BAB III
METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini bersifat *true experimental* dalam bentuk *the post test-only control group design*. Setelah sampel dipilih secara inklusi, lalu dilakukan pemberian minuman Mar'ke Bilar. Model rancangan t*he post test-only control group design* dengan tabel sebagai berikut.

Tabel 7. Model Rancangan T*he Post Test-Only Control Group Design*

Grup	Perlakuan	*Posttest*
Kontrol	-	O_1
Kelompok 1	X_1	O_2
Kelompok 2	X_2	O_3
Kelompok 3	X_3	O_4

(Sugioyo, 2018)

Keterangan:

X_1 = Pemberian minuman Mar'ke Bilar Formulasi 1 (sari ubi jalar ungu 40 ml + sari kesemek 40 ml + sari markisa ungu 30 ml + 90 ml air) selama 15 hari dengan dosis 4ml pada setiap tikus

X_2 = Pemberian minuman Mar'ke Bilar Formulasi 2 (sari ubi jalar ungu 50 ml + sari kesemek 50 ml + sari markisa ungu 30 ml + 70 ml airl) selama 15 hari dengan dosis 4ml pada setiap tikus

X_3 = Pemberian minuman Mar'ke Bilar Formulasi 3 (sari ubi jalar ungu 60 ml + sari kesemek 60 ml + sari markisa ungu 30 ml + 50 ml air) selama 15 hari dengan dosis 4ml pada setiap tikus

O_1 = Kadar HbA1c pada tikus wistar jantan diabetes mellitus tanpa pemberian minuman Mar'ke Bilar

O_2 = Kadar HbA1c pada tikus wistar jantan diabetes mellitus dengan pemberian minuman Mar'ke Bilar Formulasi 1 selama 15 hari pada setiap tikus

O_3 = Kadar HbA1c pada tikus wistar jantan diabetes mellitus dengan pemberian minuman Mar'ke Bilar Formulasi 2 selama 15 hari pada setiap tikus

O_4 = Kadar HbA1c pada tikus wistar jantan diabetes mellitus dengan pemberian minuman Mar'ke Bilar Formulasi 3 selama 15 hari pada setiap tikus

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian adalah tempat atau objek untuk diadakan suatu penelitian. Pembuatan minuman Mar'ke Bilar dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan Jurusan Gizi Poltekkes Kemenkes Medan. Lokasi pemeliharaan tikus wistar jantan diabetes mellitus ini adalah di Fakultas Kedokteran bagian In Vivo Universitas Brawijaya Malang (UniBraw). Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah (KGD) tikus setelah diinduksi aloksan dan pemeriksaan variabel terikat yaitu kadar HbA1c dilakukan di Laboratorium Fisiologi Molekuler UniBraw dan bekerjasama dengan Laboratorium Okta Santika Malang, Jawa Timur sebagai penyedia KIT. Penelitian ini dilakukan pada bulan 1 Juni – 31 Juli 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah 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.

Penelitian ini dilakukan dengan 4 perlakuan, maka pengulangan dapat dihitung yaitu:

$P (n - 1) \geq 16$

$4 (n - 1) \geq 16$

$4n - 4 \geq 16$

$4n \geq 16 + 4$

$4n \geq 20$

$n \geq 5$

Jadi, jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan atau besar sampel paling sedikit adalah lima.

Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dan cadangan sebanyak 4 ekor tikus. Sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 24 ekor tikus wistar jantan diabetes mellitus.

2. Sampel

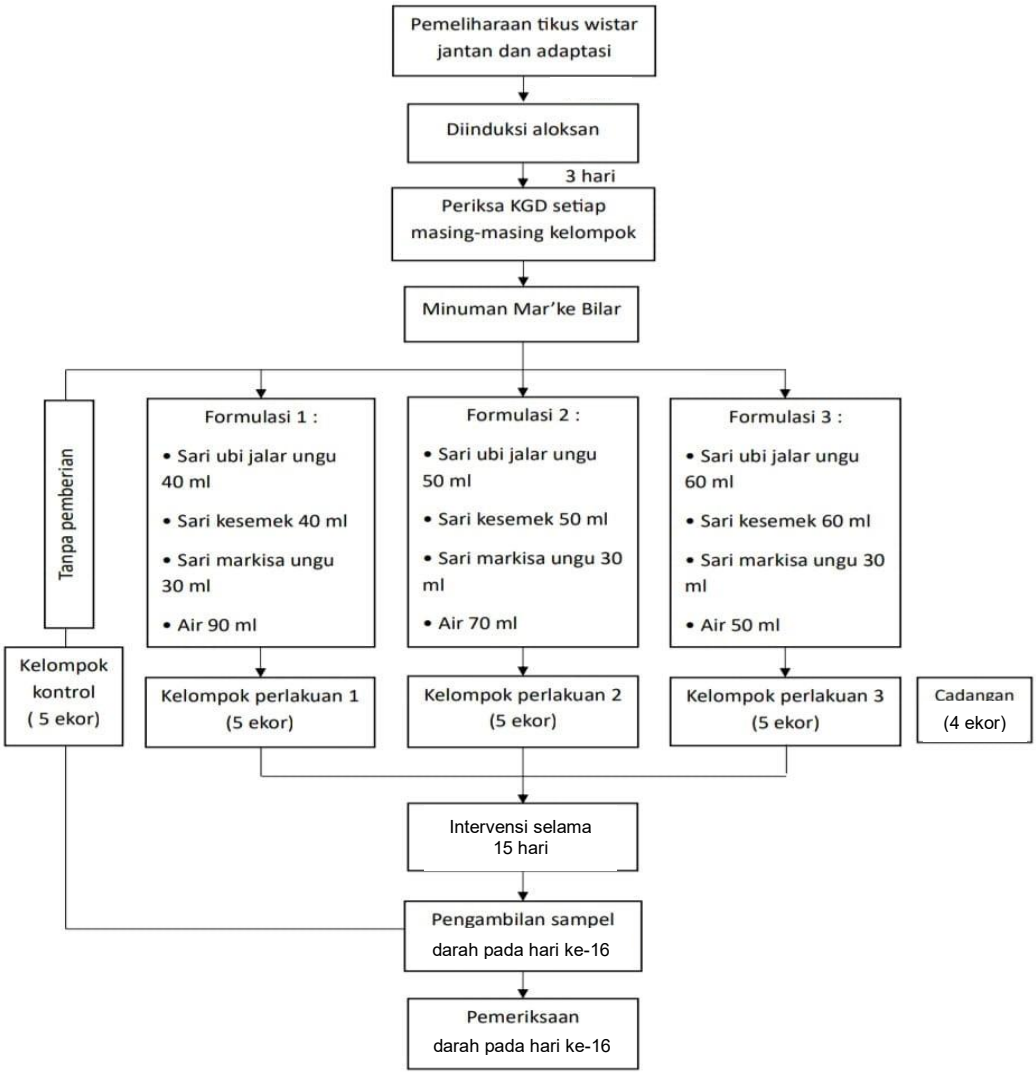
Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini yaitu secara nonprobabilitas dan purposive sampling yaitu sampel tidak dipilih secara acak dan ditetapkan berdasarkan karakteristik yang telah ditetapkan oleh peneliti. Sampel ditetapkan dengan kriteria inklusi:

a. Tikus wistar berjenis kelamin jantan
b. Sehat
c. Berusia 2-3 bulan
d. Memiliki berat badan 175-200 gram
e. Tikus dengan kondisi diabetes mellitus setelah diinduksi aloksan 120 mg/kgBB secara intraperitoneal selama 3 hari dan ditandai dengan kadar glukosa darah 2 jam *post prandial* > 140 mg/dl

Kriteria eksklusi:

a. Tikus sakit
b. Tikus yang mati saat penelitian berlangsung.

D. Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

E. Jenis dan Cara Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Pada penelitian ini jenis data yang dikumpulkan berupa data primer yang diperoleh dan dikumpulkan langsung dari objek penelitian, seperti pemeriksaan kadar glukosa darah awal tikus dan kadar HbA1c pada tikus wistar jantan setelah intervensi.

2. Cara Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan prosedur penelitian yang dilakukan dengan cara:

A. Persiapan penelitian

1) Mencari dan mengumpulkan jurnal atau literatur pendukung tentang diabetes mellitus, tikus wistar jantan dan bahan pangan khususnya markisa ungu, kesemek, dan ubi jalar ungu.
2) Menentukan lokasi penelitian, seperti laboratorium untuk pemeliharaan tikus dan pengujian kadar HbA1c.

a) Persiapan hewan coba

- Memilih sampel tikus berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan.
- Tikus di adaptasi pada lingkungan kandang percobaan selama 5 hari Fakultas Kedokteran bagian In Vivo Universitas Brawijaya Malang (UniBraw). Tikus diberi makan pakan dan minum standar dengan diet normal yaitu comfeed PAR-S dan tepung terigu cap Gunung Bromo dengan komposisi 2:1.

B. Pelaksanaan Penelitian

a) Proses Induksi Tikus Wistar Jantan

- Tikus wistar jantan diinduksi dengan aloksan dengan dosis 120 mg/kgBB secara intraperitoneal.
- Aloksan monohidrat ditimbang sebanyak 0,5 gr, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volume 10 ml.
- Lalu dilakukan pengecekan kadar glukosa darah setelah 72 jam diinduksi untuk mendapatkan kondisi hiperglikemik. Tikus dikatakan hiperglikemik jika kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl.

b) Pembuatan Minuman Mar'ke Bilar

Membuat formulasi minuman 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).

- Alat yang digunakan dalam pembuatan formulasi Mar'ke Bilar yaitu:
  1. Blender, digunakan untuk menghaluskan bahan.
  2. Pisau, digunakan untuk memotong bahan.
  3. Talenan, sebagai alas saat memotong bahan.
  4. Baskom, digunakan untuk menampung bahan selama persiapan.
  5. Saringan, digunakan untuk memisahkan sari dari ampas.
  6. Panci, sebagai wadah untuk pemanasan.
  7. Kompor gas, sebagai alat sumber panas untuk memasak.
  8. Timbangan makanan, digunakan untuk mengukur berat bahan-bahan makanan.
  9. Botol kemasan, sebagai tempat untuk mengemas, melindungi dan menyimpan produk.
  10. Sendok makan
- Bahan yang digunakan dalam pembuatan formulasi Mar'ke Bilar yaitu, ubi jalar ungu dengan berat kotor 600 gr, kesemek 600 gr, markisa ungu 600 gr dan air sebanyak 210 ml.
- Prosedur pembuatan minuman Mar'ke Bilar:
  1) Siapkan semua alat dan bahan terlebih dahulu, lalu timbang ubi jalar ungu dengan berat kotor 600 gr, kesemek 600 gr, markisa ungu 600 gr.
  2) Kukus ubi jalar ungu, lalu kupas kulitnya dan didapatkan berat bersih ubi jalar ungu 511 gr, kesemek 432 gr, dan markisa ungu 294 gr.
  3) Blender masing-masing bahan satu persatu. Pertama ubi jalar ungu dengan penambahan air 86 ml. Kedua kesemek dengan

penambahan air 112 ml dan ketiga markisa ungu dengan penambahan air 90 ml.

4) Hasil blender disaring dan diperoleh sari ubi jalar ungu sebanyak 330 ml, sari kesemek 330 ml dan sari markisa ungu 180 ml.
5) Campurkan ubi jalar ungu dan kesemek sesuai 3 perlakuan yang telah ditetapkan meliputi, ubi jalar ungu 40 ml dan kesemek 40 ml, ubi jalar ungu 50 ml dan kesemek 50 ml, ubi jalar ungu 60 ml dan kesemek 60 ml.
6) Panaskan campuran sari ubi jalar ungu dan kesemek dengan penambahan air 90 ml, 70 ml dan 50 ml. Lalu dinginkan sampai suhu 36˚C (ukur suhu menggunakan termometer).
7) Masukkan sari markisa ungu sebanyak 30 ml untuk setiap formulasi. Lalu dikemas kedalam botol berukuran 200 ml.



Gambar 8. Minuman Mar'ke Bilar

- Minuman Mar'ke Bilar yang telah dikemas dengan *sterofoam* dan dilengkapi dengan *ice pack* dikirim ke Laboratorium Fisiologi Molekuler UniBraw sebanyak 3 kali dengan menggunakan pengirimaan *Lion Parcel* yang dilakukan pada tanggal 16, 23 dan 28 Juni 2025.

c) Pemberian minuman Mar'ke Bilar

Pemberian sari Mar'ke Bilar dilakukan selama 15 hari berturut-turut secara langsung oleh peneliti yang dibantu oleh asisten laboratorium dan 6 orang enumerator yang merupakan anggota satu tim

penelitan yaitu mahasiswa semester 7 Jurusan Gizi Poltekkes Medan. Sari Mar'ke Bilar diberikan sekali sehari sebanyak 4 ml dengan menggunakan spuit 5 cc tanpa jarum dan tetap diberi pakan dan minum sesuai standar. Setiap hari peneliti atau enumerator mengontrol sampel untuk menghabiskan minuman Mar'ke Bilar.

d) Pengambilan dan Pemeriksaan Sampel Darah

1. Sampel darah diambil pada hari ke-16 sebanyak 5 cc yang dilakukan oleh tenaga medis analis kesehatan.
2. Darah diambil melalui jalur intra cardiac untuk dipisahkan antara plasma dan serum
3. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung pengumpul darah vakum atau tabung *vacutainer* dan diberi label.
4. Sampel darah diperiksa kadar HbA1c-nya di Fakultas Kedokteran bagian In Vivo Universitas Brawijaya Malang (UniBraw) sebanyak 5 cc untuk masing-masing tikus pada setiap kelompok.
5. Hasil pemeriksaan darah dibaca dengan alat spektrofotometer.

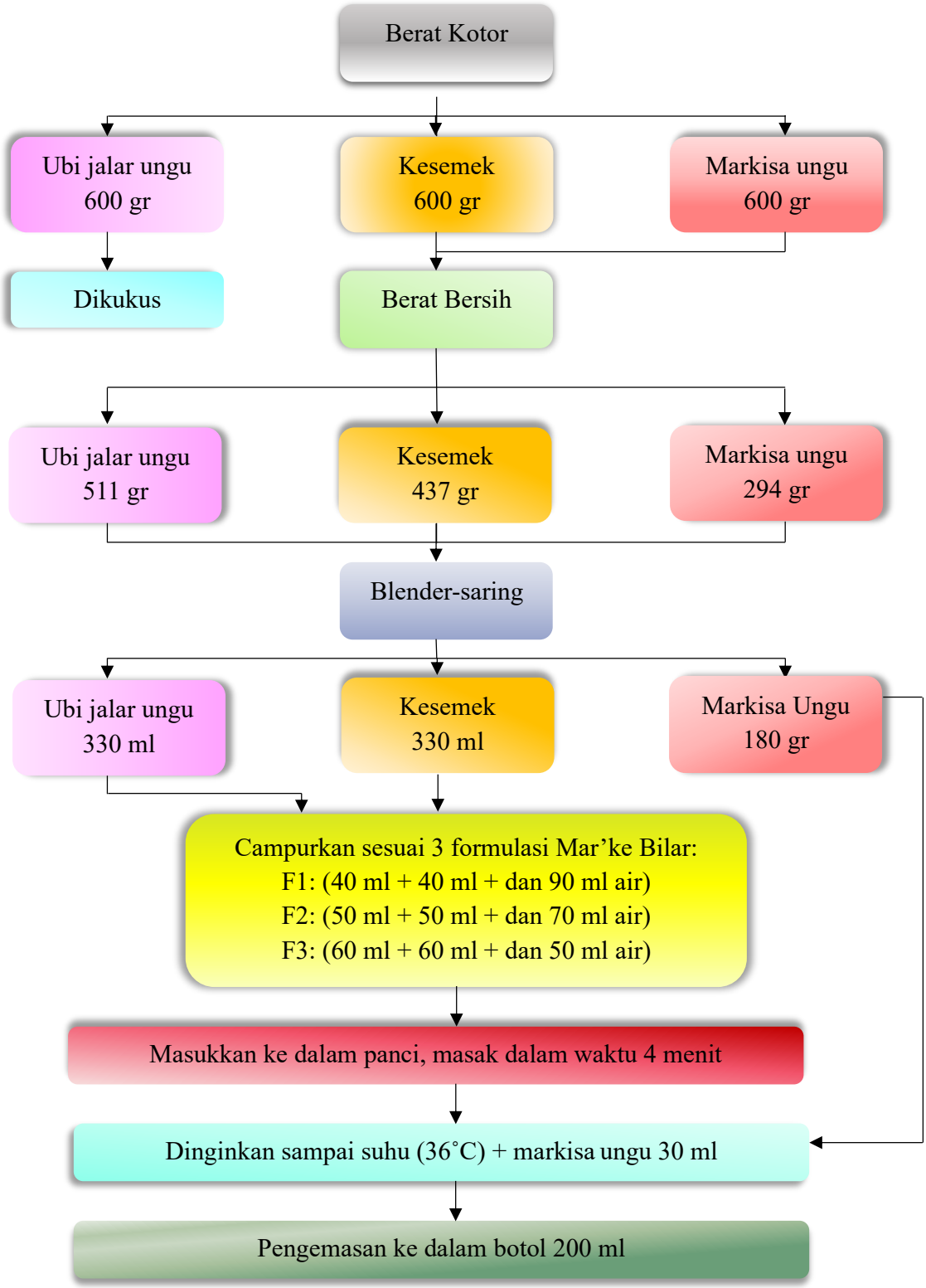
e) Pemeriksaan kadar HbA1c

Data kadar HbA1c diperoleh dengan melakukan pemeriksaan di Fakultas Kedokteran bagian In Vivo Universitas Brawijaya Malang (UniBraw) pada sampel darah yang dilakukan pada hari ke-16 setelah pemberian *treatment* berupa minuman Mar'ke Bilar. Pemeriksaan HbA1c dilakukan menggunakan kit reagen HbA1c dengan metode *enzyme linked immunoabsorbent assay* (ELISA).

Prosedur pemeriksaan kadar HbA1c dengan metode *enzyme linked immunoabsorbent assay* (ELISA) adalah sebagi berikut:

1) Siapkan sampel darah pada tabung *vacutainer* yang sudah diberi label.
2) Mikroplat ELISA dilapisi dengan antibodi monoklonal spesifik yang mengenali epitop N-terminal glikosilasi pada HbA1c.

3) Sampel serum/plasma dimasukkan ke sumur mikroplat dan diinkubasi (biasanya 2 jam pada suhu ruang) agar HbA1c terikat ke antibodi.
4) Mikroplat dicuci dengan buffer khusus untuk menghilangkan komponen yang tidak terikat.
5) Ditambahkan antibodi sekunder berlabel enzim (horseradish peroxidase/HRP) yang mengenali HbA1c.
6) Diinkubasi kembali (30-60 menit) untuk membentuk kompleks antigen-antibodi-enzim.
7) Proses pencucian diulang untuk membersihkan antibodi sekunder yang tidak terikat.
8) Ditambahkan substrat kromogenik seperti TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) yang akan bereaksi dengan enzim menghasilkan perubahan warna.
9) Intensitas warna diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Kadar HbA1c ditentukan melalui kurva kalibrasi.



Gambar 9. Alur Pembuatan Minuman Mar'ke Bilar

F. Analisis Data

1. Analisis Univariat

Analisis univariat dilakukan terhadap data hasil penelitian yaitu data asupan tikus, kadar glukosa darah tikus setelah diinduksi aloksan dan kadar HbA1c tikus dengan menampilkan mean (nilai rata-rata) dan standar deviasi.

2. Analisis Bivariat

Data asupan tikus dan kadar glukosa darah (KGD) tikus dianalisis menggunakan *Independent Samples T-Test* untuk melihat tidak ada perbedaan yang bermakna dengan $p > 0,05$. Uji ini dilakukan pada data tersebut untuk memastikan kesetaraan karakteristik dasar antar kelompok dan meminimalisir potensi bias pada sampel. Selanjutnya dilakukan analisis pada data kadar HbA1c dengan uji *One Way Anova* untuk mendapatkan informasi ada tidaknya perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan, bila $p < 0,05$ memiliki arti bahwa terdapat perbedaan bermakna antar kelompok, dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk melihat kelompok yang memiliki perbedaan bermakna.

G. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh keterangan layak etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Medan dengan Nomor No.01.26.1376/KEPK/POLTEKKES KEMENKES MEDAN 2025. Penelitian dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah, 3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Risiko, 5) Bujukan/Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan 7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar. Pernyataan Layak Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 02 Juli 2025 sampai dengan tanggal 02 Juli 2026.