

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah *True experimental laboratory* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design* (Nursalam, 2008). Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK). Pada desain penelitian ini menggunakan dua jenis kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol terdiri dari 2 kelompok yang pertama mencit dalam kondisi sehat, yang kedua mencit dalam kondisi hiperglikemia tanpa diberikan ekstrak daun seledri. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok dengan pemberian ekstrak daun seledri sebesar 200mg/kgBB, 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba mencit galur BALB/c jantan karena mempunyai persamaan filogenik dengan manusia dan mempunyai sifat respons biologis seperti manusia. Untuk menghindari faktor perancu yang dapat mempengaruhi proses penelitian, maka ditentukan kriteria inklusi untuk menghomogenkan sampel

Kriteria inklusi:

1. Mencit galur BALB/c
2. Jenis kelamin jantan
3. Umur 2-3 bulan

4. Berat badan 20-30 gram
5. Kondisi sehat, ditandai dengan pergerakan aktif, jinak, berbulu licin, mengkilat, dan bersih; rambut tebal dan tidak kusam; badan tegap; tidak ada luka

Cara Penghitungan Jumlah Sampel

Sampel diambil secara acak (*simple random sampling*) dengan menggunakan bilangan random yang selanjutnya dikelompokkan dalam masing-masing kelompok kontrol atau kelompok perlakuan. Besar sampel dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan prosedur baku dalam penetapan jumlah sampel yang menggunakan hewan coba (mencit) sebagai sampel percobaan. Selanjutnya untuk menentukan jumlah pengulangan digunakan rumus menurut Andayani (2003):

$$p(n-1) > 15$$

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini besar “p” adalah 5 (1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan), sehingga didapatkan nilai “n” sebagai berikut:

$$5(n-1) > 15$$

$$5n - 5 > 15$$

$$5n > 20$$

$$n > \frac{20}{5}$$

$$n > 4$$

Jadi jumlah sampel dalam penelitian ini minimal 4 ekor mencit pada setiap kelompok dan total sampel berjumlah 25 mencit BALB/c. Untuk mengantisipasi kemungkinan adanya *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena mencit mati, maka diberikan 1 mencit tambahan setiap kelompok. Jadi, pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit BALB/c.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.3.1 Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak daun seledri, pemeliharaan hewan coba dan pemberian terapi ekstrak daun seledri dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB. Pemeriksaan jaringan pankreas dilakukan di Laboratorium Histo Patologi FKUB.

4.3.2 Waktu

Penelitian membutuhkan waktu 67 hari. 7 hari digunakan untuk menjadikan hewan coba dalam kondisi hiperglikemia kronik dan 60 hari digunakan untuk memberikan terapi.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) dengan pemberian oral sebanyak 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB satu kali sehari (Niaz et al, 2013)

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah sel beta pancreas

4.5 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Independen: Ekstrak daun seledri (<i>Apium graveolens L</i>)	Ekstrak daun seledri (<i>Apium graveolens L</i>) dalam bentuk ekstrak kasar dibuat melalui prosedur ekstraksi dengan pelarut etanol 96% kemudian diberikan ke hewan coba. Prosedur ekstraksi seledri (dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dibagi menjadi 3 dosis pemberian yaitu 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB.	% dan gram	Rasio
Variabel Dependen: Jumlah sel beta pankreas	Hasil perhitungan sel beta pankreas yang dilakukan dengan pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE), diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan diambil 5 lapang pandang untuk dihitung jumlah sel beta pankreas. Pengamatan menggunakan mikroskop menunjukkan	Jumlah sel	Rasio

	sitoplasma sel beta berwarna biru gelap. Pada hasil penelitian sel beta ditunjukkan dengan warna ungu gelap, sedangkan sel alfa berwarna ungu pudar.		
--	--	--	--

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstraksi

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan ekstraksi antara lain botol hasil ekstrak, oven, *blender* untuk menghaluskan daun seledri, timbangan gelas erlenmeyer, labu evaporasi, *rotary evaporator*, labu penampung etanol, evaporator, *freezer*, selang *water pump*, *water pump*, *water bath* (Sulastri, 2009).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstraksi antara lain daun seledri, etanol 96%, dan aquades.

4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Pankreas

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan preparat histology jaringan pankreas meliputi talenan, pisau *scalpet*, pinset, saringan, *tissue casset*, mesin prosesor otomatis, mesin vakum, mesin bloking, *freezer* (-20⁰ C), mesin *microtome*, pisau *microtome*, *water bath* 46⁰ C, kaca

objek dan kaca penutup, rak khusus untuk pewarnaan, oven (Muntiha, 2001).

3. Bahan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histology jaringan pancreas meliputi jaringan pankreas yang telah difiksasi dengan *Buffer Neutral Formalin (BNF) 10%*, *buffer Neutral Formalin (BNF) 10%*, etanol absolute, *xylol*, *glycerin 99,5%*, larutan *Hematoxilin*, larutan eosin, parafin cair (Histoplat)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens L.*)

A. Proses Pengeringan

Daun seledri didapatkan dari UPT. Materia Medika. Daun yang diambil adalah daun yang berwarna hijau muda sampai tua. Daun seledri dicuci secara terpisah dengan air mengalir sampai bersih. Kemudian daun dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan di suhu ruangan agar zat-zat yang terkandung di daun seledri tidak rusak terkena sinar matahari. Setelah daun kering, dilakukan proses penghalusan menggunakan blender sehingga menjadi bentuk serbuk.

B. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi mengikuti standar ekstraksi di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Serbuk daun seledri ditimbang sebanyak 500 gram. Masukkan serbuk daun seledri 500 gram ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter. Rendam dengan etanol sampai volume

1000 ml. Campuran serbuk daun seledri dan etanol dikocok hingga tercampur dan diamkan selama 24 jam hingga menguap

C. Proses Evaporasi

Pengambilan lapisan atas campuran etanol yang mengandung zat aktif, kemudian masukkan dalam labu evaporasi 1 liter. Pasang labu evaporasi pada evaporato dan isi *water bath* dengan air sampai penuh. Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur suhu pada $70^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C}$), kemudian sambungkan dengan aliran listrik.

4.7.2 Pembuatan Dosis

4.7.2.1 Pembuatan Dosis Ekstrak Daun Seledri

Dosis anjuran ekstrak daun seledri adalah 200 mg/ kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB. Dosis ekstrak daun seledri pada kelompok I pada penelitian ini adalah 200 mg/kgBB. Kemudian dikonversi dengan dosis untuk mencit dengan berat badan 30 gr = $200 \text{ mg} \times \frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} = 6 \text{ mg}$, yang kemudian diberikan secara oral dengan pelarut *aquades* 0,5 cc

Dosis ekstrak daun seledri pada kelompok II pada penelitian ini adalah 400 mg/kgBB. Kemudian dikonversi dengan dosis untuk mencit dengan berat badan 30 gr = $400 \text{ mg} \times \frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} = 12 \text{ mg}$, yang kemudian diberikan secara oral dengan pelarut *aquades* 0,5 cc

Dosis ekstrak daun seledri pada kelompok III pada penelitian ini adalah 800 mg/kgBB. Kemudian dikonversi dengan dosis untuk mencit dengan berat

badan $30 \text{ gr} = 800 \text{ mg} \times 30 \text{ gr}/1000 \text{ gr} = 24 \text{ mg}$ yang kemudian diberikan secara oral dengan pelarut *aquades* 0,5 cc

4.7.3 Persiapan Hewan Coba

A. Sebelum Penelitian

1. Hewan coba diseleksi sesuai kriteria inklusi
2. Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan, alkohol 70%.
3. Hewan coba diadaptasikan di dalam laboratorium farmakologi selama 7 hari dan dibagi 5 kelompok.
4. Mencit diberi makan dan minum standart laboratorium dan dilakukan penimbangan berat badan di awal dan di akhir aklimatisasi untuk mengetahui adanya kenaikan atau penurunan berat badan.

B. Selama Penelitian

1. Prosedur induksi hiperglikemia

Setelah 7 hari aklimatisasi dengan lingkungan sekitar dan pemberian diet standar mencit, kemudian dilakukan induksi diabetes, mencit dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberi air minum. Hal ini dilakukan karena disesuaikan dengan protokol percobaan yang menyebutkan bahwa hewan uji yang dipuasakan selama 8-12 jam lebih rentan mengalami hiperglikemia dibandingkan hewan uji yang tidak dipuasakan. Sebelum dilakukan induksi, dilakukan pengukuran kadar

glukosa darah puasa terlebih dahulu untuk mengetahui kadar darah puasa sebelum diinduksi STZ (Srinivasan dan Ramarao, 2007; Mendes, 2012).

Streptozotocin (STZ) dilarutkan ke dalam 50 mM- *citric acid buffer* dan Nicotinamide dilarutkan ke dalam *normal saline* yang akan digunakan. Sebelum diinjeksikan STZ, mencit diinjeksi Nicotinamide 240 mg/kgBB secara intraperitoneal, 15 menit kemudian mencit diinjeksikan STZ 70 mg/kgBB intraperitoneal. Untuk injeksi STZ, tikus dipegang dengan satu tangan pada posisi dorsal, bagian yang diinjeksi kemudian diusap dengan povidone iodine. Injeksi STZ dilakukan masuk ke ruang abdomen bagian kaudal menggunakan spuit 3 cc dan *needle* 23-G. Tanda hiperglikemia akan terlihat pada mencit dalam 7 hari pasca induksi STZ melalui pengukuran gula darah yang dilakukan dengan pengambilan darah vena di ekor tikus menggunakan glukometer. Mencit dianggap mengalami hiperglikemia apabila kadar glukosa darah puasa lebih dari 150 mg/dL atau dengan kadar glukosa darah acak lebih dari 200 mg/dL (Frode dan Medeiros, 2008; Zangiabadi *et al*, 2011)

2. Prosedur Sonde Mencit

Dimulai dengan, sonde yang ujungnya terbuat dari karet mengambil ekstrak daun seledri sebanyak 200 mg/kg BB untuk kelompok I, 400 mg/kgBB untuk kelompok II, dan 800 mg/kgBB untuk kelompok III. Mulut mencit dihadapkan ke atas dengan cara memegang mencit pada kulit bagian kepala kemudian sonde dimasukkan melalui mulut dan ekstrak daun seledri diinjeksikan.

3. Pengukuran Glukosa Darah Mencit

Konsentrasi glukosa dalam darah diukur secara enzimatik dari 10 μ L volume darah yang diambil dari ekor mencit, dan menggunakan *Glucotide strips* dan *Glucometer* merk *Nesco*.

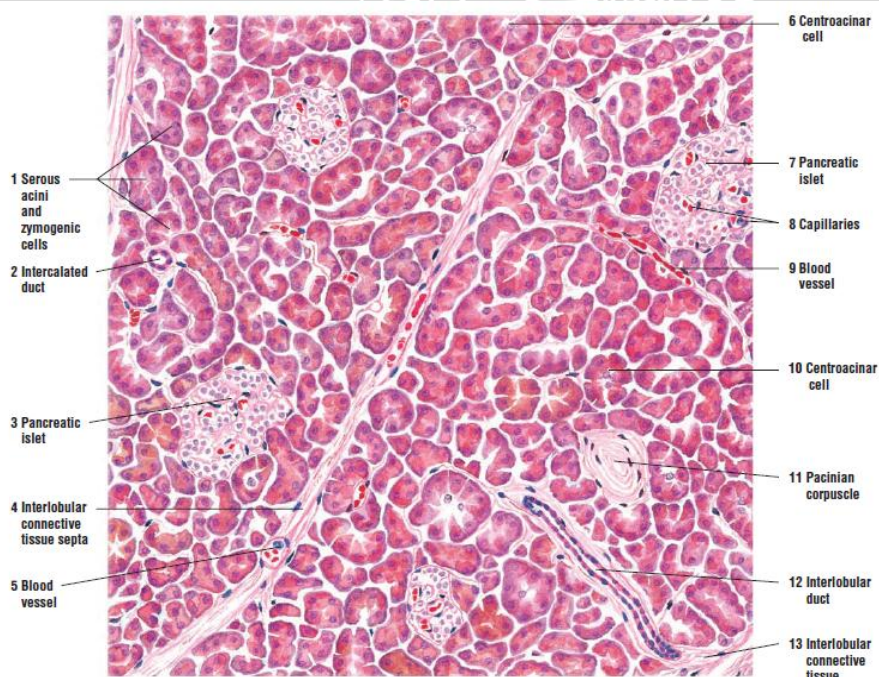
C. Sesudah Penelitian

1. Setelah dilakukan penelitian selama 2 bulan, maka dilakukan eutanasia pada mencit.
2. Mencit dieutanasia dengan pemberian klorofom berlebihan secara inhalasi dan dikubur. Tanda mencit percobaan sudah mati yaitu tidak adanya pergerakan nafas, denyut jantung (palpasi dada atau gunakan stetoskop), serta kehilangan reflek palpebral dan kornea (reflex kornea positif apabila bola mata disentuh dan reflex palpebral positif ketika kelopak mata diusap. Kematian ditandai dengan mata yang tetap terbuka dan kelopak mata tidak bergerak).
3. Pengambilan jaringan pancreas mencit
4. Setelah pengambilan spesimen, tubuh mencit dibersihkan dan dilakukan tindakan aseptik dengan pemberian alkohol 70% kemudian diautoklaf. Setelah itu dikubur dengan baik.
5. Pembuatan preparat histopatologi jaringan pancreas mencit
6. Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE) untuk melihat jumlah sel beta pancreas

4.7.4 Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Pankreas

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan pancreas mencit dalam formalin 10% selama sehari semalam (24 jam), kemudian

dilanjutkan dengan tahap pemotongan jaringan dengan ketebalan 4 mm. Potongan jaringan dimasukkan dalam kaset dan diberi label sesuai dengan label jaringan. Kemudian jaringan dalam kaset dimasukkan ke dalam larutan formalin 10 % yang kemudian dimasukkan ke dalam alat *Tissue Tex Processor* 90 menit. Selanjutnya, dilakukan pengeblokan dengan parafin. Setelah paraffin membeku, maka dipotong dengan microtome 3-5 mikron dan ditaruh dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80°C, kemudian dimasukkan ke dalam larutan xylol selama 2x 20 menit. Setelah diletakkan dalam xylol, sayatan dipindah ke dalam alkohol 4x3 menit, lalu dimasukkan dalam air mengalir selama 15 menit. Kemudian dilakukan proses pewarnaan *Hematoxylen Eosin* (HE) lalu dilanjutkan dengan *mounting* dengan entelan dan *deckglass*. Slide dibiarkan kering pada suhu ruangan lalu diamati pada mikroskop untuk melihat histologi pankreas



Gambar 4.7 Histologi Jaringan pancreas (Eroschenko,2010)

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisa Data

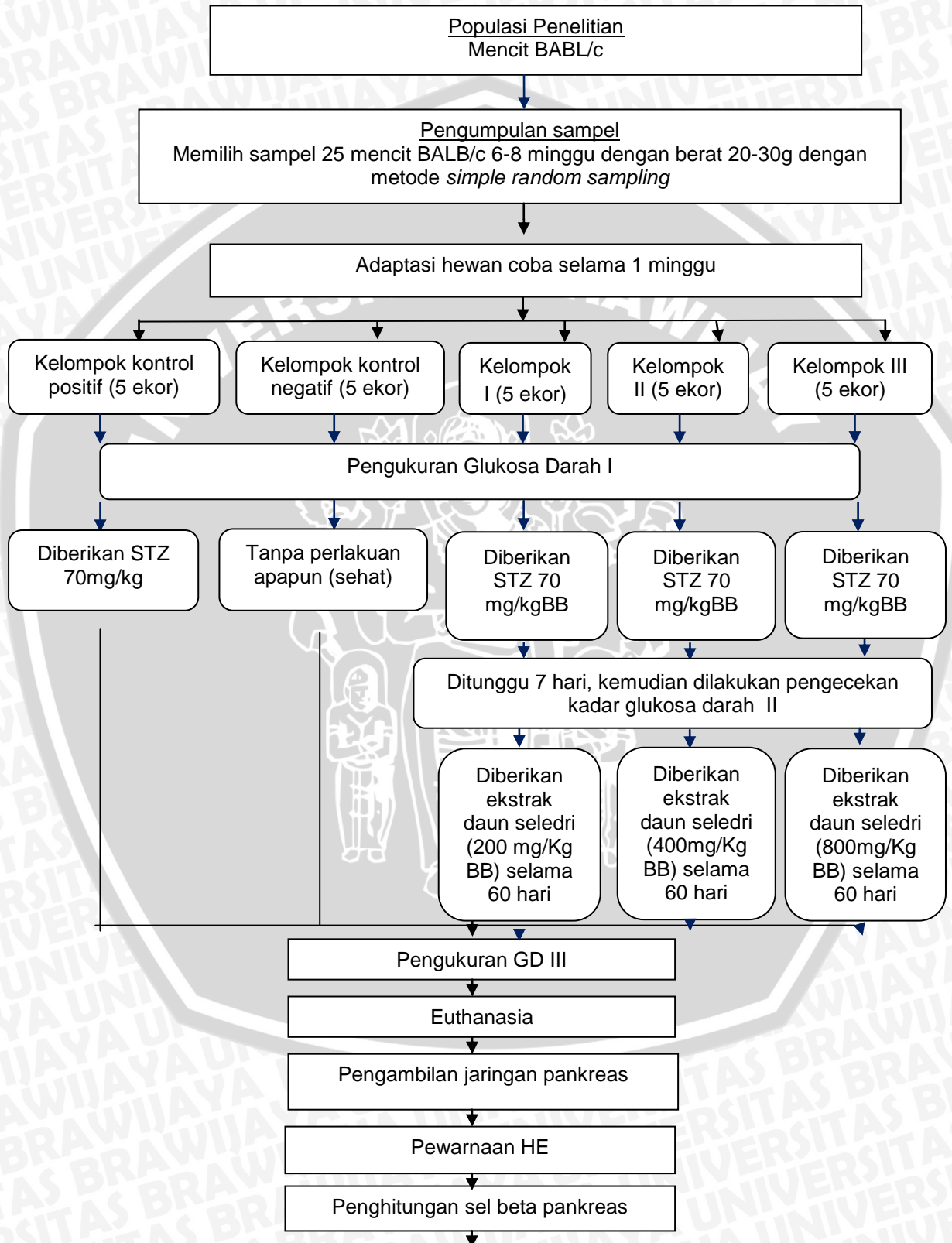
4.8.1 Teknik Pengumpulan Data

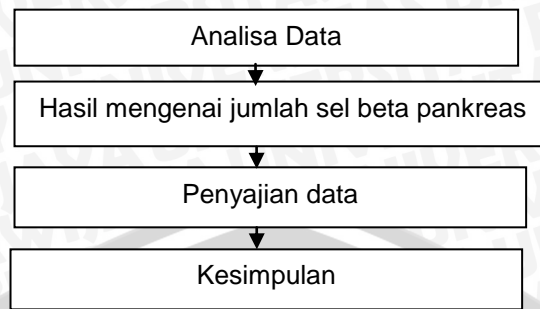
Data didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif dengan mencit dengan kondisi sehat dan kontrol positif dengan mencit model hiperglikemia. Data juga diperoleh dari 3 kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) dengan dosis berbeda. Sampel diberikan ekstrak daun seledri dari hari pertama dinyatakan hiperglikemia hingga 8 minggu berikutnya.

4.8.2 Metode Pengumpulan Data

Pada minggu ke-8, mencit dieuthanasia dan jaringan pancreas yang sudah diambil difiksasi dalam larutan buffer formalin 10% untuk dilakukan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE) untuk penilaian mikroskopis dan dianalisa menggunakan *software Olyvia (viewer for histological examination)*. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah sel beta pankreas dibandingkan antara kelompok kontrol dan perlakuan, serta antar kelompok perlakuan.

4.8.3 Alur Penelitian





Gambar 4.8 Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

4.9.1 Tahap Pre Analisa Data

Data hasil penelitian yang diperoleh, tidak bisa langsung diolah melainkan harus melewati dahulu tahap persiapan sebelum dilakukan analisis. Pada tahap ini, ada tiga langkah yang harus dipenuhi yaitu editing dan koding. Tahap editing, data yang telah dikumpulkan dipilah dan dipilih data-data penting yang nantinya perlu untuk dilakukan analisis. Selain itu data juga dibersihkan dari kemungkinan adanya kesalahan peneliti sebagai pengumpul data (*human error*). Tahap koding (pemberian kode), data yang telah dipilah dan dipilih diberi kode berupa angka-angka (misal angka 1, 2, 3) dan selanjutnya dilakukan tahap tabulasi dengan tujuan untuk mempermudah proses analisa data yang dilakukan.

4.9.2 Analisa Data

Analisa data yang digunakan adalah *parametric test* yaitu *one way analysis of variant* (ANOVA) dengan menggunakan selang kepercayaan 95 % untuk meneliti efek ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) terhadap jumlah sel beta pancreas pada tiap-tiap kelompok dan diolah dengan menggunakan program *SPSS 20.0 for Windows*.

Sebelum melakukan analisa data dengan menggunakan *one way* ANOVA, maka diperlukan pemenuhan atas beberapa asumsi data, yaitu data harus mempunyai sebaran (distribusi) normal dan ragam yang homogen. Distribusi normal merupakan distribusi teoritis dari variable random yang kontinyu. Kurva yang menggambarkan distribusi normal adalah kurva yang berbentuk simetris. Untuk menguji apakah sampel penelitian merupakan jenis distribusi normal digunakan pengujian *Shapiro Wilk* terhadap masing-masing variabel.

Kriteria pengujian untuk mengetahui suatu sebaran (distribusi) normal atau tidak yaitu:

- Angka signifikansi p (*value*) $> 0,05$ maka data berdistribusi normal
- Angka signifikansi p (*value*) $< 0,05$ maka data tidak berdistribusi normal

Setelah didapatkan distribusi normal, kemudian dilakukan pengujian homogenitas, *one way* ANOVA, dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test (LSD)* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikansi pada masing-masing kelompok (Dahlan, 2004).

4.10 Etika Penelitian

Hewan coba pada penelitian ini diaklimatisasi selama 7 hari dengan tidak dilakukan pengekangan dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kandang yang berbentuk balok terbuat dari plastik, terbuka pada bagian atas, ditutup dengan kotak dengan pinggiran terbuat dari kayu untuk mencegah hewan coba keluar dari kandang dan diberi jaring kawat pada bagian tengah untuk akses keluar masuknya udara. Kandang diberi sekam pada bagian bawahnya dan sekam diganti 3 hari sekali agar tetap kering

dan bersih. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu ruangan sekitar 35-38°C (sedang). Masing-masing kandang diisi dengan 6 ekor mencit. Makanan dan air minum untuk hewan coba diberikan dengan jumlah, komposisi, dan jam pemberian yang sama. Makanan berbentuk serbuk dengan komposisi yang terdiri dari jagung, katul, *pollard*, DDGS, *rape seed*, *copra meal*, biji batu, CPO, vitamin, dan mineral kemudian dicampur dengan tepung terigu dengan perbandingan 2:1. Makanan diberikan dalam bentuk bulatan padat seberat 20 gram dan air minum diambil dari air kran bersih ditempatkan dalam botol minum standar hewan yang sudah disediakan.

Berdasarkan prinsip etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan dapat dijelaskan sebagai berikut (Ridwan, 2013) :

Prinsip 3R :

1. *Replacement* diartikan sebagai keperluan memanfaatkan hewan coba sudah diperhitungkan dengan seksama. Dalam penelitian ini digunakan hewan coba mencit BALB/c dengan berat badan 20-30 gram, jenis kelamin jantan, berusia 2-3 bulan. Mencit merupakan hewan coba yang mempunyai kondisi biologis mirip dengan manusia.
2. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan coba dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini menggunakan jumlah hewan coba sebanyak 25 ekor pada 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kemudian ditambahkan 1 ekor tikus pada setiap kelompok untuk mengantisipasi kemungkinan *dropout*. Jumlah hewan coba dihitung menggunakan rumus yaitu $p(n-1) > 15$, dengan p adalah jumlah kelompok dan n adalah jumlah hewan coba yang diperlukan.

3. *Refinement* diartikan sebagai perlakuan hewan coba secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Dalam penelitian ini, hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari untuk menciptakan lingkungan yang dapat mencegah terjadinya stress. Hewan coba juga diberikan akses makan dan minum secara *ad libitum* agar bebas dari rasa lapar dan haus. Memberikan perlakuan menggunakan prosedur secara oral (sonde) untuk meminimalisasi rasa nyeri dari prosedur invasif. Serta tidak dilakukan pengekangan dan dipelihara pada kandang yang diberi sekam pada bagian bawahnya dan sekam diganti 3 hari sekali agar tetap kering dan bersih. Masing-masing kandang diisi dengan 3 ekor hewan coba. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu sekitar 35-38°C (sedang). Euthanasia dilakukan dengan metode yang manusiawi, yaitu dengan anestesi perinhalasi. Hewan coba diletakkan pada wadah tertutup yang berisi kapas yang dibasahi dengan *chloroform* dan dipastikan sudah dalam keadaan benar-benar mati.

Prinsip 5F :

1. *Freedom from hunger and thirst*. Dalam penelitian ini hewan coba diberikan makanan dan minuman dengan jumlah, komposisi, dan jam pemberian yang sama. Makanan diberikan dalam bentuk bulatan padat seberat 20 gram di setiap kandang dan air minum diambil dari air kran bersih ditempatkan dalam botol minum standar hewan yang sudah disediakan serta diberikan secara *ad libitum*.
2. *Freedom from discomfort*. Dalam penelitian ini hewan coba diletakkan pada kandang dan hanya diisi 3 ekor pada setiap kandang untuk menyediakan

kebebasan dalam bergerak. Kandang berbentuk balok terbuat dari plastik dan diberi penutup jaring kawat untuk akses keluar masuknya udara. Kandang dialasi dengan sekam, diganti 3 hari sekali agar tetap kering dan bersih.

3. *Freedom from pain, injury, and disease.* Dalam penelitian ini hewan coba diberikan perlakuan secara oral (sonde) untuk meminimalisasi nyeri dari prosedur invasif. Berikutnya, hewan coba harus bebas dari penyakit dengan dilakukan pemantauan secara rutin. Proses euthanasia dengan anestesi perinhalasi. Hewan coba diletakkan pada wadah tertutup yang berisi kapas yang dibasahi dengan *chloroform*. Sebelum prosedur pembedahan, tikus dipastikan benar-benar dalam keadaan sudah mati dengan tanda tidak adanya pergerakan nafas pada dada, hilangnya denyut jantung melalui palpasi dada atau dengan stetoskop, dan hilangnya refleks palpebra (mata tetap terbuka ketika diusap) serta hilangnya refleks kornea (kelopak mata tidak bergerak).
4. *Freedom to express normal behaviour.* Dalam penelitian ini hewan coba diperbolehkan mengekspresikan tingkah laku alami dengan memberikan kualitas kandang yang baik dan cukup luas agar bebas bergerak.
5. *Freedom from fear and distress.* Dalam penelitian ini hewan coba aklimatisasi selama 7 hari untuk menciptakan lingkungan yang dapat mencegah terjadinya stres.