

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 1 Juni sampai 31 Juli 2025, pemeliharaan tikus DM dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang oleh laboran. Minuman Mar'Ke Bilar dikirim dari kota Medan ke Malang sebanyak dua kali dengan jasa pengiriman barang menggunakan pesawat terbang. Kemudian pemeriksaan kadar TNF- α akan dilakukan dengan melakukan pengemasan sampel darah yang kemudian dikemas di dalam tabung kuvet lalu dibekukan. Selanjutnya akan dikirim ke Laboratorium Fisiologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang.

B. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *True Experimental* dengan *post-test only control group design* sehingga memungkinkan peneliti untuk melihat perbandingan kadar TNF- α pada kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol sesudah diberikan sari Mar'ke Bilar

Tabel 7. Model Rancangan Post-test Only Control Group Design

Kelompok	<i>Treatment</i>	<i>Post test</i>
K		O ₁
E ₁	X ₁	O ₂
E ₂	X ₂	O ₃
E ₃	X ₃	O ₄

K = Kelompok Kontrol

E = Kelompok Eksperimen

X₁ = Pemberian *treatment* dengan sari mar'ke bilar formulasi 1 dengan dosis 4ml

- X_2 = Pemberian *treatment* dengan sari mar'ke bilar formulasi 2 dengan dosis 4ml
 X_3 = Pemberian *treatment* dengan sari mar'ke bilar formulasi 3 dengan dosis 4ml
 O_0 = Kadar TNF- α Kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan (*treatment*)
 O_1 = Kadar TNF- α tikus wistar jantan diabetes melitus setelah diberikan *treatment* Formulasi 1 selama 14 hari
 O_2 = Kadar TNF- α tikus wistar jantan diabetes melitus setelah diberikan *treatment* Formulasi 2 selama 14 hari
 O_3 = Kadar TNF- α tikus wistar jantan diabetes melitus setelah diberikan *treatment* Formulasi 3 selama 14 hari

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Penelitian ini dilakukan pada hewan uji tikus wistar jantan yang diinduksi dengan Aloksan melalui injeksi intraperitoneal. Besar sampel minimal menggunakan rumus dari Frederer (1991) sebagai berikut :

Keterangan :

p = Jumlah perlakuan

n = Jumlah pengulangan pada setiap sampel

$$\begin{array}{rcl}
 4(n-1) & \geq & 16 \\
 4n - 4 & \geq & 16 \\
 4n & \geq & 16 + 4 \\
 4n & \geq & 20 \\
 n & \geq & 5
 \end{array}$$

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, diperoleh jumlah pengulangan pada penelitian ini adalah 5 ekor tikus untuk masing-masing kelompok, dengan 1 ekor tikus cadangan untuk setiap kelompok sehingga jumlah sampel total penelitian ini adalah 24 ekor hewan uji.

2. Sampel

Pengambilan besaran sampel pada penelitian ini menggunakan metode *purposive sampling* yang merupakan teknik pengambilan sampel yang didasarkan pada pertimbangan tertentu, dengan melihat ciri-ciri yang dibedakan menjadi :

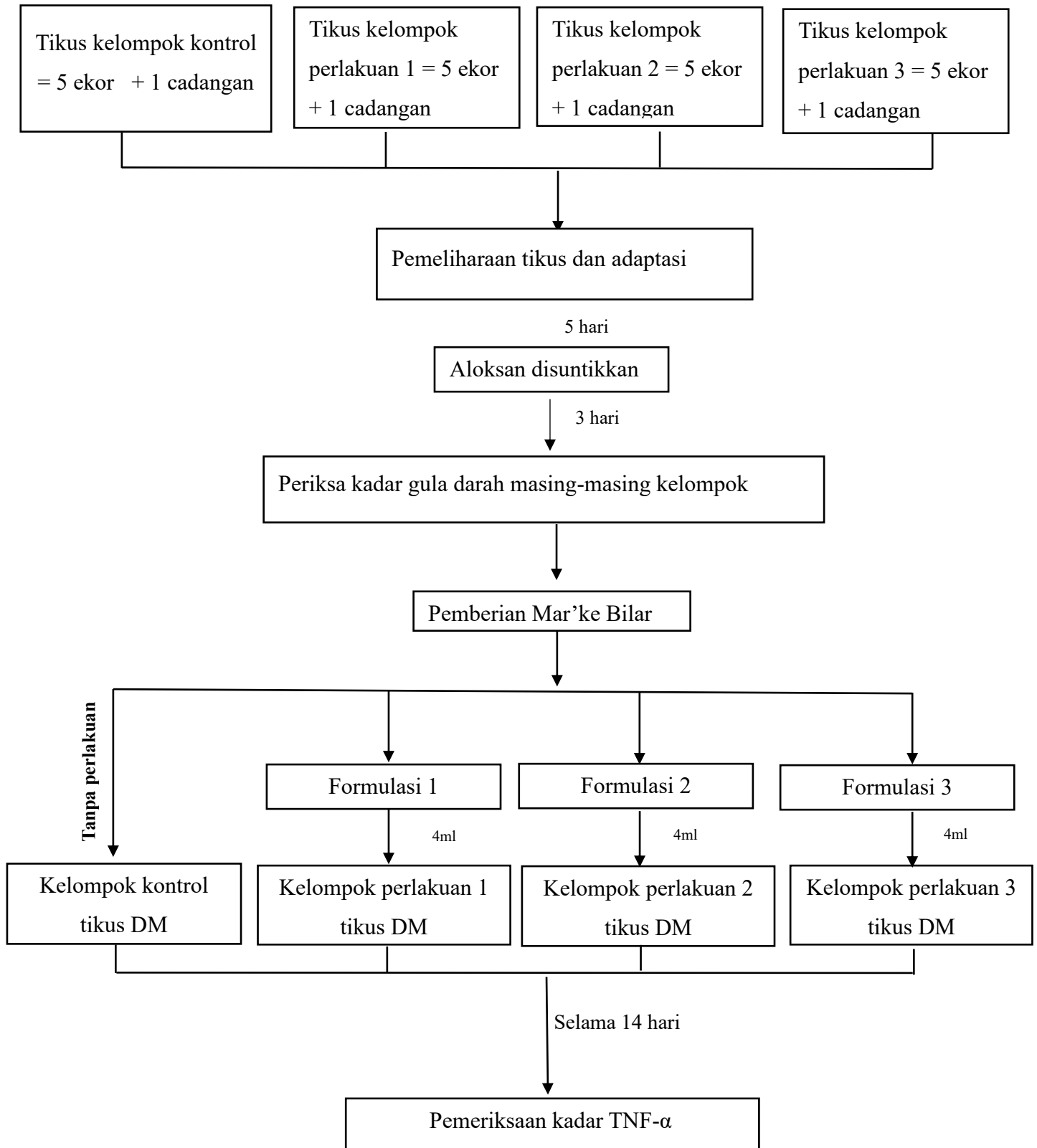
a. Kriteria inklusi (Kumara, 2018). :

- Tikus wistar berjenis kelamin jantan
- Berusia 6-8 minggu
- Berat badan 175-200 gram
- Tikus aktif dan tidak ada kelainan anatomi.

b. Kriteria eksklusi (Mustikasari et al., 2019) :

- Tikus yang sakit sebelum penelitian dilaksanakan
- Tikus yang mati pada saat penelitian.

D. Alur Penelitian



E. Jenis dan Cara Pengumpulan

1. Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini yaitu data primer yang diperoleh langsung pada saat penelitian meliputi kadar gula darah awal tikus dan kadar TNF- α

2. Cara pengumpulan data

a. Sebelum Penelitian

- Mencari jurnal yang berkaitan dengan topik serta variabel yang dibahas
- Menentukan lokasi penelitian

a) Persiapan hewan coba

- Pemeliharaan pada tikus sebelum diinduksi Aloksan melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 120mg/kgBB.
- Tikus diadaptasikan di kandang selama 7 hari dengan diberi air minum dan pakan standar *comfeed PAR-S* yang dicampurkan dengan tepung bromo.

b. Saat Penelitian

a) Proses Induksi

- Tikus wistar jantan diinduksi dengan Aloksan melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 120mg/kgBB.
- Aloksan disuntikkan pada daerah abdomen di antara kartilago xiphoidea (tulang rawan dada) dan simphysis pubis (bagian depan panggul)



Gambar 6. Induksi Aloksan

(Refdanita et al, 2018) dalam (Setiawan et al., 2021)

- Tunggu reaksi Aloksan selama 4-7 hari kemudian lakukan pemeriksaan kadar gula darah untuk mengetahui kondisi hiperglikemia pada tikus ($>200\text{mg/dl}$). Jika tidak sampai, maka akan dilakukan penambahan dosis atau penginduksian ulang

b) Pembuatan Minuman Mar'ke Bilar

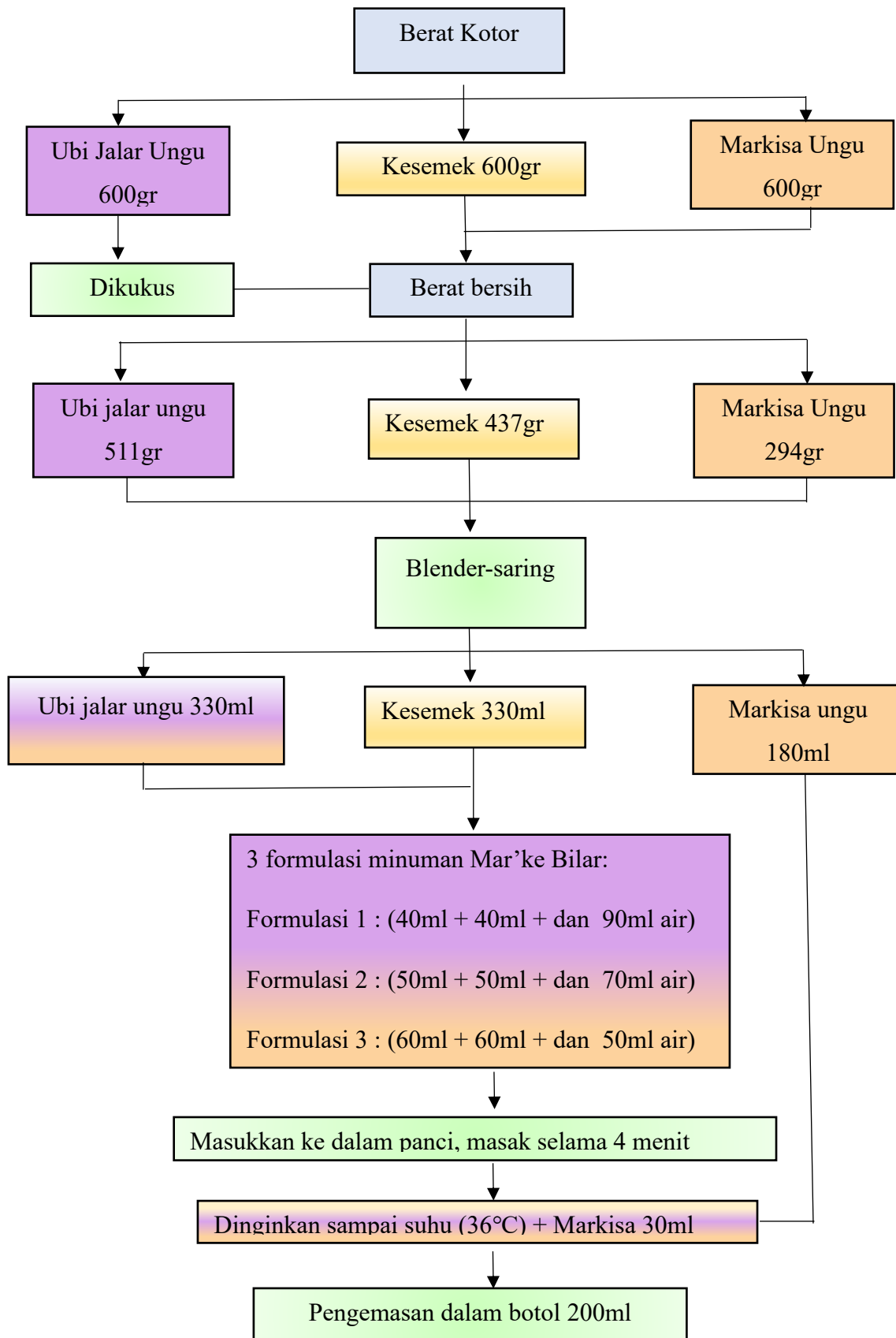
- Membuat formulasi sari Mar'ke Bilar dalam tiga variasi:
 - Formulasi 1 (40 ml sari ubi jalar ungu + 40 ml sari kesemek + 30 ml sari markisa ungu + 90 ml air).
 - Formulasi 2 (50 ml sari ubi jalar ungu + 50 ml sari kesemek + 30 ml sari markisa ungu + 70 ml air).
 - Formulasi 3 (60 ml sari ubi jalar ungu + 60 ml sari kesemek + 30 ml sari markisa ungu + 50 ml air).
- Siapkan alat dan bahan terlebih dahulu untuk membuat minuman Mar'ke Bilar sebagai *treatment* pada kelompok perlakuan dengan tiga formulasi

Alat yang digunakan dalam proses pengolahan Minuman Mar'ke Bilar :

- Blender, digunakan untuk menghaluskan bahan
 - Pisau, digunakan untuk memotong dan mangupas bahan
 - Talenan, sebagai alas saat proses pemotongan bahan
 - Baskom, sebagai wadah untuk menampung dan meletakkan bahan
 - Saringan, digunakan untuk menyaring bahan yang sudah dihaluskan
 - Panci, sebagai wadah saat proses memanaskan bahan
 - Kompor gas, digunakan sebagai sumber panas saat memasak
 - Timbangan, digunakan untuk menimbang berat bahan
 - Botol kemasan, sebagai wadah untuk mengemas hasil
 - Sendok makan
-
- Bahan yang digunakan untuk membuat Minuman Mar'ke Bilar terdiri dari ubi jalar ungu dengan berat kotor 600gr, kesemek 600gr, markisa ungu 600gr, air mineral 210ml.

- Timbang berat kotor bahan
- Kemudian kukus seluruh bahan lalu kupas hingga didapatkan berat bersih ubi jalar ungu 511gr, kesemek 432gr, dan markisa ungu 294gr
- Blender bahan satu persatu dengan penambahan air masing-masing ubi jalar ungu 86ml, kesemek 112ml, dan markisa ungu 90ml.
- Hasil blender kemudian disaring dan didapatkan sari ubi jalar ungu 330ml, kesemek 330ml, dan markisa ungu 180ml.
- Setelah itu minuman Mar'ke bilar dibuat dengan mencampurkan ketiga bahan menjadi 3 formulasi
- Formulasi 1 dengan ubi jalar ungu 40ml dan kesemek 40ml, formulasi 2 ubi jalar ungu 50ml dan kesemek 50ml, serta formulasi 3 ubi jalar ungu 60ml dan kesemek 60ml.
- Campuran sari ubi jalar ungu dan sari kesemek dipanaskan dengan penambahan air 90ml. 70ml, dan 50ml.
- Dinginkan hingga agak sejuk sekitar 36°C (diukur dengan thermometer)
- Campurkan dengan sari markisa masing-masing 30ml pada setiap formulasi
- Kemas kedalam botol berukuran 200ml
- Masukkan ke *freezer* hingga beku
- Kemas di dalam *sterofoam box* dengan *ice pack* untuk dikirimkan ke laboratorium FMIPA Universitas Brawijaya

Skema Pembuatan Minuman Mar'ke Bilar



Gambar 7. Skema Pembuatan Minuman Mar'ke Bilar (Siahaan et al.,

c) Pemberian Mar'ke Bilar

- Minuman Mar'ke Bilar diberikan pada tikus kelompok perlakuan sebanyak 4ml dengan menggunakan spuit yang sudah dilepas jarumnya dengan tetap diberi pakan standar dan air minum setiap hari
- Pemberian minuman Mar'ke Bilar dilakukan secara oral selama 14 hari
- Selama pemberian *treatment*, peneliti dibantu oleh 6 orang enumerator



Gambar 8. Pemberian *Treatment*

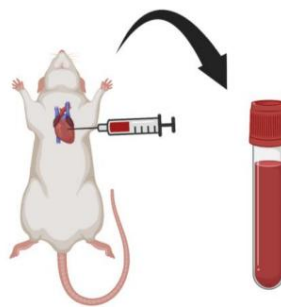
(Setiawan, 2021) dalam (Setiawan et al., 2021)

d) Pengambilan Sampel Darah (Wardhana, 2016)

- Pengambilan sampel darah sebanyak 5cc dilakukan pada hari ke-15 dilakukan oleh tenaga medis analis kesehatan
- Sampel darah diambil melalui jalur intra cardiac
- Tikus di anastesi terlebih dahulu dengan xylazin dosis 7-10 mg/ kg berat badan, kemudian ketamin (40-50 mg/ kg berat badan) melalui injeksi intramuskuler
- Setelah tikus berada dalam kondisi anestesi yang adekuat, tikus diposisikan terlentang.
- Bersihkan area dada dengan alkohol 70% kemudian jarum disisipkan pada dasar sternum (bawah xiphoid) dengan sudut kemiringan sekitar 30-45° ke arah sisi kiri.
- Darah diaspirasi secara perlahan dengan spuit hingga volume yang dibutuhkan tercapai. Apabila diperlukan, tabung penampung darah dapat diganti. Pengambilan darah dilakukan hingga tidak ada lagi darah yang

dapat diaspirasi, yang menyebabkan kematian hewan akibat eksanguinasi

- Setelah prosedur selesai, lakukan verifikasi untuk memastikan aktivitas jantung dan pernapasan tikus telah berhenti. Apabila masih ditemukan tanda-tanda kehidupan, lakukan eutanasi sesuai protokol yang berlaku menggunakan barbiturat dosis 100 mg/mL melalui injeksi intrakardinal. Kemudian hewan didiamkan sekitar 15 menit untuk memastikan tikus benar-benar sudah mati.



Gambar 9. Pengambilan Sampel Darah (Mourão et al., 2023)

- .Darah dikoleksi ke dalam tabung eppendorf (dengan lapisan EDTA dan tidak dilapisi EDTA) dan siap digunakan untuk keperluan penelitian
- e) Pemeriksaan Kadar TNF- α**
- Kemas sampel darah ke dalam tabung kuvet kemudian diberi label
 - Sampel darah dikirim ke Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang. untuk diperiksa kadar TNF- α dengan menggunakan TNF- α kit human TNF- α *sandwich* Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Prosedur metode ELISA :

- a. Prosedur ELISA diawali dengan tahap coating, yaitu proses Imobilisasi antigen atau antibody dalam 96-well polystyrene plate. Selanjutnya dilakukan tahap blocking untuk menutupi bagian permukaan plate yang tidak terikat antigen atau antibodi menggunakan blocking reagent, sehingga dapat mencegah ikatan nonspesifik

- b. Setelah proses blocking, plate diinkubasi dengan antibody yang terkonjugasi dengan enzim. Selanjutnya dilakukan pencucian untuk menghilangkan antibodi yang tidak berkaitan dengan antigen
- c. Tahap berikutnya adalah penambahan substrat yang akan bereaksi dengan enzim sehingga menghasilkan perubahan warna. Intensitas warna yang terbentuk kemudian akan diukur menggunakan microplate reader.
- d. Enzim yang paling umum digunakan dalam ELISA adalah horseradish peroxidase (HRP) and alkaline phosphatase (AP). Enzim lain yang digunakan juga diantaranya : β -galactosidase, acetylcholinesterase, and catalase
- e. Substrat kolorimetrik yang dipakai untuk enzim HRP adalah TMB, OPD dan ABTS, sedangkan untuk alkaline phosphatase adalah PNPP
- f. Pemilihan jenis substrat disesuaikan dengan tingkat sensitivitas pengujian yang dibutuhkan serta instrument yang tersedia untuk mendeteksi sinyal seperti spectrophotometer, fluorometer atau luminometer

F. Analisis Data

1. Pengolahan data

Keseluruhan data diolah secara manual dengan tahapan-tahapan proses komputerisasi (*editing, coding, data entry*, pengolahan data)

2. Analisis Univariat

Analisis univariat dilakukan terhadap data hasil penelitian yaitu kadar glukosa darah 2 jam Post Prandial (KGD 2JPP) setelah induksi aloksan dan data asupan pakan tikus dengan menampilkan nilai rata-rata (*mean*) dan standar deviasi

3. Analisis Bivariat

Data KGD 2JPP dan data asupan pakan tikus dianalisis menggunakan uji T-Independent untuk mengetahui apakah terdapat tidak adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p > 0.05$). Uji ini dilakukan untuk memastikan bahwa kedua data tersebut setara dan tidak menjadi faktor bias dalam menilai pengaruh perlakuan terhadap penurunan kadar TNF- α . Selanjutnya dilakukan dengan uji *one-*

way ANOVA untuk melihat perbedaan rata-rata kadar TNF- α kelompok control dan kelompok perlakuan yang diberikan intervensi berupa minuman Mar'ke Bilar dengan tiga jenis formulasi dengan nilai $p < 0.05$ maka terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. setelah asil uji *one-way* ANOVA menunjukkan hasil bermakna, kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc tukey* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan paling signifikan diperoleh nilai $p < 0.05$ maka ada perbedaan signifikan anantara kelompok tersebut.