

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (adanya metode sampling, kelompok kontrol, dan intervensi) menggunakan rancangan penelitian pretes-postes. Rancangan ini bertujuan untuk mengungkapkan hubungan sebab akibat dengan cara melibatkan kelompok kontrol disamping kelompok eksperimen yang telah dipilih secara acak (Nursalam, 2003).

**Tabel 3.1. Desain Penelitian**

No	Kelompok	T1	Aloksan	T2	Perlakuan	H03	H07	H13
1	K-	01	Induksi	O2	-	-	-	-
2	K+	01	Induksi	O2	Y	Y	Y	Y
3	P1	01	Induksi	O2	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>
4	P2	01	Induksi	O2	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>
5	P3	01	Induksi	O2	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>

Keterangan :

K- : Kelompok kontrol negatif (induksi aloksan)

K+ : Kelompok kontrol positif (induksi aloksan, diberi glibenklamid)

P1 : Kelompok perlakuan 1 (kombinasi glibenklamid+ekstrak kunyit 150 mg)

P2 : Kelompok perlakuan 2 (kombinasi glibenklamid+ekstrak kunyit 300 mg)

P3 : Kelompok perlakuan 3 (kombinasi glibenklamid+ekstrak kunyit 500 mg)

T1 : Observasi glukosa (tes gula darah) sebelum induksi aloksan (01)

T2 : Observasi glukosa (tes gula darah) sesudah induksi aloksan (02)

H03 : Observasi glukosa (tes gula darah) sebelum induksi aloksan

H07: Observasi glukosa darah hari ke 7 sesudah perlakuan

H13: Observasi glukosa darah hari ke 13 sesudah perlakuan

Y : Glibenklamid (pemberian glibenklamid 0,9 mg)

X<sub>1</sub> : Perlakuan 1 (kombinasi glibenklamid+ekstrak kunyit 150 mg)

X<sub>2</sub> : Perlakuan 2 (kombinasi glibenklamid+ekstrak kunyit 200 mg)

X<sub>3</sub> : Perlakuan 3 (kombinasi glibenklamid+ekstrak kunyit 500 mg)

## B. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Dosis ekstrak rimpang kunyit dengan pembagian dosis (150, 300, 500 mg/hari).
2. Variabel Terikat : Kadar glukosa darah
3. Variabel Pembanding : Glibenklamid (0,9 mg)
4. Variabel Kontrol : Umur, berat badan, dan jenis kelamin
5. Variabel Pengganggu : Nutrisi (dikendalikan dengan diit).  
: Aktifitas (dikendalikan dengan kandang)

## C. Subjek Penelitian

Pemilihan dan penentuan hewan uji yang sesuai dilakukan berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria inklusi :
  - a. Tikus putih usia 2-3 bulan
  - b. Berat badan berkisar 150-200 gram

Perhitungan sampel menurut rumus *Fredrer* :

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 15/4 = n \geq 3,75 + 1 = n \geq 4,375 \text{ atau } n = 5$$

Keterangan:  $n$  = jumlah sampel tiap kelompok

$t$  = jumlah kelompok pengujian

Penelitian ini menggunakan tikus jantan (tikus putih) sehat yang diperoleh dari laboratorium FKIK UMY sebanyak 30 ekor (5 ekor cadangan), dengan berat badan 150-200 gram, umur 2-3 bulan yang sudah terkondisikan sebagai hewan uji (sudah mampu beradaptasi). Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok, masing masing kelompok terdiri dari 6 ekor (1 cadangan). Jumlah ini juga sesuai dengan penentuan besar sampel menurut WHO yaitu minimal 5 ekor setiap kelompok yang diambil secara acak (random).

Selama melakukan penelitian ini terdapat 3 ekor tikus yang mati dihari ke 3 pada kontrol positif (kelompok  $K^+$ ) 1 ekor dan 2 ekor pada kelompok perlakuan 3 (kelompok P3). Agar masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, maka satu ekor tikus dari kelompok  $K^-$  (kontrol negatif) dipindahkan ke klompok P3 kemudian diberi perlakuan yang sama (diberikan tanda khusus, waktu perlakuanya ditambah).

#### D. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di laboratorium fakultas pertanian

(agroteknologi) dan laboratorium FKIK UMY dilaksanakan selama 30 hari

## **E. Instrumen Penelitian**

### **1. Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan terdiri dari sarung tangan, masker, sonde oral, pipet tetes, ayakan, kertas penyaring, kandang, timbangan hewan uji (ohaus), timbangan analitik (Satorius), centrifuge, pisau, skapel, spuit injeksi (ukuran tergantung keperluan), bejana, tabung reaksi, toples penyimpanan hasil ekstraksi, GCU (alat pemeriksa gula darah) dan alat-alat gelas yang lain.

### **2. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan terdiri dari rimpang kunyit, tablet glibenklamid isi 5 mg/a, alloxan, aquades, ethanol 95%, etil asetat.

## **F. Cara Induksi, Penghitungan Dosis dan Ekstraksi**

### **1. Cara penginduksian aloksan**

Aloksan monohidrat dengan dosis 120 mg/kg diinduksikan pada hewan uji secara i.p (intra peritoneal) dengan dilarutkan menggunakan normal saline (aquades), kemudian dipuasakan selama 72 jam. Untuk menghindari terjadinya kerusakan pankreas secara total maka 6 jam pertama setelah induksi aloksan berikan cairan glukosa 10% sehingga tikus dapat dipakai sebagai model penderita diabetes tipe 2. Tikus dengan kadar glukosa darah berkisar 200-350 mg/dl adalah indikasi penginduksian berhasil (Santoshkumar at al., 2013).

Penentuan dosis aloksan :

a. Aloksan 0.5 g (ditimbang) kemudian larutkan dalam aquades 10 ml

$$b. \text{ Konsentrasi aloksan } C = \frac{\text{Berat}}{\text{Volume}} = \frac{500 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = 50 \text{ mg/ml}$$

c. Dosis aloksan yang diberikan adalah sebanyak 120 mg/kg BB tikus.

Maka volume larutan aloksan yang diberikan adalah :

$$\text{VAO} = \frac{\text{Dosis} \times \text{BB}}{C} = \frac{\frac{120}{1000} \times 200}{50 \text{ mg/ml}} = 0.48 \text{ ml}$$

## 2. Cara pembuatan ekstrak dan penghitungan dosis

### a. Ekstraksi Kunyit (metode maserasi)

1) Siapkan 2 kg rimpang kunyit umur 6 bulan hingga 1 tahun atau lebih, tergantung dari warna rimpangnya jika dilihat dengan sayatan atau potongan lurus (berwarna kuning pekat). Rimpang kunyit dibersihkan dan dikeringkan dengan cara dijemur dalam keadaan utuh selama tiga hari hingga tampak padat, kemudian dipotong-potong kecil (sekitar diameter 1-2 cm), diamkan dalam ruangan dengan suhu kamar (sekitar 30 °C) selama 5 hari. Setelah kering (dapat disebut simplisia kering), timbang dengan timbangan yang sesuai.

2) Simplisia kering yang baik (tidak bulukan dan seratnya masih bagus, terbebas dari jamur aflatoxin) sebanyak 1 kg, dihaluskan atau di potong-potong hingga sesuai ukuran kemudian ambil 200 g.

3) 10 bagian simplisia dimasukkan dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian penyari, ditutup, terlindung dari cahaya dan

dibiarkan selama 5 hari di dalam bejana...

- 4) Setelah 5 hari sari diserakai, dan ampas diperas. Ampas ditambah cairan penyari, aduk dan diserakai sampai diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian, kemudian bejana ditutup, diamkan di tempat sejuk selama 2 hari terlindung dari cahaya.
- 5) Saring campuran tersebut dengan flannel (penyaring) sampai diperoleh maserat (filtrat).
- 6) Dengan metode water bath (ditutup dengan kain tipis) uapkan ekstrak cair agar kandungan kimianya tidak rusak.
- 7) Setelah ekstrak kental diperoleh lakukan purifikasi ekstrak dengan etil asetat. Masukkan ekstrak kental dalam erlemeyer, tambahkan etil asetat.
- 8) Pisahkan ekstrak hasil purifikasi yang diperoleh.

b. Dosis pemberian ekstrak kunyit

- 1) Sebanyak 10 g ekstrak kunyit (diambil dari hasil purifikasi) dilarutkan dalam aquades 100 ml adalah :

$$C = \frac{\text{Berat}}{\text{Volum}} = \frac{10.000 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = 100 \text{ mg/ml}$$

- 2) Dosis (A) ekstrak kunyit yang diberikan 0,15 g/kg BB, maka volume larutannya adalah :

$$\text{VEO} = \frac{\text{Dosis} \times \text{BB}}{C} = \frac{150 \times 200}{100 \text{ mg/ml}} = 0,3 \text{ ml po}$$

- 3) Dosis (B) ekstrak kunyit yang diberikan 0,3 g/kg BB, maka volume dalam larutan adalah :

$$VEO = \frac{\text{Dosis} \times \text{BB}}{C} = \frac{\frac{300}{1000} \times 200}{100 \text{mg/ml}} = 0,6 \text{ ml po}$$

- 4) Dosis (C) ekstrak kunyit yang diberikan 0,5 g/kg BB, maka volume dalam larutan adalah :

$$VEO = \frac{\text{Dosis} \times \text{BB}}{C} = \frac{\frac{500}{1000} \times 200}{100 \text{mg/ml}} = 1 \text{ ml po}$$

c. Dosis pemberian glibenklamid

- 1) Glibenklamid yang diperoleh dari apotek ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam aquades 100 ml
- 2) Konsentrasi glibenklamid  $C = \frac{\text{Berat}}{\text{Volum}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = 0,1 \text{ mg/ml}$
- 3) Dosis pada manusia dengan BB 70 kg adalah 5mg po/hari (ISO, 2012). Maka pemberian dosis pada tikus berdasarkan konversi pada manusia 70 kg dengan persamaan  $D_m \times 0,018 = n$  ( $D_m$ ) dosis pada manusia dengan BB 70 kg, dan ( $n$ ) dosis pada tikus dengan berat 200 g adalah:  $5 \text{ mg} \times 0,018 = 0,09 \text{ mg}$

$$\text{Dosis manusia (70 kg)} = 5 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis tikus (200g)} = 0,018 \times 5 \text{ mg} = 0,09 \text{ mg}$$

Karena ada faktor farmakokinetik yang mempengaruhi maka dikalikan 10, jadi hasil akhirnya adalah:  $0,09 \text{ mg} \times 10 = 0,9 \text{ mg}$

$$VGO = (\text{Dosis} \times \text{BB}) / \text{Konsentrasi}$$

$$= (0,9 \text{ mg} \times 200) / 100 \text{ mg/ml} = 1,8 \text{ ml po}$$

d. Dosis kombinasi (ekstrak kunyit + glibenklamid).

Dalam dosis kombinasi ini dilakukan penggabungan antara ekstrak kunyit dan glibenklamid dosis tunggal. Cara pemberian dosis kombinasi ini dilakukan terpisah antara ekstrak kunyit dan glibenklamid untuk menghindari adanya reaksi obat yang tidak diinginkan. Dosis kombinasi dapat dinyatakan sebagai berikut :

1) Dosis kombinasi A (150 mg kunyit + glibenklamid)

$$\begin{aligned} \text{Dosis kombinasi} &= \text{Dosis Ekstrak} + \text{Dosis Glibenklamid} \\ &= 0,3 \text{ ml} + 1,35 \text{ ml} \\ &= 1,65 \text{ ml po} \end{aligned}$$

Jadi dosis kombinasi A pada tikus putih akan diberikan sebanyak 1,65 ml po/hari.

2) Dosis kombinasi B (300 mg kunyit + glibenklamid)

$$\begin{aligned} \text{Dosis kombinasi} &= \text{Dosis Ekstrak} + \text{Dosis Glibenklamid} \\ &= 0,6 \text{ ml} + 1,35 \text{ ml} \\ &= 1,95 \text{ ml po} \end{aligned}$$

Jadi dosis kombinasi B pada tikus putih akan diberikan sebanyak 1,95 ml po/hari.

3) Dosis kombinasi C (500 mg kunyit + glibenklamid)

$$\text{Dosis kombinasi} = \text{Dosis Ekstrak} + \text{Dosis Glibenklamid}$$

Jadi dosis kombinasi C pada tikus putih akan diberikan sebanyak 2,35 ml po/hari.

### G. Definisi Oprasional

#### 1. Ekstrak Rimpang Kunyit

Ekstrak rimpangkunyit merupakan hasil dari ekstraksi rimpang kunyit berumur 6 bulan hingga 1 tahun atau lebih dengan menggunakan etanol 95%, yang kemudian di purifikasi.

#### 2. Glibenklamid

Glibenklamid merupakan obat golongan sulfonilurea yang biasanya digunakan pada pasien diabetes tipe 2 sebagai terapi standar. Glibenklamid dapat diperoleh di apotek dalam bentuk kemasan tablet.

#### 3. Tikus Diabetes

Tikus diabetes merupakan tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar/ albino wistar rats*) yang diinduksi dengan aloksan monohidrat dengan dosis 120 mg/kg secara i.p (intra peritonal) dengan dilarutkan menggunakan normal saline (aquades).

#### 4. Kadar glukosa darah

Kadar glukosa darah merupakan hasil analisa darah dengan GCU (alat tes glukosa darah). Tikus dipuasakan selama minimal 8 jam kemudian darah diambil dengan membuat sayatan atau menusukkan jarum (lanset) pada ekor kemudian dibaca dengan menggunakan stik yang dihubungkan dengan alat pembaca (GCU).

## H. Alur Penelitian dan Pendataan (Hewan Uji)

Proses penelitian ini akan dilakukan berdasarkan alur penelitian sebagai berikut:

**Tabel 3.2** Alur Penelitian dan Pendataan

Hari ke	Jam	Tindakan
0-6	08.00-selesai (hari ke7)	Mengadaptasikan tikus
7	10.00 - 13.00	Tikus dipuasakan 12 jam atau lebih
	13.00	Periksa glukosa darah , beri pakan
8	10.00	Induksi aloksan pada tikus. Puasakan selama 6 jam
	16.00 - 17.00	Berikan larutan glukosa pada tikus
	17.00	Tikus dipuasakan 24 jam.
9	16.00 - 17.00	Berikan larutan glukosa pada tikus,
	17.00	Tikus dipuasakan 24 jam.
10	16.00 - 17.00	Berikan larutan glukosa pada tikus
	17.00	Tikus dipuasakan 24 jam
11	16.00 - 17.00	Periksa glukosa darah, semua kelompok
	17.00	Tikus diberi pakan seperti biasa (standar)
12	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 1 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
13	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 2 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
14	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 3 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00 - 18.00	Tikus diberi pakan seperti biasa

Tabel 3.2 Alur Penelitian dan Pendataan (lanjutan)

Hari ke	Jam	Tindakan
	18.00	Tikus dipusakan 12 jam
15	06.00 - 07.00	Periksa kadar glukosa darah
	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 4 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
16	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 5 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
17	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 6 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
18	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 7 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00 - 18.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
	18.00	Tikus dipusakan 12 jam
19	06.00 - 07.00	Periksa kadar glikosa darah
	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 8 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>

**Tabel 3.2** Alur Penelitian dan Pendataan (lanjutan)

Hari ke	Jam	Tindakan
19	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
20	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 9 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00-18.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
	18.00	Tikus dipuasakan 12 jam
21	06.00 - 07.00	Periksa kadar glukosa darah
	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 10 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
22	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 11 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
23	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 12 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
24	07.00 - 10.00	Perlakuan ke 13 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kelompok K<sup>-</sup> diberi glibenklamid</li> <li>• Kelompok P1 diberi gliben+ekstrak 150 mg</li> <li>• Kelompok P2 diberi gliben+ekstrak 300 mg</li> <li>• Kelompok P3 diberi gliben+ekstrak 500 mg</li> </ul>
	11.00 - 18.00	Tikus diberi pakan seperti biasa
	18.00	Tikus dipuasakan 12 jam
25	06.00 - 07.00	Periksa kadar glukosa darah
	07.00 - Selesai	Beri pakan. tempatkan tikus sesuai prosedur

## I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini telah dikalibrasi. Kalibrasi alat-alat ekstraksi seperti *water bath*, dan timbangan analitik (satorius) dilakukan oleh petugas laboratorium secara berkala. Begitu juga dengan kalibrasi alat-alat kaca seperti gelas ukur dan erlenmeyer dilakukan oleh petugas labrotorium. Sedangkan untuk alat pemeriksaan kadar glukosa darah (dalam penelitian ini menggunakan GCU), kalibrasi alatnya menggunakan chip standar dari pabrik pembuatnya.

## J. Pengolahan Data dan Uji Hipotesis

### 1. Uji Normalitas

Dalam penelitian ini untuk mengetahui sebaran data normal atau tidak, digunakan uji *Shapiro-Wilk* dikarenakan sampel yang digunakan  $\leq 50$  (sampel kecil). Nilai kemaknaannya ( $p$ )  $> 0,05$  (Dahlan, 2011). Hasil dari uji normalitas yang dilakukan pada penelitian ini terdapat beberapa data yang tidak normal, untuk menormalkan data tersebut dilakukan tranformasi data, tetapi jika ada data yang tidak dapat dinormalkan dengan menggunakan tranformasai maka data tersebut dihilangkan dengan catatan tidak lebih dari 20%.

### 2. Uji Beda

Untuk mengetahui uji beda antar kelompok yang berbeda lebih dari dua kelompok, uji yang digunakan adalah *two way* ANOVA (uji parametrik) yaitu pengembangan dari metode *one way* ANOVA, hal ini diperlukan untuk mempermudah dalam melihat konflik. Tetapi jika ada

tidak normal (sarat uji parametrik yang sesuai tidak terpenuhi) maka digunakan uji alternatifnya yaitu uji Kruskal-Wallis (Dahlan, 2011). Uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *two way* ANOVA karena data hasil penelitian pada penelitian ini normal.

#### **K. Etika Penelitian**

Dalam penelitian ini, tikus putih (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai hewan uji, dimana hewan uji yang sehat dijadikan hiperglikemia. Setiap hewan uji diperlakukan secara baik dan adil (*right in fair treatment*). Jenis makanan dan tempat tinggalnya adalah sama, yang berbeda hanya terapi yang diberikan pada tiap kelompok hewan uji untuk melihat perbedaan kadar glukosa darahnya. Setelah penelitian selesai hewan uji diperlakukan sesuai dengan standar prosedur oprasional laboratorium (disembelih, kemudian dibekukan untuk analisis).