



**EFEK EDAMAME (*Glycine max* (L.) Merrill)
TERFERMENTASI KOMBINASI *Aspergillus oryzae* DAN *Rhizopus
oligosporus* TERHADAP KADAR KOLESTEROL DAN
TRIGLISERIDA TIKUS TEROVARIEKTOMI**

SKRIPSI

Oleh:

Livia Pimarahayu

NIM 152210101020

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2019



**EFEK EDAMAME (*Glycine max* (L.) Merrill)
TERFERMENTASI KOMBINASI *Aspergillus oryzae* DAN *Rhizopus
oligosporus* TERHADAP KADAR KOLESTEROL DAN
TRIGLISERIDA TIKUS TEROVARIEKTOMI**

SKRIPSI

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

Oleh:

Livia Pimarahayu

NIM 152210101020

**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 Sutinah dan Ayah Suwarno 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 bertaqwadengan 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)¹

“Jangan kecewakan amanah orang tua”

“Rumpun bambu terkuat tumbuh diatas tanah yang keras”
(MPA Pring Kuning)

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

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Livia Pimarahayu

NIM : 152210101020

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Efek Edamame (*Glycine max* (L.) Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Kolesterol dan Trigliserida Tikus Terovariektomi” adalah 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 sebenar-benarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata pernyataan ini tidak benar.

Jember, 13 Juli 2019

Yang menyatakan,

(Livia Pimarahayu)

NIM 152210101020

SKRIPSI

**EFEK EDAMAME (*Glycine max* (L.) Merrill) TERFERMENTASI
KOMBINASI *Aspergillus oryzae* DAN *Rhizopus oligosporus*
TERHADAP KADAR KOLESTEROL DAN TRIGLISERIDA TIKUS
TEROVARIEKTOMI**

Oleh

Livia Pimarahayu

Nim 152210101020

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing II : dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Edamame (*Glycine max* (L.) Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Kolesterol dan Trigliserida Tikus Terovariektomi” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech
NIP 198107232006042002 NIP. 198408192009122003

Tim Penguji

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Dewi Dianasari S. Farm., M.Farm., Apt Nuri S.Si., Apt., M.Si.
NIP 198407122008122002 NIP 198201292009121003

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember

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

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Efek Edamame (*Glycine max* (L.) Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Kolesterol dan Trigliserida Tikus Terovarietomi:Livia Pimarahayu: 152210101020 ; 2019; x Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala atas rahmat dan hidayahnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Edamame (*Glycine max* (L.) Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Kolesterol dan Trigliserida 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. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis untuk menyelesaikan penelitian ini;
4. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Penguji I dan Bapak Nuri, S.Si., Apt., M.Si. selaku Dosen Penguji II yang dengan sabar memberikan saran terhadap penelitian ini;
5. Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., 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, Ibu Sutinah dan Ayah Suwarno yang selalu mendoakan, mendukung, memotivasi, dan memberikan segalanya yang terbaik kepada penulis dalam mengerjakan skripsi dan penelitian;
8. Keluarga besar UKM PRING KUNING tempat penulis banyak berproses, baik tentang persaudaraan, pengalaman, ilmu dan dukungan kepada penulis

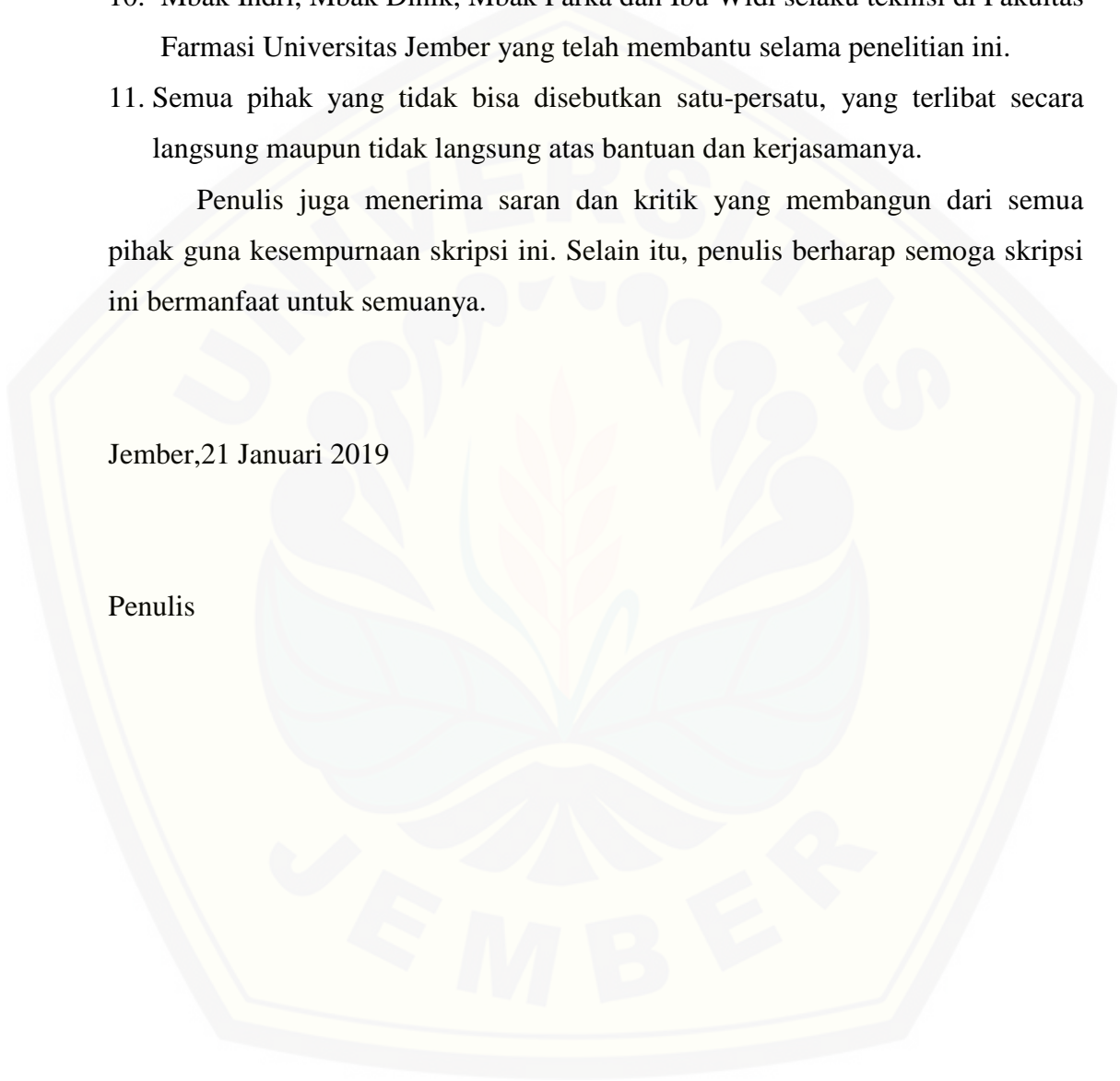
dan untuk MPA. PK. IX (Pasang, Kernet, Nesting, Tutur, Ceret, Poker, Webing, Gudhel) yang selalu bertahan dalam suka maupun duka.

9. Seluruh anggota tim proyek edamame serta dosen-dosen yang selalu membimbing selama pelaksanaan penelitian.
10. Mbak Indri, Mbak Dinik, Mbak Parka dan Ibu Widi selaku teknisi di Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membantu selama penelitian ini.
11. 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
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR	v
BAB 1. PENDAHULUAN	6
1.1 Latar Belakang	6
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Manfaat Penelitian	9
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Edamame Terfermentasi	10
2.2 Fermentasi.....	12
2.3 Estrogen dan Fitoestrogen	15
2.4 Kolesterol dan Trigliserida	18
2.4.1 <i>Kolesterol</i>	18
2.4.2 Trigliserida	19
2.5 Ovariektomi dan <i>Menopause</i>	21
2.6 Dislipidemia akibat <i>Menopause</i>	22
2.7 Kerangka Konseptual	23
2.8 Hipotesis	25
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	26
3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
3.1.1 Jenis penelitian	26
3.1.2 Waktu dan tempat penelitian	26
3.2 Variabel Penelitian	26
3.2.1 Variabel bebas	26
3.2.2 Variabel terikat	26
3.2.3 Variabel terkontrol	27
3.3 Rancangan Penelitian.....	27
3.3.1 Rancangan operasional.....	27
3.3.2 Definisi operasional.....	27

3.4 Alat dan Bahan Penelitian	29
3.4.1 Alat	29
3.4.2 Bahan	29
3.5 Prosedur Penelitian	29
3.5.1 Preparasi edamame	29
3.5.2 Peremajaan isolat <i>A. oryzae</i> dan isolat <i>R. oligosporus</i>	29
3.5.3 Pembuatan suspensi spora <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i>	30
3.5.4 Perhitungan konsentrasi spora <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i>	30
3.5.5 Preparasi edamame terfermentasi	31
3.5.6 Persiapan hewan uji	31
3.5.7 Ovariectomi	32
3.5.8 Perlakuan hewan uji	33
3.5.9 Penentuan kadar kolesterol dan trigliserida	33
3.6 Analisis Data	34
3.7 Skema kerja penelitian	35

DAFTAR PUSTAKA	Error!
Bookmark not defined.	6

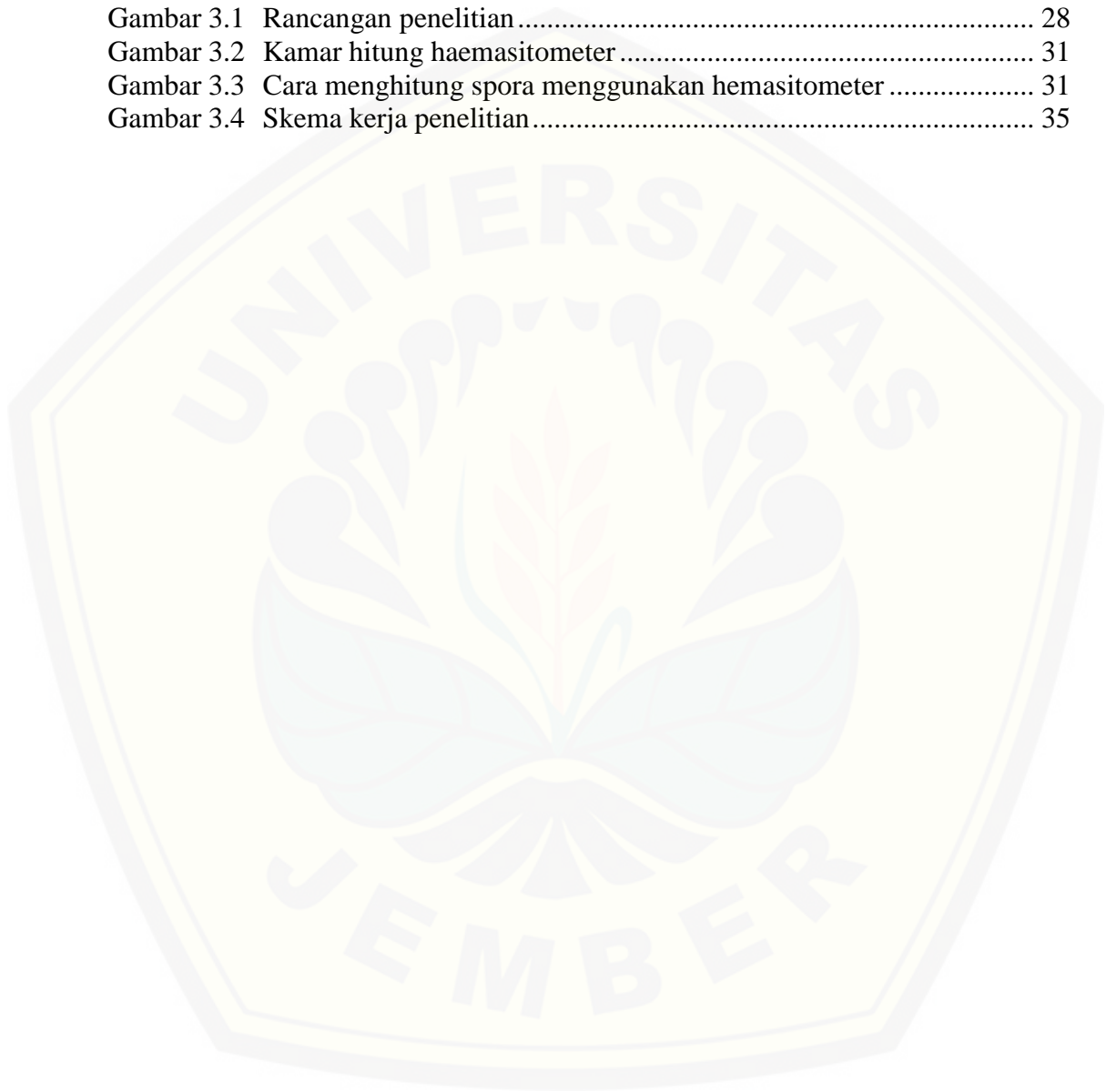
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kriteria kadar trigliserida dalam darah..... 20



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Biji edamame	11
Gambar 2.2	Struktur kimia isoflavon aglikon dan gugus substitusinya.....	18
Gambar 2.3	Struktur kimia isoflavon glikosida dan gugus substitusinya.....	18
Gambar 2.4	Kerangka konseptual.....	23
Gambar 3.1	Rancangan penelitian.....	28
Gambar 3.2	Kamar hitung haemasitometer	31
Gambar 3.3	Cara menghitung spora menggunakan hemasitometer	31
Gambar 3.4	Skema kerja penelitian.....	35



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dislipidemia merupakan kelainan metabolisme lipoprotein yang mengarah pada peningkatan persisten konsentrasi plasma kolesterol total dan trigliserida (Jocelyne dkk., 2017). Dislipidemia menjadi salah satu faktor risiko signifikan terjadinya penyakit kardiovaskuler terutama penyakit jantung koroner (PJK) yang memiliki tingkat morbiditas dan jumlah angka kematian tinggi di seluruh dunia (Sifri dkk., 2014). Berdasarkan data statistik pada tahun 2017, penyakit jantung koroner menjadi penyebab kematian nomor satu di seluruh dunia (Benjamin dkk., 2017). Selain itu, pada tahun 2030 diperkirakan penyakit kardiovaskuler berpotensi menyebabkan 25 juta kematian terutama akibat penyakit jantung koroner (Sifri dkk., 2014). Menurut hasil statistik WHO, prevalensi dislipidemia di Indonesia (kolesterol total ≥ 160 mg/dL) pada kelompok usia ≥ 25 tahun sebesar 36% (33,1% untuk pria dan 38,2% untuk wanita) (Lin dkk., 2018). Risiko terjadinya dislipidemia semakin meningkat setiap tahunnya, ditunjukkan dengan tingginya proporsi *overweight* sebesar 13,6% dan obesitas sebesar 21,8% dari tahun 2007-2018 sebagai faktor pencetus terjadinya dislipidemia (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018).

Berdasarkan profil lipidnya, dislipidemia dapat dibedakan menjadi 3 jenis yaitu hiperkolesterolemia, hipertrigliseridemia, dan hiperlipidemia kombinasi peningkatan trigliserida dan kolesterol (Jocelyne dkk., 2017). Patofisiologi dislipidemia penyebab penyakit kardiovaskuler terjadi akibat hipertrofi jaringan adiposa sehingga jumlah *Low density lipoprotein* (LDL) meningkat (Packard, 2003). LDL disintesis dari trigliserida dalam partikel LDL yang diproses oleh enzim lipase hati. Selain penyakit kardiovaskuler, peningkatan kadar serum kolesterol total atau hiperkolesterolemia juga berkaitan dengan patofisiologi aterosklerosis karena menyebabkan penebalan lapisan medial dan intimal dinding arteri dan berkurangnya elastisitas arteri (Lemos dkk., 2013). Kondisi hiperkolesterolemia dapat terjadi terutama pada wanita yang mengalami fase

menopause. Hiperkolesterolemia terjadi akibat penurunan hormon estrogen yang kemudian meningkatkan risiko penyakit kardiovaskuler (Mešalić dkk., 2008). Salah satu terapi yang dapat dilakukan untuk mengurangi risiko terjadinya penyakit kardiovaskuler yaitu menggunakan *hormone replacement therapy* (HRT) (Williams dan Suparto, 2004). Berdasarkan studi observasional, penggunaan HRT terbukti dapat mengurangi risiko penyakit jantung koroner sebanyak 50% (Bush dkk., 1987). Meskipun demikian, penggunaan HRT terutama kombinasi hormon estrogen dan progesteron pada wanita *menopause* dapat meningkatkan risiko terjadinya kanker payudara dan demensia (wanita berusia > 65 tahun). Oleh karena itu diperlukan terapi lain yang lebih aman untuk menggantikan HRT. Salah satu terapi alternatif yang dapat diberikan yaitu berupa senyawa fitoestrogen yang berasal dari tumbuhan (Mahmud, 2010).

Fitoestrogen merupakan senyawa yang dapat mengikat reseptor estrogen karena strukturnya yang mirip dengan estrogen sehingga dapat digunakan sebagai alternatif dari HRT (Carolina dan Moreira, 2013). Studi epidemiologi tentang penggunaan fitoestrogen menunjukkan penurunan risiko kanker payudara, menurunnya keluhan terhadap gejala *menopause* dan osteoporosis pada wanita dari negara-negara dengan konsumsi fitoestrogen tinggi melalui diet berbasis kedelai (Messina, 2008). Hasil penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa konsumsi kedelai dapat menurunkan LDL dan kadar kolesterol total (Boyle dkk., 2003). Fitoestrogen yang paling banyak terdapat pada kedelai berupa isoflavon (Sirotkin, 2014). Salah satu jenis kedelai yang menjadi komoditas utama sekaligus produk andalan dari Jember adalah edamame (*Glycine max (L.) Merrill*) (Kurniasanti dkk., 2014). Sejumlah besar isoflavon telah diidentifikasi dalam tanaman dalam bentuk glikosida tidak aktif (daidzin dan genistin) (Messina, 2008). Aktivitas estrogenik fitoestrogen tersebut dapat ditingkatkan menjadi senyawa yang lebih aktif berupa isoflavon aglikon melalui reaksi hidrolisis oleh β -glikosidase (Nikolić dkk., 2017). Proses enzimatik untuk membentuk isoflavon aglikon pada makanan dapat melalui aksi enzimatik di saluran pencernaan dan proses fermentasi (Nikolić dkk., 2017).

Fermentasi edamame menggunakan jamur dapat memperbaiki nutrisi, meningkatkan jumlah dan avaiabilitas isoflavon aglikon (genistein, daidzein, glisitein) (Murphy dkk., 1999). Jenis jamur yang dapat digunakan dalam proses fermentasi kedelai di antaranya *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*. Fermentasi edamame menggunakan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dapat meningkatkan daidzein secara signifikan dibanding edamame nonfermentasi (Imansari 2018), sedangkan fermentasi dengan kombinasi jamur serupa diketahui juga meningkatkan jumlah genistein (Fitriah, 2018).

Berdasarkan uraian tersebut, edamame terfermentasi dengan kandungan isoflavon aglikon yang tinggi memiliki efek estrogenik yang diduga dapat menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida sehingga dapat mengurangi risiko terjadinya dislipidemia sebagai pencetus penyakit kardiovaskuler. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji pengaruh edamame (*Glycine max (L.) Merrill*) terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar kolesterol dan trigliserida pada tikus betina *Sprague Dawley* terovariektomi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah dalam penelitian yaitu apakah pemberian edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dapat menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida tikus terovariektomi?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian adalah mengetahui pengaruh pemberian edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar kolesterol dan trigliserida tikus terovariektomi.

1.4 Manfaat Penelitian

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

a) Bagi peneliti

Penelitian ini dapat menambah ilmu, wawasan, dan pengalaman baru bagi peneliti tentang pengaruh pemberian edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* untuk menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida tikus terovariektomi

b) Bagi institusi

Manfaat bagi institusi ialah sebagai dasar penelitian selanjutnya mengenai pengaruh fitoestrogen edamame terhadap kadar kolesterol dan trigliserida.

c) Bagi masyarakat

Hasil penelitian dapat digunakan sebagai bahan edukasi bagi masyarakat terkait manfaat fermentasi edamame terutama untuk wanita pada masa *menopause*. Terlebih dengan tingginya ketersediaan edamame di Jember diharapkan dapat lebih dimanfaatkan baik untuk meningkatkan perekonomian maupun kualitas hidup masyarakat.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Edamame Terfermentasi

Edamame merupakan jenis kedelai Jepang yang terkenal di Indonesia dengan bentuk, biji dan ukuran polong yang lebih besar dari kedelai pada umumnya. Di Indonesia, edamame termasuk produk unggulan terutama di wilayah Jember (Mahanani, 2016). Edamame di Kabupaten Jember dikembangkan oleh PT Mitra Tani 27 sejak tahun 1994 yang ditanam pada tanah regosol basah (Kusmanadhi dan Poerwoko, 2018). Selain diolah dalam bentuk cemilan maupun sebagai bahan sayuran, edamame juga telah dipasarkan dalam bentuk beku. Pasar utama edamame beku terdapat di pasar domestik seperti Denpasar, Surabaya, Bandung, Jakarta dan juga di Jepang serta Amerika. Edamame termasuk komoditas ekspor karena nilai ekonominya jauh lebih tinggi dari kedelai biasa.

Klasifikasi edamame dalam taksonomi adalah 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. (ITIS, 2018)

Waktu terbaik untuk panen edamame adalah ketika sebagian besar edamame berwarna hijau atau sebelum warnanya berubah menjadi kuning (pada

tahap pertumbuhan R6-R7) (Zeipina dkk., 2017), 58-65 hari setelah ditanam (Kusmanadhi dan Poerwoko, 2018).



Gambar 2.1 Biji edamame (*Glycine max* (L.) Merrill) (Fitriah, 2018)

Edamame memiliki kandungan kalsium dan serat makanan yang tinggi. Seratus gram edamame mengandung 70-72 mg kalsium dan 13,8-15,6 gram serat makanan (Johnson dkk., 1999). Tingginya kandungan kalsium dan serat makanan dalam edamame dapat bermanfaat dalam mengubah metabolisme lipid dalam usus, khususnya dengan menurunkan efektivitas penyerapan lemak dalam tubuh (Wironegoro, 2018). Kandungan lainnya dalam edamame antara lain protein, lemak, fosfolipid, fosfor, kalsium, besi, sodium, potassium, vitamin B1, vitamin B2, niacin, vitamin E, asam askorbat, serat, serta isoflavon. Dalam tiap gram edamame kering diketahui mengandung isoflavon kurang lebih sebesar 100-400 mg/100 g pada sebagian besar varietas edamame (Murphy dkk., 2009). Sejumlah besar penelitian menunjukkan bahwa isoflavon memiliki berbagai pengaruh positif terhadap kesehatan diantaranya dapat mengurangi risiko penyakit kardiovaskuler, efek monopause dan gejala yang berkaitan dengan kadar kolesterol darah (Zhang dkk., 2003). Isoflavon juga diketahui memiliki aktivitas antikanker dan efek terhadap siklus sel serta mengendalikan pertumbuhan sel (Gourineni dkk., 2010).

Isoflavon glikosida merupakan komponen utama yang terdapat pada edamame dan produk kedelai nonfermentasi lainnya (Chen dan Wei, 2008). Glikosida merupakan flavonoid yang berikatan dengan gula (Ferreira dkk., 2011). Isoflavon dalam bentuk glikosida kurang dapat diserap di dalam usus halus dikarenakan berat molekul dan sifat hidrofilnya yang besar. Sehingga diperlukan aksi dari β -glucosidase untuk mengubah glikosida menjadi bentuk aglikon yang lebih aktif (Araújo dkk.,

2013). Isoflavon aglikon (daidzain, glisitein, dan genistein) lebih mudah terabsorpsi akibat struktur dan metabolitnya yang mempengaruhi luas absorpsi dari sistem gastrointestinal. Proses perubahan isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon terjadi melalui proses fermentasi (Chen dan Wei, 2008).

2.2 Fermentasi Edamame

Fermentasi merupakan proses perubahan makanan melalui aksi mikroorganisme atau enzim sehingga terjadi perubahan biokimia yang menyebabkan modifikasi signifikan pada makanan (Sahlin, 1999). Sedangkan dalam istilah mikrobiologis, fermentasi adalah proses utama untuk menghasilkan ATP melalui degradasi bahan organik secara anaerob (tanpa molekul O₂) dengan adanya mikroorganisme yang sesuai (Mani dkk., 2018). Proses fermentasi pada makanan dilakukan menggunakan mikroorganisme dengan enzim yang aman untuk dikonsumsi seperti amilase, protease dan lipase. Beberapa mikroorganisme yang biasa digunakan dalam proses fermentasi antara lain kapang, jamur dan bakteri (Bourdichon dkk., 2012).

Salah satu jamur yang biasa digunakan dalam proses fermentasi makanan adalah jamur dari genus *Aspergillus* yaitu *Aspergillus oryzae*. *A. oryzae* merupakan jamur berfilamen yang dapat mengeluarkan sejumlah enzim hidrolitik untuk proses fermentasi dan banyak digunakan dalam pembuatan kecap secara tradisional di Asia (Chancharoonpong dkk., 2012). Jamur lainnya dari genus *Aspergillus* yang dapat digunakan dalam industri fermentasi adalah *Aspergillus niger* dan *Aspergillus sojae*. Sedangkan *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* termasuk jamur yang bersifat patogen (Yoshimi dkk., 2016). Meskipun secara genetik *A. oryzae* dekat dengan *Aspergillus flavus* yang diketahui dapat menghasilkan zat karsinogen berupa aflatoxin, *A. oryzae* terbukti tidak memproduksi aflatoxin atau metabolit karsinogenik lainnya (Barbesgaard dkk., 1992).

Taksonomi *A. oryzae* menurut Uniprot (2018):

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

Jenis jamur lain yang juga sudah sejak lama dipakai dalam industri fermentasi makanan terutama tempe adalah *Rhizopus oligosporus* (Nout dan Kiers, 2005). *R. oligosporus* merupakan jenis jamur yang paling sering digunakan dalam fermentasi tempe karena pertumbuhannya yang cepat pada suhu tinggi (30-42 °C). Manfaat lain dari penggunaan *R. oligosporus* yaitu memiliki aktivitas fotolitik dan lipolitik yang tinggi dan dapat memproduksi antioksidan yang kuat (Nout, 1990). *R. oligosporus* memiliki ciri-ciri koloni berwarna abu-abu kecoklatan dengan tinggi 1 mm atau lebih. Jumlah spora pada sporangium sekitar 100 spora dengan sporangiospora berbentuk bulat hingga setengah bulat, berukuran besar dan tidak beraturan (Madigan dan Martinko, 2004). Klasifikasi jamur *R. oligosporus* menurut *New Zeland Organism Register* (2016):

Kingdom : Fungi
Phylum : Zygomycota
Subphylum : Mucoromycotina
Order : Mucorales
Family : Rhizopodaceae
Genus : *Rhizopus*
Species : *Rhizopus oligosporus* Saito

Proses fermentasi pada kedelai mendorong perubahan senyawa fitokimia menjadi bentuk isoflavon melalui reaksi hidrolisis. Selain itu, fermentasi juga dapat mengurangi antinutritional faktor dengan mengurangi kandungan inhibitor trypsin (Araújo dkk., 2013). Fermentasi pada edamame menyebabkan perubahan isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon melalui reaksi hidrolisis oleh enzim β -glucosidase (Chen dan Wei, 2008). Mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi berperan dalam memutus ikatan karbohidrat (Araújo dkk., 2013). Oleh karena itu, jumlah isoflavon aglikon lebih banyak terdapat pada edamame terfermentasi dibandingkan nonfermentasi.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, kadar genistein optimal pada edamame terfermentasi menggunakan *R. oligosporus* terjadi pada hari kedua fermentasi (Novitasari, 2018). Penelitian kadar deidzein dengan jamur yang sama meningkat pada hari ke 2, 3, dan 4 setelah mengalami penurunan pada hari pertama fermentasi (Naufalia, 2018). Fermentasi edamame menggunakan *A. oryzae* menunjukkan peningkatan kadar deidzein pada hari ke-4 fermentasi dibandingkan kedelai nonfermentasi (Sutatik, 2018). Sedangkan pada penelitian Yunindarwati dkk. (2016), kadar genistein pada edamame fermentasi mengalami peningkatan pada hari pertama sampai hari ke-3. Penelitian edamame terfermentasi menggunakan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* menunjukkan kadar genistein yang mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan edamame nonfermentasi (Fitriah, 2018). Begitu pula pada penelitian Imansari (2018), kadar deidzein pada edamame terfermentasi menggunakan kombinasi jamur yang sama menunjukkan peningkatan yang signifikan. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa kadar isoflavon deidzein dan genistein mengalami peningkatan setelah proses fermentasi dimana isoflavon merupakan salah satu kelompok fitoestrogen yang memiliki aktivitas signifikan sebagai alternatif pengganti hormon estrogen dengan struktur steroidal dan aktivitas biologis yang sama.

2.3 Estrogen dan Fitoestrogen

Estrogen merupakan hormon steroid yang dihasilkan ovarium yang mempengaruhi fungsi hipotalamus, hipofisis, hati, kerangka dan kalsium homeostasis (Baki, 2013). Hormon estrogen juga merupakan hormon reproduksi utama yang mempengaruhi pertumbuhan, perkembangan, pematangan dan fungsi saluran reproduksi serta diferensiasi seksual dan perilaku (Balthazart dkk., 2009). Estrogen disintesis di sejumlah sel dan jaringan manusia, seperti sel granulosa ovarium, plasenta *syncytiotrophoblast*, jaringan adiposa dan otak (Li dan Shen, 2005). Pada wanita *menopause*, estrogen disintesis menggunakan kolesterol sebagai prekursor di ovarium, korpus luteum, dan plasenta serta sejumlah kecil estrogen juga diproduksi oleh organ non gonad seperti hati, jantung, kulit, dan otak (Cui dkk., 2013). Tiga bentuk utama estrogen pada wanita antara lain estrone, 17- β -estradiol, dan estriol (Cui dkk., 2013). Estradiol adalah produk utama dari keseluruhan proses biosintesis dan merupakan estrogen yang paling potensial selama periode *premenopause*. Di ovarium, estradiol adalah jenis estrogen yang paling aktif secara fisiologis yang diproduksi oleh folikel sel granulosa praovulasi melalui aromatisasi androgen oleh folikel sel granulosa yang tumbuh (Baki, 2013).

Estrogen bekerja melalui dua jenis reseptor, yaitu *nuclear reseptor* (ER) α dan β serta reseptor sel membran (GPR30 dan ER-X). Kedua jenis reseptor estrogen diekspresikan di jaringan perifer dan otak melalui distribusi sel dan jaringan spesifik. Meskipun kedua jenis reseptor estrogen mentransduksi efek estrogen menjadi berbagai respon fisiologis di berbagai organ, pada reseptor estrogen *nuclear* efek estrogen yang dimediasi terjadi secara perlahan (berjam-jam/berhari-hari) sedangkan efek intraseluler yang dimediasi oleh reseptor estrogen sel-membran merespons lebih cepat, bahkan dalam beberapa detik. Reseptor estrogen α terutama diekspresikan dalam organ gonad tetapi juga terdapat seperti uterus, epididimis, tulang, payudara, hati, ginjal, jaringan adiposa putih, stroma prostat, dan sel *leydig* pada testis sedangkan reseptor estrogen β lebih banyak diekspresikan dalam jaringan non gonad seperti usus besar, testis, sumsum tulang, endotelium pembuluh darah, paru-paru, kandung kemih, epitel

prostat, dan sel granulosa ovarium (Couse dan Korach, 1999). Salah satu peranan dari reseptor estrogen terutama ER- α adalah mengatur metabolisme lipid. Hilangnya gen ER- α dapat menyebabkan *up*-regulasi gen yang terlibat dalam biosintesis lemak di hati dan *down*-regulasi gen yang terlibat dalam transportasi lipid. Selain itu, GPR30 (reseptor sel membran) berperan dalam mengatur metabolisme LDL salah satunya dengan cara menunjukkan gangguan homeostasis kolesterol berupa tingginya kadar LDL sedangkan kadar HDL tetap normal (Li dan Zhang, 2018).

Fitoestrogen adalah komponen non steroidal yang berikatan dan aktif terhadap *estrogen reseptors* (ERs) α dan β yang disebabkan oleh konformasi strukturnya yang mirip dengan estradiol (Araújo dkk., 2013). Berdasarkan struktur kimianya dan siklus biosintesis, fitoestrogen terdiri dari 4 kelas yaitu coumestans, flavonoid (flavon, flavonol, flavanon, isoflavonoid), lignan, stilbenoids (Carolina dan Moreira, 2013). Isoflavon ditemukan pada tumbuhan jenis kacang-kacangan terutama kedelai, sedangkan sumber utama lignan terdapat pada biji rami dan coumestans secara signifikan terdapat pada tanaman semanggi, alfalfa dan kecambah kedelai (Sirotkin dan Harrath, 2014). Contoh senyawa yang paling dikenal dari kelompok coumestans adalah coumestrol. Sedangkan contoh senyawa dari kelompok lignan antara lain matairesinol, secoisolariciresinol, lariciresinol, pinoresinol dan metabolitnya seperti enterodiol, enterolakton, dan equol. Sejumlah besar isoflavon yang telah diidentifikasi pada tanaman terdapat dalam bentuk glikosida tidak aktif (daidzin dan genistin) dan dalam bentuk 4'-turunan metilasi (formononetin dan biochanin A) (Nikolić dan Savić-Gajić, 2017). Fitoestrogen dapat berikatan dengan ER α atau ER β , namun memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap ER β . Adanya cincin fenolik dan juga jarak antara dua atom oksigen fenolik yang berlawanan pada struktur isoflavon memiliki kemiripan dengan estradiol. Persamaan struktur inilah yang memungkinkan isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen sehingga dapat menggantikan estradiol secara efektif.

Berdasarkan studi epidemiologi, penggunaan fitoestrogen pada wanita *menopause* menunjukkan penurunan risiko kanker payudara, mengurangi gejala

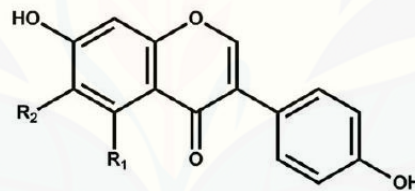
menopause dan osteoporosis pada wanita yang mengkonsumsi fitoestrogen melalui diet berbasis kedelai (Coxam, 2008). Hasil studi lainnya menunjukkan bahwa konsumsi fitoestrogen dapat menurunkan kadar kolesterol total, triasilgliserol, LDL, dan meningkatkan kadar kolesterol HDL serta menghasilkan efek yang lebih signifikan pada pasien dengan kondisi hiperkolesterolemia (Reynolds dkk., 2006; Nikolić dkk., 2017). Salah satu fitoestrogen yang memiliki efek signifikan yaitu isoflavon aglikon (genistein dan daidzein) yang dapat menurunkan jumlah kolesterol total dan trigliserida melalui aktivitas estrogenik berupa regulasi adipogenesis.

Penurunan kadar kolesterol dan trigliserida oleh isoflavon terjadi melalui ikatan isoflavon aglikon (deidzein dan genistein) dengan reseptor estrogen (ER) terutama ER- β . Ikatan tersebut dapat meningkatkan ekspresi gen reseptor LDL, menghambat sintesis kolesterol dan meningkatkan klirens kolesterol sehingga mengurangi kadar kolesterol dalam plasma darah (Kishida dkk., 2006). Reseptor LDL merupakan regulator utama yang mengikat LDL dan apolipoprotein B dan berperan dalam mengatur sirkulasi LDL. Ketika reseptor LDL berada pada permukaan sel, LDL yang terikat akan terdegradasi oleh enzim lisosom (Zeka dkk., 2017). Peningkatan jumlah reseptor LDL yang diikuti dengan aktivasi reseptor LDL oleh isoflavon menyebabkan peningkatan *uptake* LDL yang terjadi di hati sehingga mengurangi jumlah apolipoprotein-B serta menurunkan konsentrasi kolesterol dan trigliserida (Zeka dkk., 2017). Isoflavon juga dapat mencegah reaksi oksidasi dan mengurangi toksisitas dari oksidasi LDL. *Stress* oksidatif dapat meningkatkan kadar serum total kolesterol, LDL, trigliserida, dan VLDL. Pemberian isoflavon dapat merubah profil lipid tersebut kembali ke kondisi normal. Mekanisme aktivitas ini terjadi melalui perbaikan rasio hormon insulin dan glukagon yang melibatkan penurunan biosintesis lemak di hati dengan cara mengurangi ekspresi gen *sterol regulatory element binding protein* (SREBP-1) (Abd dkk., 2014). SREBP-1 merupakan prekursor protein yang meregulasi enzim yang terlibat dalam biosintesis asam lemak dan trigliserida seperti *acetyl-CoA carboxylase* (ACC), *fatty acid synthase* (FAS). Penurunan ekspresi gen SREBP-1 di hati akan mengurangi jumlah FAS sehingga kadar lemak yang

disintesis menjadi berkurang. Selain itu, isoflavon juga meningkatkan klirens serum kolesterol melalui stimulasi faktor transkripsi *sterol regulatory element binding protein-2* (SREBP-2) yaitu prekursor protein yang terlibat pada biosintesis kolesterol dan mengendalikan transkripsi reseptor LDL (Zeka dkk., 2017).

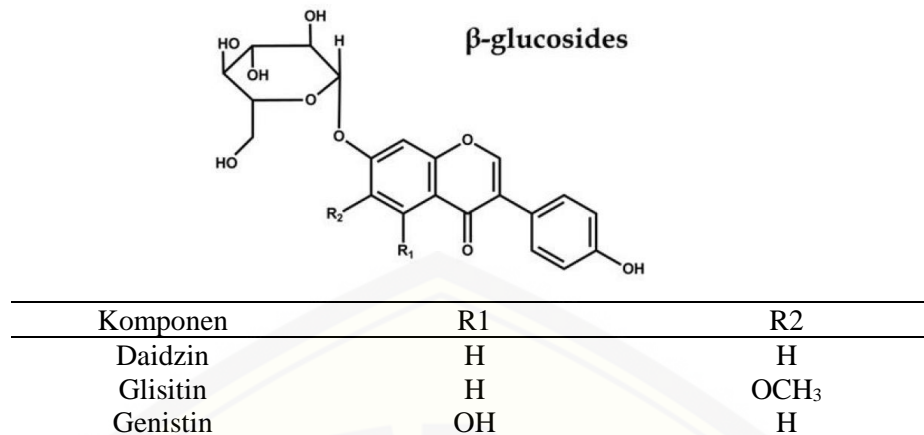
Efek isoflavon pada sistem kardiovaskular berkaitan dengan efeknya pada metabolisme lemak. Konsumsi fitoestrogen yang dapat berperan dalam menunda terjadinya aterosklerosis dan risiko penyakit kardiovaskular berhubungan dengan hilangnya fungsi ovarium yang mengakibatkan defisiensi estrogen pada saat *menopause*. Oleh karena itu, untuk membuktikan aktivitas fitoestrogen terutama pada edamame terfermentasi dapat dilakukan melalui penelitian terhadap hewan uji coba dengan metode ovariektomi.

Berikut struktur isoflavon aglikon dan glikosida ditunjukkan pada Gambar 2.2 dan Gambar 2.3.



Komponen	R1	R2
Daidzein	H	H
Glisitein	H	OCH ₃
Genistein	OH	H

Gambar 2.2 Struktur kimia isoflavon aglikon dan gugus substitusinya (Michel dkk., 2013).



Gambar 2.3 Struktur kimia isoflavon glikosida dan gugus substitusinya (Lecomte dkk., 2017)

2.4 Tinjauan tentang kolesterol dan trigliserida

2.4.1 Kolesterol

Kolesterol merupakan kelompok sterol utama pada hewan dan komponen struktural membran serta prekursor berbagai steroid. Kolesterol termasuk lemak tubuh dengan rumus molekul $C_{27}H_{46}O$ yang sulit larut dalam air dan perlu dikombinasikan dengan fosfolipid atau asam empedu agar larut dalam darah. Kolesterol adalah sumber molekul biologis aktif seperti hormon steroid (kortisol, kortison, aldosteron, dan progesteron), cholecalciferol (vitamin D) dan asam empedu yang disimpan dalam sel dalam bentuk ester kolesterol (Priya dkk., 2013). Biosintesis kolesterol terjadi di hati dan usus dengan kontribusi jumlah kolesterol masing-masing 10% dan 15% dari jumlah yang dihasilkan per hari. Kolesterol disintesis dari asetat asetil-KoA yang berlangsung di sitoplasma dan mikrosom (Herman, 2003). Pada kondisi hormon yang normal, estrogen akan meningkatkan sekresi kolesterol dalam hati menjadi asam empedu melalui reaksi yang dimediasi oleh ER- α di hati (Palmisano dkk., 2017). Hormon Estrogen dapat menurunkan LDL dan HDL dalam plasma darah. Penurunan LDL terjadi akibat peningkatan ekspresi reseptor LDL hati yang meningkatkan klirens LDL dan sekresi kolesterol menjadi asam empedu. Estrogen mendorong sekresi kolesterol

empedu di hati sehingga meningkatkan saturasi kolesterol dalam asam empedu (Faulds dkk., 2012).

Kolesterol yang terdapat di dalam tubuh bergerak dengan membentuk kompleks dengan beberapa protein yang disebut lipoprotein. Berdasarkan rasio kandungan lemak dengan protein, lipoprotein dapat diklasifikasikan sebagai *low density lipoprotein* (LDL) yang dikenal sebagai kolesterol jahat, *high density lipoprotein* (HDL) atau kolesterol baik dan *very low density lipoprotein* (VLDL) yang mirip dengan LDL dan trigliserida (Priya dkk., 2013). *Low density lipoprotein* (LDL) merupakan lipoprotein yang mengangkut kolesterol dari hati dan usus ke sel-sel dan jaringan tubuh melalui aliran darah. Komponen utama pembentuk molekul LDL adalah *phosphatidylcholine* (Hevonoja dkk., 2000). *High density lipoprotein* (HDL) adalah kolesterol baik yang membawa kolesterol dari sel-sel dan jaringan ke hati untuk mengurangi jumlah kolesterol dalam darah. HDL memiliki protein utama berupa apoA-I dan apoA-II serta mengandung sedikit lemak atau bahkan tidak mengandung lemak (Tailleux dkk., 2002). *Very low density lipoprotein* (VLDL) adalah jenis lipoprotein dengan jumlah trigliserida tertinggi dan dikategorikan sebagai jenis kolesterol jahat karena pada akhirnya akan dikonversi menjadi LDL dan menyebabkan penumpukan kolesterol pada dinding arteri (Priya dkk., 2013).

2.4.2 Trigliserida

Trigliserida adalah komponen utama dari *very low density lipoprotein* (VLDL) dan berfungsi sebagai sumber energi. Trigliserida tersusun dari molekul gliserol yang terikat pada tiga asam lemak. Trigliserida dipecah kemudian diserap oleh sel-sel yang terdapat di usus serta dikombinasikan dengan kolesterol dan protein membentuk kilomikron untuk selanjutnya dibawa ke getah bening dan menuju aliran darah (Washington dkk., 2012). Trigliserida merupakan sumber energi utama bagi tubuh dan juga berperan dalam proses metabolisme yang menentukan laju oksidasi asam lemak, tingkat plasma asam lemak bebas, biosintesis molekul lipid lain dan metabolisme lipoprotein (Karantonis dkk.,

2009). Berdasarkan sumbernya, trigliserida terdiri dari 2 macam yaitu trigliserida yang berasal dari makanan atau disebut dengan trigliserida eksogen (kilomikron) dan trigliserida yang terbentuk di hati atau trigliserida endogen (pra- β -lipoprotein). Trigliserida hanya ditemukan sedikit dalam darah dan disimpan di dalam sel sebagai lipid sitoplasma (adiposom) yang tertutup oleh monolayer fosfolipid dan protein hidrofobik (Dzoyem dkk., 2014). Jumlah normal trigliserida yang terdapat di dalam darah dipengaruhi oleh jenis kelamin dan usia. Tingginya jumlah trigliserida dalam darah akan diikuti dengan peningkatan jumlah LDL-c atau penurunan jumlah HDL-c yang kemudian dapat meningkatkan risiko terjadinya *stroke*. Oleh karena itu, jumlah trigliserida dalam tubuh tidak boleh melebihi batas normal sesuai dengan kriteria kadar trigliserida pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kriteria kadar trigliserida dalam darah (Ma dan Shieh, 2006)

Trigliserida	
Jumlah	Keterangan
< 150 mg/dL	Normal
150-199 mg/ dL	Batas tinggi
200-499 mg/ dL	Tinggi
\geq 500 mg/ dL	Sangat tinggi

Trigliserida disintesis dalam kondisi lipogenik yang kemudian dibawa ke jaringan adiposa untuk disimpan. Sebanyak 2 molekul prekursor yang diperlukan untuk sintesis *de novo* trigliserida yang terjadi di hati yaitu berupa lemak-CoA dan gliserol-3-fosfat (G-3-P). Proses sintesis trigliserida dimulai dengan asetil-CoA yang masuk ke dalam siklus asam sitrat dan bereaksi dengan oksaloasetat untuk membentuk sitrat. Sitrat kemudian diekspor dari mitokondria menuju sitoplasma untuk selanjutnya diubah menjadi asetil-CoA dan oksaloasetat oleh sitrat lyase. melalui proses ini, turunan glukosa yaitu asetil-CoA dipindahkan ke sitoplasma sebagai prekursor untuk biosintesis *de novo* asam lemak. Sesuai kebutuhan metabolisme seluler, asam lemak yang telah terbentuk akan diubah menjadi trigliserida untuk disimpan atau fosfolipid untuk sintesis membran biologis. Di dalam hati, metabolisme trigliserida ikut dipengaruhi oleh hormon estrogen. Ketika kadar estrogen yang beredar naik di atas rentang fisiologis, metabolisme jaringan adiposa mengalami perubahan dan menghasilkan penurunan proses

sintesis lemak dan ukuran lemak yang disimpan. Reseptor estrogen α berperan dalam menurunkan akumulasi trigliserida dan mengurangi ekspresi lipoprotein lipase (LPL) yaitu enzim yang mengkatalisis konversi trigliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol (Faulds dkk., 2012). Seperti pada kondisi obesitas, distribusi asam lemak mengalami peningkatan menuju hati dalam bentuk VLDL dengan kandungan trigliserida (TG) yang tinggi. Peningkatan klirens asam lemak oleh estrogen mengakibatkan berkurangnya distribusi asam lemak yang akan digunakan dalam produksi VLDL-TG di hati. Produksi VLDL-TG yang tinggi seimbang dengan peningkatan klirens VLDL-TG sehingga menyebabkan kadar VLDL-TG menurun (Palmisano dkk., 2017). Selain itu, pengaruh hormon estrogen terhadap penurunan jumlah trigliserida juga terjadi melalui stimulasi penggunaan lemak sehingga dapat diubah menjadi energi dan meningkatkan oksidasi asam lemak bebas yang terjadi di hati (Yeasmin dkk., 2017).

2.5 Ovariectomi dan *Menopause*

Ovariectomi merupakan prosedur invasif yang biasa dilakukan untuk mensterilkan hewan uji coba seperti anjing dan tikus (Peeters dan Kirpensteijn, 2011). Prosedur ini dilakukan untuk menciptakan kondisi kekurangan hormon estrogen pada hewan uji yang menggambarkan terjadinya *menopause* pada wanita. Prosedur ovariectomi dilakukan dengan cara menghilangkan salah satu (unilateral) atau kedua (bilateral) ovarium melalui sayatan yang dibuat pada garis tengah punggung hewan uji (Idris, 2012). Pengaruh ovariectomi unilateral dapat diamati pada kadar FSH yang meningkat hanya dalam waktu 24 jam. Selain itu berdasarkan hasil observasi Mandl (1951), ovariectomi menyebabkan peningkatan kadar testosteron yang signifikan dan penurunan kadar progesteron dan estradiol.

Menopause mengacu pada berhentinya siklus menstruasi akibat perubahan hormon dan ketidakaktifan ovarium pada wanita yang dimulai dengan perubahan pola menstruasi dan akhirnya menyebabkan berhentinya menstruasi akibat ovarium yang mengalami penuaan (Lim dan Mackey, 2012). Periode

perubahan fisiologis ini biasanya dimulai pada wanita dengan usia 40-50 tahun dan ditandai oleh berkurangnya hormon estrogen (Mahdavian dan Abbassian, 2014). Pada *menopause*, perubahan kelenjar endokrin yang terlihat adalah penurunan serum kadar inhibin yang kemudian diikuti berkurangnya aktivitas ovarium sehingga kadar serum estradiol turun dan terjadi peningkatan FSH dan LH untuk mempertahankan estrogen pada kondisi fisiologis terbaik.

Menopause dapat terjadi secara alami maupun dengan cara diinduksi melalui kemoterapi atau intervensi bedah seperti ooforektomi/ovariektomi bilateral (Stefanska dkk., 2015). Penurunan estrogen pada *menopause* yang terjadi secara alami maupun akibat pembedahan dapat menyebabkan risiko terjadinya hipertensi, penyakit jantung iskemik, infark miokard, dan stroke meningkat pada wanita *menopause* (Rocca dkk., 2012). Selain itu, risiko CVD meningkat secara signifikan setelah terjadi *menopause*. Hal ini merupakan akibat dari perubahan hormon seks, gangguan *menopause* pada parameter kardiometabolik serta terjadinya penuaan (Collins dkk., 2007). Gangguan klinis lainnya yang dapat terjadi berupa aterosklerosis yang berhubungan dengan defisiensi hormon estrogen yang kemudian menyebabkan kadar LDL meningkat dan terjadi akumulasi kolesterol sehingga membentuk aterosklerosis (Matthews dkk., 2006).

2.6 Dislipidemia akibat *Menopause*

Menopause merupakan faktor risiko penyebab terjadinya *metabolic syndrome* (MetS) salah satunya berupa dislipidemia (Stefanska dkk., 2015). Dislipidemia merupakan kadar lipid abnormal berupa peningkatan fluks asam lemak bebas, kadar trigliserida, HDL, LDL dan apolipoprotein B yang menunjukkan adanya kelainan metabolisme lipoprotein. Profil lipid yang menunjukkan kondisi dislipidemia terlihat pada jumlah kolesterol total $> 2,7$ g/L, HDL-c $< 0,44$ g/L, LDL-c $> 1,88$ g/L, dan trigliserida $> 1,50$ g/L (Jocelyne dkk., 2017). Dislipidemia dapat terjadi akibat beberapa faktor risiko diantaranya diabetes, hipertensi, merokok, usia, *abdominal obesity*, dan *menopause* (Wilde

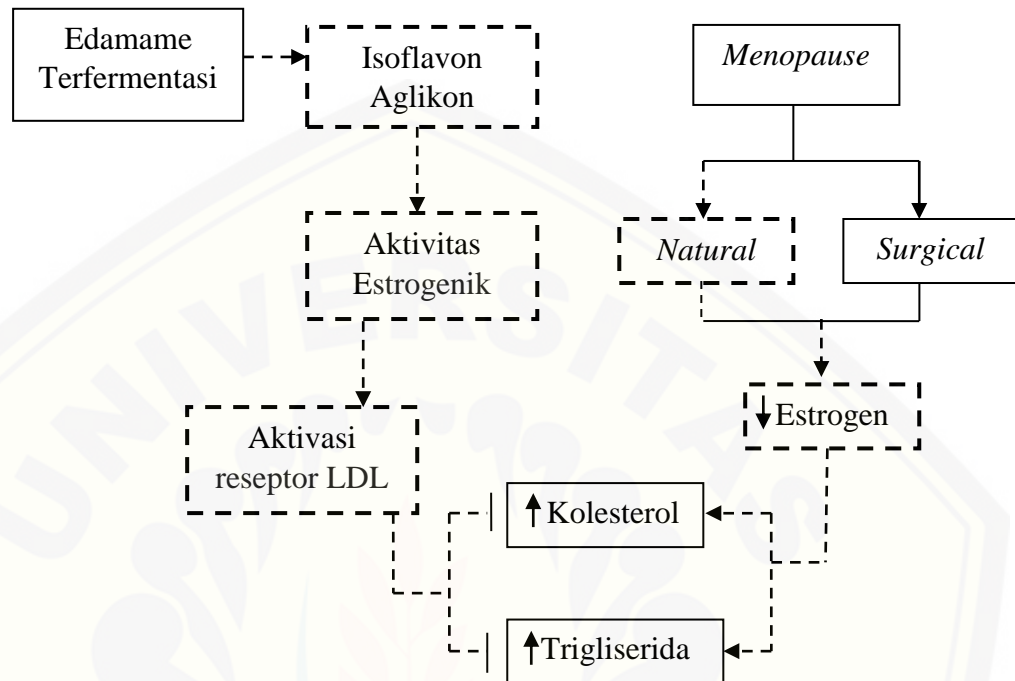
dkk., 2006). Dislipidemia dapat dibedakan menjadi 3 jenis yaitu hiperkolesterolemia, hipertrigliseridemia, dan hiperlipidemia kombinasi peningkatan trigliserida dan kolesterol (Jocelyne dkk., 2017).

Profil lemak pada wanita yang telah mengalami masa *menopause* mengalami sejumlah perubahan seperti peningkatan jumlah kolesterol total, LDL, apolipoprotein B serta penurunan jumlah HDL dibandingkan sebelum *menopause*. Peningkatan kadar kolesterol dan trigliserida terjadi akibat penurunan hormon estrogen pada kondisi *menopause* yang berperan dalam menjaga keseimbangan metabolisme lemak dengan cara mengurangi jumlah kolesterol melalui mekanisme katabolisme kolesterol dan sintesis asam empedu di hati. Sedangkan mekanisme penurunan trigliserida oleh hormon estrogen yaitu dengan mendorong penggunaan lemak tubuh untuk diubah menjadi energi dan meningkatkan oksidasi asam lemak bebas (Yeasmin dkk., 2017).

Pada kondisi *menopause*, partikel LDL berubah menjadi partikel berukuran lebih kecil yang bersifat aterogenik (Toth dan Phan, 2014). Jumlah trigliserida yang meningkat berhubungan dengan berkembangnya obesitas dan resistensi insulin pada wanita setelah masa *menopause*. Resistensi insulin pada adiposit menyebabkan peningkatan pelepasan asam lemak menuju sirkulasi darah. Asam lemak bebas yang berlebih kemudian masuk ke dalam hati dan menstimulasi pembentukan serta sekresi VLDL sehingga mengakibatkan terjadinya hipertrigliseridemia dan hiperkolesterolemia (Yeasmin dkk., 2017). Selain itu, tingginya jumlah LDL dapat menjadi faktor risiko utama penyakit kardiovaskular berupa arteriosklerosis yang dapat ditemukan pada penyakit jantung koroner, stroke iskemik, dan penyakit oklusif vaskular perifer.

2.7 Kerangka Konseptual

Kerangka konseptual penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Keterangan bagan : (1) : variabel yang diteliti; (2) : variabel yang tidak diketahui; (3) \longrightarrow : memicu; dan (4) ---| : menghambat

Gambar 2.4 Kerangka Konseptual Penelitian

Menopause dapat terjadi secara alami (*natural menopause*) dan melalui prosedur operasi (*surgical menopause*) (Rodriguez dan Shoupe, 2015). *Natural menopause* normal terjadi pada setiap wanita berusia 40-50 tahun yang ditandai dengan berkurangnya hormon estrogen (Mahdavian dan Abbassian, 2014). *Surgical menopause* merupakan kondisi *menopause* yang terjadi akibat pengambilan salah satu atau kedua ovarium melalui prosedur pembedahan yang dilakukan sebelum usia *menopause* (Rodriguez dan Shoupe, 2015). Penurunan hormon estrogen ini menyebabkan peningkatan kolesterol total dan trigliserida yang kemudian menyebabkan terbentuknya plak aterosklerosis dan terjadinya penyakit jantung koroner (Matthews dkk., 2006).

Edamame terfermentasi memiliki kandungan fitoestrogen terutama golongan isoflavon aglikon yang merupakan senyawa bioaktif dibandingkan isoflavon glikosida (Carolina dan Moreira, 2013). Berdasarkan penelitian Imansari (2018), fermentasi edamame kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* mampu meningkatkan kadar senyawa isoflavon aglikon. Isoflavon aglikon merupakan salah satu jenis isoflavon dengan bioavailabilitas yang lebih tinggi dibandingkan jenis lainnya dikarenakan lebih cepat diserap di usus kecil. Isoflavon memiliki struktur kimia mirip dengan estrogen, sehingga memiliki aktivitas estrogenik yang kemudian dapat digunakan sebagai pengganti hormon estrogen untuk menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida.

Pada kondisi dislipidemia, isoflavon dapat menurunkan jumlah kolesterol total dan trigliserida melalui aktivitas estrogenik. Mekanisme ini terjadi melalui ikatan isoflavon aglikon dengan ER- β . Ikatan tersebut dapat meningkatkan ekspresi gen reseptor LDL, menghambat sintesis kolesterol dan meningkatkan klirens kolesterol sehingga mengurangi kadar kolesterol dalam plasma darah (Kishida dkk., 2006). Peningkatan jumlah reseptor LDL yang diikuti dengan aktivasi reseptor LDL oleh isoflavon menyebabkan peningkatan *uptake* LDL yang terjadi di hati sehingga mengurangi jumlah apolipoprotein-B serta menurunkan konsentrasi kolesterol dan trigliserida (Zeka dkk., 2017).

2.8 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dapat menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida tikus terovariektomi.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian perlakuan tertentu dengan kondisi terkendali. Jenis penelitian eksperimental yang digunakan berupa *true experimental* dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan kadar kolesterol dan trigliserida pada tikus sebelum dan sesudah ovariectomi (OVX) dengan perlakuan.

3.1.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari-November 2018 bertempat 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

Variabel yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkendali yang dijelaskan sebagai berikut:

3.2.1 Variabel bebas

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

3.2.2 Variabel terikat

Variable terikat dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol dan trigliserida pada serum darah tikus yang diberikan perlakuan dengan pemberian suspensi serbuk edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus*.

3.2.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain waktu fermentasi edamame, suhu inkubasi fermentasi edamame dan inokulum fermentasi yang digunakan seperti suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dengan ketentuan 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

Tahapan penelitian yang dilakukan antara lain sebagai berikut:

- a. Preparasi sampel edamame nonfermentasi.
- b. Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dengan jumlah spora 10^6 spora/mL.
- c. Preparasi sampel edamame fermentasi dengan *A. oryzae* dan *R. oligosporus*.
- d. Pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan penyerbukan edamame terfermentasi.
- e. Dilakukan aklimatisasi hewan uji selama 10 hari di dalam kandang Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- f. Pengambilan darah dilakukan 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 dengan masa penyembuhan selama 10 hari.
- h. Pemberian edamame terfermentasi kepada hewan uji yang dilakukan selama 28 hari.
- i. Penentuan kadar kolesterol dan trigliserida tikus.

3.3.2 Definisi operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut:

- a. Varietas kedelai edamame yang digunakan yaitu kedelai varietas SPM 1 yang diperoleh dari PT.Mitratani Dua Tujuh Jember pada bulan Februari 2018 (waktu panen \pm 3 bulan).
- b. Pada penelitian ini, hewan uji yang digunakan dalam adalah tikus betina perawan galur *Sprague Dawley* yang berusia 6 minggu (42 hari) diperoleh dari pengembangan hewan uji mandiri (PHPM) dan berasal dari unit pengembangan hewan percobaan (UPHP) UGM.
- c. Pada penelitian ini terdapat kelompok *shamed* OVX yang merupakan kelompok tikus yang mengalami pembedahan tanpa pengambilan ovarium tikus.
- d. Kadar kolesterol dan trigliserida pada penelitian diukur menggunakan metode fotometri untuk kemudian dianalisis menggunakan analisis statistik *one way ANOVA* dan *Kruskal-Wallis*.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi

Pada penelitian, populasi hewan uji sebanyak 40 tikus betina perawan galur (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague dawley* berusia 42 hari saat perlakuan dimulai dengan berat rata-rata 180-200 gram yang berasal dari PHPM (pengembangan hewan uji mandiri) dan indukan yang berasal dari unit pengembangan hewan percobaan (UPHP) UGM.

3.4.2 Sampel

Sampel hewan uji yang dipilih adalah tikus betina galur *Sprague dawley* sehat dan normal tanpa adanya kelainan serta dipilih menggunakan teknik acak sederhana (*simple random sampling*). Kriteria inklusi dalam penelitian ini diantaranya tikus betina yang masih perawan dan termasuk dalam usia reproduktif (6 minggu sampai 15 bulan) (Andreollo dkk., 2012), normal, serta sehat. Kriteria eksklusi dalam penelitian ini diantaranya tikus mati selama proses penelitian berlangsung, tikus sakit yang dapat diketahui dari rambut tikus yang abnormal seperti

kusam, botak, atau rontok, pasif atau aktivitas kurang, serta sedang hamil ataupun sedang menyusui.

3.4.3 Besar Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian sebanyak 40 ekor tikus yang dihitung menggunakan rumus *Federer* dan diperoleh jumlah minimal hewan uji sebanyak 4 ekor tikus untuk setiap kelompok.

$$(p - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(8 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$7(n - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) \geq 2,14$$

$$n \geq 3,14$$

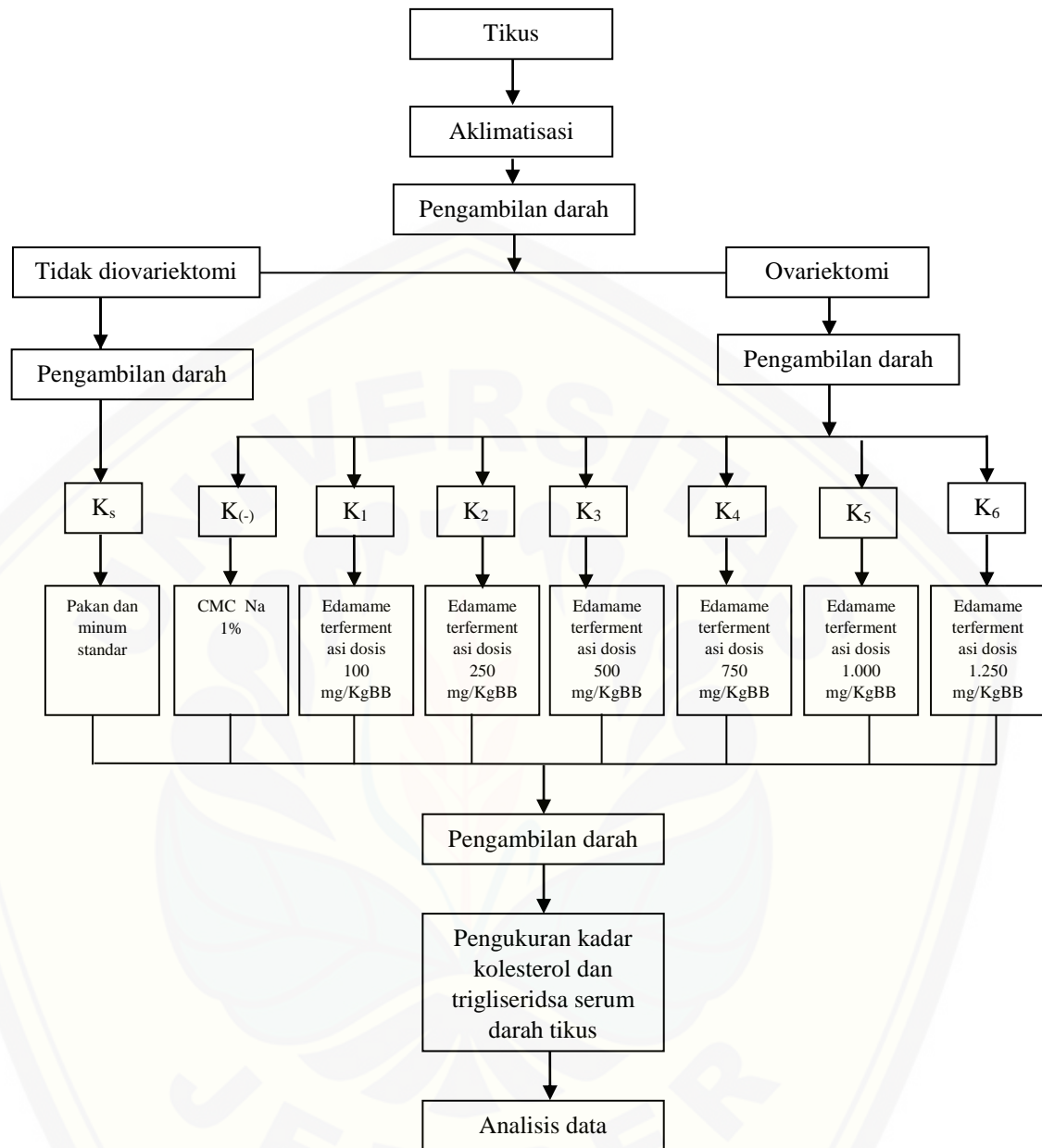
dibulatkan menjadi 4

Keterangan:

p : Jumlah kelompok perlakuan

n : Jumlah ulangan masing-masing kelompok

Penelitian ini terdiri atas 8 kelompok perlakuan dan terdiri dari 5 ekor tikus pada setiap kelompok sehingga total hewan uji yang digunakan sebanyak 40 ekor tikus.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian pengaruh fermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar kolesterol dan trigliserida tikus *Sprague Dawley* dengan metode ovariektomi. KS menunjukkan kelompok *shamed* OVX; K(-) menunjukkan kelompok kontrol negatif; K1 menunjukkan kelompok dosis 100 mg/kgBB; K2 menunjukkan kelompok dosis 250 mg/kgBB; K3 menunjukkan kelompok dosis 500 mg/kgBB; K4 menunjukkan kelompok dosis 750 mg/kgBB; K5 menunjukkan kelompok dosis 1.000 mg/kgBB; K6 menunjukkan kelompok dosis 1.250 mg/kgBB.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Timbangan analitik, alat gelas, *Laminar air flow* (Airtech), autoklaf (ALP), *hot plate*, mikroskop cahaya (Olympus BX53), hemasitometer (Neubar Improved), mikropipet (Serena), sentrifuge (Hermle), inkubator (Imperial III), blender, oven (Memmert), ayakan, seperangkat kandang tikus, seperangkat alat bedah, sonde lambung, dan fotometer (biolyzer100).

3.5.2 Bahan

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

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi edamame

Edamame yang masih segar sebanyak 6 kg dicuci dan dibersihkan untuk kemudian direndam di dalam air panas. Setelah air menjadi dingin, kulit bagian luar dan kulit ari pada edamame dikupas dilanjutkan dengan membersihkan edamame menggunakan air bersih. Setelah bersih, sebanyak 50 gram edamame ditimbang dan dibungkus dengan kertas saring dan selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan disimpan dalam freezer setelah dirasa dingin (Imansari, 2018).

3.6.2 Peremajaan isolate *A. oryzae* dan isolate *R. oligosporus*

Diambil masing-masing *A. oryzae* dan *R. oligosporus* menggunakan kawat ose yang sebelumnya telah disterilisasi kemudian masing-masing kapang tersebut dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisikan media miring *potato dextrose agar* (PDA). Media yang telah berisi *A. oryzae* diinkubasi selama 1 hari sedangkan media lain yang telah berisi *R. oligosporus* diinkubasi selama 3 hari dalam inkubator menggunakan suhu 30 °C (Imansari, 2018).

3.6.3 Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus*

Suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dibuat dengan mencampurkan tween 80 dan aquades dibawah *laminar air flow* (LAF) dengan perbandingan 1:100 sebanyak 10 mL. Campuran tersebut kemudian dituangkan kedalam tabung reaksi yang berisi kapang *A. oryzae* dan *R. oligosporus*. Spora kapang *A. oryzae* dan *R. oligosporus* kemudian diambil dengan hati-hati menggunakan ose steril secara perlahan agar media pada dinding tabung reaksi tidak ikut terambil. Selanjutnya suspensi dimasukkan kedalam tabung reaksi steril dan divortex untuk menghomogenkan dan untuk keperluan selanjutnya (Imansari, 2018).

3.6.4 Perhitungan konsentrasi spora *A.oryzae* dan *R.oligosporus*

Perhitungan konsentrasi spora *A.oryzae* dan *R.oligosporus* dilakukan menggunakan gelas hemasitometer. Sebanyak 10 μ L suspensi spora *A.oryzae* dan *R.oligosporus* yang telah diperoleh sebelumnya dipipet menggunakan mikropipet lalu ditempatkan di kamar hitung *hemasitometer improved neubuer* (Gambar 3.2). Kemudian dihitung jumlah spora yang terdapat pada hemasitometer (Gambar 3.3) atau diamati pada mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 400 kali. Spora yang terdapat pada 5 bidang/kotak pandang 1, 2, 3, 4, dan 5 dihitung kemudian dimasukkan ke dalam Persamaan 3.1.

$$N = \frac{x}{t(mm) \times d \times l(mm^2)} \times 10 \dots \text{Persamaan 3.1 Perhitungan jumlah spora}$$

Keterangan:

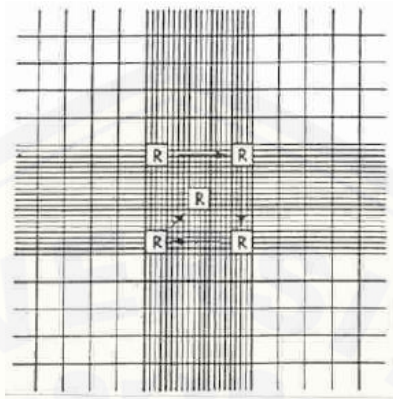
- N : Jumlah spora/mL
- X : Rata-rata jumlah spora yang dihitung
- l : Luas kotak hitung
- t : Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)
- d : Faktor pengenceran
- 10 : Volume suspensi yang diambil (10 μ L = 10 mm³)

Apabila hasil perhitungan kepadatan spora *A.oryzae* dan *R.oligosporus* yang diperoleh lebih dari 10⁶ spora maka dilakukan pengenceran sesuai Persamaan 3.2.

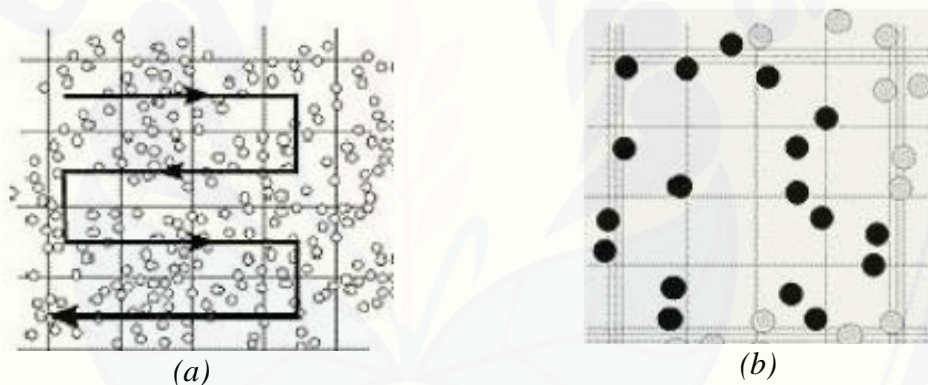
$$N1V1 = N2V2 \dots \text{Persamaan 3. 2 Perhitungan pengenceran spora}$$

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 hemacytometer (a) alur menghitung spora (b) cara menghitung spora (● menunjukkan spora yang dihitung, ○ menunjukkan spora yang tidak dihitung)(Tim QC APH, 2009)

3.6.5 Preparasi edamame terfermentasi

Inokulum jamur *A.oryzae* sebanyak 0,5 mL dan *R. oligosporus* sebanyak 0,5 mL ditambahkan ke dalam edamame yang telah disterilisasi untuk kemudian dilakukan fermentasi dengan cara diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30 °C selama 3 hari. Hasil fermentasi edamame kemudian dipotong kecil dan dimasukkan kedalam oven menggunakan suhu 60 °C hingga kering. Edamame terfermentasi yang telah kering diserbuk menggunakan mesin penggiling atau menggunakan blender agar lebih halus (Imansari, 2018). Edamame yang telah

dihaluskan kemudian diayak untuk menghilangkan bagian-bagian yang kasar. Selanjutnya, hasil ayakan serbuk edamame siap untuk diberikan kepada hewan uji.

3.6.6 Persiapan hewan uji

Dilakukan aklimatisasi hewan uji (tikus betina *Sprague Dawley*) di dalam kandang laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember selama 10 hari. Pada fase ini, hewan uji diberi makanan dan minuman yang sesuai setiap hari sesukanya (*ad libitum*). Hewan kemudian dikelompokkan secara 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.

3.6.7 Ovariectomi

Ovariectomi dilakukan terhadap tikus kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Ovariectomi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan tikus dengan defisiensi estrogen sebagai gambaran wanita *menopause*. Berdasarkan prosedur operasi ovariectomi tikus oleh Khajuria dkk., (2012) yang dimodifikasi, ovariectomi dilakukan dengan kondisi tikus yang telah dianestesi menggunakan kombinasi ketamin 2 mL (50 mg/mL) dan xylazine 2 mL (20 mg/mL). Pada area yang akan dibedah, rambut tikus dicukur \pm seluas 4 cm, kemudian inisiasi transabdominal pada area bedah (posisi menjorok kedalam tubuh sekitar 2 cm) hingga 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 untuk 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.

3.6.8 Pembagian kelompok perlakuan

Tikus sebanyak 40 ekor dibagi menjadi 8 kelompok dan setiap kelompok terdapat 5 ekor tikus. Pemilihan sampel menggunakan *simple random sampling*. Perlakuan setiap kelompok berbeda, seperti yang dijelaskan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Pembagian kelompok perlakuan

Nama kelompok	Perlakuan yang diberikan
Kelompok KS	-
Kelompok K ₍₋₎	Pemberian Na CMC
Kelompok K ₁	Pemberian Edamame Terfermentasi 100 mg/KgBB
Kelompok K ₂	Pemberian Edamame Terfermentasi 250 mg/KgBB
Kelompok K ₃	Pemberian Edamame Terfermentasi 500 mg/KgBB
Kelompok K ₄	Pemberian Edamame Terfermentasi 750 mg/KgBB
Kelompok K ₅	Pemberian Edamame Terfermentasi 1.000 mg/KgBB
Kelompok K ₆	Pemberian Edamame Terfermentasi 1.250 mg/KgBB

3.6.9 Perlakuan hewan uji

Setiap hari tiap kelompok hewan uji diberikan makan dan minuman standar. Setiap tikus pada kelompok perlakuan diukur berat badannya menggunakan timbangan untuk dijadikan acuan dalam pemberian dosis. Kelompok K₁-K₆ diberi diet suspensi edamame terfermentasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* peroral menggunakan sonde lambung sehari sekali selama 28 hari. Sedangkan kelompok kontrol negatif diberikan suspensi CMC Na dan kelompok *shamed* OVX hanya diberikan pakan dan minum standar. Suspensi edamame terfermentasi dibuat menggunakan CMC Na 1% dan akuades.

3.6.10 Penentuan kadar kolesterol dan trigliserida

a. Pengambilan sampel darah

Darah hewan uji pada H-1 OVX dan H+10 OVX diambil dengan cara menggosokkan mikrohematokrit pada *medial canthus* dibawah bola mata ke arah *foramen opticus*. Mikrohematokrit diputar sampai melukai *plexus* kemudian darah ditampung kedalam mikrotube sebanyak ± 1 mL. Sedangkan darah hewan uji 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).

b. Penentuan kadar kolesterol

Reagen Chol Fluitest sebanyak 500 μL dimasukkan kedalam mikrotube dan ditambahkan 10 μL serum darah. Reagen dan serum tersebut kemudian dicampur dengan cara diresuspensi hingga homogen. Campuran yang telah homogen diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ yang selanjutnya dilakukan pengukuran kadar kolesterol menggunakan fotometri.

c. Penentuan kadar trigliserida

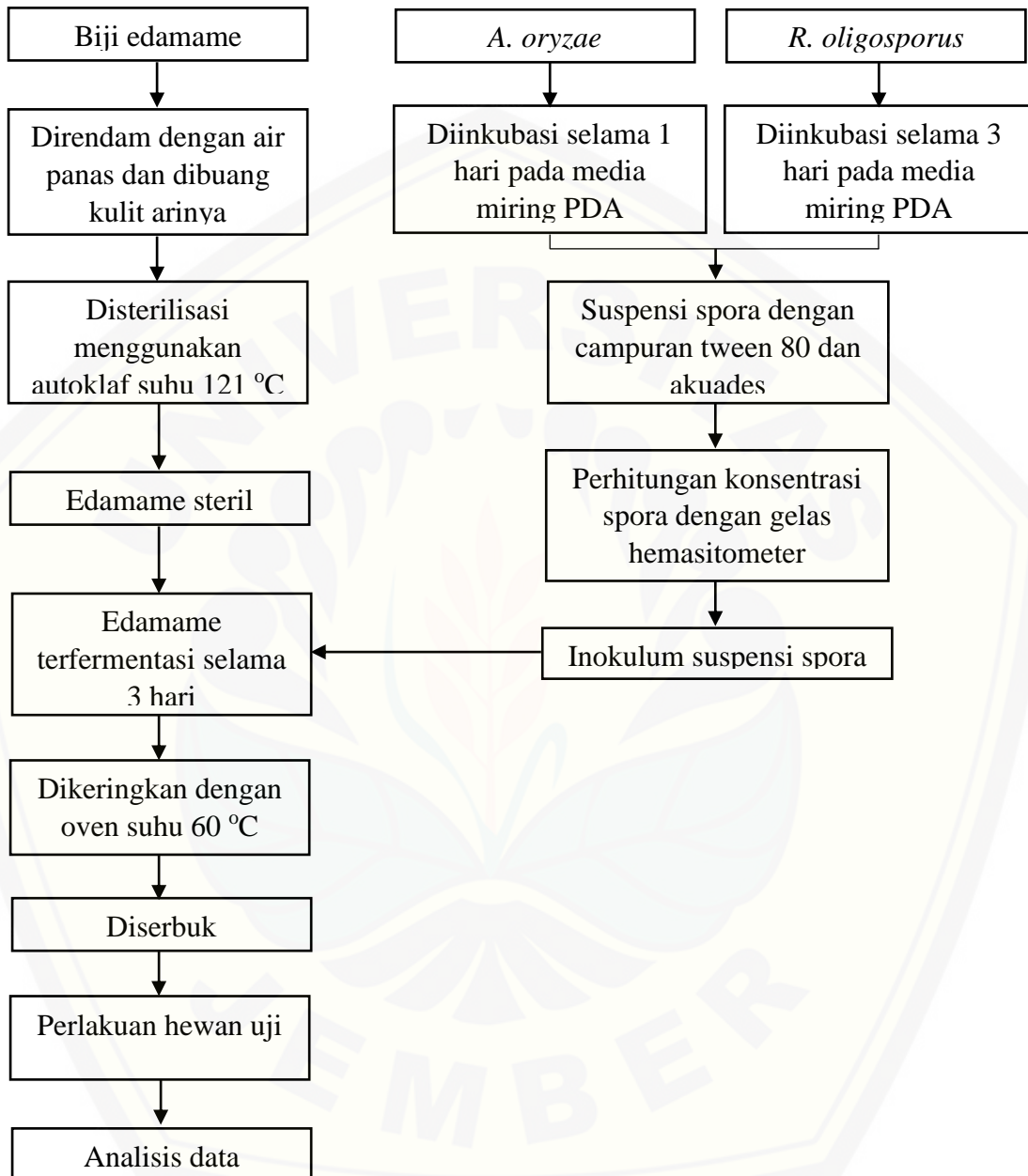
Sebanyak 500 μL reagen TG Fluitest dimasukkan kedalam microtube dan ditambahkan serum darah sebanyak 10 μL . Resuspensi campuran reagen dan serum hingga homogen untuk kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya, campuran tersebut diukur menggunakan fotometri untuk melihat kadar trigliserida.

3.7 Analisis Data

Data kolesterol dan trigliserida yang terdiri dari selisih kadar sebelum OVX dengan setelah OVX dan selisih kadar setelah OVX dengan setelah perlakuan dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk melihat varian data antar kelompok. Hasil analisis statistik data kolesterol dan data trigliserida berupa selisih kadar trigliserida setelah OVX dengan setelah perlakuan menunjukkan varian data antar kelompok homogen dan terdistribusi dengan normal kemudian dilanjutkan menggunakan analisis varian *one way ANOVA* ($p < 0,05$). Sedangkan data trigliserida berupa selisih kadar sebelum OVX dengan setelah OVX yang tidak menunjukkan varian data antar kelompok homogen dan terdistribusi dengan normal dilanjutkan menggunakan analisis uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$).

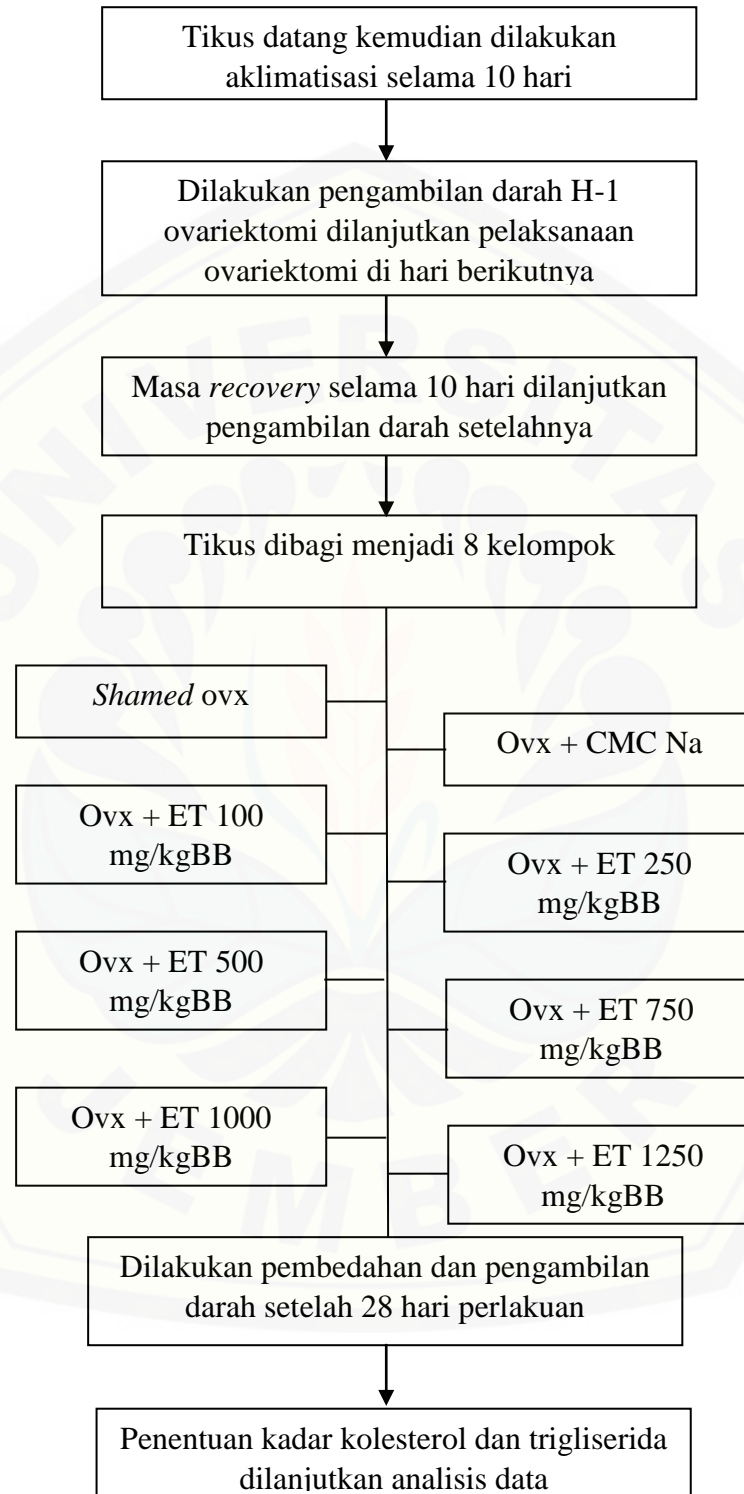
3.8 Skema kerja penelitian

3.8.1 Pembuatan Edamame Terfermentasi



Gambar 3.4 Pembuatan Edamame Terfermentasi

3.8.2 Perlakuan Hewan Uji



Gambar 3.5 Perlakuan Hewan Uji

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pemberian serbuk edamame terfermentasi kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligoporus* tidak mampu menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida pada tikus terovariektomi pada semua kelompok uji dan kelompok *shamed* OVX bila dibandingkan dengan kontrol negatif (CMC Na).

5.2 Saran

Saran yang perlu disampaikan pada penelitian ini adalah:

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek edamame terfermentasi dengan waktu perlakuan lebih dari 28 hari.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan edamame terfermentasi dalam bentuk ekstrak atau isolat bahan aktifnya sehingga dapat membeikan efek yang lebih potensial.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd, M. A., E. Latif, N. H. Mohamed, dan N. L. Zaki. 2014. Effects of soybean isoflavone on lipid profiles and antioxidant enzyme activity in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacology*. 8(3):378–384.
- Andreollo, N. A., E. F. dos Santos, M. R. Araújo, dan L. R. Lopes. 2012. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 25(1):49–51.
- Araújo, M. M., G. B. Fanaro, A. Lucia, dan C. Haasis. 2013. Soybean and Isoflavones – From Farm to Fork. *Field Crops Research*.
- Baki, H. 2013. Estrogen and growth hormone and their roles in reproductive function. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*. 5(1):21–28.
- Balthazart, J., C. A. Cornil, T. D. Charlier, M. Taziaux, dan G. F. Ball. 2009. Estradiol, a key endocrine signal in the sexual differentiation and activation of reproductive behavior in quail. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 311(5):323–345.
- Barbesgaard, P., H. P. Heldt-hansen, dan B. Diderichsen. 1992. Applied microbiology biotechnology mini-review on the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 569–572.
- Benjamin, E. J., M. J. Blaha, S. E. Chiuve, dan D. Lackland. 2017. *Heart Disease and Stroke Statistics — 2017 Update A Report From the American Heart Association*.
- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, J. C. Frisvad, M. L. Gerds, W. P. Hammes, J. Harnett, G. Huys, S. Laulund, A. Ouwehand, I. B. Powell, J. B. Prajapati, Y. Seto, E. Ter, A. Van Boven, V. Vankerckhoven, A. Zgoda, S. Tuijtelaars, dan E. Bech. 2012. International journal of food microbiology food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*. 154(3):87–97.
- Boyle, C., K. Moizer, T. Barlow, B. Jeffrey, dan S. Paul. 2003. Phytoestrogens and Health. *The Food Standards Agency*.
- Bush, T. L., E. Barrett-connor, L. D. Cowan, M. H. Criqui, R. B. Wallace, C. M. Suchindran, H. A. Tyroler, dan B. M. Rifkind. 1987. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the lipid research clinics program follow-up study. *Pathophysiology And Natural History-Coronary Artery Disease*.
- Carolina, A. dan S. Moreira. 2013. Phytoestrogens as alternative to the hormone replacement therapy: mitochondrial and cellular interactions. 1–162. Thesis.

- Coimbra: Faculty of Sciences and Technology of the University of Coimbra.
- Chancharoonpong, C., P. Hsieh, dan S. Sheu. 2012. Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* s. on soybean koji fermentation. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 1–5.
- Chen, T. R. dan Q. K. Wei. 2008. Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soybean and soybean products. *Nutrition & Food Science*.
- Collins, P., G. Rosano, C. Casey, C. Daly, M. Gambacciani, P. Hadji, dan R. Kaaja. 2007. Management of cardiovascular risk in the perimenopausal women: a consensus statement of european cardiologists and gynecologists. *European Heart Journal*. 508–526.
- Couse, J. F. dan K. S. Korach. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us ?. *Endocrine Reviews*. 20(3):358–417.
- Coxam, V. 2008. Phyto-oestrogens and bone health. *Proceedings of the Nutrition Society*. 67(2):184–195.
- Cui, J., Y. Shen, dan R. Li. 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*. 19(3):197–209.
- Dzoyem, J. P., V. Kuete, dan J. N. Eloff. 2014. *23 Biochemical Parameters in Toxicological Studies in Africa: Significance, Principle of Methods, Data Interpretation, and Use in Plant Screenings*. Dalam Toxicological Survey of African Medicinal Plants. Elsevier Inc.
- Faulds, M. H., C. Zhao, dan K. Dahlman-wright. 2012. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *Endocrinology*. 3–12.
- Ferreira, M. P., M. Cristina, N. De Oliveira, J. Marcos, dan G. Mandarino. 2011. Changes in the isoflavone profile and in the chemical composition of tempeh during processing and refrigeration. 1555–1561.
- 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.
- Gourineni, V. P., M. Verghese, dan J. Boateng. 2010. Anticancer effects of prebiotics synergy1® and soybean extracts: possible synergistic mechanisms in caco-2 cells.
- Hansen, P. J. 2000. Use of a Hemocytometer. Florida: University of Florida.
- Herman, G. E. 2003. Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Human Molecular Genetics*. 12(1):75–88.
- Hevonoja, T., M. O. Pentika, M. T. Hyvo, P. T. Kovanen, dan M. Ala-korpela.

2000. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochimica et Biophysica Acta*. 189–210.
- 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. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Jocelyne, V., A. Moor, S. N. Amougou, S. Ombotto, F. Ntone, D. E. Wouamba, dan B. N. Nonga. 2017. Dyslipidemia in patients with a cardiovascular risk and disease at the university teaching hospital of yaoundé, cameroon. *International Journal of Vascular Medicine*. 1–5.
- Johnson, D., S. Wang, dan A. Suzuki. 1999. Edamame: a vegetable soybean for colorado. *Perspectives on New Crops and New Uses*. 385–387.
- Karantonis, H. C., T. Nomikos, dan C. A. Demopoulos. 2009. Triacylglycerol metabolism. *Current Drug Targets*. 302–319.
- Karjalainen, A., J. Heikkinen, dan M. J. Savolainen. 2000. Mechanisms regulating LDL metabolism in subjects on peroral and transdermal estrogen replacement therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. Hasil utama riskesdas 2018.
- 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.
- Kishida, T., T. Mizushige, M. Nagamoto, Y. Ohtsu, T. Izumi, A. Obata, dan K. Ebihara. 2006. Lowering effect of an isoflavone-rich fermented soybean extract on the serum cholesterol concentrations in female rats, with or without ovariectomy, but not in male rats lowering effect of an isoflavone-rich fermented soybean extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70(7):1547–1556.
- 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.
- Kusmanadhi, B. dan M. S. Poerwoko. 2018. Production and quality of some edamame varieties affected by residual effect of worm compost application. *Earth and Environmental Science*.
- Leboeuf, R. C., M. Caldwell, dan E. Kirk. 1994. Regulation by nutritional status of lipids and apolipoproteins a-i, a4, and a-iv in inbred mice. *Lipid Research*. 35:121–133.
- Lecomte, S., F. Demay, F. Ferri, dan F. Pakdel. 2017. Phytochemicals targeting estrogen receptors: beneficial rather than adverse effects?. *International*

Journal of Molecular Sciences. 1–19.

- Lemos, J. O., E. De Oliveira, dan C. Rocha. 2013. Nutritional status and lipid profile of young children in brazil. *Tropical Pediatrics*. 42(1):54–58.
- Li, J. dan W. Zhang. 2018. *Hormonal Regulation of Cholesterol Homeostasis*. Dalam Cholesterol - Good, Bad and the Heart.
- Li, R. dan Y. Shen. 2005. Estrogen and brain: synthesis, function and diseases. (11):257–267.
- Lim, H. dan S. Mackey. 2012. The menopause transition experiences of chinese singaporean women: an exploratory qualitative study. *The Journal of Nursing Research*. 20(2):81–89.
- Lin, C., Y. Chang, S. Chien, Y. Lin, dan H. Yeh. 2018. Epidemiology of dyslipidemia in the asia pacific region. 4–8.
- Link, J. C., X. Chen, C. Prien, M. S. Borja, B. Hammerson, M. N. Oda, A. P. Arnold, dan K. Reue. 2015. Increased high-density lipoprotein cholesterol levels in mice with xx versus xy sex chromosomes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1778–1786.
- Ma, H. dan K. Shieh. 2006. Cholesterol and human health. *The Journal of American Science*. 2(1):46–50.
- Madigan, M. T. dan J. M. Martinko. 2004. *Brock Biology of Microorganisms, 11th Edn*. Dalam International Microbiology.
- Mahanani, R. S. 2016. Effect of marketing mix on customer satisfaction to edamame products of pt mitratani dua tujuh. 132–139.
- Mahdavian, M. dan H. Abbassian. 2014. Major cardiovascular risk factors for menopausal and non-menopausal women, compared with men of the same age, among patients admitted to the cardiology department of imam reza hospital, mashhad, iran. *Journal of Midwifery and Reproductive Health*. 2(2):136–142.
- Mahmud, K. 2010. Natural hormone therapy for menopause. 26(2):81–85.
- Mandl, B. Y. A. M. 1951. Cyclical changes in the vaginal smear of adult ovariectomized rats.
- Mani, A., B. Chandra, dan K. Viswavidyalaya. 2018. Food preservation by fermentation and fermented food products. *International Journal of Academic Research & Development*.
- Matthews, K. A., N. Santoro, B. Lasley, Y. Chang, S. Crawford, R. C. Pasternak, K. Sutton-tyrrell, dan M. Sowers. 2006. Relation of cardiovascular risk factors in women approaching menopause to menstrual cycle characteristics and reproductive hormones in the follicular and luteal phases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 91(5):1789–1795.

- Mešalić, L., E. Tupković, S. Kendić, dan D. Balić. 2008. Correlation between hormonal and lipid status in women in menopause. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 8(2):188–192.
- Messina, M. 2008. Investigating the optimal soy protein and isoflavone intakes for women: a perspective. *Women's Health*. 4(4):337–356.
- Michel, T., M. Halabalaki, A. Skaltsounis, dan N. P. Chemistry. 2013. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Med*. 514–532.
- Murphy, P. A., T. Song, G. Buseman, K. Barua, G. R. Beecher, D. Trainer, dan J. Holden. 1999. Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(7):2697–2704.
- Murphy, S. E., E. A. Lee, L. Woodrow, P. Seguin, J. Kumar, I. Rajcan, dan G. R. Ablett. 2009. Genotype × environment interaction and stability for isoflavone content in soybean.
- Naufalia, A. N. 2018. Validasi metode dan penetapan kadar daidzein edamame (*Glycine max.*) terfermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* dengan klt-densitometri. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Nikolić, I., I. Savić-Gajić, A. Tačić, dan I. Savić. 2017. Classification and biological activity of phytoestrogens: a review. *Advanced Technologies*. 6(2):96–106.
- Nikolić dan I. M. Savić-Gajić. 2017. Clasification and biological activity of phytoestrogens: a review. *Advanced technologies*. 6(2):96–106.
- Nout, M. J. R. 1990. Recent developments in tempe research
- Nout, M. J. R. dan J. L. Kiers. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *Journal of Applied Bacteriology*. 789–805.
- Novitasari, D. 2018. Validasi metode penetapan kadar genistein ekstrak edamame (*Glycine max* L. Merrill) terfermentasi *Rhizopus oligosporus* dengan metode klt densitometri. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Ørgaard, A. dan L. Jensen. 2008. The effects of soy isoflavones on obesity. *Experimental Biology and Medicine*.
- Packard, C. J. 2003. Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. 31:1066–1069.
- Palmisano, B. T., L. Zhu, dan J. M. Stafford. 2017. Role of estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. *Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity, Advances in Experimental Medicine and Biology*. 227–256.

- Parasuraman, S., R. Raveendran, dan R. Kesavan. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 1(2):87.
- Parker, A. K. 2013. Chronic Stress Alters Serum Lipids: effects Due to “Stress Eating” versus Metabolic Changes.
- Peeters, M. E. dan J. Kirpensteijn. 2011. Comparison of surgical variables and short-term postoperative complications in healthy dogs undergoing ovariectomy or ovariectomy. 238(2):189–194.
- Puspitasari, E., I. R. Sutejo, B. Kusumawardani, S. H. Fhaturani, L. Pimarahayu, 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.
- Priya, T., S. Maurya, dan K. H. Khan. 2013. Cholesterol: genetic, clinical and natural implications research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences. 4(5):1344–1364.
- Reynolds, K., A. Chin, K. A. Lees, A. Nguyen, D. Bujnowski, dan J. He. 2006. A meta-analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids.
- Rocca, W. A., B. R. Grossardt, V. M. Miller, L. T. Shuster, dan R. D. Brown. 2012. Premature menopause or early menopause and risk of ischemic stroke. 19(3):272–277.
- Rodriguez, M. dan D. Shoupe. 2015. Surgical menopause. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 44(3):531–542.
- Rohman, M. K. 2019. Pengaruh edamame (*Glycine max* L. Merrill) terfermentasi kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* terhadap kadar HDL dan LDL tikus terovarietomi. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Sahlin, P. 1999. Fermentation as a method of food processing in fermenting cereals.
- Sifri, S. N. Al, W. Almahmeed, S. Azar, O. Okkeh, P. Bramlage, C. Jünger, B. Ambegaonkar, S. Wajih, dan P. Brudi. 2014. Results of the dyslipidemia international study (dysis)-middle east: clinical perspective on the prevalence and characteristics of lipid abnormalities in the setting of chronic statin treatment. 9(1):1–10.
- Sirotkin, A. V. 2014. Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology*. 741(1):230–236.
- Stefanska, A., K. Bergmann, dan G. Sypniewska. 2015. *Metabolic Syndrome and Menopause: Pathophysiology, Clinical and Diagnostic Significance*. Dalam *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier Inc.
- Sutatik. 2018. Validasi metode klt densitometri dan pengaruh fermentasi

- Aspergillus oryzae* terhadap kadar daidzein edamame (*Glycine max* L.). Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Tailleux, A., P. Duriez, dan J. Fruchart. 2002. Apolipoprotein a-ii, hdl metabolism and atherosclerosis.
- Tim QC APH, G. J. 2009. Modul quality control (QC) APH golongan jamur. Surabaya: Balai Besar Pembenuhan dan Proteksi Tanaman Perkebunan.
- Toth, P. dan B. A. Phan. 2014. Dyslipidemia in women: etiology and management. *International Journal of Women's Health*. 6:185.
- Washington, I. M., G. Van Hoosier, B. Marrow, B. Marrow, B. Marrow, B. Marrow, dan B. Marrow. 2012. Clinical biochemistry and hematology.
- Wilde, E., C.-C. Au, G. Hunt, dan E. Janzen. 2006. Vascular protection dyslipidemia clinical guide.
- Williams, J. K. dan I. Suparto. 2004. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: lessons from a monkey model of postmenopausal women. 45(2):139–146.
- Wironegoro, R. 2018. Effects of edamame (*Glycine max*) extract on post-prandial serum.
- Yeasmin, N., A. Qs, S. Mahmuda, S. Nahar, R. Rabbani, M. Hasan, dan M. Salehin. 2017. Effect of estrogen on serum total cholesterol and triglyceride levels in postmenopausal women. *J Dhaka Med Coll*.
- Yoshimi, A., K. Miyazawa, dan K. Abe. 2016. Cell wall structure and biogenesis in aspergillus species.
- 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* (determination of genistein content and tyrosinase inhibition activity of soybean (*Glycine max*) fermented with *Aspergillus oryzae*).
- Zeipina, S., I. Alsiņa, dan L. Lepse. 2017. Insight in edamame yield and quality parameters: a review. 2:40–45.
- Zeka, K., K. Ruparelia, R. R. J. Arroo, R. Budriesi, dan M. Micucci. 2017. Flavonoids and their metabolites: prevention in cardiovascular diseases and diabetes. *Diseases*. 5(19):1–18.
- Zhang, X., X. O. Shu, Y. Gao, G. Yang, Q. Li, H. Li, F. Jin, dan W. Zheng. 2003. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in chinese women. 2874–2878.
- Zhu, L., W. C. Brown, Q. Cai, A. Krust, P. Chambon, O. P. McGuinness, dan J. M. Stafford. 2013. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes*.



