BAB III
METODE PENELITIAN

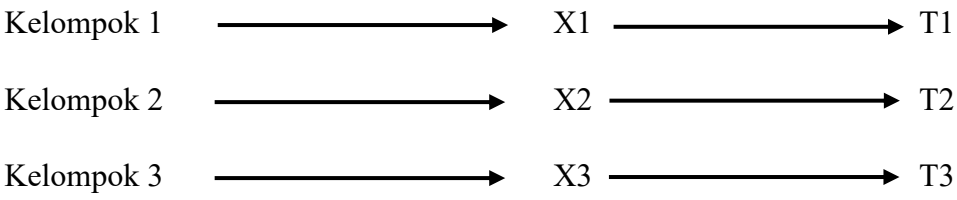
A. Lokasi dan Waktu Penelitian.

Penelitian ini dilaksanakan pada 1 Juni sampai dengan 31 Juli tahun 2025, Mulai dari pembuatan Marke'Bilar, pengiriman Mar'ke Bilar, pemeliharaan tikus, induksi aloksan, pemberian Mar'ke Bilar, pengambilan sampel darah dan pemeriksaan kadar MDA. 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 MDA akan dilakukan dengan melakukan pengemasan sampel darah yanng kemudian dikemas di dalam tabung kuvet lalu dibekukan dan dikirim ke Laboratorium Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran Univeritas Brawijaya, Malang.

B. Jenis dan Desain Penlitian.

Penelitian ini berjenis *true experimental* dan desain *only post control group*. Dengan rancangan ini, memungkinkan peneliti mengetahui hasil akhir dari kelompok sesudah diberikan minuman sehat mar'ke bilar.

Model rancangan *post test only control group design*, yaitu digambarkan sebagai berikut :



(Sugioyo, 2018)

Keterangan :

X1 : Pemberian minuman sehat "Mar'ke bilar" formulasi 1 dengan komposisi (40 ml ubi ungu, 40 ml kesemek, 30 ml markisa ungu, dan 90ml air) pada tikus selama 14 hari.

X2 : Pemberian minuman sehat "Mar'ke bilar" formulasi 2 dengan komposisi (50 ml ubi ungu, 50ml kesemek, 30ml markisa ungu, dan 70ml air) pada tikus selama 14 hari.

X3 : Pemberian minuman sehat "Mar'ke bilar" formulasi 3 dengan komposisi (60ml ubi ungu, 60ml kesemek, 30ml markisa ungu, dan 50ml air) selama 14 hari.

T1 : Kadar Malondialdehid (MDA) pada tikus Wistar jantan setelah pemberian minuman sari Mar'ke Bilar formulasi 1 selama 14 hari.

T2 : Kadar Malondialdehid (MDA) pada tikus Wistar jantan setelah pemberian minuman sari Mar'ke Bilar formulasi 2 selama 14 hari.

T3 : Kadar Malondialdehid (MDA) pada tikus Wistar jantan setelah pemberian minuman sari Mar'ke Bilar formulasi 3 selama 14 hari.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Penelitian ini dilakukan pada tikus wistar jantan yang telah diinduksi dengan aloksan. Perlakuan pada penelitian ini dilakukan pengulangan yang dapat dihitung dengan rumus:

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

Keterangan :

P : Jumlah perlakuan

n : Jumlah pengulangan untuk tiap sampel.

$P (n-1) \geq 16$

$4 (n-1) \geq 16$

$4n-4 \geq 16$

$4n \geq 16 + 4$

$4n \geq 20$

$n \geq 5$

Berdasarkan hasil yang didapat setiap sampel dianalisis minimal 5 kali, sehingga jumlah pengulangan pada setiap kelompok adalah 5. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus tikus wistar jantan dan juga disediakan tikus cadangan sebanyak 4 ekor berasarkan setiap kelompok yang mati atau gagal dalam penelitian. Dari penjabaran tersebut didapati jumlah sampel yang dibutuhkan sebanyak 24 ekor tikus wistar jantan diabetes melitus.

2. Sampel

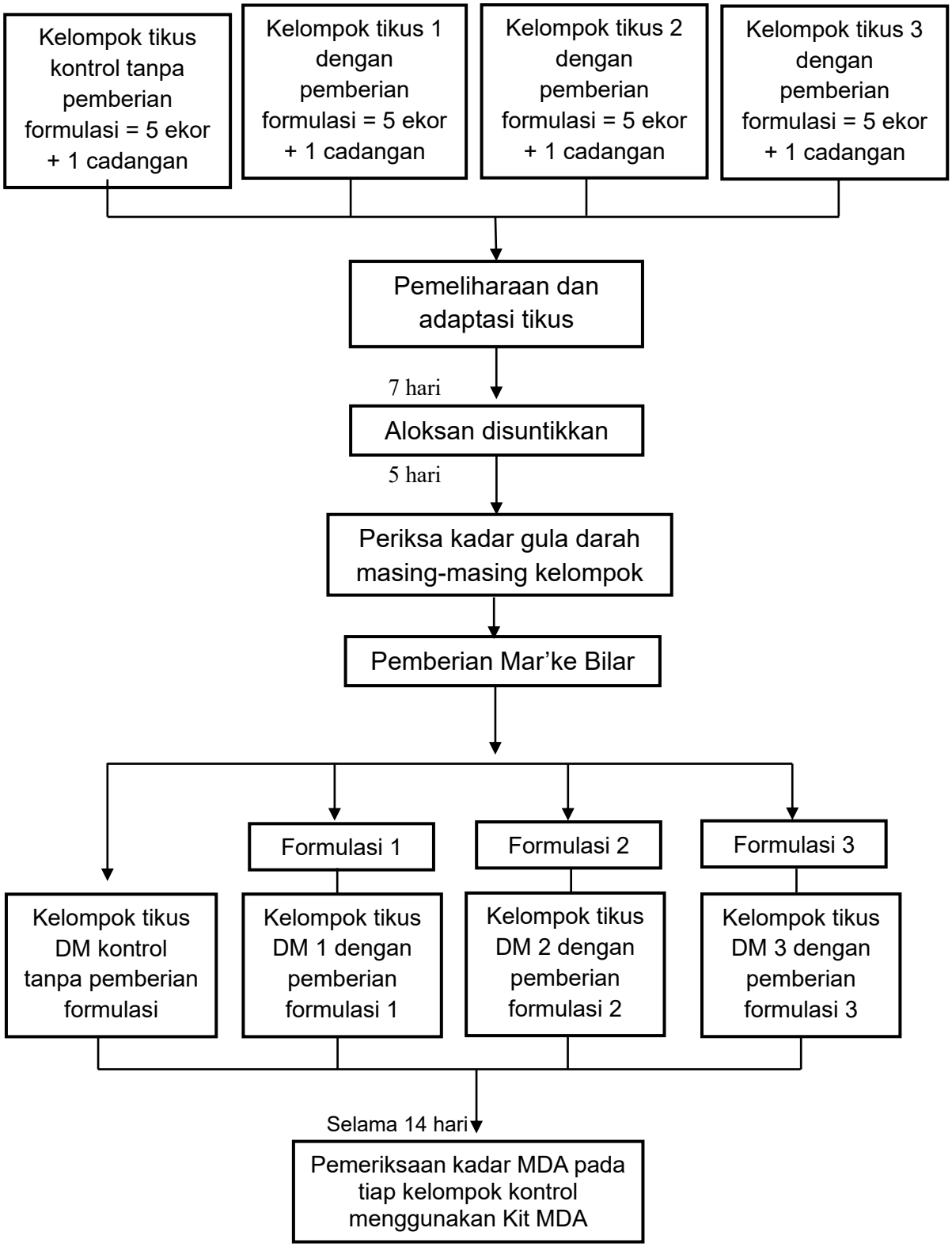
Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan metode nonprobabilitas dengan purposive sampling, di mana sampel tidak dipilih secara acak, melainkan ditentukan berdasarkan karakteristik tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti. Sampel ditetepkan dengan kriteria inklusi :

- Tikus wistar Jantan berkelamin Jantan
- Tidak ada kelainan anatomi
- Usia 2-3 bulan (6-8 minggu)
- Memiliki berat badan 175-200 gram
- Tikus dengan diderita kondisi diabetes melitus setelah diinduksi aloksan 120 mg/kgBB (Mustika et al ., 2019)

2. Kriteria ekslusi :

- Tikus mati selama aklimatisasi 7 hari dan terdapat kelainan anatomis
- Tikus sakit
- Berat badan kurang

D. Alur Penelitian



E. 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 tikus dan kadar MDA.

2.Cara pengumpulan Data

A. Tahapan sebelum penelitian

- Mencari dan mengumpulkan literatur jurnal atau literatur pendukung tentang diabetes melitus, tikus wistar jantan dan bahan pangan lokal fungsional khususnya markisa, kesemek, ubi jalar ungu
- Menentukan lokas penelitian.

B. **Persapan Hewan Uji**

- Pemeliharaan pada tikus sebelum diinduksi aloksan melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 120mg/kgBB
- Adaptasi Sampel Selama masa pemeliharaan dan adaptasi, tikus Wistar jantan menunjukkan kondisi yang baik dan sehat. Hal ini terlihat dari aktivitas tikus yang normal, seperti bergerak aktif, makan dan minum dengan baik, serta tidak menunjukkan tanda-tanda sakit atau stres. Selain itu, kondisi fisik tikus juga tampak baik, ditandai dengan bulu yang bersih, tidak kusam, mata jernih, dan tidak terdapat luka atau kelainan pada tubuh. Selama pemeliharaan, berat badan tikus juga mengalami peningkatan secara bertahap sesuai dengan pertumbuhan normal.

C. Pelaksanaan Peneltian

a) Proses Induksi Tikus Wistar Jantan

1.Tikus wistar jantan diinduksi dengan aloksan melalui injeksi intraperitoneal secara ntrapertonal dengan dosis 120 mg/kgBB.

2. Aloksan disuntikkan pada daerah abdomen di antara kartilago xiphoidea (tulang rawan dada) dan simphis pubis (bagian depan panggul)

3.Tunggu 48-72 jam, cek KGD awal > 200 mg/kgd. Jika tidak sampai dilakukan penambahan dosis atau pemginduksian ulang. Pemeriksaan kadar gula darah awal untuk mengetahui tikus sudah mengalami hiperglikemia

b) Pembuatan Minuman Mar'ke Bilar

- Siapkan tikus yang sudah dalam kondisi DM
- 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 telebih dahulu untuk membuat minuman Mar'ke Bilar sebagai *treatment* pada kelompok perlakuan dengan tiga formulasi :
- Alat yang digunakan :
  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 600 gr, kesemek 600 gr, markisa ungu 600 gr, 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, 600 gr 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.



c) Pemberian Mar'ke Bilar

- Minuman Mar'ke Bilar diberikan pada tikus kelompok perlakuan dengan pemberian formulasi sebanyak 4 ml dengan spuit yang sudah dilepas jarumnya dengan tetap diberi pakan standart dan air minum setiap hari.
- Pemberian minuman Mar'ke Bilar dilakukan secara oral sebanyak 1 kali sehari dengan tetap diberi pakan standart dan air minum setiap hari selama 14 hari



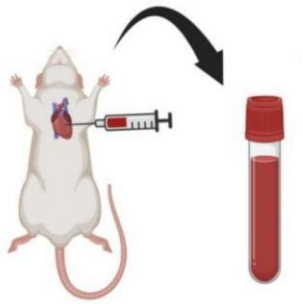
Gambar 6. Pemberian Minuman Pada Tikus
(H.Setiawan et al., 2021)

d) Pengambilan dan Pengemasan Sampel Darah

- Pengambilan sampel darah sebanyak 5 cc dilakukan pada hari ke-16 oleh petugas laboratorium yang telah ditunjuk oleh Kepala Laboratorium In Vivo FK Universitas Brawijaya.
- Pengambilan darah dilakukan melalui metode intra cardiac
  Sebelum prosedur, tikus terlebih dahulu diberikan anestesi menggunakan xylazin dengan dosis 7–10 mg/kg berat badan, dilanjutkan dengan ketamin dosis 40–50 mg/kg berat badan secara intramuskular.
- Setelah teranestesi, tikus diposisikan terlentang.
- Area dada dibersihkan menggunakan alkohol 70%, kemudian jarum disuntikkan pada bagian dasar sternum (di bawah xiphoid) dengan sudut kemiringan sekitar 30–45° ke arah sisi kiri.
- Darah ditarik secara perlahan menggunakan jarum suntiik hingga mencapai volume yang dibutuhkan, dan tabung diganti apabila diperlukan. Pengambilan darah

dilakukan sampai tidak ada darah lagi yang dapat diaspirasi. Kematian tikus terjadi akibat proses eksanguinasi.

- Selanjutnya dilakukan pemeriksaan untuk memastikan jantung telah berhenti berdetak. Apabila tikus masih masih bernafas, dilakukan eutanasi menggunakan barbiturat dosis 100 mg/ml secara intrakardial. Proses ini diikuti dengan waktu unggu selama 15 menit untuk memastikan tikus benar-benar telah mati



Gambar 7. 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.

e). Pemeriksaan Kadar MDA

- Sampel darah dikirim ke Laboratorium Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB), kota Malang. untuk diperiksa kadar MDA dengan menggunakan MDA *Sandwich*-ELISA kit (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).
- Prosedur ELISA dimulai dengan tahap coating, di mana antigen atau antibodi diimobilisasi pada permukaan sumuran dalam 96-well polystyrene plate. Setelah itu, dilakukan proses blocking untuk menutupi area yang tidak ada antibody/antigen ditutupi dengan reangent blocking.
- Plate kemudian diinkubasi dengan antibodi yang telah dikonjugasikan dengan enzim. Setelah inkubasi selesai, plate dicuci untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan dengan antigen

- Selanjutnya, substrat ditambahkan ke dalam plate. Reaksi antara enzim dan substrat menghasilkan perubahan warna yang dapat diukur
- Label enzim yang umum digunakan dalam ELISA adalah horseradish peroxidase (HRP) dan alkaline phosphatase (AP). Selain itu, enzim lain seperti β-galactosidase, acetylcholinesterase, dan catalase juga dapat digunakan
- 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 (spectrophotometer, fluorometer atau luminometer)

f). Pengolahan dan Analisis Data

1. **Pengolahan Data**

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

2. **Analisis Univariat**

   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 MDA

3. 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 MDA

Analisis bivariat dilakukan menggunakan metode one-way ANOVA, untuk mengidentifikasi perbedaan rata-rata kadar MDA 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.