

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1 sebagai berikut:

**Tabel 1.** Alat-alat Penelitian

No	Alat	Fungsi
1	Akuarium 60x30 cm <sup>3</sup>	Untuk tempat pemijahan ikan zebra ( <i>D. rerio</i> )
2	Cawan petri	Untuk tempat perkembangan embrio
3	Timbangan digital AND E-610i	Untuk menimbang tembakau yang dibutuhkan
4	Seser	Untuk mengambil induk ikan zebra ( <i>D. rerio</i> )
5	Gelas ukur PYREX 100 ml	Untuk mengukur air media yang dibutuhkan
6	Beaker glass	Untuk wadah telur ikan zebra ( <i>D. rerio</i> ) yang telah dipanen
7	Mikroskop binokuler merk Olympus CX-21	Untuk mengamati perkembangan embrio dan detak jantung
8	Pipet tetes 1 ml	Untuk mengambil telur saat pengamatan perkembangan embrio dan detak jantung
9	Objek glass	Untuk meletakkan telur saat pengamatan perkembangan embrio dan detak jantung
10	Handtally counter merk KW-triO 2410	Untuk membantu menghitung detak jantung
11	Selang	Untuk memanen telur didalam akuarium dengan cara menyifon
12	Kamera	Untuk mendokumentasikan hasil pengamatan perkembangan embrio dan detak jantung
13	Lampu	Untuk membantu penerangan saat menghitung derajat penetasan
14	Alat tulis	Untuk mencatat hasil pengamatan
15	Stopwatch	Untuk menghitung waktu yang ditentukan saat pengamatan detak jantung
16	DO meter merk EUTECH Cybercan	Untuk mengukur kandungan oksigen terlarut dalam perairan

	DO 300	
17	Thermometer Hg	Untuk mengukur suhu dalam perairan
18	<i>Undergravel</i>	Untuk membatasi induk agar tidak memakan telurnya sendiri
No	Alat	Fungsi
19	Tanaman palsu	Untuk merangsang induk ikan zebra ( <i>D. rerio</i> ) memijah
20	Nampan	Untuk meletakkan alat dan bahan

### 3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2 sebagai berikut:

**Tabel 2.** Bahan-bahan Penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Induk jantan ikan zebra ( <i>Danio rerio</i> )	Sebagai bahan yang akan diujikan
2	Induk betina ikan zebra ( <i>Danio rerio</i> )	Sebagai bahan yang akan diujikan
3	Trashbag	Sebagai penutup akuarium saat pemijahan ikan zebra ( <i>D. rerio</i> )
4	Kertas label	Sebagai penanda pada cawan petri
5	Tisu	Sebagai pembersih
6	Sterofom	Sebagai alas untuk akuarium
7	Air tawar steril	Sebagai media perkembangan embrio
8	Puntung rokok	Sebagai bahan yang akan diujikan
9	Plastik	Sebagai wadah air untuk perhitungan fluktuasi DO
10	Air	Sebagai media hidup ikan zebra ( <i>D. rerio</i> )

### 3.2 Metode Penelitian

Pada penelitian ini metode yang digunakan yaitu metode eksperimen. Menurut Alsa (2004), hakekat penelitian eksperimen (*experimental research*) adalah meneliti pengaruh perlakuan terhadap perilaku yang timbul sebagai akibat perlakuan. Akibat perlakuan yang timbul akan menunjukkan sebuah hubungan.

Tujuan eksperimen adalah untuk mendapatkan hasil yang menunjukkan sebuah hubungan sebab akibat.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Idha *et al.* (2013), rancangan acak lengkap adalah suatu rancangan yang paling sederhana, dimana perlakuan dilibatkan sepenuhnya secara acak pada unit-unit eksperimen. Menurut Sastrosupadi (2000), Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca, dan peternakan. Karena media homogen maka media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati dan model untuk RAL adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

$i$  = 1,2, .... T

$J$  = 1,2 .... r

$Y_{ij}$  = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

$\mu$  = nilai tengah umum

$T_i$  = pengaruh perlakuan ke-i

$\epsilon_{ij}$  = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j.

Penentuan dosis dan waktu perlakuan yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada hasil penelitian pendahuluan yang telah dilakukan sebelum penelitian inti. Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan

menggunakan dosis 350 ppm. Untuk mendapatkan perlakuan lama paparan paling toksik, maka dalam penelitian ini digunakan lama paparan sebagai berikut:

Perlakuan A : Paparan selama 36 jam

Perlakuan B : Paparan selama 72 jam

Perlakuan C : Paparan selama 108 jam

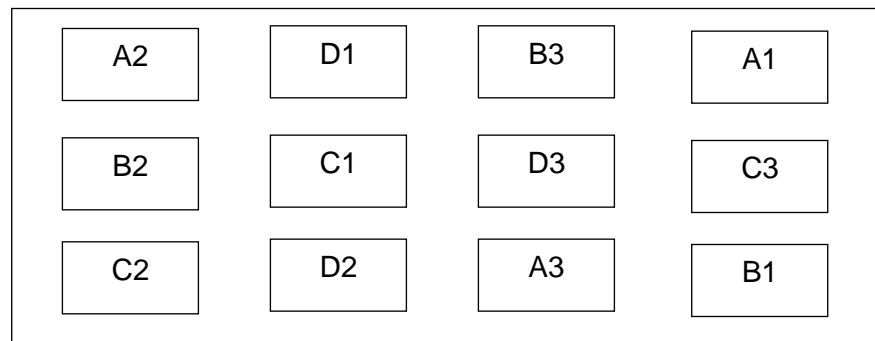
Perlakuan D : Paparan selama 144 jam

Layout percobaan yang digunakan dalam penelitian disajikan dalam Tabel 3.

**Tabel 3.** Layout Percobaan

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3

Denah penelitian yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pengacakan disajikan dalam Gambar 3.



**Gambar 3.** Denah Penelitian

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Wadah

Persiapan wadah pada penelitian ini dilakukan sesuai pernyataan Adyakza *et al.* (2015), langkah pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah persiapan

wadah sebagai tempat pemijahan induk ikan zebra (*D. rerio*). Persiapan wadah dimulai dari mempersiapkan akuarium berukuran 60x30 cm<sup>2</sup>. Akuarium dicuci menggunakan sabun cuci kemudian dikeringkan dibawah matahari selama 24 jam. Setelah akuarium kering, dimasukkan *undergravel* ke dalam akuarium agar telur yang keluar langsung jatuh ke dasar dan tidak dimakan oleh indukan. Kemudian akuarium diisi air  $\frac{3}{4}$  bagian. Selanjutnya dimasukkan aerasi sebagai penyuplai oksigen. dan substrat pemijahan yaitu menggunakan tanaman palsu untuk merangsang induk untuk memijah. Setelah itu, dilakukan pemasangan lampu untuk merangsang proses pemijahan ikan zebra.

#### **3.4.2 Pemilihan Induk Ikan Zebra (*D. rerio*) yang Matang Gonad**

Ikan uji diperoleh dari Pasar Ikan Hias Gunungsari, Surabaya. Pemilihan induk dilakukan dengan pengamatan secara morfologi menurut Alrifly (2016), ciri-ciri morfologi induk yang telah matang gonad antara jantan dan betina berbeda. Induk jantan memiliki ciri-ciri morfologi yaitu badan ramping, perut tidak membuncit, warna cerah, lubang urogenital berwarna pucat dan mengeluarkan sperma. Sedangkan pada induk betina dicirikan dengan bentuk tubuh yang lebih besar, perut membuncit dan sedikit lembek, lubang urogenital berwarna kemerahan dan mengeluarkan telur. Pergerakan induk baik induk jantan maupun induk betina sama-sama memiliki pergerakan yang lincah.

#### **3.4.3 Proses Pemijahan**

Setelah induk siap untuk dilakukan pemijahan, maka induk dimasukkan ke dalam akuarium. Pemijahan dilakukan secara masal karena ikan zebra (*D. rerio*) memiliki sifat memilih pasangan sendiri apabila dipijahkan secara langsung. Pemijahan dilakukan secara alami dengan perbandingan induk jantan dan betina 2:1. Selama pemijahan suhu dipertahankan pada suhu 25-28°C (Adyakza *et al.*,

2015). Pemijahan berlangsung dari sore sampai dini hari. Biasanya dicirikan dengan induk jantan yang akan mengejar induk betina. Kemudian menggesekkan tubuhnya secara perlahan pada tubuh induk betina untuk merangsang mengeluarkan yang akan dibuahi oleh induk jantan.

#### **3.4.4 Pembuatan Larutan Limbah Tembakau Puntung Rokok**

Langkah awal untuk pembuatan larutan limbah puntung rokok adalah menyiapkan limbah puntung rokok yang telah dihisap oleh konsumen. Puntung rokok yang digunakan pada penelitian adalah puntung rokok merk x dengan kadar nikotin 1,8 mg. Kemudian diambil tembakau dari puntung rokok dan dipotong kecil-kecil. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 350 mg/l. Setelah tembakau dari puntung rokok disiapkan, kemudian ditimbang menggunakan timbangan digital dengan ketelitian  $10^{-4}$  sebanyak 350 mg. Tembakau yang telah ditimbang dilarutkan pada air steril sebanyak 1 L. Pembuatan larutan limbah tembakau puntung rokok dilakukan dengan metode dekoktasi (Adyakza *et al.*, 2015), metode dekoktasi adalah mengekstraksi dengan air pada suhu  $90^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Hasil dekoktasi didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Kemudian hasil dekoktasi di paparkan pada embrio ikan zebra (*D. rerio*) pada masing-masing perlakuan.

#### **3.4.5 Pembuahan**

Induk betina mengeluarkan telur diikuti dengan induk jantan mengeluarkan sperma sehingga terjadi fertilisasi. Embrio yang telah terbuahi kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri yang telah berisi larutan tembakau puntung rokok dengan masing-masing perlakuan. Pada setiap cawan petri diisi sebanyak 20 buah. Setelah itu, diambil 1 embrio menggunakan pipet tetes kemudian di letakkan di objek glass untuk pengamatan perkembangan embrio dan dilakukan dokumentasi disetiap

pengamatan. Setelah itu diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40X. Telur ikan zebra yang terbuahi ditandai dengan warna transparan. Menurut Kordinata (2017), telur yang berhasil dibuahi ditandai dengan warna transparan dan kantung amnion utuh.

### **3.5 Parameter Uji**

#### **3.5.1 Parameter Utama**

##### **a. Perkembangan Embrio**

Penelitian ini menggunakan perkembangan embrio sebagai parameter utama. Pengamatan perkembangan embrio dilakukan selama 1 jam sekali setelah fertilisasi selama 20 jam pertama. Selanjutnya pengamatan dilakukan setiap 4 jam sekali hingga larva berumur 2 hari dan kuning telur larva ikan habis (Sekarsari, 2006). Perkembangan embrio yang diamati antara lain: morula, blastula, gastrula, neurula, organogenesis hingga menetas dengan menggunakan mikroskop dan dilakukan juga pencatatan perbedaan waktu perkembangan fase embrio untuk menentukan kecepatan perkembangan embrio pada paparan tembakau rokok. Kemudian diambil foto perkembangan embrionya sampai dengan telur menetas sebagai data utama.

##### **b. Derajat Penetasan (HR)**

Parameter utama selain perkembangan embrio adalah derajat penetasan (HR). Perhitungan dilakukan pada akhir pengamatan (144 Jam). Ciri-ciri telur menetas yaitu ketika selaput korion telur pecah dan larva bergerak aktif. Perhitungan derajat penetasan telur pada masing-masing perlakuan dilakukan dengan menggunakan rumus sesuai pernyataan Marbun (2015), yaitu:

$$\text{Daya tetas (\%)} = \frac{\text{Jumlah telur yang menetas}}{\text{Jumlah telur yang ditebar}} \times 100\%$$

### c. Fluktuasi Konsumsi DO dalam Media

Parameter utama selanjutnya adalah fluktuasi konsumsi DO dalam media. Fluktuasi konsumsi DO dalam media adalah konsumsi DO yang dibutuhkan embrio untuk berkembang dalam media. Wadah yang digunakan untuk perlakuan adalah plastik kecil. Air dengan paparan tembakau rokok dimasukkan ke dalam plastik, kemudian diukur oksigen terlarut dan dicatat sebagai  $DO_0$ . Selanjutnya embrio ikan zebra dimasukkan ke dalam plastik dan ditutup sampai rapat. Sebelum plastik ditutup dipastikan terlebih dahulu bahwa tidak adanya oksigen yang masuk ke dalam plastik. Oksigen terlarut diukur kembali jika sudah melewati masing-masing perlakuan waktu sebagai  $DO_t$ . Fluktuasi oksigen dihitung dengan menggunakan rumus sesuai pernyataan Santoso (2011), yaitu:

$$\Delta DO = DO_0 - DO_t$$

### d. Frekuensi Denyut Jantung Embrio

Pengamatan frekuensi denyut jantung dihitung pada waktu yang ditentukan. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran objektif 40x. Frekuensi denyut jantung dihitung selama 15 detik kemudian dikalikan 4 dengan menggunakan *hand counter*. Perhitungan dilakukan pada 1 embrio setiap perlakuan dan diulang sebanyak tiga kali (Kowan *et al.*, 2015).

### 3.5.2 Parameter Penunjang

Penelitian ini menggunakan kualitas air sebagai parameter penunjang. Pengamatan kualitas air meliputi suhu, pH dan DO (Oksigen terlarut). Pengukuran



kualitas air dilakukan sebanyak dua kali sehari, yaitu pada pagi pukul 07.00 WIB dan sore hari pukul 15.00 WIB.

### **3.6 Analisis Data**

Analisis data yang didapat dari penelitian ini dianalisis pengaruhnya pada masing-masing perlakuan dengan menganalisa grafik dan tabel waktu fase perkembangan embrio telur dari setiap perlakuan paparan tembakau rokok yang diberikan. Berdasarkan analisa grafik tersebut maka dapat diketahui telur manakah yang mengalami perlambatan perkembangan berdasarkan perlakuan paparan tembakau rokok dengan waktu yang berbeda. Dari setiap fase perkembangan (fase pembelahan-menetas) akan dianalisis. Semua analisis dihitung dan diuji secara statistik dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) dan 99% ( $\alpha = 0,01$ ) dengan menggunakan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan pada masing – masing perlakuan. Apabila dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh nyata atau berbeda sangat nyata ( $F$  hitung  $>$   $F$  tabel) maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menggunakan aplikasi SPSS 16.