



**PENGARUH EDAMAME (*Glycine max* L. Merrill)  
TERFERMENTASI KOMBINASI *Aspergillus oryzae* DAN  
*Rhizopus oligosporus* TERHADAP KADAR HDL DAN LDL  
TIKUS TEROVARIEKTOMI**

**SKRIPSI**

Oleh:

**Muhammad Kholilur Rohman**

**NIM 152210101066**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2019**



**PENGARUH EDAMAME (*Glycine max* L. Merrill)  
TERFERMENTASI KOMBINASI *Aspergillus oryzae* DAN  
*Rhizopus oligosporus* TERHADAP KADAR HDL DAN LDL  
TIKUS TEROVARIEKTOMI**

**SKRIPSI**

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

Oleh:

**Muhammad Kholilur Rohman**

**NIM 152210101066**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2019**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah Subhanahu wa ta'ala dan Nabi Muhammad Shalallahu alaihi wassalam;
2. Orang tua tercinta, Ibu Siti Asiyah, S.Ag dan Ayah Sugiyono, M.Pd 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;
3. Adik-adik dan seluruh keluarga besar, terimakasih atas motivasi dan dukungan untuk mencapai jenjang pendidikan yang lebih tinggi;
4. 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;
5. 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)\*

“Jangan kecewakan amanah orang tua”

“Rumpun bambu terkuat tumbuh diatas tanah yang keras”

(MPA Pring Kuning)

---

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

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Muhammad Kholilur Rohman

NIM : 152210101066

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Pengaruh Edamame (*Glycine max* L. Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar HDL dan LDL Tikus Terovarietomi" 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, 20 Desember 2018

Yang menyatakan,

Muhammad Kholilur Rohman

NIM 152210101066

**SKRIPSI**

**PENGARUH EDAMAME (*Glycine max* L. Merrill)  
TERFERMENTASI KOMBINASI *Aspergillus oryzae* DAN  
*Rhizopus oligosporus* TERHADAP KADAR HDL DAN LDL  
TIKUS TEROVARIEKTOMI**

Oleh:

Muhammad Kholilur Rohman

NIM 152210101066

Pembimbing

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

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Pengaruh Edamame (*Glycine max* L. Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar HDL dan LDL Tikus Terovarietomi” karya Muh. Kholilur R telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 21 Januari 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

Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt  
NIP 198201292009121003

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

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

NIP 197604142002122001

## RINGKASAN

**Pengaruh Edamame (*Glycine max* L. Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar HDL dan LDL Tikus Terovarietomi:** Muhammad Kholilur Rohman: 152210101066; 2019; 78 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Menopause merupakan perubahan alami pada tubuh yang mencakup perubahan biologis yang terkait dengan proses penuaan (Lalo dkk., 2017). Pada wanita yang mengalami menopause terjadi penurunan kadar HDL dan peningkatan kadar LDL yang signifikan setelah sekitar 2,5 tahun akibat penurunan kadar estrogen sehingga menyebabkan percepatan pembentukan aterosklerosis (Connor, 2013). Oleh karena itu, diperlukan asupan estrogen dari luar tubuh untuk menurunkan risiko aterosklerosis pada wanita menopause. Terapi yang biasa digunakan untuk mengatasi kekurangan hormon estrogen adalah dengan menggunakan *hormone replacement therapy* (HRT) (Suvarna, 2010). Seperti semua obat lainnya, HRT dapat menimbulkan efek samping serius yang dapat terjadi. Maka alternatif lain yang dapat digunakan adalah mengonsumsi isoflavon dan kandungan isoflavon paling tinggi terdapat pada tanaman kedelai atau edamame.

Edamame adalah tanaman yang berasal dari Jepang dan merupakan spesies dari kedelai. Kandungan isoflavon utama pada kedelai adalah bentuk glikosidanya (genistin, daidzin, dan glisitin) dan sedikit dalam bentuk aglikon (genistein, daidzein, dan glisitein). Adanya proses fermentasi dapat meningkatkan kandungan isoflavon aglikon pada kedelai. Proses fermentasi edamame menggunakan *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terbukti dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon genistein dan daidzein (Fitriah, 2018; 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 HDL dan LDL pada tikus betina *Sprague Dawley* yang diovariectomi.

Tahap awal yang dilakukan adalah preparasi edamame terfermentasi selama 3 hari sampai didapatkan serbuk edamame terfermentasi. Kemudian serum darah pada masing-masing kelompok uji diambil pada H -1 ovariektomi, H +10 ovariektomi dan H +29 perlakuan. Setelah tikus diovariectomi, masa penyembuhan tikus pasca ovariektomi adalah 10 hari, kemudian dilanjutkan dengan pemberian suspensi serbuk edamame terfermentasi terhadap hewan uji pada kelompok perlakuan selama 28 hari. kemudian serum darah diperiksa kadar HDL dan LDL-nya menggunakan metode enzimatik.

Hasil pemeriksaan kadar HDL dan LDL menunjukkan kadar HDL dan LDL sebelum ovariektomi pada semua kelompok uji memiliki kadar yang berbeda-beda. Terjadi penurunan kadar HDL dan peningkatan kadar LDL setelah ovariektomi yang menunjukkan adanya pengaruh ovariektomi terhadap kadar HDL dan LDL. setelah 28 hari perlakuan, kadar HDL tertinggi pada kelompok perlakuan berturut-turut yaitu pada dosis 1.000, 1.250, 500, 250, 750 dan 100 mg/kgBB. Namun, berdasarkan hasil uji statistik, semua kelompok perlakuan tidak memberikan hasil yang signifikan dengan nilai  $p < 0,05$ . sedangkan nilai LDL kelompok perlakuan didapatkan kadar terendah berturut-turut yaitu pada dosis 750 mg/kgBB yang diikuti dengan dosis 100, 500, 250, 1.000 dan 1.250 mg/kgBB. Berdasarkan analisis



statistik, pada semua kelompok uji memberikan hasil yang tidak berbeda signifikan. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa serbuk edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligoporus* tidak mampu memberikan kenaikan kadar HDL dan penurunan kadar LDL pada tikus yang dilakukan ovariektomi berdasarkan analisis statistik yang tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif.



## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala atas rahmat dan hidayahnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Edamame (*Glycine max* L. Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar HDL dan LDL Tikus Terovarietomi”. 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 penulis untuk menyelesaikan penelitian ini;
4. Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M. Farm.,Apt selaku Dosen Penguji I dan Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt selaku Dosen Penguji II yang dengan sabar memberikan saran terhadap penelitian ini;
5. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., 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, Siti Asiyah S. Ag dan Ayah Sugiyono M. Pd yang selalu mendoakan, mendukung, memotivasi, dan memberikan segalanya yang terbaik kepada penulis dalam mengerjakan skripsi dan penelitian;
8. Pengasuh Pondok Pesantren Al Jauhar, Ibu Nyai Lilik Istiqomah, M.H yang selalu memberikan semangat dan saran-saran terhadap ilmu-ilmu agama dan juga terkait perkuliahan;

9. Teman dekat penulis EW (Coro) yang setia mendoakan, mendukung ,dan membantu penulis mulai awal hingga terselesaikannya penyusunan dan penelitian ini;
10. Keluarga besar UKM PRING KUNING tempat penulis banyak berproses, baik tentang persaudaraan, pengalaman, ilmu dan dukungan kepada penulis dan untuk MPA. PK. IX (Pasang, Kernet, Nesting, Tuttur, Ceret, Poker, Webing, Gudhel) yang selalu bertahan dalam suka maupun duka.
11. Mbak Indri, Mbak Dinik, Mbak Parka dan Ibu Widi selaku teknisi di Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membantu selama penelitian ini;
12. Rekan kerja kelompok dan praktikum (Bagus, Damay, Rima, Ulfia, Intan, Zulfikhar, dan Zubaidah)
13. 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, 21 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTO .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN .....	vii
PRAKATA .....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Tinjauan tentang Edamame Terfermentasi.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Estrogen dan Fitoestrogen.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Tinjauan tentang <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Tinjauan tentang HDL dan LDL .....</b>	<b>13</b>
2.4.1 <i>High density lipoprotein</i> (HDL) .....	13
2.4.2 <i>Low density lipoprotein</i> (LDL).....	13
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>16</b>

3.1.1 Jenis penelitian .....	16
3.1.2 Waktu dan tempat penelitian .....	16
<b>3.2 Variabel Penelitian .....</b>	<b>16</b>
3.2.1 Variabel bebas .....	16
3.2.2 Variabel terikat .....	16
3.2.3 Variabel terkontrol .....	16
<b>3.3 Rancangan Penelitian.....</b>	<b>17</b>
3.3.1 Rancangan operasional.....	17
3.3.2 Definisi operasional.....	17
<b>3.4 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>19</b>
3.4.1 Alat .....	19
3.4.2 Bahan .....	19
<b>3.5 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>19</b>
3.5.1 Preparasi edamame.....	19
3.5.2 Peremajaan isolat <i>A. oryzae</i> dan isolat <i>R. oligosporus</i> .....	19
3.5.3 Pembuatan suspensi spora <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i> .....	20
3.5.4 Perhitungan konsentrasi spora <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i> .....	20
3.5.5 Preparasi edamame terfermentasi.....	22
3.5.6 Persiapan hewan uji.....	22
3.5.7 Ovariectomi.....	22
3.5.8 Perlakuan hewan uji .....	23
3.5.9 Penentuan kadar HDL dan LDL.....	23
<b>3.6 Analisis Data .....</b>	<b>24</b>
<b>3.7 Skema kerja penelitian.....</b>	<b>25</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>26</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN.....</b>	<b>32</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>33</b>
<b>LAMPIRAN 1.....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN 2.....</b>	<b>45</b>

LAMPIRAN 3..... 47



**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1 Tingkatan LDL pada manusia ( <i>American heart association</i> ).....	15
Tabel 4.1 Kadar HDL sebelum ovx, setelah ovx, dan setelah perlakuan.....	27
Tabel 4.2 Kadar LDL sebelum ovx, setelah ovx, dan setelah perlakuan.....	28



**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1	Biji edamame .....	6
Gambar 2.2	Struktur kimia fitoestrogen .....	10
Gambar 2.3	Morfologi kapang <i>Aspergillus oryzae</i> .....	102
Gambar 2.4	Morfologi kapang <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	103
Gambar 3.1	Rancangan penelitian .....	18
Gambar 3.2	Kamar hitung haemasitometer .....	21
Gambar 3.3	Cara menghitung spora menggunakan hemasitometer .....	21
Gambar 3.4	Skema kerja penelitian .....	25
Gambar 4.1	Kadar HDL serum darah sebelum OVX, setelah OVX, dan setelah perlakuan.....	27
Gambar 4.2	Kadar LDL serum darah sebelum OVX, setelah OVX, dan setelah perlakuan.....	28



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Menopause merupakan perubahan alami pada tubuh yang mencakup perubahan biologis yang terkait dengan proses penuaan (Lalo dkk., 2017). Pada wanita yang mengalami menopause terjadi penurunan kadar HDL dan peningkatan kadar LDL yang signifikan setelah sekitar 2,5 tahun sehingga menyebabkan percepatan pembentukan aterosklerosis (Connor, 2013). Aterosklerosis merupakan penyakit peradangan kronis, progresif, dengan fase asimtomatik yang panjang (Toth, 2008). Aterosklerosis ditandai dengan adanya endapan lemak (atheromatus) yang muncul di lapisan dalam arteri (Rafieian dkk., 2014). Perkembangan penyakit ini dapat menyebabkan penyakit kardiovaskular akut, seperti infark miokard, *unstable* angina pectoris dan penyakit jantung koroner (Toth, 2008). Menurut Nathan dan Chaudhuri (1997), pembentukan aterosklerosis dapat dihambat oleh adanya hormon estrogen yang berperan dalam mengubah profil lipoprotein dan mencegah pembentukan LDL oksidatif. Oleh karena itu, diperlukan asupan estrogen dari luar tubuh untuk menurunkan risiko aterosklerosis pada wanita menopause.

Terapi yang biasa digunakan untuk mengatasi kekurangan hormon estrogen adalah dengan menggunakan *hormone replacement therapy* (HRT) (Suvarna, 2010). HRT merupakan kombinasi hormon estrogen dan progesteron sintetis yang digunakan sebagai terapi pengganti hormon yang telah digunakan sejak tahun 1940 (Kopera dan van Keep, 1991). Seperti semua obat lainnya, HRT dapat menimbulkan efek samping. Hasil penelitian pada *women's health initiative* (WHI) terhadap 16.000 wanita dengan usia 50-79 tahun menunjukkan bahwa HRT menghasilkan peningkatan yang signifikan terhadap risiko kanker payudara invasif, penyakit jantung dan stroke masing-masing sebesar 26, 29 dan 41 % (Suvarna, 2010). Selain itu, HRT juga menyebabkan tromboemboli vena (Stevenson, 2016), kejadian kanker endometrium dan kanker payudara (Chlebowski dkk., 2009), serta kandung empedu (Dhiman dan Chawla, 2006). Maka diperlukan molekul pengganti

hormon estrogen yang aman, salah satu cara yang dapat dilakukan yaitu dengan menggunakan senyawa fitoestrogen yang dapat diperoleh dari bahan alam (Moreira dkk., 2014).

Fitoestrogen merupakan bahan kimia yang berasal dari tumbuhan, alternatif populer untuk terapi estrogen/progesteron (Mahmud, 2010). Fitoestrogen memiliki struktur kimia yang serupa dengan estrogen, sehingga diperkirakan bahwa fitoestrogen dapat menggantikan hormon estrogen (Moreira dkk., 2014). Fitoestrogen yang berasal dari kedelai mendapatkan banyak perhatian terutama karena manfaatnya dalam penurunan risiko osteoporosis, penyakit jantung, kanker payudara, dan gejala menopause (Patisaul dan Jefferson, 2010). Studi epidemiologi penggunaan fitoestrogen juga menunjukkan penurunan gejala vasomotor menopause sebesar 30-50 % (Verheus dkk., 2007) dan penurunan risiko kanker payudara sebesar 36 % (Patisaul dan Jefferson, 2010) pada wanita dari negara-negara dengan konsumsi fitoestrogen tinggi, yaitu melalui diet berbasis kedelai.

Salah satu jenis kedelai yang menjadi komoditas hasil pertanian di Kabupaten Jember adalah edamame (Mahanani, 2016). Edamame memiliki kandungan makronutrien seperti karbohidrat, protein dan lemak. Edamame juga mengandung mikronutrien, yang termasuk isoflavon, fitrat, soyaponin, fitosterol, vitamin dan mineral (Moreira dkk., 2014). Fitoestrogen yang umum berasal dari kedelai adalah isoflavon (Dixon, 2009). Isoflavon yang terkandung dalam kedelai berada dalam bentuk  $\beta$ -D-glikosida yaitu genistin dan daidzin (Cederroth dan Nef, 2009). Isoflavon glikosida tersebut memiliki efek yang lebih rendah dibandingkan dengan bentuk aglikonnya (Setchell, 1998). Isoflavon glikosida dapat dihidrolisis oleh enzim  $\beta$ -glukosidase oleh bakteri yang terdapat dinding usus, menghasilkan konversi isoflavon aglikon yang bentuknya lebih aktif secara biologis (Setchell, 1998). Menurut Setyaningsih dkk., (2006), enzim  $\beta$ -glukosidase juga dapat dihasilkan oleh jamur atau kapang. Untuk mendapatkan isoflavon aglikon dari edamame, maka dapat dilakukan proses fermentasi menggunakan jamur atau kapang.

Proses fermentasi edamame terbukti dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon genistein dan daidzein (Fitriah, 2018; Imansari, 2018). Berdasarkan

penelitian Eftekhari dkk (2014), pemberian genistein dan daidzein dapat meningkatkan kadar HDL dengan meningkatkan produksi *Apolipoprotein A*. Selain itu, pada penelitian Kim dkk (2014) pemberian fermentasi susu kedelai yang mengandung daidzein dan genistein dapat menurunkan kadar LDL dengan meningkatkan reseptor LDL. *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* merupakan kapang atau jamur yang biasa digunakan dalam proses fermentasi kedelai. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Imansari (2018), fermentasi edamame dengan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* menunjukkan peningkatan daidzein yang signifikan dibandingkan dengan edamame tak terfermentasi. Begitu pula penelitian Fitriah (2018), fermentasi edamame dengan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* menunjukkan peningkatan kadar genistein. Sehingga pada penelitian ini dilakukan uji pengaruh edamame (*Glycine max* L. Merrill) terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar HDL dan LDL pada tikus betina *Sprague Dawley* yang diovariektomi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka masalah dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

- a. Bagaimanakah pengaruh pemberian edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar HDL tikus yang diovariektomi?
- b. Bagaimanakah pengaruh pemberian edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar LDL tikus yang diovariektomi?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan yang diharapkan dalam penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui pengaruh pemberian edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar HDL tikus yang diovariektomi.

- b. Mengetahui pengaruh pemberian edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar LDL tikus yang diovariectomi.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Berdasarkan tujuan penelitian diatas, maka manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini adalah:

- a. Bagi Peneliti

Penelitian ini dapat memperluas wawasan peneliti mengenai pengaruh pemberian edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar HDL dan LDL tikus yang diovariectomi sehingga diharapkan dapat mengedukasi masyarakat terkait dengan fungsinya dalam masa menopause wanita.

- b. Bagi Institusi

Penelitian ini diharapkan dapat mendukung pencapaian visi, misi dan tujuan Fakultas Farmasi Universitas Jember terkait Tridharma Universitas dan juga menjadi salah satu bahan acuan untuk penelitian selanjutnya untuk pengembangan penelitian sampai tahap uji klinis sebagai salah satu alternatif pengganti HRT yang berbasis bahan alam.

- c. Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan mampu mengedukasi masyarakat mengenai manfaat edamame terfermentasi terhadap masa menopause wanita. Ketersediaan edamame yang melimpah di Kabupaten Jember diharapkan dapat dimanfaatkan semaksimal mungkin agar dapat meningkatkan kualitas hidup dan juga tingkat ekonomi masyarakat.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan tentang Edamame Terfermentasi

Di Kabupaten Jember, kedelai merupakan salah satu komoditas utama hasil pertanian yang bersaing dengan jagung (Mahanani, 2016). Salah satu jenis kedelai yang dikembangkan adalah kedelai asal Jepang yang biasa disebut edamame (Kurniasanti dkk., 2014). Edamame adalah jenis legum yang paling banyak ditanam di dunia karena biasa digunakan sebagai makanan, pakan ternak dan banyak digunakan dalam industri tertentu (Gresshoff, 2017). PT MT 27 adalah industri pembudidaya, pengolah, dan pemasar edamame terbesar di Kabupaten Jember. Edamame yang dihasilkan dijual dalam bentuk segar yang dibekukan untuk kemudian di ekspor ke beberapa negara seperti Jepang, Singapura, Malaysia, USA, Kanada, dan Belanda, namun sejak tahun 2008 telah merambah ke pasar lokal (Kurniasanti dkk., 2014). Berdasarkan data *integrated taxonomic information system* (ITIS) (2018) tanaman edamame diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Superordo	: Rosanae
Ordo	: Fabales
Family	: Fabaceae
Genus	: Glycine Wild.
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L.) Merr.

Edamame dipanen ketika polong kacang berwarna hijau (Gambar 2.1) dan tepat sebelum berubah menjadi kuning/matang (Xu dkk., 2016). Sama halnya

seperti kedelai, edamame memiliki nilai gizi dan obat yang tinggi (Konovsky dkk., 1994).



Gambar 2.1 Biji edamame (PT Mitra Tani 27, 2017)

Hal tersebut karena edamame memiliki kandungan protein yang tinggi, lemak, fosfolipid, fosfor, kalsium, besi, thiamin, riboflavin, vitamin E, serat dan kandungan isoflavon (Basavaraja dan Salimath, 2005; Hu dkk., 2006). Kandungan isoflavon tertinggi terdapat pada awal kematangan biji yang hampir 90% terdapat di kotiledon (Kartini, 2015). Isoflavon memiliki efek penurunan risiko osteoporosis, penyakit jantung, kanker payudara, dan gejala menopause (Patisaul dan Jefferson, 2010). Kedelai juga memiliki potensi untuk pencegahan dan penekanan kanker karena kandungan genisteinnya yang tinggi (Huang dkk., 2014). Studi klinis menunjukkan bahwa isoflavon pada protein kedelai memiliki pengaruh positif terhadap substansi darah dan mengurangi risiko penyakit kardiovaskular (Mentreddy dkk., 2002).

Isoflavon yang terkandung dalam kedelai berada dalam bentuk  $\beta$ -D-glikosida (Cederroth dan Nef, 2009). Isoflavon glikosida memiliki efek yang lebih rendah dibandingkan isoflavon aglikon (Setchell, 1998). Isoflavon glikosida dapat dihidrolisis oleh enzim  $\beta$ -glukosidase oleh bakteri yang terdapat dinding usus, menghasilkan konversi isoflavon aglikon yang bentuknya lebih aktif secara biologis (Setchell, 1998). Selain itu, isoflavon glikosida juga dapat diubah menjadi isoflavon aglikon melalui proses fermentasi (Yunindarwati dkk., 2016). Peningkatan jumlah isoflavon aglikon selama proses fermentasi terjadi akibat aktivitas enzim dari

mikroorganisme yang disebut  $\beta$ -glukosidase (Punjaisee dkk., 2011). Enzim  $\beta$ -glukosidase merupakan enzim utama dalam metabolisme karbohidrat yang berlangsung di bakteri. Enzim ini memiliki peranan penting dalam proses biotransformasi, seperti degradasi selulosa, sianogenik glukosida dan perubahan flavonoid glukosida (Yunindarwati dkk., 2016). Proses peningkatan konsentrasi aglikon karena aktivitas mikroba dapat meningkatkan bioavailabilitas isoflavon aglikon dalam tubuh manusia (Haron dkk., 2009). Bentuk aglikon yang terdapat dalam edamame yaitu genistein, daidzein dan glisitein yang memiliki aktivitas mencegah menopause dini (Amato dkk., 2013).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Naufalia (2018), edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* menunjukkan penurunan kadar daidzein pada hari 1, namun terjadi peningkatan pada hari ke 2,3, dan 4. Peningkatan kadar genistein optimal pada hari kedua fermentasi edamame oleh *R. oligosporus* (Novitasari, 2018). Fermentasi edamame oleh *A. oryzae* juga menunjukkan peningkatan kadar daidzein pada hari ke 4 dibandingkan edamame non fermentasi (Sutatik, 2018). Penelitian fermentasi edamame dengan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dilakukan oleh (Imansari, 2018), menunjukkan peningkatan daidzein yang signifikan dibandingkan dengan edamame tak terfermentasi. Begitu pula penelitian Fitriah (2018), fermentasi edamame dengan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* menunjukkan peningkatan kadar genistein. Berdasarkan penelitian tersebut, kandungan isoflavon (genistein dan daidzein) menunjukkan peningkatan kadar setelah proses fermentasi. Isoflavon tersebut merupakan salah satu kelas dari fitoestrogen yang merupakan bahan kimia tumbuhan yang dapat digunakan sebagai alternatif terapi pengganti estrogen karena memiliki struktur mirip dengan struktur kimia  $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$  (Mahmud, 2010).

## 2.2 Estrogen dan Fitoestrogen

Estrogen merupakan hormon steroid, yang menghasilkan dan mengatur siklus menstruasi. Estrogen diproduksi oleh sel teka interna ovarium yang dihasilkan dari konversi kolesterol menjadi androsten-dion dan testosteron

kemudian diubah menjadi estron dan estradiol dalam sel granulosa (Porter dkk., 1991). Estrogen juga dapat diproduksi di korpus luteum, plasenta (Endo dkk., 1998), kelenjar adrenalin, jaringan adiposa, otak dan payudara (Walf dkk., 2011). Estrogen mendukung pengembangan dan pemeliharaan sistem reproduksi wanita, termasuk pengembangan payudara, bentuk tubuh, distribusi jaringan adiposa pada usus, dan perubahan kadar estrogen pada saluran genital wanita (Nilsson dkk., 2001). Estrogen utama adalah 17- $\beta$ -estradiol yang diproduksi sebanyak 700  $\mu$ g sehari di folikel ovarium tergantung pada fase siklus menstruasinya (Moenter dkk., 2003; Kumar dkk., 2010). Efek intraseluler estrogen diatur oleh reseptor estrogen dalam transkripsi gen melalui pengikatan sekuens target DNA spesifik yang disebut *estrogen responsive elements* (ERE) (Welboren dkk., 2007). Efek spesifik jaringan dimediasi oleh dua subtipe reseptor estrogen yang berbeda, yaitu  $\alpha$  dan  $\beta$ , serta oleh beberapa co-regulator. Reseptor estrogen  $\alpha$  dominan pada kelenjar susu dan di uterus dan reseptor estrogen  $\beta$  memiliki peran dominan dalam sistem saraf pusat, jantung, sistem kekebalan tubuh, saluran urogenital, tulang, ginjal, dan paru-paru. Reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  ditemukan di sitoplasma dan nukleus (Gustafsson, 2000).

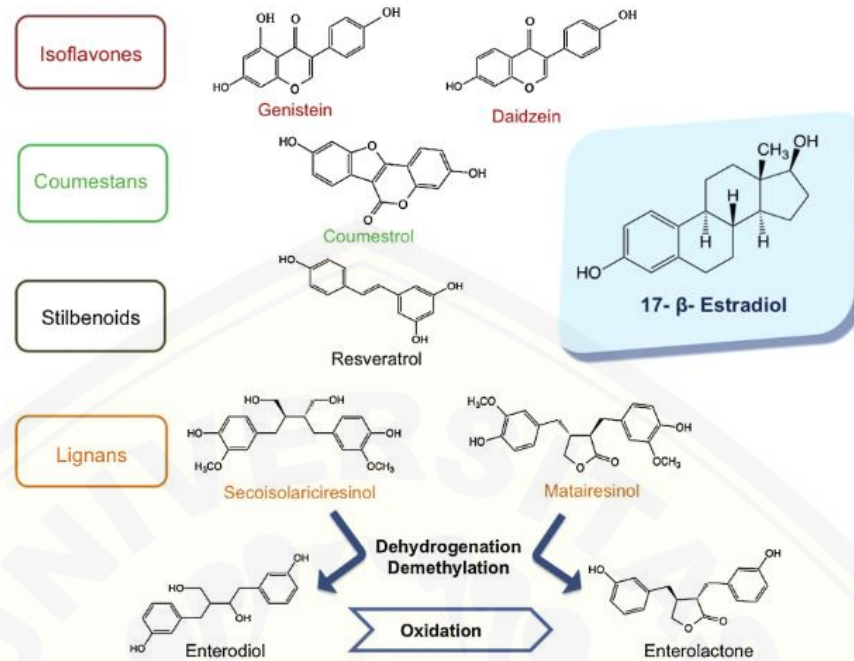
Penurunan kadar estrogen dapat terjadi seiring dengan proses penuaan sehingga menyebabkan berakhirnya masa menstruasi (menopause). Transisi menopause dimulai saat terjadi fluktuasi siklus menstruasi, yang menyebabkan peningkatan hormon stimulasi folikel (FSH). Rata-rata, menopause terjadi ketika wanita berusia sekitar 51,4 tahun (McKinlay dkk., 1996). Kondisi yang dapat mempengaruhi onset menopause, seperti umur, etnis, indeks massa tubuh dan riwayat kesehatan keluarga (Melby dkk., 2005). Menopause juga dapat disebabkan oleh kemoterapi (Shifren dan Avis, 2007), dan radiasi (Sakata dkk., 2011). Menopause dapat memicu beberapa perubahan dalam tubuh dan meningkatkan risiko pengembangan beberapa patologi klinis, seperti penyakit kardiovaskular (Hutter dkk., 2012) dan osteoporosis (Crepaldi dan Maggi, 2009). Wanita memiliki risiko penyakit kardiovaskular lebih rendah dibandingkan pria pada usia yang sama, namun meningkat ketika memasuki masa menopause (Oliveira dkk., 2012). Selain itu, pada wanita menopause juga terjadi peningkatan risiko osteoporosis karena percepatan reabsorpsi tulang dan penurunan pembentukan tulang (Gallagher dkk.,



2002). Untuk mengatasi gejala menopause, terapi *hormone replacement therapy* (HRT) dapat diberikan kepada wanita menopause dan premenopause.

HRT merupakan kombinasi hormon estrogen dan progesteron sintetis yang digunakan sebagai terapi pengganti hormon yang telah digunakan sejak tahun 1940 (Gunderson dkk., 2012). Seperti semua obat lainnya, HRT dapat menimbulkan efek samping. *Women Health initiative* (WHI) menunjukkan bahwa HRT menghasilkan peningkatan insidensi stroke (Renoux dkk., 2010) dan thromboembolisme andvenous (Stevenson, 2016). Hasil dari penelitian WHI tahun 2002 sebelumnya juga menunjukkan bahwa HRT berbasis estrogen memiliki efek negatif pada wanita pasca menopause (Rossouw dkk., 2002), termasuk peningkatan yang signifikan dalam kejadian kanker payudara, penyakit jantung, emboli paru dan demensia vaskular pada sekelompok wanita menopause berusia di atas 65 tahun. HRT juga meningkatkan kejadian kanker endometrium dan kanker payudara (Chlebowski dkk., 2009), serta kandung empedu (Dhiman dan Chawla, 2006) dan penyakit ovarium (Argento dkk., 2008). Hasil dari berbagai sumber menunjukkan bahwa penggunaan HRT perlu dilakukan secara hati-hati serta analisis risiko dan manfaat terapi harus diperhatikan. Berdasarkan masalah yang terkait dengan HRT maka perlu penggantian estrogen oleh molekul lain yang lebih aman, salah satunya menggunakan fitoestrogen (Moreira dkk., 2014).

Fitoestrogen merupakan kelompok bahan kimia berasal dari tumbuhan yang biasa digunakan sebagai alternatif untuk terapi estrogen/progesteron karena memiliki struktur yang mirip dengan struktur kimia 17- $\beta$ -estradiol (Mahmud, 2010). Fitoestrogen diklasifikasikan dalam empat kelas utama yaitu isoflavon, lignan, coumestans dan stilbenes (Gambar 2.2). Baik isoflavon dan lignan disimpan dalam vakuola tumbuhan dengan bentuk glikosida (Adlercreutz, 2007). Isoflavon umumnya berasal dari kedelai dengan kandungan glikosida tertinggi yaitu genistein, daidzein, dan glisitein (Dixon, 2009). Lignan adalah fitoestrogen yang paling umum di alam dan banyak ditemukan dalam biji rami, biji gandum dan gandum hitam. Coumestans dan stilbenes merupakan jenis fitoestrogen yang ketersediaannya kurang melimpah di alam (Dixon, 2009).



Gambar 2.2 Struktur kimia fitoestrogen yaitu isoflavon, lignans, coumestans dan stilbenes yang menunjukkan kemiripan struktur dengan hormone estrogen wanita (Moreira dkk., 2014)

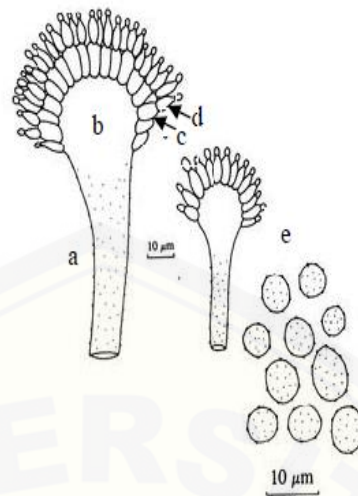
Fitoestrogen memiliki cincin fenolik yang dapat berikatan dengan reseptor estrogen, selain itu fitoestrogen juga memiliki berat molekul yang mirip dengan 17-β-estradiol yang dapat bekerja sebagai agonis atau antagonis reseptor estrogen. Efek seluler dari fitoestrogen dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu konsentrasi, status reseptor, ada atau tidaknya estrogen endogen dan jaringan target (Setchell, 1998). Fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen  $\alpha$  atau reseptor estrogen  $\beta$ , dengan afinitas yang lebih tinggi terhadap reseptor estrogen  $\beta$  (Barone dkk., 2008).

Penggunaan fitoestrogen sebagai alternatif untuk HRT didapatkan dari observasi terkait gejala dan patologi menopause dengan kadar estrogen rendah. Penurunan tingkat estrogen selama masa menopause dapat mengakibatkan perkembangan penyakit kardiovaskular (Vassalle dkk., 2009; Oliveira dkk., 2012). Beberapa fitoestrogen dapat melindungi jantung dengan mengurangi kadar kolesterol dalam plasma, salah satunya adalah genistein yang menunjukkan efek farmakologis setelah kondisi iskemik (Tissier dkk., 2007). Kandungan isoflavon yang tinggi dalam kedelai mampu mencegah aterosklerosis dan resiko penyakit kardiovaskular terkait dengan defisiensi estrogen pada wanita menopause.. Salah

satu metode yang dapat digunakan untuk pengujian aktivitas isoflavon adalah metode ovariektomi terhadap hewan coba. Ovariektomi pada tikus betina umum dilakukan karena tikus betina sensitif terhadap hilangnya hormon yang dihasilkan ovarium sehingga dapat menunjukkan karakteristik menopause wanita. Menurut Nathan dan Chaudhuri, (1997) hormon estrogen berperan dalam mengubah profil lipoprotein yaitu dengan menaikkan kadar HDL dan menurunkan kadar LDL. Berdasarkan penelitian Eftekhari dkk (2014), pemberian genistein dan daidzein dapat meningkatkan kadar HDL dengan meningkatkan produksi *Apolipoprotein A*. Selain itu, pada penelitian Kim dkk (2014), pemberian fermentasi susu kedelai yang mengandung daidzein dan genistein dapat menurunkan kadar LDL dengan meningkatkan reseptor LDL. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian aktivitas edamame terfermentasi terhadap kadar HDL dan LDL tikus ovariektomi.

### **2.3 Tinjauan tentang *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus***

*A. Oryzae* adalah salah satu spesies yang penting dalam proses fermentasi beberapa makanan tradisional dan juga dapat digunakan untuk memproduksi enzim. *A. oryzae* digunakan untuk fermentasi tahap pertama pada proses pembuatan kecap (Fardiaz, 1992). *A. oryzae* merupakan anggota dari kelompok *A. flavus*. Selain itu, *A. sojae*, *A. nomius* dan *A. parasiticus* juga termasuk dalam kelompok *A. flavus* (Elbashiti dkk., 2010). *A. oryzae* memiliki kepala konidia berbentuk bulat, berwarna hijau-kekuningan, dan apabila tua menjadi coklat redup. Perkembangbiakan secara vegetatif dilakukan dengan menggunakan konidia, sedangkan pembiakkan secara generatif menggunakan spora yang terbentuk dalam askus. Kegunaan dari jamur *A. oryzae* yaitu berguna dalam pembuatan kecap, minuman, dan etanol (Dwidjoseputro, 1990). Pertumbuhan *A.oryzae* memerlukan kondisi aerobik, dengan suhu optimal pertumbuhan sebesar 32 – 36 °C (Barbesgaard dkk., 1992).



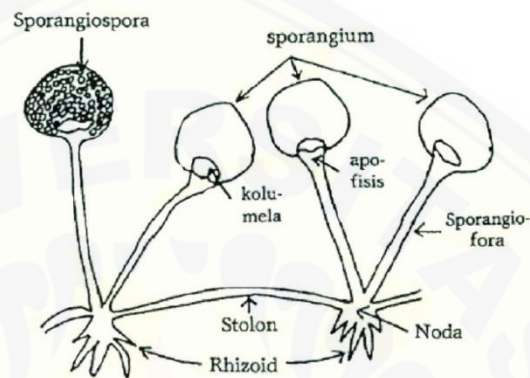
Gambar 2.3 Morfologi kapang *A.oryzae* (a) Konidiofor (b) Vesikel (c) Metula (d) Fialid (e) Konidia (Gandjar dkk., 1999)

Menurut Uniprot (2018), taksonomi *A. oryzae* adalah sebagai berikut:

Domain	: Eukariot
Kingdom	: Fungi
Subkingdom	: Dikarya
Filum	: Ascomycota
Subfilum	: Pezizomycotina
Kelas	: Eurotiomycetes
Subkelas	: Eurotiomycetidae
Ordo	: Eurotiales
Famili	: Aspergillaceae
Genus	: Aspergillus
Spesies	: <i>Aspergillus oryzae</i>

Selain *A. oryzae*, salah satu kapang yang berperan dalam proses fermentasi tempe adalah *R. oligosporus*. *R. oligosporus* memiliki koloni abu-abu kecoklatan dengan tinggi 1 mm atau lebih. Sporangiofor tunggal atau dalam kelompok dengan dinding halus atau agak sedikit kasar, dengan panjang lebih dari 1000 μm dan diameter 10–18 μm. Sporangia globosa yang pada saat masak berwarna hitam kecoklatan, dengan diameter 100–180 μm (Wipradnyadewi dkk., 2004). Kapang

*Rhizopus* memiliki ciri spesifik yaitu mempunyai hifa tidak bersepta dengan stolon dan rizhoid serta spora berwarna gelap ketika sudah tua. Hifa vegetatif pada *Rhizopus* akan melakukan penetrasi pada substrat dan memiliki pertumbuhan yang cepat dalam membentuk miselium (Fardiaz, 1992). Morfologi kapang *R. oligosporus* dapat dilihat pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Morfologi kapang *R. oligosporus* (Fardiaz, 1992).

Klasifikasi kapang *R. oligosporus* menurut *New Zeland Organism Register* (2016) :

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Zygomycota
Subphylum	: Mucoromycotina
Order	: Mucorales
Family	: Rhizopodaceae
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Species	: <i>Rhizopus oligosporus</i> Saito

## 2.4 Tinjauan tentang HDL dan LDL

### 2.3.1 High density lipoprotein (HDL)

*High density lipoprotein* (HDL) merupakan partikel heterogen yang memiliki densitas tinggi dibandingkan lipoprotein lain serta memiliki ukuran yang kecil dan mengandung 52% protein dan 48% lemak (Zhou dkk., 2015). HDL juga disebut sebagai kolesterol baik karena memiliki efek antiaterogenik kuat

(Almatsier, 2003). HDL mengandung kolesterol paling sedikit dibandingkan dengan lipoprotein LDL. HDL disintesis di hati dan intestinum dan memiliki peran dalam proses pengeluaran kolesterol di dalam jaringan yang kemudian diangkut ke hati untuk dikonversi menjadi asam empedu. Sebagian besar lipid dalam HDL diperoleh dari lapisan kilomikron dan VLDL selama proses lipolisis serta memperoleh kolesterol dari jaringan ekstrahepatik. Kemudian kolesterol mengalami proses esterifikasi oleh *lecitin cholesterol acyltransferase* (LCAT) menjadi kolesterol ester sehingga membentuk spesies HDL dengan ukuran lebih besar. Kolesterol ester selanjutnya ditransfer ke VLDL, IDL, dan LDL dengan bantuan transfer ester kolesterol (CETP). Jadi, sebagian besar kolesterol ester yang ditransfer pada akhirnya dibawa ke hati untuk dimetabolisme dan diekskresikan menjadi garam empedu (Katzung, 2018).

HDL dapat melindungi seseorang dari penyakit kardiovaskuler karena HDL memiliki kemampuan memindahkan kolesterol dari ateroma dalam arteri dan mentransportasikan kembali ke hati yang selanjutnya akan di ekskresikan atau dipakai ulang (Katzung, 2018). Tingkat kadar kolesterol HDL dianggap rendah apabila dibawah 35 mg/dL.

### 2.3.2 *Low density lipoprotein* (LDL)

*Low density lipoprotein* atau dikenal sebagai kolesterol jahat merupakan senyawa lipoprotein yang memiliki berat jenis rendah. LDL tergolong protein dengan densitas rendah yaitu sebesar 1.019-1.063 g/mL yang merupakan hasil akhir dari metabolisme VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) di dalam hati (Manita dkk., 2005). Protein berukuran besar atau yang disebut dengan apoprotein B-100 berikatan dengan reseptor LDL yang berperan dalam proses metabolisme kolesterol. Protein utama yang membentuk LDL adalah Apo-B (apolipoprotein-B). Kolesterol dan trigliserida di dalam hati akan disintesis dan disekresikan sebagai lipoprotein VLDL. VLDL diubah menjadi LDL melalui proses hidrolisis oleh enzim LPL (Lipoprotein Lipase) yang menempel pada dinding kapiler hepar menjadi IDL. Kemudian IDL dihidrolisis dan dirubah menjadi LDL. Sebagian dari VLDL, IDL, dan LDL akan mengangkut kolesterol ester kembali ke hati (Murray dan Davis, 2003). LDL memiliki sifat aterogenik yaitu mudah melekat pada dinding

pembuluh darah bagian dalam serta dapat mengurangi pembentukan reseptor LDL (Ivanova dkk., 2017). LDL mengandung 10% trigliserida dan 50% kolesterol. Jumlah kadar ini dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti kadar kolesterol dan kandungan lemak jenuh dalam makanan yang dikonsumsi.

Fungsi LDL dalam tubuh yaitu mengangkut kolesterol dan fosfolipid dari hati ke berbagai jaringan yang kemudian digunakan untuk sintesis membran sel (Murray dan Davis, 2003). Nilai kandungan LDL normal kurang dari 130 mg/dL. Seseorang dikatakan beresiko sedang apabila nilai LDL nya 130-155 mg/dL sedangkan beresiko tinggi apabila lebih dari 160 mg/dL. Tingkatan kolesterol LDL pada manusia berdasarkan *American heart association* dapat dilihat pada Tabel 2.1. Umumnya pria memiliki kadar LDL lebih tinggi dibandingkan perempuan, namun setelah menopause wanita lebih tinggi. Faktor lain yang dapat meningkatkan kadar lemak (LDL dan VLDL) yaitu diet, kebiasaan merokok, ras, antropomerik, dan penyakit seperti diabetes mellitus, hipotiroidea, uremia (Melmed dan Conn, 2007).

Tabel 2.1 Tingkatan LDL pada Manusia (*American heart association*)

Level LDL	Klasifikasi
<100 mg/dL	Optimal
100 – 129 mg/dL	Mendekati optimal
130 – 159 mg/dL	Batas tinggi
160 – 189 mg/dL	Tinggi
(>190) mg/dL	Sangat tinggi

### BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

##### 3.1.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental yang digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan tertentu menggunakan kondisi yang terkendali. Jenis penelitian eksperimental ini adalah jenis *true experimental* yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan kadar HDL dan LDL pada tikus sebelum dan sesudah ovariektomi (OVX) dengan perlakuan.

##### 3.1.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-selesai 2018 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

#### 3.2 Variabel Penelitian

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

##### 3.2.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah serbuk edamame terfermentasi selama 3 hari dengan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dengan dosis 100, 250, 500, 750, 1.000, dan 1.250 mg/kgBB.

##### 3.2.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kadar HDL dan LDL pada serum darah tikus yang diberi perlakuan suspensi serbuk edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus*.

##### 3.2.3 Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu inkubasi fermentasi edamame, waktu fermentasi edamame, inokulum fermentasi yang digunakan seperti suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang mengandung  $10^6$  spora/mL. Galur



tikus, jenis kelamin, umur, pemeliharaan tikus meliputi pemberian pakan dan minum.

### 3.3 Rancangan Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut :

- a. Preparasi sampel edamame non fermentasi.
- b. Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang mengandung  $10^6$  spora/mL.
- c. Preparasi sampel edamame fermentasi dengan *A. oryzae* dan *R. oligosporus*.
- d. Pengeringan menggunakan oven 50 °C dan penyerbukan edamame terfermentasi.
- e. Hewan uji diadaptasikan selama 10 hari di dalam kandang Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- f. Pengambilan darah melalui bagian mata tikus sebelum ovariektomi (H-1 OVX), setelah ovariektomi (H+10) dan setelah perlakuan (H+29 perlakuan).
- g. Persiapan hewan uji untuk dilakukan ovariektomi dan masa penyembuhan selama 10 hari.
- h. Pemberian perlakuan kepada tikus menggunakan edamame terfermentasi dilakukan selama 28 hari.
- i. Penentuan kadar HDL dan LDL tikus.

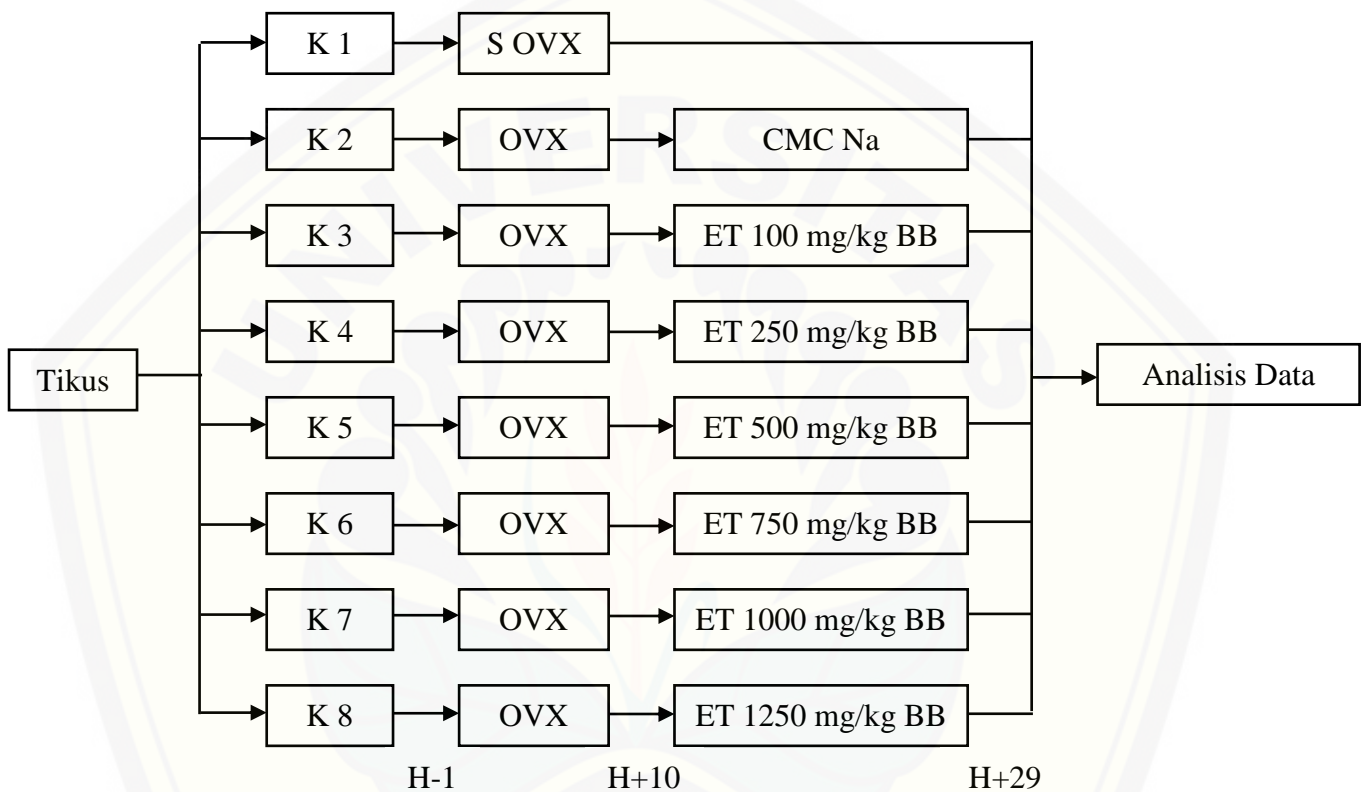
#### 3.3.2 Definisi operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut :

- a. Kedelai edamame yang digunakan adalah kedelai varietas SPM 1 yang diperoleh dari PT. Mitratani Dua Tujuh Jember pada bulan Februari 2018 (waktu panen  $\pm$  3 bulan).
- b. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus betina perawan galur *Sprague Dawley* usia 6 minggu (42 hari) yang didapatkan

dari pengembangan hewan coba mandiri (PHPM) dengan asal indukan dari unit pengembangan hewan percobaan (UPHP) UGM.

Gambar 3.1 merupakan skema rancangan penelitian pengaruh fermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar HDL dan LDL tikus *Sprague Dawley* dengan metode ovariektomi:



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

K : Kelompok

S OVX : *Shamed* ovariektomi

OVX : Ovariektomi

ET : Edamame terfermentasi

H-1 : Pengambilan darah 1 hari sebelum ovariektomi

H+10 : Pengambilan darah 10 hari setelah ovariektomi

H+29 : Pengambilan darah 29 hari setelah perlakuan

### 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.4.1 Alat

Alat gelas, timbangan analitik, *hot plate*, autoklaf (ALP), *Laminar air flow* (Airtech), mikroskop cahaya (Olympus BX53), mikropipet (Serena), hemasitometer (Neubar Improved), inkubator (Imperial III), oven (Memmert), blender, ayakan, seperangkat kandang tikus, seperangkat alat bedah, sonde lambung, sentrifuge (Hermle) dan fotometer (biolyzer 100).

#### 3.4.2 Bahan

Edamame (kedelai varietas SPM 1), *Isolat A. oryzae*, isolat *R. oligosporus*, tween 80, tip mikropipet, akuades, CMC Na 1%, sarung tangan (Latex), masker, jarum syringe, povidone-iodin 10%, xylazine 20 mg/ml, ketamin 50 mg/ml, mikrohematokrit, reagen HDL-Chol (Fluitest), reagen LDL-Chol (Fluitest), reagen Cholesterol (Fluitest).

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Preparasi edamame

Sebanyak 6 kg edamame yang masih segar dicuci dan dibersihkan kemudian direndam dalam air panas. Setelah dingin, kulit bagian luar dan kulit ari edamame dikupas. Kemudian dibersihkan kembali menggunakan air bersih. Edamame yang telah bersih ditimbang sebanyak 50 gram dan dibungkus menggunakan kertas saring dan dilanjutkan dengan mensterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit dan setelah dingin disimpan dalam freezer (Imansari, 2018).

#### 3.5.2 Peremajaan isolat *A. oryzae* dan isolat *R. oligosporus*

Masing-masing *A. oryzae* dan *R. oligosporus* diambil dengan menggunakan kawat ose yang telah disterilisasi lalu masing-masing kapang tersebut dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi media miring *potato dextrose agar* (PDA). Kemudian media yang berisi *A. oryzae* diinkubasi selama 1 hari dan media yang berisi *R. oligosporus* diinkubasi selama 3 hari dalam inkubator dengan suhu 30° C (Imansari, 2018).

### 3.5.3 Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus*

Suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dibuat dengan mencampurkan tween 80 dan aquades dengan perbandingan 1:100 sebanyak 10 mL yang dilakukan dibawah *laminar air flow* (LAF). Setelah itu, campuran tersebut dituangkan kedalam tabung reaksi yang berisi kapang *A. oryzae* dan *R. oligosporus*. Spora kapang *A. oryzae* dan *R. oligosporus* diambil dengan cara menggeruk kapang menggunakan ose steril secara perlahan dan hati-hati. Kemudian suspensi dimasukkan kedalam tabung reaksi steril lalu divortex untuk menghomogenkan dan untuk keperluan selanjutnya (Imansari, 2018).

### 3.5.4 Perhitungan konsentrasi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus*

Perhitungan konsentrasi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dilakukan menggunakan gelas hemasitometer. Suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang telah didapatkan selanjutnya dipipet sebanyak 10  $\mu$ L menggunakan mikropipet lalu ditempatkan di kamar hitung *hemasitometer improved neubuer* (Gambar 3.2). Jumlah spora yang terdapat pada hemasitometer dihitung (Gambar 3.3) atau diamati pada mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Spora yang terdapat pada 5 bidang/kotak pandang 1, 2, 3, 4 dan 5 dihitung kemudian dimasukkan kedalam rumus 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  $\mu$ L = 10 mm<sup>3</sup>)

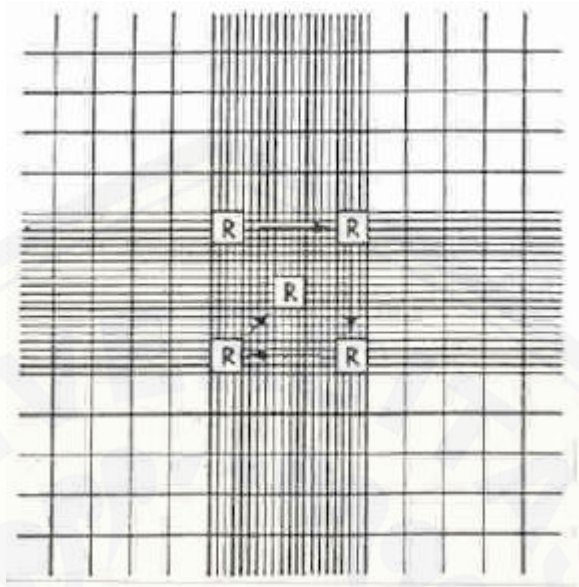
Apabila kepadatan spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang didapatkan lebih dari 10<sup>6</sup> spora maka dilakukan pengenceran menggunakan rumus berikut:

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

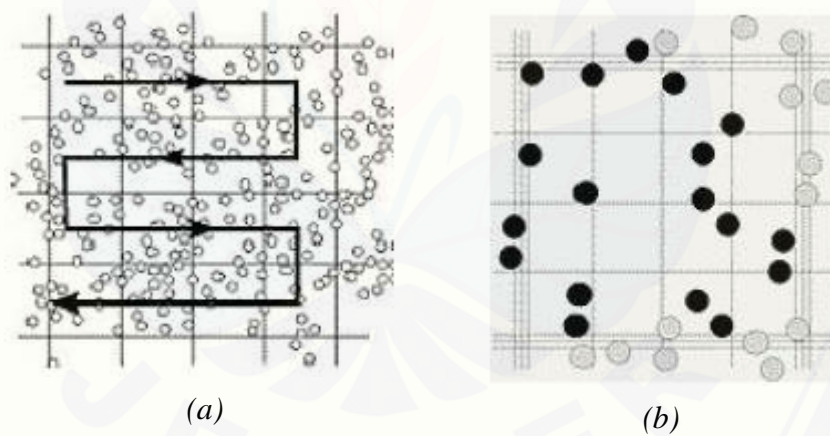
Keterangan :

- 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 terfermentasi

Edamame yang telah disterilisasi kemudian ditambahkan inokulum jamur *A. oryzae* sebanyak 0.5 mL dan *R. oligosporus* sebanyak 0.5 mL. Edamame steril yang telah ditambah inokulum tersebut kemudian dilakukan fermentasi dengan

diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 3 hari. Edamame yang telah terfermentasi dipotong kecil untuk kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60 °C sampai benar-benar kering. Edamame terfermentasi yang telah kering diserbuk menggunakan mesin penggiling atau menggunakan blender (Imansari, 2018). Kemudian diayak untuk menghilangkan bagian yang kasar. Serbuk edamame yang telah diayak siap untuk diberikan kepada tikus.

#### 3.5.6 Persiapan hewan uji

Hewan coba (tikus betina *Sprague Dawley*) diadaptasikan di dalam kandang laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember selama 10 hari. Pada fase ini, hewan coba diberi makanan dan minuman sesuai setiap hari sesukanya (*ad libitum*). Kemudian hewan dikelompokkan dengan acak sesuai dengan pembagian kelompok yang telah ditentukan, yaitu kelompok *shamed* OVX (pura-pura diovariectomi), kelompok kontrol negatif (OVX) dengan pemberian CMC Na, kelompok perlakuan (OVX) dengan pemberian edamame terfermentasi dosis 100, 250, 500, 750, 1.000, dan 1.250 mg/kg BB.

#### 3.5.7 Ovariectomi

Dilakukan ovariectomi terhadap tikus kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Ovariectomi ditujukan untuk mendapatkan tikus dengan defisiensi estrogen sebagai gambaran wanita menopause. Teknik ovariectomi yang dilakukan berdasarkan prosedur operasi ovariectomi tikus oleh Khajuria dkk., (2012) yang dimodifikasi yaitu tikus dianestesi menggunakan kombinasi ketamin 2 ml (50 mg/ml) dan xylazine 2 ml (20 mg/ml). Rambut tikus dicukur pada area bedah ± seluas 4 cm, kemudian inisiasi transabdominal pada area bedah (posisi menjorok kedalam tubuh sekitar 2 cm) sampai menembus dinding peritonium. Kapas ditotolkan pada badan tikus yang mengalami pendarahan kapiler. Uterus yang berbentuk granul seperti anggur yang transculen dan berada di bawah kolon dicari kemudian dipotong dan disisihkan. Povidon-iodine 10% dioleskan pada luka yang terbuka untuk mencegah infeksi kemudian luka dijahit sebanyak 1 simpul pada lapisan kulit dalam dan luar sekaligus. Tikus yang telah dioperasi diletakkan pada kandang tunggal yang beralaskan kertas kemudian diberi makanan dan minuman.

Terapi pasca operasi diberikan amoksisilin pada luka operasi dan selalu diamati perkembangan kesembuhan tikus serta kebersihan kandang tikus.

#### 3.5.8 Perlakuan hewan uji

Tiap kelompok hewan coba setiap hari diberi makan dan minuman standar. Setiap tikus pada kelompok perlakuan ditimbang beratnya untuk dijadikan acuan dalam pemberian dosis. Kelompok perlakuan hewan coba diberi diet suspensi edamame terfermentasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* per oral menggunakan sonde lambung sehari sekali selama 28 hari. Suspensi edamame terfermentasi dibuat menggunakan CMC Na 1 % dan akuades.

#### 3.5.9 Penentuan kadar HDL dan LDL

##### 1. Pengambilan sampel darah

Darah hewan coba pada H-1 OVX dan H+ 10 OVX diambil dengan cara menggoreskan mikrohematokrit pada medial canthus dibawah bola mata ke arah foramen opticus. Mikrohematokrit diputar sampai melukai plexus kemudian darah ditampung kedalam mikrotube sebanyak  $\pm 1$  ml. sedangkan darah hewan coba pada H+28 perlakuan diambil saat pembedahan dengan cara menusukkan syringe ke jantung dan disedot perlahan kemudian ditampung kedalam mikrotube. Darah yang telah ditampung didiamkan selama 30 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Serum darah dipindahkan kedalam mikrotube baru secara hati-hati (Parasuraman dkk., 2010).

##### 2. Penentuan kadar HDL

Reagen HDL-Chol sebanyak 100  $\mu$ l dimasukkan kedalam mikrotube. Selanjutnya ditambahkan serum darah sebanyak 50  $\mu$ l. Campuran reagen dan serum tersebut kemudian disentrifugasi kembali selama 10 menit. Reagen kolesterol sebanyak 500  $\mu$ l disiapkan kedalam tabung reaksi. Campuran reagen HDL-serum yang telah disentrifugasi dipipet sebanyak 50  $\mu$ l dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi reagen kolesterol. Kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang (20  $^{\circ}$ C-25  $^{\circ}$ C) setelah itu dilakukan pengukuran kadar HDL menggunakan fotometri.

##### 3. Penentuan kadar LDL

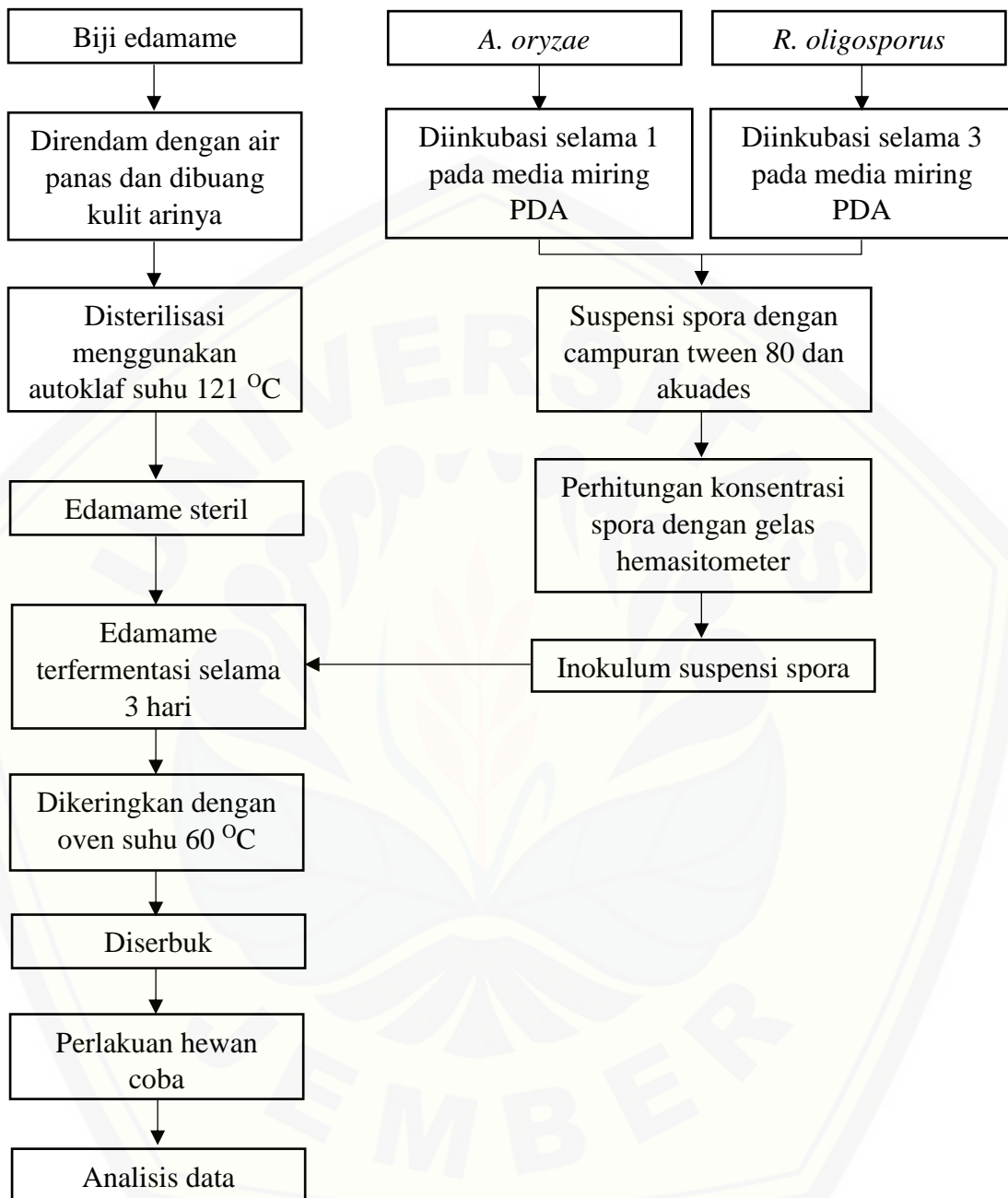
Reagen LDL-Chol sebanyak 100  $\mu\text{l}$  dimasukkan kedalam microtube. Selanjutnya ditambahkan serum darah sebanyak 10  $\mu\text{l}$ . Campuran reagen dan serum tersebut kemudian disentrifugasi kembali selama 15 menit. Reagen kolesterol sebanyak 500  $\mu\text{l}$  disiapkan kedalam tabung reaksi. Campuran reagen LDL-serum yang telah disentrifugasi dipipet sebanyak 50  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi reagen kolesterol. Kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang ( $20^{\circ}\text{C}$  -  $25^{\circ}\text{C}$ ) setelah itu dilakukan pengukuran kadar LDL menggunakan fotometri.

### 3.6 Analisis Data

Data kadar HDL dan LDL yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan analisis varian *one way ANOVA*. Taraf kepercayaan yang digunakan menggunakan metode ini adalah 95 %. Analisis ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh serbuk edamame terhadap kadar HDL dan LDL kelompok uji (*shamed* OVX, CMC Na, ET 100, 250, 500, 750, 1.000, dan 1.250 mg/kgBB). Varian data antar kelompok harus homogen dan terdistribusi dengan normal. Apabila didapatkan data yang menunjukkan perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji *post hoc least significant difference* (LSD) untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan. Transformasi data dilakukan apabila sebaran data tidak normal. Apabila proses transformasi data masih tidak memenuhi varian normal atau homogen, maka uji Anova tidak valid untuk digunakan sehingga uji statistik diganti menggunakan uji non parametrik . Uji non parametrik yang dapat digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis*. Apabila data yang dianalisis menunjukkan sig  $P < 0,05$  berarti data tiap kelompok memiliki perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *post hoc Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan.



### 3.7 Skema kerja penelitian



Gambar 3.4 Skema kerja penelitian

## 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* tidak mampu memberikan kenaikan kadar HDL pada tikus yang dilakukan ovariectomi pada semua kelompok uji. Berdasarkan analisis statistik kelompok *shamed* OVX dan kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif.
- b. Pemberian serbuk edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligoporus* tidak mampu memberikan penurunan kadar LDL pada tikus yang dilakukan ovariectomi pada semua kelompok uji. Berdasarkan analisis statistik kelompok *shamed* OVX dan kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif.

### 5.2 Saran

Saran yang perlu disampaikan pada penelitian ini adalah:

1. Diperlukan penelitian mengenai dosis serbuk edamame yang lebih besar dari 1.250 mg/kgBB atau menggunakan ekstrak edamame terfermentasi
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh edamame terfermentasi dengan masa penyembuhan yang lebih lama setelah ovariectomi untuk memastikan defisiensi hormon estrogen benar-benar terjadi.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai mengenai pengaruh edamame terfermentasi dengan waktu perlakuan diatas 28 hari.

## DAFTAR PUSTAKA

- Almatsier, S. 2003. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama
- Adlercreutz, H. 2007. Lignans and Human Health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 44(5–6):483–525
- Amato, P., F. M. Steinberg, M. J. Murray, R. D. Lewis, M. A. Cramer, S. Barnes, K. J. Ellis, R. J. Shypailo, J. K. Fraley, K. L. Konzelmann, J. G. Fischer, C. Lasalle, E. O. B. Smith, dan W. W. Wong. 2013. Effect of soy isoflavone supplementation on menopausal quality of life. *Menopause: The Journal of The North American Menopase Society*. 20(4):443–447.
- Argento, M., P. Hoffman, dan A.-S. Gauchez. 2008. Ovarian cancer detection and treatment: current situation and future prospects. *Anticancer Research*. 28(5):3135–3138.
- Barbesgaard, P., H. Hheldt-Hansen, dan B. Diderichsen. 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae* : a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36:569–572.
- Barone, M., S. Tanzi, K. Lofano, M. P. Scavo, R. Guido, L. Demarinis, M. B. Principi, A. Bucci, dan A. Di Leo. 2008. Estrogens, phytoestrogens and colorectal neoproliferative lesions. *Genes and Nutrition*. 3(1):7–13.
- Basavaraja, G. T. dan P. M. Salimath. 2005. Evaluation of vegetable soybean genotypes for yield and component traits. *Karnataka Journal Agriculture Science*. 18(1):(27-31) 2005
- Cederroth, C. R. dan S. Nef. 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 304(1–2):30–42.
- Chlebowski, R. T., L. H. Kuller, R. L. Prentice, M. L. Stefanick, J. E. Manson, M. Gass, A. K. Aragaki, J. K. Ockene, D. S. Lane, G. E. Sarto, A. Rajkovic, R. Schenken, S. L. Hendrix, P. M. Ravdin, T. E. Rohan, S. Yasmeen, dan G.

- Anderson. 2009. Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine*. 360(6):573–587.
- Dixon, R. A. 2009. Phytoestrogens. *Annual Reviews Plant Biology*. 55:225–61.
- Connor, E. B. 2013. Menopause, atherosclerosis, and coronary artery disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 13(2):186–191.
- Crepaldi, G. dan S. Maggi. 2009. Epidemiologic link between osteoporosis and cardiovascular disease. *Journal of Endocrinological Investigation*. 32(4):2–5.
- Dhiman, R. K. dan Y. K. Chawla. 2006. Is there a link between oestrogen therapy and gallbladder disease?. *Expert Opinion on Drug Safety*. 5(1):117–129.
- Dwidjoseputro. 1990. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Solo: Djambatan.
- Eftekhari, M. H., N. M. Honarvas, A. Rajaeifard, dan A. Awji. 2014. Effect of daidzein and genistein on serum glucose, lipid profile and paroxonase activity in diabetic rats. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 12(3):85-90
- Elbashiti, T., F. Amal, dan E. Abboud. 2010. Isolation and identification of *Aspergillus oryzae* and the production of soy sauce with new aroma. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9(12): 1171-1175.
- Endo, T., H. Henmi, T. Goto, Y. Kitajima, T. Kiya, A. Nishikawa, K. Manase, H. Yamamoto, dan R. Kudo. 1998. Effects of estradiol and an aromatase inhibitor on progesterone production in human cultured luteal cells. *Gynecological Endocrinology*. 12(1):29–34.
- Fardiaz, Srikandi. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama
- 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*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember

- Gallagher, J. C., P. B. Rapuri, G. Haynatzki, dan J. R. Detter. 2002. Effect of discontinuation of estrogen, calcitriol, and the combination of both on bone density and bone markers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 87(11):4914–4923.
- Gallo, D., G. F. Zannoni, P. Apollonio, E. Martinelli, C. Ferlini, G. Passetti, A. Riva, P. Morazzoni, E. Bombardelli, dan G. Scambia. 2005. Characterization of the pharmacologic profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: effects on bone, uterus, and lipid profile. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society* 12(5):589–600
- Gandjar, I., A. S. Robert., V. D Karin., O. Ariyanti, dan S. Iman. 1999. *Pengenalan Kapang Topik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gresshoff, P. 2017. Soybean ( *glycine max l*). *Reference Module in Life Sciences*. 2016:1–4.
- Gruber, C. J., W. Tschugguel, C. Schneeberger, dan J. C. Huber. 2002. Production and actions of estrogens. *English Journal of Medicine*. 346(5):340–352.
- Gunderson, C. C., M. J. Khan, dan B. Chou. 2012. Update on hormone replacement therapy. *Postgraduate Obstetrics & Gynecologi*. 31(22):1-8
- Gustafsson, J. A. 2000. Novel aspects of estrogen action. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 7(1):1998–1999.
- Hansen, P. J. 2000. *Use of a Hemocytometer*. Florida: University of Florida
- Haron, H., A. Ismail, A. Azlan, S. Shahr, dan L. S. Peng. 2009. Daidzein and genestein contents in tempeh and selected soy products. *Food Chemistry*. 115(4):1350–1356.
- Hu, Q. guo, M. Zhang, A. S. Mujumdar, G. nian Xiao, dan S. Jin-cai. 2006. Drying

of edamames by hot air and vacuum microwave combination. *Journal of Food Engineering*. 77(4):977–982.

Huang, M., Q. Wang, M. Zhang, dan Q. Zhu. 2014. Prediction of color and moisture content for vegetable soybean during drying using hyperspectral imaging technology. *Journal of Food Engineering*. 128:24–30.

Hutter, R., J. J. Badimon, V. Fuster, dan J. Narula. 2012. Coronary artery disease in aging women: a menopause of endothelial progenitor cells?. *Medical Clinics of North America*. 96(1):93–102.

Imansari, F. 2018. Validasi Metode Dan Pengaruh Fermentasi Kombinasi *Aspergillus Oryzae* Dan *Rhizopus Oligosporus* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine Max L.*) Menggunakan KLT-Densitometri. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Jember

Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2018. Fabaceae of North America Update, Database (Version 2011). Online. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null, diakses pada 2 November 2018]

Ivanova, E. A., V. A. Myasoedova, A. A. Melnichenko, A. V. Grechko, dan A. N. Orekhov. 2017. Small dense low-density lipoprotein as biomarker for atherosclerotic diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017:1-10

Katzung, B. G. 2018. *Basic & Clinical Pharmacology*. 14th Ed. Boston: McGraw Hill.

Khajuria, D. K., R. Razdan, dan D. R. Mahapatra. 2012. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 52(3):462–470.

Kim, Y., S. Yoon, S. B. Lee, H. W. Han, H. Oh, W. J. Lee, dan S. M. Lee. 2014. Fermentation of soy milk via *Lactobacillus plantarum* improves dysregulated lipid metabolism in rats on a high cholesterol diet. *PLOS ONE*. 9(2):1-8

- Konovsky, J., T. A. Lumpkin, dan D. McClary. 1994. Edamame : the vegetable soybean. *Understanding the Japanese Food and Agrimarket: A Multifaceted Opportunity*. 1988(1984):173–181.
- Kopera, H. dan P. A. van Keep. 1991. Development and present state of hormone replacement therapy. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*. 29(10):412–417.
- Kumar, S., K. Lata, S. Mukhopadhyay, dan T. K. Mukherjee. 2010. Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1800(10):1127–1135.
- Kurniasanti, S. A., U. Sumarwan, dan B. P. Y. Kurniawan. 2014. Analisis dan model strategi peningkatan daya saing produk edamame beku. 11(3):154–163.
- Mahanani, R. S. 2016. Effect of marketing mix on customer satisfaction to edamame products of pt mitratani dua tujuh. *Advances in Environmental Biolog.*, 10(8):132–139.
- Mahmud, K. 2010. Natural hormone therapy for menopause. *Gynecological Endocrinology*. 26(2):81–85.
- Manita, K., K. Kanazawa, T. Maehara, S. Takasaki, dan T. Abe. 2005. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488 (2000) 189-210
- McKinlay, S. M., D. J. Brambilla, dan J. G. Posner. 1996. The normal menopause transition: an overview. *Maturitas*. 23(2):137–145.
- Melby, M. K., M. Lock, dan P. Kaufert. 2005. Culture and symptom reporting at menopause. *Human Reproduction Update*. 11(5):495–512.
- Melmed, P. S. dan M. Conn. 2007. *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*.

- Mentreddy, S. R., A. I. Mohamed, N. Joshee, dan A. K. Yadav. 2002. Edamame : a nutritious vegetable crop. *Trends in New Crops and New Uses*. 11:432–438.
- Moenter, S. M., R. Anthony DeFazio, G. R. Pitts, dan C. S. Nunemaker. 2003. Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 24(2):79–93.
- Moreira, A. C., A. M. Silva, M. S. Santos, dan V. A. Sardão. 2014. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: what is real, what is unknown. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 143:61–71.
- Murray, R. K. dan J. C. Davis. 2003. Harper's Illustrated Biochemistry. 26th Ed. Lange Medical Books/McGraw-Hil
- Mayes, PA. 2003. Sintesis, Pengangkutan, dan Ekskresi Kolesterol. Dalam: Murray RK, Ganner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editor. Biokimia harper 25<sup>th</sup> ed. Jakarta: EGC
- Nathan, L. dan G. Chaudhuri. 1997. Estrogens and atherosclerosis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 37(1):477–515.
- Naufalia, A. N. 2018. Validasi metode dan penetapan kadar daidzein edamame (*Glycine max* ) terfermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* dengan klt-densitometri. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Jember
- New Zealand Organism Register. tanpa tahun. *Rhizopus Microsporus Var. oligosporus* (Saito). <http://www.nzor.org.nz/>. [diakses tanggal 22 Januari 2019].
- Nilsson, S., S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, dan J.-Å. Gustafsson. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*. 81(4):1535–1565.
- Novitasari, D. 2018. Validasi metode penetapan kadar genistein ekstrak edamame



( *Glycine max* L. Merrill ) terfermentasi *Rhizopus oligosporus* dengan metode klt densitometri. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Jember

Oliveira, P. J., R. A. Carvalho, P. Portincasa, L. Bonfrate, dan V. A. Sardao. 2012. Fatty acid oxidation and cardiovascular risk during menopause: a mitochondrial connection?. *Journal of Lipids*. 2012:1–12.

Parasuraman, S., R. Raveendran, dan R. Kesavan. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 1(2):87.

Patisaul, H. B. dan W. Jefferson. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31(4):400–419.

Porter, T. O. M. E., B. M. Hargis, J. L. Silsby, M. E. E. L. Halawani, dan P. E. T. Al. 1991. Characterization of dissimilar steroid productions by granulosa , theta interna and theta externa cells during follicular maturation in the Turkey (*Meleagris gallopavo*). *General and Comparative Endocrinology*. 84:1–8.

PT Mitra Tani 27. 2017. Sekolah Lapang Budidaya Edamame Bersama Mitratani Dua Tujuh. Onlilne. [<http://mitratani27.co.id/informasi/sekolah-lapang-budidaya-edamame-bersama-mitratani>, diakses pada 5 November 2018]

Punjaissee, C., W. Visessanguan, S. Punjaissee, dan C. Chaiyasut. 2011. Screening of potential aspergillus spp. for production of fermented soybean with high antioxidative activity. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*. 10(2):197–212.

Puspitasari, E., I. R. Sutejo, B. Kusumawardani, S. H. Fhaturani, L. Fimarahayu, D. R. Maulida, dan M. K. Rohman. 2018. Fermented edamame (*Glycine max* L.) increase estrogen level on ovariectomized rat model. *International Conference of Pharmaceutical Updates*. 11:1-10

Rafieian, M. K., M. Setorki, M. Doudi, A. Baradaran, dan H. Nasri. 2014. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*. 5(8):927–946.

- Renoux, C., S. Dell'aniello, dan S. Suissa. 2010. Hormone replacement therapy and the risk of venous thromboembolism: a population-based study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 8(5):979–986.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, R. L. Prentice, A. Z. LaCroix, C. Kooperberg, M. L. Stefanick, R. D. Jackson, S. A. A. Beresford, B. V Howard, K. C. Johnson, J. M. Kotchen, J. Ockene, dan Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288(3):321–333.
- Sakata, R., Y. Shimizu, M. Soda, M. Yamada, W.-L. Hsu, M. Hayashi, dan K. Ozasa. 2011. Effect of radiation on age at menopause among atomic bomb survivors. *Radiation Research*. 176(6):787–795.
- Setchell, K. D. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal of Nutrition*. 168: 1332-1346
- Setyaningsih, D., K. Tresnawati, M. T. Soehartono, dan A. Apriyantono<sup>3</sup>. 2006. Pengaruh aktivitas b-glukosidase eksternal dari kapang terhadap kadar vanilin buah vanili. 16(1):28–35.
- Setyawan, F. E. B. 2017. Kajian tentang efek pemberian nutrisi kedelai (glicine max) terhadap penurunan kadar kolesterol total pada menopause. *Fakultas Kedokteran UMM*. 1(4):33–42.
- Shifren, J. L. dan N. E. Avis. 2007. Surgical menopause: effects on psychological well-being and sexuality. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*. 14(3):586–591.
- Stevenson, J. C. 2016. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *Ginekologia Polska*. 87(1):59–64.
- Sutatik. 2018. *Validasi metode klt densitometri dan pengaruh fermentasi*

*aspergillus oryzae* terhadap kadar daidzein edamame ( *Glycine max* L. ).  
Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Jember

Suvarna, K. 2010. Hormone replacement therapy: an update. *Archives of Hellenic Medicine*. 27(5):776–782.

Tim QC APH, G. J. 2009. *Modul Quality Control (QC) APH Golongan Jamur*. Surabaya: Balai Besar Pembenuhan dan Proteksi Tanaman Perkebunan.

Tissier, R., X. Waintraub, N. Couvreur, M. Gervais, P. Bruneval, C. Mandet, R. Zini, B. Enriquez, A. Berdeaux, dan B. Ghaleh. 2007. Pharmacological postconditioning with the phytoestrogen genistein. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 42(1):79–87.

Toth, P. P. 2008. Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. *International Journal of Clinical Practice*. 62(8):1246–1254.

Vassalle, C., A. Mercuri, dan S. Maffei. 2009. Oxidative status and cardiovascular risk in women: keeping pink at heart. *World Journal of Cardiology*. 1(1):26–30.

Verheus, M., C. H. Van Gils, L. Keinan-Boker, P. B. Grace, S. A. Bingham, dan P. H. M. Peeters. 2007. Plasma phytoestrogens and subsequent breast cancer risk. *Journal of Clinical Oncology*. 25(6):648–655.

Walf, A. A., J. J. Paris, M. E. Rhodes, J. W. Simpkins, dan C. A. Frye. 2011. Divergent mechanisms for trophic actions of estrogens in the brain and peripheral tissues. *Brain Research*. 1379:119–136.

Welboren, W. J., H. G. Stunnenberg, F. C. G. J. Sweep, dan P. N. Span. 2007. Identifying estrogen receptor target genes. *Molecular Oncology*. 1(2):138–143.

Wipradnyadewi, P. A. S., S. R. Endang, dan S. Raharjo. 2004. Isolasi Identifikasi *Rhizopus oligosporus* pada Beberapa Inokulum Tempe. *Laporan Penelitian*

*Tim Pasca Sarjana Angkatan I Tahun ke-2.*

Xu, Y., A. Cartier, D. Kibet, K. Jordan, I. Hakala, S. Davis, E. Sismour, M. Kering, dan L. Rutto. 2016. Physical and nutritional properties of edamame seeds as influenced by stage of development. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 10(2):193–200.

Yousef, M., K. I. Kamel, A. M. Esmail, dan H. H. Baghdadi. 2004. Antioxidant activities and lipid lowering effects of isoflavone in male rabbits. *Food and Chemical Toxicology*. 42(9):1497–1503.

Yunindarwati, E., E. U. Ulfa, E. Puspitasari, dan M. A. Hidayat. 2016. Penentuan kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai (*glycine max*) terfermentasi *aspergillus oryzae*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 14(1):1–7.

Zhou, L., C. Li, L. Gao, dan A. Wang. 2015. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (review). *Molecular Medicine Reports*. 12(3):4015–4021.

**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 KADAR HDL DAN LDL

## 2.1 Kadar HDL sebelum OVX, setelah OVX, dan setelah perlakuan

Kelompok Uji	Kadar HDL (mg/dL)		
	Sebelum OVX	Setelah OVX	Setelah Perlakuan
<i>Shamed OVX</i>	103,8	50,37	56,63
	106,9	76,07	96,63
	107,9	25,70	115,1
CMC	162,4	57,57	81,21
	187,1	48,32	150,1
	119,3	42,15	75,04
100	114,1	35,98	72,99
	70,93	38,04	82,24
	86,35	35,98	78,13
250	94,58	46,26	87,38
	114,1	34,95	75,04
	78,13	59,62	90,46
500	98,69	34,95	90,46
	80,18	57,57	58,60
	137,8	46,26	85,32
750	86,35	29,81	78,13
	145,1	53,46	81,21
	123,4	45,23	64,76
1000	86,35	35,98	105,9
	107,9	53,46	103,8
	87,38	104,9	101,8
1250	97,66	41,12	95,60
	102,8	46,26	84,30
	81,21	45,23	157,3

## 2.3 Kadar LDL sebelum OVX, setelah OVX, dan setelah perlakuan

Kelompok uji	Kadar LDL (mg/dL)		
	Sebelum OVX	Setelah OVX	Setelah perlakuan
Shamed OVX	81,20	93,80	62,44
	38,92	98,28	87,36
CMC Na	56,84	134,7	64,96
	109,5	266,8	63,28
Dosis 100 mg/kgBB	65,52	188,7	52,08
	92,96	176,7	44,80
Dosis 250 mg/kgBB	77,84	79,80	62,72
	45,64	111,2	67,20
Dosis 500 mg/kgBB	45,36	289,8	45,92
	63,00	121,8	66,08
Dosis 750 mg/kgBB	61,88	111,4	72,80
	49,56	164,1	41,44
Dosis 1000 mg/kgBB	29,68	153,2	61,04
	37,24	140,3	57,96
Dosis 1.250 mg/kgBB	35,84	108,4	56,00
	43,40	96,60	57,12
Dosis 1.250 mg/kgBB	44,80	124,9	31,08
	38,08	227,1	43,96
Dosis 1.250 mg/kgBB	65,52	162,4	50,40
	50,40	129,4	76,16
Dosis 1.250 mg/kgBB	43,40	196,0	61,32
	41,16	198,5	64,96
Dosis 1.250 mg/kgBB	35,18	54,60	58,80
	90,16	192,4	105,6



**LAMPIRAN 3**  
**ANALISIS STATISTIK**

**3.1 Kadar HDL setelah OVX**

tikus			Statistic	Std. Error
	Mean		5.07E+01	1.45E+01
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-	
		Upper Bound	1.13E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		5.04E+01	
	Variance		634.373	
	Std. Deviation		2.52E+01	
	Minimum		25.7	
	Maximum		76.07	
	Range		50.37	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		0.061	1.225
	Kurtosis		.	.
data	Mean		4.93E+01	4.48E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.01E+01	
		Upper Bound	6.86E+01	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		4.83E+01	
	Variance		60.235	
	Std. Deviation		7.76E+00	
	Minimum		42.15	
	Maximum		57.57	
	Range		15.42	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		0.585	1.225
	Kurtosis		.	.
100 mg/kg	Mean		3.67E+01	0.686667
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.37E+01	

		Upper Bound	3.96E+01	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		3.60E+01	
	Variance		1.415	
	Std. Deviation		1.19E+00	
	Minimum		35.98	
	Maximum		38.04	
	Range		2.06	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.732	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		4.69E+01	7.13E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.63E+01	
		Upper Bound	7.76E+01	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		4.63E+01	
	Variance		152.502	
250 mg/kg	Std. Deviation		1.23E+01	
	Minimum		34.95	
	Maximum		59.62	
	Range		24.67	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		0.248	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		4.63E+01	6.53E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.82E+01	
		Upper Bound	7.44E+01	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		4.63E+01	
	Variance		127.916	
500 mg/kg	Std. Deviation		1.13E+01	
	Minimum		34.95	
	Maximum		57.57	
	Range		22.62	
	Interquartile Range		.	

	Skewness		0	1.225
	Kurtosis		.	.
750 mg/kg	Mean		4.06E+01	5.38E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.35E+01	
		Upper Bound	5.77E+01	
	5% Trimmed Mean		4.05E+01	
	Median		3.96E+01	
	Variance		115.954	
	Std. Deviation		1.08E+01	
	Minimum		29.81	
	Maximum		53.46	
	Range		23.65	
	Interquartile Range		20.565	
	Skewness		0.356	1.014
	Kurtosis		-2.755	2.619
	1000 mg/kg	Mean		6.48E+01
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	2.42E+01	
		Upper Bound	1.54E+02	
5% Trimmed Mean			.	
Median			5.35E+01	
Variance			1.28E+03	
Std. Deviation			3.58E+01	
Minimum			35.98	
Maximum			1.05E+02	
Range			68.88	
Interquartile Range			.	
Skewness			1.279	1.225
Kurtosis			.	.
1250 mg/kg		Mean		4.42E+01
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.74E+01	
		Upper Bound	5.10E+01	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		4.52E+01	
	Variance		7.395	

Std. Deviation	2.72E+00	
Minimum	41.12	
Maximum	46.26	
Range	5.14	
Interquartile Range	.	
Skewness	-1.457	1.225
Kurtosis	.	.

**a. Tes normalitas**

**Tests of Normality**

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
tikus		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
data	shamed ovx	.176	3	.	1.000	3	.977
	cmc na	.219	3	.	.987	3	.781
	100 mg/kg	.385	3	.	.750	3	.000
	250 mg/kg	.189	3	.	.998	3	.908
	500 mg/kg	.175	3	.	1.000	3	1.000
	750 mg/kg	.233	4	.	.945	4	.688
	1000 mg/kg	.291	3	.	.925	3	.471
	1250 mg/kg	.314	3	.	.893	3	.364

a. Lilliefors Significance Correction

Makna: pada kelompok 100 mg/kgBB nilai sig < 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data sampel tidak terdistribusi normal.

**b. Tes Homogenitas**

**Test of Homogeneity of Variances**

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.380	7	17	.019

Makna : Nilai sig < 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data memiliki varian yang tidak sama atau terdapat perbedaan (tidak *homogen*).

**c. Kruskal wallis****Ranks**

tikus		N	Mean Rank
data	shamed ovx	3	14.33
	cmc na	3	16.50
	100 mg/kg	3	7.67
	250 mg/kg	3	14.17
	500 mg/kg	3	13.67
	750 mg/kg	4	9.25
	1000 mg/kg	3	17.17
	1250 mg/kg	3	12.50
	Total	25	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	data
Chi-Square	4.487
df	7
Asymp. Sig.	.722

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tikus

Makna : Nilai sig.>0,05 Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar HDL secara signifikan.

## 3.2 Kadar HDL setelah perlakuan

tikus			Statistic	Std. Error
shamed ovx	Mean		8.95E+01	1.73E+01
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.52E+01	
		Upper Bound	1.64E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		9.66E+01	
	Variance		893.314	
	Std. Deviation		2.99E+01	
	Minimum		56.63	
	Maximum		1.15E+02	
	Range		58.47	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.018	1.225
	Kurtosis		.	.
	data	Mean		1.02E+02
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	-	
		Upper Bound	2.06E+02	
5% Trimmed Mean			.	
Median			8.12E+01	
Variance			1.74E+03	
Std. Deviation			4.17E+01	
Minimum			75.04	
Maximum			1.50E+02	
Range			75.06	
Interquartile Range			.	
Skewness			1.689	1.225
Kurtosis			.	.
100 mg/kg		Mean		7.78E+01
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6.63E+01	
		Upper Bound	8.93E+01	
	5% Trimmed Mean		.	

	Median		7.81E+01	
	Variance		21.479	
	Std. Deviation		4.63E+00	
	Minimum		72.99	
	Maximum		82.24	
	Range		9.25	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-0.332	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		8.43E+01	4.71E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6.40E+01	
		Upper Bound	1.05E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		8.74E+01	
250 mg/kg	Variance		66.59	
	Std. Deviation		8.16E+00	
	Minimum		75.04	
	Maximum		90.46	
	Range		15.42	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.459	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		7.81E+01	9.88E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.56E+01	
		Upper Bound	1.21E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		8.53E+01	
500 mg/kg	Variance		292.573	
	Std. Deviation		1.71E+01	
	Minimum		58.6	
	Maximum		90.46	
	Range		31.86	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.558	1.225

	Kurtosis	.	.
750 mg/kg	Mean	7.47E+01	5.05E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5.30E+01
		Upper Bound	9.64E+01
	5% Trimmed Mean	.	.
	Median	7.81E+01	.
	Variance	76.474	.
	Std. Deviation	8.74E+00	.
	Minimum	64.76	.
	Maximum	81.21	.
	Range	16.45	.
	Interquartile Range	.	.
	Skewness	-1.493	1.225
	Kurtosis	.	.
	1000 mg/kg	Mean	1.04E+02
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	9.87E+01
		Upper Bound	1.09E+02
5% Trimmed Mean		.	.
Median		1.04E+02	.
Variance		4.203	.
Std. Deviation		2.05E+00	.
Minimum		1.02E+02	.
Maximum		1.06E+02	.
Range		4.1	.
Interquartile Range		.	.
Skewness		0.073	1.225
Kurtosis		.	.
1250 mg/kg		Mean	1.12E+02



95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.48E+01	
	Upper Bound	2.10E+02	
5% Trimmed Mean		.	
Median		9.56E+01	
Variance		1.54E+03	
Std. Deviation		3.93E+01	
Minimum		84.3	
Maximum		1.57E+02	
Range		73	
Interquartile Range		.	
Skewness		1.572	1.225
Kurtosis		.	.

#### a. Tes normalitas

##### Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
tikus		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
data	shamed ovx	.262	3	.	.957	3	.600
	cmc na	.359	3	.	.811	3	.142
	100 mg/kg	.196	3	.	.996	3	.877
	250 mg/kg	.314	3	.	.893	3	.363
	500 mg/kg	.330	3	.	.867	3	.288
	750 mg/kg	.319	3	.	.885	3	.338
	1000 mg/kg	.177	3	.	1.000	3	.973
	1250 mg/kg	.332	3	.	.863	3	.276

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**

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.506	7	16	.002

Makna : Nilai sig < 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data memiliki varian yang tidak sama atau terdapat perbedaan (tidak *homogen*).

**c. Tes Kruskal Wallis****Ranks**

	tikus	N	Mean Rank
data	shamed ovx	3	13.67
	cmc na	3	12.67
	100 mg/kg	3	7.50
	250 mg/kg	3	11.67
	500 mg/kg	3	10.17
	750 mg/kg	3	6.67
	1000 mg/kg	3	20.00
	1250 mg/kg	3	17.67
	Total	24	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	data
Chi-Square	8.986
df	7
Asymp. Sig.	.254

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tikus

Makna : Nilai sig.>0,05 Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar HDL secara signifikan.

**3.3 Kadar LDL setelah OVX**

tikus			Statistic	Std. Error
shamed ovx	Mean		1.09E+02	1.30E+01
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5.32E+01	
		Upper Bound	1.65E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		9.83E+01	
	Variance		503.216	
	Std. Deviation		2.24E+01	
	Minimum		93.8	
	Maximum		1.35E+02	
	Range		40.9	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.655	1.225
	Kurtosis		.	.
	data	Mean		2.11E+02
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	8.92E+01	
		Upper Bound	3.32E+02	
5% Trimmed Mean			.	
Median			1.89E+02	
Variance			2.39E+03	
Std. Deviation			4.89E+01	
Minimum			1.77E+02	
Maximum			2.67E+02	
Range			90.1	
Interquartile Range			.	
Skewness			1.616	1.225
Kurtosis			.	.
100 mg/kg		Mean		1.60E+02
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-	
		Upper Bound	4.42E+02	
	5% Trimmed Mean		.	

	Median	1.11E+02	
	Variance	1.28E+04	
	Std. Deviation	1.13E+02	
	Minimum	79.8	
	Maximum	2.90E+02	
	Range	2.10E+02	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	1.584	1.225
	Kurtosis	.	.
	Mean	1.32E+02	1.61E+01
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 6.31E+01 Upper Bound 2.02E+02	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	1.22E+02	
250 mg/kg	Variance	779.123	
	Std. Deviation	2.79E+01	
	Minimum	1.11E+02	
	Maximum	1.64E+02	
	Range	52.7	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	1.465	1.225
	Kurtosis	.	.
	Mean	1.34E+02	1.33E+01
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 7.67E+01 Upper Bound 1.91E+02	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	1.40E+02	
500 mg/kg	Variance	531.843	
	Std. Deviation	2.31E+01	
	Minimum	1.08E+02	
	Maximum	1.53E+02	
	Range	44.8	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	-1.143	1.225

	Kurtosis		.	.
	Mean		1.50E+02	3.96E+01
		Lower Bound	-	
	95% Confidence Interval for Mean	Upper Bound	2.10E+01	
			3.20E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		1.25E+02	
750 mg/kg	Variance		4.71E+03	
	Std. Deviation		6.86E+01	
	Minimum		96.6	
	Maximum		2.27E+02	
	Range		1.31E+02	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.407	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		1.63E+02	1.92E+01
		Lower Bound	7.99E+01	
	95% Confidence Interval for Mean	Upper Bound	2.45E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		1.62E+02	
1000 mg/kg	Variance		1.11E+03	
	Std. Deviation		3.33E+01	
	Minimum		1.29E+02	
	Maximum		1.96E+02	
	Range		66.6	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		0.027	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		1.49E+02	4.70E+01
		Lower Bound	-	
	95% Confidence Interval for Mean	Upper Bound	5.37E+01	
			3.51E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		1.92E+02	
1250 mg/kg	Variance		6.62E+03	

Std. Deviation	8.14E+01	
Minimum	54.6	
Maximum	1.99E+02	
Range	1.44E+02	
Interquartile Range	.	
Skewness	-1.721	1.225
Kurtosis	.	.

**a. Tes normalitas**

**Tests of Normality**

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
tikus		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
data	shamed ovx	.349	3	.	.831	3	.191
	cmc na	.340	3	.	.848	3	.235
	100 mg/kg	.334	3	.	.859	3	.266
	250 mg/kg	.315	3	.	.891	3	.358
	500 mg/kg	.275	3	.	.943	3	.541
	750 mg/kg	.307	3	.	.903	3	.397
	1000 mg/kg	.175	3	.	1.000	3	.990
	1250 mg/kg	.372	3	.	.782	3	.072

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**

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.855	7	16	.012

Makna : Nilai sig < 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data memiliki varian yang tidak sama atau terdapat perbedaan (tidak *homogen*).

**c. Tes Kruskal Wallis****Ranks**

tikus		N	Mean Rank
data	shamed ovx	3	6.67
	cmc na	3	19.33
	100 mg/kg	3	11.00
	250 mg/kg	3	11.00
	500 mg/kg	3	11.00
	750 mg/kg	3	12.00
	1000 mg/kg	3	15.33
	1250 mg/kg	3	13.67
	Total	24	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Data
Chi-Square	5.827
df	7
Asymp. Sig.	.560

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tikus

Makna : Nilai sig.>0,05 Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar LDL secara signifikan.

## 3.4 Kadar LDL setelah perlakuan

tikus		Statistic	Std. Error
	Mean	7.16E+01	7.92E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 3.75E+01 Upper Bound 1.06E+02	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	6.50E+01	
shamed ovx	Variance	188.186	
	Std. Deviation	1.37E+01	
	Minimum	62.44	
	Maximum	87.36	
	Range	24.92	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	1.667	1.225
	Kurtosis	.	.
data	Mean	5.34E+01	5.37E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 3.03E+01 Upper Bound 7.65E+01	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	5.21E+01	
	Variance	86.658	
	Std. Deviation	9.31E+00	
	Minimum	44.8	
	Maximum	63.28	
	Range	18.48	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	0.619	1.225
	Kurtosis	.	.
100 mg/kg	Mean	5.86E+01	6.48E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 3.07E+01 Upper Bound 8.65E+01	
	5% Trimmed Mean	.	



	Median	6.27E+01	
	Variance	125.858	
	Std. Deviation	1.12E+01	
	Minimum	45.92	
	Maximum	67.2	
	Range	21.28	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	-1.427	1.225
	Kurtosis	.	.
	Mean	6.01E+01	9.53E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 1.91E+01 Upper Bound 1.01E+02	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	6.61E+01	
250 mg/kg	Variance	272.623	
	Std. Deviation	1.65E+01	
	Minimum	41.44	
	Maximum	72.8	
	Range	31.36	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	-1.415	1.225
	Kurtosis	.	.
	Mean	5.83E+01	1.47E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 5.20E+01 Upper Bound 6.46E+01	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	5.80E+01	
500 mg/kg	Variance	6.455	
	Std. Deviation	2.54E+00	
	Minimum	56	
	Maximum	61.04	
	Range	5.04	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	0.647	1.225

	Kurtosis		.	.
	Mean		4.41E+01	7.52E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.17E+01	
		Upper Bound	7.64E+01	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		4.40E+01	
750 mg/kg	Variance		169.527	
	Std. Deviation		1.30E+01	
	Minimum		31.08	
	Maximum		57.12	
	Range		26.04	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		0.032	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		6.26E+01	7.46E+00
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.05E+01	
		Upper Bound	9.47E+01	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		6.13E+01	
1000 mg/kg	Variance		167.175	
	Std. Deviation		1.29E+01	
	Minimum		50.4	
	Maximum		76.16	
	Range		25.76	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		0.45	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		7.65E+01	1.47E+01
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.33E+01	
		Upper Bound	1.40E+02	
	5% Trimmed Mean		.	
1250 mg/kg	Median		6.50E+01	

Variance	646.633	
Std. Deviation	2.54E+01	
Minimum	58.8	
Maximum	1.06E+02	
Range	46.8	
Interquartile Range	.	
Skewness	1.618	1.225
Kurtosis	.	.

**b. Tes Normalitas**

**Tests of Normality**

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
tikus		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
data	shamed ovx	.352	3	.	.825	3	.176
	cmc na	.222	3	.	.985	3	.767
	100 mg/kg	.310	3	.	.900	3	.384
	250 mg/kg	.308	3	.	.902	3	.391
	500 mg/kg	.225	3	.	.984	3	.756
	750 mg/kg	.176	3	.	1.000	3	.988
	1000 mg/kg	.207	3	.	.992	3	.833
	1250 mg/kg	.341	3	.	.847	3	.232

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**

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.138	7	16	.099

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

**c. Uji one way ANOVA****ANOVA**

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2133.836	7	304.834	1.466	.248
Within Groups	3326.229	16	207.889		
Total	5460.065	23			

Makna : Nilai sig.>0,05 Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar LDL secara signifikan.