

Review Artikel

Potensi Fitoestrogen Semanggi Merah sebagai Nutraceutical untuk Mengatasi Sindrom Menopause

Ni Luh Putu Putri Dewi¹, Ni Putu Ariantari^{2*}

¹Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, niluhptputridewi@gmail.com

²Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, putu_ariantari@unud.ac.id

*Penulis Korespondensi

Abstrak– Sindrom menopause merupakan disfungsi seksual yang dialami oleh wanita pada akhir siklus menstruasi yang terjadi akibat penurunan kadar estrogen dalam darah. Oleh karena itu, diperlukan terapi penggantian hormon (*Hormone Replacement Therapy*) yang memiliki efek samping rendah, namun efektivitas terapeutiknya setara dengan estrogen yang dihasilkan dalam tubuh. Salah satu tanaman yang memiliki kandungan fitoestrogen yang tinggi adalah semanggi merah (*Trifolium pratense* L.). Tujuan penulisan *review* artikel ini adalah untuk memberikan informasi mengenai senyawa fitokimia, potensi semanggi merah untuk menangani sindrom menopause melalui uji *in vitro*, *in vivo*, dan klinis, dugaan mekanisme kerja, serta interaksi farmakokinetik dari fitoestrogen semanggi merah. Artikel ini disusun menggunakan metode tinjauan pustaka terhadap artikel-artikel yang telah dipublikasi di jurnal ilmiah nasional dan internasional yang bersifat *open acces* pada 10 tahun terakhir (2013-2023). Hasil dari berbagai penelitian menunjukkan bahwa semanggi merah berpotensi sebagai suplemen untuk mengatasi defisiensi estrogen dan memperbaiki gejala menopause yang meliputi *hot flashes*, kelelahan, osteoporosis, gangguan metabolik, nyeri sendi, peningkatan kadar kolesterol, serta gangguan kardiovaskular. Efek pemberian ekstrak semanggi merah juga telah diteliti pada jaringan seperti payudara, endometrium, dan sistem reproduksi. Tidak ditemukan adanya interaksi antara fitoestrogen semanggi merah dengan enzim sitokrom P450. Aktivitas estrogenik berasal dari kandungan isoflavon yang meliputi Biochain A, Formononetin, Genistein, serta Daidzein. Isoflavon yang terkandung dalam semanggi merah berperan sebagai fitoestrogen yang mampu menduduki reseptor estrogen dan mampu menimbulkan efek seperti estrogen. Hasil tinjauan pustaka ini dapat dijadikan sebagai acuan untuk pengembangan nutraceutical dalam menangani sindrom menopause di masa mendatang.

Kata Kunci– *estrogen, fitoestrogen, isoflavon, semanggi merah, sindrom menopause*

1. PENDAHULUAN

Sindrome menopause merupakan disfungsi seksual yang dialami oleh wanita pada akhir siklus haid yang terjadi 12 bulan setelah periode menstruasi terakhir. Usia rata-rata wanita yang mengalami menopause di Indonesia adalah 48 tahun [1]. Faktor genetik, kebiasaan makan, tingkat aktivitas, dan olahraga menyebabkan perbedaan usia menopause pada berbagai kalangan [2]. Setiap wanita menghabiskan setidaknya sepertiga hingga seperempat hidupnya dalam status menopause. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa setiap tahunnya terdapat 25 juta wanita di seluruh dunia yang mengalami menopause. Berdasarkan hal tersebut, maka dapat diperkirakan pada tahun 2030 akan terdapat 1,2 miliar wanita menopause dengan usia di atas 50 tahun. Sedangkan menurut data Dinas Kesehatan Republik Indonesia 2016, jumlah wanita yang mengalami menopause di Indonesia mencapai

7,4% dari total populasi atau sekitar 14 juta. Diperkirakan pada tahun 2025 jumlah tersebut akan meningkat menjadi 60 juta wanita menopause di Indonesia [3].

Pada masa transisi menuju menopause, 85% perempuan mengalami setidaknya satu gejala menopause. Penelitian Du, et al (2020), menunjukkan sebanyak 73,8% wanita di Tiongkok mengalami gejala menopause dengan tiga gejala teratas meliputi kelelahan (38,08%), rasa panas dan berkeringat (33,65%), dan nyeri sendi (28,81%) [4]. Sedangkan di Korea terdapat 98,5% wanita menopause yang melaporkan satu atau lebih gejala menopause seperti vasomotor, ketidaknyamanan jantung, gangguan tidur, masalah seksual, kekeringan pada vagina, dan ketidaknyamanan sendi/otot [5]. Masalah kesehatan pasca menopause kini telah mendapat perhatian utama di seluruh dunia karena sangat berpengaruh pada kesejahteraan dan *Quality Of Life* (QOL) wanita.

Sindrom menopause terjadi akibat penurunan kadar estrogen dalam darah yang mengakibatkan penghentian total fungsi ovarium [2]. Umumnya, tidak ada tes laboratorium yang diperlukan untuk diagnosis menopause. Diagnosis secara klinis didasarkan pada usia pasien, gejala, dan mengesampingkan kondisi lain untuk pasien yang lebih tua dari 45 tahun. Peningkatan FSH serum (lebih besar dari 40 mIU/mL) dapat menjadi indikasi menopause (melalui kegagalan ovarium) [6]. Terapi yang digunakan untuk menangani hal tersebut dibagi menjadi dua, yaitu terapi hormonal dan terapi non hormonal. Terapi hormon hanya dapat digunakan dalam jangka waktu pendek dan pada dosis efektif terendah, karena meningkatkan risiko relatif kanker payudara, kanker ovarium, tromboemboli, stroke, dan penyakit jantung koroner. Sedangkan, terapi non hormonal yang dapat diberikan yaitu *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor* (SSRI), *Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitor* (SNRI), gabapentin, dan clonidine. Perawatan ini juga hanya dapat digunakan dalam jangka waktu pendek untuk gejala menopause karena efek samping yang ditimbulkan [7].

Kultur masyarakat yang cenderung mengikuti trend *back to nature* mendorong perkembangan agen-agen terapi yang berasal dari bahan alam karena dinilai lebih aman dan ekonomis. Berdasarkan hal tersebut diperlukan terapi penggantian hormon yang berasal dari alam dengan efek samping yang rendah. Fitoestrogen merupakan kelompok senyawa bukan hormon, namun strukturnya mirip dengan 17β estradiol yang mampu menduduki reseptor estrogen dan mampu menimbulkan efek seperti estrogen [8]. Salah satu tanaman yang memiliki kandungan fitoestrogen yang tinggi adalah semanggi merah. Semanggi merah (*Trifolium pratense* L.) mengandung isoflavonoid dan senyawa fenolik yang berpotensi sebagai nutraceutical untuk mengatasi defisiensi estrogen pada sindrom menopause. Penelitian secara *in vitro*, *in vivo*, serta uji klinis mengenai fitoestrogen dari semanggi merah telah banyak dilakukan dalam beberapa dekade terakhir. Hal tersebut dapat dijadikan sebagai acuan untuk pengembangan nutraceutical untuk menangani sindrom menopause di masa mendatang. Oleh karena itu, *review* artikel ini bertujuan untuk memberikan pengetahuan kolektif mengenai senyawa fitokimia, uji *in vitro*, *in vivo*, uji klinis, dugaan mekanisme kerja, serta interaksi farmakokinetika dari fitoestrogen semanggi merah.

2. METODE

Artikel jurnal diperoleh di beberapa *search engine* seperti ScienceDirect, PubMed, SpringerLink dan Google Scholar. Artikel yang diperoleh kemudian dilakukan seleksi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi kemudian dibahas dalam bentuk narasi.

Kriteria Inklusi dan Eksklusi

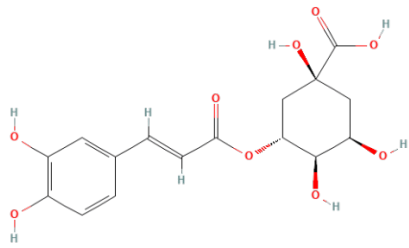
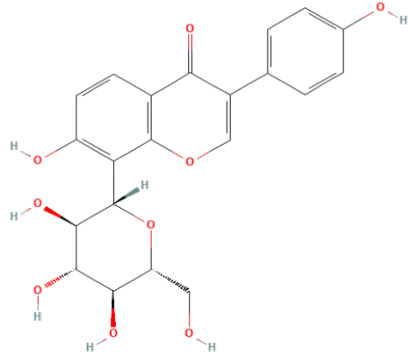
Artikel yang digunakan adalah artikel penelitian berbahasa Indonesia atau Inggris serta berasal dari sumber nasional maupun internasional dengan syarat *open acces* serta tersedia *full text*. Rentang waktu artikel penelitian yang digunakan adalah 10 tahun terakhir (2013-2023). Kriteria inklusi meliputi artikel yang membahas mengenai potensi semanggi merah sebagai fitoestrogen untuk mengatasi sindrom menopause, senyawa fitokimia yang dikandung, hasil uji *in vivo* dan uji klinis, dugaan mekanisme kerja, serta interaksi farmakokinetika semanggi merah. Kriteria eksklusi adalah sumber sekunder dan tersier berupa buku dan *review* yang membahas topik serupa.

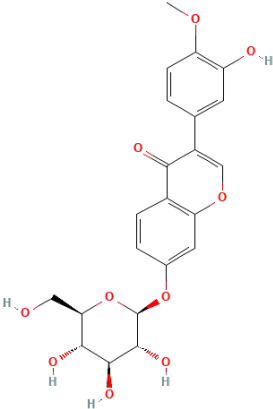
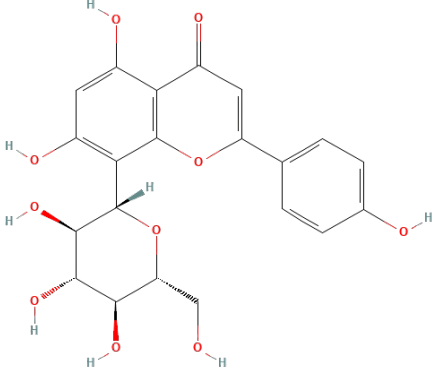
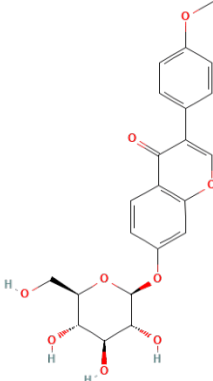
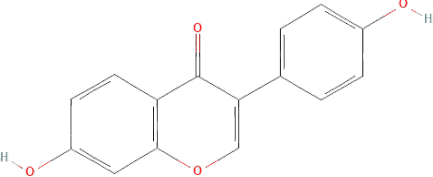
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

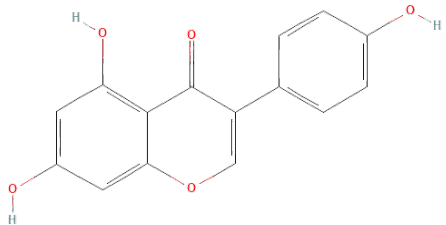
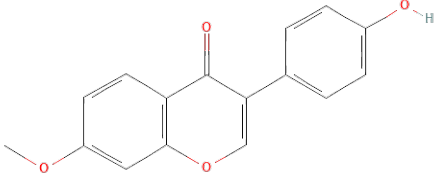
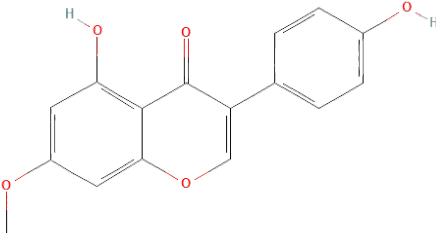
3.1 Kandungan Fitokimia *Trifolium pratense* L.

Trifolium pratense L. mengandung flavonoid, isoflavonoid, chalcones, minyak atsiri dan kumari. Luo, et al (2020) melaporkan 28 komponen yang terdiri dari 24 isoflavon dan 4 asam organik. Isoflavon yang teridentifikasi yaitu isoflavon aglikon (7 spesies), isoflavon glikosida (9 spesies), dan isoflavon malonil glukosida (8 spesies) yang terkandung dalam ekstrak HCl 6M semanggi merah yang diidentifikasi dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Terdapat sembilan senyawa marker yang terkandung dalam semanggi merah yang tertera dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Senyawa Marker Semanggi Merah (*Trifolium pratense* L.)

Nama Senyawa	Rumus Molekul	Gambar
Chlorogenic Acid	$C_{16}H_{18}O_9$	
Daidzin	$C_{21}H_{20}O_9$	

Nama Senyawa	Rumus Molekul	Gambar
Calycosin-7-O-β-D-Glucoside	$C_{22}H_{22}O_{10}$	
Vitexin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	
Ononin	$C_{22}H_{22}O_9$	
Daidzein	$C_{15}H_{10}O_4$	

Nama Senyawa	Rumus Molekul	Gambar
Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	
Formononetin	$C_{16}H_{12}O_4$	
Biochain A	$C_{16}H_{12}O_5$	

Konstituen utama yang terkandung dalam semanggi merah adalah isoflavonoid. Isoflavonoid merupakan kelompok flavonoid khas yang hanya ditemukan pada beberapa spesies kacang-kacangan. Metabolit sekunder ini terbentuk melalui hubungan simbiosis dengan Rhizobiabakteri dan respon pertahanan tanaman polong-polongan. Isoflavon disintesis melalui jalur fenilpropanoid yaitu jalur biosintetik yang serupa dengan biosintesis flavonoid [9]. Isoflavonoid utama dalam semanggi merah adalah biochanin A, daidzein, formononetin, dan geinstein, yang memiliki aktivitas estrogenik [10]. Menurut penelitian Tucak, et al (2019) yang mengkarakterisasi kandungan isoflavon pada semanggi merah Kroasia, kandungan isoflavon yang tertinggi adalah Formononetin 61,81% (3672,77-9893,30 $\mu\text{g g}^{-1}$) bahan kering, diikuti oleh Biochain A 36,12% (1811,01-6123,70 $\mu\text{g g}^{-1}$), Genistein 1,26% (54,13-318 $\mu\text{g g}^{-1}$), serta Daidzein 0,80% (43,46 – 114,82 $\mu\text{g g}^{-1}$). Kandungan isoflavon dalam semanggi merah yang paling tinggi terdapat pada daun, diikuti oleh batang, tangkai daun, dan bunga [11]. Selain itu, Tava et al (2019) juga melaporkan tingginya kandungan flavonoid lain seperti quercetin dan turunannya pada bagian daun dan bunga semanggi merah. pada ekstrak Metanol 80% dengan menggunakan metode UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) Waters ACQUITY. Turunan quercetin yang ditemukan meliputi Quercetin-3-O-galactoside, Quercetin-3-O-glucoside-6''-O-malonate, dan Kaempferol-3-O-galactoside-6''-O-malonate [12].

Selain flavonoid, daun dan bunga semanggi merah juga kaya akan senyawa fenolik sehingga memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Daun semanggi merah kultivar mengandung total fenolik sebanyak 72,89 mg/g bahan kering, sedangkan pada populasi alami mengandung

total fenolik 69,11 mg/g bahan kering. Bunga semanggi merah kultivar memiliki kandungan total fenolik sebesar 92,18 mg/g bahan kering, sedangkan populasi alami mengandung total fenolik 81,81 mg/g bahan kering. Berdasarkan hal tersebut, maka total fenolik terbesar ditemukan pada bagian bunga [12]. Selain itu, Zhang, et al (2020) mengidentifikasi polisakarida yang terdapat dalam ekstrak air semanggi merah yang dimurnikan dengan kromatografi kolom, kemudian dianalisis dengan metode HPLC. Adapun polisakarida yang teridentifikasi meliputi glukosa, asam galakturonat, arabinosa, dan galaktosa dengan persentase molar masing-masing 52,54, 1,04, 16,31, dan 30,11% [13].

3.2 Aktivitas Farmakologi Semanggi Merah untuk Mengatasi Sindrom Menopause

Berdasarkan hasil studi literatur diperoleh beberapa aktivitas farmakologi dari semanggi merah dalam mengatasi sindrom menopause seperti aktivitas estrogenik, antihiperlipidemia, antiosteoporosis, antiobesitas, meningkatkan kadar glikogen otot, serta aktivitas pada sistem kardiovaskuler. Beberapa penelitian mengenai aktivitas farmakologi semanggi merah dirangkum pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Aktivitas Farmakologi Semanggi Merah untuk Mengatasi Sindrom Menopause

Jenis Uji	Intervensi/ Comparator	Lama Perlakuan	Hasil Uji	Pustaka
Efek Estrogenik				
In vivo	I : ekstrak air semanggi merah konsentrasi 25, 50, dan 75 mg L ⁻¹ ; C : 17 β-Estradiol	30 hari	Aktivitas estrogenik tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak air semanggi merah dengan konsentrasi 50 mg L ⁻¹ , namun masih lebih rendah dibanding kontrol positif 17 β-Estradiol. Tidak terdapat penurunan berat badan tikus pada akhir percobaan.	[14]
In vivo	I: ekstrak etanol 70% konsentrasi 125, 250, dan 500 mg/kgBB, per oral; C: Placebo	12 minggu	Pemberian ekstrak kombinasi semanggi merah dan hop 500 mg secara signifikan (p<0,05) dapat menghambat peningkatan suhu kulit ekor (<i>hot flashes</i>).	[15]
In vivo	I : nanoparticle lipid carrier semanggi merah 160 mg/kgBB transdermal; C: virgin coconut oil dan estradiol benzoat 10μg/kgBB	6 minggu	Peningkatan kadar estrogen pada kelompok NLCs semanggi merah, VCO, dan estradiol berturut-turut sebagai berikut 30,008ng/mL, 22,728 ng/mL, dan 36.444ng/mL. Pemberian nanostructure lipid carrier (NLCs) semanggi merah menunjukkan efektivitas dalam menangani defisiensi estrogen tanpa risiko hiperplasia	[16]

Jenis Uji	Intervensi/Comparator	Lama Perlakuan	Hasil Uji	Pustaka
			endometrium dan kanker ovarium.	
In vivo	I : Larutan ekstrak konsentrasi 308, 615, dan 1.538 mg/kgBB; C: Placebo	6 minggu	Kadar hormon estradiol dan progesterone mengalami peningkatan pada kelompok semanggi merah masing-masing sebesar 1,45 kali lipat (p=0,0138) dan 2,66 kali lipat (p=0,0033). Selain itu, kadar LDL dan CK mengalami penurunan secara signifikan (p<0,0001).	[17]
Antiosteoporosis				
In vivo	I: ekstrak etanol 70% konsentrasi 125, 250, dan 500 mg/kgBB, per oral; C: Placebo	12 minggu	Kombinasi ekstrak semanggi merah dan hop 500 mg menurunkan kadar osteokalsin dan CTX (C-Telopeptide).	[15]
In vivo	I : ekstrak etanol 30% + dekstrin yang dispray drying dengan konsentrasi 125, 250, 500 mg/kgBB; C: ekstrak buah delima 500 mg/kgBB dan estradiol 25 µg/kgBB	12 minggu	Ekstrak semanggi merah menurunkan regulasi ekspresi RANKL (<i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa β Ligand</i>), yaitu gen yang terlibat dalam inisiasi diferensiasi osteoklas dan resorpsi tulang, serta meningkatkan regulasi ekspresi gen ERβ. Selain itu, terjadi penurunan telopeptida C-terminal serum pada tingkat kolagen tipe 1 dan peningkatan karakteristik rahim yang bergantung pada estrogen pada lapisan lumen.	[18]
Antihiperlipidemia				
In vivo	I: ekstrak etanol 70% konsentrasi 125, 250, dan 500 mg/kgBB, per oral; C: Placebo	12 minggu	Pemberian kombinasi ekstrak semanggi merah dan hop 500 mg dapat meningkatkan kadar HDL (<i>High Density Lipoprotein</i>) dan menurunkan kadar LDL (<i>Low Density Lipoprotein</i>) pada tikus ovariektomi.	[15]
In vivo	I : ekstrak etanol 70% semanggi merah 500 dan	30 hari	Ekstrak semanggi merah dosis 750 mg/kgBB secara signifikan (p<0,05) dapat meningkatkan	[19]

Jenis Uji	Intervensi/Comparator	Lama Perlakuan	Hasil Uji	Pustaka
	750 mg/kgBB; C: klomifen sitrat 1 mg/kgBB.		HDL dan menurunkan kadar LDL.	
In vivo	I : ekstrak etanol 30% + dekstrin yang dispray drying dengan konsentrasi 125, 250, 500 mg/kgBB; C: ekstrak buah delima 500 mg/kgBB dan estradiol 25 µg/kgBB	12 minggu	Pemberian ekstrak semanggi merah meningkatkan komposisi mikrobiota usus yang berkorelasi kuat dengan kadar lipid serum dan kolesterol pada tikus ovariektomi. Ditemukan penurunan yang signifikan ($P<0,05$) pada trigliserida (TG), kolesterol total (TCHOL), dan kadar LDL/VLDL (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>) serta peningkatan kadar HDL.	[20]
In vivo	I : suplemen Ormona SI® (kedelai) 200 mg/kg/hari, suplemen Ormona RC® (semanggi merah) 200 mg/kg/hari, kecambah 200 mg/kg/hari, Ormona RC® 200 mg/kg/hari + simvastatin 20 mg/kg/hari; C: simvastatin 20 mg/kg/hari	40 hari	Ormona SI® dan Ormona RC® mampu memperbaiki profil lipid abnormal yang disebabkan oleh tingginya lemak secara signifikan, dengan nilai yang mendekati senyawa kontrol, simvastatin. Selain itu, pengobatan bersama dengan nutraceutical dan simvastatin dapat melindungi terhadap lipotoksisitas hati dengan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan simvastatin tunggal.	[21]
Sindrom Metabolik				
In vivo	I: ekstrak etanol 70% konsentrasi 125, 250, dan 500 mg/kgBB, per oral; C: Placebo	12 minggu	Ekstrak semanggi merah yang dikombinasikan dengan hop 500 mg dapat menghambat peningkatan berat badan pada tikus ovariektomi.	[15]
In vivo	I : tablet oral yang mengandung 80 mg ekstrak semanggi merah; C: plasebo	24 bulan	Kelompok semanggi merah mengalami penurunan BMI (<i>Body Mass Index</i>) sebesar 1,5 kg/m ² , penurunan lingkar pinggang sebesar 3,5 cm, dan penurunan lingkar pinggul sebesar 4,4 cm yang jauh lebih	[22]

Jenis Uji	Intervensi/Comparator	Lama Perlakuan	Hasil Uji	Pustaka
			besar ($P < 0,0001$) dibandingkan kelompok placebo.	
In vivo	I : Larutan ekstrak konsentrasi 308, 615, dan 1.538 mg/kgBB; C: Placebo	6 minggu	Suplemen semanggi merah dapat menurunkan massa lemak dan meningkatkan ambang rasa lelah yang ditandai dengan peningkatan waktu berenang, meningkatkan kekuatan cengkeraman, dan glikogen otot pada tikus secara signifikan ($p < 0,04$) dibandingkan placebo.	[17]
Klinis	I : Jus ekstrak semanggi merah yang difermentasi sebanyak 60 mL di pagi hari dan 60 mL di malam hari (setara dengan 60 mg isoflavon per hari; C: Placebo	14 hari	Tidak terdapat perubahan signifikan secara statistik ($p > 0,05$) pada kandungan protein ER β pada otot rangka dan kekuatan otot rangka setelah pemberian suplemen ekstrak semanggi merah dibandingkan dengan placebo.	[23]
Klinis	I: Kapsul suplemen makan yang mengandung 1,91 gram ekstrak semanggi merah (mengandung Formononetin 4,18 mg dan Biochain A 0,94 mg) C: placebo	8 minggu	Terdapat penurunan signifikan pada kadar insulin puasa di minggu ke-8 pada kelompok yang menerima kapsul suplemen makan yang mengandung ekstrak semanggi merah dari 4.76 μ IU/mL menjadi 4.01 μ IU/mL ($P = 0,046$). Selain itu, hemoglobin A1c juga berkurang secara signifikan dari 5,36% menjadi 5,28% ($p = 0,040$).	[24]
Gangguan Kardiovaskuler				
In vivo	I : ekstrak etanol 70% semanggi merah 500 dan 750 mg/kgBB; C: kломifen sitrat 1 mg/kgBB.	30 hari	Ekstrak semanggi merah 750 mg/kgBB dapat menurunkan kadar SOD (<i>Superoxide Dismutase</i>), NO (<i>Nitrite Oxide</i>), dan MDA (<i>Malonyl Dehydrogenase</i>).	[19]
In vitro	I : Ekstrak semanggi merah dan hop (3:1) dengan dosis 12,5, 25, 50, dan	24 jam	Kombinasi ekstrak semanggi merah dan hop menunjukkan afinitas pengikatan terhadap ER α dan ER β dengan nilai IC ₅₀ masing-masing sebesar 5,92	

Jenis Uji	Intervensi/ Comparator	Lama Perlakuan	Hasil Uji	Pustaka
	100 µg/mL C :-		µg/mL dan 1,66 µg/mL. Ekstrak semanggi merah secara signifikan meningkatkan viabilitas sel dan mengurangi produksi spesies oksigen reaktif terhadap kerusakan akibat stres oksidatif. Kombinasi semanggi merah dan hop menunjukkan peningkatan NO dan penurunan endothelin-1 dibandingkan pengobatan semanggi merah atau hop tunggal.	
Klinis	I : Jus ekstrak semanggi merah yang difermentasi sebanyak 60 mL di pagi hari dan 60 mL di malam hari (setara dengan 60 mg isoflavan per hari; C: Placebo	14 hari	Pemberian ekstrak semanggi merah yang difermentasi dapat mengurangi ekspresi VCAM-1 (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>) sebesar ~5,4% dibandingkan dengan placebo ($503,2 \pm 84.4$ vs. $534,8 \pm 96.8$ ng mL ⁻¹ ; p = 0,0321; d = 0.7) dan secara signifikan mengurangi peradangan pembuluh darah pada awal pasca-menopause.	[25]
Risiko Kanker				
In vitro	I : tablet oral yang mengandung 80 mg ekstrak semanggi merah; C: plasebo	24 bulan	Ketebalan endometrium tetap konstan (P=0,93). Kepadatan payudara menurun secara signifikan pada kedua kelompok (P<0,0001). Suplementasi semanggi merah tidak mengganggu pengobatan Tamoxifen (anti-estrogen).	[22]
In vivo	I : ekstrak etil alkohol 70% semanggi merah yang dikombinasikan dengan doxorubicin; C: placebo	35 hari	Semanggi merah memiliki efek sinergis dengan doxorubicin (antiestrogen) dalam menekan pertumbuhan tumor dan menurunkan volume tumor melalui peningkatan regulasi gen terkait apoptosis dan menekan produksi estrogen pada tikus BALB/c yang mengandung tumor 4T1.	[26]

3.2.1 Aktivitas Estrogenik

Isolavon sebagian besar berasal dari kacang-kacangan (family fabaceae) dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen alfa ($ER\alpha$) dan reseptor estrogen beta ($ER\beta$), sehingga berpotensi meniru peran estrogen endogen. Meskipun tidak memiliki struktur steroid, fitoestrogen mirip dengan 17β estradiol karena keduanya bersaing untuk reseptor yang sama, meskipun dengan kapasitas aktivasi yang lebih rendah, tetapi dapat menjalankan mekanisme yang sama. Ada dua jenis reseptor estrogen yaitu $ER\alpha$, bentuk dominan di payudara dan rahim, dan $ER\beta$, bentuk dominan di sistem kardiovaskular, saluran urogenital, otot, dan tulang [8], [25]. Isoflavon semanggi merah dengan kesamaan struktural dengan 17β -estradiol endogen mengungkapkan efek biologisnya melalui pengaktifan reseptor estrogen (ER), dengan afinitas yang lebih tinggi terhadap $ER\beta$ dibandingkan dengan $ER\alpha$ [15]. Fitoestrogen yang menargetkan reseptor estrogen β ($ER\beta$) tanpa aktivasi $ER\alpha$ sangat diperlukan untuk menghindari risiko kanker [27]. Quah, et al (2022) melaporkan hal serupa yaitu pemberian ekstrak semanggi merah dosis 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB meningkatkan ekspresi gen $ER\beta$ di tibia tetapi tidak pada gen $ER\alpha$ [18]. Namun, apabila ekstrak semanggi merah diberikan dalam bentuk kombinasi dengan ekstrak hop, efek estrogeniknya lebih besar terhadap $ER\alpha$ dibanding $ER\beta$ [28]. Hasil penelitian Chen, et al (2021) melaporkan bahwa pemberian ekstrak semanggi merah secara signifikan meningkatkan kadar hormon estrogen dan progesterone melalui pengikatan terhadap $ER\alpha$ dan $ER\beta$ [17]. Aktivitas biologis fitoestrogen dikaitkan dengan struktur kimianya, yang mengandung cincin fenolik heterosiklik yang mirip dengan estrogen alami dan sintetis, oleh karena itu, fitoestrogen kompatibel dengan reseptor beta estrogen [8].

Penelitian Kim, et al (2020) melaporkan bahwa ekstrak semanggi merah dapat mengatasi *hot flashes* yang merupakan salah satu gejala utama pada wanita yang mengalami menopause. *Hot flashes* didefinisikan sebagai kondisi berupa demam parah pada wajah, leher, dan bagian dada atas yang menyebabkan berkeringat dan menggigil. Kondisi ini terjadi ketika adanya peningkatan aliran darah bersamaan dengan hipertermia di sebagian besar tubuh. Rasa menggigil yang menyertai kondisi ini merupakan respons kompensasi untuk menurunkan suhu inti tubuh menjadi normal [29]. *Hot flashes* diduga terjadi akibat respon otak terhadap defisiensi estrogen progresif dan fluktuasi aktivitas neurotransmitter, terutama pada jalur serotonergik dan noradrenergik, sehingga menyebabkan ketidakstabilan mekanisme termoregulasi di hipotalamus. Hal tersebut menyebabkan peningkatan aliran darah melalui kulit dan peningkatan aktivitas kelenjar keringat [15]. Estrogen dianggap berperan penting dalam *hot flashes* karena muncul saat menopause, saat kadar estrogen dalam darah rendah [27].

Selain itu, terdapat dua penelitian yang melaporkan bahwa ekstrak semanggi merah juga dapat membantu mengatasi osteoporosis [15], [18]. Konsumsi fitoestrogen dapat mencegah patah tulang dengan meningkatkan kadar senyawa anorganik dalam tulang dan komposisi serat kolagen. Fitoestrogen juga diketahui mempengaruhi resorpsi tulang, mengurangi pengeroposan tulang tulang melalui penghambatan ALP (*Alkaline Phosphatase*), osteokalsin, dan CTX-1. Selain itu, dapat mencegah pengurangan ketebalan trabekuler akibat defisiensi estradiol dan mengurangi jumlah osteoklas di metafisika tibialis. CTX-1 adalah penanda resorpsi tulang yang

dihasilkan oleh aktivitas osteoklas [30], [31]. Mekanisme lain yang terlibat yaitu penurunan regulasi RANKL untuk mencegah aktivasi RANK yang merupakan reseptor yang terletak pada permukaan osteoklas. Ketika aktivasi RANK dihambat, maka akan terjadi penurunan resorpsi tulang [18].

3.2.2 Antihiperlipidemia

Terdapat enam penelitian yang melaporkan penurunan kadar LDL dan trigliserida pada pemberian ekstrak semanggi merah. LDL dan trigliserida adalah biomarker klinis utama lipid darah. Lipase adalah enzim yang bertanggung jawab untuk memecah lemak sehingga dapat diserap. Inhibitor lipase dapat mengikat bagian aktif lipase di lambung dan usus kecil, menghambat aktivitas katalitik sehingga mengurangi pencernaan lipid. Penelitian terbaru dari Gościniak, et al (2023) melaporkan bahwa ekstrak dan bunga semanggi merah dari berbagai varietas memiliki aktivitas penghambatan lipase pada konsentrasi 50 mg/mL. Dari enam varietas yang diujikan, penghambatan persen penghambatan lipase tertinggi ditunjukkan oleh semanggi merah varietas Lucrum dan Lemmon [32]. Kandungan isoflavon dalam semanggi merah berpotensi meringankan hiperglikemia dan dislipidemia dengan mengaktifkan reseptor PPARs (*Proliferator Activator Receptor*), yang merupakan reseptor yang terlibat dalam keseimbangan lipid dan fungsi insulin. Selain itu, mekanisme lain menyebutkan bahwa penurunan kadar LDL disebabkan oleh penghambatan 7 α -hidroksilase dan efek estrogenik pada reseptor LDL yang memodulasi enzim PCSK9 (*Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin9*) untuk menurunkan LDL [17], [33].

Pemberian suplemen semanggi merah dosis 615 mg/kgBB tikus meningkatkan kesehatan usus yang dikaitkan dengan mikroorganisme *Pseudobutyrvibrio* dan *parabakteroid*. Mikrobiota usus dapat memodulasi metabolisme lipid di BAT (*Brown Adipose Tissue*). BAT merangsang lipolisis dan berperan penting dalam menghambat lipogenesis pada tikus [17]. *Proteobacteria* berkorelasi positif dengan kadar serum TG, LDL/VLDL namun berkorelasi negatif dengan kadar HDL serum. *Biidobakterium pseudolongum* dan *A.muciniphila* menunjukkan korelasi positif dengan kadar HDL serum dan berkorelasi negatif dengan kadar, LDL/VLDL, TCHOL, dan TG serum [20], [34]. Efek hipokolesterolemia dari semanggi merah mungkin disebabkan oleh adanya fitoestrogen yang dapat mengubah metabolisme hati dengan peningkatan pembuangan LDL dan VLDL oleh hepatosit [20]. Selain itu, dugaan mekanisme lainnya melaporkan bahwa agonisme reseptor estrogen akan menyebabkan dimerisasi dan penghambatan lebih lanjut terhadap *Sterol Regulator Element-Binding Protein 1* (SREBP1), Penghambatan *Peroxisome Proliferatoractivated Receptor γ* (PPAR γ), dan penghambatan CCAAT/*Enhancer Binding Proteins* (C/EBP). Penghambatan jalur ini akan menurunkan akumulasi lipid [21], [35].

3.2.3 Sindrom Metabolik

Obesitas adalah salah satu penyakit paling umum yang menyebabkan berbagai disfungsi metabolisme seperti resistensi insulin, penyakit kardiovaskular, dan kanker. Sindrom metabolik didefinisikan menurut *International Diabetes Federation* (IDF). Kriterianya adalah obesitas

sentral ditambah dua hal berikut: (1) trigliserida ≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) atau pengobatan khusus untuk kelainan lipid; (2) Kolesterol HDL < 50 mg/dL (1,29 mmol/L) pada wanita atau pengobatan khusus untuk kelainan lipid; (3) tekanan darah sistolik ≥ 130 mmHg atau tekanan darah diastolik ≥ 85 mm Hg atau pengobatan hipertensi yang telah didiagnosis sebelumnya; dan (4) glukosa plasma puasa ≥ 100 mg/dL atau diabetes tipe 2 yang sebelumnya terdiagnosis. Obesitas sentral didefinisikan sebagai lingkaran pinggang ≥ 80 cm [36]. Penelitian yang dilakukan oleh Septiyani dan Seniwati (2020) melaporkan bahwa obesitas meningkat pada pasien yang berusia 40-59 tahun dan mayoritas terjadi pada wanita [37]. Selama transisi menopause, berat badan wanita bertambah 2-2,5 kg dan mengalami redistribusi lemak sehingga menyebabkan terjadinya obesitas sentral. Perubahan penumpukan lemak ini kemungkinan besar disebabkan oleh hilangnya hormon estrogen ovarium. Kelebihan lemak visceral pada kondisi obesitas mensekresikan banyak adipokin dan kemokin yang menyebabkan infiltrasi dan aktivasi makrofag, resistensi insulin, serta berkaitan dengan peningkatan penanda inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan interleukin 6 (IL-6) [38].

Efek semanggi merah pada BMI diduga sebagian dimediasi oleh efek isoflavon pada reseptor teraktivasi proliferasi peroksisom (PPAR). Biochanin A yang terkandung dalam semanggi merah merupakan aktivator PPARs [22]. PPARs mengatur berbagai gen yang terlibat dalam hampir semua jalur metabolisme lipid dan glukosa dalam jaringan metabolik, seperti jaringan adiposa dan hati [39]. Terdapat tiga isotipe PPAR telah diidentifikasi, yaitu PPAR α (NR1C1), PPAR- β/δ (NR1C2), dan PPAR γ (NR1C3). Reseptor PPAR α banyak ditemukan pada *brown adipose tissue* (BAT) dan penting dalam proses metabolisme lipid dengan mengatur ekspresi protein yang terlibat dalam transpor dan β -oksidasi asam lemak bebas secara di hati [40]. Reseptor PPAR γ banyak diekspresikan pada jaringan *white adipose tissue* (WAT) dan *brown adipose tissue* (BAT). Sehingga PPAR γ merupakan salah satu penanda WAT selain C/EBP α dan FABP4 yang berkaitan dengan metabolisme hingga biosintesis asam lemak, Trigliserida, kolesterol serta pengaturan reseptor insulin [41].

Selain itu, semanggi merah juga memiliki efek antidiabetes yang dilaporkan oleh Masuda, et al (2020) dengan mengamati kadar insulin dan HbA1c. Ditemukan penurunan kadar insulin pada kelompok semanggi merah (4,25 μ IU/ml pada Minggu 0 hingga 3,61 μ IU/ml pada Minggu ke 8) namun tidak signifikan secara statistik. Namun, kadar HbA1c menunjukkan interaksi yang signifikan ($P=0,040$) dan menurun secara signifikan pada \leq kelompok semanggi merah berusia 50 tahun (5,36% pada Minggu 0 hingga 5,28% pada Minggu 8, $P=0,025$). Nilai HbA1c mencerminkan paparan glikemik keseluruhan selama 1–2 bulan sebelumnya. Efek penurunan glukosa darah dari ekstrak semanggi merah diduga disebabkan oleh formononetin. Hal ini karena ekstrak semanggi merah mengandung formononetin empat kali lebih banyak dibandingkan isoflavon biochanin A, meskipun efek penghambatan glukosidase dari isoflavon tersebut serupa. Konsentrasi penghambatan glukosidase (IC_{50}) formononetin dan biochanin A masing-masing adalah 0,027–0,031 dan 0,020 mM [11], [24].

Penelitian Chen, et al (2021) melaporkan pemberian ekstrak semanggi merah dapat meningkatkan ambang rasa lelah dan meningkatkan kadar glikogen otot. Estrogen dan

progesterone berkontribusi terhadap peningkatan ambang rasa lelah dan kekuatan otot pada wanita, massa otot, dan mengurangi pengeroposan tulang. Selain itu, estrogen mempengaruhi atrofi otot, khususnya otot yang bergerak cepat dibandingkan otot yang bergerak lambat [42]. Efek tersebut dimediasi oleh estrogen yang dapat menekan pelepasan mitokondria dan mengurangi kelelahan otot melalui peningkatan pembentukan molekul ATP lewat respirasi mitokondria. Ekstrak semanggi merah juga dapat meningkatkan kadar glikogen sehingga dapat mengurangi kelelahan pada wanita menopause [17].

3.2.4 Gangguan Kardiovaskuler

Wanita mempunyai risiko lebih tinggi terkena penyakit kardiovaskular setelah menopause karena defisiensi estrogen dan metabolisme lipid terganggu. Isoflavon dalam semanggi merah berpotensi menurunkan risiko gangguan kardiovaskular dengan memberikan efek antihipertensi dan antiaterosklerosis. Wickham, et al (2022) mengukur kadar VCAM-1, ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), SAA (*Serum Amyloid*), dan CRP (*C-Reactive Protein*) dalam plasma sebagai penanda utama peradangan pembuluh darah dan adhesi sel sebagai respons terhadap pemberian ekstrak semanggi merah. Dari beberapa parameter tersebut, hanya VCAM-1 yang menunjukkan penurunan signifikan secara statistik. Penurunan kadar VCAM-1 dapat mengindikasikan berkurangnya aterosklerosis, karena tingkat molekul adhesi sel yang bersirkulasi berkorelasi positif dengan derajat aterosklerosis pada manusia. Penelitian lain melaporkan bahwa isoflavon dapat menghambat perkembangan aterosklerosis melalui penghambatan ekspresi NF- κ B, trombin, TNF- α , dan molekul adhesi sel-1 (VCAM-1) vaskular pada tikus. Faktor-faktor ini yaitu NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa β*), TNF- α , dan VCAM-1 merupakan kontributor penting terhadap aterosklerosis dengan menginduksi akumulasi dan meningkatkan adhesi monosit ke dinding pembuluh darah di tempat yang rentan membentuk lesi aterosklerotik [43].

Reseptor ER- β terdapat di endotel pembuluh darah dan dapat dengan mudah diikat oleh isoflavon. Isoflavon dapat meningkatkan regulasi sintase Oksida Nitrat Endotel (eNOS) dan meningkatkan produksi NO, sehingga mengurangi peningkatan tekanan darah karena aktivitas vasodilatasi [44]. Potensiasi jalur NO/cGMP (*Guanylate cyclase*) juga relevan untuk relaksasi vena umbilikal manusia yang diprkonstriksi dengan 5-HT (5-Hidroksitriptamin). Isoflavon mampu menurunkan tekanan darah sistolik sehingga melindungi dari gangguan kardiovaskular. Isoflavon juga diduga menetralkan hidrogen peroksida dalam sel karena aktivitas antioksidannya sehingga memodulasi produksi tromboksan melalui jalur COX-1 (*Cyclooxygenase-1*) [45].

3.2.5 Resiko Kanker

Beberapa penelitian melaporkan bahwa isoflavon dapat menekan pertumbuhan sel tumor BC secara in vitro dan in vivo [22], [26], [46]. Ekstrak semanggi merah bersinergi dengan doxorubicin, menghambat pertumbuhan tumor TNBC (*Triple Negative Breast Cancer*) ortotopik dan proliferasi sel kanker pada tikus galur BALB/c yang mengandung tumor 4T1 melalui menginduksi apoptosis yang bergantung pada dosis secara in vivo. Selain itu, ekstrak semanggi

merah dapat mengurangi efek samping doxorubicin melalui pengaktifan jalur antioksidan. Peningkatan kelangsungan hidup tikus dikaitkan dengan mekanisme peningkatan jalur hormonal, antiinflamasi, serta antioksidan [26]. Kombinasi ekstrak semanggi merah dengan doxorubicin secara sinergis meningkatkan kadar sitokin Interferon γ (IFN- γ) dan IL-12 serum dibandingkan dengan kelompok yang diobati dengan doxorubicin atau ekstrak semanggi merah tunggal. IL-12 memainkan peran penting dalam mengaktifkan kekebalan antitumor dan menghambat angiogenesis *in vivo* dan *in vitro* [26]. Isoflavon dan metabolitnya mempengaruhi produksi IL-12 dan IFN- γ oleh sel NK (*Natural Killer*) [47].

IFN- γ adalah aktivator makrofag yang kuat melalui pengaturan p53, p21, dan p27. Lebih lanjut, IFN- γ mendorong diferensiasi sel T CD4 naive ke dalam sel TH1 (*Tianhe-1*), merangsang ekspresi molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*) menghadirkan antigen tumor, memediasi penghentian siklus sel, dan meningkatkan apoptosis dan kerentanan sel tumor terhadap pengenalan dan penghancuran system imun. Fitoestrogen memiliki efek ganda pada produksi IL-12 dan IFN- γ . Genistein dapat mengikat ER α yang terbukti meningkatkan ekspresi IFN- γ dan meningkatkan respon TH1. Isoflavon mampu meningkatkan produksi IFN- γ melalui sel T sitotoksik dan sel TH1 pada tikus betina dan model tikus kanker serviks [48].

Selain itu, penelitian Khazaei dan Pazthouhi (2019) melaporkan ekstrak semanggi merah mampu menghambat proliferasi garis sel MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) dan MDA-MB-231 dan menginduksi apoptosis dan *autophagy* melalui pengaktifan gen seperti p53, Bax, Caspase-3, LC-3, BECN-1, dan ATG-7 [49]. Kandungan flavonoid dan isoflavon dalam semanggi merah dapat meningkatkan efek antikanker melalui penghentian siklus sel pada fase G1 atau G2/M, menginduksi apoptosis, menghambat pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*), memetabolisme enzim, dan menekan mediator seperti faktor pertumbuhan endotel vaskular dan dasar fibroblas [50]. Isoflavon memiliki afinitas yang lebih kuat untuk mengikat dan mentransaktivasi ER β daripada ER α yang berkaitan dengan sel kanker. Berdasarkan penelitian tersebut, pemberian suplementasi semanggi merah payudara tidak mengganggu pengobatan anti-estrogen pada wanita yang mengalami kanker karena target pengikatannya pada reseptor yang berbeda [22].

3.3 Interaksi Obat

Kurangnya pengetahuan mengenai adanya interaksi farmakokinetika antara bahan herbal dengan obat kimia menjadi masalah medis hingga saat ini. Enzim yang memetabolisme obat dikelompokkan menjadi dua. Enzim fase I mengkatalisis reaksi kimia seperti oksidasi, reduksi, dan hidrolisis. Sedangkan, enzim fase II melibatkan reaksi konjugasi. Enzim fase I yang paling penting adalah sitokrom P450 (CYP) yang banyak ditemukan di hati. Menurut panduan FDA (*Food and Drug Administration*) untuk studi interaksi obat klinis, interaksi farmakokinetik yang relevan secara klinis didefinisikan sebagai penurunan setidaknya 20% pada AUC (*Area Under Curve*) untuk induksi dan peningkatan setidaknya 1,25 kali lipat pada AUC untuk penghambatan [51]. Chen et al (2020) melakukan penelitian untuk mengevaluasi interaksi farmakokinetik semanggi merah dengan empat obat yang disetujui FDA (kafein, tolbutamid, dekstrometorfan,

dan alprazolam) sebagai substrat pemeriksaan. untuk enzim CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4/5. Hasil menunjukkan pemberian suplemen semanggi merah tidak mengubah parameter farmakokinetik apa pun untuk substrat pemeriksaan CYP1A2, CYP2D6, dan CYP3A4/5 [52]. Sebagian besar parameter metabolisme serum seperti enzim hati, bilirubin, kreatinin, dan BUN (*Blood Urea Nitrogen*) tidak menunjukkan perubahan setelah pemberian suplemen semanggi merah. Selain itu, kadar glukosa semanggi merah tidak mengalami peningkatan signifikan. Bahkan semanggi merah dilaporkan menghasilkan efek antidiabetes pada tikus [53]. Penurunan sejumlah kecil natrium serum dan CO₂(masing-masing 0,85 dan 3,15%) juga diamati setelah konsumsi suplemen semanggi merah. Walaupun demikian, konsentrasi natrium dan CO₂ masih berada dalam batas normal [52]. Meskipun isoflavon berpotensi mengganggu endokrin dan menjadi sitotoksik pada dosis tinggi, pada konsentrasi fisiologis obat ini aman digunakan, hanya terdapat efek samping gastrointestinal ringan yang dilaporkan [54].

4. KESIMPULAN

Potensi semanggi merah (*Trifolium pratense* L.) sebagai fitoestrogen telah dievaluasi pada berbagai penelitian *in vitro*, *in vivo*, maupun klinis. Efek estrogenik semanggi merah berasal dari kandungan isoflavon yang terdiri dari Formononetin, Biochain A, Daidzein, serta Genistein. Ekstrak semanggi merah yang diberikan tunggal maupun dalam bentuk kombinasi memiliki aktivitas estrogenik, antihiperlipidemia, mengatasi sindrom metabolik, serta gangguan kardiovaskuler. Isoflavon semanggi merah bekerja dengan mengikat reseptor estrogen (ER) secara spesifik lebih kuat pada ER- β dibandingkan dengan ER- α sehingga dapat mengurangi risiko kanker. Pemberian suplemen semanggi merah dengan obat-obatan lain tidak mengubah profil farmakokinetika secara signifikan. Diperlukan lebih banyak penelitian yang menyelidiki dosis dan keamanan pemberian fitoestrogen semanggi merah dalam jangka panjang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada panitia penyelenggara WSNF tahun 2023, dosen pembimbing yang telah memberi saran dan masukan, serta rekan-rekan penulis yang memberi dukungan selama penyusunan *review* artikel ini hingga dapat selesai tepat waktu.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] A. Husada *et al.*, “Tingkat Pengetahuan Wanita Pra Lansia Tentang Menopause Di RT 023 RW 001 Kelurahan Sunter Agung,” *JAKHKJ*, vol. 6, no. 2, 2020.
- [2] M. Barati, H. Akbari-heidari, E. Samadi-yaghin, E. Jenabi, H. Jormand, and N. Kamyari, “The factors associated with the quality of life among postmenopausal women,” *BMC Womens Health*, vol. 21, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12905-021-01361-x.
- [3] A. Wijayanti, S. Tinggi, I. Kesehatan, A. Palembang, S. Dwi, and Y. Putri, “Paritas Dengan Usia Menopause Pada Wanita Usia 45-59 Tahun,” *Jurnal Inovasi Riset Ilmu Kesehatan*, vol. 1, no. 2, 2023.
- [4] L. Du, B. Xu, C. Huang, L. Zhu, and N. He, “Menopausal symptoms and perimenopausal healthcare-seeking behavior in women aged 40–60 years: A community-based cross-

- sectional survey in Shanghai, China,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, no. 8, Apr. 2020, doi: 10.3390/ijerph17082640.
- [5] K. J. Ryu *et al.*, “Comparison of various menopausal symptoms and risk factor analysis in Korean women according to stage of menopause,” *Maturitas*, vol. 140, pp. 41–48, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.maturitas.2020.05.023.
- [6] K. Peacock and K. M. Ketvertis, “Menopause Continuing Education Activity.”
- [7] J. A. E. Manson *et al.*, “Algorithm and mobile app for menopausal symptom management and hormonal/non-hormonal therapy decision making: A clinical decision-support tool from The North American Menopause Society,” *Menopause*, vol. 22, no. 3. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 247–253, Mar. 10, 2015. doi: 10.1097/GME.0000000000000373.
- [8] L. Lg *et al.*, “Citation: Phytotherapy as an Alternative to Hormone Replacement Therapy in Climacteric Syndrome,” 2020. [Online]. Available: www.gnosscience.com
- [9] G. R. Malca-Garcia *et al.*, “Auto-hydrolysis of red clover as ‘green’ approach to (iso)flavonoid enriched products,” *Fitoterapia*, vol. 152, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.fitote.2021.104878.
- [10] J. Luo, A. Mao, and Z. Zeng, “Sensor-based smart clothing for women’s menopause transition monitoring,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 4, Feb. 2020, doi: 10.3390/s20041093.
- [11] M. Tucak *et al.*, “The characterization of isoflavone content in the croatian red clover collection,” *Poljoprivreda*, vol. 25, no. 1, pp. 3–11, Jun. 2019, doi: 10.18047/poljo.25.1.1.
- [12] A. Tava, Ł. Pecio, R. Lo Scalzo, A. Stochmal, and L. Pecetti, “Phenolic content and antioxidant activity in Trifolium germplasm from different environments,” *Molecules*, vol. 24, no. 2, Jan. 2019, doi: 10.3390/molecules24020298.
- [13] H. Zhang, J. Zhao, H. Shang, Y. Guo, and S. Chen, “Extraction, purification, hypoglycemic and antioxidant activities of red clover (*Trifolium pratense* L.) polysaccharides,” *Int J Biol Macromol*, vol. 148, pp. 750–760, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.194.
- [14] F. Turan, I. Akyurt, and S. Cek-Yalniz, “Effect of Red Clover Extract on Sex Reversal and Gonadal Development in the African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822),” *Pak J Zool*, vol. 54, no. 2, Apr. 2022, doi: 10.17582/journal.pjz/20190211080201.
- [15] M. R. Kim *et al.*, “Combination of Red Clover and Hops Extract Improved Menopause Symptoms in an Ovariectomized Rat Model,” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/7941391.
- [16] A. H. Ali, M. Turki Al-Musawi, J. Zainab Universitas Maritim Raja Ali Haji, and Z. J. Shanan, “Production and characterization of nanoparticles lipid carrier (NLCs) loaded with red clover isoflavones extract for menopause therapy 580-594| P a g e”, doi: 10.36295/ASRO.2021.2446.

- [17] Y. M. Chen, I. L. Wang, X. Y. Zhu, W. C. Chiu, and Y. S. Chiu, “Red Clover Isoflavones Influence Estradiol Concentration, Exercise Performance, and Gut Microbiota in Female Mice,” *Front Nutr*, vol. 8, Apr. 2021, doi: 10.3389/fnut.2021.623698.
- [18] Y. Quah *et al.*, “Serum biomarker-based osteoporosis risk prediction and the systemic effects of *Trifolium pratense* ethanolic extract in a postmenopausal model,” *Chinese Medicine (United Kingdom)*, vol. 17, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s13020-022-00622-7.
- [19] Z. Abbasian, M. Jafari Barmak, F. Barazesh, M. Ghavamizadeh, and A. Mirzaei, “Therapeutic efficacy of *trifolium pratense* L. On letrozole induced polycystic ovary syndrome in rats,” *Plant Science Today*, vol. 7, no. 3, pp. 501–507, Sep. 2020, doi: 10.14719/pst.2020.7.3.845.
- [20] Y. Quah *et al.*, “*Trifolium pratense* ethanolic extract alters the gut microbiota composition and regulates serum lipid profile in the ovariectomized rats,” *BMC Complement Med Ther*, vol. 22, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12906-021-03486-w.
- [21] A. P. S. Rodrigues *et al.*, “Ormona® SI and Ormona® RC—New Nutraceuticals with Geranylgeraniol, Tocotrienols, Anthocyanins, and Isoflavones—Decrease High-Fat Diet-Induced Dyslipidemia in Wistar Rats,” *Nutraceuticals*, vol. 2, no. 4, pp. 311–322, Oct. 2022, doi: 10.3390/nutraceuticals2040024.
- [22] C. Ferraris *et al.*, “Red clover and lifestyle changes to contrast menopausal symptoms in premenopausal patients with hormone-sensitive breast cancer receiving tamoxifen,” *Breast Cancer Res Treat*, vol. 180, no. 1, pp. 157–165, Feb. 2020, doi: 10.1007/s10549-020-05534-4.
- [23] M. Oxfeldt, L. B. Dalgaard, J. Risikesan, F. T. Johansen, and M. Hansen, “Influence of fermented red clover extract on skeletal muscle in early postmenopausal women: A double-blinded cross-over study,” *Nutrients*, vol. 12, no. 11, pp. 1–15, Nov. 2020, doi: 10.3390/nu12113587.
- [24] T. Masuda *et al.*, “Effects of isoflavone-rich red clover extract on blood glucose level: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial,” *J Food Sci*, vol. 86, no. 4, pp. 1393–1399, Apr. 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15672.
- [25] K. A. Wickham *et al.*, “Short-Term Supplementation With Fermented Red Clover Extract Reduces Vascular Inflammation in Early Post-menopausal Women,” *Front Cardiovasc Med*, vol. 9, Feb. 2022, doi: 10.3389/fcvm.2022.826959.
- [26] M. Akbaribazm, M. R. Khazaei, and M. Khazaei, “*Trifolium pratense* L. (red clover) extract and doxorubicin synergistically inhibits proliferation of 4T1 breast cancer in tumor-bearing BALB/c mice through modulation of apoptosis and increase antioxidant and anti-inflammatory related pathways,” *Food Sci Nutr*, vol. 8, no. 8, pp. 4276–4290, Aug. 2020, doi: 10.1002/fsn3.1724.
- [27] A. W. Fleischer *et al.*, “Long-term oral administration of a novel estrogen receptor beta agonist enhances memory and alleviates drug-induced vasodilation in young ovariectomized mice,” *Horm Behav*, vol. 130, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.yhbeh.2021.104948.

- [28] S. Y. Jeon, M. R. Kim, E. O. Lee, B. H. Jeon, J. J. Lee, and Y. C. Lee, "Effect of a new herbal composition comprised of red clover and hop extract on human endothelial cell damage and vasorelaxant activity," *J Food Biochem*, vol. 44, no. 8, Aug. 2020, doi: 10.1111/jfbc.13314.
- [29] R. Bansal and N. Aggarwal, "Menopausal hot flashes: A concise review," *J Midlife Health*, vol. 10, no. 1, p. 6, 2019, doi: 10.4103/jmh.jmh_7_19.
- [30] A. M. Keiler *et al.*, "A standardized *Humulus lupulus* (L.) ethanol extract partially prevents ovariectomy-induced bone loss in the rat without induction of adverse effects in the uterus," *Phytomedicine*, vol. 34, pp. 50–58, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.phymed.2017.08.001.
- [31] A. Janas *et al.*, "Negligible Effect of Estrogen Deficiency on Development of Skeletal Changes Induced by Type 1 Diabetes in Experimental Rat Models," *Mediators Inflamm*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/2793804.
- [32] A. Gościński, P. Szulc, W. Zielewicz, J. Walkowiak, and J. Cielecka-Piontek, "Multidirectional Effects of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) in Support of Menopause Therapy," *Molecules*, vol. 28, no. 13, Jul. 2023, doi: 10.3390/molecules28135178.
- [33] Luís, F. Domingues, and L. Pereira, "Effects of red clover on perimenopausal and postmenopausal women's blood lipid profile: A meta-analysis," *Climacteric*, vol. 21, no. 5. Taylor and Francis Ltd, pp. 446–453, Sep. 03, 2018. doi: 10.1080/13697137.2018.1501673.
- [34] H. Zhao, J. Chen, X. Li, Q. Sun, P. Qin, and Q. Wang, "Compositional and functional features of the female premenopausal and postmenopausal gut microbiota," *FEBS Lett*, vol. 593, no. 18, pp. 2655–2664, Sep. 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13527.
- [35] S. Wang, Y. Wang, M. H. Pan, and C. T. Ho, "Anti-obesity molecular mechanism of soy isoflavones: Weaving the way to new therapeutic routes," *Food and Function*, vol. 8, no. 11. Royal Society of Chemistry, pp. 3831–3846, Nov. 01, 2017. doi: 10.1039/c7fo01094j.
- [36] IDF, "IDF Diabetes Atlas Eighth edition 2017," 2017.
- [37] S. Septiyanti and S. Seniwati, "Obesity and Central Obesity in Indonesian Urban Communities," *Jurnal Ilmiah Kesehatan (JIKA)*, vol. 2, no. 3, pp. 118–127, Dec. 2020, doi: 10.36590/jika.v2i3.74.
- [38] M. Marimoutou, F. Le Sage, J. Smadja, C. L. D'Hellencourt, M. P. Gonthier, and C. R. Da Silva, "Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- κ B genes," *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, vol. 12, no. 1, 2015, doi: 10.1186/s12950-015-0055-6.
- [39] S. Naiman *et al.*, "SIRT6 Promotes Hepatic Beta-Oxidation via Activation of PPAR α ," *Cell Rep*, vol. 29, no. 12, pp. 4127–4143.e8, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.067.
- [40] D. Harbilas *et al.*, "Populus balsamifera extract and its active component salicortin reduce obesity and attenuate insulin resistance in a diet-induced obese mouse model," *Evidence-*

- based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/172537.
- [41] S. A. Kuddus *et al.*, “Antioxidant-rich Tamarindus indica L. leaf extract reduced high-fat diet-induced obesity in rat through modulation of gene expression,” *Clinical Phytoscience*, vol. 6, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1186/s40816-020-00213-9.
- [42] J. Liu *et al.*, “Role of sex hormones in diabetic nephropathy,” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 14. Frontiers Media S.A., 2023. doi: 10.3389/fendo.2023.1135530.
- [43] K. Yamagata and Y. Yamori, “Potential effects of soy isoflavones on the prevention of metabolic syndrome,” *Molecules*, vol. 26, no. 19. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/molecules26195863.
- [44] T. G. Richardson *et al.*, “Evaluating the relationship between circulating lipoprotein lipids and apolipoproteins with risk of coronary heart disease: A multivariable Mendelian randomisation analysis,” *PLoS Med*, vol. 17, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PMED.1003062.
- [45] C. Borghi and F. Piani, “Uric Acid and Risk of Cardiovascular Disease: A Question of Start and Finish,” *Hypertension*, vol. 78, no. 5. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1219–1221, Nov. 01, 2021. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17631.
- [46] A. Ahmeda, A. Zangeneh, and M. M. Zangeneh, “Green synthesis and chemical characterization of gold nanoparticle synthesized using Camellia sinensis leaf aqueous extract for the treatment of acute myeloid leukemia in comparison to daunorubicin in a leukemic mouse model,” *Appl Organomet Chem*, vol. 34, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.1002/aoc.5290.
- [47] T. A. Mace *et al.*, “Soy isoflavones and their metabolites modulate cytokine-induced natural killer cell function,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-41687-z.
- [48] G. Mohammadi, M. M. Zangeneh, A. Zangeneh, and Z. M. S. Haghghi, “Chemical characterization and anti-breast cancer effects of silver nanoparticles using Phoenix dactylifera seed ethanolic extract on 7,12-Dimethylbenz[a] anthracene-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague Dawley male rats,” *Appl Organomet Chem*, vol. 34, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1002/aoc.5136.
- [49] M. Khazaei and M. Pazhouhi, “Antiproliferative Effect of Trifolium Pratens L. Extract in Human Breast Cancer Cells,” *Nutr Cancer*, vol. 71, no. 1, pp. 128–140, Jan. 2019, doi: 10.1080/01635581.2018.1521443.
- [50] C. Park *et al.*, “Induction of G2/M cell cycle arrest and apoptosis by genistein in human bladder cancer T24 cells through inhibition of the ROS-dependent PI3k/Akt signal transduction pathway,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 9, Sep. 2019, doi: 10.3390/antiox8090327.
- [51] U.S. Food & Drug Administration, “Clinical Drug Interaction Studies-Cytochrome P450 Enzyme-and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry,” 2020. [Online]. Available:

<https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

- [52] L. Chen *et al.*, “No Clinically Relevant Pharmacokinetic Interactions of a Red Clover Dietary Supplement with Cytochrome P450 Enzymes in Women,” *J Agric Food Chem*, vol. 68, no. 47, pp. 13929–13939, Nov. 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.0c05856.
- [53] M. J. Oza and Y. A. Kulkarni, “Trifolium pratense (Red Clover) Improve SIRT1 Expression and Glycogen Content in High Fat Diet-Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes in Rats,” *Chem Biodivers*, vol. 17, no. 4, Apr. 2020, doi: 10.1002/cbdv.202000019.
- [54] S. Gómez-Zorita, M. González-Arceo, A. Fernández-Quintela, I. Eseberri, J. Trepiana, and M. P. Portillo, “Scientific evidence supporting the beneficial effects of isoflavones on human health,” *Nutrients*, vol. 12, no. 12. MDPI AG, pp. 1–25, Dec. 01, 2020. doi: 10.3390/nu12123853.