

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai tanggal 10 Juni hingga 31 Juli 2025. Proses penyiapan Mar' ke Bilar dilakukan di laboratorium teknologi pangan Jurusan Gizi Poltekkes (di bawah naungan Kementerian Kesehatan) di Medan. Selanjutnya, hewan uji (mencit) dipindahkan ke unit penelitian in vivo di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (UniBraw), Malang. Pada saat yang sama, kadar glukosa darah diukur di Laboratorium Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran UniBraw, bekerja sama dengan Laboratorium Okta Santika di Malang (Jawa Timur) yang menyediakan peralatan analisisnya.

##### B. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian jenis ini merupakan studi eksperimental murni yang menggunakan rancangan kelompok kontrol dengan pengujian setelah perlakuan (post-test-only control group design), yang bertujuan untuk menentukan pengaruh pemberian minuman Mar'ke Bilar terhadap kadar glukosa darah pada tikus jantan Wistar yang menderita diabetes mellitus. Model rancangan kelompok kontrol dengan pengujian setelah perlakuan tersebut dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7 Model rancangan post-test-only control group design**

| Kelompok | <i>Treatment</i> | <i>Post test</i> |
|----------|------------------|------------------|
| K 0      | Tanpa pemberian  | K1               |
| A1       | F1               | A1.1             |
| A2       | F2               | A1.2             |
| A3       | F3               | A1.3             |

Keterangan Tabel :

- 1) K0 = Kelompok Kontrol
- 2) F1 = Pemberian treatment dengan sari Mar'kebilar formulasi 1
- 3) F2 = Pemberian treatment dengan sari Mar'kebilar formulasi 2
- 4) F3 = Pemberian treatment dengan sari Mar'kebilar formulasi 3
- 5) K1 = Kadar Gula Darah kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan (Treatment)
- 6) A 1.1 = Kadar glukosa darah tikus jantan Wistar yang menderita diabetes mellitus setelah menjalani pengobatan dengan formulasi 1 selama 15 hari.
- 7) A 1.2 = Kadar glukosa darah tikus jantan Wistar yang menderita diabetes mellitus setelah menjalani pengobatan dengan formulasi 2 selama 15 hari.
- 8) A1.3 = Kadar glukosa darah tikus jantan Wistar yang menderita diabetes mellitus setelah menjalani pengobatan dengan formulasi 3 selama 15 hari.

### C. Populasi dan sampel penelitian

#### 1. Populasi

Penelitian ini dilakukan pada tikus Wistar jantan yang diberi suntikan aloksan secara intraperitoneal untuk menginduksi stres. Ukuran sampel minimum dihitung menggunakan rumus Frederer (1991), sebagaimana ditunjukkan di bawah ini:

Penjelasan:

$$4(n-1) > 16$$

$$4n - 4 > 16$$

$$4n > 16 + 4$$

$$4n > 20$$

$$n > 5$$

P = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan per sampel

Berdasarkan perhitungan di atas, penelitian ini menggunakan 5 ekor tikus per kelompok, ditambah 1 ekor tikus tambahan per kelompok, sehingga totalnya menjadi 24 ekor hewan coba.

## **2. Sampel**

Penelitian ini menggunakan metode pengambilan sampel yang cermat untuk menentukan ukuran sampel sebuah teknik yang didasarkan pada pertimbangan khusus dengan memperhatikan karakteristik yang dikelompokkan sebagai berikut :

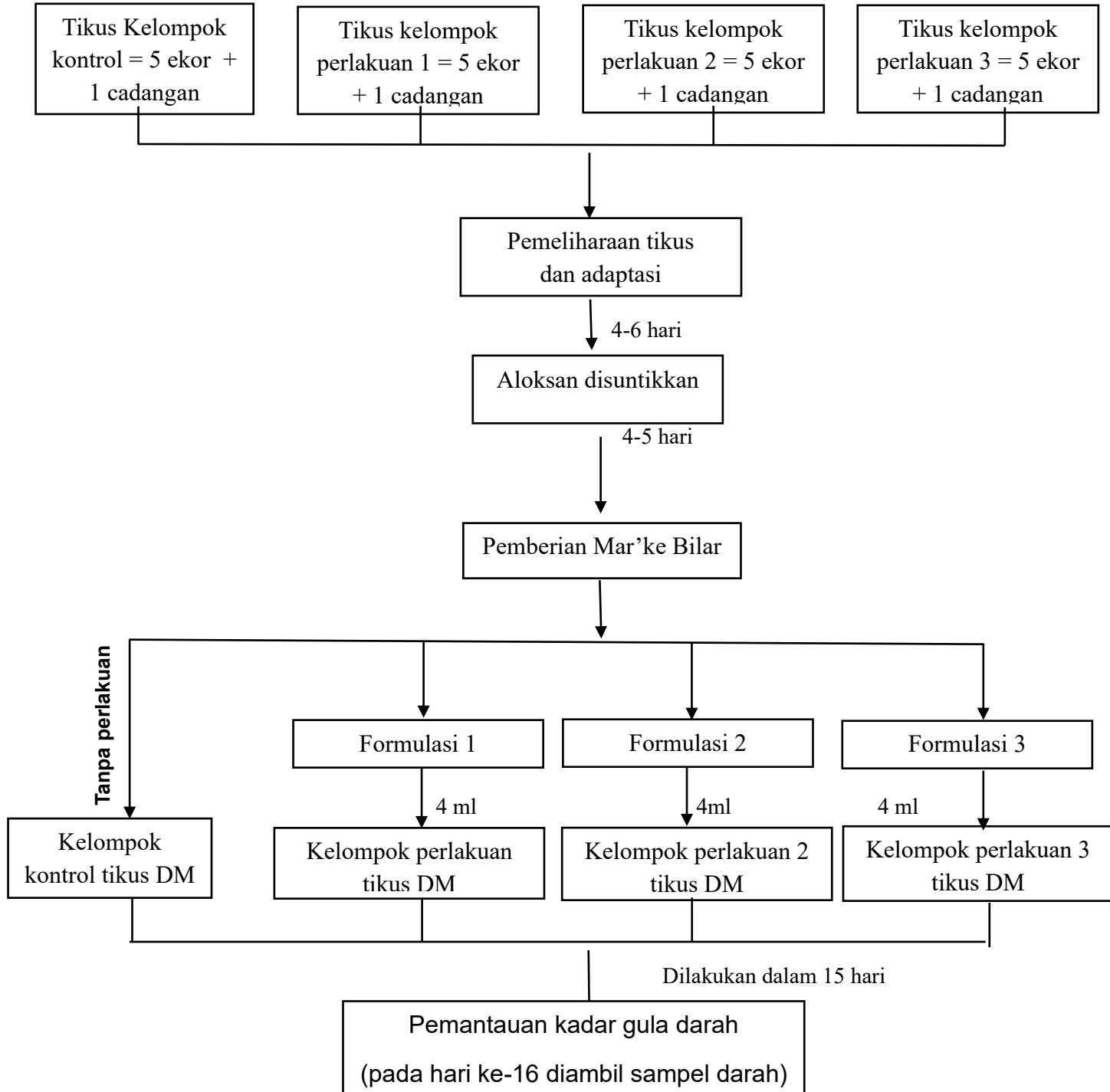
a. Kriteria inklusi:

- Tikus jantan Wistar
- Usia antara 6 dan 8 minggu
- Berat antara 175 dan 200 gram
- Tikus yang aktif dan tidak memiliki kelainan anatomi

b. Kriteria pengecualian:

- Tikus yang sudah sakit sebelum penelitian dilakukan
- Tikus yang mati selama penelitian berlangsung

#### D. Alur Penelitian



**Gambar 8 Alur Penelitian**

## E. Jenis dan Cara pengumpulan data

### 1. Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer yang diperoleh langsung oleh para peneliti, seperti pengukuran awal kadar glukosa darah pada tikus jantan Wistar untuk memastikan adanya diabetes mellitus dan pengukuran akhir kadar glukosa darah setelah penerapan intervensi.

#### A. Sebelum penelitian

- Mencari jurnal yang berkaitan dengan topik serta variabel yang dibahas
- Menentukan Lokasi penelitian
- Tempat pembuatan Mar'kebilar
- Tempat pemeriksaan Kadar Gula Darah

#### a. Persiapan Hewan Uji

- Persiapan sebelum induksi aloksan pada tikus melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 120 mg/kg berat badan.
- Tikus-tikus tersebut dibiarkan beradaptasi di dalam kandang selama 7 hari dengan pakan normal Comfeed PAR-S dan air minum, yang komposisinya dapat dilihat pada Tabel 8 di bawah ini.

**Table 8. Kandungan gizi per 100 g komposisi pakan normal tikus**

| Nutrisi        | Comfeed PAR-S | Tepung Bromo |
|----------------|---------------|--------------|
| Energi (kkal)  | 344           | 340          |
| Protein (gram) | 19            | 11           |
| Lemak (gram)   | 4             | 0,9          |
| Karbohidrat    | 58            | 72           |

## **B. Saat Penelitian**

### **a. Proses induksi**

- Tikus jantan Wistar diinduksi dengan alloxan melalui suntikan intraperitoneal dengan dosis 120 mg per kilogram berat badan.
- Alloxan disuntikkan ke daerah perut, di antara tulang rawan hialin sternum dan simfisis pubis, yang merupakan bagian depan panggul.



**Gambar 9 Induksi Aloksan**

(Setiawan et al., 2021)

- Tunggu selama 4 hingga 7 hari untuk melihat reaksi tikus terhadap Aloksan, kemudian lakukan tes gula darah untuk memeriksa apakah mereka mengalami hiperglikemia, yaitu kadar gula darah lebih dari 200 mg/dl. Jika kadar tersebut belum tercapai, dosis akan ditingkatkan atau hiperglikemia akan diinduksi kembali.

### **F. Pembuatan Minuman Mar'Ke Bilar**

- Tikus-tikus tersebut sudah siap untuk menjalani pengobatan
- Menyiapkan tiga varian formula Mar'ke Bilar:
  - a) Formula 1 (40 ml jus ubi ungu + 40 ml jus kesemek + 30 ml jus markisa ungu + 90 ml air).
  - b) Formula 2 (50 ml jus ubi ungu + 50 ml jus kesemek + 30 ml jus markisa ungu + 70 ml air).

- c) Formula 3 (60 ml jus ubi ungu + 60 ml jus kesemek + 30 ml jus markisa ungu + 50 ml air).
- Siapkan peralatan yang akan digunakan dalam pembuatan minuman Mar'ke Bilar sebagai pengobatan bagi kelompok eksperimen dengan ketiga formula tersebut.

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

- Blender, digunakan untuk menghaluskan bahan-bahan
- Sebuah pisau, digunakan untuk memotong dan mengupas bahan-bahan.
- Talenan, sebagai alas saat memotong bahan-bahan.
- Sebuah mangkuk yang digunakan untuk menampung dan meletakkan bahan-bahan.
- Saringan yang digunakan untuk mencampur bahan-bahan yang sudah dihaluskan.
- Sebuah panci yang digunakan untuk memanaskan bahan-bahan.
- Kompor gas yang digunakan sebagai sumber panas selama memasak.
- Timbangan yang digunakan untuk menimbang bahan-bahan.
- Botol yang digunakan untuk mengemas produk akhir.
- Sendok makan
- Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat minuman Mar'ke Bilar adalah: 600 gram ubi ungu, 600 gram kesemek, 600 gram markisa ungu, dan 210 ml air mineral.
- Perhatikan berat kotor bahan-bahan tersebut.
- Selanjutnya, kukus semua bahan dan kupas hingga diperoleh berat bersih 511 gram ubi ungu, 432 gram kesemek, dan 294 gram markisa ungu.
- Haluskan setiap bahan satu per satu, sambil menambahkan air: 86 ml untuk ubi ungu, 112 ml untuk kesemek, dan 90 ml untuk markisa ungu.
- Tuang campuran yang telah dihaluskan dan peroleh 330 ml jus ubi ungu, 330 ml jus kesemek, dan 180 ml jus markisa ungu.

- Selanjutnya, minuman yang disebut “markebilar” dibuat dengan mencampurkan ketiga bahan tersebut dalam tiga formulasi berbeda.
- Formulasi 1: 40 ml ubi ungu dan 40 ml kesemek; formulasi 2: 50 ml ubi ungu dan 50 ml kesemek serta formulasi 3 ubi jalar ungu 60 ml dan kesemek 60 ml.
- Campuran jus ubi ungu dan jus kesemek dipanaskan dengan menambahkan masing-masing 90 ml, 70 ml, dan 50 ml air.
- Biarkan mendingin hingga mencapai suhu sekitar 36 °C (diukur dengan termometer).
- Campurkan setiap bagian dengan 30 ml jus markisa. Tuangkan campuran tersebut ke dalam botol berkapasitas 200 ml.
- Letakkan botol-botol tersebut di dalam freezer hingga cairannya membeku.
- Kemas produk beku tersebut ke dalam kotak polistiren bersama kantong es untuk dikirim ke Departemen Fisiologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, di Malang.

#### **G. Pemberian Mar’Ke Bilar**

- Produksi minuman Mar’kebilar dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan, Jurusan Gizi, Poltekkes (Sekolah Tinggi Teknik Kesehatan) di bawah Kementerian Kesehatan di Medan.
- Minuman Mar’kebilar dituangkan ke dalam botol berukuran 200 ml dan diberi label sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Kemudian, botol-botol tersebut dimasukkan ke dalam kotak polistiren berisi kantong es untuk menjaga minuman tetap dingin dan mencegahnya rusak, sehingga dapat dikirim ke Laboratorium Fisiologi Molekuler di Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Selama pengiriman, suhu minuman Mar’kebilar dijaga antara 8 dan 15 derajat Celcius.
- Tikus-tikus pada kelompok perlakuan diberi 4 ml minuman Mar’ke Bilar menggunakan jarum suntik tanpa jarum, dan mereka terus menerima makanan standar serta air segar setiap hari.
- Minuman “Mar’ke Bilar” diberikan secara oral selama 15 hari, dalam tiga tahap: awal, tengah, dan akhir.

- Selama penelitian, para peneliti bekerja sama dengan tiga anggota Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang semuanya memiliki gelar di bidang Biologi dan Kimia.

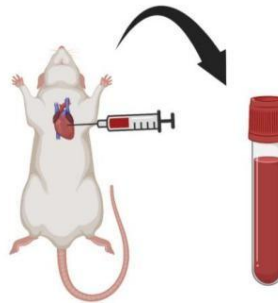


**Gambar 10 Pemberian Treatment**

(Setiawan et al., 2021)

#### **H. Pengambilan Sampel Darah .**

- Sampel darah sebanyak 5 cc diambil pada tanggal 16 oleh staf laboratorium yang ditunjuk oleh kepala Laboratorium In Vivo di Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.
- Sampel darah diambil langsung dari jantung.
- Pertama, tikus diberi xylazine dengan dosis 7 hingga 10 mg per kilogram berat badan. Kemudian, ketamine diberikan dengan dosis 40 hingga 50 mg per kilogram berat badan, melalui suntikan intramuskular.
- Tikus diletakkan dalam posisi telentang.
- Bersihkan area dada dengan alkohol 70% dan masukkan jarum ke pangkal tulang dada (di bawah prosesus xifoid) dengan sudut 30–45 derajat ke arah sisi kiri.
- Ambil darah secara perlahan menggunakan jarum suntik hingga mencapai jumlah yang diinginkan, dan ganti tabung jika diperlukan. Terus ambil darah hingga tidak dapat disedot lagi. Kematian tikus terjadi akibat kehilangan darah.
- Pastikan jantung telah berhenti berdetak sepenuhnya, dan jika hewan masih bernapas, lakukan eutanasia dengan menggunakan 100 mg/ml barbiturat melalui injeksi intrakardial. Tunggu selama 15 menit dan pastikan tikus tersebut benar-benar mati.



**Gambar 11 Pengambilan sampel darah**

- Darah dikumpulkan ke dalam tabung Eppendorf (dengan dan tanpa EDTA) dan siap digunakan dalam penelitian.
- Prosedur ini dilakukan oleh tiga tenaga kesehatan dari Laboratorium Fisiologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, di Malang.

## **I. Pemeriksaan Kadar Gula Darah**

Data kadar glukosa darah diperoleh dari hasil pengujian yang dilakukan di Departemen Fisiologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya di Malang. Sampel darah diambil pada hari ke-16 setelah pemberian pengobatan, yaitu minuman Mar'ke Bilar. Analisis glukosa darah dilakukan menggunakan alat uji glukosa darah dengan metode enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Proses pengukuran kadar glukosa darah menggunakan metode enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) adalah sebagai berikut:

### **1. Persiapan alat dan bahan**

- Mikrotiter plate (coated dengan antibodi terhadap glukosa jika indirect/sandwich ELISA)
- Reagen ELISA kit glukosa (biasanya mengandung standar glukosa, antibodi, substrat enzim, buffer)
- Mikropipet dan tip
- Mesin ELISA reader (spektrofotometer mikroplate)
- Inkubator (37°C)
- Sampel darah pasien (biasanya plasma atau serum)

- Pelat mikrotiter yang dilapisi antibodi terhadap glukosa jika menggunakan metode ELISA tidak langsung atau sandwich.
- Reagen dalam kit ELISA glukosa (biasanya mencakup standar glukosa, antibodi, substrat enzimatis, dan buffer).
- Mikropipet dan ujung pipet
- Pembaca ELISA (spektrofotometer pelat mikro)
- Inkubator (37 °C)
- Sampel darah pasien (biasanya plasma atau serum).

## **2. Persiapan Sampel**

- Ambil sekitar 2 hingga 3 mililiter darah vena.  
Pisahkan serum atau plasma dengan cara sentrifugasi (sekitar 3000 rpm selama 10 menit).
- Jika Anda tidak berencana menggunakan sampel tersebut segera, simpanlah pada suhu antara 2 dan 8 derajat Celcius.

## **3. Langkah-Langkah ELISA**

### **1) Penambahan sampel dan standar**

Tambahkan standar glukosa serta sampel serum atau plasma ke setiap sumur.

- Inkubasi pada suhu 37 °C selama 30–60 menit (sesuai protokol kit)
- Cuci pelat sebanyak 3 hingga 5 kali dengan larutan pencuci untuk menghilangkan sampel yang tidak terikat.

### **2) Penambahan antibodi terkonjugasi**

- Tambahkan antibodi yang terkonjugasi dengan enzim, seperti HRP (horseradish peroxidase). Inkubasi kembali selama 30–60 menit.
- Seka pelat sekali lagi dengan kain pembersih.

### 3) Penambahan substrat

- Tambahkan substrat enzimatik (misalnya, TMB – tetrametilbenzidin).
- Inkubasikan dalam kondisi gelap selama 15 hingga 30 menit hingga muncul warna.

### 4) Menghentikan reaksi

- Tambahkan larutan penghenti, biasanya asam sulfat encer.
- Warna berubah, misalnya, dari biru menjadi kuning.

### 5) Pembacaan

- Ukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu, biasanya 450 nm, menggunakan alat pembaca ELISA.

## J. Analisis Data

### 1. Pengolahan data

Seluruh data diproses secara manual, termasuk tahapan dalam proses digitalisasi seperti pemeriksaan, pengodean, entri, dan penanganan data.

### 2. Analisis Univariat

Analisis univariat dilakukan terhadap data dari penelitian ini, yang mencakup KGD 2JPP setelah induksi dengan alloksan serta data asupan makanan tikus-tikus tersebut, yang menunjukkan nilai rata-rata dan simpangan baku.

### 3. Analisis Bivariat dan Multivariat

Data KGD 2JPP dan data asupan pakan tikus dianalisis menggunakan uji T-independent, untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang bermakna antar setiap perlakuan kelompok ( $p > 0.05$ ). Dan memastikan bahwa KGD 2JPP dan data asupan pakan tikus dalam keadaan homogen sehingga tidak menjadi faktor bias bagi penurunan KGD. Selanjutnya dilakukan uji *oneway* ANOVA dalam menilai pengaruh perlakuan terhadap penurunan KGD. kelompok control dan kelompok perlakuan yang diberikan intervensi berupa minuman Mar'ke Bilar berupa 3 jenis formulasi, didapat  $p < 0.05$ . kemudian di lanjutkan dengan uji post-hoc tukey untuk mengetahui kelompok mana yang paling signifikan penurunan KGD ditunjukkan dengan notasi huruf.