

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Setiap tahun, diperkirakan sekitar 115 juta hewan digunakan dalam penelitian di seluruh dunia. Namun, jumlah hewan yang digunakan untuk pengujian regularity dapat dipastikan dengan tepat, karena banyak negara yang tidak mengumpulkan atau mempublikasikan data tersebut, sementara negara lainnya hanya memberikan informasi terbatas (Taylor dan Alvarez, 2020). Di sisi lain, penggunaan hewan dalam penelitian sering kali menuai kritik dari kelompok hak asasi hewan, yang berpendapat bahwa hewan juga memiliki hak untuk hidup sesuai dengan alamiah mereka. Meskipun demikian, banyak ilmuwan sepakat bahwa penelitian yang melibatkan hewan diperbolehkan, asalkan prinsip-prinsip *animal welfare* diterapkan dengan benar. *Animal welfare*, dalam konteks ini, merujuk pada kondisi hewan yang dapat mengatasi tantangan lingkungan dan memenuhi kebutuhan biologis serta psikologisnya dengan baik (Wahyuwardani et al., 2020).

Animal welfare laboratorium, khususnya, mengacu pada kondisi hewan yang dipelihara dalam lingkungan yang sesuai dengan tujuan percobaan, dimana faktor fisiologis dan psikologis mereka mendukung kualitas hidup yang lebih baik. Salah satu dasar utama dari prinsip *animal welfare* adalah “Lima Kebebasan”, yang meliputi bebas dari rasa lapar dan haus, bebas dari rasa tidak nyaman, bebas dari cedera, penyakit, dan rasa sakit, bebas dari rasa takut dan penderitaan, serta bebas untuk mengekspresikan perilaku alami mereka (Mutiarahmi et al., 2021).

Tikus wistar laboratorium (*Rattus norvegicus*) telah menjadi hewan yang sangat umum digunakan dalam berbagai penelitian ilmiah, termasuk di bidang biologi, farmakologi, kedokteran, dan kesehatan. Salah satu alasan utama penggunaannya adalah kesamaan genetik antara tikus dan manusia, yang memungkinkan mereka untuk menjadi model yang baik dalam penelitian. Tikus putih berkontribusi besar dalam berbagai penelitian, seperti fisiologi, biologi reproduksi, imunologi, obesitas, farmakologi, ilmu saraf, penuaan, kanker, diabetes, hipertensi, penyakit menular, nutrisi, toksikologi, dan transplantasi (Wati et al., 2024).

Meskipun tikus Wistar banyak digunakan dalam berbagai penelitian, aspek *animal welfare* sering kali belum menjadi fokus utama dalam manajemen pemeliharaannya. Salah satu prinsip penting dalam kesejahteraan hewan laboratorium adalah kebebasan untuk mengekspresikan perilaku alami. Pada tikus, perilaku alami mencakup aktivitas seperti eksplorasi, *grooming*, pembuatan sarang, bermain, dan interaksi sosial. Jika perilaku-perilaku tersebut terhambat akibat kondisi lingkungan yang terlalu monoton atau sempit, hewan dapat menunjukkan tanda-tanda stres atau perilaku abnormal seperti *stereotypy* (gerakan berulang tanpa tujuan) (Ratuski et al., 2022). Oleh karena itu, pengelolaan kandang, pemberian pengayaan lingkungan (*environmental enrichment*), serta interaksi sosial antar hewan menjadi faktor penting dalam menjaga kesejahteraan perilaku tikus laboratorium.

Stres yang dialami hewan laboratorium tidak hanya berdampak pada *animal*

welfare, tetapi juga mempengaruhi validitas data penelitian. Hewan yang mengalami stres kronis menunjukkan perubahan fisiologis seperti gangguan fungsi imun, perubahan metabolisme, dan aktivasi berkepanjangan hormon stres yang dapat mempengaruhi hasil penelitian (Bailey, 2018). Kondisi stres juga meningkatkan variabilitas data antar individu, sehingga mengurangi reproduktibilitas penelitian dan dapat menyebabkan interpretasi hasil yang keliru (Gaskill dan Garner, 2017). Oleh karena itu, penerapan prinsip *animal welfare* bukan hanya kewajiban etis, tetapi juga kebutuhan metodologis untuk menghasilkan data penelitian yang valid dan dapat diandalkan (Würbel, 2017).

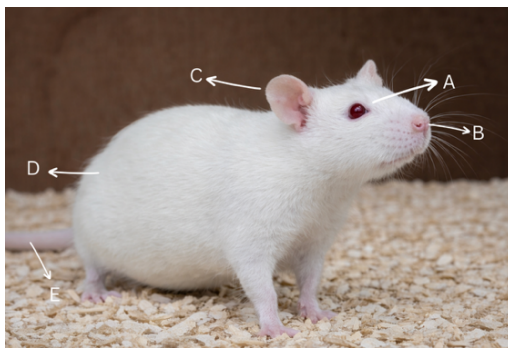
Metode *Open Field Test* (OFT) merupakan salah satu pendekatan yang digunakan untuk mengevaluasi kesejahteraan dan perilaku eksploratif tikus dalam lingkungan baru. OFT digunakan untuk menilai tingkat aktivitas, rasa ingin tahu, kecemasan, dan interaksi hewan terhadap ruang terbuka. Tikus yang mengalami stres akibat lingkungan pemeliharaan yang buruk cenderung menunjukkan penurunan eksplorasi, peningkatan perilaku pasif, atau peningkatan waktu di area tepi arena (Corredor et al., 2022). Sebaliknya, tikus dengan kondisi pemeliharaan yang memperhatikan prinsip *animal welfare* biasanya menampilkan perilaku eksploratif yang lebih aktif dan tingkat kecemasan yang lebih rendah (Sudakov et al., 2021).

Penerapan manajemen pemeliharaan tikus laboratorium di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin yang sesuai prinsip *animal welfare* diharapkan dapat menciptakan kondisi yang ideal bagi hewan untuk mengekspresikan perilaku normalnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi penerapan prinsip *animal welfare*, khususnya aspek “bebas mengekspresikan perilaku normal,” melalui observasi perilaku tikus Wistar dengan menggunakan metode *Open Field Test* (OFT). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran objektif mengenai tingkat *animal welfare* laboratorium di fasilitas penelitian serta menjadi dasar perbaikan manajemen pemeliharaan hewan di masa mendatang.

1.2 Teori

1.2.1 Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Rattus (tikus) adalah hewan uji yang biasa digunakan dalam penelitian ilmiah. Karakteristiknya sebagian besar sudah diketahui, perawatannya mudah, dan hewan ini cukup sesuai untuk berbagai jenis penelitian. Tikus dan manusia memiliki kesamaan dalam sistem reproduksi, sistem saraf, penyakit (seperti kanker dan diabetes), dan kecemasaannya karena kesamaan organisasi DNA dan ekspresi gen. Gen yang sebanding dengan gen tikus ditemukan pada 98% gen manusia (Rejeki et al., 2018). Tikus Wistar adalah salah satu hewan coba yang paling banyak digunakan sebagai model dalam penelitian. Galur ini terus dibiakkan hingga kini karena ideal sebagai hewan model untuk berbagai tujuan penelitian (Fitria dan Sarto, 2014). Hewan ini paling aktif di malam hari, namun sebagian besar eksperimen pada hewan ini dilakukan pada siang hari (Francois et al., 2022).



Gambar 1. Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*); A(Mata Merah), B(Hidung Pink), C(Telinga Merah Muda dan Lebar), D(Berbulu Putih), E(Ekor Panjang dan Tidak Berbulu) (Komang et al, 2014)

Tubuh tikus ditutupi dengan kulit berbulu yang merupakan ciri khas mamalia. Tikus memiliki telinga yang pendek dan ekor yang panjang. Batas-batas antara kepala (*head*), leher (*serviks*), badan (*torso*), ekor yang belum sempurna (*sisi ekor*), dan anggota badan (*limbs*) terlihat jelas. Karakteristik Morfologi dari tikus putih antara lain memiliki hidung tumpul seberat 150- 600 gram dan tubuh besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan batang bawah. Ekor dan telinganya relatif kecil, tidak lebih besar dari 20–23 mm. Tikus memiliki penglihatan yang buruk dan buta warna. Mengimbangi dengan indra penciuman, sentuhan, dan pendengaran yang kuat. Gerakan di malam hari terutama dikendalikan oleh kumis dan bulunya untuk tumbuh (Aisyah et al., 2023). Menurut Rejeki et al. (2018), berikut taksonomi dari tikus:

Kindom	: animalia
Filum	: <i>chordate</i>
Kelas	: mamalia
Ordo	: <i>rodentia</i>
Famili	: <i>murinane</i>
Genus	: <i>rattus</i>
Spesies	: <i>rattus norvegicus</i>

1.2.2 Aspek Animal Welfare

Animal welfare, yang juga dikenal sebagai kesejahteraan hewan, adalah suatu konsep yang melibatkan berbagai aspek, termasuk kesehatan fisik dan mental, serta elemen-elemen seperti kenyamanan, serta bebas dari rasa lapar, haus, dan penyakit. Pemerintah Indonesia telah mengeluarkan regulasi mengenai *animal welfare*, yang diatur dalam Pasal 1 Ayat 42 Undang-Undang Republik Indonesia No. 41 Tahun 2014. Pasal ini menyatakan bahwa semua hal yang berkaitan dengan kondisi fisik dan mental hewan harus diukur berdasarkan perilaku alaminya, dan perlu diterapkan serta ditegakkan untuk melindungi hewan dari perlakuan yang tidak semestinya oleh manusia (Mayasari et al., 2023).

Prinsip “*Five Freedoms of Animal Welfare*” atau lima kebebasan kesejahteraan hewan merujuk pada pedoman dari *Farm Animal Welfare Council*

yang menjamin *animal welfare* berdasarkan lima asas. Pertama, hewan harus bebas dari rasa lapar dan haus, dengan akses yang memadai untuk makan dan minum sesuai kebutuhan mereka. Kedua, mereka harus bebas dari ketidaknyamanan, yaitu memiliki tempat tinggal yang baik dengan biosekuriti yang memadai. Ketiga, hewan harus dilindungi dari rasa sakit, cedera, dan penyakit melalui pencegahan dan pengobatan yang tepat. Keempat, mereka harus bebas dari rasa takut dan stres, dengan upaya untuk meminimalkan penderitaan. Terakhir, hewan harus dapat mengekspresikan perilaku alaminya, yang berarti mereka memerlukan ruang gerak dan fasilitas yang sesuai dengan kebutuhan mereka (Mayasari et al., 2023).

Hewan coba yang digunakan pada penelitian akan mengalami penderitaan seperti: ketidaknyamanan (*inconvenience*), ketidakselesaan (*discomfort*), kesusahan (*distress*), rasa nyeri (*pain*), dan pada akhirnya kematian (*death*). Dalam pelaksanaan penelitian, peneliti harus bekerja berdasarkan protokol yang sesuai dengan standar etik yang berlaku. Semua studi yang melibatkan hewan coba harus dievaluasi untuk melihat apakah prinsip 3R dapat diaplikasikan. Prinsip adalah sebagai berikut: *Replacement*, sering diartikan sebagai penggunaan sistem tidak-hidup (mati) sebagai alternatif, misalnya, sebuah model komputer atau manekin. Hal ini juga dapat berarti penggantian vertebrata menjadi invertebrata. Ini juga mencakup penggunaan kultur sel dan jaringan. *Reduction* berarti menurunkan jumlah hewan coba yang digunakan tanpa mengurangi informasi yang berguna. Hal ini mungkin dicapai dengan mengurangi jumlah variabel melalui desain eksperimental yang baik, menggunakan statistik yang tepat, menggunakan genetik hewan yang homogen, dan memastikan bahwa kondisi eksperimen terkontrol dengan baik. *Refinement* berarti perubahan dalam beberapa aspek perlakuan yang berpotensi menimbulkan rasa sakit atau stres jangka panjang, memperlakukan hewan coba secara manusiawi (*humane*), dan memelihara (Yurista et al., 2016).

1.2.3 Penerapan *Animal Welfare* dalam Pengelolaan Pemeliharaan Hewan Laboratorium

Tikus yang digunakan dalam penelitian sebagai hewan model merupakan spesies *Rattus norvegicus*. Hewan ini tergolong dalam kelas mamalia dan ordo rodensia. *Rattus norvegicus*, yang dikenal sebagai tikus norwegia, beradaptasi untuk hidup di liang tanah dan telah melalui proses evolusi. Hewan laboratorium secara spesifik adalah suatu kondisi hewan laboratorium yang dipelihara khusus untuk tujuan percobaan, memiliki keadaan fisiologis dan psikologi yang sesuai untuk menunjang kualitas hidupnya yang sesuai dengan 'Lima Kebebasan'. Prinsip lima kebebasan mencakup bebas dari rasa lapar dan haus, bebas dari rasa tidak nyaman, bebas dari luka, penyakit dan sakit, bebas dari rasa takut dan penderitaan, dan bebas mengekspresikan perilaku normal (Mutiarahmi, 2021). Pengelolaan hewan laboratorium mencakup:

1.2.3.1 Kandang Tikus

Tikus harus ditempatkan dalam kandang dengan populasi yang tidak terlalu padat untuk meminimalkan perilaku agresif di antara mereka. Luas lantai kandang untuk kelompok hingga lima tikus seberat 250-300 gram sebaiknya mencapai 1.800 cm²,

dengan tinggi kandang sekitar 22 cm agar tikus dapat berdiri tegak. Kandang harus terbuat dari plastik dan dilengkapi dengan *wire mesh* di bagian atas untuk ventilasi yang baik, serta suhu ruangan yang direkomendasikan antara 20-26°C dan kelembapan 40-70%. Selain itu, penting untuk melengkapi kandang dengan alas *absorbent*, seperti serpihan kayu, dan bahan untuk bersarang yang memberikan manfaat fisiologis dan psikologis bagi tikus. Karena gigi depan tikus terus tumbuh sepanjang hidupnya, penyediaan barang keras untuk menggigit, seperti balok kayu, sangat diperlukan. Pengayaan, seperti shelter plastik untuk aktivitas fisik, juga harus disertakan untuk mendukung *animal welfare* (Noor et al., 2022). Pertimbangan dalam pemilihan kandang tikus sangat sederhana. Kriteria yang harus dipenuhi berupa kemudahan dalam membersihkan kandang, menghemat tempat serta murah. Adapun faktor yang harus diperkirakan dalam membuat kandang tikus yaitu bahan kandang, ventilasi, sanitasi kandang dan ukurannya. Kandang tikus yang baik adalah kandang yang dapat melindungi hewan dari angin dan perubahan pada suhu (Dhana, 2012).

1.2.3.2 Lingkungan

Parameter lingkungan merupakan aspek krusial dalam pemeliharaan hewan laboratorium yang berpengaruh langsung terhadap kesejahteraan dan validitas data penelitian. Suhu standar laboratorium (23°C) sering kali berada di bawah zona termoneutral untuk mencit dan tikus, menyebabkan *cold stress* yang berdampak pada fisiologi dan *animal welfare*. Pemeliharaan pada suhu termoneutral (30°C untuk mencit) dapat meningkatkan kesejahteraan dengan mengurangi *cold stress*, menurunkan konsumsi pakan kompensatori, dan mengurangi level kortikosteron (Villiger et al., 2025).

Kelembaban relatif perlu dikontrol pada kisaran yang sesuai untuk mencegah masalah kesehatan dan menjaga kenyamanan hewan. Parameter lingkungan yang tidak tepat dapat mempengaruhi respons fisiologis hewan dan mengubah hasil penelitian (Dauchy et al., 2024). Pencahayaan merupakan zeitgeber eksternal utama yang mengatur ritme sirkadian pada hewan. Gangguan pada siklus cahaya-gelap, seperti paparan cahaya selama fase gelap (*light at night*), dapat menyebabkan disrupsi ritme sirkadian yang berdampak pada disregulasi metabolisme, perubahan ekspresi gen *circadian clock* seperti *Per1* dan *Per2*, gangguan sekresi hormon metabolik, dan perubahan fungsi imun (Fonken dan Nelson, 2014).

1.2.3.3 Pemberian Pakan Tikus

Pemberian pakan dan minum pada hewan harus mencukupi untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup yang optimal, dengan menyediakan air segar dan nutrisi yang memadai. Pakan dan air minum sebaiknya disediakan secara *ad libitum*, kecuali ada izin khusus dari komisi etik hewan. Variasi makanan penting untuk disediakan, termasuk pelet komersial, biji bunga matahari kering, jagung rebus, dan sayuran segar. Selain itu, pakan tikus sebaiknya tidak hanya diletakkan di tempat pakan, tetapi juga ditaburkan di bedding lantai kandang untuk meningkatkan minat makan, mendorong perilaku mencari makan, dan menunjukkan postur normal selama makan. Pola makan nokturnal tikus juga perlu diperhatikan dalam desain penelitian,

terutama saat memberikan obat melalui pakan (Noor et al., 2022).

Menurut Dhana, (2012) Tikus merupakan hewan omnivora dan memakan hampir apa saja jenis makanan. Tikus perlu makan dalam jumlah yang kecil beberapa kali sehari, jika tidak makan maka perut akan mengalami kekosongan setelah enam jam tanpa asupan makanan. Nutrisi standar yang dibutuhkan oleh tikus setiap harinya adalah:

Tabel 1. Nutrisi Standar Tikus Putih (Dhana, 2012)

No.	Nutrisi	Persentase (%)
1	Protein	20-25%
2	Lemak	5-12%
3	Serat kasar	2,5%
4	Karbohidrat	45-60%

1.2.4 Perilaku Alami Tikus

Perilaku alami tikus Wistar merupakan indikator utama kesejahteraan. Dalam kondisi alami, tikus menunjukkan perilaku eksploratif, sosial, dan perawatan diri yang kompleks. Mereka mencari makan, menggali, membangun sarang, serta melakukan interaksi sosial seperti *allogrooming* dan bermain. Ketika tikus tidak dapat menampilkan perilaku ini akibat keterbatasan ruang atau lingkungan yang monoton, muncul tanda-tanda stres kronis dan perilaku abnormal seperti menggigit jeruji kandang, berputar-putar, atau hiperaktivitas (Schweinfurth, 2020).

Menurut penelitian Ratuski & Weary (2022), pemberian kesempatan bagi tikus untuk menggali dan membuat sarang merupakan bentuk ekspresi perilaku alami yang paling penting. Aktivitas tersebut tidak hanya berfungsi untuk kenyamanan fisik, tetapi juga memberikan stimulasi mental dan sosial yang mendukung kesejahteraan. Selain itu, perilaku *grooming* baik individual maupun sosial merupakan indikator keseimbangan emosional. *Grooming* yang meningkat selama proses adaptasi sering menandakan usaha hewan menstabilkan keadaan fisiologisnya (Rojas-Carvajal et al., 2018). Oleh karena itu, pengamatan perilaku alami dapat dijadikan salah satu tolok ukur untuk menilai efektivitas manajemen pemeliharaan.

1.2.5 Open Field Test (OFT)

Open Field Test (OFT) adalah uji standar untuk mengevaluasi perilaku eksplorasi, kecemasan, dan aktivitas motorik hewan pengerat. Dalam pengujian, tikus ditempatkan di arena terbuka untuk mengamati perilaku seperti jarak tempuh, waktu di pusat arena, jumlah *rearing*, *grooming*, dan *freezing*. OFT tidak hanya mencerminkan kondisi emosional hewan, tetapi juga dapat digunakan untuk mengevaluasi dampak kondisi pemeliharaan terhadap perilaku (Sudakov et al., 2021).

Rojas-Carvajal et al. (2018) menemukan bahwa tikus yang mengalami *environmental enrichment* menunjukkan proses habituasi lebih cepat dan pola *grooming* yang lebih kompleks, yang menandakan penurunan tingkat stres. Sebaliknya, tikus dari kandang minimalis cenderung menunjukkan perilaku

thigmotaxis (lebih banyak di tepi arena) dan waktu eksplorasi yang lebih sedikit di pusat arena. Hal ini menunjukkan bahwa hasil OFT bisa menjadi cerminan langsung dari kualitas pemeliharaan hewan. Dengan demikian, evaluasi manajemen pemeliharaan dapat dilakukan secara tidak langsung melalui respons perilaku dalam OFT.

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dipaparkan maka dapat tujuan penelitian pada penelitian ini sebagai berikut:

1. Untuk mengevaluasi manajemen pemeliharaan tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) berdasarkan prinsip *animal welfare*, khususnya aspek kebebasan mengekspresikan perilaku normal.
2. Untuk mengetahui integrasi multi-parameter dan dan implikasi pemeliharaan hewan lab dengan metode *animal welfare* berdasarkan hasil *Open Field Test* (OFT).

1.3.2 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat menjadi dasar evaluasi bagi pengelola fasilitas penelitian dan laboratorium hewan di institusi pendidikan dalam memperbaiki standar manajemen pemeliharaan. Dengan penerapan prinsip *animal welfare* yang lebih baik, kualitas hasil penelitian yang menggunakan hewan laboratorium juga akan meningkat karena menurunnya pengaruh stres dan perilaku abnormal.

2. Manfaat Akademis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya literatur ilmiah di bidang *animal welfare* laboratorium, khususnya terkait penerapan prinsip *animal welfare* pada tikus Wistar. Selain itu, penelitian ini dapat menjadi acuan bagi penelitian selanjutnya yang menggunakan metode *Open Field Test* dalam menilai aspek perilaku dan *animal welfare*.

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2024 di Animal Laboratorium Terpadu Rumah Sakit Hewan Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan yaitu *Aluminium foil (Clinpage)*, Autoklaf (*Coremedix*), higrotermometer (HCT-1), kandang tikus 40 cm² (40 × 31 × 13), tempat makan tikus (*Chiro plate*), timbangan digital (samono), Tempat minum (*Sweet Bootle*), dan saringan. Bahan yang digunakan dua puluh empat ekor tikus wistar, pakan standar, sekam, air, alkohol (*Onemed*), dan tisu (*Nice*).

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk melihat behavior: perilaku alami tiap kelompok tikus wistar (*Rattus novergicus*) terhadap penerapan aspek *animal welfare* dalam manajemen pemeliharaan hewan laboratorium di Animal Lab Rumah sakit hewan Universitas Hasanuddin.

2.4 Materi Penelitian

2.4.1 Populasi dan Sampel

Alokasi sampel penelitian menggunakan *Simple Random Sampling*. Sampel diambil dari populasi tikus wistar dan besar sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer:

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

Keterangan:

n: jumlah sampel

t: jumlah kelompok/perlakuan

Dengan menggunakan rumus di atas, maka dapat diperoleh jumlah sampel perkelompok, yaitu:

$$(n-1)(8-1) \geq 15$$

$$(7n-7) \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

$$n \approx 3$$

Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini mengacu pada Prinsip *reduction* dalam konsep 3R menekankan bahwa jumlah hewan uji harus dibatasi pada tingkat minimum yang masih mampu menghasilkan data yang valid secara ilmiah. Menurut Herrmann dan Flecknell (2019), pengurangan jumlah hewan diperbolehkan dan dianjurkan apabila desain penelitian dibuat efisien dan setiap hewan dimanfaatkan secara maksimal untuk memperoleh informasi yang relevan. Salah satu cara paling efektif untuk mencapai hal tersebut adalah dengan mengukur beberapa parameter dari individu hewan yang sama, yang dikenal sebagai *multiple endpoints*. Berdasarkan pertimbangan tersebut, jumlah sampel per kelompok ditetapkan $n = 2$ karena penelitian ini bersifat evaluatif dan eksploratif dalam menilai

kondisi manajemen pemeliharaan tikus wistar berdasarkan aspek animal welfare. Penggunaan uji *Kruskal–Wallis* sebagai analisis statistik non-parametrik dipandang sesuai, mengingat uji ini secara metodologis dapat digunakan pada jumlah sampel kecil (minimal 2 sampel per kelompok) dan tidak mensyaratkan distribusi data normal. Hasil analisis statistik dalam penelitian ini diinterpretasikan secara hati-hati sebagai pendukung analisis deskriptif untuk melihat kecenderungan perbedaan antar kelompok, bukan sebagai dasar penarikan kesimpulan inferensial atau kausal, sehingga tetap sejalan dengan prinsip *reduction* dalam konsep 3R.

Tabel 2. Pengelompokan Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Treatment		
	Kandang	Lingkungan	Nutrisi
1	++	*	##
2	++	*	#
3	++	**	##
4	++	**	#
5	+	**	#
6	+	**	##
7	+	*	#
8	+	*	##

Keterangan:

Kandang:

- 2 ekor, sekam steril (++)
- 4 ekor, sekam tidak steril (+)

Lingkungan:

- Suhu: 22-24°C; Kelembaban: 40-60%; Pencahayaan 12 jam siang dan 12 jam malam (**)
- Suhu: 10-15°C; Kelembaban: < 40%; Pencahayaan sepanjang hari (*)

Nutrisi:

- Diberi pakan standar 2x sehari (##)
- Diberi pakan standar 1x sehari (#)

2.5 Pelaksanaan Penelitian

2.5.1 Pemeliharaan Hewan Uji Coba

Sebelum memulai percobaan, tikus diadaptasi di dalam kandang selama 7 hari untuk penyeragaman cara hidup dan makanannya. Tiap tikus dipisah dan ditempatkan di kandangnya sendiri. Kesehatan tikus dipantau tiap harinya dan berat badan tikus ditimbang diakhir minggu. Tikus ditempatkan secara individual dalam kandangnya masing-masing dan diberikan pakan standar serta air minum secara *ad libitum*.

2.5.2 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan selama 3 minggu pengamatan setelah masa adaptasi hewan uji selama 7 hari. Selama periode penelitian, setiap tikus Wistar diuji menggunakan metode *Open Field Test* (OFT) sebanyak satu kali setiap minggu, yaitu pada minggu ke-1, ke-2, dan ke-3. Pengujian dilakukan secara individual untuk

menghindari pengaruh interaksi sosial terhadap perilaku. Setiap sesi *Open Field Test* berlangsung selama 10 menit per ekor, dengan waktu pelaksanaan yang konsisten setiap minggu guna meminimalkan pengaruh ritme sirkadian terhadap perilaku tikus. Arena OFT dibersihkan sebelum dan sesudah pengujian setiap individu untuk menghilangkan sisa bau yang dapat memengaruhi hasil pengamatan.

Seluruh aktivitas tikus selama pengujian direkam menggunakan kamera video, kemudian hasil rekaman dianalisis menggunakan *software toxtrac v 1.1* untuk memperoleh data *peripheral time*, *total distance*, *total rearing*, dan *total grooming*. Analisis kuantitatif data dilakukan menggunakan aplikasi SPSS dengan metode *Kruskal Wallis* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

2.5.3 Pengamatan Peripheral Time OFT

Pengamatan *Peripheral Time* pada *Open Field Test (OFT)* dilakukan untuk menilai respons kecemasan dan aktivitas lokomotor hewan uji. Parameter yang diamati meliputi durasi waktu yang dihabiskan hewan di area tepi arena uji sebagai indikator perilaku ansietas. Pencatatan dilakukan secara *Open Field Test (OFT)* dengan analisis menggunakan *software toxtrac v 1.1* dimana tikus akan di video secara individu selama 10 menit.

2.5.4 Pengamatan Total Distance OFT

Pengamatan *Total Distance* pada *Open Field Test (OFT)* dilakukan untuk mengukur total jarak yang ditempuh oleh hewan uji selama periode pengamatan. Parameter ini mencerminkan tingkat aktivitas lokomotor dan eksplorasi hewan. Pencatatan jarak tempuh dilakukan secara *Open Field Test (OFT)* dengan analisis menggunakan *software toxtrac v 1.1* dimana tikus akan di video secara individu selama 10 menit.

2.5.5 Pengamatan Total Rearing OFT

Total Rearing diamati sebagai jumlah perilaku berdiri dengan kedua kaki belakang (*rearing*) selama pengujian OFT. Parameter ini menggambarkan perilaku eksploratif dan respons kewaspadaan hewan terhadap lingkungan barunya. Pencatatan dilakukan dengan analisis menggunakan *software toxtrac v 1.1* dimana tikus akan di video secara individu selama 10 menit.

2.5.6 Pengamatan Total Grooming OFT

Pengamatan *Total Grooming* dilakukan untuk mencatat frekuensi perilaku membersihkan tubuh (*grooming*) yang ditunjukkan oleh hewan selama OFT. Parameter ini sering digunakan sebagai indikator kondisi emosional, stres, atau ansietas pada hewan percobaan. Pencatatan dilakukan dengan analisis menggunakan *software toxtrac v 1.1* dimana tikus akan di video secara individu selama 10 menit.

2.6 Pengamatan dan Pengukuran

Analisis data dianalisis secara deskriptif kuantitatif dengan menggunakan *kruskal wallis*, *mann-whitney test* untuk analisis setiap variabel. Serta analisis video OFT (*Open Field Test*) menggunakan *software toxtrac v1.1*.