



**PENGARUH FERMENTASI *Aspergillus oryzae* DAN
Rhizopus oligosporus PADA EDAMAME (*Glycine max* L.)
TERHADAP KADAR KALSIMUM DAN DENSITAS TULANG
PADA TIKUS OVARIIEKTOMI**

SKRIPSI

Oleh:

Dinda Rizqiyah Maulida

NIM 152210101052

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2019



**PENGARUH FERMENTASI *Aspergillus oryzae* DAN
Rhizopus oligosporus PADA EDAMAME (*Glycine max* L.)
TERHADAP KADAR KALSIMUM DAN DENSITAS TULANG
PADA TIKUS OVARIIEKTOMI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Dinda Rizqiyah Maulida

NIM 152210101052

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

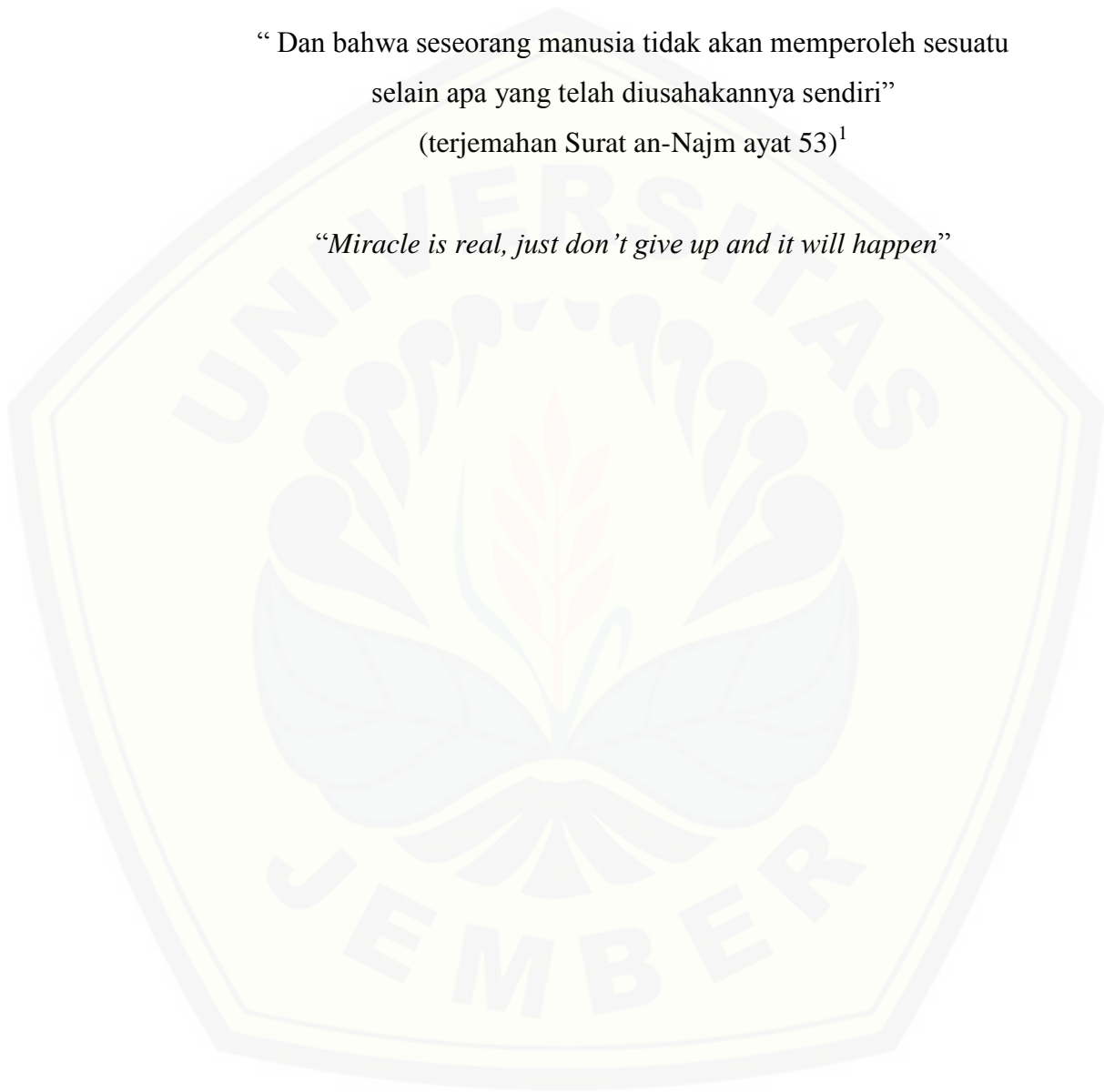
1. Orang tua tercinta, *my superwoman and my lovely mom* Wiji Asmaraningtinah *and my big boss* Imam Mustofa yang selalu memberikan doa, kasih sayang, dorongan, motivasi, nasihat dan senantiasa mendampingi setiap langkah, serta didikan yang telah diberikan selama ini. Semoga lulus menjadi seorang Sarjana Farmasi menjadi salah satu yang dapat dibanggakan dari penulis;
2. *My fans or my lovely brother* Riski Bagus Setyabudi dan Adik-adik dan seluruh keluarga besar, terimakasih atas motivasi dan dukungan untuk mencapai jenjang pendidikan yang lebih tinggi;
3. Guru-guru saya mulai dari Taman Kanak-kanak (TK) hingga Sekolah Menengah Atas (SMA), dosen, laboran, dan segenap civitas akademika yang mendidik saya menjadi orang yang berilmu dan bertaqwa dengan penuh ketulusan;
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTO

“ Dan bahwa seseorang manusia tidak akan memperoleh sesuatu selain apa yang telah diusahakannya sendiri”

(terjemahan Surat an-Najm ayat 53)¹

“Miracle is real, just don't give up and it will happen”



¹ Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Qur'an dan Terjemahnya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Dinda Rizqiyah Maulida

NIM : 152210101052

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul ” Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* pada Edamame (*Glycine max* l.) Terhadap Kadar Kalsium dan Densitas Tulang pada Tikus Ovariectomi” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 7 Juli 2019

Yang menyatakan,

Dinda Rizqiyah Maulida

NIM 152210101052

SKRIPSI

**PENGARUH FERMENTASI *Aspergillus oryzae* DAN
Rhizopus oligosporus PADA EDAMAME (*Glycine max* L.)
TERHADAP KADAR KALSIUM DAN DENSITAS TULANG
PADA TIKUS OVARIIEKTOMI**

Oleh:

Dinda Rizqiyah Maulida

NIM 152210101052

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* pada Edamame (*Glycine max* L.) Terhadap Kadar Kalsium dan Densitas Tulang pada Tikus Ovariectomi” karya Dinda Rizqiyah Maulida telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 16 Juli 2019

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt
NIP 198107232006042002

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes
NIP 197005091999032001

Tim Penguji

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Indah Yulia N, S.Farm., M.Farm., Apt
NIP 198407122008122002

Dewi Dianasari, S.Farm., M.farm., Apt
NIP 198712082014042002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

Lestyo Wulandari, S.Si., M. Farm., Apt
NIP 197604142002122001

RINGKASAN

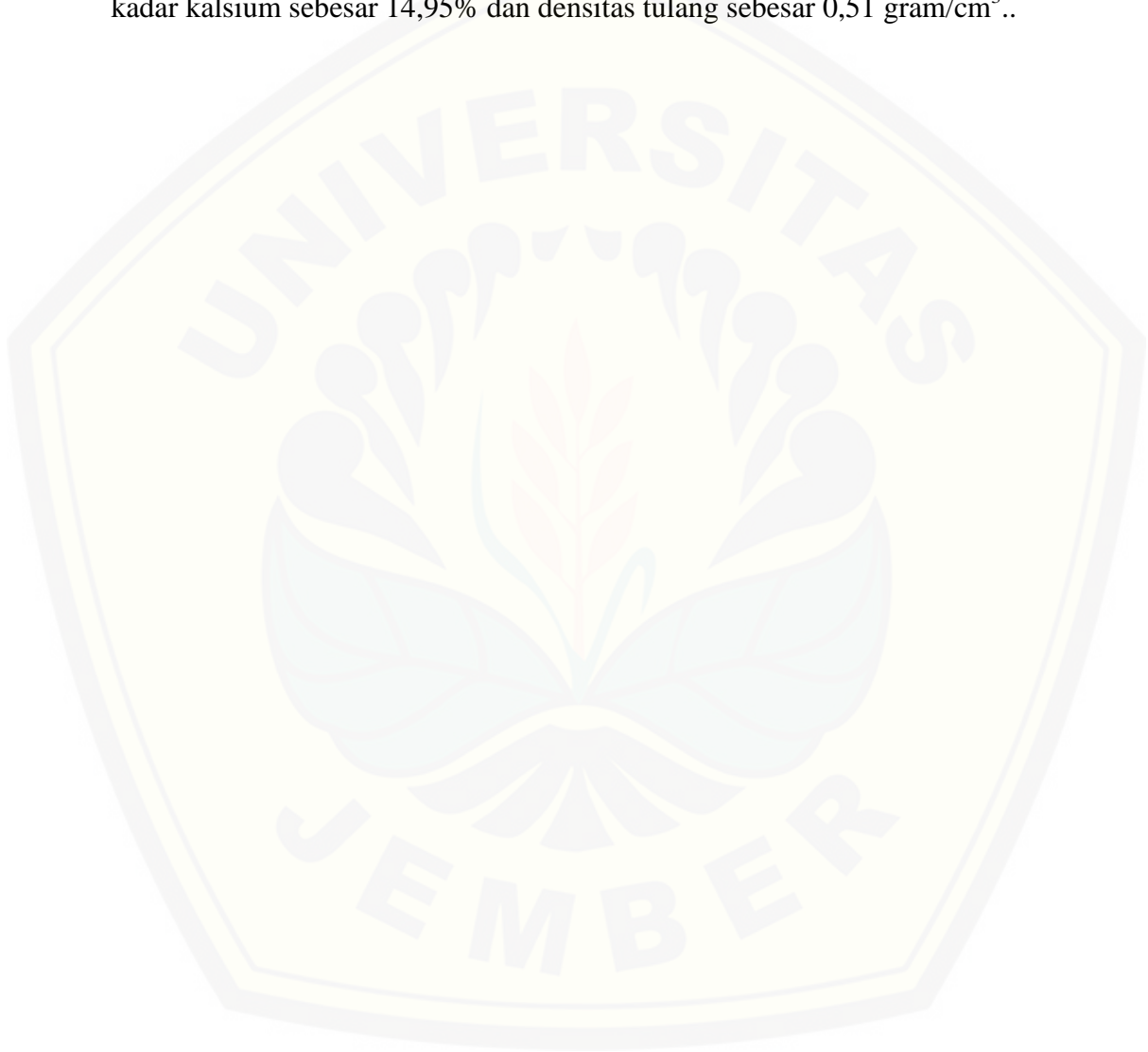
Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* pada Edamame (*Glycine max* L.) Terhadap Kadar Kalsium dan Densitas Tulang pada Tikus Ovariectomi: Dinda Rizqiyah Maulida: 152210101052; 2019; 71 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Osteoporosis merupakan suatu kondisi yang ditandai dengan menurunnya massa dan kekuatan tulang sehingga mengakibatkan peningkatan kecenderungan patah tulang (Lindsay dan Cosman, 2018). Kurangnya hormon estrogen dalam tubuh dapat menjadi salah satu penyebab osteoporosis karena hormon estrogen juga memiliki peran penting dalam proses pembentukan tulang (Kalkan dan Tulay, 2018). Salah satu terapi yang sering digunakan untuk mencegah dan mengatasi osteoporosis adalah *hormone replacement therapy* (HRT). Namun terapi ini memiliki kekurangan yaitu dapat meningkatkan risiko kanker payudara dan penyakit kardiovaskular sehingga tidak dapat digunakan dalam jangka waktu panjang (Liu dkk., 2016). Oleh karena itu diperlukan alternatif pengobatan lain yang lebih aman untuk digunakan dalam jangka waktu yang panjang.

Fitoestrogen merupakan alternatif fitoterapi non hormonal berasal dari tumbuhan yang memiliki kemiripan struktur dan mekanisme dengan estrogen dan memiliki keamanan terapi yang lebih baik daripada HRT. Salah satu sumber fitoestrogen adalah isoflavon. Edamame adalah salah satu jenis kedelai yang menjadi salah satu kandidat pengganti HRT karena memiliki kandungan isoflavon yang tinggi. Kedelai memiliki senyawa isoflavon dalam bentuk glikosida dan aglikon. Sejumlah besar isoflavon telah diidentifikasi pada tanaman adalah dalam bentuk glikosida yang berpengaruh pada kemampuan absorpsi isoflavon yang rendah di usus. Isoflavon tersebut dapat berubah menjadi menjadi bentuk aglikon dengan fase hidrolisis pada proses fermentasi (Nikolić dkk., 2017). Proses fermentasi edamame menggunakan *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terbukti dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon genistein dan daidzein (Imansari, 2018). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji pengaruh edamame (*Glycine max* L. Merrill) terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar kalsium dan densitas tulang pada tikus ovariectomi.

Tahap awal yang dilakukan adalah preparasi edamame terfermentasi selama 3 hari hingga menjadi bentuk serbuk dan disuspensikan dengan CMC-Na. Kemudian pengambilang ovarium dilakukan untuk mendapatkan tikus dengan kondisi defisiensi estrogen. Perlakuan pada semua kelompok tikus yaitu *shamed ovx*, kontrol negatif (CMC-Na), kelompok uji edamame terfermentasi dosis 100,250,500,750, 1.000, 1.250 mg/kgBB dilakukan selama 28 hari. Pada hari ke-29 dilakukan pengambilang tulang femur bagian kanan untuk dilakukan uji penetapan kadar kalsium dengan menggunakan Spektroskopi Serapan Atom (SSA) dan densitas tulang.

Hasil pemeriksaan menunjukkan Pemberian serbuk edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligoporus* mampu memberikan efek yang menguntungkan dalam meningkatkan kadar kalsium dan densitas tulang ovariektomi pada pemberian edamame terfermentasi pada dosis tersebut. Dosis optimal edamame terfermentasi dalam meningkatkan kadar kalsium adalah dosis 750 mg/kgBB. Dosis optimal edamame terfermentasi dalam meningkatkan densitas tulang adalah dosis 250 mg/kgBB. Dosis optimal dalam meningkatkan densitas tulang sekaligus kadar kalsium tulang adalah dosis 750 mg/kgBB dengan kadar kalsium sebesar 14,95% dan densitas tulang sebesar 0,51 gram/cm³..



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala atas rahmat dan hidayahnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh fermentasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* pada Edamame (*Glycine max* l.) Terhadap Kadar Kalsium dan Densitas Tulang pada Tikus Ovariectomi”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa atas semua karunia yang telah diberikan;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta dengan sabar membimbing saya untuk menyelesaikan penelitian ini;
4. Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M. Farm.,Apt selaku Dosen Penguji I dan Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Penguji II yang dengan sabar memberikan saran terhadap penelitian ini;
5. Ibu Lidya Ameliana, S.Si.,M.Farm.,Apt selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing saya selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Seluruh dosen maupun tenaga pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmunya, berbagi pengalaman selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
7. Orang tua tercinta, ibyuk Wiji Asmaraningtinah dan ayah Imam Mustofa yang selalu mendoakan, mendukung, memotivasi, dan memberikan segalanya yang terbaik kepada penulis dalam mengerjakan skripsi dan penelitian;
8. Teman dekat penulis jod (Zidni Hafizah), itak (Ita Husnul), Rully dan Edamame squad (Mamad, Livia, Laras, Rima dan Azizah) yang setia

mendoakan, mendukung ,dan membantu penulis mulai awal hingga terselesaikannya penyusunan dan penelitian ini;

9. Mbak Indri, Mbak Dinik, Mbak Parka dan Ibu Widi selaku teknisi di Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membantu selama penelitian ini;
10. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung atas bantuan dan kerjasamanya.

Penulis juga menerima saran dan kritik yang membangun dari semua pihak guna kesempurnaan skripsi ini. Selain itu, penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat untuk semuanya.

Jember, 7 Juli 2019

Penulis

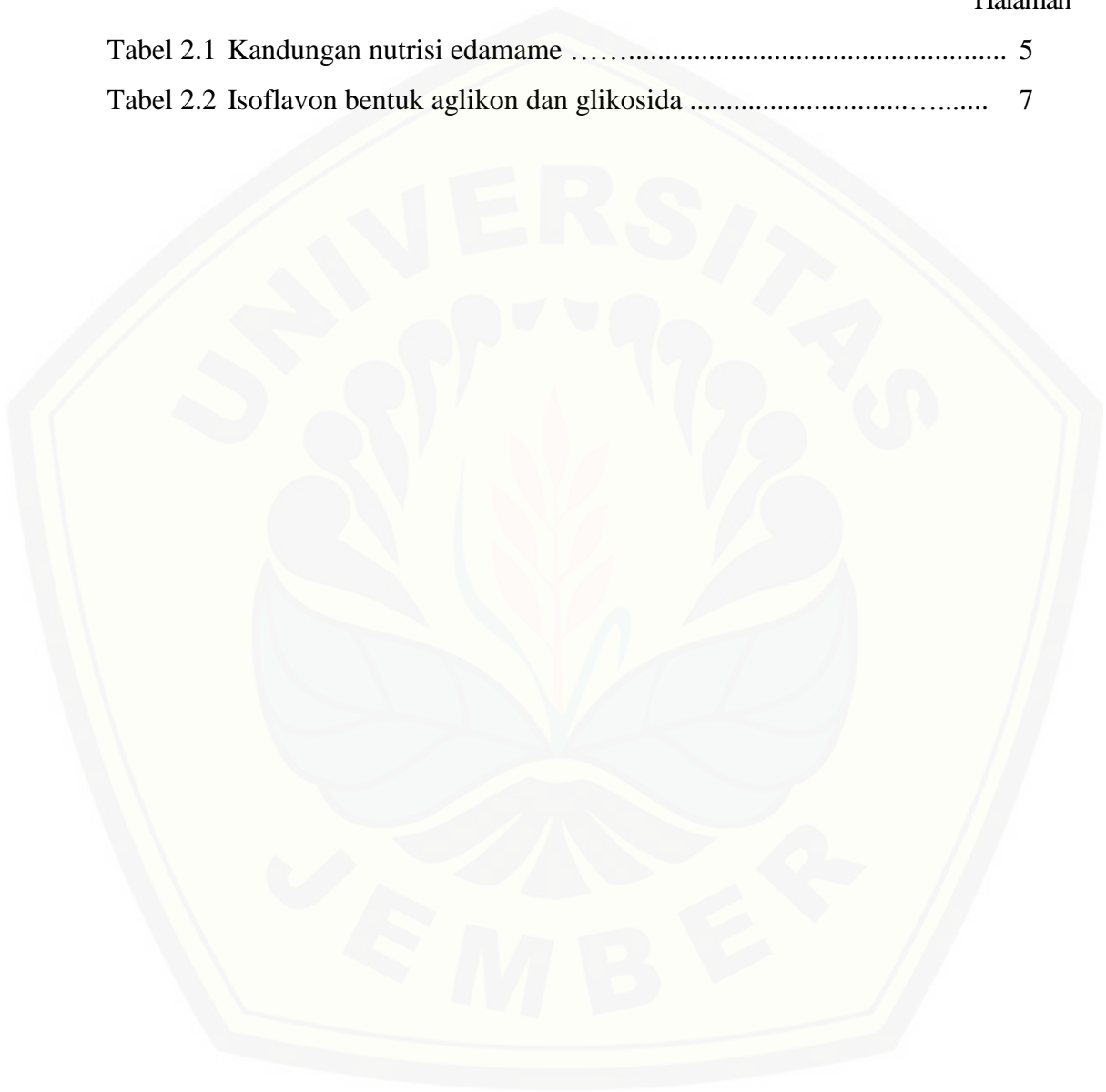
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	i
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tinjauan tentang Edamame (<i>Glycine max</i> L.).....	4
2.2 Fitoestrogen, Isoflavon dan Fermentasi Edamame	5
2.3 Tinjauan tentang Tulang dan Proses Remodeling Tulang.....	8
2.4 Hubungan Estrogen dengan Osteoporosis.....	10
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	13
3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian.....	13

3.1.1 Jenis penelitian	13
3.1.2 Waktu dan tempat penelitian	13
3.2 Variabel Penelitian	13
3.2.1 Variabel bebas	13
3.2.2 Variabel terikat	13
3.2.3 Variabel terkendali	14
3.3 Rancangan Penelitian.....	14
3.3.1 Rancangan operasional	14
3.3.2 Definisi operasional.....	15
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	16
3.4.1 Alat	16
3.4.2 Bahan	16
3.5 Prosedur Penelitian	17
3.5.1 Pemeliharaan Hewan Coba.....	17
3.5.2 Peremajaan Isolat <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i>	17
3.5.3 Pembuatan Suspensi Spora <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i>	17
3.5.4 Perhitungan Kepadatan Spora.....	17
3.5.5 Preparasi Edamame.....	19
3.5.6 Tahap Perlakuan.....	20
3.5.7 Ovariectomi.....	20
3.5.8 Pembedahan Hewan Uji	21
3.5.9 Pengukuran Densitas Tulang.....	21
3.5.10 Pengukuran Kadar Kalsium Tulang.....	21
3.6 Analisis Data	22
3.7 Skema Penelitian	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
BAB 5. KESIMPULAN.....	31
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan nutrisi edamame	5
Tabel 2.2 Isoflavon bentuk aglikon dan glikosida	7



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman edamame dan biji edamame	5
Gambar 2.2 Struktur isoflavon	6
Gambar 2.3 Anatomi tulang	9
Gambar 2.4 Siklus remodeling tulang.....	10
Gambar 3.1 Rancangan penelitian.....	15
Gambar 3.2 Kamar hitung haemasitometer	18
Gambar 3.3 Cara menghitung spora menggunakan hemasitometer	21
Gambar 3.4 Skema Penelitian Pembuatan Edamame Terfermentasi.....	23
Gambar 3.5 Skema Penelitian Perlakuan Hewan Uji.....	24
Gambar 4.1 Kadar kalsium tulang femur tikus.....	26
Gambar 4.2 Densitas tulang (gr/cm ³) femur tikus.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Perhitungan Dosis.....	37
Lampiran 2 : Spektroskopi Serapan Atom	39
Lampiran 3 : Hasil Kadar Kalsium Tulang.....	47
Lampiran 4 : Hasil Densitas Tulang	48
Lampiran 5 : Grafik Rerata Kadar Kalsium Tulang dan Densitas Tulang.....	49
Lampiran 6 : Analisis Statistik Kadar Kalsium Tulang.....	50
Lampiran 7 : Analisis Statistik Densitas Tulang.....	59
Lampiran 8 : Dokumentasi.....	69
Lampiran 9 : Determinasi Tanaman.....	70

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoporosis merupakan suatu kondisi yang ditandai dengan menurunnya massa dan kekuatan tulang sehingga mengakibatkan peningkatan kecenderungan patah tulang (Lindsay dan Cosman, 2018). Selain kurangnya asupan kalsium, kurangnya hormon estrogen dalam tubuh juga dapat menjadi salah satu penyebab osteoporosis karena hormon estrogen juga memiliki peran penting dalam proses pembentukan tulang (Kalkan dan Tulay, 2018). Berdasarkan Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, pada tahun 2011 terjadi insiden patah tulang panggul akibat osteoporosis. Perempuan memiliki prevalensi osteoporosis hampir empat kali lebih tinggi daripada laki-laki dengan rentang usia 50-99 tahun (Pusat Data dan Informasi Kesehatan Republik Indonesia, 2015). Hal tersebut dikarenakan wanita mengalami proses penuaan alami yang disebut menopause. Menopause mengakibatkan wanita mengalami kondisi kekurangan hormon estrogen yang akan berpengaruh pada ketidakseimbangan peran osteoblas dan osteoklas sehingga mengakibatkan turunnya densitas tulang (Muhammad dkk., 2018). Maka dari itu, menjaga kesehatan tulang menjadi hal yang penting terutama untuk wanita menopause.

Salah satu terapi yang sering digunakan untuk mencegah dan mengatasi osteoporosis adalah *hormone replacement therapy* (HRT). Selain untuk osteoporosis, HRT juga sering digunakan untuk mengurangi keluhan lain akibat menopause seperti nyeri payudara, *hot flush*, dan lainnya (Daan dan Fauser, 2015). Penggantian defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause menggunakan produk hormonal ini efektif dalam memperlambat keropos tulang dengan menghambat peran osteoklas yaitu resorpsi tulang. Pengobatan HRT tersebut menunjukkan adanya perkembangan yang menguntungkan pada pasien osteoporosis (Tit dkk., 2018). Namun terapi ini memiliki kekurangan yaitu dapat meningkatkan risiko kanker payudara dan penyakit kardiovaskular sehingga tidak dapat digunakan dalam jangka waktu panjang (Liu dkk., 2016). Oleh karena

itu diperlukan alternatif pengobatan lain yang lebih aman untuk digunakan dalam jangka waktu yang panjang. Alternatif lain untuk menggantikan HRT ini adalah terapi menggunakan bahan alam yaitu berasal dari tumbuhan yang memiliki kemiripan struktur dan mekanisme dengan estrogen yang disebut fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan alternatif fitoterapi non hormonal yang perlu dipertimbangkan terutama dalam kasus keamanan terapi yang lebih baik daripada HRT, terlebih lagi fitoestrogen memiliki efek sebagai agen kemopreventif untuk kanker payudara (Sakamoto dkk., 2010). Salah satu bentuk senyawa fitoestrogen adalah isoflavon. Tumbuhan jenis kedelai merupakan salah satu sumber fitoestrogen yang memiliki kandungan isoflavon yang tinggi (Mostrom dan Evans, 2018).

Edamame merupakan salah satu jenis kedelai yang produksinya melimpah di Kabupaten Jember. Edamame memiliki kandungan isoflavon yang tinggi sehingga edamame dapat menjadi salah satu kandidat pengganti HRT. Bentuk isoflavon yang diabsorpsi oleh usus adalah aglikon, namun pada umumnya bentuk glikosida lebih banyak terkandung dalam tanaman. Berdasarkan penelitian Imansari (2018) menunjukkan bahwa proses fermentasi menggunakan kombinasi kapang *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dapat meningkatkan kadar isoflavon dalam bentuk aglikon pada edamame, khususnya daidzein. Penelitian ini ditujukan untuk melihat aktivitas edamame terfermentasi kombinasi kapang *A. oryzae* dan *R. oligosporus* sebagai agen estrogenik dengan pengamatan pada densitas tulang dan kadar kalsium tulang tikus ovariektomi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dalam penelitian ini rumusan masalahnya adalah sebagai berikut:

- a. Bagaimana pengaruh pemberian edamame terfermentasi pada densitas tulang dan kadar kalsium tulang femur tikus *Sprague Dawley* ovariektomi (OVX)?

- b. Pada dosis berapakah edamame terfermentasi dapat memberikan efek optimal dalam peningkatan kadar kalsium dan densitas tulang femur tikus *Sprague Dawley* ovariektomi (OVX)?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Untuk mengetahui pengaruh pemberian edamame terfermentasi terhadap kadar kalsium dan densitas tulang pada tikus *Sprague Dawley* ovariektomi (OVX).
- b. Untuk mengetahui dosis edamame terfermentasi yang dapat memberikan efek optimal dalam peningkatan kadar kalsium tulang dan densitas tulang pada tikus *Sprague Dawley* ovariektomi (OVX).

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memberikan informasi tentang pemanfaatan edamame terfermentasi sebagai fitoestrogen dan pengobatan alternatif yang lebih aman pengganti HRT dalam upaya mengurangi keluhan menopause yaitu risiko osteoporosis pada wanita menopause. Edamame difermentasi menghasilkan edamame terfermentasi dalam bentuk produk tempe sehingga hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dan dikonsumsi oleh masyarakat luas.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

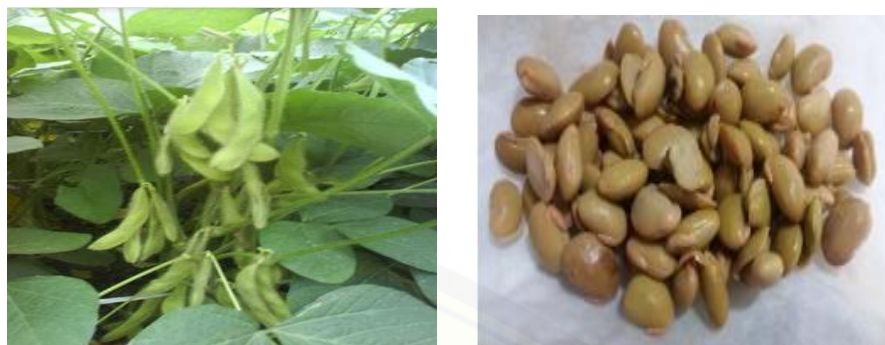
2.1 Tinjauan tentang Edamame (*Glycine max* L.)

Edamame merupakan salah satu spesies kedelai yang biasanya dikonsumsi segar sebagai camilan atau sebagai sayuran. Edamame juga dikenal sebagai kedelai sayur, kedelai hijau atau kedelai *maodou* di Cina (Mimura dkk., 2007). Edamame dipanen muda 65–68 hari setelah tanam (Soewanto dkk., 2013). Dipanen dalam bentuk polong segar pada stadi tumbuh R-6 yaitu penuh dengan biji hijau sekurangnya satu dari empat simpul teratas memiliki berat biji tertinggi dengan kandungan sukrosa, oligosakarida yang rendah (Xu dkk., 2016).

Klasifikasi edamame dalam taksonomi adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: <i>Glycine</i> Wild
Spesies	: <i>Glycine max</i> L. (USDA, 2018)

Edamame merupakan tanaman yang tumbuhnya tegak dan merambat. Tinggi tanaman berkisar 28-50 cm dengan daun yang lebat dan memiliki biji yang bobotnya dapat berkisar 28-50 g/100 biji, warna biji kuning hingga hijau, bentuk biji yang dihasilkan adalah bulat atau bulat telur (Soewanto dkk., 2013). Gambar morfologi edamame dapat dilihat pada Gambar 2.1. Edamame merupakan jenis kedelai yang unik dan berbeda dibandingkan dengan jenis kedelai lain karena ukuran bijinya yang besar, tekstur halus, rasanya yang manis, lebih mudah dimakan atau dicerna sehingga edamame lebih disukai sebagai camilan (Widati dan Hidayat, 2012).



Gambar 2.1 Tanaman edamame (Widati dan Hidayat, 2012) dan biji edamame (Imansari, 2018)

Berdasarkan tinjauan (USDA, 2018) tentang kandungan nutrisinya, edamame dengan bobot 100 g mengandung energi sebesar 160 kkal, protein 12 g, total lemak 6,67 g; karbohidrat 14,67 g; serat 10,7 g; gula 2,67 g; kalsium 53 mg; besi sebesar 1,92 mg dan kolesterol 0 mg, dapat dilihat pada Tabel 2.1. Edamame memiliki kandungan isoflavon total yang tinggi yaitu 48,95 mg dalam 100 g edamame.

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi edamame (USDA, 2018)

Nutrisi	Unit	Kandungan per 75 g	Kandungan per 100 g
Energi	Kkal	120	160
Protein	g	9	12
Total lemak	g	5	6,67
Karbohidrat	g	11	14
Serat	g	8	10,7
Gula	g	2	2,67
Kasium	mg	40	53
Besi	mg	1,44	1,92
Kolestrol	mg	0	0
Isoflavon	mg	-	48,95

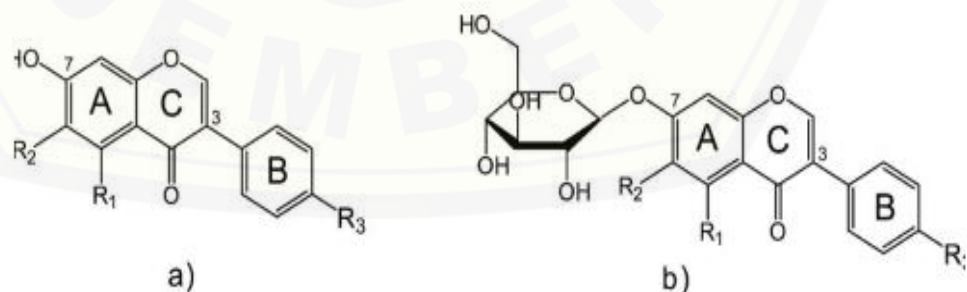
2.2 Fitoestrogen, Isoflavon dan Fermentasi Edamame

Edamame memiliki kandungan isoflavon yang tinggi sehingga menjadikan edamame salah satu kandidat fitoestrogen pengganti HRT. Fitoestrogen adalah senyawa nonsteroid alami dari tumbuhan yang memiliki kemiripan struktur atau fungsional dengan hormon estrogen. Fitoestrogen memiliki efek estrogenik pada

sistem saraf pusat dan pada sistem reproduksi pria dan wanita, merangsang estrus dan merangsang pertumbuhan saluran genital dan kelenjar susu pada wanita. Fitoestrogen juga memiliki efek menguntungkan terkait dengan mengurangi aterosklerosis, osteoporosis, angiogenesis, diabetes, dan efek vasomotor (*hot flushes*) saat menopause dan bertindak sebagai antioksidan, antineoplastik, anti peradangan, dan probiotik (Mostrom dan Evans, 2018).

Berdasarkan struktur kimianya, fitoestrogen secara umum dibagi menjadi flavanon, isoflavon, coumestans, chalcones, stilbenes dan lignan. Kelompok fitoestrogen pada edamame yang jumlahnya paling signifikan adalah isoflavon (Nikolic dkk., 2017). Isoflavon adalah isomer sederhana dari flavonoid yang memiliki 15 atom karbon. Isoflavon memiliki cincin B yang melekat pada C-3 dari cincin heterosiklik flavon. Sumber utama isoflavon adalah tanaman dengan famili Leguminosae atau Fabaceae. Diketahui lebih dari 800 isoflavon yang telah dilaporkan dan diisolasi dari famili ini. Selain itu, 225 isoflavon telah diketahui dari 59 famili tanaman selain famili Leguminosae (Hussain dan Green, 2017).

Kedelai memiliki senyawa isoflavon dalam bentuk glikosida dan aglikon. Sejumlah besar isoflavon telah diidentifikasi pada tanaman dalam bentuk glikosida. Isoflavon tersebut dapat terhidrolisis menjadi senyawa isoflavon dalam bentuk aglikon selama proses fermentasi (Nikolić dkk., 2017). Struktur umum aglikon dan glikosida isoflavon pada tanaman disajikan pada Gambar 2.2 dan Tabel 2.2.



Gambar 2.2 Struktur isoflavon: a) aglikon b) glikosida (Nikolic dkk., 2017)

Tabel 2.2 Isoflavon bentuk aglikon dan glikosida (Nikolić dkk., 2017)

Aglikon	Glikosida	R1	R2	R3
Daidzein	daidzin (Daidzein-O-7-glukosida)	H	H	OH
genistein	genistin (genistein-O-7-glukosida)	OH	H	OH
glycitein	glicitin(glycitein-O-7-glukosida)	H	OCH ₃	OH
formononetin	ononin (formononetin-O-7-glukosida)	H	H	OCH ₃
biochanin A	sissotrin (biochanin A-O--7-glukosida)	OH	H	OCH ₃

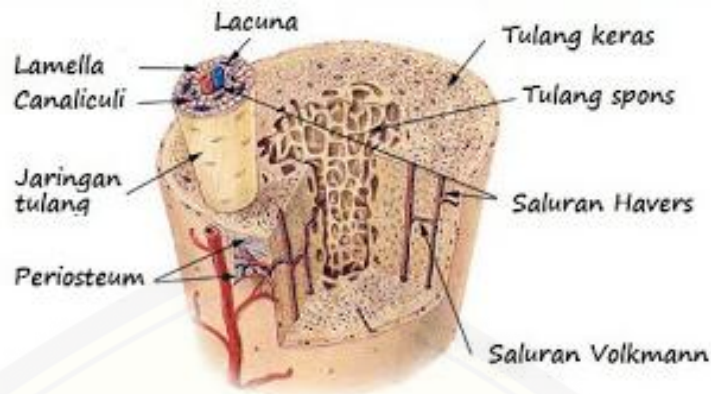
Perubahan bentuk glikosida menjadi aglikon dapat terjadi melalui proses fermentasi. Fermentasi adalah proses metabolisme yang mengubah gula menjadi asam, gas, atau alkohol oleh mikroorganisme atau enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme seperti ragi (jamur) dan bakteri (Siefert dkk., 2016). Kecepatan fermentasi tergantung pada konsentrasi mikroorganisme, enzim yang dihasilkan, pH, suhu, ketersediaan air, garam (Siefert dkk., 2016). β -Glukosidase merupakan salah satu enzim yang diekspresikan oleh kapang untuk membantu pemecahan glukosa menjadi etanol dan karbon dioksida secara anaerob (Renge dkk., 2012). Hidrolisis enzimatik menggunakan β -glukosidase telah diterapkan untuk menghidrolisis isoflavon bentuk glikosida menjadi bentuk aglikon yang sesuai. Aglikon isoflavon relatif tahan terhadap degradasi pada saluran pencernaan dan memiliki sifat mudah diabsorpsi oleh usus (Nikolic dkk., 2017). Menurut penelitian Imansari, (2018) bahwa kandungan isoflavon bentuk aglikon khususnya daidzein dapat meningkat dengan adanya proses fermentasi kombinasi dari jamur *A. oryzae* dan *R. oligosporus* sehingga diharapkan dapat diabsorpsi oleh usus lebih banyak dan meningkatkan efek estrogenik.

Dalam proses fermentasi dapat digunakan jamur atau kapang yang merupakan organisme multiselular dan dapat dilihat dengan mata telanjang. Kapang memiliki hifa yang panjang dan digunakan untuk menembus substrat (Humairoh, 2017). Kapang atau jamur yang dapat digunakan dalam proses fermentasi adalah *R. oligosporus* dan *A. oryzae*. Kombinasi kapang tersebut digunakan untuk menghasilkan produk edamame terfermentasi dalam bentuk tempe. Kombinasi kapang *A. oryzae* dan *R. oligosporus* di inokulum menghasilkan produk tempe kedelai dengan parameter yang lebih baik,

dibandingkan dengan tempe yang dibuat secara tradisional (dibuat dengan kultur murni *R. oligosporus*) (Janiszewska dkk., 2012). Sporangiofor pada *R. oligosporus* dapat tumbuh dengan tinggi 1 mm atau lebih, dengan panjang lebih dari 1000 μm dan berdiameter 10-18 μm . Ciri khas dari kapang ini yaitu warnanya abu kecoklatan yang dapat tumbuh pada suhu 12-42°C dan dapat tumbuh optimum pada suhu 30-35°C. Sporangya memiliki bentuk bulat atau setengah bulat (Ratna Stia Dewi dan Saefuddin 'Aziz, 2011). Jamur tempe termasuk genus *Rhizopus sp* ini memiliki ciri-ciri terdapat rhizoid dan bentuk misellium seperti kapas, warna koloni jamur abu-abu kecoklatan, bentuk sporangia bulat, warna sporangia abu abu kecoklatan mempunyai spora tunggal (Dewi dkk., 2014). *A. oryzae* merupakan kapang dengan ciri memiliki warna hijau kekuningan, dengan miselium berwarna putih, dan tumbuh dengan diameter 60 mm (Oramahi dkk., 2006).

2.3 Tinjauan tentang Tulang dan Proses Remodeling Tulang

Tulang adalah kerangka pendukung tubuh yang unik, ditandai dengan sifatnya yang kaku, keras dan kuat. Tulang berfungsi untuk melindungi organ vital, menyediakan lingkungan untuk sumsum (baik pembentukan darah dan penyimpanan lemak), bertindak sebagai reservoir mineral untuk homeostasis kalsium, reservoir faktor pertumbuhan dan sitokin, dan juga mengambil bagian dalam keseimbangan asam basa (Kini dan Nandeesh, 2012). Kerangka terdiri dari dua jenis struktural utama yaitu tulang kortikal dan trabekular, dapat dilihat pada Gambar 2.3. Tulang kortikal menyumbang sekitar 80% massa kerangka manusia. Tulang kortikal jauh lebih padat, kuat dan keras jika dibandingkan dengan tulang trabekular. Tulang trabekular atau kanselus (juga dikenal sebagai tulang *sponge*) memiliki kepadatan lebih rendah dan luas permukaan lebih besar daripada tulang kortikal sehingga menyebabkan tulang trabekular memiliki risiko osteoporosis lebih besar (Ralston, 2017).

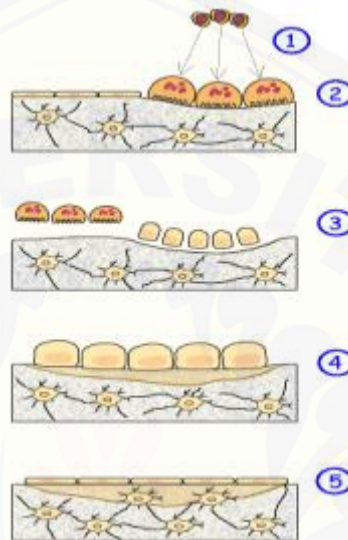


Gambar 2.3 Anatomi tulang (IOF, 2019)

Tulang terus-menerus mengalami remodeling selama hidup untuk membantunya beradaptasi dengan perubahan gaya biomekanik, serta untuk menghilangkan tulang yang sudah lama rusak dan menggantinya dengan tulang baru yang lebih kuat (Ralston, 2017). Proses remodeling tulang melibatkan sel-sel tulang utama yaitu osteoklas dan osteoblas. Osteoklas berasal dari sel induk hematopoietik yang berdiferensiasi menjadi preosteoklas dan akan bersirkulasi dalam aliran darah. Preosteoklas mengekspresikan RANK (*receptor activator nuclear factor kappa B*) yang merupakan sebuah reseptor membran. Ketika sel-sel ini bertemu dengan ligan RANK kemudian menjadi aktif, melebur dan membentuk sel osteoklas yang dapat menyerap tulang. Sedangkan Osteoblas berasal dari sel batang stroma yang berada di sumsum tulang dan memiliki peran dalam regenerasi tulang (Brunetti dkk., 2018).

Siklus remodeling dimulai dari fase aktivasi yang mencakup rekrutmen osteoklas ke permukaan tulang. Kemudian fase resorpsi yaitu osteoklas menghasilkan lingkungan mikro yang asam antara sel dan permukaan tulang, melarutkan atau menyerap kandungan mineral tulang. Pada fase pembalikan, osteoklas menjalani apoptosis dan perannya digantikan dengan osteoblas yang direkrut ke permukaan tulang. Pada fase pembentukan, osteoblas kemudian menyimpan kolagen mineral untuk membentuk tulang baru (Gallagher dan Harsha, 2013). Tahap pembentukan tulang oleh osteoblas berlangsung paling lama karena pembentukan tulang lebih lambat daripada resorpsi tulang. Pada fase

ini melibatkan proses pembentukan tulang baru dan mineralisasi serta diferensiasi terminal osteoblas. Fase terakhir adalah fase tulang untuk istirahat, kemudian kembali lagi ke fase awal (Kular dkk., 2012). Proses remodeling tulang dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Siklus remodeling tulang: 1) Fase aktivasi 2) Fase resorpsi 3) Fase pembalikan 4) Fase pembentukan 5) Fase istirahat (IOF, 2019)

2.4 Hubungan Estrogen dengan Osteoporosis

Osteoporosis merupakan suatu kelainan pada tulang yang ditandai dengan menurunnya kekuatan dan massa tulang sehingga mengakibatkan pengeroposan tulang dan mengakibatkan peningkatan kecenderungan patah tulang (Lindsay dan Cosman, 2018). Tulang memainkan peran kunci dalam mineralisasi kerangka dan diperlukan untuk pertumbuhan, perkembangan, dan kekuatan tulang. Berdasarkan kandungan tulang, kalsium dapat menjadi salah satu parameter kepadatan tulang karena jumlahnya yang sangat melimpah. Tulang termasuk jaringan ikat kompleks termineralisasi yang mengandung sekitar 70% mineral dan 30% konstituen organik (Florencio-silva dkk., 2015). Jumlah kalsium pada orang dewasa yaitu sekitar 1-1,3 kg dan 99% kalsium ada di tulang. Sisa 1% kalsium dapat ditemukan dalam jaringan lunak dan cairan ekstraseluler (Vannucci

dkk., 2018). Sumber kalsium sebagian besar terdapat pada produk susu, tahu, beberapa sayuran berdaun hijau tua, lobak, ikan dan sebagian terdapat pada kacang-kacangan (Titchenal dan DoBBs, 2007). Pada orang dewasa dengan usia sekitar 51-70 tahun membutuhkan asupan kalsium sebesar 1000 mg/dL untuk laki-laki dan 1200 mg/dL untuk perempuan (Caroli dkk., 2011). Total konsentrasi kalsium dalam serum diatur agar tetap antara 8,5-10,5 mg/dL (2,12-2,62 mmol/L) (Ross dkk., 2012). Jika kadar kalsium serum menurun, resorpsi tulang akan semakin meningkat karena adanya hormon paratiroid (PTH) yang berfungsi untuk melepaskan kalsium yang tersimpan dalam tulang ke dalam darah untuk mencegah tubuh kekurangan kalsium (Maslin dan Dennison, 2019).

Selain kurangnya kalsium, osteoporosis juga dapat disebabkan oleh suatu kondisi defisiensi hormon estrogen akibat menopause. Menopause yaitu proses penuaan yang melibatkan sistem reproduksi yang ditandai dengan siklus haid mulai terganggu dan akhirnya berhenti secara permanen (Lumsden, 2016). Pada wanita menopause, ovarium tidak dapat merespon untuk membentuk hormon estrogen. Estrogen manusia utama adalah estron, estradiol dan estriol. Secara biologis, estrogen yang paling aktif dan berlimpah adalah estradiol. Mekanisme aksi estrogen terjadi melalui pengikatan estrogen ke reseptor estrogen. Dimulai dengan masuknya estrogen ke dalam sel, berikatan dengan reseptornya dan membentuk kompleks yang langsung bertranslokasi ke dalam nukleus. Di nukleus kompleks ini berikatan dengan *estrogen response element* untuk tahap transkripsi genetik sehingga menghasilkan efek estrogenik (Sihombing.I.dkk, 2012). Estrogen telah lama dikenal sebagai antiresorptif yang bekerja dengan menekan aktivitas osteoklas. Defisiensi estrogen menyebabkan ekspresi RANKL terhadap RANK sehingga menimbulkan inisiasi dan diferensiasi osteoklas (Salamanna dkk., 2018). Selama 5-10 tahun selama dan setelah menopause, wanita kehilangan tulang lebih cepat daripada pria dengan laju 2-3% per tahun. Hal ini sebagian besar disebabkan oleh defisiensi estrogen pada masa menopause yang menyebabkan peningkatan sekresi hormon PTH dan penurunan penyerapan kalsium di usus (Zhu dan Prince, 2012). Berdasarkan penelitian Elkomy dan Elsaid, (2015) bahwa tikus yang diovariectomi mengembangkan perubahan tulang

yang mirip dengan yang terlihat pada wanita osteoporosis yang ditunjukkan dengan adanya penurunan densitas tulang pada tulang femur.

HRT merupakan terapi pilihan pertama untuk mengurangi gejala akibat menopause, salah satunya adalah osteoporosis. Terapi ini tidak disarankan untuk wanita menopause dengan kondisi memiliki penyakit kanker. Terapi hormon ini juga tidak dapat digunakan untuk terapi jangka waktu panjang dan dengan dosis yang besar. Waktu terapi maksimal hanya untuk 5 tahun. Penggunaan terapi dalam jangka waktu panjang dapat meningkatkan risiko kanker payudara, uterus, ovarium dan penyakit jantung koroner (Stuenkel dkk., 2015). Fitoestrogen adalah salah satu penemuan yang menjadi alternatif pengganti HRT. Efek estrogenik pada fitoestrogen tidak seefektif HRT, namun lebih aman untuk digunakan dalam jangka waktu yang panjang. Fitoestrogen memiliki struktur yang menyerupai struktur dari hormon estrogen yaitu memiliki cincin fenolik yang dapat berikatan dengan reseptor estrogen sehingga fitoestrogen juga memiliki mekanisme dan memberikan efek yang mirip dengan estrogen (Mostrom dan Evans, 2018).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental yang termasuk dalam *true experimental laboratories in vivo* yang bertujuan untuk mengetahui efek fermentasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* pada edamame (*Glycine max* L.) terhadap kadar kalsium dan densitas tulang pada tikus ovariektomi.

3.1.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi serta Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi, di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) dan Laboratorium Terpadu (CDAST) Universitas Jember pada bulan Februari 2018 sampai dengan April 2019.

3.2 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan tiga variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkontrol yang dijelaskan sebagai berikut:

3.2.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan tikus dengan memberikan suspensi edamame yang telah difermentasi selama 3 hari kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* pada tikus ovariektomi dengan dosis 100, 250, 500, 750, 1000, dan 1250 mg/kgBB, *shamed* OVX, dan OVX + CMC-Na sebagai kontrol negatif.

3.2.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah densitas tulang dan kadar kalsium tulang femur pada tikus yang diberi serbuk edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus*.

3.2.3 Variabel terkendali

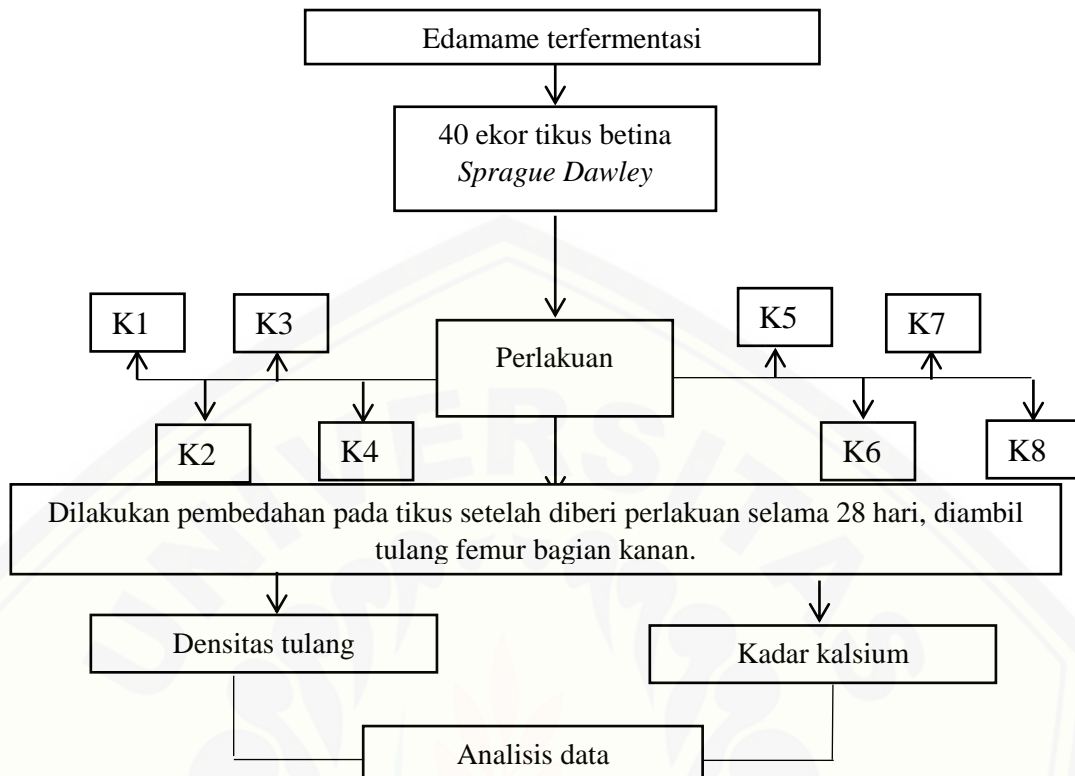
Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kepadatan spora sebanyak 10^6 spora/mL, suhu inkubasi edamame fermentasi, waktu fermentasi edamame, galur tikus, umur tikus, pakan dan minum tikus serta jenis kelamin.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Rancangan operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut:

- a. Preparasi sampel edamame
- b. Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* sebanyak 10^6 spora/mL
- c. Preparasi sampel edamame fermentasi dengan menggunakan campuran *A. oryzae* dan *R. oligosporus*
- d. Pembuatan serbuk edamame fermentasi dengan mengeringkan tempe edamame terfermentasi menggunakan oven 50°C .
- e. Hewan uji diadaptasi selama 10 hari dalam kandang Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- f. Ovariektomi dan penyembuhan luka selama 10 hari.
- g. Pemberian perlakuan serbuk tempe edamame dalam bentuk suspensi pada tikus selama 28 hari.
- h. Penimbangan bobot tikus selama 28 hari.
- i. Dilakukan pembedahan setelah perlakuan dan diambil tulang femur tikus bagian kanan dan kiri.
- j. Dilakukan pengukuran densitas tulang dengan *plethysmometer*.
- k. Dilakukan pengukuran kadar kalsium tulang femur tikus dengan Spektroskopi Serapan Atom (SSA).



Gambar 3.1 Diagram rancangan penelitian

Keterangan:

K1 :Kelompok tikus tanpa ovariektomi atau *shamed* OVX dengan pakan standar.

K2 :Kelompok tikus OVX dengan CMC-Na.

K3 :Kelompok tikus OVX dengan edamame terfermentasi 100 mg/kgBB.

K4 :Kelompok tikus OVX dengan edamame terfermentasi 250 mg/kgBB.

K5 :Kelompok tikus OVX dengan edamame terfermentasi 500 mg/kgBB.

K6 :Kelompok tikus OVX dengan edamame terfermentasi 750 mg/kgBB.

K7 :Kelompok tikus OVX dengan edamame terfermentasi 1000 mg/kgBB.

K8 :Kelompok tikus OVX dengan edamame terfermentasi 1250 mg/kgBB.

3.3.2 Definisi operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut:

- a. Bahan penelitian yang digunakan adalah edamame yang berasal dari PT. Mitra Tani 27 Jember dengan varietas SPM-1, ditanam di daerah Jember,

dipanen pada bulan Februari 2018, dan proses panen dilakukan pada 63-68 hari setelah tanam.

- b. Isolat *R. oligosporus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember.
- c. Isolat *A. oryzae* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi & Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- d. Tikus betina perawan galur *Sprague Dawley* adalah hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini. Usia tikus adalah 59 hari dan didapatkan dari pengembangan hewan coba mandiri (PHPM) dengan asal indukan dari unit pengembangan hewan percobaan (UPHP) UGM.

Rancangan penelitian pada penelitian pengaruh efek fermentasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* pada edamame terhadap kadar kalsium dan densitas tulang pada tikus ovariektomi dapat dilihat pada Gambar 3.1.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Autoklaf, *laminar air flow* (Airtech), mikropipet (Serena) , bunsen, tabung reaksi, hemasitometer, mikroskop (Olympus BX53), inkubator, oven, *blender*, ayakan, timbangan analitik digital, seperangkat alat bedah, *plethysmometer*, SSA (ZA3000 Series Atomic Absorption Spectrophotometer), alat gelas.

3.4.2 Bahan

Edamame (kedelai varietas SPM 1), isolat *A. oryzae*, isolat *R. oligosporus*, *Potato Dextrose Agar* (PDA), akuabides steril, dan tween 80, ketamin, xylasin, betadin, antibiotik, CMC Na 1%, NaCl, HCL 5N, TCA 20%, *Calcium standard solution*, *Milli-Q water*.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Jumlah tikus minimal yang digunakan dalam percobaan dihitung dengan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, bahwa t merupakan jumlah perlakuan dan n merupakan banyak pengulangan tiap perlakuan, sehingga didapatkan $n \geq 3,14$. Jumlah tikus betina jenis *Sprague Dawley* yang digunakan pada penelitian ini adalah 40 ekor dan terbagi menjadi 8 kelompok (5 tikus tiap kelompok). Tikus beradaptasi di dalam kandang dengan suhu kamar atau $20^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$ selama 7 hari sebelum perlakuan. Tikus diberi makan dengan pakan standar dan minum setiap hari.

3.5.2 Peremajaan Isolat *A. oryzae* dan *R. oligosporus*

Peremajaan isolat *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dilakukan dengan mengambil sebagian indukan dari isolat *A. oryzae* dan *R. oligosporus* menggunakan ose steril dan menempatkannya ke dalam tabung reaksi yang berisi media yaitu *potato dextrose agar* (PDA). Kemudian isolat diinkubasi pada suhu 30°C selama 1 hari untuk isolat *A. oryzae* dan selama 3 hari untuk isolat *R. oligosporus* (Imansari, 2018).

3.5.3 Pembuatan Suspensi Spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus*

Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dilakukan di bawah *Laminar Air Flow* (LAF). Pertama larutan tween 1% dibuat dengan mencampurkan akuades dan Tween 80 (1 : 100) sebanyak 10 ml dalam ependorf. Kapang diambil atau dikeruk dari media menggunakan ose steril secara hati-hati dan masing-masing dimasukkan dalam ependorf yang berisi campuran akuades dan tween 80. Kemudian larutan dihomogenkan menggunakan mikropipet atau dengan vortex (Imansari, 2018).

3.5.4 Perhitungan Kepadatan Spora

Suspensi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dibuat dengan mengambil suspensi spora masing-masing sebanyak 10 μl dan suspensi dimasukkan ke dalam hemasitometer. Kemudian kepadatan spora diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x hingga kamar hitung terlihat pada hemasitometer. Jumlah kepadatan spora yang dibutuhkan adalah sebesar 10^6 spora/ml. Jumlah spora dapat

dihitung di bawah mikroskop. Spora yang dihitung hanya yang terletak pada kotak hitung (1 + 2 + 3 + 4 + 5), seperti yang tersaji pada (Gambar 3.2). Spora yang dihitung hanya pada kamar hitung pada sisi kiri dan atas, dapat dilihat pada (Gambar 3.3). Setelah semua spora pada kotak hitung didapatkan, perhitungan jumlah spora/ml dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$N = \frac{x}{t(\text{mm}) \times d \times l(\text{mm}^2)} \times 10 \dots\dots\dots \text{Persamaan 2.1}$$

Keterangan:

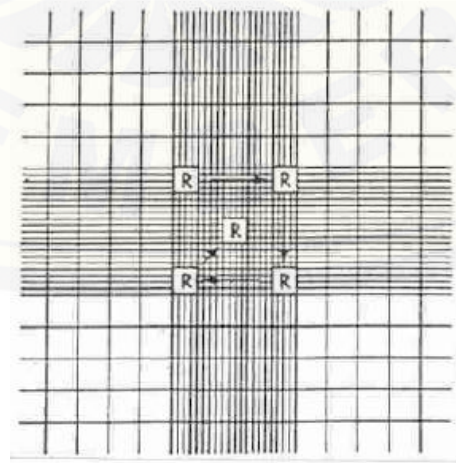
- N : Jumlah spora/mL
 X : Rata-rata jumlah spora yang dihitung
 l : Luas kotak hitung
 t : Kedalaman bidang hitung (0.1 mm)
 d : Faktor pengenceran
 10 : Volume suspensi yang diambil ($10 \mu\text{L} = 10 \text{ mm}^3$)

Apabila kepadatan spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang didapatkan lebih dari 10^6 spora maka dilakukan pengenceran menggunakan rumus berikut:

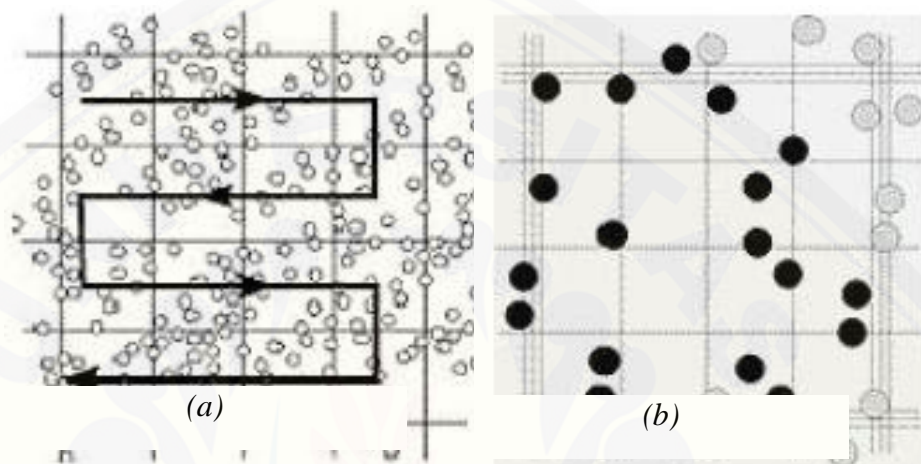
$$N1V1 = N2V2 \dots\dots\dots \text{Persamaan 2.2}$$

Keterangan :

- N1 : Konsentrasi larutan stock (spora/mL)
 N2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan (spora/mL)
 V1 : Volume larutan stock (mL)
 V2 : Volume larutan yang diinginkan (mL)



Gambar 3.2 Kamar hitung haemasitometer (Hansen, 2000)



Gambar 3.3 Cara menghitung spora menggunakan hemasitometer (a) alur menghitung spora (b) cara menghitung spora (● menunjukkan spora yang dihitung, ○ menunjukkan spora yang tidak dihitung) (Tim QC APH, 2009)

3.5.5 Preparasi Edamame

Edamame sebanyak 500 gram yang telah dikupas, direndam dalam air panas selama ± 28 menit untuk memudahkan dalam pelepasan kulit ari edamame. Biji edamame ditimbang dengan bobot masing-masing 50 gram dan membungkusnya dengan kertas saring. Edamame disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan. Tahap selanjutnya adalah proses fermentasi yang dilakukan dengan menambahkan suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* sebanyak 1 ml dengan perbandingan 1:1 pada tiap bungkus edamame. Kemudian edamame masuk ke dalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Edamame yang telah terfermentasi dikeluarkan dari inkubator dan ditempatkan dalam loyang, dicacah hingga ukurannya menjadi lebih kecil agar lebih mudah dikeringkan dan loyang dimasukkan dalam oven. Proses pengeringan dengan oven dilakukan dengan suhu

60⁰C selama 28 jam. Setelah kering, edamame dihaluskan menggunakan blender hingga halus dan diayak dengan ayakan mesh 80 (Imansari, 2018). Pembuatan suspensi edamame dibuat dengan melarutkan serbuk edamame ke dalam larutan CMC Na 1%. Suspensi edamame terfermentasi yang telah dibuat akan disondekan pada tikus sesuai dosis yaitu 100, 250, 500, 750, 1000, dan 1250 mg/kgBB.

3.5.6 Tahap Perlakuan

Bobot tikus ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui volume yang dibutuhkan sesuai kelompok uji. Suspensi edamame yang telah dibuat disondekan pada tikus sesuai dosis yaitu 100, 250, 500, 750, 1.000, 1,250 mg/kgBB. Kelompok kontrol negatif diberi perlakuan dengan menyondekan CMC-Na 1% pada tikus. Kelompok uji *shamed* OVX tidak memerlukan perlakuan khusus yaitu hanya diberi pakan dan minum selayaknya tikus normal.

3.5.7 Ovariektomi

Tujuan dilakukan ovariektomi adalah untuk mendapatkan model hewan coba dengan kondisi defisiensi estrogen atau menopause dengan mengambil kedua ovarium. Pertama seluruh meja operasi didesinfeksi dengan spraying etanol 70%. Tikus dianestesi dengan *xylasin* dan ketamin 1 cc di daerah femur dengan perbandingan 1:1. Tikus diletakkan di atas papan bedah. Tikus diinsisi longitudinal pada bagian perut yang telah dicukur sepanjang 1-2 cm pada kulit di daerah punggung 1,5-2 cm dari tulang vertebra dan 1,5-2 cm dari tulang femur bagian proksimal. Tikus diinsisi dengan kedalaman hingga lapisan lemak di bawah kulit dan dinding peritoneal terbuka. Ovarium yang berbentuk granul diangkat dan digunting. Ujung tuba falopi yang tergantung diikat menggunakan benang bedah dan dimasukkan kembali ke dalam rongga peritoneal. Dinding peritoneum dan kulit luar tikus dijahit kembali hingga tertutup sempurna. Prosedur tersebut dilakukan kembali untuk mengambil ovarium di sisi yang berlawanan. Bekas jahitan diolesi betadin dan ditaburi bubuk antibiotik. Tikus diletakkan di kandang dan diberi makan serta minum. Kondisi kesehatan tikus diperhatikan selama 10 hari pasca ovariektomi (Khajuria dkk., 2012).

3.5.8 Pembedahan Hewan Uji

Setelah perlakuan selama 28 hari, akan dilakukan pembedahan untuk mengambil tulang femur tikus. Pertama tikus dianastesi dengan kloroform kemudian dibedah menggunakan alat bedah yang telah disterilkan. Pembuluh darah bagian jantung dipotong, dan tikus dipastikan telah mati. Tulang femur tikus diambil untuk pemeriksaan kadar kalsium. Tulang dibilas dengan NaCl 0,9% dan dibersihkan dari jaringan lunak yang menempel (Edward dkk., 1989).

3.5.9 Pengukuran Densitas Tulang

Sebelum dilakukan pengukuran densitas tulang, tulang dioven pada suhu 105°C hingga bobot tulang menjadi konstan. Pengukuran densitas tulang (gram/cm^3) didapat dengan mengetahui bobot tulang dan volume tulang. Bobot (gram) tulang diukur dengan menggunakan timbangan analitik dan mengukur volume tulang menggunakan alat *plethysmometer* (Satphaty dkk., 2013).

3.5.10 Pengukuran Kadar Kalsium Tulang

Tahap awal yang dilakukan adalah pembuatan kurva baku standar. Konsentrasi standar yang digunakan adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Larutan standar yang digunakan adalah *Calcium standard solution* yang mengandung $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dengan konsentrasi 1000 mg/L. Pembuatan kurva baku standar yaitu dengan cara mengambil masing-masing *Calcium standard solution* sebanyak 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; dan 0,1 mL dan memasukkannya ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian *milli-Q water* ditambahkan ke dalam masing-masing larutan standar sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 dan $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tahap selanjutnya yaitu preparasi sampel dengan metode destruksi kering. Preparasi sampel dilakukan dengan cara menimbang tulang femur kering dan dilanjutkan dengan proses pengabuan tulang femur menggunakan *furnace* pada suhu 600°C selama 3 jam, kemudian didinginkan (Edward dkk., 1989). Tahap selanjutnya adalah proses destruksi abu yang telah dingin menggunakan 2 ml HCl 5N dalam air mendidih selama 10 menit. Kemudian TCA 20% ditambahkan sebanyak 3 mL dan divortex sampai homogen. larutan yang telah homogen ditambahkan akuades ad 10 ml. Larutan yang telah homogen disaring dengan

kertas saring. Setelah larutan standar dan sampel telah siap, proses selanjutnya adalah menganalisis larutan tersebut menggunakan Spektroskopi Serapan Atom (SSA) (Shear dan Kramer, 1927).

Pengukuran larutan standar Ca dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g/mL}$ diketahui dengan mengukur absorbansinya. Hasil absorbansi larutan standar dapat digunakan untuk membuat kurva standar dan persamaan liniernya. Kemudian pengukuran absorbansi larutan sampel dilakukan dan diperoleh konsentrasi larutan sampel dalam $\mu\text{g/mL}$ dengan cara memplotkan nilai absorbansi pada kurva standar atau menghitung konsentrasi larutan sampel dalam $\mu\text{g/mL}$ menggunakan persamaan regresi linier standar. Kadar kalsium tulang dalam persentase dihitung dengan rumus sebagai berikut:

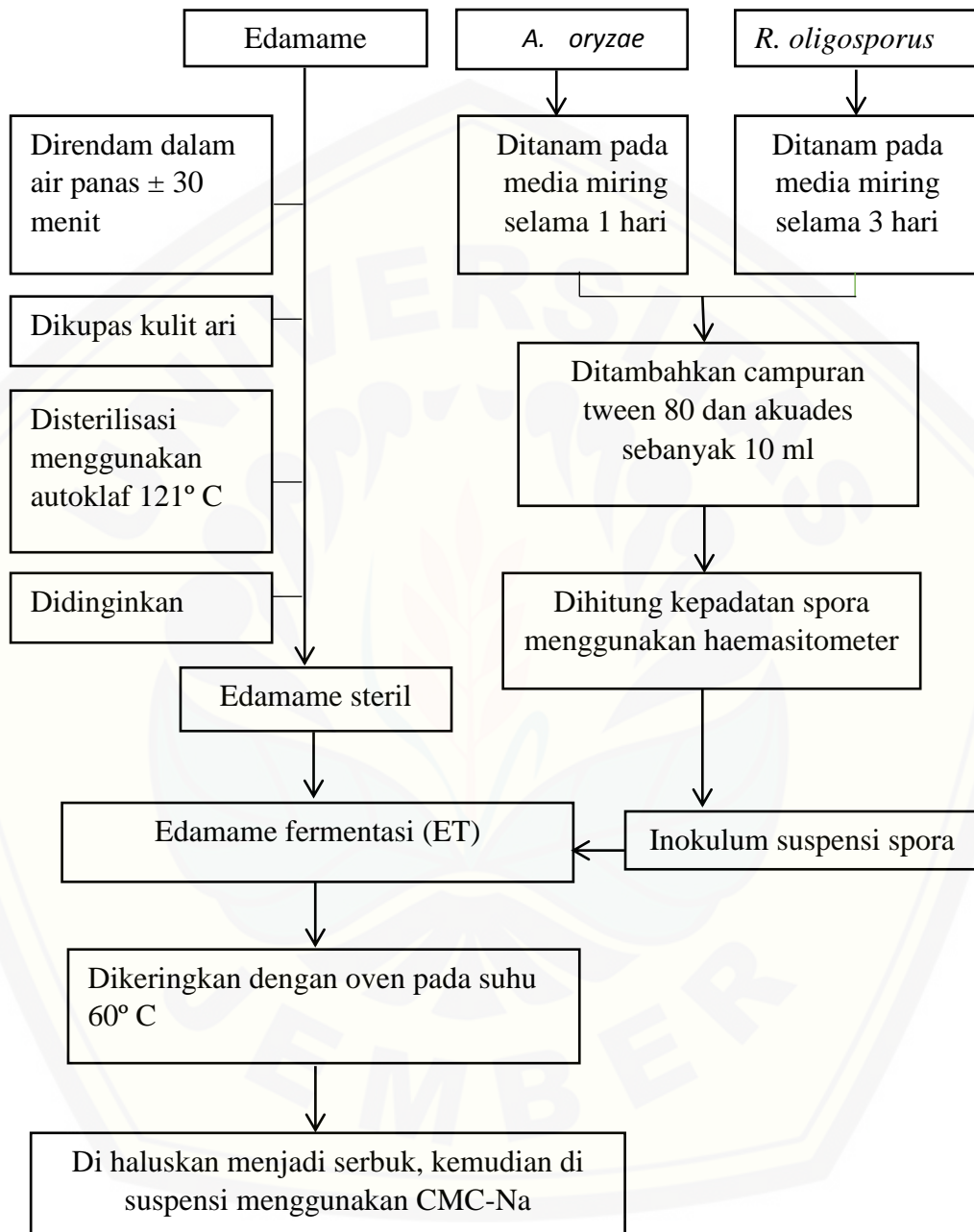
$$\text{Kadar (\%)} = \frac{\text{konsentrasi sampel (\mu\text{g/mL})}}{\text{bobot tulang (mg)}} \times 100\%$$

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data densitas tulang dalam gram/cm^3 dan kadar kalsium tulang dalam persentase. Kemudian data densitas tulang dan kadar kalsium tulang masing-masing dianalisis dengan menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan syarat data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen. Jika nilai $p < 0,05$ yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan uji (*post hoc*) *LSD (least significant difference)*. Apabila hasil dari uji *LSD* didapatkan nilai $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), hal tersebut menunjukkan bahwa data dapat dikatakan bermakna. Namun apabila data yang diperoleh tidak memenuhi syarat dapat dilakukan transformasi data dan diuji kembali homogenitas dan normalitasnya. jika hasil transformasi tidak memenuhi syarat maka dilakukan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* (Magda M Elkomy dan Elsaid, 2015).

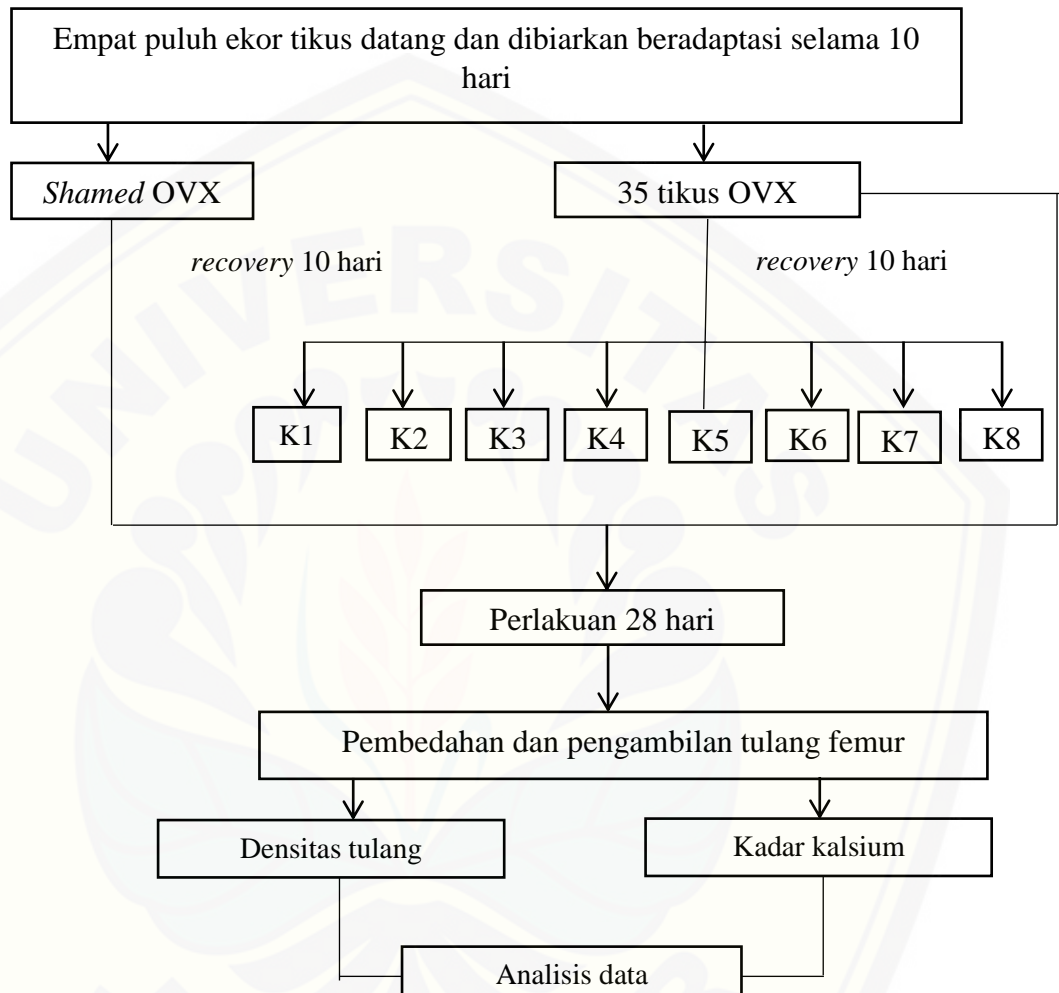
3.7 Skema Penelitian

3.7.1 Pembuatan Edamame Fermentasi



Gambar 3.4 Skema Pembuatan Edamame Terfermentasi

3.7.2 Perlakuan Hewan Uji



Gambar 3.5 Skema Perlakuan Hewan Uji

Keterangan:

K1: Shamed OVX

K2: Kontrol negatif (CMC-Na)

K3: Edamame Terfermentasi dosis 100 mg/kgBB

K4: Edamame Terfermentasi dosis 250 mg/kgBB

K5: Edamame Terfermentasi dosis 500 mg/kgBB

K6: Edamame Terfermentasi dosis 750 mg/kgBB

K7: Edamame Terfermentasi dosis 1000 mg/kgBB

K8: Edamame Terfermentasi dosis 1250 mg/kgBB

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

- a. Pemberian serbuk edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligoporus* mampu memberikan efek yang menguntungkan dalam meningkatkan kadar kalsium dan densitas tulang ovariektomi pada pemberian edamame terfermentasi pada dosis 250, 500, 750 dan 1.000 mg/kgBB
- b. Dosis optimal edamame terfermentasi dalam meningkatkan kadar kalsium adalah dosis 750 mg/kgBB. Dosis optimal edamame terfermentasi dalam meningkatkan densitas tulang adalah dosis 250 mg/kgBB. Dosis optimal meningkatkan densitas tulang sekaligus kadar kalsium tulang adalah dosis 750 mg/kgBB.

5.2 Saran

Saran yang perlu disampaikan pada penelitian ini adalah diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan isolat fitoestrogen edamame terfermentasi untuk meminimalisir interaksi yang tidak diinginkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Brunetti, G., A. Di Benedetto, dan G. Mori. 2018. Bone remodeling. *Encyclopedia of Endocrine Diseases, 2nd Edition*. (January):27–37.
- Caroli, A., A. Poli, D. Ricotta, G. Banfi, dan D. Cocchi. 2011. Invited review: dairy intake and bone health: a viewpoint from the state of the art1. *Journal of Dairy Science*. 94(11):5249–5262.
- Carson, L. C., J. H. Freeman, J. R. Harris, G. E. Welbaum, dan L. C. Carson. 2010. Cultivation and nutritional constituents of virginia grown edamame by cultivation and nutritional constituents of virginia grown edamame
- Daan, N. M. P. dan B. C. J. M. Fauser. 2015. Menopause prediction and potential implications. *Maturitas*. 82(3):257–265.
- Dang, Z. C. dan C. Lowik. 2005. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 16(5)
- Dewi, A. K., C. S. Utama, dan S. Mukodiningsih. 2014. Kandungan total fungi serta jenis kapang dan khamir pada limbah pabrik pakan yang difermentasi dengan berbagai aras starter “starfung”. *Agripet*. 14(2):102–106.
- Edward, J. B., R. A. Benfer, dan J. S. Morris. 1989. The effects of dry ashing on the composition of human and animal bone. *Biological TraceElement Research*. 25
- Elkomy, Magda M. dan F. G. Elsaid. 2015. Anti-osteoporotic effect of medical herbs and calcium supplementation on ovariectomized rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 72:81–88.
- Elkomy, Magda M dan F. G. Elsaid. 2015. The egyptian german society for zoology anti-osteoporotic effect of medical herbs and calcium supplementation on ovariectomized rats. *THE JOURNAL OF BASIC & APPLIED ZOOLOGY*. 72:81–88.
- Fitriah, A. M. 2018. Validasi Metode Dan Penetapan Kadar Genistein Dalam Ekstrak Edamame (Glycine Max L. Merrill) Terfermentasi Kombinasi Aspergillus Oryzae Dan Rhizopus Oligosporus Dengan KLT Densitometri. *skripsi*. Fakultas Farmasi: Universitas Jember.
- Florencio-silva, R., G. Rodrigues, E. Sasso-cerri, M. J. Simões, P. S. Cerri, dan B. Cells. 2015. Biology of bone tissue. *BioMed Research International*. 1–17.
- Gallagher, J. C. dan S. Harsha. 2013. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1–16.

- Hansen, P. J. 2000. *Use of a Hemocytometer*. Florida: University of Florida.
- Humairoh, D. 2017. Identifikasi kapang pada kecap kedelai manis produksi lokal kediri dengan metode pengenceran. *Jurnal Sains Dan Teknologi*. 6(1)
- Hussain, H. dan I. R. Green. 2017. A patent review of the therapeutic potential of isoflavones (2012-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 27(10):1135–1146.
- Imansari, F. 2018. Validasi Metode Dan Pengaruh Fermentasi Kombinasi *Aspergillus Oryzae* Dan *Rhizopus Oligosporus* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine Max L.*) Menggunakan KLT-Densitometri. Universitas Jember.
- Janiszewska, A. S., Stodolak, Dulinski, dan Mickowska. 2012. The influence of inoculum composition on selected bioactive and nutritional parameters of grass pea tempeh obtained by mixed-culture fermentation with *rhizopus oligosporus* and *aspergillus oryzae* strains. *Food Science and Technology International*. 18(2):113–122.
- Kalkan, R. dan P. Tulay. 2018. The interactions between bone remodelling, estrogen hormone and eph family genes. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression*. 28(2):135–138.
- Khajuria, D. K., R. Razdan, dan D. R. Mahapatra. 2012. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Institutional Animal Ethics Committee (IAEC) of Al-Ameen College of Pharmacy*. 52(3):462–466.
- Kini, U. dan B. N. Nandeesh. 2012. *Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism*. Dalam *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. India: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kular, J., J. Tickner, S. M. Chim, dan J. Xu. 2012. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry*. 45(12):863–873.
- Lindsay, R. dan F. Cosman. 2018. Pathogenesis of osteoporosis. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. 1–9.
- Liu, J. Y., T. J. Chen, dan S. J. Hwang. 2016. The risk of breast cancer in women using menopausal hormone replacement therapy in taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13(5)
- Lumsden, M. A. 2016. The nice guideline – menopause: diagnosis and management. *Climacteric*. 19(5):426–429.
- Maslin, K. dan E. Dennison. 2019. *Diet and Bone Health*. Elsevier Inc. *Analysis in Nutrition Research*.

- Mimura, M., C. J. Coyne, M. W. Bambuck, dan T. A. Lumpkin. 2007. Ssr diversity of vegetable soybean [glycine max (l .) merr .]. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54:497–508.
- Mostrom, M. dan T. J. Evans. 2018. *Phytoestrogens*. Edisi Third Edit. Elsevier Inc. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition*.
- Muhammad, A., S. Bello, I. Malami, G. E. Forcados, O. L. Erukainure, H. Sani, dan I. Babangida. 2018. Postmenopausal osteoporosis and breast cancer: the biochemical links and beneficial effects of functional foods. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 107(August):571–582.
- Nikolić, I. L., I. M. Savić-Gajić, A. D. Tačić, dan I. M. Savić. 2017. Classification and biological activity of phytoestrogens : 6(2):96–106.
- Nikolic, I., I. Savic-Gajic, A. Tacic, dan I. Savic. 2017. Classification and biological activity of phytoestrogens: a review. *Advanced Technologies*. 6(2):96–106.
- Oramahi, H. A., C. Sumardiyono, dan N. Pusposendjojo. 2006. Identifikasi Jamur Genus *Aspergillus* Pada Gapek Di Kabupaten Gunung Kidul. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 2006.
- Pusat Data dan Informasi Kesehatan Republik Indonesia. 2015. Data Dan Kondisi Penyakit Osteoporosis Di Indonesia.pdf. Jakarta Selatan. 2015.
- Ralston, S. H. 2017. Bone structure and metabolism. *Medicine (United Kingdom)*. 45(9):560–564.
- Ratna Stia Dewi dan Saefuddin ‘Aziz. 2011. Isolasi rhizopus oligosporus pada beberapa inokulum tempe di kabupaten banyumas. *Molekul*. 6(2):93–104.
- Renge, V. C., S. V Khedkar, dan N. R. Nandurkar. 2012. Enzyme synthesis by fermentation method: a review. *Scientific Reviews & Chemical Communication*. 2(6):585–590.
- Ross, A. C., C. L. Taylor, A. L. Yaktine, dan H. B. Del. 2012. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. 5. *National Academy of Sciences*.
- Sakamoto, T., H. Horiguchi, E. Oguma, dan F. Kayama. 2010. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth , cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 21(9):856–864.
- Salamanna, F., V. Borsari, D. Contartese, N. Nicoli Aldini, dan M. Fini. 2018. Link between estrogen deficiency osteoporosis and susceptibility to bone metastases: a way towards precision medicine in cancer patients. *Breast*. 41:42–50.

- Satphaty, S., A. Patra, dan A. P. Purohit. 2013. Estrogenic effect of punica granatum l. peel extract. *Asian Pasific Journal of Reproduction*. 19–24.
- Shear, M. J. dan B. Kramer. 1927. Composition of bone. analytical micro methods. *Pediatric Research Laboratory*. 1927
- Siefert, W., F. Miessner, H. H. Richter, dan P. Wieland. 2016. Fermentation and its application in vegetable preservation: a review. *Intl. J. Food. Ferment. Technol.* 6(38 , 1983):221–240.
- Sihombing.I.dkk. 2012. Peran estrogen pada remodeling tulang. *Jurnal Biomedik*. 4(3):S18–S28.
- Soewanto, H., A. Prasongko, dan Sumarno. 2013. Agribisnis edamame untuk ekspor. *P*. 417–443.
- Stuenkel, C. A., S. R. Davis, A. Gompel, M. A. Lumsden, M. H. Murad, J. V Pinkerton, dan R. J. Santen. 2015. Treatment of symptoms of the menopause: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 17(6):453–456.
- Tim QC APH, G. J. 2009. *Modul Quality Control (QC) APH Golongan Jamur*. Surabaya: Balai Besar Pembenuhan dan Proteksi Tanaman Perkebunan.
- Tit, D. M., S. Bungau, C. Iovan, D. Carmen, N. Cseppento, L. Endres, C. Sava, A. M. Sabau, G. Furau, dan C. Furau. 2018. Effects of the hormone replacement therapy and of soy isoflavones on bone resorption in postmenopause. *Journal of Clinical Medicine*. 1–13.
- Titchenal, C. A. dan J. Dobbs. 2007. A system to assess the quality of food sources of calcium. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20(8):717–724.
- USDA. 2018. Usda branded food products database release july , 2018 full report (all nutrients) 45343528 , edamame (boiled soy bean), upc : 604215887830. 45343528.
- Vannucci, L., C. Fossi, S. Quattrini, L. Guasti, B. Pampaloni, G. Gronchi, F. Giusti, C. Romagnoli, L. Cianferotti, G. Marcucci, dan M. L. Brandi. 2018. Calcium intake in bone health: a focus on calcium-rich mineral waters. *Nutrients*. 10(12):1930.
- Widati, F. dan I. M. Hidayat. 2012. *Kedelai Sayur (Glycine Max L . Merill)*. Bandung: Balai Penelitian Tanaman Sayuran.
- Xu, Y., A. Cartier, D. Kibet, K. Jordan, I. Hakala, S. Davis, E. Sismour, dan M. Kering. 2016. Physical and nutritional properties of edamame seeds as influenced by stage of development. *Journal of Food Measurement and*

Characterization. 10(2):193–200.

Zhu, K. dan R. L. Prince. 2012. Calcium and bone. *Clinical Biochemistry*. 45(12):936–942.



LAMPIRAN**Lampiran 1: Perhitungan Dosis**

Dosis suspensi edamame terfermentasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis 100, 250, 500, 750, 1000, dan 1250 mg/kgBB.

1. Dosis 100 mg/kgBB

$$\frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{200 \text{ g}}$$

$$X = 20 \text{ mg}$$

$$\frac{20 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{x}{10 \text{ ml}}$$

$$X = 100 \text{ mg}$$

Pembuatan ekstrak dosis 100 mg/kgBB adalah menimbang serbuk sebanyak 100 mg yang digerus dan disuspensikan dengan CMC Na 1% b/v hingga homogen sampai 10 mL.

2. Dosis 250 mg/kgBB

$$\frac{250 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{200 \text{ g}}$$

$$X = 50 \text{ mg}$$

$$\frac{50 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{x}{10 \text{ ml}}$$

$$X = 250 \text{ mg}$$

Pembuatan ekstrak dosis 100 mg/kgBB adalah menimbang serbuk sebanyak 250 mg yang digerus dan disuspensikan dengan CMC Na 1% b/v hingga homogen sampai 10 mL.

3. Dosis 500 mg/kgBB

$$\frac{500 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{200 \text{ g}}$$

$$X = 100 \text{ mg}$$

$$\frac{100 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{x}{10 \text{ ml}}$$

$$X = 500 \text{ mg}$$

Pembuatan ekstrak dosis 500 mg/kgBB adalah menimbang serbuk sebanyak 500 mg yang digerus dan disuspensikan dengan CMC Na 1% b/v hingga homogen sampai 10 mL.

4. Dosis 750 mg/kgBB

$$\frac{750 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{200 \text{ g}}$$

$$X = 150 \text{ mg}$$

$$\frac{150 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{x}{10 \text{ ml}}$$

$$X = 7500 \text{ mg}$$

Pembuatan ekstrak dosis 750 mg/kgBB adalah menimbang serbuk sebanyak 750 mg yang digerus dan disuspensikan dengan CMC Na 1% b/v hingga homogen sampai 10 mL.

5. Dosis 1000 mg/kgBB

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{200 \text{ g}}$$

$$X = 200 \text{ mg}$$

$$\frac{200 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{x}{10 \text{ ml}}$$

$$X = 1000 \text{ mg}$$

Pembuatan ekstrak dosis 1000 mg/kgBB adalah menimbang serbuk sebanyak 1000 mg yang digerus dan disuspensikan dengan CMC Na 1% b/v hingga homogen sampai 10 mL.

6. Dosis 1250 mg/kgBB

$$\frac{1250 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{200 \text{ g}}$$

$$X = 250 \text{ mg}$$

$$\frac{250 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{x}{10 \text{ ml}}$$

$$X = 1250 \text{ mg}$$

Pembuatan ekstrak dosis 1250 mg/kgBB adalah menimbang serbuk sebanyak 1250 mg yang digerus dan disuspensikan dengan CMC Na 1% b/v hingga homogen sampai 10 mL.

Lampiran 2: Hasil Spektrofotometri Serapan Atom (SSA)

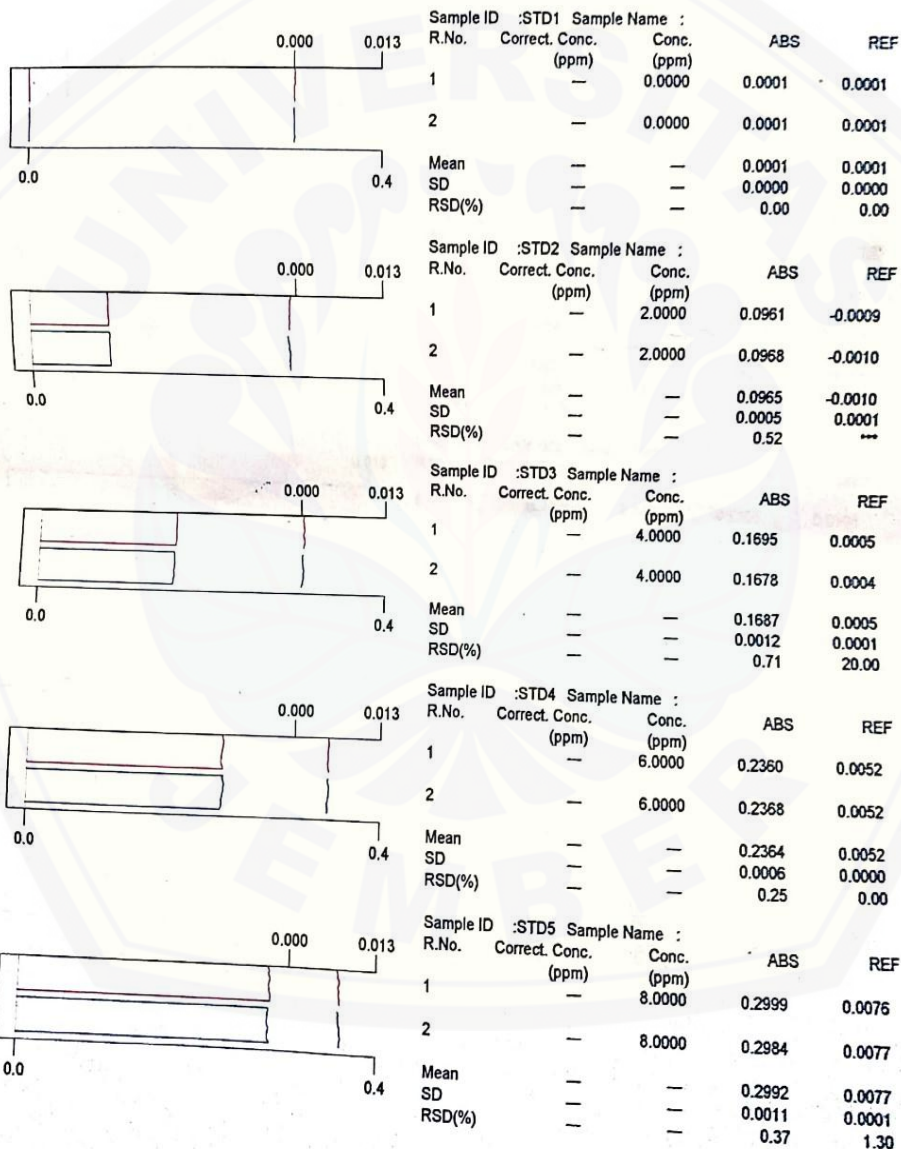
AutoSave2019_0305_1201_49.adf 3/5/2019 12:04:47 PM

Detail Table

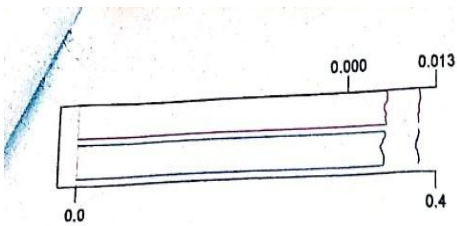
Model : ZA3000 Series Atomic Absorption Spectrophotometer
 Serial No. :
 Analysis Name : Analisa Ca
 Measurement Mode : Flame
 Operator : CDAST, Universitas Jember
 Comment :
 Method File Name : Ca 05-03-19.amf

Meas. Date : 3/5/2019 8:39:52 AM - 3/5/2019 12:01:17 PM
 Recalc. Date : 3/5/2019 12:04:19 PM

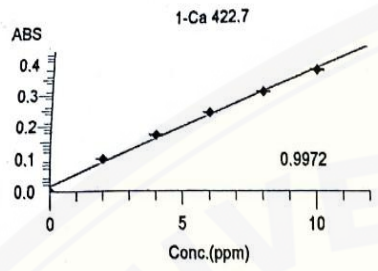
Element : Ca



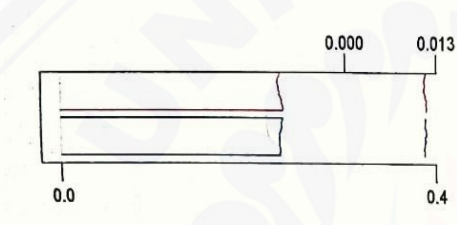
Autosave2019_0305_1201_49.adf 3/5/2019 12:04:47 PM



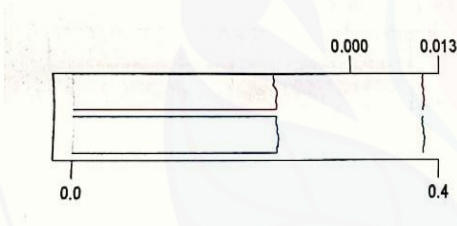
Sample ID	Sample Name	R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF
STD6		1	—	10.000	0.3682	0.0106
		2	—	10.000	0.3653	0.0104
		Mean	—	—	0.3668	0.0105
		SD	—	—	0.0021	0.0001
		RSD(%)	—	—	0.57	0.95



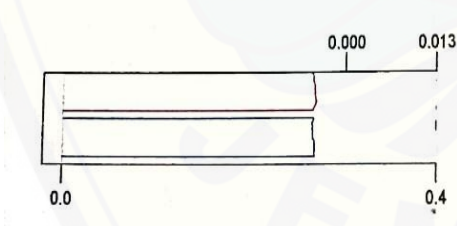
Coefficient : K3 = —
 : K2 = —
 : K1 = 3.584714e-002
 : K0 = 1.538095e-002
 Corr. Coef. : 0.9972
 DL : 0.0000



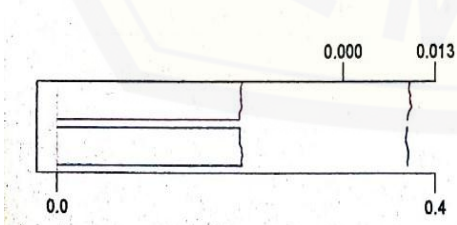
Sample ID	Sample Name	R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF
UNK-001	:1 [2.1 Shamed Ov]	1	3260.0	6.5199	0.2491	0.0115
		2	3264.1	6.5282	0.2494	0.0115
		Mean	3262.1	6.5241	0.2493	0.0115
		SD	2.8991	0.0059	0.0002	0.0000
		RSD(%)	0.09	0.09	0.08	0.00



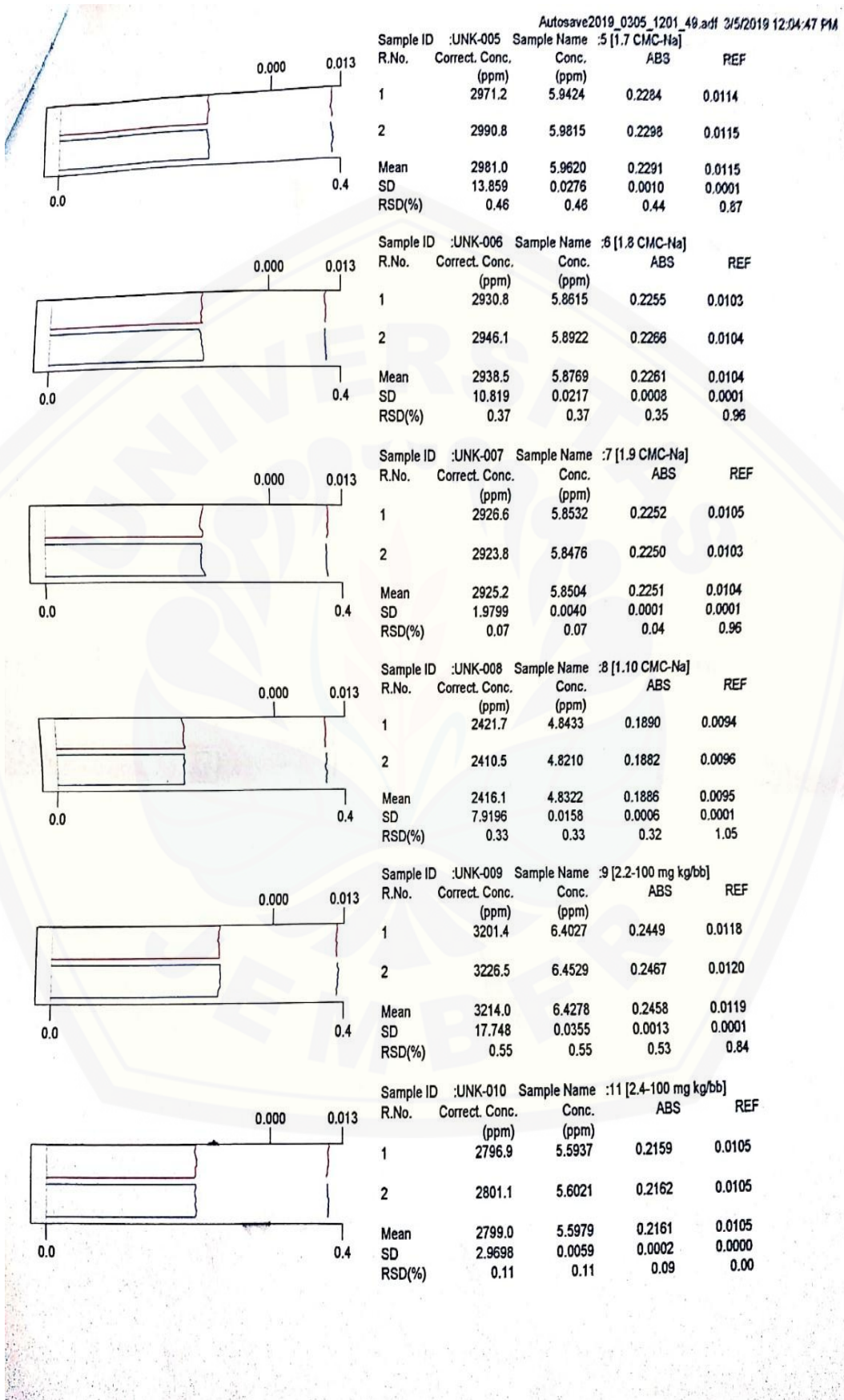
Sample ID	Sample Name	R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF
UNK-002	:2 [3.1 Shamed Ov]	1	3070.3	6.1405	0.2355	0.0108
		2	3101.0	6.2019	0.2377	0.0108
		Mean	3085.7	6.1712	0.2366	0.0108
		SD	21.708	0.0434	0.0016	0.0000
		RSD(%)	0.70	0.70	0.68	0.00

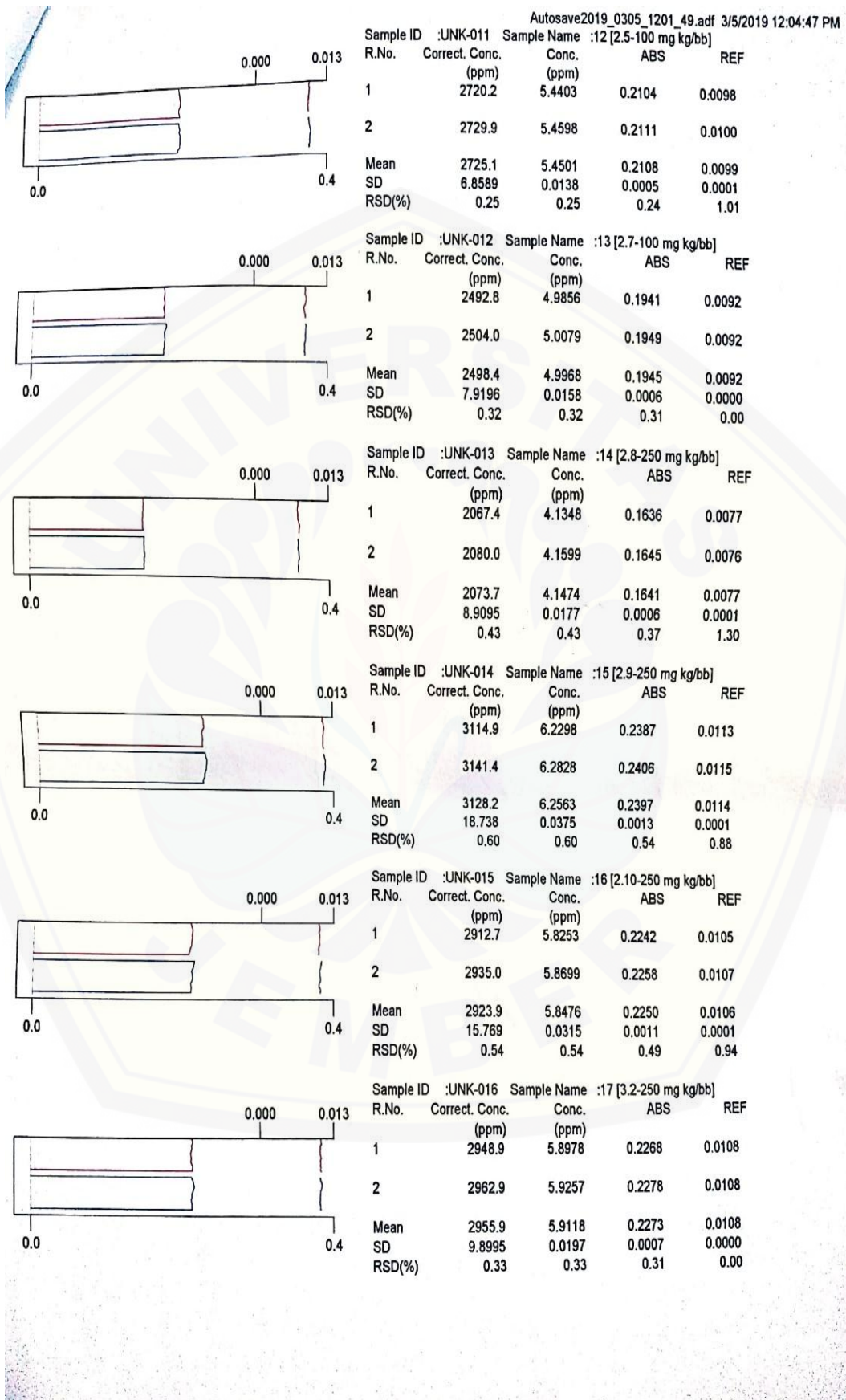


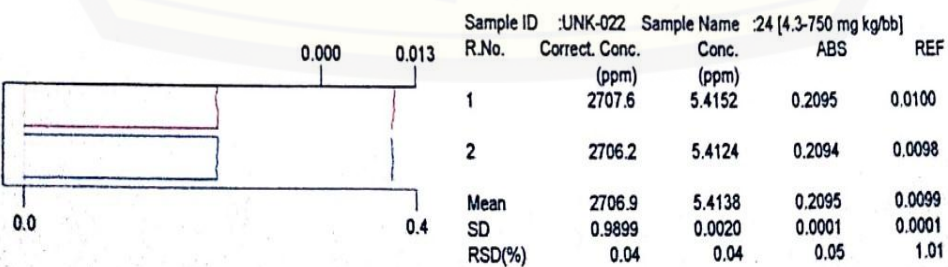
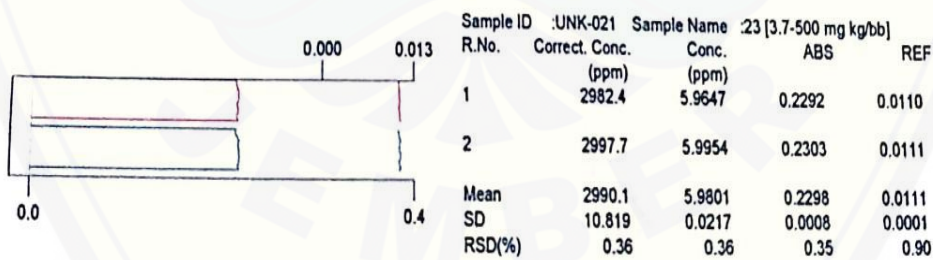
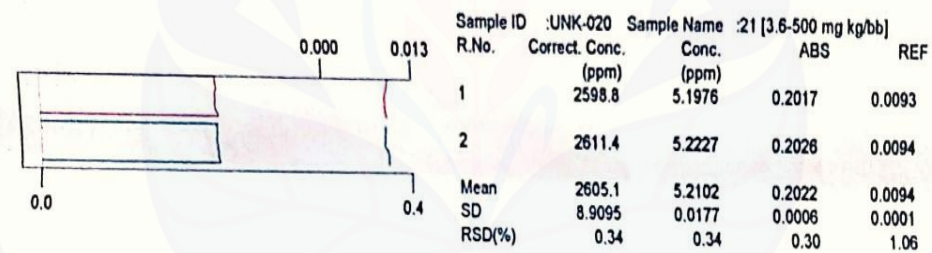
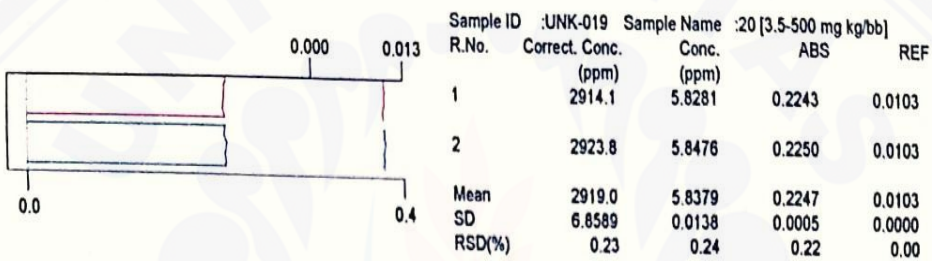
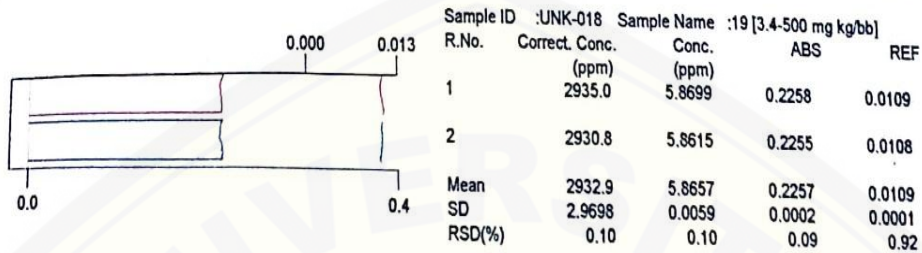
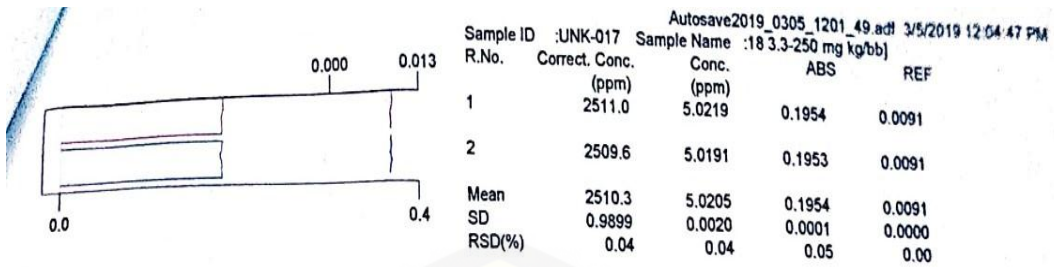
Sample ID	Sample Name	R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF
UNK-003	:3 [4.1 Shamed Ov]	1	3799.8	7.5995	0.2878	0.0132
		2	3785.8	7.5716	0.2868	0.0132
		Mean	3792.8	7.5856	0.2873	0.0132
		SD	9.8995	0.0197	0.0007	0.0000
		RSD(%)	0.26	0.26	0.24	0.00

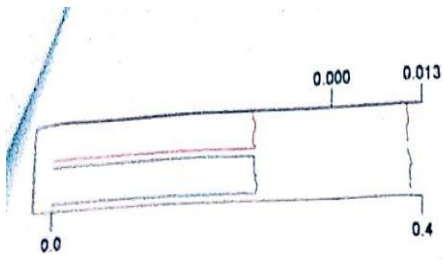


Sample ID	Sample Name	R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF
UNK-004	:4 [5.1 Shamed Ov]	1	2686.7	5.3733	0.2080	0.0095
		2	2689.5	5.3789	0.2082	0.0091
		Mean	2688.1	5.3761	0.2081	0.0093
		SD	1.9799	0.0040	0.0001	0.0003
		RSD(%)	0.07	0.07	0.05	3.23



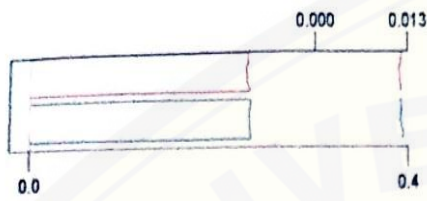




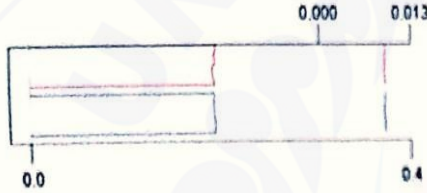


Autosave2019_0305_1201_49 adf 3/5/2019 12:04:47 PM

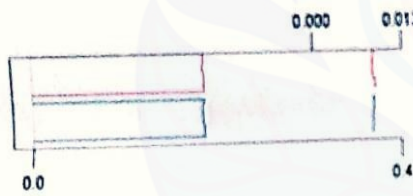
Sample ID	UNK-023	Sample Name	25 [4.4-750 mg kg/bb]		
R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF	
1	3045.2	6.0903	0.2337	0.0110	
2	3068.9	6.1377	0.2354	0.0114	
Mean	3057.1	6.1140	0.2346	0.0112	
SD	16.758	0.0335	0.0012	0.0003	
RSD(%)	0.55	0.55	0.51	2.68	



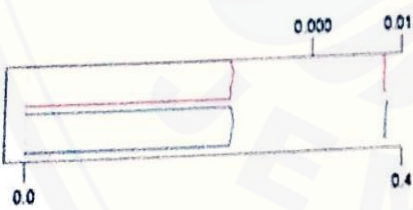
Sample ID	UNK-024	Sample Name	26 [4.5-750 mg kg/bb]		
R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF	
1	3230.7	6.4613	0.2470	0.0120	
2	3257.2	6.5143	0.2489	0.0122	
Mean	3244.0	6.4878	0.2480	0.0121	
SD	18.738	0.0375	0.0013	0.0001	
RSD(%)	0.58	0.58	0.52	0.83	



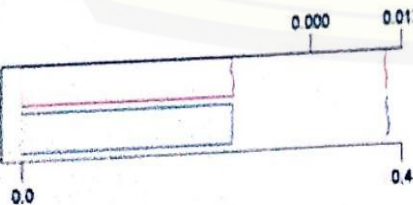
Sample ID	UNK-025	Sample Name	27 [4.6-750 mg kg/bb]		
R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF	
1	2644.9	5.2897	0.2050	0.0094	
2	2647.6	5.2952	0.2052	0.0094	
Mean	2646.3	5.2925	0.2051	0.0094	
SD	1.9092	0.0039	0.0001	0.0000	
RSD(%)	0.07	0.07	0.05	0.00	



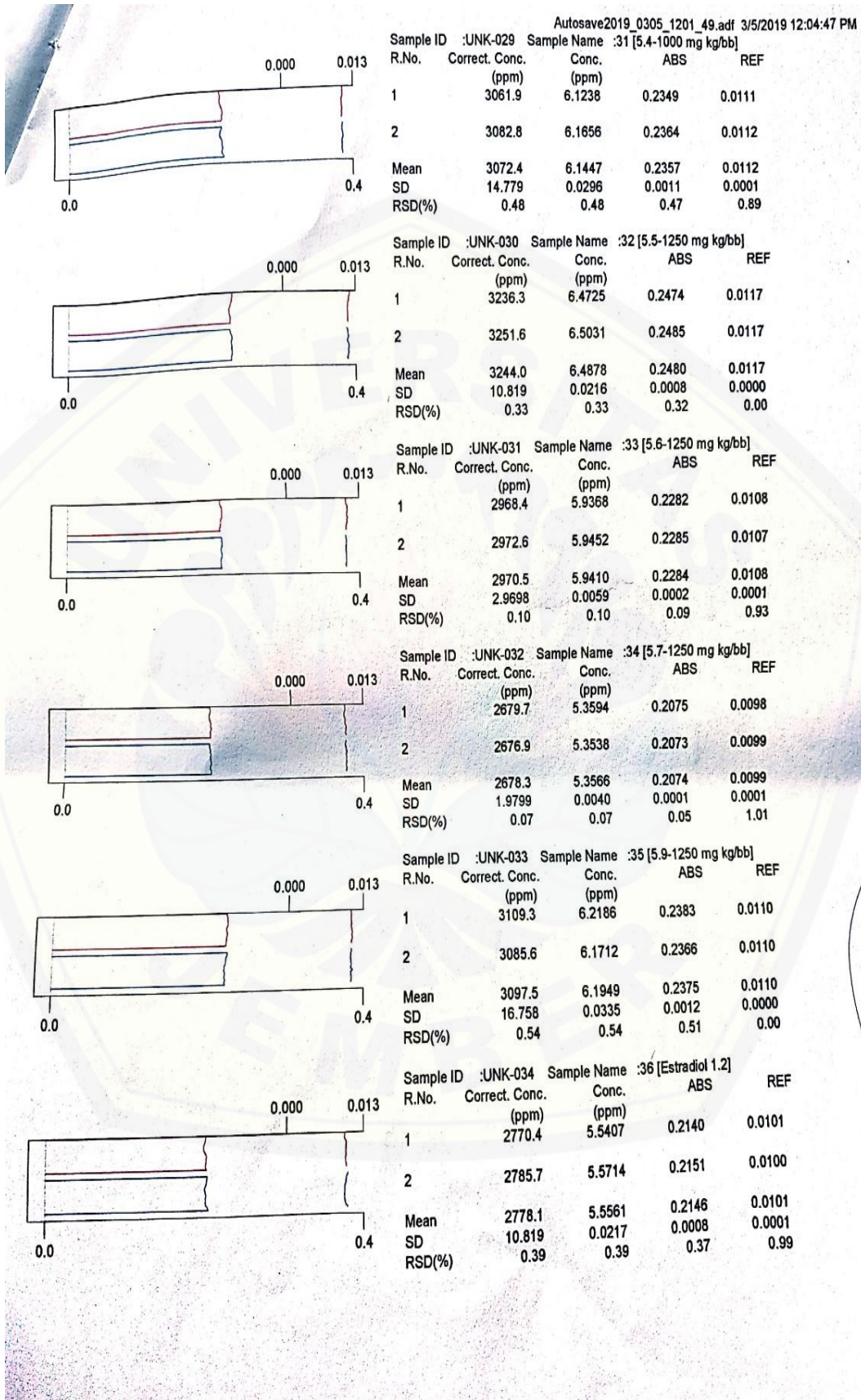
Sample ID	UNK-026	Sample Name	28 [4.7-1000 mg kg/bb]		
R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF	
1	2526.3	5.0525	0.1965	0.0089	
2	2512.3	5.0248	0.1955	0.0088	
Mean	2519.3	5.0386	0.1960	0.0089	
SD	9.8995	0.0197	0.0007	0.0001	
RSD(%)	0.39	0.39	0.36	1.12	

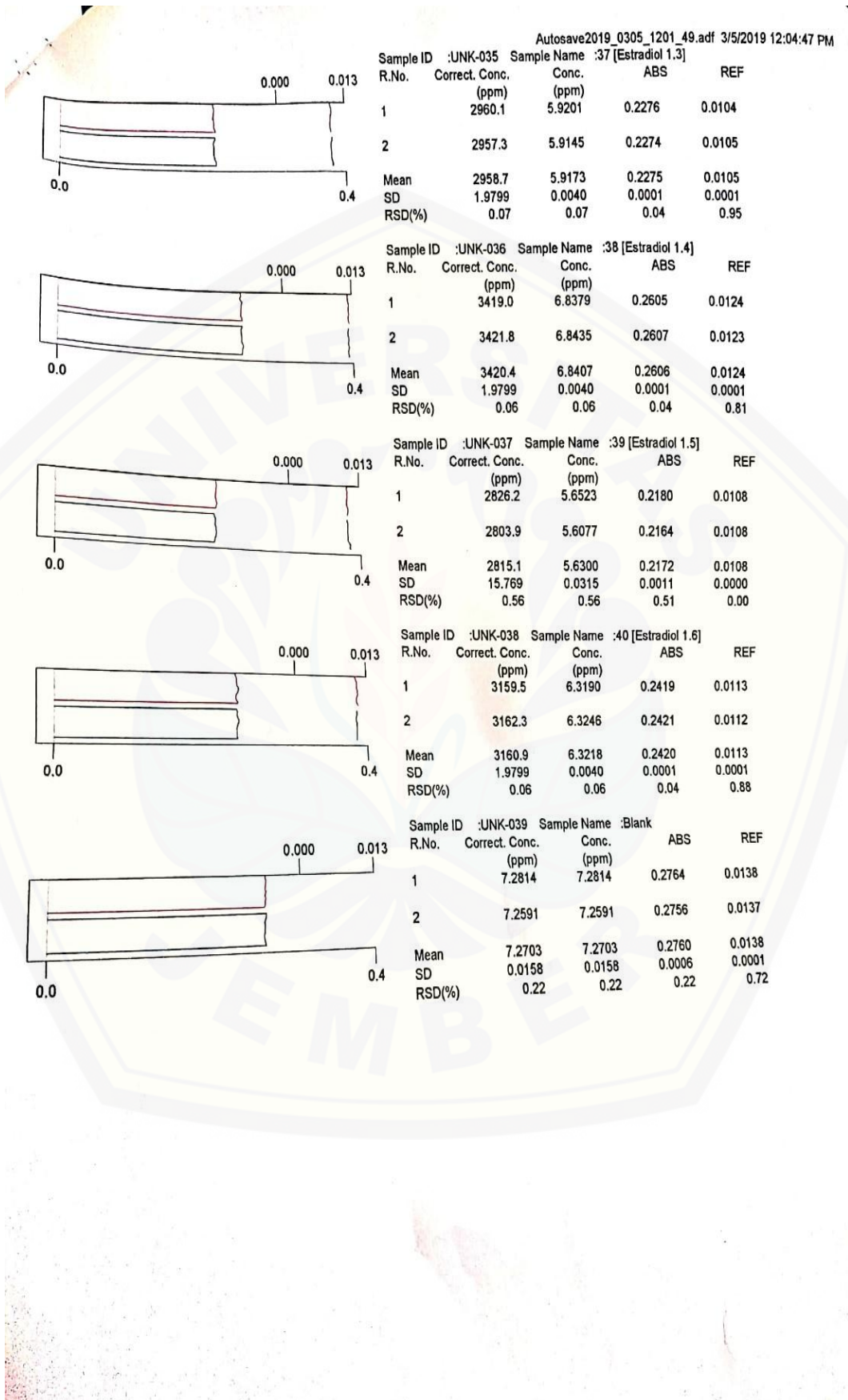


Sample ID	UNK-027	Sample Name	29 [4.8-1000 mg kg/bb]		
R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF	
1	3010.3	6.0205	0.2312	0.0105	
2	3022.8	6.0456	0.2321	0.0107	
Mean	3016.6	6.0331	0.2317	0.0106	
SD	8.8388	0.0177	0.0006	0.0001	
RSD(%)	0.29	0.29	0.26	0.94	



Sample ID	UNK-028	Sample Name	30 [5.2-1000 mg kg/bb]		
R.No.	Correct. Conc. (ppm)	Conc. (ppm)	ABS	REF	
1	3060.5	6.1210	0.2348	0.0108	
2	3056.3	6.1126	0.2345	0.0110	
Mean	3058.4	6.1168	0.2347	0.0109	
SD	2.9698	0.0059	0.0002	0.0001	
RSD(%)	0.10	0.10	0.09	0.92	





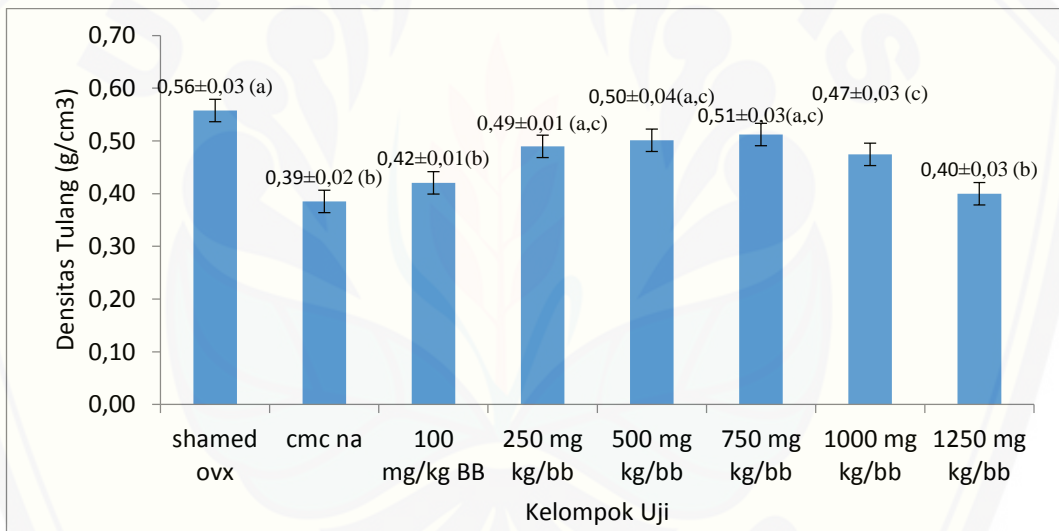
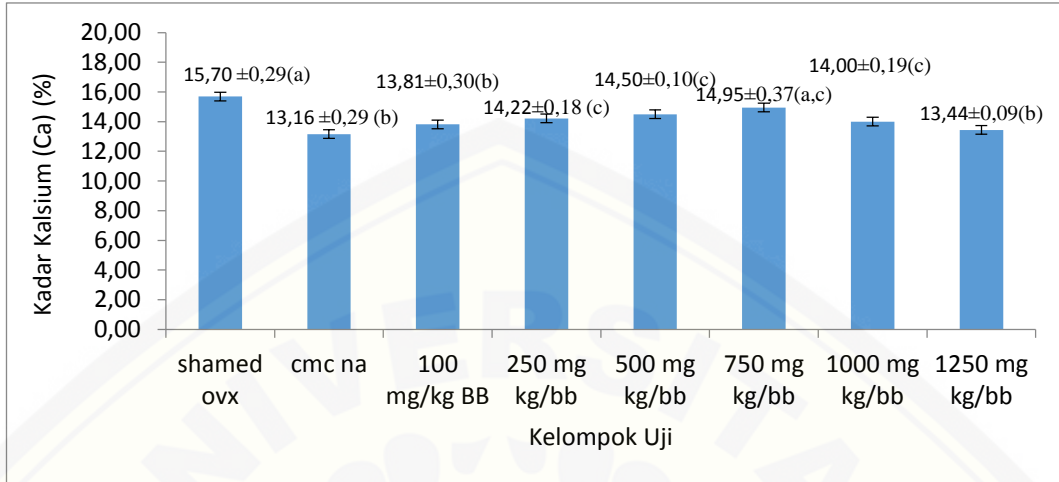
Lampiran 3: Hasil Kadar Kalsium Tulang

No	Sampel	Pengenceran 500x			Bobot (gr)	Bobot (mg)	Kadar (%)	Rerata	SD	SE
		Konsentrasi Ca	Blank	Konsentrasi (Ca-blank)						
1.	2.1 Shamed Ovx	3262,10	7,27	3254,83	0,21	211,15	15,41	15,70	0,59	0,29
2.	3.1 Shamed Ovx	3085,70	7,27	3078,43	0,20	201,88	15,25			
3.	4.1 Shamed Ovx	3792,80	7,27	3785,53	0,23	230,45	16,43			
4.	5.1 Shamed Ovx	2688,10	7,27	2680,83	0,18	177,00	15,15			
5.	1.7 CMC-Na	2981,00	7,27	2973,73	0,22	216,63	13,73	13,37	0,58	0,29
6.	1.8 CMC-Na	2938,50	7,27	2931,23	0,21	211,97	13,83			
7.	1.9 CMC-Na	2925,20	7,27	2917,93	0,22	218,25	13,37			
8.	1.10 CMC-Na	2416,10	7,27	2408,83	0,19	191,80	12,56			
9.	2.2-100 mg/kgBB	3214,00	7,27	3206,73	0,23	228,15	14,06	13,81	0,60	0,30
10.	2.4-100 mg/kgBB	2799,00	7,27	2791,73	0,19	193,50	14,43			
11.	2.5-100 mg/kgBB	2725,10	7,27	2717,83	0,20	197,39	13,77			
12.	2.7-100 mg/kgBB	2498,40	7,27	2491,13	0,19	191,60	13,00			
13.	2.10-250 mg/kgBB	2923,90	7,27	2916,63	0,20	201,08	14,50	14,22	0,37	0,18
14.	3.2-250 mg/kgBB	2955,90	7,27	2948,63	0,20	198,81	14,83			
15.	2.9-250 mg/kgBB	3128,20	7,27	3120,93	0,21	209,55	14,89			
16.	3.3-250 mg/kgBB	2510,30	7,27	2503,03	0,18	177,63	14,09			
17.	3.7-500 mg/kgBB	2990,10	7,27	2982,83	0,20	203,05	14,69	14,50	0,19	0,10
18.	3.6-500 mg/kgBB	2605,10	7,27	2597,83	0,18	182,53	14,23			
19.	3.5-500 mg/kgBB	2919,00	7,27	2911,73	0,21	206,87	14,50			
20.	3.4-500 mg/kgBB	2932,90	7,27	2925,63	0,20	200,80	14,57			
21.	4.4-750 mg/kgBB	3057,10	7,27	3049,83	0,21	210,46	14,49	14,95	0,74	0,37
22.	4.5-750 mg/kgBB	3244,00	7,27	3236,73	0,20	202,18	16,01			
23.	4.3-750 mg/kgBB	2706,90	7,27	2699,63	0,19	187,61	14,39			
24.	4.6-750 mg/kgBB	2646,30	7,27	2639,03	0,18	176,99	14,91			
25.	5.4-1000 mg/kgBB	3072,40	7,27	3065,13	0,21	208,81	14,68	14,00	0,18	0,09
26.	5.2-1000 mg/kgBB	3058,40	7,27	3051,13	0,21	210,93	14,47			
27.	4.7-1000 mg/kgBB	2519,30	7,27	2512,03	0,17	170,06	14,77			
28.	4.8-1000 mg/kgBB	3016,60	7,27	3009,33	0,20	201,94	14,90			
29.	5.9-1250 mg/kgBB	3097,50	7,27	3090,23	0,24	238,98	12,93	13,44	0,56	0,28
30.	5.5-1250 mg/kgBB	3244,00	7,27	3236,73	0,25	247,16	13,10			
31.	5.6-1250 mg/kgBB	2970,50	7,27	2963,23	0,22	218,45	13,56			
32.	5.7-1250 mg/kgBB	2678,30	7,27	2671,03	0,19	188,30	14,18			

Lampiran 4: Hasil Kadar Densitas Tulang

No	Sampel	Bobot (gr)	Volume (cm ³)	Densitas Tulang (g/cm ³)	Rerata	SD	SE
1.	2.1 Shamed Ovx	0,21	0,40	0,53	0,56	0,05	0,03
2.	3.1 Shamed Ovx	0,20	0,33	0,62			
3.	4.1 Shamed Ovx	0,23	0,40	0,58			
4.	5.1 Shamed Ovx	0,18	0,35	0,51			
5.	1.7 CMC-Na	0,22	0,58	0,38	0,38	0,04	0,02
6.	1.8 CMC-Na	0,21	0,50	0,42			
7.	1.9 CMC-Na	0,22	0,55	0,40			
8.	1.10 CMC-Na	0,19	0,60	0,32			
9.	2.2-100 mg/kgBB	0,23	0,60	0,38	0,38	0,01	0,01
10.	2.4-100 mg/kgBB	0,19	0,50	0,39			
11.	2.5-100 mg/kgBB	0,20	0,55	0,36			
12.	2.7-100 mg/kgBB	0,19	0,50	0,38			
13.	2.10-250 mg/kgBB	0,20	0,40	0,50	0,48	0,03	0,01
14.	3.2-250 mg/kgBB	0,20	0,43	0,47			
15.	2.9-250 mg/kgBB	0,21	0,43	0,49			
16.	3.3-250 mg/kgBB	0,18	0,40	0,44			
17.	3.7-500 mg/kgBB	0,20	0,35	0,58	0,50	0,07	0,04
18.	3.6-500 mg/kgBB	0,18	0,45	0,41			
19.	3.5-500 mg/kgBB	0,21	0,40	0,52			
20.	3.4-500 mg/kgBB	0,20	0,40	0,50			
21.	4.4-750 mg/kgBB	0,21	0,35	0,60	0,51	0,06	0,03
22.	4.5-750 mg/kgBB	0,20	0,40	0,51			
23.	4.3-750 mg/kgBB	0,19	0,40	0,47			
24.	4.6-750 mg/kgBB	0,18	0,38	0,47			
25.	5.4-1000 mg/kgBB	0,21	0,40	0,52	0,44	0,06	0,03
26.	5.2-1000 mg/kgBB	0,21	0,45	0,47			
27.	4.7-1000 mg/kgBB	0,17	0,45	0,38			
28.	4.8-1000 mg/kgBB	0,20	0,50	0,40			
29.	5.9-1250 mg/kgBB	0,24	0,60	0,40	0,40	0,06	0,03
30.	5.5-1250 mg/kgBB	0,25	0,55	0,45			
31.	5.6-1250 mg/kgBB	0,22	0,50	0,44			
32.	5.7-1250 mg/kgBB	0,19	0,60	0,31			

Lampiran 5: Grafik Rerata Kalsium Tulang Dan Densitas Tulang



Lampiran 6: Analisis Statistik Kadar Kalsium Tulang**Case Processing Summary**

kode tikus		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
kadar ca	shamed ovx	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	cmc-na	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	100 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	250 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	500 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	750 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	1000 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	1250 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%

Descriptives

kode tikus		Statistic	Std. Error
kadar ca	shamed ovx	Mean	15,560000
		95% Confidence Interval for Lower Bound Mean	,2949011
		Upper Bound	14,621493
		5% Trimmed Mean	16,498507
		Median	15,534444
		Variance	15,330000
		Std. Deviation	,348
		Minimum	,5898022
			15,1500

	Maximum	16,4300	
	Range	1,2800	
	Interquartile Range	1,0000	
	Skewness	1,808	1,014
	Kurtosis	3,328	2,619
cmc-na	Mean	13,372500	,2882815
	95% Confidence Interval for Lower Bound Mean	12,455059	
	Upper Bound	14,289941	
	5% Trimmed Mean	13,392222	
	Median	13,550000	
	Variance	,332	
	Std. Deviation	,5765631	
	Minimum	12,5600	
	Maximum	13,8300	
	Range	1,2700	
	Interquartile Range	1,0425	
	Skewness	-1,374	1,014
	Kurtosis	1,460	2,619
100 mg/kgBB	Mean	13,815000	,3033837
	95% Confidence Interval for Lower Bound Mean	12,849498	
	Upper Bound	14,780502	
	5% Trimmed Mean	13,826111	
	Median	13,915000	
	Variance	,368	

	Std. Deviation	,6067674	
	Minimum	13,0000	
	Maximum	14,4300	
	Range	1,4300	
	Interquartile Range	1,1450	
	Skewness	-,878	1,014
	Kurtosis	,956	2,619
250 mg/kgBB	Mean	14,577500	,1837287
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	13,992793
		Upper Bound	15,162207
	5% Trimmed Mean	14,587222	
	Median	14,665000	
	Variance	,135	
	Std. Deviation	,3674575	
	Minimum	14,0900	
	Maximum	14,8900	
	Range	,8000	
	Interquartile Range	,6825	
	Skewness	-,937	1,014
	Kurtosis	-,680	2,619
500 mg/kgBB	Mean	14,497500	,0974145
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	14,187484
		Upper Bound	14,807516
	5% Trimmed Mean	14,501667	

	Median	14,535000	
	Variance	,038	
	Std. Deviation	,1948290	
	Minimum	14,2300	
	Maximum	14,6900	
	Range	,4600	
	Interquartile Range	,3625	
	Skewness	-1,048	1,014
	Kurtosis	1,586	2,619
750 mg/kgBB	Mean	14,950000	,3708549
	95% Confidence Interval for Lower Bound Mean	13,769774	
	Upper Bound	16,130226	
	5% Trimmed Mean	14,922222	
	Median	14,700000	
	Variance	,550	
	Std. Deviation	,7417097	
	Minimum	14,3900	
	Maximum	16,0100	
	Range	1,6200	
	Interquartile Range	1,3200	
	Skewness	1,500	1,014
	Kurtosis	1,981	2,619
1000 mg/kgBB	Mean	14,705000	,0904157
	95% Confidence Interval for Lower Bound	14,417257	

	Mean	Upper Bound	14,992743	
	5% Trimmed Mean		14,707222	
	Median		14,725000	
	Variance		,033	
	Std. Deviation		,1808314	
	Minimum		14,4700	
	Maximum		14,9000	
	Range		,4300	
	Interquartile Range		,3450	
	Skewness		-,598	1,014
	Kurtosis		,571	2,619
1250 mg/kgBB	Mean		13,442500	,2795346
	95% Confidence Interval for Lower Bound Mean		12,552896	
		Upper Bound	14,332104	
	5% Trimmed Mean		13,430000	
	Median		13,330000	
	Variance		,313	
	Std. Deviation		,5590692	
	Minimum		12,9300	
	Maximum		14,1800	
	Range		1,2500	
	Interquartile Range		1,0525	
	Skewness		,870	1,014
	Kurtosis		-,576	2,619

A. Tes normalitas**Tests of Normality**

kode tikus		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadar ca	shamed ovx	,350	4	.	,787	4	,081
	cmc-na	,248	4	.	,872	4	,307
	100 mg/kgBB	,220	4	.	,962	4	,794
	250 mg/kgBB	,254	4	.	,903	4	,445
	500 mg/kgBB	,255	4	.	,944	4	,676
	750 mg/kgBB	,272	4	.	,848	4	,221
	1000 mg/kgBB	,195	4	.	,983	4	,918
	1250 mg/kgBB	,230	4	.	,934	4	,615

a. Lilliefors Significance Correction

Makna: pada semua kelompok nilai sig >0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data sampel terdistribusi normal.

b. Tes Homogenitas**Test of Homogeneity of Variances**

kadar ca

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,133	7	24	,376

c. One way Anova

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16,348	7	2,335	8,826	,000
Within Groups	6,351	24	,265		
Total	22,699	31			

Makna : Nilai sig > 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data memiliki varian yang sama (*homogen*).

d. post hoc test

e. Multiple Comparisons

Dependent Variable: kadar ca

LSD

(I) kode tikus	(J) kode tikus	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
shamed ovx	cmc-na	2,1875000*	,3637335	,000	1,436791	2,938209
	100 mg/kgBB	1,7450000*	,3637335	,000	,994291	2,495709
	250 mg/kgBB	,9825000*	,3637335	,012	,231791	1,733209
	500 mg/kgBB	1,0625000*	,3637335	,007	,311791	1,813209
	750 mg/kgBB	,6100000	,3637335	,107	-,140709	1,360709
	1000 mg/kgBB	,8550000*	,3637335	,027	,104291	1,605709
	1250 mg/kgBB	2,1175000*	,3637335	,000	1,366791	2,868209
cmc-na	shamed ovx	-2,1875000*	,3637335	,000	-2,938209	-1,436791
	100 mg/kgBB	-,4425000	,3637335	,236	-1,193209	,308209
	250 mg/kgBB	-1,2050000*	,3637335	,003	-1,955709	-,454291
	500 mg/kgBB	-1,1250000*	,3637335	,005	-1,875709	-,374291

	750 mg/kgBB	-1,5775000*	,3637335	,000	-2,328209	-,826791
	1000 mg/kgBB	-1,3325000*	,3637335	,001	-2,083209	-,581791
	1250 mg/kgBB	-,0700000	,3637335	,849	-,820709	,680709
100 mg/kgBB	shamed ovx	-1,7450000*	,3637335	,000	-2,495709	-,994291
	cmc-na	,4425000	,3637335	,236	-,308209	1,193209
	250 mg/kgBB	-,7625000*	,3637335	,047	-1,513209	-,011791
	500 mg/kgBB	-,7825000*	,3637335	,073	-1,433209	,068209
	750 mg/kgBB	-1,1350000*	,3637335	,005	-1,885709	-,384291
	1000 mg/kgBB	-,8900000*	,3637335	,022	-1,640709	-,139291
	1250 mg/kgBB	,3725000	,3637335	,316	-,378209	1,123209
250 mg/kgBB	shamed ovx	-,9825000*	,3637335	,012	-1,733209	-,231791
	cmc-na	1,2050000*	,3637335	,003	,454291	1,955709
	100 mg/kgBB	,7625000*	,3637335	,047	,011791	1,513209
	500 mg/kgBB	,0800000	,3637335	,828	-,670709	,830709
	750 mg/kgBB	-,3725000	,3637335	,316	-1,123209	,378209
	1000 mg/kgBB	-,1275000	,3637335	,729	-,878209	,623209
	1250 mg/kgBB	1,1350000*	,3637335	,005	,384291	1,885709
500 mg/kgBB	shamed ovx	-1,0625000*	,3637335	,007	-1,813209	-,311791
	cmc-na	1,1250000*	,3637335	,005	,374291	1,875709
	100 mg/kgBB	,7825000*	,3637335	,073	-,068209	1,433209
	250 mg/kgBB	-,0800000	,3637335	,828	-,830709	,670709
	750 mg/kgBB	-,4525000	,3637335	,225	-1,203209	,298209
	1000 mg/kgBB	-,2075000	,3637335	,574	-,958209	,543209
	1250 mg/kgBB	1,0550000*	,3637335	,008	,304291	1,805709
750 mg/kgBB	shamed ovx	-,6100000	,3637335	,107	-1,360709	,140709

	cmc-na	1,5775000*	,3637335	,000	,826791	2,328209
	100 mg/kgBB	1,1350000*	,3637335	,005	,384291	1,885709
	250 mg/kgBB	,3725000	,3637335	,316	-,378209	1,123209
	500 mg/kgBB	,4525000	,3637335	,225	-,298209	1,203209
	1000 mg/kgBB	,2450000	,3637335	,507	-,505709	,995709
	1250 mg/kgBB	1,5075000*	,3637335	,000	,756791	2,258209
1000 mg/kgBB	shamed ovx	-,8550000*	,3637335	,027	-1,605709	-,104291
	cmc-na	1,3325000*	,3637335	,001	,581791	2,083209
	100 mg/kgBB	,8900000*	,3637335	,022	,139291	1,640709
	250 mg/kgBB	,1275000	,3637335	,729	-,623209	,878209
	500 mg/kgBB	,2075000	,3637335	,574	-,543209	,958209
	750 mg/kgBB	-,2450000	,3637335	,507	-,995709	,505709
	1250 mg/kgBB	1,2625000*	,3637335	,002	,511791	2,013209
1250 mg/kgBB	shamed ovx	-2,1175000*	,3637335	,000	-2,868209	-1,366791
	cmc-na	,0700000	,3637335	,849	-,680709	,820709
	100 mg/kgBB	-,3725000	,3637335	,316	-1,123209	,378209
	250 mg/kgBB	-1,1350000*	,3637335	,005	-1,885709	-,384291
	500 mg/kgBB	-1,0550000*	,3637335	,008	-1,805709	-,304291
	750 mg/kgBB	-1,5075000*	,3637335	,000	-2,258209	-,756791
	1000 mg/kgBB	-1,2625000*	,3637335	,002	-2,013209	-,511791

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 7: Analisis Statistik Densitas Tulang

Case Processing Summary

Kode tikus		Cases				
		Valid		Missing		Total
		N	Percent	N	Percent	N
densitas tulang	shamed ovx	4	100,0%	0	0,0%	4
	cmc na	4	100,0%	0	0,0%	4
	100 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4
	250 mg/kgBB	3	100,0%	0	0,0%	3
	500 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4
	750 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4
	1000 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4
	1250 mg/kgBB	4	100,0%	0	0,0%	4

Case Processing Summary

Kode tikus		Cases
		Total
		Percent
densitas tulang	shamed ovx	100,0%
	cmc na	100,0%
	100 mg/kgBB	100,0%
	250 mg/kgBB	100,0%
	500 mg/kgBB	100,0%
	750 mg/kgBB	100,0%

1000 mg/kgBB	100,0%
1250 mg/kgBB	100,0%

Descriptives

Kode tikus		Statistic	Std. Error		
densitas tulang	shamed ovx	Mean	,557721	,0257550	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,475757	
			Upper Bound	,639685	
		5% Trimmed Mean	,557085		
		Median	,552000		
		Variance	,003		
		Std. Deviation	,0515101		
		Minimum	,5057		
		Maximum	,6212		
		Range	,1155		
		Interquartile Range	,0987		
		Skewness	,461	1,014	
		Kurtosis	-1,933	2,619	
		cmc na		Mean	,379293
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			,308953	
	Upper Bound			,449633	
5% Trimmed Mean	,380125				
Median	,386783				

	Variance	,002		
	Std. Deviation	,0442051		
	Minimum	,3197		
	Maximum	,4239		
	Range	,1043		
	Interquartile Range	,0832		
	Skewness	-,908	1,014	
	Kurtosis	1,085	2,619	
100 mg/kgBB	Mean	,377335	,0063014	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,357281	
		Upper Bound	,397389	
	5% Trimmed Mean	,377823		
	Median	,381725		
	Variance	,000		
	Std. Deviation	,0126028		
	Minimum	,3589		
	Maximum	,3870		
	Range	,0281		
Interquartile Range	,0218			
250 mg/kgBB	Skewness	-1,714	1,014	
	Kurtosis	3,111	2,619	
	Mean	Lower Bound	,487849	,0104094
		Upper Bound	,532637	

	5% Trimmed Mean	.	
	Median	,493059	
	Variance	,000	
	Std. Deviation	,0180295	
	Minimum	,4678	
	Maximum	,5027	
	Range	,0349	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	-1,192	1,225
	Kurtosis	.	.
500 mg/kgBB	Mean	,486754	,0387844
	95% Confidence Interval for Lower Bound Mean	,363324	
	Upper Bound	,610183	
	5% Trimmed Mean	,486073	
	Median	,480625	
	Variance	,006	
	Std. Deviation	,0775688	
	Minimum	,4056	
	Maximum	,5801	
	Range	,1745	
	Interquartile Range	,1492	
	Skewness	,330	1,014
	Kurtosis	-2,123	2,619
750 mg/kgBB	Mean	,519447	,0284970

	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,428757	
		Upper Bound	,610137	
	5% Trimmed Mean		,517700	
	Median		,503725	
	Variance		,003	
	Std. Deviation		,0569940	
	Minimum		,4690	
	Maximum		,6013	
	Range		,1323	
	Interquartile Range		,1001	
	Skewness		1,485	1,014
	Kurtosis		2,774	2,619
1000 mg/kgBB	Mean		,460161	,0300072
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,364664	
		Upper Bound	,555657	
	5% Trimmed Mean		,461293	
	Median		,470353	
	Variance		,004	
	Std. Deviation		,0600145	
	Minimum		,3779	
	Maximum		,5220	
	Range		,1441	
	Interquartile Range		,1089	
	Skewness		-,979	1,014

	Kurtosis	2,030	2,619
1250 mg/kgBB	Mean	,422115	,0124557
	95% Confidence Interval for Lower Bound Mean	,382476	
	Upper Bound	,461755	
	5% Trimmed Mean	,421924	
	Median	,420390	
	Variance	,001	
	Std. Deviation	,0249115	
	Minimum	,3983	
	Maximum	,4494	
	Range	,0511	
	Interquartile Range	,0466	
	Skewness	,170	1,014
	Kurtosis	-4,561	2,619

Tests of Normality

Kode tikus	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	
densitas tulang	shamed ovx	,219	4	.	,959	4
	cmc na	,227	4	.	,960	4
	100 mg/kgBB	,341	4	.	,824	4
	250 mg/kgBB	,280	3	.	,937	3
	500 mg/kgBB	,209	4	.	,967	4

750 mg/kgBB	,347	4	.	,859	4
1000 mg/kgBB	,307	4	.	,918	4
1250 mg/kgBB	,268	4	.	,885	4

a. Tes normalitas

Tests of Normality

		Shapiro-Wilk ^a
Kode tikus		Sig.
densitas tulang	shamed ovx	,773
	cmc na	,776
	100 mg/kgBB	,152
	250 mg/kgBB	,517
	500 mg/kgBB	,821
	750 mg/kgBB	,257
	1000 mg/kgBB	,525
	1250 mg/kgBB	,362

a. Lilliefors Significance Correction

Makna: pada kelompok uji, nilai sig > 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data sampel terdistribusi normal.

b. Tes homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,989	7	23	,101

Makna : Nilai sig >0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data memiliki varian yang sama (*homogen*).

c. one way ANOVA

ANOVA

densitas tulang

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,117	7	,017	6,917	,000
Within Groups	,055	23	,002		
Total	,172	30			

d. post hoc

3.8 Multiple Comparisons

Dependent Variable: densitas tulang

LSD

(I) Kode tikus	(J) Kode tikus	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
shamed ovx	cmc na	,1784277*	,0347073	,000	,106630	,250225
	100 mg/kgBB	,1803857*	,0347073	,000	,108588	,252183
	250 mg/kgBB	,0698719	,0374882	,075	-,007678	,147422
	500 mg/kgBB	,0709671	,0347073	,052	-,000830	,142765
	750 mg/kgBB	,0382736	,0347073	,282	-,033524	,110071
	1000 mg/kgBB	,0975602*	,0347073	,010	,025763	,169358
	1250 mg/kgBB	,1356054*	,0347073	,001	,063808	,207403
cmc na	shamed ovx	-,1784277*	,0347073	,000	-,250225	-,106630

	100 mg/kgBB	,0019579	,0347073	,956	-,069840	,073755
	250 mg/kgBB	-,1085559*	,0374882	,008	-,186106	-,031006
	500 mg/kgBB	-,1074606*	,0347073	,005	-,179258	-,035663
	750 mg/kgBB	-,1401542*	,0347073	,001	-,211952	-,068357
	1000 mg/kgBB	-,0808675*	,0347073	,029	-,152665	-,009070
	1250 mg/kgBB	-,0428223	,0347073	,230	-,114620	,028975
100 mg/kgBB	shamed ovx	-,1803857*	,0347073	,000	-,252183	-,108588
	cmc na	-,0019579	,0347073	,956	-,073755	,069840
	250 mg/kgBB	-,1105138*	,0374882	,007	-,188064	-,032964
	500 mg/kgBB	-,1094185*	,0347073	,004	-,181216	-,037621
	750 mg/kgBB	-,1421121*	,0347073	,000	-,213910	-,070315
	1000 mg/kgBB	-,0828255*	,0347073	,026	-,154623	-,011028
	1250 mg/kgBB	-,0447802	,0347073	,210	-,116578	,027017
250 mg/kgBB	shamed ovx	-,0698719	,0374882	,075	-,147422	,007678
	cmc na	,1085559*	,0374882	,008	,031006	,186106
	100 mg/kgBB	,1105138*	,0374882	,007	,032964	,188064
	500 mg/kgBB	,0010952	,0374882	,977	-,076455	,078645
	750 mg/kgBB	-,0315983	,0374882	,408	-,109148	,045952
	1000 mg/kgBB	,0276883	,0374882	,468	-,049862	,105239
	1250 mg/kgBB	,0857336*	,0374882	,093	-,011817	,143284
500 mg/kgBB	shamed ovx	-,0709671	,0347073	,052	-,142765	,000830
	cmc na	,1074606*	,0347073	,005	,035663	,179258
	100 mg/kgBB	,1094185*	,0347073	,004	,037621	,181216
	250 mg/kgBB	-,0010952	,0374882	,977	-,078645	,076455
	750 mg/kgBB	-,0326936	,0347073	,356	-,104491	,039104

	1000 mg/kgBB	,0265931	,0347073	,451	-,045204	,098391
	1250 mg/kgBB	,0846383*	,0347073	,075	-,007159	,136436
750 mg/kgBB	shamed ovx	-,0382736	,0347073	,282	-,110071	,033524
	cmc na	,1401542*	,0347073	,001	,068357	,211952
	100 mg/kgBB	,1421121*	,0347073	,000	,070315	,213910
	250 mg/kgBB	,0315983	,0374882	,408	-,045952	,109148
	500 mg/kgBB	,0326936	,0347073	,356	-,039104	,104491
	1000 mg/kgBB	,0592866	,0347073	,101	-,012511	,131084
	1250 mg/kgBB	,0973319*	,0347073	,010	,025534	,169129
	1000 mg/kgBB	shamed ovx	-,0975602*	,0347073	,010	-,169358
cmc na		,0808675*	,0347073	,029	,009070	,152665
100 mg/kgBB		,0828255*	,0347073	,026	,011028	,154623
250 mg/kgBB		-,0276883	,0374882	,468	-,105239	,049862
500 mg/kgBB		-,0265931	,0347073	,451	-,098391	,045204
750 mg/kgBB		-,0592866	,0347073	,101	-,131084	,012511
1250 mg/kgBB		,0880452*	,0347073	,284	-,033752	,109843
1250 mg/kgBB	shamed ovx	-,1356054*	,0347073	,001	-,207403	-,063808
	cmc na	,0428223	,0347073	,230	-,028975	,114620
	100 mg/kgBB	,0447802	,0347073	,210	-,027017	,116578
	250 mg/kgBB	-,0857336*	,0374882	,093	-,143284	,011817
	500 mg/kgBB	-,086383*	,0347073	,075	-,136436	,007159
	750 mg/kgBB	-,0973319*	,0347073	,010	-,169129	-,025534
	1000 mg/kgBB	-,0880452*	,0347073	,284	-,109843	,033752

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 8: Dokumentasi



Edamame segar



Kandang tikus



Ovariektomi



Preparasi kombinasi jamur *A. oryzae* dan *R. oligosporus*



Edamame terfermentasi



Tulang femur



AAS

LAMPIRAN 9

Determinasi Tanaman Edamame



MITRATANI DUA TUJUH
TAKSONOMI TANAMAN EDAMAME

KLASIFIKASI EDAMAME:

Divisi	Spermatophyta
Classis	Dicotyledonae
Ordo	Rosales
Familia	Papilionaceae
Genus	Glycine
Species	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill (TTG Budidaya Pertanian, 2000, 1)

SYARAT TUMBUH EDAMAME:

Edamame memerlukan iklim dengan suhu 26 - 32°C dengan curah hujan relatif tinggi. Pada umumnya pertumbuhan tanaman akan baik pada tanah yang berketetapan 0 - 500 m dpl. Edamame tumbuh baik pada tanah alluvial, regosol, grumosol, latosol dan andosol. Ph tanah 5,8 - 7 dengan aerasi dan drainase yang sesuai. Edamame menghendaki tanah yang subur, gembur dan kaya bahan organik.

Jember, 14 Januari 2019



Edy Zen Yuliantoko
Kepala Divisi Quality Assurance



MITRATANI DUA TUJUH

DISKRIPSI EDAMAME

Glycine max L. Merrill

Var. SPM 1

Tahun Pemakaian Varietas	: 2010
Pemilik	: PT. Mitratani Dua Tujuh Jember
Asal Ginjar	: Seleksi Massa KS3
Daya Hasil	
Segar/basah	: RM : 11.1 – 12.5 ton/ha
	: SQ : 7 – 8 ton/ha
Kering/Bensh	: 850 – 1200 kg/ha
Warna Hipokotil	: Hijau
Warna Epikotil	: Hijau
Warna Daun	: Hijau
Warna Bulu	: Coklat
Warna Bunga	: Putih
Warna Kulit Biji	: Kuning
Warna Polong	
a. Muda	: Merah : Hijau
	: Marang : Hijau
b. Tua	: Cokelat
Warna Kulit biji	
a. Muda	: Hijau
b. Tua	: Kuning
Warna Hilum	: Coklat
Bentuk Daun	: Oval
Bentuk Biji	: Agak Bulat
Tipe Tumbuh	: Determinit
Umur Berbunga	: 23 – 25 hst
Umur Produksi	
a. Segar	: 63 – 68 hst
b. Bensh/Kering	: 87 – 95 hst
Tinggi Tanaman	: 45 - 55 cm
Bobot 100 biji	: 35.4 g
Kandungan Protein	
a. Polong muda – matang	: 11.58
b. Polong Tua/Kering	: 37.97
Kandungan Lemak	
a. Polong muda – matang	: 10.57
b. Polong Tua/Kering	: 22.35
Bentuk Polong	: Lekukan antar biji kelihatan
Jumlah Cabang	: 3 – 4 buah
Aroma Polong	: Biasa
Jumlah Bunga Perpohon	: 40 – 50