

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen adalah observasi di bawah kondisi buatan (*artificial condition*), adanya replikasi atau pengulangan serta adanya kontrol (Nazir, 1988).

B. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain rancangan acak lengkap (*completely randomized design*). Desain ini digunakan karena percobaan dilakukan dalam laboratorium dengan kondisi lingkungan dapat dikontrol (Nazil, 1983). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui nilai ketertarikan kupu-kupu jantan *Papilio memnon* terhadap perbandingan bahan uji berupa ekstraksi abdomen langsung dari betina *Papilio memnon*, betina “Virgin” hidup *Papilio memnon*, jantan hidup *Papilio memnon* dan larutan heksan sebagai kontrol yang diujikan. Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah kupu-kupu *Papilio memnon* “Virgin” atau kupu-kupu yang setelah dari kepompong dan 2-3 hari dalam kurungan yang sudah dipisahkan jantan dan betinanya serta diberi pakan berupa cairan sukrosa setiap harinya. Kupu-kupu yang diambil sebagai sampel adalah hasil pemeliharaan pada fase instar “ulat”, di dalam prosedur penelitian akan dijelaskan lebih rinci bagaimana proses penggunaan sampel hingga menjadi bahan uji.

Penelitian ini menggunakan bahan uji berupa ekstrak kelenjar feromon betina “virgin”, betina hidup “virgin” dan jantan hidup “virgin”, serta larutan heksan yang dibandingkan dan melihat nilai ketertarikan kupu-kupu jantan *Papilio memnon* (Tabel 3.2). Untuk keperluan kelengkapan data pada penelitian ini peneliti melampirkan data pengukuran abiotik berupa data faktor klimatik yang diukur untuk mengetahui rantang suhu dan kelembapan udara yang dibutuhkan ulat (instar) untuk menjadi kepompong (pupa) hingga menjadi kupu-kupu (imago) pada Tabel 3.1.

Pada penelitian ini waktu pengujian dilakukan selama 5 hari yang menyesuaikan kesediaan bahan dan sampel yang diuji dengan setiap hari melakukan pengujian perbandingan bahan uji. Setiap perlakuan disusun sebanyak 5 kombinasi dengan kontrol.

Adapun jumlah pengulangan berdasarkan pada perhitungan dalam rumus (Gomez & Gomez, 1985; Sugandi & Sugiarto, 1994) :

$$(t)(r) - 1 \geq 24$$

$$(5)(r) - 1 \geq 24$$

$$5r \geq 24 + 1$$

$$5r \geq 25$$

$$r \geq 5$$

Keterangan :	r	= jumlah pengulangan
	t	= jumlah perlakuan
	24	= Faktor nilai derajat kebebasan

Berdasarkan perhitungan tersebut maka penelitian ini dilakukan dengan minimal 5 kali pengulangan atau lebih. Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah nilai ketertarikan (IA) kupu-kupu jantan *Papilio memnon* terhadap ekstraksi kelenjar feromon seks langsung dari betina “Virgin” *Papilio memnon* dengan bahan uji perbandingan di laboratorium dan di lapangan. Data penelitian ini akan diolah dengan menggunakan *software SPSS release for windows* versi 23 dengan menggunakan uji normalitas (*Lil-liefors*), dan uji homogenitas (*Levene Statistic*) untuk mengetahui apakah data penelitian yang telah didapat terdistribusi normal dan homogen. Data yang telah didapat kemudian diuji dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbandingan rata-rata pada tiap kelompok perlakuan.

Ulat “Instar” *Papilio memnon* yang digunakan merupakan hasil penemuan dan pencarian dengan menggunakan metode eksplorasi pada tanaman *Citrus sp.*

dan didapat sebanyak 65 ulat, kemudian ulat tersebut diletakan kedalam toples yang sudah dipersiapkan berdasarkan ukuran dan umur ulat. Pemeliharaan ulat hingga menjadi serangga dewasa (imago) berupa kupu-kupu betina *Papilio memnon* kemudian diekstrak bagian abdomen segmen 6-8 menggunakan heksan, dianalisis dengan *Gas Chromatography Mass Spectrum* (GCMS) dan diamati ada tidaknya peningkatan kandungan bioaktif atau biokhemis senyawa alkohol dan aldehid pada setiap perlakuan.

Tabel 3.1. Lembar Pengamatan Faktor Klimatik Laboratorium Penangkaran

No	Keterangan Kegiatan	Pengukuran Faktor Klimatik	
		Suhu Udara (°C)	Kelembaban Udara (%)
1			
2			

Tabel 3.2. Lembar Pengamatan Pengujian Feromon Seks *Papilio memnon*
(Data Pengulangan)

No	Perbandingan Bahan Uji	Waktu Pengamatan	Nilai Ketertarikan Pengulangan Pengujian (/6menit)				
			1	2	3	4	5
1	Ekstrak Kelenjar Feromon Seks VS Larutan Heksan	09.30-10.00					
		10.00-10.30					
		10.30-11.00					
		11.00-11.30					
		11.30-12.00					

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama lima bulan dari bulan Maret hingga Juli 2017. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Riset Lingkungan Departemen Biologi, FPMIPA UPI dan penangkaran kupu-kupu Panaruban, Cicadas, Kecamatan Sagalaherang, Kabupaten Subang dimana kedua lokasi tersebut merupakan tempat melakukannya pengujian dan untuk mencari serta mengambil fase ulat “instar” kupu-kupu *Papilio memnon* untuk di *rearing* serta tanaman inangnya. Untuk laboratorium tempat meletakkan kandang-kandang eksperimen yang berupa toples

Iqbal, 2018

PENGUJIAN FEROMON SEKS PADA KUPU-KUPU *Papilio memnon* Linn. (LEPIDOPTERA : PAPILIONIDAE) DI LABORATORIUM

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

D. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel yang digunakan dalam penelitian adalah kupu-kupu jantan dan kupu-kupu betina *Papilio memnon* sebanyak 65 ekor. Populasi kupu-kupu yang digunakan bersal dari hasil pemeliharaan mulai fase ulat dan fase kepompong di Penangkaran Butterfly Haven, Kampung Panaruban, Desa Cicadas, Kecamatan Sagalaherang, Kabupaten Subang, Jawa Barat.

E. Variabel Penelitian

a. Variabel bebas :

Ekstak feromon seks yang digunakan adalah hasil ekstraksi kelenjar dari abdomen betina “virgin” kupu-kupu *Papilio memnon* hasil pemeliharaan mulai fase ulat dan fase kepompong di dalam Penangkaran.

b. Variabel terikat :

Waktu prilaku memanggil dan nilai ketertarikan jantan *Papilio memnon* terhadap bahan uji di laboratorium dan di lapangan.

F. Instrumen Penelitian

a. Alat dan Bahan

Tabel 3.3. Alat yang digunakan pada Penelitian

No	Nama Alat	Spesifikasi	Fungsi	Jumlah Pemakaian
1	Pot salep bening	Toples kaca bening (Ø = 3 cm; t =5cm)	Untuk mengkatalisasi reagen dengan kelenjar feromon	10 botol
2	Toples plastik	Toples plastik bening ukuran 10L	Sebagai kandang eksperimen	± 5 botol
3	Botol vial	Botol kaca dengan tutup karet berukuran 100ml	Tempat penyimpanan akhir dari ekstraksi kelenjar feromon	± 5 botol
4	Mikropipet	Ukuran 20µl, 200µl	Untuk mengukur pengambilan jumlah reagen yang dibutuhkan	1 set
5	Termohyrometer	Thermometer Hygrometer °C	Untuk mengukur kelembaban dan suhu udara	1 set
6	Tabung Y (Pipa	Pipa paralon atau plastik fiber Ø =	Sebagai arena pengujian di laboratorium	1 set

Iqbal , 2018

PENGUJIAN FEROMON SEKS PADA KUPU-KUPU *Papilio memnon* Linn. (LEPIDOPTERA : PAPILIONIDAE) DI LABORATORIUM

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

No	Nama Alat	Spesifikasi	Fungsi	Jumlah Pemakaian
	Paralon/ Fiber Plastic)	10 cm dan p = 200cm		
7	Pisau Bedah		Membantu dalam pemotongan abdomen sampel eksperimen	1 set
8	Kain kasa	Kain berwarna putih dengan jaitan yang renggang-renggang	Penutup bagian atas toples/kandang eksperimen	1 gulung
9	Tisu non Alkohol	Tidak berbau/ tidak memiliki aroma buah atau bunga	Untuk alas kandang eksperimen	10 gulung
10	Kertas label	Kertas berwarna putih yang dapat di tulis dan dengan lem perekat di bawahnya	Penanda dan untuk melabelkan alat dan bahan eksperimen	15 lembar
11	Sarung Tangan Lateks	Sarung tangan karet steril dengan ukuran L	Sebagai atribut dan melindungi tangan dari alat dan bahan eksperimen, dan sebaliknya.	10 pasang
12	Alat Tulis	Pulpen, pensil, penggaris, rautan, penghapus, kertas, dll	Membantu dalam kinerja penulisan dan pendataan.	Seperlunya
13	Kuas	Kuas lukis kecil dengan ukuran 11”	Sebagai alat pembersih kandang eksperimen	3 buah
14	Alat Dokumentasi (Kamera Digital/Kamera Handphone)	Kamera belakang Handphone Lenovo Vibe X2	Membantu mengabadikan momen-momen selama penelitian	1 set
15	Laptop	Notebook seri NB 520 Toshiba	Untuk pengoperasian data dan penulisan hasil laporan penelitian	1 set
16	Freezer		Penyimpanan ekstraksi kelenjar feromon	1 buah

Tabel 3.4. Objek yang digunakan pada Penelitian

No	Nama Bahan	Jumlah Pemakaian
1	Kupu-kupu <i>Papilio memnon</i> (populasi dan sampel).	Betina : ± 10ekor Jantan : ± 10ekor

Tabel 3.5. Bahan yang digunakan pada Penelitian

No	Nama Bahan	Jumlah Pemakaian
1	Pakan Alami (Daun Jeruk segar)	500gram
2	Larutan heksan	500µL

Iqbal , 2018

PENGUJIAN FEROMON SEKS PADA KUPU-KUPU *Papilio memnon* Linn. (LEPIDOPTERA : PAPILIONIDAE) DI LABORATORIUM

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3	Tanaman Jeruk	5pot
---	---------------	------

G. Prosedur Penelitian

Proses pengumpulan data pada penelitian ini terbagi ke dalam empat tahap, yaitu : tahap pra penelitian, tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap akhir.

1. Tahap Pra Penelitian

Tahap pra-penelitian adalah tahap awal dari penelitian utama yang mencakup studi literatur, penyusunan rancangan penelitian dan melakukan seminar rancangan penelitian. Pada tahap studi literatur, dipelajari klasifikasi lepidoptera secara umum, siklus hidup kupu-kupu secara umum, habitat dan tanaman inang untuk kupu-kupu khususnya tanaman inang untuk *Papilio memnon*, serta cara memelihara kupu-kupu di dalam kandang. Pada penyusunan rancangan penelitian, peneliti dituntut untuk bisa memahami penelitian yang akan dilakukan dan rancangan penelitian yang telah dibuat, mulai dari latar belakang, rumusan masalah dan pertanyaan penelitian, tujuan, manfaat, batasan masalah, asumsi, hipotesis, landasan teori, dan metode penelitian.

Pada tahap seminar rancangan penelitian, peneliti dituntut dapat memahami dan memaparkan maksud dari penelitian yang dilakukan, dengan penguji seminar yang sudah berkompeten dibidangnya. Pada tahap ini peneliti dan penguji serta audien yang ikut pada seminar rancangan penelitian diberi waktu untuk memberikan kritik dan saran dari pemaparan rancangan penelitian yang akan dilakukan.

2. Tahap persiapan

a. Mempersiapkan alat dan bahan penelitian

Pada tahap mempersiapkan alat dan bahan, peneliti dalam penelitian ini perlu mencatat peralatan dan bahan apa saja yang diperlukan, diperkirakan serta disiapkan jumlah dan kebutuhan saat melakukan penelitian.

b. Observasi Lokasi Penelitian

Adapun metode pengobservasian bertujuan agar peneliti mengetahui lokasi mana saja yang nanti akan menjadi lokasi pengacarian fase instar. Alasan melakukan observasi kelapangan dikarenakan pencarian dan penemuan serangga *Papilio memnon* pada fase telur maupun ulat tidak dilakukan di laboratorium Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA, UPI.

c. Pencarian dan Pengambilan fase instar *Papilio memnon* di Lapangan.

Pencarian dan pengambilan fase ulat “instar” untuk *direaring* langsung didapatkan dari alam melainkan bukan *ngerearing* dari fase telur, dikarenakan pada fase telur hingga menetas jadi instar memerlukan waktu yang cukup lama dan juga dipengaruhi beberapa faktor dari luar. Oleh sebabnya, pada perlakuan *rearing* yang dilakukan hanya pada fase instar dengan umur dan fase instar ke berapa yang tidak ditentukan. Seperti terlihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Eksplorasi pencarian larva liar *Papilio memnon* langsung dari perkebunan jeruk di Desa Panaruban, Kabupaten Subang.

Dokumentasi Pribadi, 2017

3. Tahap Pelaksanaan

a. Pemeliharaan ulat *Papilio memnon*

Serangga uji (larva *Papilio memnon*) yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari perkebunan jeruk milik petani di Daerah Panaruban, Kecamatan Sagalaherang, Kabupaten Subang, Jawa Barat, dan dikembangbiakan di Laboratorium Riset Lingkungan, Departemen

Pendidikan Biologi FPMIPA UPI pada kondisi temperatur 24°C-28°C dan kelembapan relatif 70 % - 80 % serta periode gelap-terang (penyinaran) 12 : 12.

Larva dipelihara dalam wadah plastik (25 x 20 cm), diberi pakan alami (daun jeruk) kemudian setelah larva memasuki akhir instar-V, dipindahkan ke wadah lain sampai terbentuk pupa. Masing-masing pupa dipindahkan ke dalam toples plastik silinder (vol. 10 L) yang telah dilengkapi dengan larutan sukrosa 10% sebagai makanan imago (Setiawati dkk., 1998). Untuk rearing masal dimasukkan 20 pasang imago umur 1 - 3 hari ke dalam kurungan (30 x 30 x 40 cm) berisi tanaman jeruk dalam polybag yang dilengkapi dengan larutan sukrosa 10% sebagai makanan imago. Seperti terlihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Toples yang digunakan dalam penelitian dan ketersediaan pakan di masing-masing toples.

Dokumentasi Pribadi, 2017

b. Pengamatan Prilaku Memanggil (*Calling Behavior*)

Pengamatan dilakukan di dalam wadah kurungan (1m x 3m²), kemudian 5 pasang Imago Kupu-kupu *Papilio memnon* diletakkan ke dalam wadah tersebut yang dijadikan sebagai arena pengamatan. Pengamatan dilakukan pada jam 08.00 -11.00 pagi WIB dengan faktor abiotik yang telah ditentukan. Setelah menemukan pasangan yang tepat, maka kupu-kupu akan kawin (kopulasi) yang bisa terjadi di tanah maupun diudara, kemudian

Iqbal , 2018

PENGUJIAN FEROMON SEKS PADA KUPU-KUPU *Papilio memnon* Linn. (LEPIDOPTERA : PAPILIONIDAE) DI LABORATORIUM

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

terjadi pembuahan internal yang dapat berlangsung selama beberapa detik hingga beberapa menit atau beberapa jam (Landmand, 2001).



Gambar 3.3. Kurungan sementara untuk pengamatan perilaku memanggil pasangan *Papilio memnon*.

Dokumentasi Pribadi, 2017

c. Ekstraksi Feromon Seks

Ekstraksi kelenjar feromon diperoleh dan dilakukan dengan cara memotong abdomen akhir “abdominal tip” 20 ekor kupu-kupu yang belum kawin “virgin” berumur 1-3 hari. Waktu pengambilan ekstraksi kelenjar feromon ini cukup penting untuk mendapatkan jumlah senyawa feromon secara maksimal, karena sintesis dan pengeluaran feromon sangat singkat dan tertentu waktunya. Pemotongan dilakukan setelah 4-7 jam photophase (jam 07.00 – 11.00 pagi hingga menjelang siang hari).

Ekstrak feromon dikumpulkan dari serangga uji sebanyak 20 ekor (Toth *et al.*, 1984). Selanjutnya ujung abdomen tersebut dimasukkan ke dalam botol gelas kecil (vol. 5 ml) dengan tutup teflon dan diekstraksi dengan larutan heksan sebanyak 500 μ l selama 5 menit. Hasil yang didapatkan kemudian dilarutkan ke dalam larutan heksan. Untuk ekstraksi kelenjar feromon seks digunakan larutan heksan karena larutan heksan mempunyai polaritas yang sama dengan senyawa feromon seksual *Papilio memnon* dan bersifat volatil atau mudah menguap sehingga mudah untuk direspons oleh serangga.

Kemudian botol tersebut diberi label dan ditutup dengan parafilm dan disimpan dalam freezer dengan suhu $\pm 10^{\circ}\text{C}$ (Ono *et al.*, 1990) untuk keperluan analisis maupun pengujian baik di laboratorium maupun di lapangan.

4. Tahap Akhir (Pengujian Penelitian)

a. Uji laboratorium ekstrak feromon seks dengan tabung Y (Olfaktometer)

Uji laboratorium feromon seks *Papilio memnon* dilakukan dengan menggunakan tabung “Y” (olfaktometer) dengan bahan uji berupa ekstrak kelenjar feromon seks betina yang belum kawin (“virgin”), kupu-kupu jantan, kupu-kupu betina “virgin” serta larutan heksan. Selanjutnya ekstrak feromon dimasukkan ke dalam salah satu ujung ditempat berbentuk silinder sebanyak 10 μl dan dibiarkan mengering, sedangkan kupu-kupu jantan dan betina “virgin” dimasukkan langsung.

Untuk menguji ketertarikan kupu-kupu jantan pada salah satu bahan uji, maka tempat silinder (seperti tabung Y) yang mengandung ekstrak kelenjar feromon seks, kupu-kupu betina “virgin”, dan kupu-kupu jantan diletakkan pada ujung tabung B dengan menggunakan pinset, sedangkan larutan heksan pada ujung tabung C. Sebanyak ± 5 ekor kupu-kupu jantan dilepaskan satu persatu pada ujung tabung A, selanjutnya dialirkan udara dari aerator melalui selang plastik pada tabung B dan C (Gambar 3.4). Untuk pengujian berikutnya ekstrak kelenjar feromon seks diletakkan pada ujung tabung B, sedangkan kupu-kupu betina “virgin” dan kupu-kupu jantan pada ujung tabung C. Kemudian dibiarkan sambil diamati selama 1 jam. Jumlah kupu-kupu jantan yang masuk ke dalam ujung tabung B dan C dicatat dan diulang sebanyak lima kali.

Jumlah Kupu-kupu jantan yang tertarik baik pada ekstrak kelenjar feromon seks, kupu-kupu jantan, kupu-kupu betina yang belum kopulasi dan larutan heksan dicatat untuk setiap perlakuan beserta pengulangannya. Analisis data untuk menghitung nilai ketertarikan kupu-kupu jantan terhadap bahan uji, digunakan formula dari Smith *et al.* (1994) (Rostaman, 1999):

$$IA = [(A_p - A_k) \times 100 \%]/N$$

IA : nilai ketertarikan
 Ap : Σ serangga yang tertarik pada bahan uji
 Ak : Σ serangga yang tertarik pada larutan heksan
 N : Σ serangga uji



Keterangan:

A : Tabung A
 B : Tabung B
 C : Tabung C
 Aerator : Mesin Pengatur Udara Buatan
 Sumber Listrik : Tenaga untuk menyalakan Mesin Aerator

Gambar 3.4. Pemodelan Tabung Y (olfaktometer)

(Dokumentasi Pribadi, 2017)

Tabel 3.6. Lembar Pengamatan Nilai Ketertarikan (IA) *Papilio memnon* Jantan terhadap Bahan Uji

No.	Pengujian	Nilai Ketertarikan Kupu – kupu Jantan (%)				
		1	2	3	4	5
1.	Ekstrak kelenjar feromon seks vs larutan heksan					

Iqbal , 2018

PENGUJIAN FEROMON SEKS PADA KUPU-KUPU *Papilio memnon* Linn. (LEPIDOPTERA : PAPILIONIDAE) DI LABORATORIUM

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

2.	Kupu - kupu betina “virgin” vs larutan heksan					
3.	Kupu - kupu jantan vs larutan heksan					
4.	Ekstrak kelenjar feromon seks vs Kupu - kupu betina “virgin”					

b. Pengujian Lapangan Ekstrak Feromon Seks di dalam *Dome*

Pengujian lapangan dilaksanakan pada awal bulan Agustus 2017 di Penangkaran Kebun Botani UPI, Kota Bandung. Perangkap yang digunakan adalah perangkap berumpan (bait traps : 15 cm x 15 cm) yang terbuat kayuyang berfungsi sebagai rangka perangkap dan kain kasa yang digunakan sebagai penutup sisi-sisi pada kerangka perangkap. Pada perlakuan perangkap berumpan ekstrak feromon seks dan larutan heksan menggunakan perangkap air dengan perbandingan 1 : 10, masing-masing umpan dimasukkan ke dalam vial plastik (vol. 100 ml) yang ditutup dengan menggunakan aluminium foil dan diberi lubang sebesar ± 1 cm (Persoons *et al.*, 1976). Perlakuan pada perangkap berisi betina “virgin” hidup cukup dimasukkan ke dalam perangkap dengan ketentuan umur betina 2-3 hari setelah masa penetasan kepompong.

Perangkap ditempatkan di atas permukaan tanah dengan jarak antar perangkap ± 1 meter dengan luas penangkaran 3 x 6 m². Pengamatan dilakukan setiap 30 menit sekali selama periode 1 hari (6 jam), kemudian dilakukan penghitungan kupu-kupu jantan yang mendekati perangkap hingga menempel pada dinding perangkap.

H. Pengelohan Data

a. Analisis Statistik

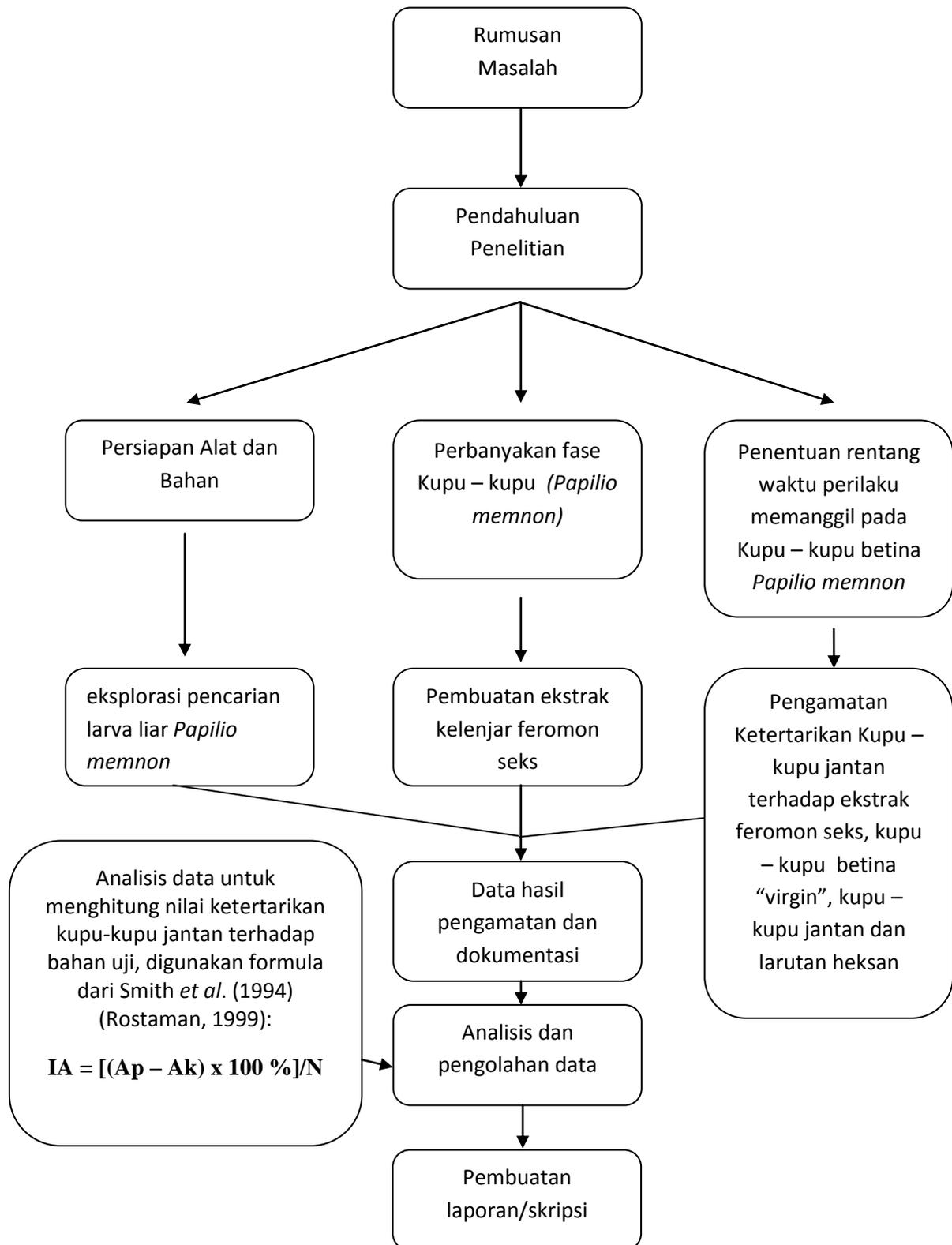
Varians dari semua data dari laboratorium tes diperiksa normalitas menggunakan uji Lil-liefors (Lilliefors 1967). Satu-way ANOVA SPSS Versi 23 kemudian digunakan untuk mengungkap perbedaan dalam respon rata-rata jantan mengenai tiga variabel yang diamati antara perlakuan ($P \leq 0,05$).

Iqbal , 2018

PENGUJIAN FEROMON SEKS PADA KUPU-KUPU *Papilio memnon* Linn. (LEPIDOPTERA : PAPILIONIDAE) DI LABORATORIUM

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

I. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Bagan Alur Perencanaan Penelitian