

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah “*The Post Control Group Design*” dengan membandingkan secara mikroskopis pemberian ekstrak *Virgin Coconut Oil* (VCO) pada lambung tikus (*Rattus novergicus* strain wistar) yang diinduksi indometasin dengan cara melibatkan kelompok kontrol disamping kelompok perlakuan yang akan dipilih dengan menggunakan metode simple random sampling.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus putih (*Rattus noverrgicus*) yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah 25 ekor tikus (*Rattus novergicus*) dengan kriteria inklusi :

- a. Jenis kelamin : jantan
- b. Usia : 2-3 bulan
- c. Berat badan : 150-250 gram
- d. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif

Kriteria eksklusi :

- a. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
- c. Tikus sakit selama masa adaptasi

Cara pengambilan sampel dengan metode *simple random sampling* (sampel diambil random) dari populasi yang kemudian dikelompokkan kedalam masing-masing kelompok control dan perlakuan. Banyaknya sampel pada penelitian ini ditetapkan berdasarkan standar prosedur baku. Untuk menentukan jumlah sampel digunakan rumus :

$$n = (15+p) : p \text{ (Indra, 1999)}$$

$$n = (15+5) : 5$$

$$n = 4$$

keterangan: p = perlakuan (5 perlakuan)

n = jumlah sampel

15 = nilai kontanta

Untuk perlakuan sejumlah 5 macam diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali untuk masing-masing perlakuan sehingga jumlah total skor = 20 ekor. Akan tetapi diperlukan penambahan pengulangan pada setiap perlakuan sebagai cadangan dan ditetapkan sejumlah 1 kali pengulangan untuk menghindari bias dan kemungkinan tikus mati sebelum pembedahan. Sehingga total sampel yang dibutuhkan 25 ekor tikus dengan rincian 5 ekor tikus untuk masing-masing perlakuan. Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan *simple random sampling* yaitu pengundian.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel independen (variabel bebas) : pemberian ekstrak *Virgin Coconut Oil* (VCO)

Variabel dependen (variabel terikat) : kedalaman ulkus pada mukosa lambung tikus *Rattus novergicus*

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Penelitian dilakukan selama 1 bulan, dimulai dari bulan Maret 2017 – Mei 2017.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Bahan yang digunakan selama pemeliharaan *Rattus novergicus* strain wistar adalah :

- a. Sekam
- b. Makanan tikus, makanan standar berupa campuran dari makanan ayam jenis BK 1 dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1 kemudian dibuat pelet.

4.5.1.2 Bahan Untuk Perlakuan Hewan Coba

Bahan yang digunakan selama perlakuan pada *Rattus norvegicus* strain wistar adalah :

- a. Indometacin 30mg/KgBB
- b. Aquades sebagai Pelarut Indometasin
- c. *Virgin Coconut Oil* (VCO)
- d. Aquades

4.5.1.3 Bahan Untuk Pengambilan Organ

- a. Klorofom
- b. Air untuk mencuci kotoran

4.5.1.4 Bahan Untuk Pembuatan Preparat

- a. Lambung Tikus
- b. Formalin 10%
- c. Alkohol 80%, 95%, 96%, dan 100%
- d. Alkohol asam
- e. Parafin
- f. Xylol
- g. Counter staining
- h. *Canadian balsem* atau *Entellan*
- i. Putih telur
- j. Air
- k. Cat Hematoksilin-Eosin (Haris Hematoxilen)

4.5.2 Alat Penelitian

4.5.2.1 Alat Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Kandang tikus berupa kotak plastik yang diisi sekam dan ditutup dengan kawat. Ukuran kandang 15cm x 30cm x 42 cm, masing-masing kandang berisi 5 ekor tikus
- b. Wadah air minum tikus
- c. Spidol untuk memberi identitas pada tikus

4.5.2.2 Alat Untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

- a. Timbangan

4.5.2.3 Alat Untuk Pemberian Indometasin dan *Virgin Coconut Oil* (VCO)

- a. Sonde
- b. Spuit 1 cc
- c. Spuit 3 cc

4.5.2.4 Alat Untuk Pengambilan Organ

- a. Handscoen
- b. Papan dan nampan bedah
- c. Alat bedah minor berupa: pinset, pisau bedah (scalpel), gunting
- d. Tempat organ berupa tabung plastik untuk pemeriksaan histopatologi

4.5.2.5 Alat Untuk Pembuatan Preparat

- a. *Rotatory microtome*
- b. *Object glass*
- c. *Cover glass*

4.5.2.6 Alat Penilaian Mikroskopis Lesi Mukosa Lambung Tikus

- a. Mikroskop cahaya
- b. Minyak imersi
- c. Camera digital
- d Software komputer untuk pengambilan gambar
- e. Alat tulis

4.6 Definisi Operasional

1. Indometasin

Indometasin adalah obat golongan *Non Steroid Antiinflammatory Drugs* (NSAIDs) yang digunakan sebagai inducer perdarahan pada lambung tikus dengan dosis 30mg/kgBB (Purnamawati, 2009). Indometasin dengan merek SIGMA, disediakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2. Virgin Coconut Oil (VCO)

VCO diberikan pada tikus perlakuan 1, 2, dan 3 per oral dengan dosis untuk penelitian eksplorasi 1,25 ml/kgBB, 2,5 ml/kgBB, dan 5 ml/kgBB. VCO dengan merek VICO BAGOES yang diproduksi oleh dr. Zainal Gani

3. Tikus model ulkus

Tikus yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan berat 150-250 gram yang dibuat model ulkus dengan diinduksi indometasin per oral dengan dosis 30 mg/kgBB.

4. Gambaran mikroskopis (kedalaman ulkus)

Pengukuran hasil gambaran mikroskopis berupa kedalaman ulkus adalah kerusakan yang terjadi mulai dari diinduksinya indometasin sampai diberikannya *Virgin Coconut Oil* (VCO), kemudian dilakukan pembedahan, pengecatan HE, dan diamati secara histopatologi, klasifikasi dari kerusakan sel adalah:

a. Ulserasi epitel mukosa lambung

Disebut ulserasi jika terdapat gap > 10 sel epitel pada lesi mukosa tiap lapang pandang berdasarkan dengan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 200x.

b. Erosi permukaan epitel mukosa lambung

Disebut sebagai erosi jika terdapat gap 1-10 sel epitel pada lesi mukosa tiap lapang pandang berdasarkan dengan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 200x.

c. Deskuamasi epitel

Jika terjadi kerusakan atau pengangkatan sedikit pada sel epitel mukosa lambung berdasarkan dengan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 200x.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Model Hewan Gastritis

- 1) Tikus dipuaskan sehari, kemudian diinduksi indometasin 30mg/kgBB per oral (Purnamawati, 2009)
- 2) Setelah 8 jam pasca induksi indometasin, dilakukan pembedahan pada kelompok kontrol positif dan negatif.
- 3) Hasil lambung yang dibedah segera diamati secara mikroskopis, kemudian diawetkan dalam formalin 10% untuk perisapan pembuatan preparat histopatologi.

4.7.2 Pemberian Virgin Coconut Oil (VCO) dan Pembedahan Kelompok Perlakuan

1. VCO diberikan sebanyak 3 dosis (1 ml/kgBB, 5 ml/kgBB, 10 ml/kgBB) setiap 8 jam, kemudian dilakukan pembedahan serta diamati secara mikroskopis dan diawetkan dalam formalin 10% untuk persiapan pembuatan preparat histopatologi.

4.7.3 Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi

Metode teknik pembuatan preparat histopatologi (Muhartono, 2013)

1. Organ lambung yang telah diambil dan sudah difiksasi formalin 10% 3 jam kemudian dipotong secara representatif (perwakilan jaringan lambung tikus dari masing-masing kelompok)
2. Bilas organ tersebut dengan air mengalir sebanyak 3-5 kali
3. Dehidrasi organ lambung dengan: alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam
4. Clearing: xylol selama 1 jam, xylol selama 1 jam

5. Impregnansi dengan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65° C
6. Blok parafin didinginkan dalam lemari es sebelum dipotong, pemotongan menggunakan rotary microtome dengan menggunakan disposable knife, Pita parafin dimekarkan pada waterbath dengan suhu 60° C
7. Setelah preparat jadi, kemudian dilakukan pengecatan jaringan lambung tikus menggunakan pewarna Hematoxylin Eosin (HE)
8. Prosedur pulasan HE:
 - a. Dilakukan deparafinisasi dalam alrutan *xylo* selama 5 menit, larutan *xylo* selama 5 menit, etanol absolut selama 1 jam
 - b. *Hydrasi* dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, air selama 10 menit
 - c. Pulasan inti dengan haris hematoksilin selama 15 menit, air mengalir, eosin selama maksimal 1 menit
 - d. Dehidrasi: alkohol 70% selama 2 menit, *xylo* selama 2 menit, *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan deck glass.

4.7.4 Identifikasi Lesi Mukosa Lambung secara Histopatologis

Pengamatan dan pengumpulan data dilakukan dengan mengamati dibawah mikroskop terhadap 25 preparat histopatologi mukosa lambung tikus dengan pembesaran 200x. Setiap preparat dipilih 5 lapang pandang untuk dilihat integritas epitelnya berdasarkan modifikasi skor integritas sel epitel Barthel Manja (Manja, 2003). Lapangan pandang dipilih secara *random*.

4.7.5 Persiapan Hewan Coba

A. Sebelum Penelitian

1. Hewan coba diseleksi sesuai dengan kriteria inklusi yang telah ditentukan.
2. Persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang yang sudah dibersihkan, rak tempat kandang yang sudah dibersihkan, anyaman kawat, sekam, botol minum yang tidak bocor, timbangan dalam gram, wadah makanan minum dan pekan.
3. Hewan coba diadaptasikan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 7 hari.
4. Masing-masing kandang berisi 5 ekor hewan coba dalam keadaan kandang bersih dan penggantian sekam dilakukan 3 hari sekali.
5. Hewan coba tikus putih diberi makan dan minum sesuai dengan standart laboratorium, kemudian dilakukan juga penimbangan berat badan diawal dan diakhir adaptasi untuk mengetahui adanya kenaikan atau penurunan berat badan sebagai standar pemberian *Virgin Coconut Oil* (VCO) dan indometasin.

B. Selama penelitian

Setelah diadaptasikan selama 7 hari, tikus pada perlakuan control negatif tetap diberi makan dan minum sesuai dengan standar laboratorium, pada kelompok control positif dan kelompok perlakuan I, II, dan III akan diinduksi indometasin per oral pada hari pertama. Untuk tikus pada perlakuan I, II, dan III 8 jam setelah diinduksi indometasin, masing-masing akan diberikan VCO per oral dengan dosis 1 ml/kgBB, 5 ml/kgBB,

dan 10 ml/kgBB selama 3 kali dengan selang waktu 8 jam setiap kali pemberian ekstrak VCO tersebut.

Pembedahan dilakukan 8 jam setelah pemberian terakhir VCO. Prosedur ini dilakukan dengan anestesi perinhalasi yaitu dengan memasukkan tikus kedalam wadah tertutup rapat berisi chlorofom hingga tidak adanya pergerakan nafas dada, hilangnya denyut jantung melalui palpasi dada, dan hilangnya reflex korneal (kelopak mata tidak bergerak). Setelah itu, pengambilan organ lambung yang telah dicuci dengan PBS untuk menghilangkan kotoran atau darah yang tersisa.

C. Sesudah Penelitian

1. Pembedahan dilakukan pada hari ke-7 atau setelah 12 jam induksi indometasin. Prosedur ini dilakukan dengan anestesi perinhalasi yaitu dengan memasukkan tikus kedalam wadah tertutup rapat berisi chlorofom. Tanda hewan coba sudah mati adalah tidak adanya pergerakan nafas dada, hilangnya denyut jantung melalui palpasi dada atau dengan stetoskop, dan hilangnya reflex korneal (kelopak mata tidak bergerak).
2. Pengambilan organ lambung yang telah dicuci dengan PBS untuk menghilangkan kotoran atau darah yang tersisa
3. Tubuh tikus yang tersisa dibersihkan dan dikubur dengan baik.
4. Alat-alat yang digunakan dicuci dengan sabun, dan dikeringkan.

4.8 Alur Penelitian dan Pengumpulan Data

Alur kerja dibagi menjadi 2 tahap

1. Tahap 1 : Penelitian Pendahuluan (eksplorasi)

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui dosis indometasin yang perlu digunakan pada penelitian sesungguhnya, mengetahui dosis VCO yang tepat yang dapat mengurangi pendarahan akibat induksi indometasin sebelumnya.

A. Penentuan dosis Indometasin dan waktu percobaan

Pada penelitian sebelumnya, dosis indometasin yang dapat menimbulkan pendarahan sebagai tanda adanya ulkus adalah pada dosis 30 mg/kgBB (Purnamawati, 2009).

B. Penentuan Dosis VCO

6 ekor tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan masing-masing 2 ekor tikus. Dengan dosis yang mengacu pada penelitian zakaria *et al* yaitu, 1 mL/kgBB, 5 mL/kgBB, 10 mL/kgBB yang diberikan peroral pada tikus setiap 8 jam sekali dalam 24 jam. Pada penelitian pendahuluan ini didapatkan hasil tikus mati pada dosis 5 mL/kgBB dan 10 mL/kgBB. Sehingga dosis yang ditentukan pada penelitian selanjutnya adalah 1,25 mL/kgBB, 2,5 mL/kgBB, 5 mL/kgBB

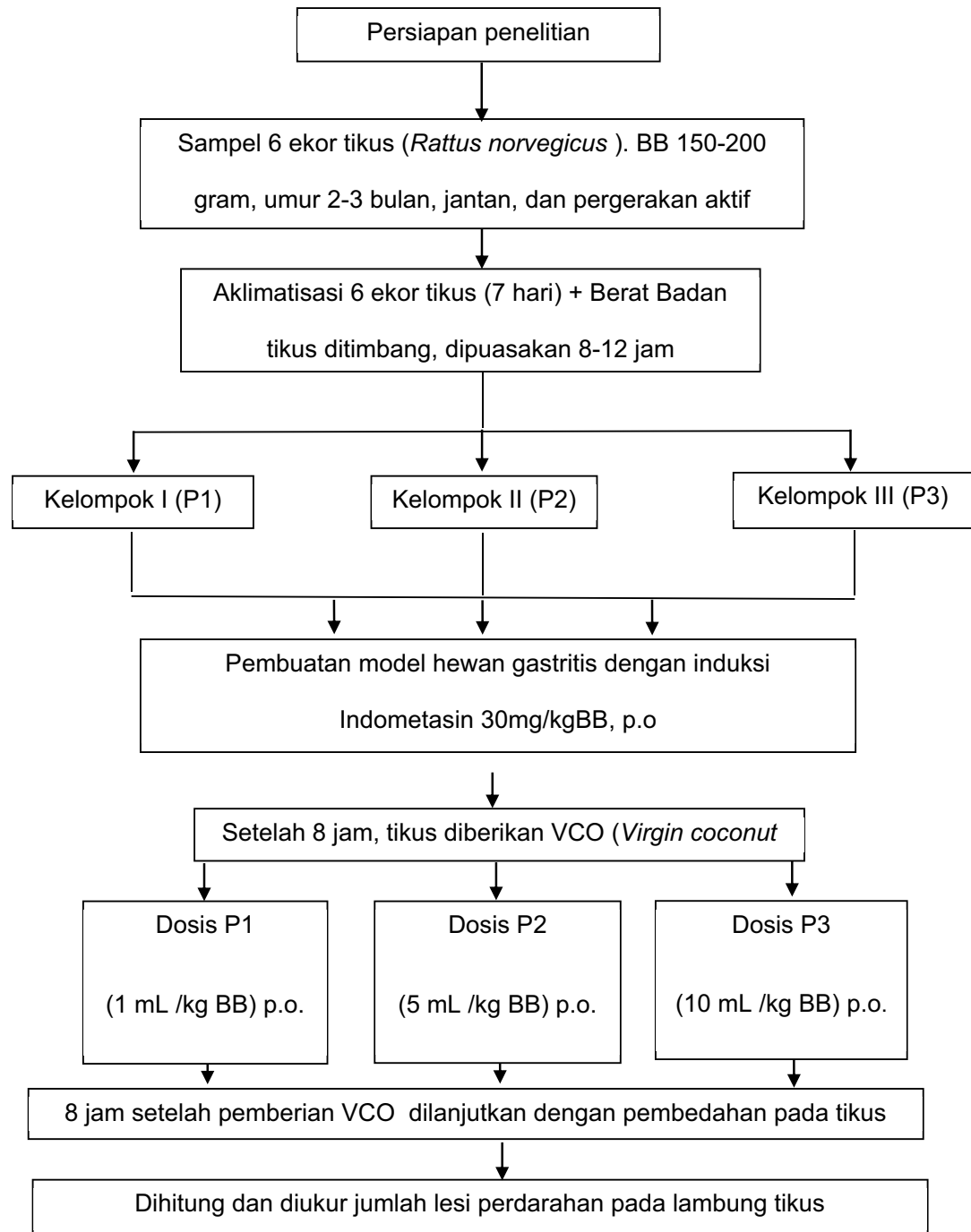
2. Tahap 2 : Penelitian selanjutnya

Setelah melakukan penelitian pendahuluan, telah ditentukan bahwa dosis Indometasin adalah 30 mg/kgBB dan dosis VCO adalah 1,25 mL/kgBB, 2,5 mL/kgBB, dan 5 mL/kgBB. Sampel Penelitian dibagi dalam 5 perlakuan yaitu:

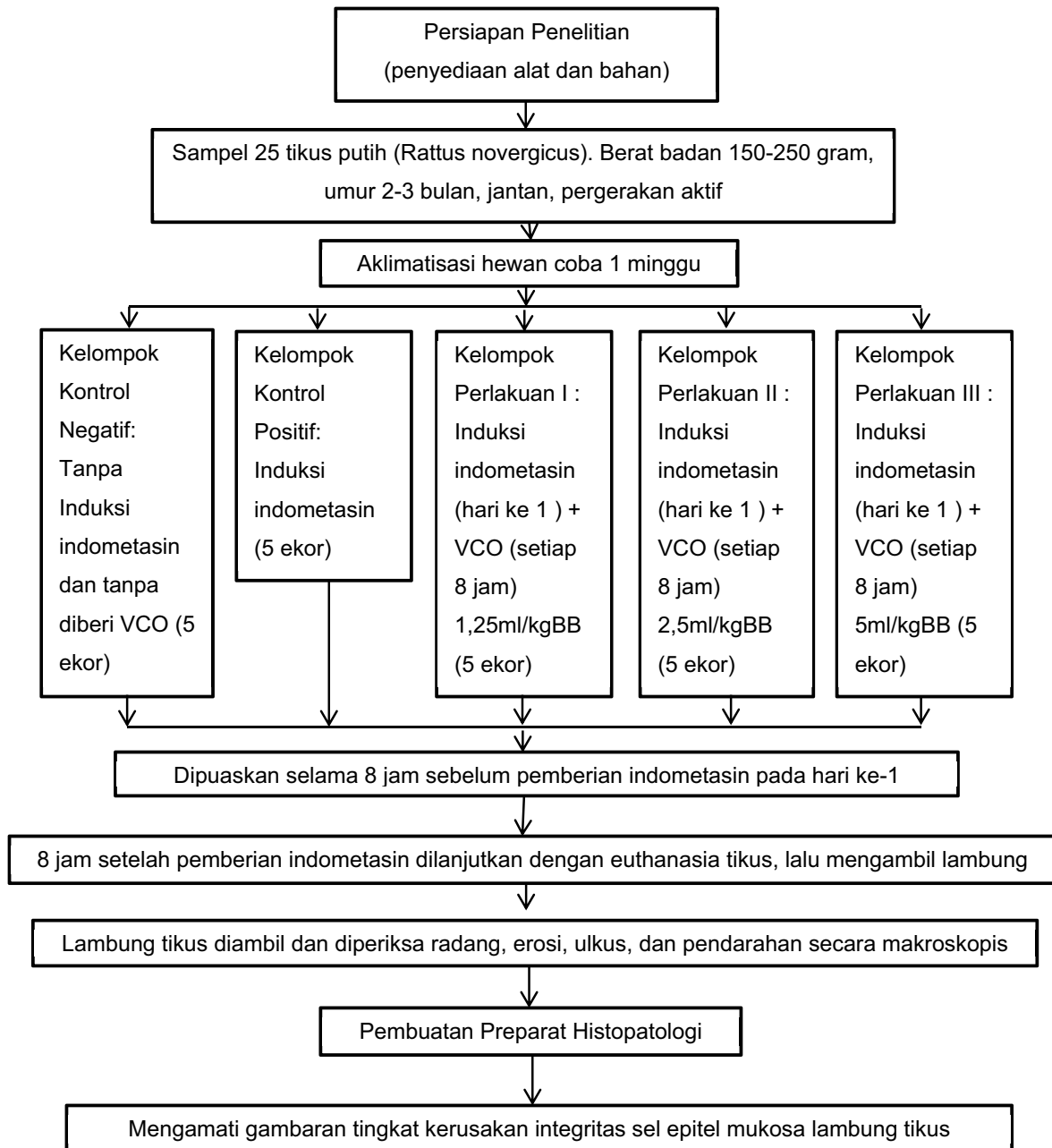
- A. Kelompok 1, yaitu kelompok kontrol negatif : tidak diberi indometasin maupun VCO.
 - B. Kelompok 2, yaitu kelompok kontrol positif : diberi indometasin 30 mg/kgBB tanpa induksi VCO.
 - C. Kelompok 3, yaitu kelompok dosis 1 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi VCO dosis 1 yaitu 1,25 ml/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.
 - D. Kelompok 4, yaitu kelompok dosis 2 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi VCO dosis 2 yaitu 2,5 ml/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.
 - E. Kelompok 5, yaitu kelompok dosis 3 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi VCO dosis 3 yaitu 5 ml/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.
- Pembedahan semua tikus dilakukan 8 jam setelah pemberian terakhir VCO.

4.8.1 Alur Penelitian

1. Tahap 1 : Penelitian Pendahuluan



2. Tahap 2 : Penelitian Sesungguhnya



4.8.2 Teknik Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dalam bentuk rerata skor epitel kedalaman lesi yang didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol negatif (tikus sehat dan tidak diberi perlakuan), 1 kelompok kontrol positif (tikus hanya diinduksi indometasin 30 mg/kgBB), dan 3 kelompok perlakuan (tikus diberikan VCO dengan dosis 1 ml/kgBB, 5 ml/kgBB, dan 10 ml/kgBB kemudian diinduksi indometasin 30mg/kgBB). Pengamatan penurunan skor epitel dilakukan sesudah pemberian perlakuan, kemudian melakukan analisa data.

4.9 Analisis Data

Rancangan pada penelitian ini menggunakan "*The Post Test Control Group Design*" dimana pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai karena penilaian mikroskopis lesi mukosa lambung pada tikus hanya mungkin dilakukan pada hewan coba yang sudah dibedah (dimatikan dulu). Pengukuran kedalaman lesi mukosa didasarkan pada keberadaan kelompok kontrol negatif sebagai kelompok yang menggambarkan kondisi lambung normal (tanpa kerusakan pada mukosa).

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data skor kedalaman lesi mukosa lambung tikus secara mikroskopis pada masing-masing kelompok perlakuan. Data hasil penelitian tersebut akan diuji normalitas data dengan Kolmogorov Smirnov (nilai $P > 0.05$ merepresentasikan data normal) dan homogenitas data dengan Levene statistik (nilai $P < 0.05$ mempresentasikan data homogen). Jika data normal dan homogen maka data tersebut akan diuji dengan ANOVA untuk mengetahui apakah ada perbedaan skor ulkus yang signifikan diantara kelompok perlakuan. Jika One-way ANOVA menyatakan

$P < 0.05$ maka analisis selanjutnya menggunakan analisis post hoc Tuckey untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan, uji korelasi Pearson, dan uji linear regresi (Muhartono, 2013). Semua uji analisis statistik menggunakan software *SPSS for windows versi 17*.

4.10 Jadwal Kegiatan

Berikut adalah jadwal kegiatan penelitian ini :

1. Persiapan (10 Januari – 22 Februari 2016)
 - 10 Januari 2016 : Pengajuan Etik
 - 22 Januari 2016 : Kelayakan Etik
 - 18 Februari 2016 : Pendaftaran penelitian di laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijata dan pemesanan tikus serta VCO
 - 22 Februari 2016 : Tikus siap digunakan penelitian
2. Pelaksanaan (23 Februari – 13 Maret 2016)
 - 23-29 Februari 2016 : Aklimatisasi tikus
 - 29 Februari 2016 : Timbang tikus, bagi kelompok, dan tikus mulai dipuasakan untuk penelitian pendahuluan
 - 30 Februari-1 Maret 2016 : Penelitian pendahuluan
 - 2 Maret 2016 : Timbang tikus, bagi kelompok, dan tikus mulai dipuasakan untuk penelitian sebenarnya
 - 3-4 Maret 2016 : Penelitian efek VCO pada kedalaman lesi mukosa lambung tikus
 - 5 Maret 2016 : Pembuatan preparat histopatologi

- 13 Maret 2016 : Pembacaan hasil preparat dengan menggunakan mikroskop
3. Pengolahan dan Pelaporan (13 Maret – 26 Maret 2016)
- Mengerjakan statistika terhadap hasil skor integritas epitel mukosa lambung tikus *Rattus novergicus* strain wistar
 - Pembuatan bab 5-7

4.11 Etika Penelitian

Hewan coba pada penelitian ini diaklimatisasi selama 7 hari dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kandang yang terbuat dari plastik dan ditutup dengan kawat serta diberi sekam pada bagian bawahnya dan diganti 3 hari sekali agar tetap lering dan bersih. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu ruangan sekitar 25-28°C. Masing-masing kandang diisi dengan 5 ekor tikus. Berdasarkan prinsip etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan dapat dijelaskan sebagai berikut (Ridwan, 2013) :

1. *Replacement* diartikan sebagai keperluan memanfaatkan hewan coba sudah diperhitungkan dengan seksama. Dalam penelitian ini digunakan hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar dengan berat badan 150-250 gram, jenis kelamin jantan, berusia 2-3 bulan. Tikus merupakan hewan coba yang mempunyai kondisi biologis mirip dengan manusia dan sudah banyak digunakan dalam penelitian hewan coba dengan ulkus lambung.

2. *Reduction* diartikan sebagai penggunaan hewan coba dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini menggunakan hewan coba sebanyak 20 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok (1 kontrol negatif, 1 kontrol positif, 3 kelompok perlakuan) masing-masing berjumlah 4 ekor tikus. Kemudian ditambahkan 1 ekor tikus pada setiap kelompok untuk mengantisipasi kemungkinan *dropout*. Jumlah hewan coba dihitung menggunakan rumus Indra tahun 1999 yaitu $n = (15+p) : p$, dengan p adalah jumlah kelompok dan n adalah jumlah hewan coba yang diperlukan.
3. *Refinement* diartikan sebagai perlakuan hewan coba secara manusiawi (*humane*), memelihara dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Dalam penelitian ini, hewan coba diaklimatisasi 7 hari serta diberikan makan dan minum *ad libitum*. Masing-masing kandang diisi dengan 5 ekor tikus. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu sekitar 25-28°C. Euthanasia dilakukan dengan anestesi perinhalasi.

Prinsip 5F :

1. *Freedom from hunger and thirst*. Dalam penelitian ini hewan coba diberikan makanan dan minuman *ad libitum*.
2. *Freedom from discomfort*. Dalam penelitian ini hewan coba diletakkan pada kandang dan hanya diisi 5 ekor tikus pada setiap kandang untuk menyediakan kebebasan dalam bergerak. Kandang 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 per oral 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*.
4. *Freedom to express normal behavior.* Dalam penelitian ini hewan coba diperbolehkan mengekspresikan tingkah laku alami dengan memberikan kualitas kandang yang baik dan cukup luas agar bebas bergerak.
5. *Freedom for fear and distress.* Dalam penelitian ini hewan coba aklimatisasi selama 7 hari untuk menciptakan lingkungan yang dapat mencegah terjadinya stress.