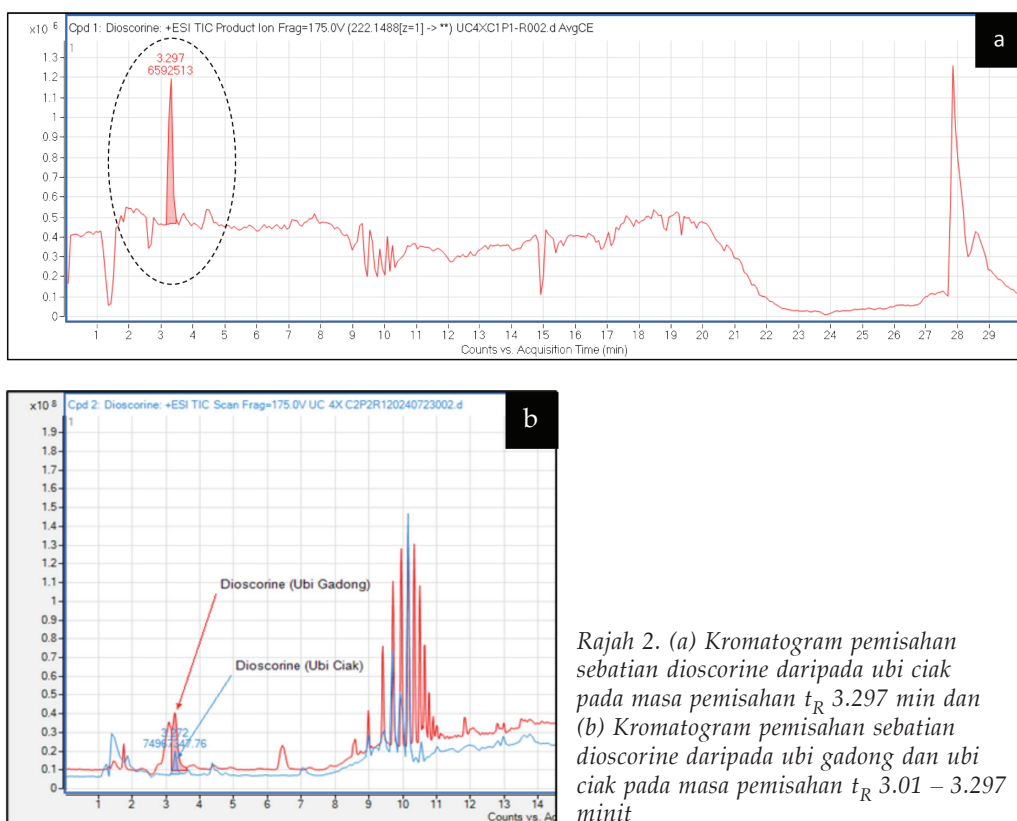
Jadual 2. Parameter bagi kaedah pemisahan dan pengenalpastian *dioscorine* menggunakan LCMS-Q-ToF dan HPLC

|                    |                                                                                |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Fasa cecair        | (A) 0.1% Asid formik dalam air<br>(B) 0.1% Asid formik dalam asetonitril (ACN) |
| Isi padu analisis  | 1.0 µl                                                                         |
| Kadar aliran       | 0.5 µl                                                                         |
| Suhu turus (kolum) | 40 °C                                                                          |
| Masa               | 20 minit                                                                       |
| Turus              | XBridge BEH C18 2.5 µm (3.0 × 150 mm)                                          |
| UV (DAD) - HPLC    | 204 nm                                                                         |

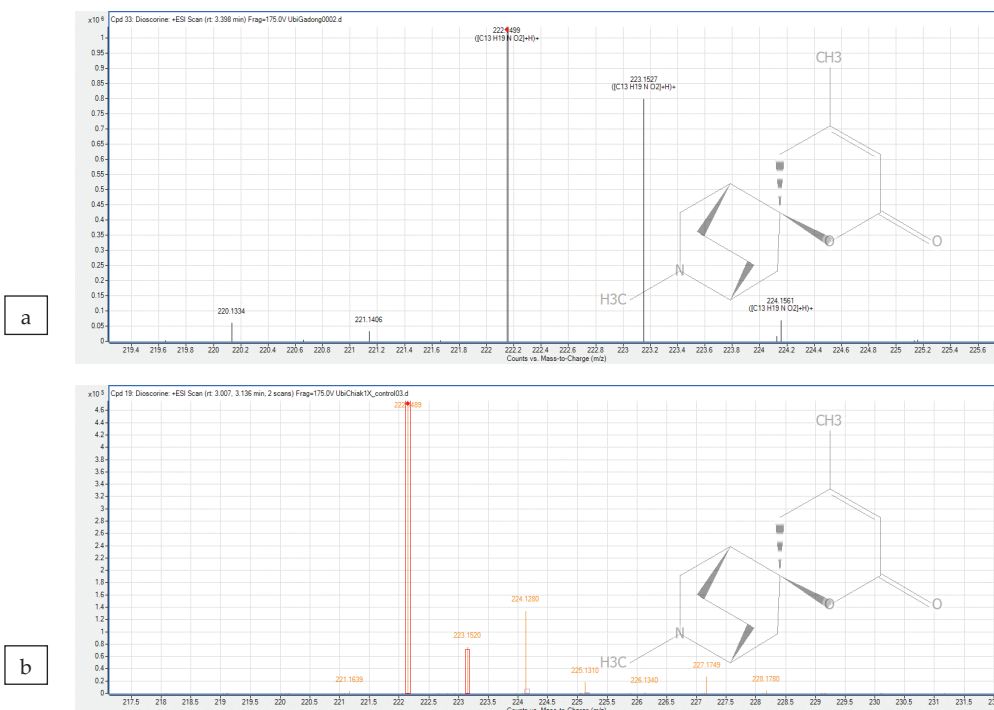
Jadual 3. Sistem pelarut fasa cecair bagi pemisahan *dioscorine* menggunakan LCMS-Q-ToF dan HPLC

| Masa (Min) | A (%) | B (%) |
|------------|-------|-------|
| 0          | 95    | 5     |
| 5          | 95    | 5     |
| 20         | 0     | 100   |
| 25         | 0     | 10    |
| 30         | 95    | 5     |

Rajah 2(a) menunjukkan kromatogram pemisahan daripada LCMS-Q-ToF bagi sebatian *dioscorine* yang dikenal pasti daripada ubi ciak. Manakala, Rajah 2(b) menunjukkan kromatogram pemisahan LCMS-Q-ToF bagi ubi gadong dan ubi ciak. Berdasarkan padanan daripada data pustaka *Mass Hunter Metlin*, masa pemisahan ( $t_R$ ) *dioscorine* daripada ubi gadong dan ubi ciak direkodkan pada 3.01 – 3.297 minit. Puncak pemisahan ubi gadong dan ubi ciak ditentusahkan dengan corak fragmen jisim berdasarkan data pustaka *Mass Hunter Metlin* LCMS-Q-ToF dengan berat jisim molekul daripada ubi gadong dan ubi ciak ialah  $m/z = 222.1499$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> dan  $m/z = 222.1489$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> (Rajah 3).



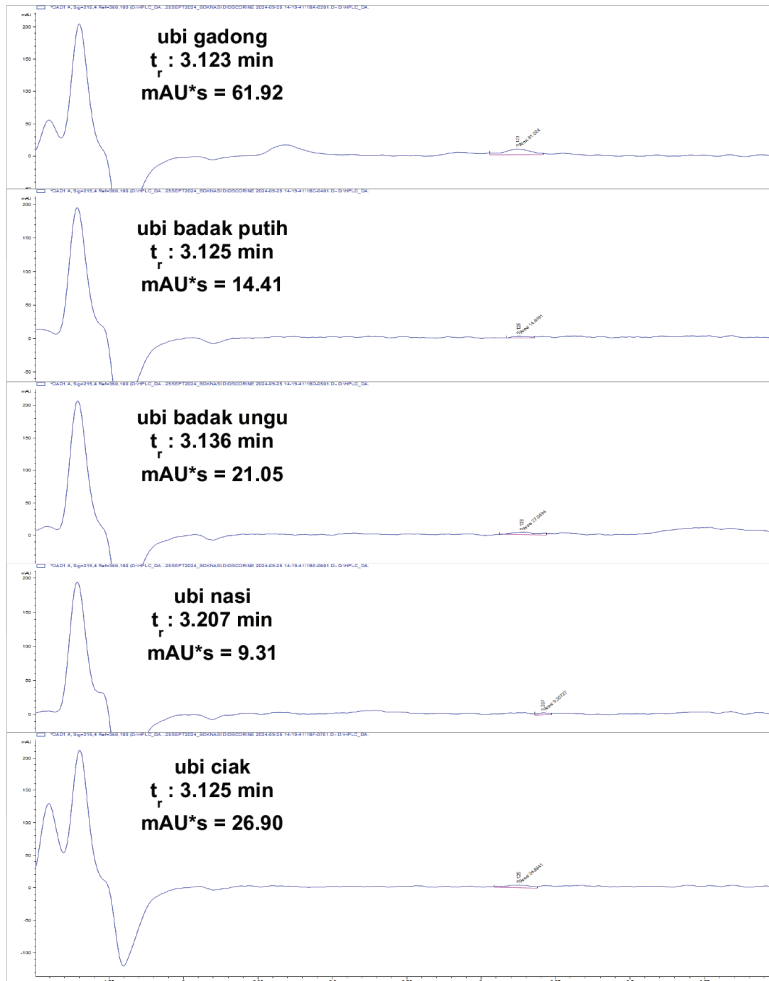
Rajah 2. (a) Kromatogram pemisahan sebatian *dioscorine* daripada ubi ciak pada masa pemisahan  $t_R$  3.297 min dan (b) Kromatogram pemisahan sebatian *dioscorine* daripada ubi gadong dan ubi ciak pada masa pemisahan  $t_R$  3.01 – 3.297 minit



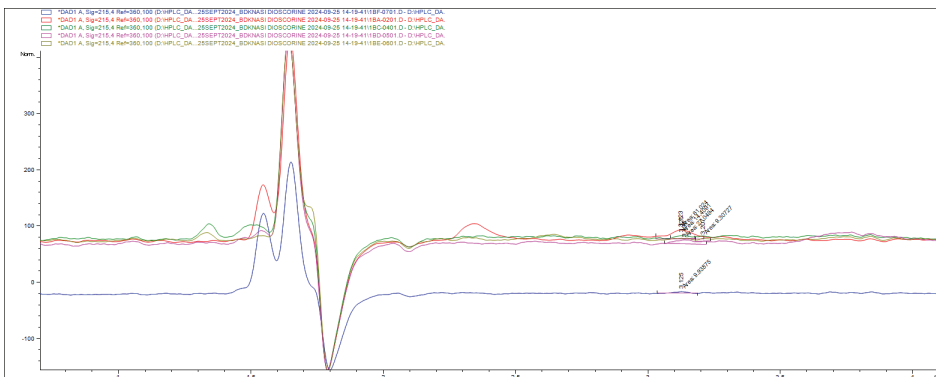
Rajah 3. Corak fragmen dioscorine daripada LCMS-Q-ToF daripada (a) ubi gadong dan (b) ubi ciak

Parameter pemisahan LCMS-Q-ToF (*Jadual 2* dan *Jadual 3*) yang diuji dan dibangunkan digunakan dalam pemisahan HPLC untuk lima sampel ubian tradisional lain. *Rajah 4(a)* dan *(b)* menunjukkan kromatografi pemisahan lima sampel ubian tradisional (ubi gadong, ubi ciak, ubi badak ungu, ubi badak putih dan ubi nasi). Nilai kandungan *dioscorine* ditentukan dengan berdasarkan luas di bawah puncak (mAU\*s).

Berdasarkan laporan terdahulu, tiada kajian penentuan *dioscorine* dijalankan menggunakan kaedah instrumentasi berteknologi tinggi seperti LCMS-Q-ToF. Satu kajian daripada Kamaruddin et al., pada tahun 2020 menggunakan LCMS-ESI bagi menentukan kandungan *dioscorine* daripada ubi gadong. Kajian tersebut mendapati *dioscorine* dalam ekstrak ubi gadong ditentukan pada masa pemisahan  $t_R$  1.648 – 1.718 minit. Ini sekali gus menunjukkan perbezaan masa pemisahan  $t_R$  *dioscorine* berbeza-beza bergantung kepada varieti, kaedah analisis, persekitaran, demografi penanaman dan lain-lain. *Jadual 4* menunjukkan pembangunan teknologi dalam penentuan *dioscorine* menggunakan LCMS dengan parameter yang berbeza.



(a) Kromatografi pemisahan lima sampel ubian tradisional menggunakan HPLC. Masa pemisahan  $t_r$  direkodkan pada 3.123 – 3.207 minit



(b) Pertindihan kromatografi pemisahan HPLC daripada lima ubian tradisional

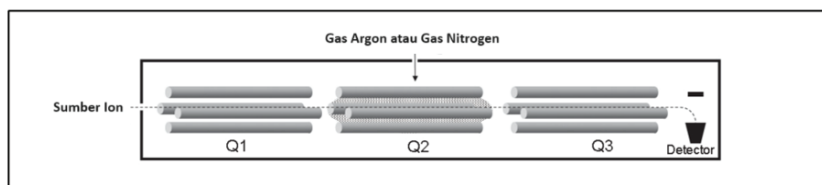
Rajah 4. Kromatografi pemisahan dioscorine daripada lima ubian tradisional



Jadual 4. Perbezaan penggunaan instrumentasi kromatografi dalam menentukan sebatian *dioscorine*

| Sampel kajian                                                           | Parameter LCMS                                                                                                                                                                                                                                          | Masa Pemisahan $t_R$ * (min) |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Ubi gadong                                                              | Sistem: LCMS-ESI-MS<br>Fasa cecair: A : Air, B : Asetonitril<br>Isi padu analisis: 1.0 $\mu$ l<br>Suhu Turus: 25 °C<br>Masa: 25 minit<br>Turus: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column<br>( <i>narrow-bore</i> 2.1 x 150 mm, saiz partikel 3.5 $\mu$ m ) | 1.64 – 1.71                  |
| Ubi gadong<br>Ubi badak ungu<br>Ubi badak putih<br>Ubi nasi<br>Ubi ciak | Sistem: LCMS-Q-ToF<br>Fasa cecair A): Air (0.1% Asid Formik)<br>(B): Asetonitril (0.1% Asid Formik)<br>Isi padu analisis: 1.0 $\mu$ l<br>Suhu Turus: 40 °C<br>Masa: 30 minit<br>Turus: XBridge BEH C18 2.5 $\mu$ m (3.0 mm x 150 mm)                    | 3.12 – 3.20                  |

Parameter LCMS yang berbeza akan memberikan bacaan masa pemisahan  $t_R$  yang berbeza. Penggunaan LCMS-Q-ToF adalah lebih efisien dalam menentukan jisim sesuatu molekul. Penganalisis kuadropol terdiri daripada satu set empat batang logam selari (*Gambar 1*). Penggunaan LCMS-Q-ToF dapat mengesan julat jisim molekul yang lebih besar dengan resolusi yang tinggi berbanding dengan LCMS-ESI-MS. Selain itu, sebatian tertentu boleh dikenal pasti dengan menggunakan sistem MS/MS yang terdapat di dalam LCMS-Q-ToF.



*Gambar 1. Spektrometer jisim kuadropol tiga. Q1 dan Q3 berfungsi sebagai penapis jisim dan boleh ditetapkan, diimbis atau dilangkah secara bebas. Q2 adalah sel perlanggaran yang mengandungi gas lengai bertekanan rendah*



## Kesimpulan

*Dioscorine* merupakan sebatian toksik daripada jenis kumpulan alkaloid yang didapati dalam pelbagai jenis ubian tradisional (*Dioscorea* spp.). Pengekstrakan *dioscorine* menggunakan kaedah asid-alkali telah dijalankan terhadap lima jenis ubian tradisional (ubi gadong, ubi badak putih, ubi badak ungu, ubi nasi dan ubi ciak). Penentuan dan pengenalpastian *dioscorine* telah dijalankan menggunakan kaedah instrumentasi kromatografi LCMS-Q-ToF dan HPLC dengan pembangunan parameter yang telah diubah suai. Masa pemisahan *dioscorine* daripada LCMS-Q-ToF dan HPLC direkodkan pada 3.01 – 3.29 minit dan 3.12 – 3.20 minit. Corak fragmen sebatian disahkan dengan padanan data pustaka LCMS-Q-ToF (Mass Hunter LCMS-Q-ToF (Metlin)). Parameter pemisahan *dioscorine* yang dibangunkan boleh dijadikan sebagai parameter khusus untuk pengenalpastian *dioscorine* daripada pelbagai jenis ubian tradisional.

## Bibliografi

- Broadbent, J. L., & Schnieden, H. (1958). A comparison of some pharmacological properties of dioscorine and dioscorine. *Brit. J. Pharmacol.*, 13, 213.
- Castillo, D. E., Fernig, D. G., Yates, E. A., & Payonga, A. P. (2021). A Review of the Distribution, Botany, Phytochemistry and biological activity of dioscorine from *Dioscorea hispida*. *Philippine Journal of Crop Science*, 46(2), 37–47.
- Estiasih, T., Ahmadi, K., Sari, I. N. I., Kuliahsari, D. E., & Martati, E. (2022). Traditional detoxification of wild yam (*Dioscorea hispida* Dennst) tuber in chips processing at East Java, Indonesia. *Journal of Ethnic Foods*, 9(1), 1–12.
- Kamaruddin, Z. H., Sapuan, S. M., Mohamed Yusoff, M. Z., & Jumaidin, R. (2020). Rapid detection and identification of dioscorine compounds in *Dioscorea hispida* tuber plants by LC-ESI-MS. *BioResources*, 15(3), 5999–6011.
- Lim, T. K. (2016). Edible medicinal and non-medicinal plants. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, 10, 1–659.
- Maneenoon, K., Sirirugsa, P., & Sridith, K. (2008). Ethnobotany of *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae), a major food plant of the sakai tribe at Banthad Range, Peninsular Thailand. *Ethnobotany Research and Applications*, 6, 385–393.
- Nashriyah, M., Salmah, T., NurAtiqah, M. Y., Siti Nor Indah, O., Muhamad Azhar, A. W., Munirah, S., & et al. (2012). Ethnobotany and distribution of *Dioscorea hispida* Dennst. (Dioscoreaceae) in Besut, Marang and Setiu Districts of Terengganu, Peninsular Malaysia. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 72(January), 240–243.
- Pitt, J. J. (2009). *Clin Biochem Rev.* Feb; (30) Pages 19–34. 30(February), 19–34.

Sasiwatpaisit, N., Thitikornpong, W., Palanuvej, C., & Ruangrungsi, N. (2014). Dioscorine content in *Dioscorea hispida* dried tubers in Thailand by TLC-densitometry and TLC image analysis. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4), 803–806.

### Ringkasan

Ubian tradisional (*Dioscorea* spp.) seperti ubi badak, ubi nasi, ubi gadong dan ubi nasi merupakan sumber makanan alternatif masyarakat di kawasan Pantai Timur (contoh Kelantan dan Terengganu) dan suku kaum orang asli di Malaysia. Ubian daripada genus *Dioscorea* jarang mendapat permintaan dan pendedahan disebabkan sifatnya yang beracun. *Dioscorine* merupakan sebatian alkaloid toksik ( $C_{13}H_{19}NO_2$ ) dan hanya dilaporkan didapati di dalam ubian tradisional (*Dioscorea* spp.). *Dioscorine* bersifat neurotoksin dan boleh mengganggu sistem saraf, memberikan kesan loya dan pening kepala kepada manusia jika toksik di dalam ubi tersebut tidak disingkirkan dengan cara yang betul. Pengeskrakan *dioscorine* telah dijalankan ke atas lima jenis ubian tradisional terpilih. Manakala, penentuan dan pengenalpastian sebatian tersebut dianalisis menggunakan LCMS-Q-ToF dan HPLC. Parameter analisis telah disahkan berdasarkan prosedur rujukan terdahulu dengan beberapa pengubahsuaian. Walaupun terdapat laporan bagi penentuan sebatian *dioscorine* sebelum ini, namun penggunaan instrumentasi terkini (LCMS-Q-ToF) lebih efisien dan tepat berdasarkan padanan dan corak fragmen berat jisim molekul dengan data pustaka, penggunaan amaun sampel yang sedikit sekali gus mengurangkan keperluan penyediaan sampel yang banyak. Diharapkan parameter yang dibangunkan ini dapat dijadikan sebagai parameter khusus dalam menentukan sebatian *dioscorine* dalam ubian tradisional pada masa hadapan.

### Summary

Wild yams (*Dioscorea* spp.) such as *ubi badak*, *ubi nasi*, *ubi gadong* and *ubi nasi* are alternative food sources for communities in the East Coast regions (e.g., Kelantan and Terengganu) and the indigenous tribes in Malaysia. Yams from the *Dioscorea* genus are rarely in demand and receive little exposure due to their toxic nature. Dioscorine is a toxic alkaloid compound ( $C_{13}H_{19}NO_2$ ) that has only been reported to be found in *Dioscorea* spp. Dioscorine acts as a neurotoxin and can disrupt the human nervous system, causing nausea and dizziness if the toxin in the yam is not fully removed. Dioscorine extraction was carried out using five selected types of wild yams. The determination and identification of this compound were analysed using LCMS-Q-ToF and HPLC. Analytical parameters were validated based on previous reference procedures with some modifications. Although there have been reports of dioscorine determination before, the use of modern instrumentation (LCMS-Q-ToF) is more efficient and accurate, based on mass fragment pattern matching with library data, requiring smaller sample amounts, thus reducing the need for large sample preparation. It is hoped that the parameters developed can serve as specific parameters for determining dioscorine in wild yams in the future.

**Pengarang**

Mohd Zulkhairi Azid  
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran  
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM  
43400 Serdang, Selangor  
E-mel: zulkhairi@mardi.gov.my

Razali Mirad, Mohd Norfaizal Ghazalli, Abdul Muhaimin Abdul Kadir, Siti Aisyah  
Mohd Noor, Saidatul Aqilah Mohamad Yusof, Nur Daliana Yusof dan Salmaniza  
Salleh  
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran  
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM  
43400 Serdang, Selangor