

UJI CEMARAN PADA EKSTRAK ETANOL TEMPE KORO BENGUK (*Mucuna pruriens* L.) SEBAGAI OBAT ANTIDIABETES TERSTANDAR

Devina Ingrid Anggraini^{1*} dan Eka Wisnu Kusuma²

¹Program Studi D3 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Nasional
Jl. Raya Solo-Baki Kwarasan, Grogol, Sukoharjo

²Program Studi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Nasional
Jl. Raya Solo-Baki Kwarasan, Grogol, Sukoharjo

*Email: devina.ia@gmail.com

Abstrak

Koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) merupakan tanaman lokal jenis polong-polongan yang mengandung senyawa bioaktif seperti triptamin, alkilamin, steroid, flavonoid, dan alkaloid. Tempe koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) dibuat dengan cara fermentasi untuk meningkatkan kemampuannya sebagai antioksidan sehingga dapat digunakan mencegah penyakit degeneratif seperti diabetes melitus. Penelitian ini dilakukan untuk meningkatkan kualitas tempe koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) menjadi bahan baku obat herbal antidiabetes yang memenuhi standar mutu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol tempe koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) berbentuk ekstrak kental, berwarna putih susu, bau khas menyengat, dengan rasa tawar. Uji kadar air dengan metode moisture balance sebesar 8,502%. Uji cemaran mikroba angka lempeng total (ALT) rata-rata adalah $7,10 \times 10^2$ cfu/ml, angka kapang khamir (AKK) diperoleh nilai rata-rata 1×10^1 cfu/ml, dan negatif mengandung bakteri coliform dan *Escherichia coli*. Hasil uji aflatoxin total sebesar 2,19 (≤ 20) $\mu\text{g/kg}$. Hasil analisis menggunakan spektrofotometri serapan atom menunjukkan bahwa cemaran Pb, Cd, As, dan Hg dibawah ambang batas. Standarisasi ekstrak etanol tempe koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) memenuhi parameter standar umum non spesifik ekstrak tumbuhan obat berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan RI No 55/Menkes/SK/I/2000 serta Peraturan Kepala BPOM RI No. 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional.

Kata Kunci : antidiabetes, tempe koro benguk (*Mucuna pruriens* L.), obat herbal terstandar (OHT), uji cemaran

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan kondisi hiperglikemia, defisiensi sekresi insulin, atau menurunnya kemampuan kerja insulin (Yekti, 2014). Adanya gangguan sekresi insulin dan resistensi insulin maupun keduanya merupakan penyebab hiperglikemia. Meningkatnya kadar gula darah dapat mengakibatkan rusaknya sel beta pankreas sehingga menimbulkan gejala metabolik penyebab diabetes melitus. Kerusakan dari sel beta pankreas menyebabkan tubuh tidak dapat menghasilkan insulin dan mengakibatkan suatu keadaan hiperglikemia (Suarsana, 2010). Kondisi ini jika berlangsung dalam waktu yang lama dapat menyebabkan stress oksidatif, kerusakan berbagai organ tubuh, terutama pada mata, ginjal, jantung, dan pembuluh darah lainnya (ADA, 2009). Diabetes melitus merupakan penyakit tidak menular, namun dari tahun ke tahun penyakit ini mengalami peningkatan yang cukup signifikan. Laporan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 menunjukkan bahwa prevalensi DM dari 1,1% di tahun 2007 meningkat menjadi 2,1% pada tahun 2013. Penyakit diabetes melitus dapat dicegah dengan konsumsi pangan fungsional yang diyakini memiliki senyawa-senyawa bioaktif yang memiliki fungsi fisiologis spesifik bagi kesehatan.

Beragam jenis tanaman kacang-kacangan yang ada di Indonesia dapat dimanfaatkan untuk pengobatan penyakit diabetes. Kacang koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) merupakan tanaman lokal yang kaya akan protein dan karbohidrat. Kandungan yang terdapat pada 100 g kacang koro benguk yaitu memiliki 343 kalori dan 24 g protein dalam bentuk kacang koro benguk yang belum diolah. Berdasarkan hasil penelitian Haryoto (2000), nilai gizi per 100 gram terutama proteinnya adalah sebesar 10,2 gram dalam bentuk tempe yang sudah mengalami tahap fermentasi. Selain memiliki kandungan gizi tersebut, kacang koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) juga mengandung senyawa bioaktif seperti triptamin, alkilamin, steroid, flavonoid, dan alkaloid. Senyawa tersebut bersifat fungsional karena dapat digunakan sebagai antioksidan (Istiani, 2010), antikolesterol

(Naufalina, dkk., 2014), antidiabetes (Uadia, 2003), dan lain-lain. Koro benguk juga memiliki antosianin yang merupakan salah satu senyawa flavonoid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Pramita, 2008). Kandungan antosianin itu dapat meningkat dengan adanya fermentasi, oleh karena itu pada penelitian ini kacang koro benguk difermentasi menjadi tempe (Juliana, dkk., 2017). Karakterisasi dalam penelitian ini dengan melihat standarisasi dari ekstrak tempe koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) menurut BPOM RI No.12 tahun 2014. Proses standarisasi merupakan suatu rangkaian yang melibatkan analisis secara kimia, analisis fisik, dan mikrobiologis, berdasarkan kriteria umum dari sisi toksikologi terhadap suatu ekstrak bahan alam untuk dijadikan *raw material*. Standarisasi terhadap ekstrak bahan alam ada dua parameter yaitu parameter non spesifik dan parameter spesifik.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas laboratorium yang umum digunakan, vortex, mikropipet, *rotary evaporator*, instrumen Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) merk Shimadzu 6650F, timbangan analitik merk Acis, furnace, oven, inkubator, autoklaf, High Performance Liquid Chromatography merk Shimadzu LC-10AD. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) yang diperoleh dari Desa Bendo kecamatan Pedan Kabupaten Klaten, akuades, NaCl, Air Suling Agar (ASA), Nutrient Agar (NA), Potato Dextrose Agar (PAD), media BPW (Buffer Pepton Water), media Lactose Broth Single Strength (LBS), media Lactose Broth Double Strength (LBD), media Brilliant Green Lactosa Bile Broth (BGLB), media MCB (Mac Conkey Broth). Untuk analisis cemaran logam diperlukan larutan standar Cd^{2+} 1000 ppm, larutan standar Pb^{2+} 1000 ppm, larutan standar As^{2+} 1000 ppm, larutan standar Hg^{2+} 1000 ppm, HNO_3 pekat, larutan $HClO_4$, aquabidest, HCl, larutan Na_2S , KI, larutan ditizon 0,005% b/v, NH_4OH , dan KCN.

Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan terhadap karakteristik dari ekstrak etanol tempe koro benguk (*Mucuna pruriens L.*). Karakteristik yang diamati berupa bentuk, rasa, bau, maupun warna dari ekstrak.

Uji Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode gravimetri dengan preparasi ekstrak kering tempe koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) kemudian dianalisis menggunakan *moisture analyzer*.

Uji Cemaran mikroba

Angka Lempeng Total

Perlakuan kontrol dengan cara memipet 1,0 ml NaCl 0,9% masukkan dalam petri steril tambahkan Nutrien Agar (NA), tunggu memadat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Persiapan sampel memakai 4 buah tabung atau lebih. Masing-masing tabung diisi dengan 9 ml pengencer NaCl 0,9%. Sebanyak satu gram sampel dimasukkan pada tabung pertama sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} kemudian dipipet sebanyak 1,0 mL kemudian dimasukkan dalam petri dan dipipet 1,0 mL lagi kemudian dimasukkan ke dalam tabung kedua sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan dibuat sampai pengenceran 10^{-4} . Dari masing-masing pengenceran dipipet 1,0 ml ke dalam cawan petri. Sebanyak 15 ml media NA cair dituangkan ke masing-masing cawan petri dan segera digoyang. Proses selanjutnya suspensi tersebut diputar membentuk angka delapan hingga rata. Setelah media cenderung menjadi padat, cawan petri yang telah preparasi diinkubasi pada suhu 35-37° C selama kurang lebih 24-48 jam dengan posisi terbalik. Jumlah koloni yang terbentuk dihitung dan diamati yang terjadi (Depkes RI, 2000).

Angka Kapang Khamir

Tiga buah tabung masing-masing diisi 9 ml ASA (Air Suling Agar). Dari hasil homogenisasi pada penyiapan ekstrak etanol tempe koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) dipipet 1,0 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung ASA pertama hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan dikocok sampai homogen. Perlakuan yang sama dilanjutkan untuk hingga pengenceran 10^{-4} . Masing-masing pengenceran dipipet 1,0 ml, dituangkan pada permukaan PDA (*Potato Dextrose Agar*),

segera digoyang sambil diputar agar suspensi terbesar rata dan dibuat duplo. Uji sterilitas media dan pengencer blangko dilakukan dengan cara menuangkan media ke dalam satu cawan petri dan tunggu hingga media menjadi padat. Media sebagai pengencer dituangkan ke cawan petri lainnya dan dibiarkan memadat juga. Semua cawan petri yang telah dipreparasi diinkubasi pada suhu antara 20-25°C selama kurang lebih 5-7 hari. Setelah waktu inkubasi tercapai, banyaknya koloni jamur yang terbentuk diamati dan dicatat. Hasil yang terakhir diamati yaitu setelah masa inkubasi 7 hari. Koloni yang terbentuk dibedakan karena bentuknya hampir menyerupai bakteri. Lempeng yang diamati adalah lempeng yang terdapat kira-kira 40-60 koloni jamur (Depkes RI, 2000).

Uji Mikroba Patogen

a) Uji nilai duga terdekat/ *most probable number (MPN) Coliform*:

(1) Pemeriksaan Pendahuluan (*presumptive tes*) :

Satu gram ekstrak etanol koro benguk (*Mucuna pruriens*) disiapkan pada 7 tabung reaksi dan dilarutkan dalam media BPW sebanyak 9 ml, homogenkan. Diinokulasikan 10 ml hasil homogenisasi dari ekstrak etanol tempe koro benguk (*Mucuna pruriens*) pada 5 tabung LBD (10ml) dan 2 tabung LBS (1ml dan 0,1ml) kemudian diinkubasi di suhu 37^o C selama 24 jam.

(2) *Confirm Tes* :

Uji confirm tes dilakukan jika uji tahap *presumptive tes* positif. Dari hasil yang positif, diambil 1-2 ose sampel lalu dimasukkan dalam tabung yang berisi BGLB dan diinkubasi pada suhu 37^o. Pembacaan dilakukan setelah 24-48 jam.

(3) *Pemeriksaan Penegasan* :

Hasil positif dari media BGLB pada uji confirm tes diinokulasikan ke media MC dengan cara teknik goresan.

Uji *Escherichia coli*

Biakan positif digunakan pada uji *MPN Coliform*. Masing-masing biakan diambil 1,0 ml selanjutnya diinokulasikan ke dalam MBC (*Mac Conkey Broth*). Suhu 37°C digunakan sebagai suhu inkubasi dan menggunakan waktu selama 24-48 jam. Fekal *Coliform* positif ditunjukkan dari timbulnya gas dalam tabung Durham, selanjutnya biakan tersebut digoreskan pada media BGLB (*Briliant Green Lactose Bile Broth*), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang dipilih adalah koloni hijau dengan kilap logam dan bintik biru kehijauan di tengahnya dari BGLB, digoreskan pada NA (*Nutrien Agar*) miring dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram. *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif bentuk batang agak membulat (Depkes RI, 2000).

Uji aflatoxin total

Kultur *Aspergillus flavus* hasil dari ekstrak etanol tempe koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) diinokulasikan pada permukaan media YES. Proses tersebut berlangsung pada suhu kamar atau kurang lebih 25°C selama satu minggu dalam posisi miring. Hal tersebut dilakukan untuk mendapatkan permukaan yang luas. Biakan yang telah dipreparasi diautoklav menggunakan suhu 121°C selama kurang lebih 15 menit, lalu dibiarkan hingga dingin. Media biakan diambil sedikit menggunakan pipet pasteur lalu masukkan ke dalam tabung reaksi kecil. Biakan dan baku aflatoxin dianalisis menggunakan HPLC Kolom C18, dengan panjang gelombang maksimum 365 nm, panjang gelombang emisi 450 nm. Fase gerak yang digunakan adalah campuran Aquabidest : Asetonitril : Metanol dengan perbandingan 600:100:300 (Depkes RI, 2000).

Uji cemaran logam berat

Preparasi sampel

Uji cemaran logam berat ditetapkan secara spektroskopi serapan atom. Preparasi sampel dengan menggunakan metode destruksi basah menggunakan campuran asam HNO₃ pekat dan HClO₄. Sampel sebanyak 1,0 gram dimasukkan dalam cawan porselen selanjutnya didestruksi dengan 15 ml HNO₃ pekat dan dipanaskan pada suhu ± 100°C. Setelah itu larutan ditambahkan dengan HClO₄ sebanyak 5 ml sedikit demi sedikit sambil dilakukan pemanasan pada suhu ± 100°C. Proses destruksi dihentikan sampai larutan jernih, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan

diencerkan dengan aquabidest sampai tanda batas. Ukur serapan sampel menggunakan alat Spektrofometer Serapan Atom (SSA) (Yatimah, 2014).

Analisis Data

Data hasil standarisasi ekstrak etanol tempe koro benguk dianalisis berdasarkan Peraturan Kepala BPOM RI No. 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional dan parameter standar umum non spesifik ekstrak tumbuhan obat berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan RI No: 55/Menkes/SK/I/2000.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) telah dimanfaatkan oleh sebagian penduduk di pulau Jawa khususnya Jawa Tengah dan Jawa Barat. Koro benguk juga memiliki antosianin yang merupakan salah satu senyawa flavonoid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Pramita, 2008). Kandungan antosianin itu dapat meningkat dengan adanya fermentasi (Juliana, dkk., 2017), oleh karena itu pada penelitian ini kacang koro benguk difermentasi menjadi tempe. Tempe koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) merupakan tempe yang terbuat dari kacang koro benguk yang difermentasi. Senyawa antioksidan yang terdapat dalam tempe koro benguk sudah terlepas dari senyawa gula melalui proses hidrolisis pada ikatan-o-glikosidik sehingga meningkatkan aktivitas antioksidan. Kandungan protein dan lemak dari biji koro benguk lebih rendah tetapi karbohidrat dan seratnya lebih besar sehingga berpotensi dalam penanggulangan penyakit degeneratif, seperti diabetes mellitus.

Tempe koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) merupakan salah satu kacang-kacangan sebagai sumber protein nabati murah bagi penduduk. Dalam tempe koro benguk mengandung zat besi yang berguna untuk mencegah anemia, asam fitat, tanin, karbohidrat, polifenol, dan protein yang cukup tinggi (Handajani, dkk., 2008). Kandungan protein dan lemak biji koro benguk lebih rendah tetapi karbohidrat dan seratnya lebih besar sehingga berpotensi dalam penanggulangan penyakit degeneratif. Asam fitat dalam koro benguk bersifat stabil. Keberadaan asam tersebut dapat berpotensi sebagai *chelating agent* karena memiliki ion hidroksil yang mampu menarik ion besi membentuk ikatan kompleks. Pengikat logam (chelator) dalam senyawa kompleks dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sekunder karena adanya proses oksidasi yang distabilkan oleh ion logam (Pramita, 2008). Dengan demikian maka asam fitat dapat dikatakan sebagai memiliki efek antioksidan. Kemampuan asam fitat mengikat beberapa mineral, kemungkinan dapat mengurangi stres oksidatif sehingga efek negatif dalam tubuh dapat dihindarkan. Efek kompleks dari asam fitat mampu mengurangi, atau bahkan menghilangkan beberapa kanker dengan menghilangkan mineral (khususnya Fe). (Pramita, dkk., 2008).

Karakterisasi dalam penelitian ini dengan melihat standarisasi bahan menurut BPOM RI No.12 tahun 2014. Standarisasi merupakan rangkaian proses yang melibatkan berbagai metode analisis kimiawi berdasarkan data farmakologis, melibatkan analisis fisik dan mikrobiologis, berdasarkan kriteria umum keamanan (toksikologi) terhadap suatu ekstrak bahan alam. Standarisasi terhadap ekstrak bahan alam ada dua parameter yaitu parameter non spesifik dan parameter spesifik.

1. Pembuatan Ekstrak Etanol Tempe Koro Benguk

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tempe koro benguk dari daerah Cawas Kabupaten Klaten. Pengelolaan bahan mencakup sortasi basah, pencucian, pengecilan ukuran, pengeringan dan sortasi kering. Setelah tahap sortasi kering simplisia diblender hingga terbentuk serbuk dan diayak dengan ayakan mesh 40 agar ukuran dari simplisia seragam, kemudian disimpan dalam tempat kering dan tertutup. Pembuatan ekstrak etanol tempe koro benguk dilakukan dengan metode maserasi dengan cara sebagai berikut, sebanyak 100 gram simplisia diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 x 24 jam pada suhu kamar. Serbuk tempe koro benguk yang telah ditimbang, dimasukkan ke dalam maserator kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 : 7,5 dan ditutup lalu dibiarkan selama 3 hari pada tempat yang terlindung dari cahaya matahari sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari, ekstrak cair disaring. Filtrat dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1: 2,5. Hasil maserasi kemudian disaring dan dipindahkan ke dalam suatu bejana tertutup. Ekstrak yang didapat kemudian diuapkan dengan

rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Etanol dengan kadar yang lebih tinggi dapat mengekstrak senyawa-senyawa bioaktif dari tempe koro bengkuk lebih banyak dibandingkan dengan etanol dengan kadar yang lebih rendah.

Proses ekstraksi ini menggunakan teknik maserasi. Maserasi merupakan teknik penyarian zat aktif tanpa menggunakan pemanasan menggunakan pelarut polar atau non polar selama periode waktu tertentu (Depkes, 1995). Penyari yang digunakan dalam pembuatan ekstrak ini adalah etanol 70%. Pemilihan etanol 70% ini dikarenakan solven ini memiliki kemampuan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar, sehingga dapat menembus membran sel lalu dapat masuk ke dalam sel dan menarik metabolit yang terdapat dalam sel. Senyawa-senyawa yang bersifat cenderung polar yang dapat terlarut dalam etanol 70% diantaranya fenolik, flavanoid, alkaloid, terpenoid, dan steroid.

2. Standarisasi Ekstrak etanol tempe koro bengkuk

Standarisasi ekstrak etanol tempe koro bengkuk yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi uji organoleptis, uji kadar air, uji cemaran mikroba, uji aflatoxin total, dan uji cemaran logam berat. Analisis data dilakukan berdasarkan parameter standar ekstrak tumbuhan obat berdasarkan Kepmenkes RI No 55/Menkes/SK/I/2000 dan Peraturan Kepala BPOM RI Nomor 12 tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional. Hasil uji yang telah dilakukan sebagai berikut:

a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik merupakan uji pengenalan secara fisik ekstrak dengan menggunakan panca indera dalam mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000). Ekstrak etanol tempe koro bengkuk secara organoleptik adalah ekstrak kental, berwarna putih susu, bau khas menyengat, dengan rasa tawar.

b. Uji Kadar air

Uji kadar air dengan metode *moisture analyzer* bertujuan untuk mengetahui kandungan air yang terkandung pada ekstrak. Kandungan air dalam suatu sediaan obat tidak boleh berlebihan, yaitu kurang dari 10%. Jika suatu bahan/ sediaan obat tradisional memiliki kadar air lebih dari 10%, maka akan mempengaruhi kualitas bahan, mempercepat pertumbuhan jamur dan dapat terjadinya hidrolisis terhadap kandungan kimianya. Prinsip dari penentuan kadar air yaitu memanaskan analit cukup sehingga bahan akan melepaskan kelembaban tanpa terbakar.

Tabel 1. Hasil pengujian kadar air

Pengulangan	Persentase Kadar Air (%)	Referensi MMI
I	8,696	
II	8,350	
III	8,460	
Rata-rata (%)	8,502	Tidak lebih dari 10%

Kadar air yang didapatkan kurang dari 10% sehingga diharapkan kestabilan optimum dari bahan akan dapat tercapai, pertumbuhan mikroba dapat dikurangi, dan proses ekstraksi berjalan dengan lancar. Proses hidrolisa dari zat kimia yang terkandung didalamnya sehingga dapat mengakibatkan penurunan mutu dari obat tradisional juga dapat dihindari. Berdasarkan data diatas berarti memenuhi syarat sehingga bisa memenuhi standarisasi obat herbal terstandar.

c. Uji cemaran mikroba

Uji cemaran mikroba bertujuan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba patogen dan tidak mengandung mikroba non patogen melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh dan berbahaya (toksik) bagi kesehatan (Depkes RI, 2000).

Uji Angka Lempeng Total

Angka Lempeng Total (ALT) merupakan salah satu parameter keamanan obat yang perlu diujikan. ALT dapat digunakan sebagai petunjuk keamanan suatu ekstrak dapat digunakan sebagai obat herbal. Uji ALT digunakan untuk menghitung angka cemaran bakteri aerob mesofil yang tumbuh dan berkembang pada sampel, juga sebagai standar untuk menentukan kualitas dan keamanan ekstrak (Tivani, 2018). Sampel yang digunakan pada percobaan ini dibuat dalam

berbagai tingkat pengenceran yaitu tujuan untuk mengetahui jumlah koloni dari tiap pengenceran. Dalam penelitian ini didapatkan hasil yang berbeda-beda dari tiap-tiap cawan petri dengan berbagai pengenceran namun dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi tingkat pengenceran yang dilakukan maka semakin sedikit mikroba yang tumbuh dalam media. Pengenceran lalu dihomogenkan berfungsi untuk mengurangi jumlah mikroba dan selanjutnya dapat memisahkan sel-sel mikroba yang bergabung. Tahap ini dilakukan untuk memperkecil jumlah mikroba yang tersuspensi sehingga perhitungan jumlah mikroba dapat dilakukan dalam satuan *Colony Forming Units* (cfu) (Lay, 1994).

Hasil pengujian menunjukkan angka lempeng total rata-rata adalah $7,10 \times 10^2$ cfu/ml. Hasil yang didapat memenuhi persyaratan yaitu $\leq 10^4$ cfu/ml, yang mengacu pada Peraturan Kepala BPOM Nomor 12 Tahun 2014 Tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional.

Uji Angka Kapang Khamir (AKK)

Uji angka kapang khamir merupakan perhitungan jumlah koloni kapang dan khamir yang tumbuh dari cuplikan mikroba setelah diinokulasikan pada media yang sesuai setelah masa inkubasi. Metode yang digunakan untuk uji AAK adalah *total plate count* (TPC). Metode ini merupakan analisis dari koloni kapang dan khamir menggunakan prinsip pengenceran dan metode cara tuang (*pour plate*). Angka kapang khamir yang semakin kecil menunjukkan bahwa maka setiap produk yang diproduksi semakin baik (Wasito, 2011). Pertumbuhan kapang atau khamir pada bahan baku obat tradisional dapat mengurangi kualitas obat tradisional karena kapang membentuk mikotoksin yang telah dikenal sebagai penyebab keracunan akut maupun kronis (Dewi, 2016). Sedangkan khamir dapat menyebabkan penyakit mikosis. Tujuan uji ini adalah untuk memberikan jaminan bahwa sediaan simplisia tidak mengandung cemaran yang dapat memberikan dampak buruk bagi kesehatan.

Hasil uji AKK pada tersebut diperoleh nilai rata-rata 1×10^1 cfu/ml, sedangkan syarat menurut BPOM No.12 Tahun 2014 $\leq 10^3$ cfu/ml, dengan demikian ekstrak yang dibuat memenuhi syarat, namun jika ekstrak akan digunakan untuk bahan obat luka maka belum memenuhi syarat karena untuk obat luka angka kapang/kamir harus negatif/gram.

Uji mikroba patogen

Uji mikroba patogen terhadap ekstrak etanol tempe koro benguk yang dihasilkan meliputi uji MPN Coliform yang dilanjutkan dengan uji mikroba *Escherichia coli*.

1. Uji mpn coliform

Bakteri *coliform* adalah bakteri indikator keberadaan bakteri patogenik. Penentuan MPN *coliform* menjadi indikator pencemaran dikarenakan jumlah koloninya pasti berkorelasi positif dengan keberadaan bakteri patogen. Semakin kecil jumlah *coliform* terdeteksi membuktikan kualitas sampel uji semakin baik. Uji positif akan menghasilkan angka indeks disesuaikan dengan tabel MPN untuk menentukan jumlah *coliform* dalam sampel (Jiwintarum, 2017). MPN terdiri dari tiga tahap, yaitu uji pendahuluan, uji penegasan, dan uji pelengkap.

Uji ini dilakukan dengan menggunakan media BGLB (*Brilliant Green Lactose Bile Broth*). Media BGLB mengandung garam *ox bile* yang berfungsi sebagai inhibitor yaitu mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif sehingga yang dapat tumbuh pada media ini adalah bakteri gram negatif yang mampu memfermentasikan laktosa dan membentuk gas termasuk bakteri *coliform*. Tahap ini dilakukan inokulasi sampel sebanyak 1 ohse dari media LBD dan LBS dengan gas atau kekeruhan positif ke dalam media BGLB yang berisi tabung durham dengan posisi terbalik secara aseptis. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C karena bakteri *coliform* memiliki suhu optimum sebesar $30-37^\circ\text{C}$ selama 2 kali 24 jam agar bakteri dapat tumbuh secara maksimal dalam media. Hasil uji dinyatakan positif jika didalam tabung durham terbentuk gas dan media berubah menjadi keruh, sebaliknya jika tidak terbentuk gas dan media tetap jernih maka hasilnya dikatakan negatif.

Tabel 2. Hasil Uji Penegasan Media BGLB

Media	Replikasi I Gas (+/-) Kekeruhan	Replikasi II Gas (+/-) Kekeruhan	Replikasi III Gas (+/-) Kekeruhan
BGLB	-	-	-
BGLB	-	-	-
BGLB	-	-	-
BGLB	-	-	-
BGLB	-	-	-
BGLB	-	-	-
BGLB	-	-	-

Keterangan : (+) = menunjukkan hasil positif (media keruh/ timbul gas/ media keruh dan timbul gas)

(-) = menunjukkan hasil positif (media jernih/ tidak timbul gas/ media jernih dan tidak timbul gas)

Kadar bakteri *coliform* maksimum yang ditetapkan Keputusan Menteri Kesehatan RI No. 55/Menkes/SK/I/2000 dan Peraturan Kepala BPOM RI No. 12 Tahun 2014 tentang persyaratan obat tradisional dengan sediaan berbentuk ekstrak adalah 0 APM/ml sampel. Berdasarkan persyaratan obat tradisional dengan bentuk sediaan ekstrak menyatakan bahwa ekstrak etanol tempe koro bengkuk memenuhi persyaratan nilai MPN, dan aman menurut aspek mikrobiologis

Uji lain dilakukan dengan penanaman pada media BHI (*Brain Heart Infussion*) dilakukan dengan cara mengambil 1 ohse dari media BGLB dengan gas positif ke dalam media BHI. Penginokulasian menggunakan media penyubur BHI (*Brain Heart Infussion*) karena media BHI merupakan media penyubur bakteri gram negatif. Selain itu apabila tidak dilakukan tidak dilakukan penanaman pada media penyubur terlebih dahulu, kemungkinan yang akan tumbuh dan berkembang adalah semua jenis bakteri. Setelah dibiakkan di media penyubur, masuk ke tahap selanjutnya ke media selektif yaitu media MC (*Mac Conkey*). Media MC merupakan media selektif karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Hasil yang didapat pada penelitian yang telah dilakukan penanaman dalam media penyubur dan media selektif yang menunjukkan sampel ekstrak etanol tempe koro bengkuk tidak ditumbuhi koloni bakteri menandakan sampel negatif mengandung bakteri *coliform* menurut Nilai MPN *Coliform*.

2. Identifikasi Bakteri Patogen pada Sampel

Identifikasi bakteri patogen pada sampel meliputi pemeriksaan morfologi atau karakterisasi, pewarnaan gram, dan uji biokimia. Pada tahap ini juga dilakukan perlakuan pada kontrol dengan menggunakan biakan murni *Escherichia coli*, dengan tujuan sebagai pembanding hasil pada sampel.

Kontrol dibuat dengan melarutkan biakan murni berbentuk padat dari media KIA (*Kliger Iron Agar*) yang sudah tersedia ke dalam NaCl 0,9% steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan dilarutkan dalam NaCl 0,9% steril adalah sebagai pengecer agar biakan yang akan ditanamkan pada media BHI tidak terlalu pekat. Sampel ekstrak etanol tempe koro bengkuk yang telah dipreparasi selanjutnya dilanjutkan dengan identifikasi keberadaan bakteri patogen pada sampel tersebut. Sampel ditimbang sebanyak 1 gram untuk diencerkan menggunakan *Buffer Pepton Water* dengan perbandingan 1 : 9. Tujuan pengenceran agar ekstrak etanol tempe koro bengkuk mampu melarut sempurna dan dapat homogen dengan pH normal. Penanaman pada media BHI (*Brain Heart Infussion*) dan KPD (*Kaldu Pepton Darah*) dilakukan dengan cara mengambil masing-masing 1 ohse dari biakan ekstrak etanol tempe koro bengkuk ke dalam media penyubur yakni BHI dan KPD. Tahap selanjutnya hasil penanaman media penyubur dibiakkan ke media selektif yaitu media MC (*Mac Conkey*) dan BAP (*Blood Agar Plate*) baik biakan kontrol dan sampel dengan tujuan memastikan dan mengidentifikasi bakteri yang tumbuh di media penyubur. Media selektif merupakan media yang memperlihatkan karakterisasi morfologi dari biakan hasil inokulasi media penyubur.

Tabel 3. Karakter morfologi bakteri pada media selektif

Morfologi Koloni	<i>Escherichia coli</i>
Bentuk	Bulat
Ukuran	Kecil
Tepian	Licin
Elevasi	Datar
Warna Media	Pink
Warna koloni	Merah
Inti	Tidak ada
Ciri khas	Koloni merah fanta

Media selektif milik sampel menunjukkan hasil negatif mengandung bakteri patogen yang tercantum pada tabel 3, karena tidak memiliki kesamaan morfologi dengan bakteri patogen tersebut bahkan tidak terdapat pertumbuhan koloni terpisah. Media selektif yang telah diinokulasi dengan kontrol dan biakan sampel perlu dilakukan pemastian di tahap selanjutnya. Pengecatan gram hanya dilakukan dari media MC kontrol yang diduga ditumbuhi bakteri patogen.

Tabel 4. pengecatan gram bakteri patogen

Hasil Pengecatan	<i>Eschersia coli</i>
Bentuk Warna	Batang Merah
Susunan	Menyebar
Cat	Gram
Sifat Bakteri	Gram (-)
Latar Belakang	Putih
Perbesaran	Ob : 100x, Ok: 10x

Hasil pengecatan gram memperlihatkan bahwa koloni yang tumbuh di media MC kontrol memiliki bentuk batang, susunan tunggal, berwarna merah, dan bersifat gram negatif (bakteri berwarna merah) pada bakteri *Escherichia coli*. Bakteri patogen tersebut memiliki komposisi dinding sel yang sebagian besar tersusun dari lebih sedikit lapisan *peptidoglikan* dan lapisan lipid yang mudah rusak saat dicuci dengan alkohol, sehingga pada saat pewarnaan kurang dapat mempertahankan zat warna *gentian violet* dan saat diwarnai *safranin* akan berwarna merah (Pelczar, 2008).

Uji biokimia dan uji pelengkap identifikasi bakteri patogen pada sampel memiliki tujuan untuk memastikan ada atau tidaknya bakteri pada sampel. Hasil uji biokimia menunjukkan reaksi kimia. Reaksi-reaksi kimia yang terjadi menyebabkan perubahan warna media dan tingkat pH media yang ditumbuhi koloni bakteri.

Uji mikroba patogen terhadap ekstrak etanol tempe koro bengkuk yang dihasilkan menunjukkan hasil telah memenuhi persyaratan uji mikroba patogen yang ditetapkan oleh Kepmenkes RI No: 55/Menkes/SK/I/2000 dan Peraturan Kepala BPOM RI Nomor 12 tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional yaitu negatif terhadap keberadaan mikroba patogen. Hasil uji mikroba patogen dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Uji mikroba patogen ekstrak etanol tempe koro bengkuk

Jenis Uji Mikroba Patogen	Hasil	Persyaratan
MPN	0 koloni/g	0 koloni/g
<i>Escherichia coli</i>	Negatif/g	Negatif/g

Uji aflatoxin

Aflatoxin merupakan metabolit sekunder yang terbentuk setelah fase logaritma pertumbuhan *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* (Tandiabang, J., 2011). *Aspergillus flavus* mampu bertahan hidup setelah 15 hari masa inkubasi (Lunggani, A.T, 2007). Aflatoxin memerlukan pH 5.5 – 7.0 dan proses pembentukan ini dipengaruhi oleh faktor genetik *Aspergillus flavus* dan lamanya kontak dengan substrat.

Aflatoxin mempunyai hubungan yang erat dengan kegagalan pertumbuhan pada bayi dan anak khususnya di negara berkembang meskipun mekanisme yang dapat mengakibatkan gangguan pertumbuhan belum diketahui; namun, salah satu penjelasan yang mungkin dapat diubah integritas usus melalui toksisitas sel atau immunomodulator. Hasil penelitian menunjukkan bahwa anak yang terpapar aflatoxin selama 8 bulan akan menurunkan rata-rata 1.7 cm pertumbuhan. Semakin tinggi aflatoxin yang masuk ke dalam tubuh maka aflatoxin dapat terdeteksi melalui air liur (sIgA) (Khlanguiswet, dkk., 2011)

Tabel 6. Hasil pengujian aflatoxin

No	Parameter uji	Hasil	Persyaratan	Satuan
1	B1	1,79	≤ 5	$\mu\text{g}/\text{kg}$
2	B2	$<0,19$		$\mu\text{g}/\text{kg}$
3	G1	0,40		$\mu\text{g}/\text{kg}$
4	G2	$<0,19$		$\mu\text{g}/\text{kg}$
	Total	2,19	≤ 20	$\mu\text{g}/\text{kg}$

Hasil uji aflatoxin memenuhi parameter standar umum non spesifik ekstrak tumbuhan obat berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan RI No: 55/Menkes/SK/I/2000 dan Peraturan Kepala BPOM RI No. 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional, dimana hasil uji aflatoxin dari sampel ekstrak etanol tempe koro benguk semua memenuhi persyaratan.

Uji cemaran logam berat

Preparasi sampel dilakukan dengan menggunakan metode destruksi. Destruksi merupakan suatu perlakuan untuk memecah senyawa menjadi unsur-unsurnya sehingga dapat dianalisis. Metode destruksi juga dapat disebut sebagai perombakan senyawa-senyawa organik logam menjadi senyawa logam anorganik. Agar saat analisis tidak terjadi interferensi, maka unsur-unsur pengganggu harus dihilangkan, sehingga dari proses destruksi tersebut diharapkan yang tertinggal hanya logam (Dewi, 2012). Destruksi yang digunakan yaitu destruksi basah dengan bantuan asam pekat dan panas sehingga diharapkan dapat menguraikan bahan organik dalam sampel dan hanya tertinggal logam yang siap dianalisis. Proses destruksi basah pada penelitian ini dilakukan dengan penambahan HNO_3 pekat lalu panaskan pada suhu $\pm 100^\circ\text{C}$. Penambahan HNO_3 pekat digunakan untuk memecah sampel organologam menjadi senyawa logam, sedangkan pemanasan pada suhu $\pm 100^\circ\text{C}$ pada proses ini digunakan sebagai katalis dalam memutus ikatan organologam tersebut. Pada proses ini akan menimbulkan gas berwarna kecoklatan yang menandakan bahwa bahan organik telah terurai oleh HNO_3 dan menghasilkan gas NO_2 yang merupakan produk samping dari destruksi.

Setelah proses destruksi sempurna, larutan didinginkan. Larutan hasil destruksi yang telah dingin, selanjutnya disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam botol flakon dan selanjutnya filtrat diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

Tabel 7. Hasil uji cemaran logam berat

No	Logam Berat	Hasil	Persyaratan	Satuan
1	Timbal(Pb)	$<0,165$	≤ 10	$\text{mg}/\text{kg}/\text{ppm}$
2	Kadmium(Cd)	$<0,159$	$\leq 0,3$	$\text{mg}/\text{kg}/\text{ppm}$
3	Arsen(As)	$<0,0200$	≤ 5	$\text{mg}/\text{kg}/\text{ppm}$
4	Air raksa(Hg)	$<0,0217$	$\leq 0,5$	$\text{mg}/\text{kg}/\text{ppm}$

Kadar beberapa logam berat yang didapatkan memenuhi parameter standar umum non spesifik ekstrak tumbuhan obat berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan RI No: 55/Menkes/SK/I/2000 dan Peraturan Kepala BPOM RI No. 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional, dimana hasil uji cemaran logam berat dari sampel ekstrak etanol tempe koro benguk semua memenuhi syarat.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol tempe koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) memenuhi parameter standar umum non spesifik ekstrak tumbuhan obat berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan RI No: 55/Menkes/SK/I/2000 dan Peraturan Kepala BPOM RI No. 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional.

DAFTAR PUSTAKA

- American Diabetes Association. (2009). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 32, (Suppl 1): S62-S67.
- Amir, Suci M. J., Herlina Wungouw, dan Damajanty Pangemanan. (2015). Kadar Glukosa Darah Sewaktu pada Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2 di Puskesmas Bahu Kota Manado. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. 3. (1) Januari-April.
- BPOM RI. (2014). *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional*. Jakarta : BPOM RI. hal. 1-25.
- Damanik, D. D. (2015). Penetapan Kadar Air Pada Sediaan Pada Jamu Pil Secara Destilasi Azeotrop. *Tugas Akhir*. Medan : Program Studi DIII Farmasi dan Makanan Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara
- Depkes RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI
- Dewi, D. C. (2012). Determinasi Kadar Logam Timbal (Pb) Dalam Makanan Kaleng Menggunakan Destruksi Basah Dan Destruksi Kering. *Alchemy*. 2(1): 12-25.
- Dewi, Meylisa Mutiara. (2016). Uji Angka kapang/Khamir (AKK) dan Uji Angka Lempeng Total (ALT) pada Jamu Gendong Temulawak di Pasar Tarumanegara Magelang. *Skripsi*. Yogyakarta : Jurusan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma
- Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). (2013). Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementrian Kesehatan RI www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf.
- Handajani, Sri., Dian R.A dan Pramita D.S. 2008. Studi Pendahuluan Karakteristik Kimia (HCN, Antioksidan dan Asam Fitat) Beberapa Jenis Koro Lokal dengan Berbagai Perlakuan Pendahuluan. Disampaikan pada Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi. Jakarta. Agustus 2008.
- http://www.wnpg.org/frm_index.php?pg=informasi/info_makalah2.php&act=edit&id=50
- Haryoto. (2000). Teknologi Tepat Guna Tempe Benguk. Yogyakarta: Kanisius. Hal : 12-19.
- Istiani, Nurina. (2010). Karakteristik Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*). *Tesis*. Surakarta: Program Pasca Sarjana Universitas Sebelas Maret.
- Jiwintarum Y. A., Baiq L. S., 2017, *Most Probable Number* (MPN) Coliform dengan Variasi Volume Media Lactosa Broth Single Strength (LBSS) dan Lactose Broth Double Strength (LBDS), *Jurnal Kesehatan Prima* vol. 11.
- Juliana, R., Julianti, E., Limbong, L. N. (2017). Pengaruh Metode dan Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Kimia Tepung Ubi Jalar Ungu, *Pangan dan Pert.*, 5(3) : 496-501
- Khlangwiset, P., Shephard, G.S., dan Wu F. (2011). Aflatoxins and Growth impairment: a review. *Critical reviews in toxicology 2011*. 41:740-755
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikrobiologi di Laboratorium*. Jakarta : PT Raja Grafindo Persada,
- Lunggani, A. T. 2007. Kemampuan Bakteri Asam Laktat Dalam Menghambat Pertumbuhan dan Produksi Aflatoxin B2 *Aspergillus flavus*. *Bioma Berkala Ilmiah Biologi*. 9(2) : 45-51
- Naufalina, M. D. dan Nuryanto. (2014). Pengaruh Pemberian Susu Kacang Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*) Terhadap Kadar Kolesterol LDL dan HDL pada Tikus Dislipidemia. *Journal of Nutrition College*. 3(4) : 456-464.

-
- Pelczar, Michael J., ECS. Chan. (2008). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta : UI Press
- Pramita, D. S. (2008) Pengaruh Teknik Pemanasan terhadap Kadar Asam Fitat dan Aktivitas Antioksidan Koro Benguk (*Mucunapruriens*), Koro Glinding (*Phaseolus lunatus*), dan Koro Pedang (*Canavaliaensiformis*). *Skripsi*.Surakarta : Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret
- Pramita, D. S., Handajani, S., dan Rachmawanti Dian. (2008) Pengaruh Teknik Pemanasan terhadap Kadar Asam Fitat dan Aktivitas Antioksidan Koro Benguk (*Mucunapruriens*), Koro Glinding (*Phaseolus lunatus*), dan Koro Pedang (*Canavaliaensiformis*). *Biofarmasi*. **6** (2) : 36-44
- Sahid, A. P. N. dan Murbawan E. (2016). Pengaruh Bubuk Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Diabetes Diinduksi Streptozotocin. *Journal of Nutrition College*. **5** (2) : 51-57.
- Suarsana, I. N., Priosoeryanto, B. P., Bintang, M. dan Wresdiyati, T. 2010. Profil Glukosa Darah dan Ultrastruktur Sel Beta Pankreas Tikus yang Diinduksi Senyawa Aloksan. *JITV*. **15**(2): 118-123
- Tandiabang, J. (2011). Kajian Pengendalian Aflatoksin pada Jagung. *Seminar Nasional Serealia 2011*. 419-425
- Tivani, I., Amananti, W., dan Purgiyanti. (2018). Uji Angka Lempeng Total (ALT) pada Jamu Gendong Kunyit Asem di Beberapa Desa Kecamatan Talang Kabupaten Tegal. *Pancasakti Science Education Journal*. **3**(1) : 43 - 48
- Uadia, N. R. (2003). Effect of Aqueous Extract of *Canavalia ensiformis* Seeds on Hyperlipidemia and Hyperketonaemia in Alloxon-Induced Diabetic Rats. *The Nigerian Society for Experimental Biology*.**15**(1): 7-15.
- Wasito, H. (2011). Obat Tradisional Kekayaan Indonesia. Yogyakarta : Graha Ilmu
- Yatimah, D. Y. (2014). Analisis Cemaran Logam Berat Kadmium dan Timbal pada Beberapa Merek Lipstik yang Beredar di Daerah Ciputat dengan Menggunakan Spektrofotometri Serapan Atom (SSA). *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta
- Yekti, Nirmala, Rochmah, Y. S., dan Mujayanto, R. (2014). Analisa Profil kadar C-Reactive Protein Pada Status Kesehatan Periodontal Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2 (Studi di Rumah Sakit Islam Sultan Agung Semarang)