BAB III
METODE PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 1 Desember 2025 sampai 28 Febuari 2026. Pembuatan Mar'ke Bilar dilakukan di laboratorium Teknologi Pangan Jurusan Gizi Poltekkes Kemenkes Medan. Selanjutnya tikus dipelihara di Fakultas Kedokteran bagian In Vivo Universitas Brawijaya Malang (UniBraw). Sedangkan Pemeriksaan variabel Kadar Glukosa Darah (KGD) dilakukan di Laboratorium Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran UniBraw yang bekerja sama dengan Laboratorium Okta Santika Malang, Jawa Timur sebagai penyedia KIT.

B. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah menggunakan penelitian *Quasi Ekserimental* dengan rancangan pre test dan post test one group design. Untuk mengetahui Dampak pemberian Minuman Mar'ke Bilar terhadap kadar gula darah pada tikus wistar Jantan Diabetes Melitus.

Model Rancangan *Pre-test* dan *Post test* design, yaitu digambarkan Sbb :

Tabel 8. Model Rancangan *Pre-test* dan *Post-test* design

01 ⟶ (x) ⟶ 02

Keterangan :

01 = Kadar Gula Darah pada tikus wistar jantan diabetes melitus Sebelum pemberian Mar'ke Bilar

x = Pemberian minuman Mar'ke Bilar selama 15 hari

02 = Kadar Gula Darah pada tikus wistar jantan diabetes melitus Setelah pemberian Mar'ke Bilar

C. Populasi dan sampel Penelitian

1. Populasi

Penelitian ini dilakukan pada hewan uji tikus wistar jantan yang diinduksi dengan Aloksan melalui injeksi intraperioneal. Besar sampel minimal

menggunakan rumus dari (Ginta *et al.*, 2025) sebagai berikut :

P (n – 1) ≥ 16

1 (n-1) ≥16

1 n-1 ≥16

1 n ≥16+1

n ≥17 ⟶ n=17

Keterangan :

P = Jumlah perlakuan

n = Jumlah pengulangan untuk tiap sampel

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, diperoleh jumlah pengulangan pada penelitian ini adalah 17 ekor tikus untuk masing-masing kelompok, untuk mengantisipasi drop out atau kematian hewan uji coba maka disiapkan cadangan sampel sebanyak (10%) atau 2 ekor tikus cadangan sehingga jumlah total penelitian ini adalah 19 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 :

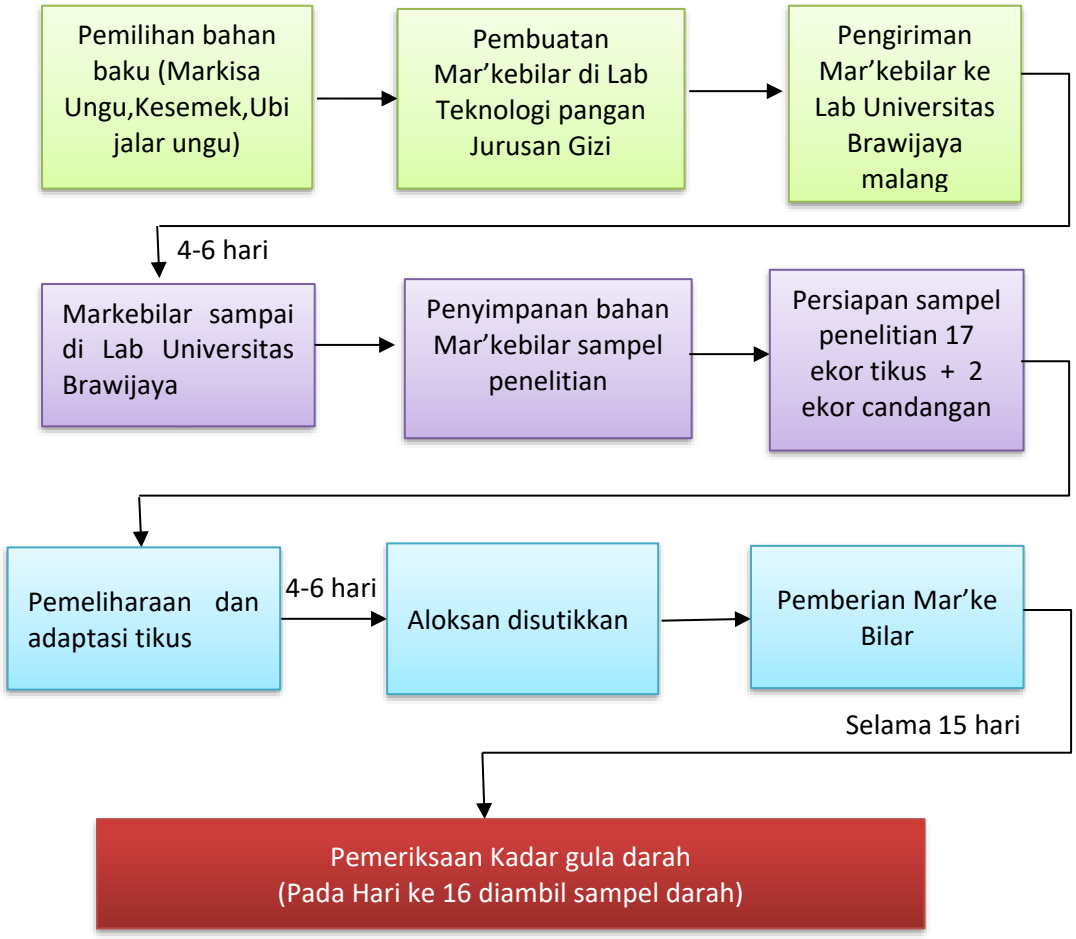
a. Kriteria inklusi :

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

b. Kriteria eksklusi :

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

D. AlurPenelitian



Gambar 9 Alur Penelitian

E. Jenis dan Cara Pengumpulan

1. Jenis Data

Jenis data yang di kumpulkan pada penelitian ini terdiri dari data primer yang diperoleh langsung oleh peneliti. Data pemeriksaan yang diperlukan dalam penelitian meliputi kadar glukosa darah awal pada tikus wistar jantan untuk memastikan kondisi diabetes melitus (DM), serta kadar glukosa darah akhir diberikan intervensi

2. Cara pengumpulan data

a. Sebelum Penelitian

1) Pembuatan Mar'ke Bilar

- Membuat formulasi sari Mar'ke Bilar dengan Komposisi:

- Formulasi (50 ml sari ubi jalar ungu + 50 ml sari kesemek + 30 ml sari markisa

ungu + 70 ml air).

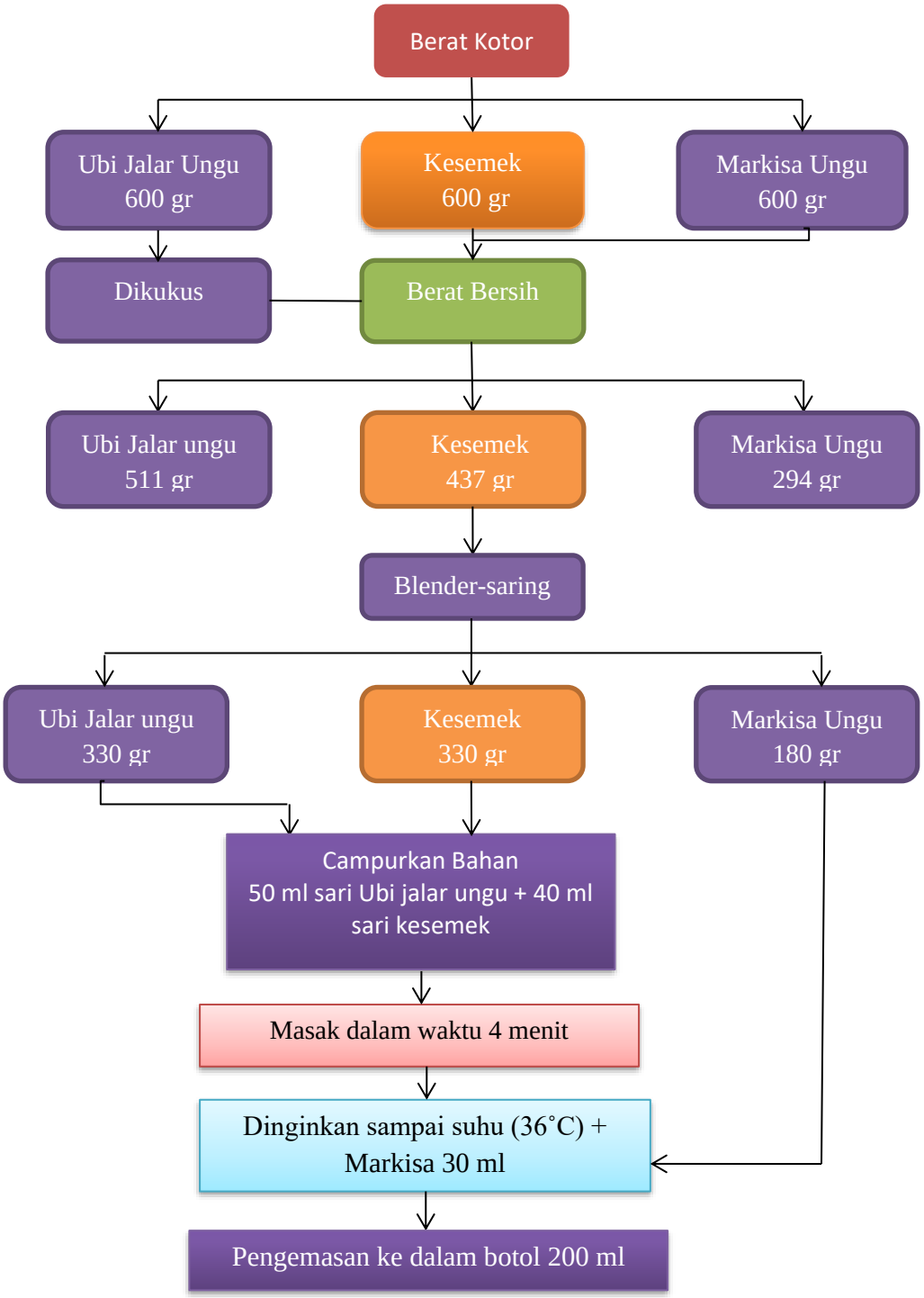
- Siapkan alat dan bahan terlebih dahulu untuk membuat minuman Mar'keBilar sebagai *treatment* pada kelompok perlakuan

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

- Blender, digunakan untuk menghaluskan bahan
- Pisau, digunakan unutuk memontong 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, seluruh bahan dikukus terlebih dahulu, setelah itu dilakukan proses pengupasan sehingga diperoleh berat bersih ubi jalar ungu sebesar 511 gr, kesemek 432 gr, dan markisa ungu 294 gr.
- Blender bahan satu persatu dengan penambahan air masing-masing ubi jalar ungu 86 ml, kesemek 112 ml, dan markisa ungu 90 ml.
- Hasil blender kemudian disaring dan didapatkan sari ubi jalar ungu 330ml, kesemek 330ml, dan markisa ungu 180ml.
- Setelah ambil sebanyak 50 ml sari ubi jalar ungu + 50 ml sari kesemek
- Campuran sari ubi jalar ungu dan sari kesemek dipanaskan dengan penambahan air 70 ml.
- Dinginkan hingga agak sejuk sekitar 36℃ (diukur dengan thermometer).
- kemudian minuman Mar'ke bilar dibuat dengan mencampurkan ketiga bahan menjadi satu dengan mencampurkan dengan sari markisa 30 ml pada 2

campuran diawal

- Kemas kedalam botol berukuran 200ml dan masukkan ke freezer hingga beku
- Kemas di dalam *sterofoam box* dengan *ice pack* untuk dikirimkan ke laboratorium FMIPA Universitas Brawijaya



Gambar 10 Alur Pembuatan Minuman Mar'ke Bilar

2) Persiapan Hewan Uji

- Pemeliharaan pada tikus sebelum diinduksi aloksan melalui injeksi intraperioneal dengan dosis 120mg/kgBB.
- Tikus diadaptasikan di kandang selama 7 hari dengan diberi diet normal *Comfeed PAR-S* standar dan air minum yang komposisi nya dapat di lihat pada tabel 8.

Tabel 9. Kandungan zat gizi per 100 gr komposisi diet normal tikus

Zat Gizi	*Comfeed PAR-S*	Tepung Bromo
Energi (kkal)	344	340
Protein (gram)	19	11
Lemak (gram)	4	0.9
Karbohidrat	58	72

3. Saat penelitian

1) Proses induksi

- Tikus wistar jantan diinduksi dengan aloksan melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 120mg/kgBB.
- Aloksan disuntikkan pada daerah abdomen diantara kartilago xipoidhea (tulang rawan dada) dan simphisis pubis (bagian depan panggul



Gambar 11 Induksi Aloksan

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



Gambar 12 Minuman Marke'Bilar

2) Pemberian Mar'ke Bilar

- Pembuatan minuman Mar'kebilar dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan Jurusan Gizi Poltekes Kemenkes Medan.
- Kemudian di kemas ke dalam Botol yg berukuran 200 ml serta di berikan lebel sesuai dengan perlakuannya, lalu dimasukkan ke dalam *sterefoam box* dengan *ice pack* agar minuman tetap segar dan terhindar dari kerusakan untuk di kirimkan ke Laboratorium Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kondisi mar'kebilar saat di kirim suhunya berkisar 8 – 10℃.
- Minuman Mar'ke Bilar diberikan sekali sehari pada tikus sebanyak 4 ml 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 15 hari dengan pengiriman sebanyak 2 kali (Awal dan Tengah).
- Selama pemberian *treatment,* peneliti menggunakan tenaga Laboratorium sebanyak 3 orang.

F. Kebutuhan Bahan Mar'ke Bilar

Perhitungan Kebutuhan dengan Cadangan 10 %

- Data dasar : 1 botol menampung 200 ml Mar'ke Bilar
- Dosis perhari : 4 ml
- Jumlah tikus : 17 ekor
- Lama pemberian : 15 hari

Kebutuhan tanpa cadangan

- Per hari

17 x 4 = 68 ml

- Selama 15 hari

15 x 68 ml = 1020 ml

Tambahan cadangan 10 %

1020 ml x 10% = 102 ml

Total kebutuhan

1020 ml + 102 ml = 1122 ml

Jumlah botol

1122 ml : 200 ml = 5,61 botol atau **6 botol**



Gambar 13 Pemberian Treatment

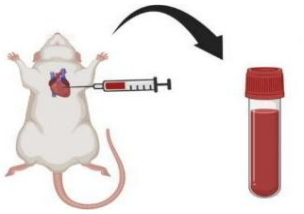
Pemberian minuman markebilar dilakukan dengan dosis 4 ml per ekor tikus per hari kepada 17 ekor tikus selama periode intervensi 15 hari. Total kebutuhan volume minuman yang diperlukan adalah 1.020 ml. Dengan penambahan cadangan sebesar 10% untuk mengantisipasi kehilangan sampel atau kesalahan teknis, total volume yang disiapkan adalah 1.122 ml, sehingga diperlukan sebanyak 6 botol minuman markebilar dengan volume 200 ml per botol.

a. Pengambilan sampel Darah

- Pengambilan sampel darah sebanyak 5 cc dilakukan pada hari ke-16 dilakukan oleh tenaga laboratorium kesehatan.
- Sampel darah diambil melalui jalur intra cardiac.
- Tikus di anastesi terlebih dahulu dengan xylazin (7-10 mg/ kg berat badan) kemudian ketamin (40-50 mg/ kg berat badan) secara intramuskuler.
- Badan tikus diletakkan pada punggungnya.
- Bersihkan area dada dengan alkohol 70% dan injeksikan jarum pada dasar sternum (bawah xiphoid) dengan sudut kemiringan 30-450 pada sisi kiri.
- Darah ditarik secara perlahan dengan jarum suntik sampai volume yang diinginkan dan ganti tabung jika diperlukan. Koleksi darah sampai tidak ada

darah lagi yang dapat di aspirasi. Kematian tikus terjadi akibat eksanguniasi.

- Verifikasi apakah jantung benar-benar telah berhenti dan apabila masih bernafas eutanasi dengan barbiturat 100 mg/ ml intracardial. Tunggu sampai 15 menit dan yakinkan tikus benar-benar sudah mati.



Gambar 14 Pengambilan sampel darah

- Darah dikoleksi ke dalam tabung eppendorf (dengan lapisan EDTA dan tidak dilapisi EDTA) dan siap digunakan untuk keperluan penelitian.
- Pengerjaan dilakukan sebanyak 3 orang oleh tenaga kesehatan Laboratorium Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

b. Pemeriksaan Kadar Gula Darah

Data kadar gula darah di peroleh melalui hasil pemeriksaan yang di lakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Brawijaya Malang pada sampel darah yang dilakukan pada hari ke-16 setelah pemberian *treatment* berupa minuman Mar'ke Bilar.Pemeriksaan KGD dilakukan menggunakan kit reagen KGD dengan metode *enzyme linked immunoabsorbent assay* (ELISA). Prosedur pemeriksaan kadar glukosa darah dengan metode *enzyme linked immunoabsorbent assay* (ELISA) adalah sebagi berikut:

1. Persiapan alat dan bahan

- Mikroliter plate (coated dengan anti bodi terhadap glukosa jika indirect/sandwich ELISA)
- Reagen ELISA kit glukosa (biasanya mengandung standart glukosa,antibody,substrat enzim,buffer)
- Mikropipet dan tip
- Inkubator ((37°C)
- Sampel darah pasien (biasanya plasma atau serum)

2. Persiapan sampel

- Ambil darah vena ± 2-3 mL
- Pisahkan serum atau plasma dengan sentrifugasi (± 3000 rpm, 10 menit).
- Simpan sampel pada suhu 2–8°C jika tidak langsung digunakan.

3. Langkah-langkah ELISA

1) Penambahan sampel dan standart

Tambahkan standar glukosa dan sampel/plasma ke masing-masing well

- Inkubasi pada suhu 37°C selama 30–60 menit (tergantung protokol kit).
- Cuci plate 3–5 kali dengan buffer pencuci untuk menghilangkan sampel yang tidak terikat.

2) Penambahan antibody konjukat

- Tambahkan antibody yang sudah dikonjugasikan dengan enzim (missal: HRP-*Horseradish Peroxidase*)
- Cuci Kembali plate dengan buffer pencuci

3) Penambahan substart

- Tambahkan substrat enzim (misalnya TMB- tetramethylbenzidine)
- Inkubasi dalam gelap selama 15-30 menit hingga warna berkembang)

4) Stop Reaksi

- Tambahkan larutan stop (biasanya H_2SO_4 encer).
- Warna berubah (misalnya dari biru ke kuning)

5) Pembacaan

Baca asorbasi pada panjang gelomang tertentu (biasanya 450 nm) menggunakan ELISA reader)

G. Analisis Data

1. Analisis univariat

Analisis univariat dilakukan terhadap data hasil penelitian yaitu kadar gula darah sebelum perlakuan dan kadar gula darah setelah perlakuan setelah induksi aloksan dan data asupan pakan tikus dengan menampilkan nilai rata-rata (*mean)* dan standar deviasi.

2. Analisis Bivariat dan Multivariat

Analiisis data mengunakan uji normalitas (saphiro Wilk) kemudian dilanjutkan menggunakan Uji T Dependent (Paired sample T-Test) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara Kadar Gula Darah 2 jam postprandial (KGD 2JPP) sebelum pemberian minuman Mar'ke Bilar (pre-test) dan sesudah pemberian minuman Mar'ke Bilar (post-test) pada kelompok tikus yang sama, jika $P<0,05$.