BAB III
METODE PENELITIAN

A. Pendekatan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif dengan metode true experimental dan desain post-test only control group design untuk mengevaluasi pengaruh *treatment* minuman Mar'ke Bilar terhadap kadar SOD pada tikus *wistar* jantan diabetes melitus. Pemilihan desain penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kadar SOD antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah pemberian Mar'ke Bilar dengan tiga formulasi yang berbeda. Data dikumpulkan melalui pemeriksaan kadar SOD pada serum darah tikus setelah seluruh perlakuan selesai diberikan. Analisis dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian Mar'ke Bilar terhadap kadar SOD serta membandingkan efektivitas setiap formulasi. Dengan penggunaan desain post-test only control group, penelitian ini menggambarkan pengaruh pemberian Mar'ke Bilar terhadap kadar SOD berdasarkan perbedaan hasil pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

B. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat *True Experimental* dengan desain *post-test only control group design,* untuk mengevaluasi pengaruh treatment Mar'ke Bilar dan melihat perbandingan kadar SOD pada kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol, setelah diberikan Mar'ke Bilar. Model rancangan *Post-test only control group* digambarkan seperti berikut:

Tabel 6. Model rancangan

Kelompok	**Perlakuan**	***Post test***
Kontrol	-	O_1
Kelompok 1	X_1	O_2
Kelompok 2	X_2	O_3
Kelompok 3	X_3	O_4

(*Sugioyo, 2018*)

Keterangan:

Kontrol: Kelompok kontrol

X_1 : Pemberian minuman Mar'ke bilar terhadap kelompok intervensi dengan formulasi I selama 14 hari.

X_2 : Pemberian minuman Mar'ke bilar terhadap kelompok intervensi dengan formulasi II selama 14 hari.

X_3 : Pemberian minuman Mar'ke bilar terhadap kelompok intervensi dengan formulasi III selama 14 hari.

O_1 : Kadar SOD kelompok kontrol.

O_2 : Kadar SOD kelompok intervensi 1 setelah pemberian minuman Mar'ke bilar dengan formulasi I.

O_3 : Kadar SOD kelompok intervensi 2 setelah pemberian minuman Mar'ke bilar dengan formulasi II.

O_4 : Kadar SOD kelompok intervensi 3 setelah pemberian minuman Mar'ke bilar dengan formulasi III.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 1 Juni sampai dengan 31 Juli tahun 2025, pembuatan Mar'ke Bilar dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan Poltekkes Kemenkes Medan, Jurusan Gizi. Pemeliharaan tikus dilakukan di Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Kemudian pemeriksaan kadar SOD akan dilakukan dengan melakukan pengemasan sampel darah yang kemudian dikemas di dalam tabung kuvet lalu dibekukan dan dikirim ke Laboratorium Fisiologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

D. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah true experimental dengan rancangan post-test only control group design. Rancangan ini melibatkan satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan yang masing-masing diberikan treatment Mar'ke Bilar dengan formulasi yang berbeda. Pengukuran kadar SOD dilakukan setelah seluruh perlakuan selesai diberikan dan kemudian hasil pengukuran antar kelompok dibandingkan untuk mengetahui pengaruh pemberian Mar'ke Bilar terhadap kadar aktivitas SOD pada tikus Wistar jantan diabetes melitus.

E. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tikus *wistar* jantan (*Rattus novergicus wistar*), yang diinduksi dengan ALOKSAN melalui injeksi intraperioneal. Jumlah populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor tikus *wistar* jantan yang ditentukan berdasarkan rumus Frederer (1991).

2. Sampel

Besar sampel ditentukan menggunakan rumus Frederer (1991) dalam Wibisono et al., 2021, untuk menentukan jumlah tikus yang perlukan pada masing-masing kelompok. Berikut adalah perhitungan jumlah tikus yang digunakan sesuai dengan rumus Frederer (1991):

Rumus : P (n-1) ≥ 16

Keterangan:
P: Jumlah kelompok perlakuan
n: Jumlah tikus per kelompok

Penelitian dengan penggunaan 4 kelompok dapat dihitung sebagai berikut:

$$P\,(n-1) \geq 16$$

$$4\,(n-1) \geq 16$$

$$4n - 4 \geq 16$$

$$n \geq \frac{(16+4)}{4}$$

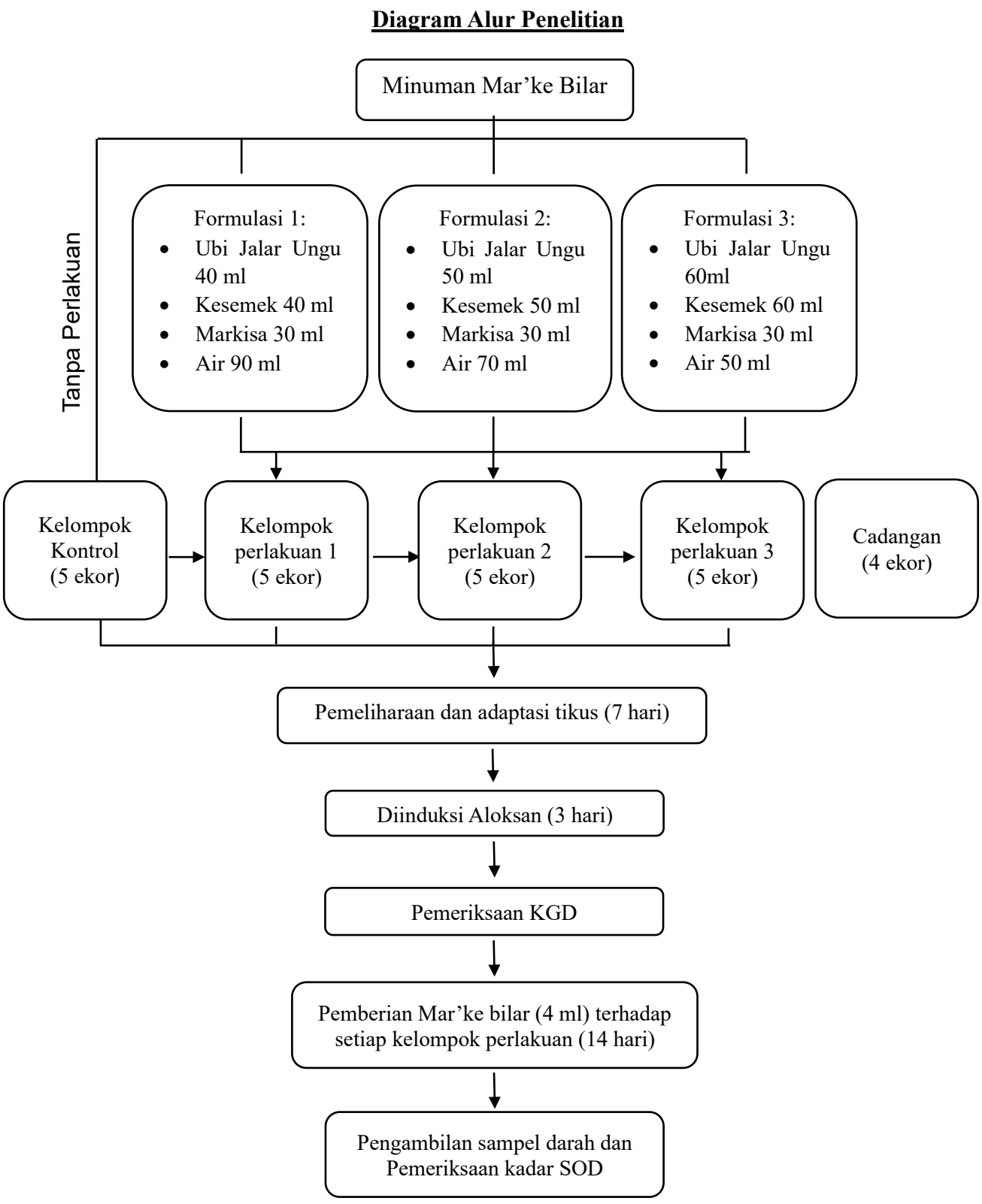
$$n \geq 5$$

Sesuai hasil perhitungan menggunakan rumus tersebut, didapatkan sebanyak 5 ekor tikus dibutuhkan untuk masing-masing kelompok, sehingga total tikus yang diperlukan untuk 4 kelompok adalah 20 ekor tikus. 1 ekor tikus ditambahkan pada masing-masing kelompok, yang bertujuan menjadi tikus cadangan sebagai bentuk antisipasi saat terjadi risiko terhadap tikus selama penelitian berlangsung. Sehingga total keseluruhan tikus yang digunakan adalah 24 ekor.

Sampel diambil dengan metode *purposive sampling* yang merupakan teknik pengambilan sampel yang didasarkan pada pertimbangan tertentu, seperti sifat-sifat atau ciri-ciri yang termasuk dalam kriteria inklusi.

a. Kriteria inklusi (Kumara et al, 2018):
    1) Tikus *wistar* berjenis kelamin jantan.
    2) Berusia 6-8 minggu.
    3) Berat badan 175-200 gram.
    4) Tikus aktif dan tidak ada kelainan anatomi.
    5) Tikus dengan kondisi diabetes melitus setelah diinduksi aloksan 120mg/kgBB secara intraperitoneal selama 3 hari dan ditandai dengan kadar glukosa darah 2 jam post prandial $\geq$ 200 mg/dl.
b. Kriteria eksklusi (Mustikasari et al., 2019) :
    1) Tikus sakit
    2) Tikus yang mati pada saat penelitian.

Alur Penelitian



Gambar 8. Alur Penelitian

F. Jenis dan Cara Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini yaitu data primer yang diperoleh langsung pada saat penelitian, seperti kadar gula darah awal dan kadar SOD tikus *wistar*.

2. Cara Pengumpulan Data

a. Tahapan sebelum penelitian

1) Mencari jurnal yang berkaitan dengan topik serta variabel yang dibahas.
2) Menentukan lokasi penelitian.

b. Tahapan persiapan hewan uji

1) Pemeliharaan pada tikus sebelum diinduksi aloksan melalui injeksi intraperioneal secara intraperitoneal dengan dosis 120mg/kgBB.
2) Tikus diadaptasikan di kandang selama 7 hari dengan diberi pakan *Comfeed* standar dan air minum.

c. Tahapan dalam penelitian

1) Pembuatan tikus diabetes melitus

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



Gambar 9. Induksi ALOKSAN

(H. Setiawan et al., 2021)

- Tunggu reaksi induksi ALOKSAN selama 4-7 hari, kemudian lakukan pengecekan kadar gula darah untuk mengetahui kondisi hiperglikemia pada tikus.

- Tikus yang mengalami hiperglikemia memiliki kadar gula darah ≥ 200 mg/dl atau kadar gula darah 2JPP setelah induksi aloksan >140 mg/dl. Ketika kadar gula darah tidak mencapai 200 mg/dl setelah induksi ALOKSAN selama 4-7 hari, maka dapat dilakukan penambahan dosis, penginduksian ulang, maupun penambahan durasi rekasi induksi..

2) Pembuatan minuman Mar'ke Bilar

- Siapkan tikus yang sudah dalam kondisi DM
- Membuat formulasi Mar'ke Bilar dalam 3 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).
- Alat yang digunakan dalam pembuatan formulasi Mar'ke Bilar yaitu:
  1. Blender, untuk menghaluskan bahan.
  2. Pisau, untuk memotong bahan.
  3. Talenan, alas saat memotong bahan.
  4. Baskom, wadah bahan dan wadah mencampur bahan.
  5. Saringan, memisahkan sari bahan dari ampas.
  6. Panci, wadah untuk memanaskan.
  7. Kompor dan gas, alat untuk memanaskan.
  8. Timbangan, untuk menimbang berat bahan.
  9. Botol kemasan, untuk mengemas hasil produk agar terlindungi.
  10. Sendok dan centong sayur, untuk membantu proses penyaringan dan mencampur bahan.

- Bahan yang digunakan dalam pembuatan Mar'ke Bilar adalah ubi jalar ungu dengan berat kotor 600gr, kesemek 600gr, markisa ungu 600gr, serta air mineral sebanyak 210 ml.
- Siapkan alat dan bahan terlebih dahulu untuk membuat minuman sari Mar'ke Bilar sebagai treatment pada kelompok perlakuan dengan 3 formulasi.
- Alat yang digunakan antara lain blender, pisau, talenan, baskom, saringan, panci, kompor gas, timbangan makanan, botol kemasan, dan sendok makan.
- Bahan yang digunakan adalah 600gr ubi jalar ungu, 600gr kesemek, 600gr markisa ungu, dan 210ml air.
- Timbang ubi jalar ungu 600 gr, kesemek 600 gr, dan markisa ungu 600 gr.
- Kemudian kukus seluruh bahan lalu kupas hingga didapatkan berat bersih ubi jalar ungu 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 330 ml, kesemek 330 ml, dan markisa ungu 180 ml.
- Setelah itu minuman Mar'ke bilar dibuat dengan mencampurkan ke-3 bahan menjadi 3 formulasi.
- Fomulasi 1 dengan ubi jalar ungu 40 ml dan kesemek 40ml, formulasi 2 ubi jalar ungu 50 ml dan kesemek 50 ml, serta formulasi 3 ubi jalar ungu 60ml dan kesemek 60 ml.
- Campuran sari ubi jalar ungu dan sari kesemek dipanaskan dengan penambahan air 90 ml. 70 ml, dan 50 ml.
- Dinginkan hingga agak sejuk sekitar 36℃ (diukur dengan *thermometer*).
- Campurkan dengan sari markisa masing-masing 30 ml pada setiap formulasi.

- Setelah seluruh bahan tercampur, masing-masing formulasi didapatkan hasil sebanyak 200 ml minuman Mar'ke Bilar.
- Kemas dalam botol berukuran 200 ml.

3) Pemberian Minuman Mar'ke Bilar

- Minuman Mar'ke Bilar diberikan pada tikus kelompok perlakuan 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 sebanyak 1 kali sehari.
- Lakukan pemberian treatment selama 14 hari.



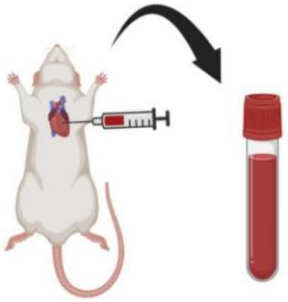
Gambar 10. Pemberian Minuman Mar'ke Bilar

(H. Setiawan et al., 2021)

4) Pengambilan dan Pengemasan Sampel Darah

- Pengambilan sampel darah sebanyak 5 cc dilakukan pada hari ke-15 dilakukan oleh tenaga medis analis kesehatan.
- Sampel darah diambil secara intracardiac (bagian kantung)
- 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 posisi 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 a diperlukan. Koleksi darah sampai tidak ada darah lagi yang dapat di aspirasi. Kematian tikus terjadi akibat eksanguniasi.
- Pastikan apakah jantung benar-benar telah berhenti dan apabila masih bernafas eutanasi dengan barbiturat 100 mg/ ml intracardial. Tunggu sampai 15 menit dan pasti kan tikus benar-benar sudah mati.



Gambar 11. Pengambilan Sampel Darah

- Darah dikoleksi ke dalam tabung eppendorf (dengan lapisan EDTA dan tidak dilapisi EDTA) dan siap digunakan untuk keperluan penelitian.
- Kemas sampel darah ke dalam tabung kuvet kemudian diberi label, dan dimasukkan kedalam lemari pendingin atau portabel box degan ice pack.

5) Pemeriksaan kadar SOD

- Sampel darah dikirim ke Laboratorium Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB), kota Malang. untuk diperiksa kadar SOD dengan menggunakan SOD *Sandwich*-ELISA kit (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

Prosedur metode ELISA:

- ELISA dimulai dengan proses *coating*, antigen atau antibodi diimobilisasi dalam 96-well polystyrene plate. Lalu dilanjutkan dengan proses *blocking*, dimana bagian yang tidak ada antibodi/antigen ditutupi dengan *reangent blocking*.

- Plate diinkubasi dengan antibodi yang terkonjugasi dengan enzim. Kemudian plate dicuci untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan.
- Substrat ditambahkan ke dalam plate yang akan menghasilkan perubahan warna, lalu dibaca menggunakan *microplate reader*.
- Label enzim yang paling banyak digunakan dalam ELISA adalah *horseradish peroxidase* (HRP) and *alkaline phosphatase* (AP). Enzim lain yang digunakan juga diantaranya : *β-galactosidase, acetylcholinesterase, and catalase.*
- Substrat kolorimetrik yang dipakai untuk horseradish peroxidase adalah TMB, OPD dan ABTS, sedangkan untuk alkaline phosphatase adalah PNPP.
- Pemilihan substrat tergantung pada sensitivitas pengujian yang diperlukan dan instrument yang tersedia untuk deteksi sinyal diantaranya *spectrophotometer, fluorometer atau luminometer.*

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Keseluruhan data diolah dengan tahapan-tahapan proses yang terdiri dari editing, coding, data entry, dan diolah menggunakan aplikasi SPSS versi 22.

a. Editing, memeriksa kelengkapan dan kebenaran data yang telah dikumpulkan.
b. Coding, memberikan kode pada setiap variabel untuk memudahkan proses pengolahan data
c. *Data Entry*, memasukkan data ke dalam aplikasi SPSS versi 22.

2. Analisis Data

a. 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.

b. Analisis Data

Data KGD 2JPP dan data asupan pakan tikus dianalisis mengunakan uji T-Independent untuk mengetahui apakah terdapat atau 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 peningkatan kadar SOD.

Analisis bivariat dilakukan menggunakan metode *one-way* ANOVA, untuk mengidentifikasi perbedaan rata-rata kadar SOD antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang menerima intervensi berupa minuman Mar'ke Bilar dengan 3 jenis formulasi. Hasil uji menunjukkan $p<0,05$ maka, terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Hasil uji *one-way* ANOVA menunjukkan hasil bermakna, kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc tukey* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan paling signifikan. Hasil uji *post-hoc tukey* menunjukkan $p<0,05$ maka, ada perbedaan signifikan anatara setiap kelompok tersebut.