

**BIOAKTIVITAS EKSTRAK METANOL DAN ETIL ASETAT *Gracilaria* sp.  
TERHADAP STRUKTUR MORFOLOGI DAN HISTOPATOLOGI LARVA  
*Anopheles* sp.: ANALISIS MENGGUNAKAN SCANNING ELECTRON  
MICROSCOPE (SEM)**

**(Tesis)**

**Oleh**

**NABILA MUHARRANI FAHDA**

**2427021002**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2026**

## ABSTRAK

### **BIOAKTIVITAS EKSTRAK METANOL DAN ETIL ASETAT *Gracilaria* sp. TERHADAP STRUKTUR MORFOLOGI DAN HISTOPATOLOGI LARVA *Anopheles* sp. ANALISIS MENGGUNAKAN SCANNING ELECTRON MICROSCOPE (SEM)**

Oleh

**NABILA MUHARRANI FAHDA**

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* sp. Penggunaan insektisida sintesis secara terus-menerus berdampak negatif terhadap lingkungan dan menimbulkan resistensi vektor, sehingga diperlukan alternatif larvasida nabati yang lebih aman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan tingkat mortalitas, menentukan nilai  $LC_{50}$ , serta mendeskripsikan perubahan morfologi dan histopatologi larva *Anopheles* sp. instar III setelah paparan ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor, yaitu jenis ekstrak dan konsentrasi (0,5%; 0,75%; 1%; 1,2%; serta kontrol akuades) dengan masing-masing lima ulangan. Data mortalitas dianalisis menggunakan metode Probit untuk menentukan  $LC_{50}$  serta diuji menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan uji lanjut *Tukey Honestly Significant Difference* (HSD) pada taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan peningkatan mortalitas larva. Mortalitas tertinggi diperoleh pada konsentrasi 1,2%, yaitu sebesar 94,4% pada ekstrak metanol dan 85,6% pada ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. Nilai  $LC_{50}$  ekstrak metanol sebesar 0,870%, sedangkan ekstrak etil asetat sebesar 0,973%, yang menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas larvasida dan tingkat toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat. Pengamatan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) menunjukkan adanya kerusakan kutikula dan deformasi struktur tubuh larva pada bagian kepala, toraks, abdomen, dan papila anal. Sementara itu, pengamatan histopatologi menunjukkan disorganisasi epitel, degenerasi sel, serta perubahan lumen pada usus tengah larva.

**Kata kunci :** *Gracilaria* sp., *Anopheles* sp., larvasida nabati, SEM, histopatologi

## ABSTRACT

### **Bioactivity of Methanol and Ethyl Acetate Extracts of *Gracilaria* sp. on The Morphological And Histopathological Structures of *Anopheles* sp. Larvae: An Analysis Using Scanning Electron Microscope (SEM)**

By

**NABILA MUHARRANI FAHDA**

Malaria is a disease caused by *Plasmodium* parasites and transmitted through the bites of *Anopheles* mosquitoes. The continuous use of synthetic insecticides has negative impacts on the environment and contributes to the development of vector resistance, highlighting the need for safer plant-based larvicidal alternatives. This study aimed to evaluate differences in larval mortality, determine the LC<sub>50</sub> values, and describe the morphological and histopathological changes in third-instar *Anopheles* sp. larvae following exposure to methanol and ethyl acetate extracts of *Gracilaria* sp. This experimental study employed a Completely Randomized Design (CRD) with two factors, namely extract type and concentration (0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.2%, and a distilled water control), with five replicates per treatment. Mortality data were analyzed using Probit analysis to determine LC<sub>50</sub> values and were further subjected to Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test at a 5% significance level. The results showed that increasing extract concentrations were directly associated with increased larval mortality. The highest mortality was observed at the 1.2% concentration, reaching 94.4% for the methanol extract and 85.6% for the ethyl acetate extract of *Gracilaria* sp. The LC<sub>50</sub> value of the methanol extract was 0.870%, whereas that of the ethyl acetate extract was 0.973%, indicating that the methanol extract exhibited greater larvicidal activity and toxicity than the ethyl acetate extract. Observations using a Scanning Electron Microscope (SEM) revealed cuticular damage and structural deformities in the larval head, thorax, abdomen, and anal papillae. Furthermore, histopathological examination demonstrated epithelial disorganization, cellular degeneration, and alterations in the lumen of the larval midgut.

**Keywords :** *Gracilaria* sp., *Anopheles* sp., botanical larvicide, SEM, histopathology

**BIOAKTIVITAS EKSTRAK METANOL DAN ETIL ASETAT *Gracilaria* sp.  
TERHADAP STRUKTUR MORFOLOGI DAN HISTOPATOLOGI  
LARVA *Anopheles* sp.: ANALISIS MENGGUNAKAN SCANNING  
ELECTRON MICROSCOPE (SEM)**

Oleh

**NABILA MUHARRANI FAHDA**

Tesis

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
MAGISTER SAINS**

Pada

**Program Studi Magister Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2026**

Judul Tesis : **BIOAKTIVITAS EKSTRAK METANOL DAN ETIL ASETAT *Gracilaria* sp. TERHADAP STRUKTUR MORFOLOGI DAN HISTOPATOLOGI LARVA *Anopheles* sp.: ANALISIS MENGGUNAKAN SCANNING ELECTRON MICROSCOPE (SEM)**

Nama Mahasiswa : **Nabila Muharrani Fahda**

NPM : 2427021002

Jurusan/Program Studi : Biologi/Magister Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**MENYETUJUI**

1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

**Dr. Endah Setyaningrum M.Biomed.**

NIP. 196405171988032001

Pembimbing II

**Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.**

NIP. 196603051991032001

2. Koordinator Program Studi Magister Biologi

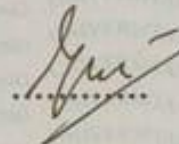
**Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.**

NIP. 196603051991032001

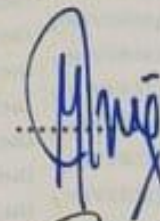
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed.



Sekretaris : Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.



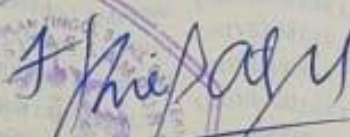

Penguji  
Bukan Pembimbing I : Prof. Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc.



Penguji  
Bukan Pembimbing II : Prof. Drs. Tugiyono, M.Si., Ph.D.





2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.  
NIP. 197110012005011002

3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.  
NIP. 196403261989021001

Tanggal Lulus Ujian Tesis: 19 Juni 2026

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nabila Muharrani Fahda  
NPM : 2427021002  
Program Studi : Magister Biologi

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam tesis yang berjudul:

**“BIOAKTIVITAS EKSTRAK METANOL DAN ETIL ASETAT  
*Gracilaria* sp. TERHADAP STRUKTUR MORFOLOGI DAN  
HISTOPATOLOGI LARVA *Anopheles* sp.: ANALISIS MENGGUNAKAN  
SCANNING ELECTRON MICROSCOPE (SEM)”**

Baik gagasan, data, dan pembahasan adalah benar hasil karya sendiri berdasarkan pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Tesis ini saya susun dengan mengikuti pedoman dan norma yang berlaku.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ilmiah ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 19 Juni 2026

Yang Menyatakan



Nabila Muharrani Fahda  
NPM. 2427021002

## RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 12 April 2001, dari pasangan Bapak H. Iqbal Madri Fahda, S.Ag., MM. dan Ibu Hj. Nelasari Padila, S.Tr.Keb. sebagai anak pertama dari dua bersaudara. Penulis memiliki seorang adik bernama Nadhira Mutia Fahda. Pendidikan formal penulis dimulai dari TK Dharma Wanita (lulus tahun 2007), melanjutkan ke MIN 5 Bandar Lampung (lulus tahun 2013), lalu melanjutkan ke MTsN 2 Bandar Lampung (lulus tahun 2016), kemudian melanjutkan ke MAN 1 Bandar Lampung (lulus tahun 2019). Pada tahun 2019, penulis terdaftar sebagai Mahasiswi Program Strata Satu (S1) Studi Pendidikan Biologi Fakultas Tarbiyah dan Keguruan di Universitas Islam Negeri (UIN) Raden Intan Lampung.

Semasa duduk di bangku menengah atas, penulis bergabung dalam ekstrakurikuler *English Club* dan pernah menjabat sebagai sekretaris di ekstrakurikuler tersebut. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Kelurahan Korpri Jaya, Kecamatan Sukarame, Kota Bandar Lampung pada tanggal 22 Juni sampai 31 Juli 2022. Pada tanggal 22 Agustus sampai 30 September 2022, penulis melaksanakan Praktik Pengalaman Lapangan (PPL) di SMP Negeri 2 Bandar Lampung. Penulis melaksanakan penelitian skripsi untuk mendapat gelar sarjana Pendidikan dengan judul “Identifikasi Jamur Makroskopis di Kawasan Hutan Produksi Gedong Wani Lampung Selatan”. Penulis lulus dan mendapat gelar sarjana pendidikan pada tahun 2023. Pada tahun 2024, penulis tercatat sebagai Mahasiswa Program Studi Magister Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

## MOTTO

كُتِبَ عَلَيْكُمُ الْقِتَالُ وَهُوَ كُرْهُ لَكُمْ وَعَسَىٰ أَنْ تَكْرَهُوا شَيْئًا وَهُوَ خَيْرٌ لَّكُمْ وَعَسَىٰ أَنْ تُحِبُّوا شَيْئًا  
وَهُوَ شَرٌّ لَّكُمْ وَاللَّهُ يَعْلَمُ وَأَنْتُمْ لَا تَعْلَمُونَ ۚ (٢١٦)

“Diwajibkan atas kamu berperang, padahal itu tidak menyenangkan bagimu. Tetapi boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.”

**(Q.S. Al-Baqarah: 216)**

قَالَ النَّبِيُّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ كُنْ عَالِمًا أَوْ مُتَعَلِّمًا أَوْ مُسْتَمِعًا أَوْ مُحِبًّا وَلَا تَكُنْ خَامِسًا فَتَهْلِكَ  
(رواه البيهقي)

“Jadilah engkau orang berilmu, penuntut ilmu, pendengar ilmu dan orang yang menyukai ilmu. Dan janganlah engkau menjadi orang yang kelima (yang membenci ilmu), maka kamu akan celaka.”

**(HR. Baihaqi)**

لَا يُكَلِّفُ اللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا ۗ (٢٨٦)

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya...”

**(Q.S. Al-Baqarah: 286)**

## PERSEMBAHAN



Dengan mengucapkan puji syukur yang tak terhingga atas berkat, rahmat, dan kehadiran Allah SWT. shalawat serta salam yang senantiasa tercurah kepada Rasulullah Muhammad SAW.

Kupersembahkan tesis yang telah kuselesaikan dengan penuh perjuangan, kesabaran, dan doa ini kepada:

Kedua orang tua tercinta,

**Ayah H. Iqbal Madri Fahda, S.Ag., MM. dan Bunda Hj. Nelasari Padila,  
S.Tr.Keb.**

yang senantiasa memberikan cinta, kasih sayang, doa, dukungan, serta pengorbanan tanpa batas dalam setiap langkah kehidupanku. Yang selalu hadir memberikan kekuatan di saat lelah, memberikan semangat di saat putus asa, dan memberikan kepercayaan di saat Bila meragukan kemampuan diri Bila sendiri.

Dosen-dosen pembimbing dan pembahas,

**Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed., Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.,  
Prof. Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc., dan Prof. Drs. Tugiyono, M.Si., Ph.D.**  
yang dengan penuh kesabaran dan ketulusan telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing, memberikan arahan, motivasi, saran, serta masukan yang berharga selama proses penelitian dan penyusunan tesis ini hingga dapat terselesaikan dengan baik.

## SANWACANA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. atas segala rahmat, karunia, dan ridha-Nya sehingga penulis diberikan kesehatan, kesempatan, kekuatan, kesabaran, kemudahan, serta kelancaran dalam menyelesaikan tesis yang berjudul “**BIOAKTIVITAS EKSTRAK METANOL DAN ETIL ASETAT *Gracilaria* sp. TERHADAP STRUKTUR MORFOLOGI DAN HISTOPATOLOGI LARVA *Anopheles* sp.: ANALISIS MENGGUNAKAN *SCANNING ELECTRON MICROSCOPE* (SEM)**”. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa proses penyusunan tesis ini tidak terlepas dari bantuan, dukungan, bimbingan, doa, serta motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan kontribusi baik secara langsung maupun tidak langsung hingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., IPM., ASEAN Eng., selaku rektor Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Muhadi, M.Si., selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung.

4. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
5. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc., selaku Koordinator Program Studi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam Universitas Lampung, sekaligus Pembimbing Akademik dan Pembimbing II tesis yang dengan penuh dedikasi membimbing penulis sejak tahap perencanaan penelitian hingga penyelesaian tesis. Berbagai arahan, saran, dan nasihat yang diberikan dengan sabar telah membantu penulis dalam menyelesaikan setiap tahapan penelitian dengan baik.
6. Ibu Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed., selaku Pembimbing I tesis yang dengan penuh dedikasi membimbing penulis sejak tahap perencanaan penelitian hingga penyelesaian tesis. Berbagai arahan, saran, dan nasihat yang diberikan dengan sabar telah membantu penulis dalam menyelesaikan setiap tahapan penelitian dengan baik.
7. Bapak Prof. Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc., selaku Pembahas I yang senantiasa memberikan saran, arahan, serta pembelajaran yang bermakna bagi penulis, baik dalam proses akademik maupun pengembangan diri.
8. Bapak Prof. Drs. Tugiyono, M.Si., Ph.D., selaku Pembahas II yang senantiasa memberikan saran, arahan, serta pembelajaran yang bermakna bagi penulis, baik dalam proses akademik maupun pengembangan diri.
9. Bapak dan Ibu Dosen serta segenap Karyawan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang tidak bisa disebutkan satu-persatu atas ilmu, bimbingan, dan bantuan kepada penulis.
10. Bapak Aris Widyowanto selaku Kader *Anopheles* di Puskesmas Hanura, Desa Hanura, yang telah membantu penulis dalam memperoleh larva *Anopheles* serta memberikan dukungan dan berbagi pengetahuan selama proses pengambilan sampel.
11. Seluruh Staf dan Karyawan di Laboratorium Saintek Universitas Raden Intan (UIN RIL) Lampung yang dengan penuh kesabaran membimbing penulis, berbagi pengalaman dan ilmu, serta membantu kelancaran pelaksanaan penelitian ini.

12. Seluruh staf dan karyawan Laboratorium Patologi Balai Veteriner Lampung yang dengan penuh kesabaran membimbing penulis, berbagi pengalaman dan ilmu, serta membantu kelancaran pelaksanaan penelitian ini.
13. Kedua orang tua tercinta, Bapak H. Iqbal Madri Fahda, S.Ag., MM. dan Ibu Hj. Nelasari Padila, S.Tr.Keb. serta adik, Nadhira Mutia Fahda, sebagai penyemangat terbaik dalam hidup penulis, terima kasih atas doa yang tidak pernah putus, dukungan yang tidak pernah surut, serta nasihat dan kasih sayang yang selalu menguatkan penulis dalam menghadapi setiap tantangan dan proses dalam menyelesaikan perjalanan akademik ini.
14. Excel dan Ponyo, yang selalu menemani hari-hari penulis dengan tingkah lucu, menggemaskan, penuh kejutan, dan selalu menjadi penyemangat sederhana yang mampu menghadirkan kebahagiaan, mengurangi penat, dan memberikan keceriaan di tengah proses penyusunan tesis ini.
15. Teman-teman seperjuangan Magister Biologi Angkatan 2024, Nabila Farahdhia, Indah Khairunnisa, Azahra Putri Najla, Mentari Aulia Senapal, Tarisa Livia HR, Ayu Fikri Damayanti, Gilang Pratama Indra Putra Duarsa, Amalia Sekar Kusumawardhani, dan (alm.) Septi Putri Wandasari, atas kebersamaan, dukungan, semangat, bantuan, serta canda tawa yang telah mewarnai hari-hari selama masa studi.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki berbagai keterbatasan dan jauh dari kesempurnaan. Meskipun demikian, penulis berharap tesis ini dapat memberikan manfaat serta menjadi sumber informasi dan referensi bagi pengembangan ilmu pengetahuan di kemudian hari.

Bandar Lampung, 19 Juni 2026  
Penulis,

**Nabila Muharrani Fahda**

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>SAMPUL DEPAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN JUDUL DALAM</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS</b> .....	<b>vii</b>
<b>RIWAYAT HIDUP</b> .....	<b>viii</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>ix</b>
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	<b>x</b>
<b>SANWACANA</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xx</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xxi</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	<b>1</b>
1.2 Tujuan Penelitian .....	<b>3</b>
1.3 Manfaat Penelitian .....	<b>4</b>
1.4 Kerangka Pemikiran.....	<b>5</b>
1.5 Hipotesis .....	<b>7</b>

<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>8</b>
2.1 Tanaman Rumput Laut dan Pentingnya bagi Keanekaragaman Hayati ...	8
2.2 <i>Gracilaria</i> sp.....	10
2.2.1 Klasifikasi Taksonomi.....	10
2.2.2 Morfologi.....	10
2.2.3 Kandungan Metabolit Sekunder .....	12
2.2.4 Potensi Bioaktif .....	12
2.3 Pelarut Metanol dan Etil Asetat sebagai Agen Ekstraksi Senyawa Bioaktif .....	14
2.3.1 Prinsip Dasar Ekstraksi Menggunakan Pelarut Organik .....	14
2.3.2 Karakteristik Metanol (Polar).....	15
2.3.3 Karakteristik Etil Asetat (Semi-Polar).....	17
2.4 Larvasida Nabati .....	17
2.4.1 Mekanisme Larvasida Nabati terhadap Larva.....	17
2.4.2 Efek Fisiologis dan Morfologis pada Larva Nyamuk ( <i>Anopheles</i> sp.) .....	18
2.5 <i>Anopheles</i> sp. ....	20
2.5.1 Klasifikasi Taksonomi.....	20
2.5.2 Morfologi <i>Anopheles</i> sp. ....	20
2.5.3 Siklus Hidup <i>Anopheles</i> sp.....	21
2.5.4 Peran <i>Anopheles</i> sp. sebagai Vektor Malaria .....	25
2.5.5 Pola Habitat dan Perilaku Ekologis <i>Anopheles</i> sp.....	26
2.6 <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) dalam Analisis Morfologi.....	27
2.6.1 Prinsip dan Mekanisme Kerja <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) .....	27
2.6.2 Aplikasi <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) pada Larva Nyamuk .....	28
2.6.3 Kelebihan <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) dalam Penelitian Larvasida .....	30
2.7 Histopatologi Larva <i>Anopheles</i> sp. ....	31
2.7.1 Konsep Dasar Histopatologi pada Jaringan Serangga.....	31
2.7.2 Prinsip Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) pada Preparat Larva.....	32
<b>III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>34</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	34
3.2 Alat dan Bahan.....	34
3.2.1 Alat .....	34
3.2.2 Bahan.....	35
3.3 Rancangan Penelitian.....	35
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	37
3.4.1 Pengumpulan Tumbuhan.....	37
3.4.2 Determinasi Tumbuhan .....	37
3.4.3 Pembuatan Simplisia .....	37
3.4.4 Pembuatan Ekstrak .....	38
3.4.5 Pembuatan Konsentrasi .....	38
3.4.6 Uji Fitokimia Metabolit Sekunder.....	40
3.4.7 Uji Aktivitas Larvasida.....	42
3.4.8 Uji <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	43

3.4.9 Uji Histopatologi .....	45
3.5 Analisis Data.....	46
3.6 Bagan Alir Penelitian.....	51
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>52</b>
4.1 Hasil.....	52
4.1.1 Uji Fitokimia Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. dan Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	52
4.1.2 Mortalitas Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah 24 Jam Paparan Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. ....	56
4.1.3 Nilai LC <sub>50</sub> Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah 24 Jam Paparan Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. ....	59
4.1.4 Perubahan Struktur Morfologi Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. Berdasarkan Hasil Pengamatan <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) .....	61
4.1.5 Perubahan Histopatologi Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. Berdasarkan Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) .....	78
4.2 Pembahasan.....	83
4.2.1 Mortalitas Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah 24 Jam Paparan Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. ....	83
4.2.2 Nilai LC <sub>50</sub> Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah 24 Jam Paparan Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. ....	86
4.2.3 Perubahan Morfologi Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. Berdasarkan Pengamatan <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) .....	89
4.2.4 Perubahan Histopatologi Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. Berdasarkan Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) .....	96
4.2.5 Mekanisme Kerja Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. Sebagai Larvasida Nabati .....	99
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>103</b>
5.1 Kesimpulan.....	103
5.2 Saran.....	103
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>104</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>120</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Perlakuan Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. Terhadap Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III.....	37
2. Perlakuan Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. Terhadap Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III.....	37
3. Konsentrasi dan Volume Ekstrak Metanol dan Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. yang Digunakan. ....	39
4. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. dan Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	53
5. Data Mortalitas Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Antar perlakuan Konsentrasi Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. ....	57
6. Data Mortalitas Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Antar perlakuan Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	58
7. Persentase Mortalitas Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Metanol dan Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. (Mean $\pm$ SD) ....	59
8. Nilai LC <sub>50</sub> Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. Terhadap Mortalitas Larva <i>Anopheles</i> sp. instar III.....	60
9. Nilai LC <sub>50</sub> Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. Terhadap Mortalitas Larva <i>Anopheles</i> sp. instar III.....	60
10. Perubahan Morfologi Kepala Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III .....	62
11. Perubahan Morfologi Toraks Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. ....	64
12. Perubahan Morfologi Abdomen Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. ....	66
13. Perubahan Morfologi Papila Anal Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. ....	68
14. Perubahan Morfologi Kepala Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	70

15. Perubahan Morfologi Toraks Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	72
16. Perubahan Morfologi Abdomen Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	74
17. Perubahan Morfologi Papila Anal Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	76
18. Perubahan Histopatologi Usus Tengah Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp. ....	79
19. Perubahan Histopatologi Usus Tengah Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Setelah Paparan Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	81

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. <i>Gracilaria</i> sp. ....	11
2. Morfologi Nyamuk <i>Anopheles</i> sp. Betina.....	21
3. Siklus Hidup <i>Anopheles</i> sp. ....	22
4. <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) .....	27
5. <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) dari <i>Anopheles aconitus</i> .....	30
6. Bagan Alir Penelitian .....	51
7. Hasil Pengamatan Uji Fitokimia Ekstrak Metanol <i>Gracilaria</i> sp.....	54
8. Hasil Pengamatan Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat <i>Gracilaria</i> sp. ....	55

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Data Mortalitas Larva <i>Anopheles</i> sp. Instar III Antar Perlakuan Konsentrasi Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. Setelah 24 jam Perlakuan .....	121
2. Uji Statistika .....	121
3. Dokumentasi Penelitian .....	129
4. Surat Izin Penelitian .....	145
5. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak <i>Gracilaria</i> sp. ....	147

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit parasitik yang disebabkan oleh protozoa genus *Plasmodium* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Penyakit malaria dapat disebabkan oleh lima spesies *Plasmodium*, yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, dan *P. knowlesi* (Cowman *et al.*, 2016). Protozoa ini bersifat intraseluler dan menyerang sel darah merah sehingga menimbulkan anemia akibat penghancuran eritrosit secara masif. Tingkat keparahan infeksi malaria dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain jenis *Plasmodium*, daerah asal infeksi, usia, kondisi genetik, status kesehatan, status gizi, serta riwayat pengobatan dan pencegahan sebelumnya (Avichena dan Anggriyani, 2023).

Secara global, malaria masih menjadi masalah kesehatan utama, khususnya di negara tropis. Menurut WHO (2024), meskipun prevalensinya menurun dalam beberapa dekade terakhir, malaria tetap menjadi penyebab penting morbiditas dan mortalitas dengan lebih dari 200.000 kematian per tahun. Indonesia termasuk negara endemis dengan iklim tropis yang mendukung siklus hidup nyamuk. Data Kementerian Kesehatan RI (2025) menunjukkan peningkatan kasus malaria dari 418.546 kasus pada 2023 menjadi 543.965 kasus pada 2024. Penyakit ini tidak hanya berdampak pada kesehatan, tetapi juga menurunkan produktivitas dan menimbulkan kerugian ekonomi (Sutarto dan B, 2017).

Upaya pengendalian malaria selama ini berfokus pada pemutusan rantai penularan melalui pengendalian vektor. Namun, munculnya resistensi parasit terhadap obat antimalaria seperti klorokuin dan artemisinin serta resistensi vektor terhadap insektisida sintetis menjadi ancaman serius (WHO, 2024; Glunt *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2014). Resistensi insektisida telah dilaporkan di berbagai daerah, seperti pada *Aedes* sp. terhadap organofosfat di Banyuwangi (Yudhana dkk., 2017), resistensi *Aedes aegypti* terhadap malathion di Pekalongan (Widiastuti dan Ikawati, 2016), serta resistensi *Anopheles* sp. terhadap piretroid di Kabupaten Muara Enim (Haryanto dkk., 2018). Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengendalian vektor yang lebih aman, ramah lingkungan, dan tetap efektif. Salah satu pendekatan yang kini banyak dikembangkan adalah pemanfaatan senyawa bioaktif dari tumbuhan sebagai larvasida nabati (Achmadi, 2013).

Fase larva merupakan tahap akuatik dalam siklus hidup nyamuk yang berlangsung dari telur hingga pupa sebelum berubah menjadi nyamuk dewasa (Wibowo, 2017). Larva instar III dianggap paling representatif untuk penelitian karena ukurannya tidak terlalu kecil sehingga mudah diamati, serta sangat aktif bergerak dan mencari makan di media air (Husna dkk., 2020). WHO (2005) juga merekomendasikan penggunaan larva instar III akhir atau instar IV awal dalam uji bioassay untuk memperoleh kurva dosis-respon yang valid. Intervensi pada tahap ini dapat memutus siklus hidup nyamuk sebelum mencapai fase dewasa yang berperan dalam penularan malaria.

Rumput laut *Gracilaria* sp. mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai larvasida alami. Penelitian menunjukkan adanya kandungan flavonoid, terpenoid, saponin, dan tanin (Bhernama, 2020; Hidayati *et al.*, 2023; Yuanddaru dkk., 2025). Senyawa tersebut memiliki aktivitas biologis yang dapat mengganggu perkembangan larva dan menyebabkan kematian (Subhalakshmi *et al.*, 2024). Flavonoid merusak sistem pernapasan larva (Yuliany dan Fitriani, 2020), saponin merusak membran sel dan meningkatkan permeabilitas hingga menimbulkan lisis pada sel mukosa usus

(Wahyuni dkk., 2022); De Geyter *et al.*, 2007, sedangkan alkaloid dan tanin bekerja sebagai racun perut yang mengganggu sistem pencernaan nyamuk (Susanti dkk., 2021; De Geyter *et al.*, 2007).

Proses ekstraksi senyawa bioaktif dari *Gracilaria* sp. dapat dilakukan dengan pelarut polar seperti metanol dan semi polar seperti etil asetat. Metanol mampu melarutkan senyawa polar maupun semi-polar sehingga banyak digunakan dalam ekstraksi senyawa bioaktif, sedangkan Etil asetat merupakan pelarut semi-polar yang efektif melarutkan senyawa fitokimia dengan kepolaran menengah, seperti flavonoid (aglikon), alkaloid tertentu, terpenoid, steroid, dan senyawa fenolik (Salamah dan Farahana, 2015; Sasidharan *et al.*, 2010; Do *et al.*, 2014).

Meskipun aktivitas larvasida ekstrak *Gracilaria* telah banyak diteliti, kajian mengenai pengaruhnya terhadap morfologi dan histopatologi larva masih terbatas. Teknik *Scanning Electron Microscope* (SEM) memungkinkan observasi perubahan morfologi secara detail hingga tingkat mikrometer (Mohammed and Abdullah, 2018). Penelitian Dey *et al.* (2023) menggunakan SEM untuk mempelajari perubahan pada kepala dan usus tengah larva *Anopheles* dan *Aedes* yang terpapar ekstrak tumbuhan. Oleh karena itu, penelitian mengenai **“Bioaktivitas Ekstrak Metanol dan Etil Asetat *Gracilaria* sp. terhadap Struktur Morfologi dan Histopatologi Larva *Anopheles* sp.: Analisis Menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM)”**, perlu dilakukan.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. sebagai senyawa bioaktif yang berpotensi larvasida.

2. Menganalisis perbandingan tingkat mortalitas larva *Anopheles* sp. pada berbagai konsentrasi ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dan etil asetat *Gracilaria* sp.
3. Menentukan nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration*) ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. terhadap larva *Anopheles* sp. sebagai indikator efektivitas larvasida.
4. Mendeskripsikan perubahan morfologi eksternal larva *Anopheles* sp. setelah perlakuan menggunakan ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. melalui pengamatan *Scanning Electron Microscope* (SEM).
5. Mendeskripsikan perubahan histopatologi jaringan larva *Anopheles* sp. setelah perlakuan menggunakan ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. melalui pengamatan mikroskop cahaya dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE).

### 1.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. yang berpotensi sebagai senyawa bioaktif larvasida.
2. Memberikan informasi mengenai efektivitas ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. terhadap mortalitas larva *Anopheles* sp. pada berbagai konsentrasi.
3. Memberikan data ilmiah mengenai nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration*) ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. terhadap larva *Anopheles* sp. sebagai indikator efektivitas larvasida.
4. Menambah pengetahuan mengenai perubahan morfologi eksternal larva *Anopheles* sp. setelah perlakuan dengan ekstrak, yang diamati menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM).
5. Menambah informasi mengenai perubahan histopatologi jaringan larva *Anopheles* sp. setelah perlakuan dengan ekstrak, yang diamati melalui pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE).

#### 1.4 Kerangka Pemikiran

Malaria masih menjadi penyakit menular yang menimbulkan masalah kesehatan serius di berbagai negara tropis, termasuk Indonesia. Penyakit ini ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* sp. yang membawa parasit *Plasmodium*. Penggunaan insektisida sintetis selama ini menjadi metode utama pengendalian vektor, namun pemakaian berulang menimbulkan resistensi nyamuk dan pencemaran lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan alternatif larvasida yang lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan, salah satunya dari sumber alami seperti rumput laut *Gracilaria* sp. yang kaya metabolit sekunder beraktivitas bioaktif terhadap serangga.

*Gracilaria* sp. merupakan makroalga merah (*Rhodophyta*) yang banyak dijumpai di perairan tropis dan telah dimanfaatkan dalam industri pangan, pakan, dan agar. Berbagai penelitian melaporkan bahwa *Gracilaria* sp. mengandung flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin, tanin, dan steroid yang berpotensi sebagai larvasida alami. Senyawa tersebut dapat mengganggu sistem fisiologis larva nyamuk, seperti flavonoid yang merusak sistem pernapasan, saponin yang menghancurkan membran sel usus, serta alkaloid yang bertindak sebagai racun pencernaan.

Ekstraksi senyawa bioaktif dari *Gracilaria* sp. dapat dilakukan dengan berbagai jenis pelarut, di antaranya metanol dan etil asetat. Metanol merupakan pelarut polar yang mampu melarutkan senyawa polar maupun semi-polar, sehingga sering digunakan dalam penelitian fitokimia untuk memperoleh senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, dan tanin. Etil asetat merupakan pelarut semi-polar yang efektif melarutkan senyawa fitokimia dengan kepolaran menengah, seperti flavonoid (aglikon), alkaloid tertentu, terpenoid, steroid, dan senyawa fenolik. Kombinasi keduanya diharapkan menghasilkan profil senyawa yang lebih lengkap untuk menilai potensi larvasida terhadap *Anopheles* sp.

Metodologi penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental laboratorium dengan rancangan acak lengkap (RAL). *Gracilaria* sp. diolah menjadi simplisia kering, kemudian diekstraksi dengan pelarut metanol dan etil asetat melalui maserasi. Kedua ekstrak diuji fitokimia (alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, tanin, fenol) serta diuji aktivitasnya terhadap larva *Anopheles* sp. instar III dengan metode standar WHO pada konsentrasi 0%, 0,5%, 0,75%, 1%, dan 1,2% dengan lima ulangan. Mortalitas larva diamati setelah 24 jam, lalu dianalisis untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  melalui analisis probit, sedangkan perbedaan mortalitas antarperlakuan diuji dengan *Two-way Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan *Tukey Honestly Significant Difference* (Tukey HSD). Selain itu, perubahan morfologi eksternal larva diamati menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM), sementara perubahan histopatologi jaringan diamati dengan mikroskop cahaya setelah pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE).

Selain mengukur mortalitas, penelitian ini juga mendalami dampak ekstrak *Gracilaria* sp. terhadap morfologi dan histopatologi larva *Anopheles* sp. Perubahan morfologi eksternal diamati menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) untuk memvisualisasikan kerusakan pada struktur permukaan tubuh larva, seperti kutikula, rambut sensorik, dan spirakel. Analisis histopatologi dilakukan pada jaringan usus larva yang diberi perlakuan dengan pewarnaan hematoksin-eosin (HE) untuk menekankan sifat larvasida sebagai racun perut, racun saraf, maupun racun kulit, sehingga dapat diketahui sifat toksik ekstrak serta efektivitasnya sebagai larvasida nabati.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah mengenai potensi *Gracilaria* sp. sebagai sumber larvasida alami yang ramah lingkungan. Hasil uji fitokimia, bioassay larvasida, serta analisis morfologi dan histopatologi diharapkan mampu memberikan gambaran komprehensif tentang efektivitas dan mekanisme aksi senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak metanol dan etil asetat.

## 1.5 Hipotesis

Adapun hipotesis dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol *Gracilaria* sp. memiliki efektivitas larvasida yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp., yang ditunjukkan oleh tingkat mortalitas larva yang lebih besar serta nilai  $LC_{50}$  yang lebih rendah pada ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dibandingkan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Rumput Laut dan Pentingnya bagi Keanekaragaman Hayati

Laut tropis memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi sehingga menyediakan habitat yang sesuai bagi berbagai organisme laut, termasuk rumput laut. Sebagai negara kepulauan terbesar, Indonesia menjadi representasi penting dalam menggambarkan keanekaragaman hayati tropis sekaligus tercatat sebagai produsen rumput laut terbesar kedua di dunia (FAO, 2020). Rumput laut atau *seaweed* merupakan salah satu tumbuhan laut yang tergolong makroalga benthik, banyak hidup melekat di dasar perairan. Klasifikasi rumput laut berdasarkan kandungan pigmen dibagi menjadi empat kelas, yaitu rumput laut hijau (*Chlorophyta*), rumput laut merah (*Rhodophyta*), rumput laut coklat (*Phaeophyta*), dan rumput laut pirang (*Chrysophyta*) (Suparmi dan Sahri, 2009).

Berdasarkan data FAO tahun 2021, total produksi rumput laut dunia mencapai 36,3 juta ton, yang didominasi oleh *Laminaria* sp. (36,7%), diikuti *Kappaphycus* sp. (17,2%), *Gracilaria* sp. (16,5%), *Undaria* (7,6%), *Eucheuma* sp. (6,8%), dan jenis lainnya (15,2%). Di Indonesia, produksi rumput laut didominasi oleh *Kappaphycus alvarezii* dengan volume 7,05 juta ton (82,7% dari produksi dunia) dan *Gracilaria* dengan volume 1,91 juta ton (32,1% dari produksi dunia) (Cai *et al.*, 2021; Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia, 2023).

Data Kementerian Kelautan dan Perikanan tahun 2007 menunjukkan bahwa produksi rumput laut nasional meningkat secara bertahap selama 2000-2006, dengan lonjakan tajam pada 2004-2006. Perkiraan produksi *Gracilaria*

hingga 2009 mencapai sekitar 400.000 ton (berat basah) per tahun yang tersebar di tujuh provinsi, yaitu Aceh, Lampung, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Tenggara, dan Sulawesi Selatan. Sementara itu, produksi *Eucheuma* diperkirakan lebih tinggi, yaitu sekitar 1.500.000 ton (berat basah) per tahun. Data ini menunjukkan bahwa Indonesia memiliki potensi besar dalam produksi rumput laut yang masih dapat dikembangkan melalui kegiatan budidaya (Pambudi *et al.*, 2010). Salah satu wilayah penghasil rumput laut yang besar dan terus berkembang adalah Kabupaten Sumba Timur di Pulau Sumba, Provinsi Nusa Tenggara Timur, dengan lebih dari 15.000 hektar area laut dangkal yang sesuai untuk kegiatan budidaya (FAO, 2020). Indonesia sebagai negara kepulauan tropis memiliki kondisi biologis yang mendukung pertumbuhan rumput laut. Jenis-jenis rumput laut yang banyak dibudidayakan, dikembangkan, dan diperdagangkan di Indonesia meliputi kelompok karginofit, seperti *Kappaphycus alvarezii* (*Eucheuma* spp.), agarofit (*Gracilaria* spp.), serta alginofit (*Sargassum* spp., *Laminaria* spp., *Ascophyllum* spp., dan *Macrocystis* spp.) (Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia, 2023).

Keragaman spesies dalam komunitas rumput laut memiliki manfaat ekologis bagi lingkungan dan nilai ekonomis bagi manusia, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga memiliki potensi besar untuk dikembangkan. Dari sisi ekologi, kemampuan rumput laut melakukan fotosintesis menjadikannya sumber produktivitas primer di perairan, sehingga populasinya berperan sebagai produsen dalam rantai makanan, terutama bagi organisme herbivora di laut. Selain itu, komunitas rumput laut yang berbentuk rimbun memberikan perlindungan terhadap dampak ombak (Handayani, 2019; Srimariana dkk., 2020; Pereira, 2021; Rajagukguk dkk., 2023).

Sebagian besar vegetasi laut di perairan Indonesia memiliki nilai ekonomis tinggi karena kandungan bioaktifnya, sehingga pemanfaatannya dikembangkan sebagai bahan baku untuk industri makanan, kosmetik,

farmasi, kedokteran, pupuk pertanian, cat, tekstil, pengolahan air limbah, kertas, dan minuman (Ira, 2018; Afonso *et al.*, 2019; Birhis-Dorhoi *et al.*, 2020; Srimariana dkk., 2020; Pereira, 2021; Rajagukguk dkk., 2023). Selain itu, rumput laut juga merupakan sumber daya yang dapat diperbaharui dan berperan penting dalam memberikan perlindungan bagi berbagai organisme laut sekaligus mendukung keanekaragaman hayati di wilayah pesisir dan laut. Rumput laut berfungsi sebagai lokasi bertelur bagi biota laut, produsen dalam rantai makanan, serta sumber nutrisi bagi hewan pesisir, sehingga turut membantu menjaga keseimbangan ekosistem dan meningkatkan produktivitas perairan (Litaay dkk., 2022).

## 2.2 *Gracilaria* sp.

### 2.2.1 Klasifikasi Taksonomi

Menurut Prescott (1954), klasifikasi rumput laut *Gracilaria* sp. adalah sebagai berikut.

Regnum	: Plantae
Divisio	: Rhodophyta
Classis	: Florideophyceae
Ordo	: <i>Gracilariales</i>
Familia	: <i>Gracilariaceae</i>
Genus	: <i>Gracilaria</i>
Species	: <i>Gracilaria</i> sp.

### 2.2.2 Morfologi

*Gracilaria* sp., yang ditunjukkan pada **Gambar 1**, merupakan salah satu jenis rumput laut yang dibudidayakan secara luas di Indonesia, yang merupakan salah satu produsen terbesar *Gracilaria* di dunia. Spesies ini melimpah di berbagai wilayah global, baik dalam kondisi liar maupun melalui budidaya (Meinita *et al.*, 2018).

Morfologi *Gracilaria* sp. menunjukkan keragaman yang cukup tinggi baik antar-populasi maupun antar-spesies. *Thallus* atau batang utama umumnya berbentuk silindris atau terete dengan diameter sekitar 1-2 mm, tumbuh tegak dari *holdfast* berbentuk *discoïd*, dan bercabang secara tidak teratur membentuk cabang sekunder maupun tersier yang panjangnya bervariasi (Othman *et al.*, 2018; Hassan *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2025). Ujung cabang dapat berbentuk runcing atau bercabang dua (bifurkat), sementara beberapa spesies menunjukkan penyempitan pangkal cabang yang khas. Lapisan medula tersusun dari 3-4 lapis sel besar, tidak berpigmen, berbentuk isodiametrik atau sferis, sedangkan lapisan korteks terdiri dari 1-3 lapis sel kecil berbentuk bundar dengan sitoplasma padat. Variasi morfologi juga tampak pada kepadatan percabangan, dengan beberapa populasi memiliki cabang rapat dan pendek, sementara populasi lain lebih jarang dan panjang. Selain itu, cystocarp sebagai struktur reproduktif betina biasanya menonjol di permukaan thallus kecuali pada bagian basal dan apikal (Othman *et al.*, 2018; Hassan *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2025).



**Gambar 1.** *Gracilaria* sp.

### 2.2.3 Kandungan Metabolit Sekunder

*Gracilaria* sp. diketahui mengandung berbagai metabolit sekunder yang berperan penting dalam aktivitas biologisnya. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengkaji kandungan fitokimia dari rumput laut ini. Soamole dkk. (2018) melaporkan bahwa ekstrak etanol *Gracilaria* sp. mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid/steroid, saponin, dan tanin. Penelitian oleh Nittyta dan Hafiludin (2025) juga mendeteksi keberadaan flavonoid dan saponin, namun kondisi sampel yang masih basah diduga menyebabkan beberapa senyawa bioaktif lainnya tidak teridentifikasi. Selain itu, Ouhabi *et al.* (2023) melalui skrining fitokimia pada berbagai ekstrak *Gracilaria bursa-pastoris*, menemukan adanya senyawa fenolik, flavonoid, serta terpenoid/steroid. Bhernama (2020) juga melaporkan bahwa *Gracilaria* sp. positif mengandung flavonoid, terpenoid, dan saponin, sementara Hidayati dkk. (2023) mendeteksi flavonoid dan tanin. Penelitian terbaru oleh Yuanddaru dkk. (2025) menunjukkan bahwa *Gracilaria* sp. mengandung flavonoid, steroid, terpenoid, saponin, dan tanin dalam kadar yang relatif rendah. Rendahnya kandungan ini diduga dipengaruhi oleh sifat polar senyawa tersebut yang lebih mudah larut dalam pelarut polar, sedangkan etil asetat merupakan pelarut semi polar.

### 2.2.4 Potensi Bioaktif

Kandungan metabolit sekunder pada *Gracilaria* sp. berperan penting dalam mendukung berbagai potensi bioaktif dari rumput laut ini. Senyawa seperti alkaloid, terpen, dan flavonoid diketahui mampu mengganggu perkembangan larva dan pada akhirnya menyebabkan kematian (Subhalakshmi *et al.*, 2024). Secara spesifik, flavonoid dapat merusak sistem pernapasan larva (Yuliany dan Fitriani, 2020), sedangkan saponin dapat merusak membran sel dan meningkatkan permeabilitas sehingga menimbulkan lisis pada sel mukosa usus

(Wahyuni dkk., 2022; De Geyter *et al.*, 2007). Selain itu, alkaloid, saponin, dan tanin juga diketahui berperan sebagai racun perut yang mengganggu sistem pencernaan nyamuk (Susanti dkk., 2021; De Geyter *et al.*, 2007).

Temuan tersebut diperkuat oleh hasil penelitian aktivitas larvasida ekstrak *Gracilaria* terhadap berbagai spesies nyamuk, termasuk *Anopheles* sp. Sebagai contoh, Pertiwi dkk. (2025) melaporkan bahwa ekstrak air dan metanol *Gracilaria* sp. menunjukkan efek toksik terhadap *Aedes aegypti* melalui metode semprot (*spray*), dengan nilai  $LC_{50}$  untuk ekstrak metanol sebesar 22,961% dan efektivitas yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak air. Sementara itu, Subhalakshmi *et al.* (2024) juga menemukan bahwa beberapa spesies rumput laut lainnya memiliki aktivitas larvasida yang signifikan, dengan tingkat efektivitas yang bergantung pada konsentrasi dan spesies yang digunakan. Senyawa bioaktif yang bertanggung jawab atas efek tersebut telah berhasil diidentifikasi dan dikarakterisasi, menegaskan potensinya sebagai alternatif insektisida yang ramah lingkungan dan berkelanjutan dibandingkan insektisida kimia.

Selain aktivitas larvasida, *Gracilaria* sp. juga memiliki potensi bioaktif lain. Penelitian oleh Insani dkk. (2022) melaporkan bahwa *Gracilaria* sp. mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti saponin, steroid, dan fenol hidrokuinon yang berperan penting dalam aktivitas biologisnya. Ekstrak metanol *Gracilaria* sp. menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi, yang menunjukkan bahwa spesies ini berpotensi dikembangkan sebagai sumber bahan alam untuk aplikasi di bidang farmakologi maupun pangan fungsional. Aktivitas tersebut sejalan dengan kandungan komponen bioaktif pada ekstrak metanol yang lebih tinggi dibandingkan pelarut lainnya, meliputi fenol hidrokuinon, saponin, dan steroid yang berfungsi sebagai antioksidan alami.

Karbohidrat yang terdapat pada *Gracilaria* sp., memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antimikroba, antiinflamasi, antioksidan, antikoagulan, antikanker (Carpena *et al.*, 2022; Hoang *et al.*, 2024), serta aktivitas antidiabetes yang telah terbukti pada *Gracilaria gracilis* (Pillay *et al.*, 2024).

## **2.3 Pelarut Metanol dan Etil Asetat sebagai Agen Ekstraksi Senyawa Bioaktif**

### **2.3.1 Prinsip Dasar Ekstraksi Menggunakan Pelarut Organik**

Ekstraksi merupakan tahap awal dalam memisahkan senyawa bioaktif dari bahan baku alami. Berbagai metode ekstraksi dapat digunakan, seperti ekstraksi pelarut, distilasi, pengepresan, dan sublimasi, sesuai dengan prinsip ekstraksi masing-masing. Di antara metode tersebut, ekstraksi pelarut merupakan yang paling umum diterapkan. Proses ekstraksi produk alami umumnya meliputi beberapa tahapan, yaitu: (1) pelarut menembus matriks padat; (2) senyawa terlarut larut ke dalam pelarut; (3) senyawa terlarut berdifusi keluar dari matriks padat; dan (4) senyawa yang diekstraksi dikumpulkan. Setiap faktor yang meningkatkan difusi dan kelarutan senyawa selama tahap-tahap tersebut akan mempercepat proses ekstraksi. Efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh sifat pelarut, ukuran partikel bahan baku, rasio pelarut terhadap padatan, suhu, dan lama waktu ekstraksi (Li *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

Pemilihan pelarut menjadi faktor krusial dalam proses ekstraksi karena dapat memengaruhi selektivitas, kelarutan zat terlarut, biaya, dan keamanan. Sesuai dengan prinsip “*like dissolves like*”, pelarut dengan polaritas yang mendekati polaritas zat terlarut cenderung memberikan hasil yang lebih optimal. Alkohol, seperti etanol (EtOH)

dan metanol (MeOH), sering digunakan sebagai pelarut universal dalam penelitian fitokimia (Zhang *et al.*, 2018).

Selain pelarut, ukuran partikel bahan baku juga memengaruhi efisiensi ekstraksi. Partikel yang lebih halus memungkinkan penetrasi pelarut dan difusi zat terlarut menjadi lebih baik, sehingga meningkatkan hasil ekstraksi. Namun, ukuran yang terlalu kecil bisa menyebabkan zat terlarut terserap berlebihan dan menyulitkan proses filtrasi. Suhu yang tinggi meningkatkan kelarutan dan difusi zat, tetapi terlalu tinggi berpotensi menimbulkan kehilangan pelarut, kontaminasi ekstrak, atau kerusakan komponen yang sensitif terhadap panas (termolabil). Lamanya waktu ekstraksi hanya berpengaruh sampai tercapainya keseimbangan antara zat terlarut di bahan padat dan pelarut. Rasio pelarut terhadap padatan yang tinggi biasanya meningkatkan hasil ekstraksi, meskipun rasio yang terlalu tinggi membutuhkan lebih banyak pelarut dan waktu konsentrasi lebih lama (Zhang *et al.*, 2018).

### **2.3.2 Karakteristik Metanol (Polar)**

Metanol adalah senyawa dengan rumus molekul  $\text{CH}_3\text{OH}$  yang bersifat polar karena memiliki gugus hidroksil (-OH), namun juga menunjukkan sifat non-polar akibat adanya gugus metil (- $\text{CH}_3$ ). Meskipun demikian, secara umum metanol dikategorikan sebagai pelarut polar (Ramdani dkk., 2017). Sebagai pelarut yang bersifat universal, metanol mampu melarutkan berbagai senyawa, baik yang bersifat polar maupun non-polar, sehingga banyak dimanfaatkan dalam proses ekstraksi senyawa bioaktif (Salamah dan Farahana, 2015).

Keunggulan lain metanol adalah titik didihnya yang relatif rendah, yaitu  $64,7^\circ\text{C}$ , serta sifat volatilnya yang membuatnya mudah diuapkan. Karakteristik ini mempermudah pemisahan metanol dari

hasil ekstrak, sehingga proses pemekatan dapat dilakukan tanpa banyak merusak kandungan bioaktif (Daryono dkk., 2022; Aiyuba dkk., 2023). Selain itu, metanol lebih mudah diperoleh kembali (*recovery*) maupun didaur ulang (*recycle*) karena tidak terikat kuat dengan air dan relatif menghasilkan metanol murni yang dapat digunakan kembali (Daryono dkk., 2022). Ukuran molekul metanol yang lebih kecil dibandingkan pelarut lain, seperti etanol, juga membuat metanol lebih efektif dalam mengekstrak senyawa metabolit sekunder dalam jumlah lebih banyak (Khair dkk., 2017).

Tidak hanya digunakan dalam ekstraksi, metanol juga memiliki peran penting dalam berbagai teknik kromatografi. Sebagai pelarut polar, metanol kerap dimanfaatkan baik sebagai pelarut ekstraksi maupun fase gerak dalam pemisahan senyawa. Penelitian terhadap rumput laut *Gracilaria* sp. oleh Nittyta dan Hafiludin (2025) menunjukkan bahwa metanol digunakan untuk mengekstraksi senyawa bioaktif, seperti flavonoid dan saponin, yang kemudian dipisahkan lebih lanjut melalui kromatografi kolom setelah pemilihan eluen terbaik menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Selanjutnya, dalam penelitian Rosydiati dan Saleh (2019), metanol digunakan sebagai salah satu komponen fase gerak pada kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) karena senyawa indole-3-asetat (IAA) memiliki kelarutan yang baik di dalam metanol. Lebih lanjut, penelitian oleh Hotmian dkk. (2021) juga menegaskan bahwa metanol berperan penting dalam proses ekstraksi sekaligus analisis kromatografi, khususnya pada identifikasi senyawa bioaktif menggunakan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS). Sifat kepolaran metanol yang tinggi menjadikannya mampu mengekstrak lebih banyak komponen bioaktif dibandingkan pelarut non-polar.

### 2.3.3 Karakteristik Etil Asetat (Semi-Polar)

Etil asetat (*ethyl acetate*) adalah senyawa ester yang terbentuk dari reaksi antara asam asetat dan etanol. Sebagai pelarut organik, etil asetat memiliki sifat semi-polar yang efektif dalam mengekstraksi berbagai senyawa bioaktif dari bahan alam (Wolayana dkk., 2022). Sebagai pelarut semi-polar, etil asetat tidak mampu menarik senyawa yang terlalu polar maupun non-polar secara optimal, namun tetap banyak digunakan karena mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah. Secara fisik, etil asetat adalah cairan tidak berwarna, transparan, berbau harum segar, sedikit seperti aseton, dengan titik didih sekitar 77°C, titik leleh -84°C, konstanta dielektrik 6,02, dan momen dipol 1,88 D, yang menunjukkan polaritas moderat sehingga dapat melarutkan senyawa polar maupun non-polar secara bersamaan (Hujjatusnaini dkk., 2021).

Sifat semi-polar ini memungkinkan etil asetat melarutkan senyawa polar seperti flavonoid dan alkaloid, sekaligus senyawa non-polar seperti hidrokarbon rantai panjang, menjadikannya pelarut ideal dalam proses ekstraksi untuk memperoleh berbagai metabolit sekunder dari tanaman (Asmah dkk., 2020). Selain itu, etil asetat juga digunakan dalam berbagai teknik kromatografi, termasuk kromatografi lapis tipis (TLC), kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), dan kromatografi gas (GC), terutama sebagai komponen fase gerak untuk memisahkan dan mengkarakterisasi berbagai komponen dalam campuran.

## 2.4 Larvasida Nabati

### 2.4.1 Mekanisme Larvasida Nabati terhadap Larva

Larvasida nabati merupakan alternatif pengendalian larva nyamuk vektor penyakit, seperti *Aedes aegypti*, yang ramah lingkungan dan aman bagi organisme non-target. Senyawa aktif dalam tanaman dapat

memengaruhi larva melalui berbagai mekanisme biologis. Salah satunya adalah gangguan pada sistem pencernaan. Penelitian oleh Anggraini (2022) menunjukkan bahwa paparan insektisida nabati dapat menyebabkan perubahan histopatologis pada sel epitel *midgut* larva, termasuk vakuolisasi dan lisis sel, sehingga fungsi pencernaan terganggu dan larva mengalami kematian. Selain itu, senyawa seperti flavonoid dan tanin dalam ekstrak tanaman dapat menghambat metabolisme larva serta proses pergantian kulit, sehingga perkembangan larva menuju stadium berikutnya terganggu (Sucipto, 2015).

Mekanisme lain yang ditemukan adalah gangguan pada sistem saraf dan respirasi. Perumalsamy *et al.* (2015) melaporkan bahwa senyawa dari *Millettia pinnata* dapat memengaruhi sistem saraf larva, menyebabkan kelumpuhan dan akhirnya kematian. Larvasida nabati juga dapat menimbulkan kerusakan pada struktur seluler larva. Hidayah (2022) menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba menyebabkan kerusakan pada sel-sel larva, sehingga mengarah pada kematian mereka. Keunggulan penggunaan larvasida nabati selain efektivitasnya adalah minimnya dampak lingkungan. Namun, efektivitas larvasida nabati dapat dipengaruhi oleh faktor konsentrasi, bentuk sediaan, dan kondisi lingkungan, sehingga penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memaksimalkan penggunaannya. Secara keseluruhan, mekanisme larvasida nabati melibatkan kombinasi gangguan sistem pencernaan, metabolisme, saraf, respirasi, dan kerusakan seluler, yang secara bersama-sama menyebabkan kematian larva dan menghambat perkembangan populasi nyamuk.

#### **2.4.2 Efek Fisiologis dan Morfologis pada Larva Nyamuk (*Anopheles* sp.)**

Larva nyamuk *Anopheles* sp. merupakan tahap penting dalam siklus hidup nyamuk vektor malaria. Paparan terhadap berbagai senyawa,

termasuk insektisida nabati, dapat memengaruhi kondisi fisiologis dan morfologis larva.

**a. Gangguan pada Sistem Pencernaan**

Senyawa aktif dalam insektisida nabati dapat merusak struktur sistem pencernaan larva. Penelitian oleh Anggraini (2022) menunjukkan bahwa paparan insektisida nabati menyebabkan perubahan histopatologis pada sel epitel *midgut* larva *Aedes aegypti*, termasuk vakuolisasi dan lisis sel, yang mengarah pada gangguan pencernaan dan kematian larva.

**b. Gangguan pada Sistem Saraf dan Respirasi**

Beberapa senyawa dalam insektisida nabati dapat memengaruhi sistem saraf dan respirasi larva. Perumalsamy *et al.* (2015) menemukan bahwa senyawa dari *Millettia pinnata* dapat mengganggu sistem saraf larva, menyebabkan kelumpuhan dan kematian.

**c. Kerusakan pada Struktur Seluler**

Paparan insektisida nabati dapat menyebabkan kerusakan pada struktur seluler larva. Hidayah (2022) menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba dapat menyebabkan kerusakan pada struktur seluler larva *Aedes aegypti*, mengarah pada kematian mereka.

**d. Efek Samping dan Keberlanjutan**

Penggunaan insektisida nabati memiliki keunggulan dalam hal keberlanjutan dan minimnya efek samping terhadap lingkungan. Namun, efektivitasnya dapat dipengaruhi oleh faktor seperti konsentrasi, bentuk sediaan, dan kondisi lingkungan.

## 2.5 *Anopheles* sp.

### 2.5.1 Klasifikasi Taksonomi

Menurut Setyaningrum (2020), klasifikasi *Anopheles* sp. adalah sebagai berikut.

Phylum	: Arthropoda
Classis	: Arthropoda
Ordo	: Diptera
Familia	: Culicidae
Subfamilia	: Anophelinae
Genus	: <i>Anopheles</i>
Species	: <i>Anopheles</i> sp.

### 2.5.2 Morfologi *Anopheles* sp.

Menurut Setyaningrum (2020), nyamuk *Anopheles* dewasa memiliki tubuh kecil yang terdiri dari tiga bagian utama, yaitu kepala, toraks, dan abdomen, yang dapat dilihat pada **Gambar 2**.

#### a. Kepala

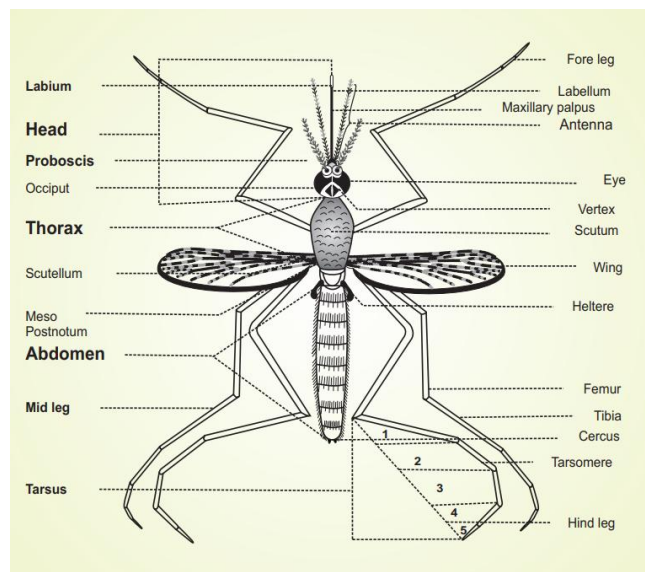
Kepala nyamuk dilengkapi dengan mata, antena, probosis, dan palpus. Mata atau hensen, berperan dalam penglihatan. Antena berfungsi mendeteksi bau dari hospes, baik manusia maupun hewan, serta membantu nyamuk betina menemukan lokasi bertelur. Probosis merupakan organ mulut yang memanjang. Pada nyamuk betina, probosis tajam dan kuat untuk menghisap darah, sementara pada jantan hanya digunakan untuk mengonsumsi cairan non-darah. Palpus yang terletak di sisi kanan dan kiri probosis berfungsi sebagai organ sensorik.

### b. Torak

Torak nyamuk *Anopheles* berbentuk seperti lokomotif dan menjadi tempat melekatnya tiga pasang kaki serta dua pasang sayap. Di antara toraks dan abdomen terdapat alat keseimbangan yang disebut halter, yang membantu nyamuk mempertahankan stabilitas saat terbang.

### c. Abdomen

Abdomen berperan sebagai organ pencernaan sekaligus tempat pembentukan telur. Bagian ini mengembang saat nyamuk betina mengisap darah, yang kemudian dicerna secara bertahap untuk menyediakan protein yang diperlukan dalam proses produksi telur. Abdomen berfungsi menyimpan dan memproses nutrisi dari darah untuk mendukung reproduksi betina.

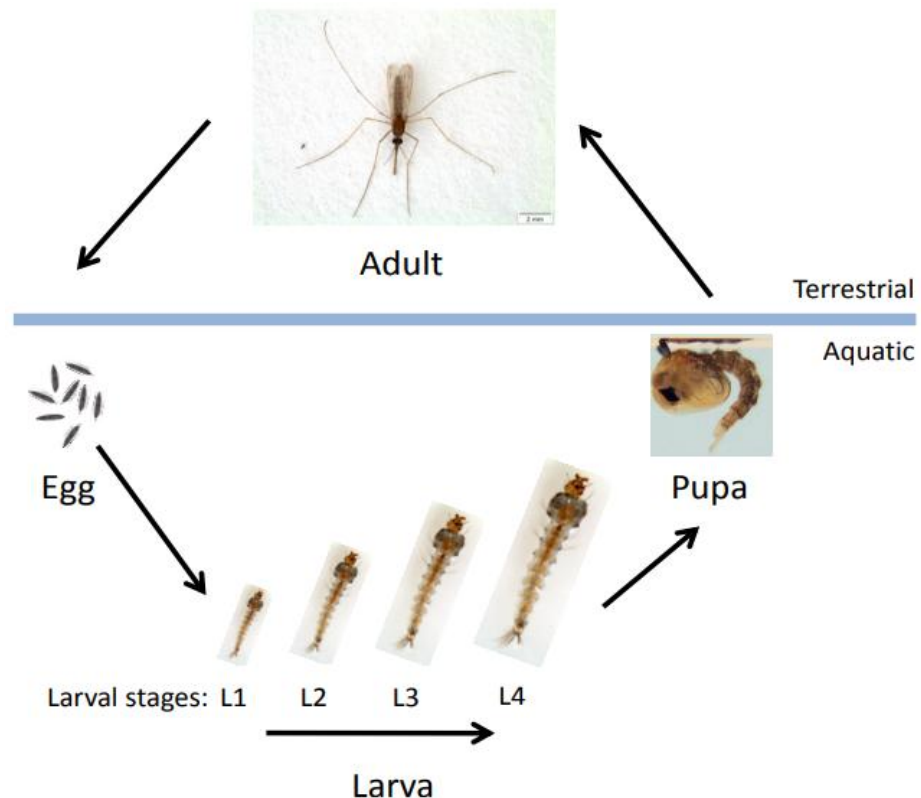


**Gambar 2.** Morfologi Nyamuk *Anopheles* sp. Betina (WHO, 2020)

### 2.5.3 Siklus Hidup *Anopheles* sp.

Siklus hidup *Anopheles* sp. terdiri dari empat tahap, yaitu telur, larva, pupa, dan dewasa, yang berlangsung sekitar 7-14 hari. Tiga tahap pertama terjadi di lingkungan air (akuatik), sedangkan tahap dewasa

berada di daratan (terrestrial). Pada fase dewasa, nyamuk betina berperan sebagai vektor malaria. Nyamuk betina dewasa umumnya hidup 1-2 minggu di alam, meskipun dapat mencapai satu bulan atau lebih di penangkaran (Setyaningrum, 2020). Siklus hidup *Anopheles* dapat dilihat pada **Gambar 3**.



**Gambar 3.** Siklus Hidup *Anopheles* sp. (Williams and Pinto, 2012)

**a. Stadium Telur**

Nyamuk *Anopheles* sp. betina dewasa umumnya menghasilkan 50-200 butir telur. Pada saat pertama kali diletakkan di permukaan air, telur berwarna putih, kemudian berubah menjadi gelap dalam 1-2 jam berikutnya. Bentuk telur lonjong dengan ujung meruncing di kedua sisinya. Peletakan telur dilakukan satu per satu di permukaan air atau dalam kelompok yang tidak saling menempel. Telur *Anopheles* sp. tidak mampu bertahan pada kondisi kering dan biasanya menetas dalam waktu 2-3 hari,

namun di daerah beriklim dingin proses penetasan dapat berlangsung hingga 2-3 minggu (Setyaningrum, 2020).

#### **b. Stadium Larva**

Setelah menetas, larva *Anopheles* sp. mengalami empat instar (I-IV) sebelum bermetamorfosis menjadi pupa. Lama fase ini sangat dipengaruhi oleh suhu; pada kondisi tropis optimal (sekitar 25-30 °C), perkembangan larva berlangsung 7-14 hari, sedangkan pada suhu rendah pertumbuhan menjadi lebih lambat dan risiko kematian meningkat. Selain suhu, faktor lain seperti ketersediaan nutrisi (fitoplankton dan detritus), kepadatan populasi (kompetisi intraspesifik), serta salinitas (pada spesies pesisir seperti *An. merus* atau *An. sundaicus*) turut menentukan laju perkembangan dan kelangsungan hidup (Christiansen-Jucht *et al.*, 2015; Agyekum *et al.*, 2021).

Secara morfologis, larva memiliki mulut dengan struktur menyerupai sikat untuk mengambil makanan. Bagian toraks tampak lebih besar dibandingkan segmen lainnya, sedangkan abdomen berbentuk tersegmentasi tanpa kaki. Tidak seperti larva nyamuk lain, larva *Anopheles* sp. tidak memiliki sifon pernapasan sehingga saat beristirahat tubuhnya sejajar dengan permukaan air. Proses pernapasan dilakukan melalui spirakel pada segmen kedelapan abdomen. Larva mencari makan di permukaan air dengan sumber utama berupa ganggang, bakteri, dan mikroorganisme lain. Jika mengalami gangguan, larva akan menyelam ke bagian bawah air. Faktor lingkungan seperti suhu, nutrisi, dan keberadaan predator juga memengaruhi perkembangan larva hingga mencapai tahap pupa (Setyaningrum, 2020).

Larva instar III *Anopheles* sp. dipilih sebagai organisme uji karena pada stadia ini terjadi perkembangan morfologi yang signifikan dengan struktur internal yang telah terdiferensiasi, sehingga memungkinkan analisis morfologi dan histopatologi dilakukan secara lebih akurat dan konsisten (Emami *et al.* (2007). Studi histopatologi pada larva instar ketiga *Anopheles stephensi* yang dipaparkan dengan ekstrak air *Lagenaria siceraria* dan nanopartikel ZnO menunjukkan kerusakan pada lapisan epitel kutikula luar, serta kerusakan pada *midgut* dan *caeca*, yang dapat diamati dengan jelas pada tahap ini (Kalpana *et al.*, 2020). Selain itu, penelitian oleh Banumathi *et al.* (2017) juga menunjukkan bahwa larva instar ketiga *Aedes aegypti* yang dipaparkan dengan nanopartikel perak mengalami kerusakan struktural yang signifikan, termasuk keruntuhan total struktur larva, yang lebih mudah diamati pada tahap ini.

#### **c. Stadium Pupa**

Pupa merupakan tahap akhir perkembangan yang berlangsung di lingkungan air dan tidak memerlukan asupan makanan. Pada fase ini terjadi pembentukan organ tubuh nyamuk, termasuk alat kelamin, sayap, dan kaki. Durasi stadium pupa pada nyamuk jantan lebih singkat sekitar 1-2 jam dibandingkan pupa betina. Secara umum, tahap ini berlangsung selama 2 hingga 4 hari (Setyaningrum, 2020).

#### **d. Stadium Dewasa**

Nyamuk dewasa berpindah dari lingkungan akuatik ke daratan setelah menyelesaikan siklus hidupnya. Pada tahap ini, betina *Anopheles* berperan sebagai vektor malaria. Umur nyamuk betina di alam berkisar 1-2 minggu, tetapi dapat mencapai sebulan atau lebih dalam penangkaran.

Tubuh nyamuk *Anopheles* berukuran kecil (4-13 mm) dan rapuh, terdiri dari kepala, toraks, dan abdomen yang meruncing di bagian ujung. Kepala relatif lebih kecil dibandingkan toraks dan abdomen, dengan sepasang antena di depan mata yang tersusun atas 14-15 ruas. Antena jantan memiliki rambut lebat (tipe plumose), sedangkan betina berambut lebih pendek dan jarang.

Mulut memanjang membentuk probosis. Pada betina, probosis berkembang sempurna untuk menusuk kulit dan mengisap darah, sehingga hanya betina yang berperan dalam penularan malaria. Sebaliknya, jantan menggunakan probosis untuk mengisap cairan tumbuhan, buah, atau keringat (Setyaningrum, 2020).

#### **2.5.4 Peran *Anopheles* sp. sebagai Vektor Malaria**

Nyamuk *Anopheles* sp. merupakan vektor utama penularan malaria, yaitu penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit Plasmodium yang berada di dalam eritrosit atau jaringan tubuh. Spesies Plasmodium yang umum menginfeksi manusia meliputi *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale* (Sinum dkk., 2023). Untuk dapat berperan sebagai vektor, nyamuk *Anopheles* harus memiliki kebiasaan menggigit manusia serta umur hidup yang cukup panjang, sehingga parasit malaria dapat menyelesaikan siklus hidupnya hingga mencapai bentuk infeksi sebelum ditularkan kembali. Faktor lingkungan, terutama suhu, sangat memengaruhi kecepatan perkembangan Plasmodium dalam tubuh nyamuk (Setyaningrum, 2020).

Berdasarkan *World Malaria Report 2024*, tercatat sekitar 263 juta kasus malaria di seluruh dunia pada tahun 2023, meningkat sekitar 11 juta kasus dibanding tahun sebelumnya, dengan jumlah kematian mencapai 597.000 jiwa. Sebagian besar, yaitu 94% kasus dan 95% kematian, terjadi di wilayah WHO Afrika, dan anak-anak di bawah usia lima tahun menyumbang hingga 76% dari seluruh kematian

tersebut (WHO, 2024). Namun, hanya sekitar 30-40 spesies *Anopheles* yang berperan penting sebagai vektor malaria secara epidemiologis. Distribusi dan adaptasi lokal setiap spesies bervariasi, mencakup preferensi menggigit manusia (antropofilik), kebiasaan menggigit malam hari, serta ketahanan terhadap insektisida. Contohnya, *An. gambiae*, *An. funestus*, dan *An. nili* mendominasi penyebaran malaria di Afrika Barat. Di wilayah Gbêkê, Pantai Gading, *An. gambiae* bertanggung jawab atas sekitar 84,8% transmisi malaria, dengan puluhan gigitan infeksius per individu per tahun pada musim hujan (Koffi *et al.*, 2023).

#### **2.5.5 Pola Habitat dan Perilaku Ekologis *Anopheles* sp.**

Pola habitat dan perilaku ekologis *Anopheles* sp. sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan serta karakteristik spesies itu sendiri. Beberapa spesies, seperti *An. gambiae*, *An. rufipes*, dan *An. pharoensis*, ditemukan di berbagai habitat perkembangbiakan, termasuk sumur gali, rawa, dan parit, dengan distribusi yang bervariasi di berbagai zona ekologi, misalnya di Ghana (Hinne *et al.*, 2021). Faktor lingkungan seperti suhu, kelembapan, dan vegetasi juga turut memengaruhi distribusi serta prevalensi parasit malaria pada larva maupun nyamuk dewasa (Vantaux *et al.*, 2021). Perbedaan perilaku ekologi antar spesies terlihat dari pola makan dan pemanfaatan habitat misalnya, *An. gambiae* lebih sering ditemukan di lingkungan domestik, sedangkan *An. funestus* lebih dominan di habitat liar (Bouafou dkk., 2024).

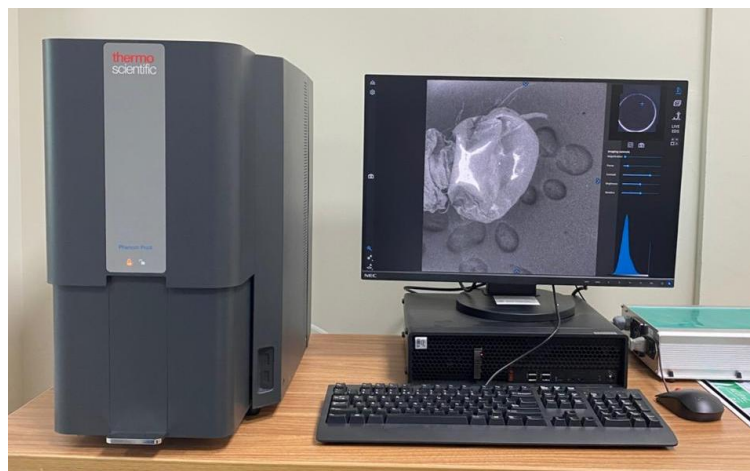
Selain itu, perubahan iklim global turut memengaruhi pola distribusi dan risiko penularan malaria. Menurut *World Malaria Report* (2023), peningkatan suhu dan perubahan pola cuaca berdampak pada kesehatan, keamanan, dan mata pencaharian masyarakat. Cuaca ekstrem, seperti banjir akibat curah hujan tinggi, berperan dalam meningkatkan risiko penularan malaria. Contohnya, pada musim

monsun yang lebih intens di Pakistan, banjir besar memicu epidemi malaria dengan lonjakan kasus hingga lima kali lipat pada tahun 2022 dibanding tahun sebelumnya. Kejadian cuaca ekstrem diperkirakan akan semakin sering dan parah seiring dampak perubahan iklim (WHO, 2024).

## 2.6 *Scanning Electron Microscope (SEM)* dalam Analisis Morfologi

### 2.6.1 Prinsip dan Mekanisme Kerja *Scanning Electron Microscope (SEM)*

*Scanning Electron Microscope (SEM)*, yang dapat dilihat pada **Gambar 4**, merupakan jenis mikroskop elektron yang memindai permukaan spesimen menggunakan berkas elektron berenergi tinggi dalam pola pemindaian raster (Wijayanto dan Bayuseno, 2013).



**Gambar 4.** *Scanning Electron Microscope*

SEM terdiri dari beberapa komponen utama, yaitu pistol elektron yang biasanya terbuat dari filamen tungsten untuk menghasilkan elektron, lensa elektron berbentuk lensa magnetik yang berfungsi memfokuskan berkas elektron, dan sistem vakum untuk mencegah hamburan elektron oleh molekul udara. Prinsip kerja SEM dimulai dari pembangkitan berkas elektron oleh pistol elektron, percepatan dengan

anoda, pemfokusan melalui lensa magnetik, dan pengarahannya oleh koil pemindai agar menyapu permukaan spesimen. Saat berkas elektron mengenai sampel, terjadi interaksi yang menghasilkan elektron sekunder, elektron pantul (*backscattered*), dan sinar-X karakteristik. Sinyal-sinyal ini diterima detektor dan diubah menjadi citra pada layar, sehingga memberikan informasi detail mengenai struktur, topografi, dan komposisi permukaan spesimen (Wijayanto dan Bayuseno, 2013).

### **2.6.2 Aplikasi *Scanning Electron Microscope* (SEM) pada Larva Nyamuk**

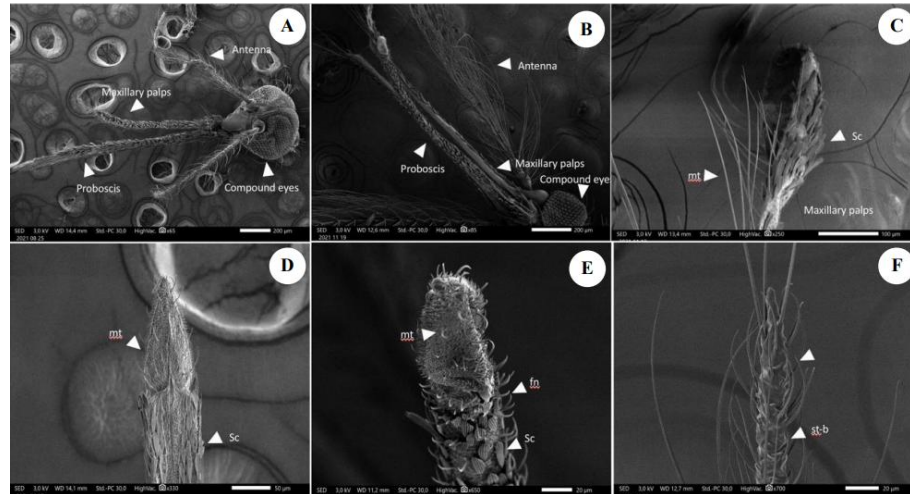
*Scanning Electron Microscope* (SEM) telah banyak digunakan untuk mengamati morfologi dan topologi berbagai jenis bahan di berbagai disiplin ilmu. Dalam bidang biologi seluler, pemanfaatan kriomikroskopi resolusi tinggi memungkinkan pengamatan struktur membran sel dan morfologi sub-seluler tanpa menimbulkan perubahan akibat metode preparasi konvensional, sehingga sel tetap dalam kondisi terhidrasi penuh. Di bidang biologi jaringan, kemampuan SEM untuk menghasilkan citra resolusi tinggi dari ultrastruktur pada area luas dan volume jaringan yang besar sangat bermanfaat untuk memahami hubungan fungsional antarbagian sistem biologis yang tersebar pada jarak tertentu. Sementara itu, dalam penelitian biomaterial, sifat fisik dan kimia material maupun nanopartikel sangat bergantung pada strukturnya, yang dapat diperiksa secara detail menggunakan mikroskop elektron (Karolina dkk., 2022).

Dalam penelitian entomologi, SEM memungkinkan pengamatan rinci terhadap permukaan larva nyamuk, termasuk bagian kepala, antena, sifon, spirakel, serta sensilla yang berperan dalam sistem sensorik. Schaper *et al.* (2006) menggunakan SEM untuk mengkaji perubahan morfologi pada empat instar larva *Aedes aegypti*, dan menemukan perbedaan signifikan pada struktur pecten dan spirakel selama

perkembangan larva. Penelitian oleh Kirti and Shipali (2014) juga menerapkan SEM untuk mendeskripsikan morfologi larva dan pupa *Anopheles stephensi*, khususnya pada sikat mulut dan spirakel, yang berguna dalam identifikasi taksonomi spesies. Yamany *et al.* (2024) meneliti larva instar IV *Aedes albopictus* menggunakan SEM dan berhasil mengidentifikasi karakter diagnostik seperti comb scales dan sensilla dengan resolusi tinggi.

Selain untuk tujuan identifikasi morfologi, SEM juga digunakan untuk menilai efek agen biolarvasida terhadap struktur permukaan larva nyamuk. De Torres *et al.* (2020) memanfaatkan SEM untuk memvisualisasikan kerusakan integumen, deformasi sifon, dan ruptur permukaan tubuh larva *Aedes aegypti* setelah perlakuan insektisida, sehingga memberikan bukti visual mekanisme toksisitas senyawa bioaktif. Penelitian serupa oleh Pereira *et al.* (2025) menggunakan SEM untuk mengamati kolonisasi jamur entomopatogen pada permukaan tubuh nyamuk setelah infeksi, yang menegaskan efektivitas agen hayati tersebut. Dey *et al.* (2023) juga menggunakan SEM untuk menilai efek ekstrak tanaman terhadap larva *Anopheles stephensi*, menemukan kerusakan pada kutikula dan organ pernapasan sebagai indikator efektivitas senyawa tersebut. Beberapa penelitian lain membuktikan bahwa SEM efektif untuk menilai efek toksik senyawa terhadap larva nyamuk, termasuk pengamatan kerusakan pada kutikula, *midgut*, dan organ pernapasan setelah perlakuan dengan nanopartikel maupun ekstrak tumbuhan (Kumar *et al.*, 2016).

Hasil dari penggunaan SEM juga dapat dilihat pada penelitian Supriyono dkk. (2022), yang memvisualisasikan morfologi *Anopheles aconitus* sebagaimana ditunjukkan pada **Gambar 5**.



**Gambar 5.** *Scanning Electron Microscope (SEM)* dari *Anopheles aconitus*: A. kepala nyamuk betina, skala 200  $\mu\text{m}$ ; B. kepala nyamuk jantan, skala 200  $\mu\text{m}$ ; C. ujung palp maksila, skala 100  $\mu\text{m}$ ; D. ujung probosis, skala 50  $\mu\text{m}$ ; E. bagian dorsal probosis, skala 20  $\mu\text{m}$ ; F. antenna, skala 20  $\mu\text{m}$  (Supriyono dkk., 2022).

### 2.6.3 Kelebihan *Scanning Electron Microscope (SEM)* dalam Penelitian Larvasida

*Scanning Electron Microscope (SEM)* memiliki berbagai kelebihan yang menjadikannya alat penting dalam penelitian larvasida. Menurut Karolina dkk. (2022), kelebihan *Scanning Electron Microscope (SEM)* adalah sebagai berikut.

1. Resolusi. Instrumen ini mampu menghasilkan citra digital dengan resolusi hingga 15 nanometer, sehingga sangat efektif untuk mengamati struktur mikro seperti retakan, korosi, butiran kristal, maupun batas antargraen.
2. Standar pembesaran yang terkalibrasi. Setiap citra yang dihasilkan telah dikalibrasi terhadap standar yang dapat dilacak, sehingga memudahkan analisis lanjutan terhadap gambar yang tersimpan, seperti pengukuran ketebalan lapisan, ukuran butiran, maupun ukuran partikel.

3. Analisis kimia. Dengan dukungan sistem *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* (EDS), SEM mampu melakukan analisis unsur baik secara kualitatif maupun kuantitatif, termasuk pemetaan elemen dan pemindaian garis sinar-X. Informasi ini bermanfaat untuk mengidentifikasi penyebab cacat pada produk, menentukan unsur dalam bahan asing, menilai ketebalan lapisan, serta memperkirakan ukuran butiran dan partikel.
4. Preparasi sampel yang sederhana. Meskipun setiap sampel perlu dipersiapkan sebelum dimasukkan ke ruang vakum, proses preparasi untuk kebanyakan sampel SEM relatif sederhana dan tidak memerlukan perlakuan yang kompleks.

Secara keseluruhan, kemampuan resolusi tinggi, akurasi pengukuran, analisis unsur, dan kemudahan preparasi menjadikan SEM sebagai instrumen yang sangat andal untuk mendukung analisis morfologi serta perubahan struktural pada larva dalam penelitian aktivitas larvasida.

## **2.7 Histopatologi Larva *Anopheles* sp.**

### **2.7.1 Konsep Dasar Histopatologi pada Jaringan Serangga**

Histopatologi adalah cabang ilmu patologi yang mempelajari perubahan-perubahan jaringan yang disebabkan oleh penyakit. Teknik ini melibatkan pemeriksaan jaringan biopsi atau jaringan bedah yang telah dipotong dan diwarnai dengan pewarnaan khusus di bawah mikroskop (Digambiro dan Parwanto, 2024).

Histopatologi pada serangga adalah studi mengenai perubahan struktural dan fungsional jaringan akibat pengaruh eksternal seperti infeksi, toksin, atau senyawa bioaktif. Pada serangga, histopatologi digunakan untuk menilai efek toksik senyawa, termasuk larvasida,

dengan mengamati perubahan pada jaringan seperti *midgut*, epidermis, dan otot. Metode ini memungkinkan identifikasi kerusakan seluler seperti vakuolisasi, nekrosis, dan degenerasi, yang penting untuk memahami mekanisme aksi senyawa dan menilai potensi toksisitasnya. Penelitian oleh Senthil-Nathan (2020) menunjukkan bahwa paparan senyawa sintetik dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan *midgut* dan kutikula larva nyamuk, yang dievaluasi melalui analisis histopatologi.

### **2.7.2 Prinsip Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) pada Preparat Larva**

Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) merupakan teknik histologis standar yang paling umum digunakan untuk menilai struktur dan morfologi jaringan. Teknik ini menggunakan dua jenis pewarna dengan sifat kimia berbeda, yaitu hematoxylin dan eosin. Hematoxylin merupakan pewarna basa yang memberikan warna biru pada struktur sel yang bersifat asam (basofilik), seperti nukleus dan ribosom, sedangkan eosin merupakan pewarna asam yang memberikan warna merah pada struktur sel yang bersifat basa (eosinofilik), seperti sitoplasma (Digambiro dan Parwanto, 2024).

Menurut Digambiro dan Parwanto (2024), prinsip dasar dari proses pewarnaan histologi meliputi beberapa tahapan sebagai berikut:

#### **1. Pemilihan Pewarna**

Pewarna yang digunakan harus mampu menunjukkan perbedaan antara berbagai struktur dan komponen sel serta jaringan. Dalam pewarnaan HE, hematoxylin yang merupakan pewarna basa digunakan untuk menstain inti sel yang kaya asam nukleat, sedangkan eosin sebagai pewarna asam digunakan untuk menstain sitoplasma dan komponen ekstraseluler.

## **2. Preparasi Sampel**

Sebelum proses pewarnaan dilakukan, jaringan harus melalui tahap deparafinisasi dan rehidrasi untuk menghilangkan parafin serta mengembalikan kondisi jaringan ke keadaan alami.

## **3. Aplikasi Pewarna**

Tahap ini dilakukan dengan cara merendam slide ke dalam larutan pewarna atau meneteskan pewarna langsung pada permukaan preparat agar jaringan dapat terwarnai secara merata.

## **4. Diferensiasi dan Pencucian**

Setelah pewarnaan, dilakukan proses diferensiasi untuk menghilangkan kelebihan pewarna dan memperjelas gambaran struktur histologis. Biasanya dilakukan dengan merendam preparat dalam alkohol atau larutan asam, kemudian dicuci untuk menghilangkan sisa pewarna.

## **5. Dehidrasi dan Mounting**

Setelah pencucian, preparat didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dan xylene untuk menghilangkan sisa air. Selanjutnya, preparat ditutup dengan cover slip menggunakan media mounting, lalu dibiarkan mengering sebelum diamati di bawah mikroskop.

Tahap deparafinisasi merupakan langkah awal penting dalam pewarnaan jaringan. Tujuan utamanya adalah menghilangkan parafin dari jaringan dan kaca objek agar penyerapan pewarna menjadi maksimal. Karena parafin merupakan campuran hidrokarbon yang bersifat hidrofobik dan tidak larut dalam air, maka pelarut nonpolar seperti xylene digunakan untuk melarutkannya (Apriani dkk., 2023).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada September 2025 – April 2026. Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Botani, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Jurusan Biologi, Universitas Lampung. Pembuatan ekstrak dan uji aktivitas larvasida dilakukan di Laboratorium Zoologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Jurusan Biologi, Universitas Lampung. Uji fitokimia dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Jurusan Kimia, Universitas Lampung. Uji *Scanning Electron Microscope* (SEM) dilakukan di Laboratorium Riset, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Negeri Raden Intan Lampung. Pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) serta pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dilakukan di Laboratorium Patologi, Balai Veteriner Lampung.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

Beaker glass, aluminium foil, batang pengaduk, kertas saring, kertas wrap, corong, labu erlenmeyer, gelas ukur, polybag, toples kaca, toples plastik, tabung plastik, timbangan analitik, timbangan biasa, spatula, kertas label, tabung reaksi, rak tabung, thinwall, rotary evaporator, micropipet, *Scanning Electron Microscope* (SEM), hotplate, stub aluminium, spesimen stub, perekat karbon, pinset, pipet

tetes, kulkas, fumehood, saringan kecil, inkubator, mikrotom, sputter coater, waterbath, cetakan embedding (mould), object glass, cover glass, dan Mikroskop Cahaya.

### 3.2.2. Bahan

Rumput laut *Gracilaria* sp. segar diambil dari Pantai Merak yang terletak di Kampung Berombang, Desa Lontar, Kecamatan Tirtayasa Serang, Banten, Jawa Barat. Larva *Anopheles* sp. instar III yang di dapat dari Desa Hanura, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah metanol dan etil asetat. Bahan-bahan yang digunakan untuk skrining fitokimia yaitu akuades, asam klorida (p)/ HCl, asam sulfat (p)/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> (Besi III chlorida) 10%, asam asetat glacial, reagen Mayer, kristal magnesium.

Bahan yang digunakan untuk preparasi *Scanning Electron Microscope* (SEM) yaitu akuades steril, larutan glutaraldehid 2,5% dalam buffer fosfat 0,1 M (pH 7,2), etanol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan 100%), silika gel, dan emas (Au). Bahan yang digunakan dalam uji histopatologi, yaitu akuades steril, larutan formalin buffer 10%, etanol (30%, 50%, 70%, 96%, 100%), alkohol absolut, toluena (xylol), paraffin cair, dan Hematoxylin-Eosin (HE).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diberikan berupa ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. dengan lima taraf konsentrasi, yaitu kontrol (0%), 0,5%, 0,75%, 1%, dan 1,2%. Penentuan konsentrasi perlakuan berdasarkan pada metode Marcellia dkk. (2024). Variabel terikat meliputi mortalitas larva *Anopheles* sp. instar III, serta perubahan morfologi dan histopatologi larva. Pengamatan morfologi

larva menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan histopatologi jaringan usus tengah larva menggunakan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) dilakukan untuk mendeskripsikan perubahan struktur larva pada masing-masing perlakuan.

Setiap level perlakuan diulang lima kali dan setiap ulangan menggunakan 25 ekor larva *Anopheles* sp. instar III dalam volume larutan uji 100 mL.

Pengamatan mortalitas dilakukan setelah 24 jam perlakuan sesuai acuan WHO (2005). Larva *Anopheles* sp. instar III yang mati dari tiap perlakuan dipilih untuk pengamatan morfologi permukaan tubuh menggunakan SEM dan pengamatan histopatologi dengan pewarnaan HE yang diamati di bawah mikroskop cahaya untuk melihat kerusakan jaringan internal.

Perlakuan ekstrak metanol *Gracilaria* sp. terhadap larva *Anopheles* sp. Instar III dapat dilihat pada **Tabel 1**. Sedangkan perlakuan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. terhadap larva *Anopheles* sp. Instar III dapat dilihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 1.** Perlakuan Ekstrak Metanol *Gracilaria* sp. Terhadap Larva *Anopheles* sp. Instar III

<b>Jenis Ekstrak</b>	<b>Kode Perlakuan</b>	<b>Konsentrasi</b>
Metanol	PM1	0%
Metanol	PM2	0,5%
Metanol	PM3	0,75%
Metanol	PM4	1%
Metanol	PM5	1,2%

**Tabel 2.** Perlakuan Ekstrak Etil Asetat *Gracilaria* sp. Terhadap Larva *Anopheles* sp. Instar III

Jenis Ekstrak	Kode Perlakuan	Konsentrasi
Etil Asetat	PEA1	0%
Etil Asetat	PEA2	0,5%
Etil Asetat	PEA3	0,75%
Etil Asetat	PEA4	1%
Etil Asetat	PEA5	1,2%

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pengumpulan Tumbuhan

Bahan tumbuhan yang digunakan adalah rumput laut *Gracilaria* sp. sebanyak 15 kg yang diperoleh dari Pantai Merak yang terletak di Kampung Berangbang, Desa Lontar, Kecamatan Tirtayasa Serang, Banten, Jawa Barat. Rumput laut *Gracilaria* sp. dipilih yang masih segar dengan ciri tidak terdapat bercak putih, tidak terkelupas, segar, elastis, sehat (Cyntyta dkk., 2018).

#### 3.4.2 Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Jurusan Biologi Universitas Lampung

#### 3.4.3 Pembuatan Simplisia

Tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah rumput laut *Gracilaria* sp. *Gracilaria* sp. dibersihkan dari kotoran yang melekat dan dicuci dengan air hingga bersih, kemudian ditiriskan. Selanjutnya, *Gracilaria* sp. yang sudah ditiriskan dikeringkan di bawah sinar matahari dengan cara ditutup dengan kain berwarna gelap. *Gracilaria* sp. tersebut dijemur sampai kering. Simplisia yang telah kering

diblender menjadi serbuk lalu dimasukkan ke dalam toples plastik tertutup untuk mencegah pengaruh lembab dan pengotor seperti debu.

#### 3.4.4 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara berikut :

**a. Ekstrak Metanol *Gracilaria* sp.**

Sejumlah 500 g serbuk simplisia kering *Gracilaria* sp. diekstraksi dengan 5000 mL metanol (perbandingan 1 : 10) dengan metode maserasi selama 7 hari, kemudian disaring. Filtrat diambil dan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Sianipar dkk., 2020).

**b. Ekstrak Etil Asetat *Gracilaria* sp.**

Sejumlah 500 g serbuk simplisia kering *Gracilaria* sp. diekstraksi dengan 5000 mL etil asetat (perbandingan 1 : 10) dengan metode maserasi selama 7 hari, kemudian disaring. Filtrat diambil dan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Sianipar dkk., 2020).

#### 3.4.5 Pembuatan Konsentrasi

Pembuatan larutan uji dilakukan untuk memperoleh konsentrasi perlakuan yang sesuai dengan rancangan penelitian, yaitu 0,5%, 0,75%, 1%, 1,2%, serta kontrol negatif (0%). Larutan uji dibuat dari larutan stok ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp.

Perhitungan konsentrasi ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. menggunakan rumus sebagai berikut.

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

**Keterangan:**

$M_1$  = konsentrasi larutan awal (%)

$V_1$  = volume larutan awal (mL)

$M_2$  = konsentrasi larutan setelah pengenceran (%)

$V_2$  = volume larutan setelah pengenceran (mL)

Volume akhir setiap larutan uji ( $V_2$ ) ditetapkan 100 mL sesuai dengan protokol uji larvasida WHO (2005). Berdasarkan persamaan di atas, volume larutan stok ( $V_1$ ) yang dibutuhkan untuk setiap konsentrasi dihitung, kemudian dicampurkan dengan akuades steril hingga mencapai volume akhir 100 mL.

Konsentrasi dan volume ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 3.** Konsentrasi dan Volume Ekstrak Metanol dan Ekstrak Etil Asetat *Gracilaria* sp. yang Digunakan.

$M_1$ (%)	$V_2$ (mL)	$M_2$ (%)	$V_1 = (V_2 \times M_2) /$ $M_1$ (mL)	Volume Akuades (mL)
2	100	0 (Kontrol)	0	100
2	100	0,5	25	75
2	100	0,75	37,5	62,5
2	100	1	50	50
2	100	1,2	60	40

Berdasarkan **Tabel 3**, pembuatan larutan uji dilakukan dengan menggunakan larutan stok ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria*

sp. dengan konsentrasi awal 2% ( $M_1$ ). Volume larutan stok yang digunakan pada setiap perlakuan disesuaikan dengan konsentrasi akhir yang diinginkan ( $M_2$ ), dengan volume akhir larutan tetap sebesar 100 mL.

Pada perlakuan kontrol (0%), tidak digunakan larutan stok, sehingga seluruh volume akhir terdiri dari 100 mL akuades. Pada konsentrasi 0,5%, digunakan 25 mL larutan stok yang kemudian diencerkan dengan 75 mL akuades. Untuk konsentrasi 0,75%, digunakan 37,5 mL larutan stok dan ditambahkan 62,5 mL akuades. Pada konsentrasi 1%, larutan dibuat dengan mencampurkan 50 mL larutan stok dan 50 mL akuades. Sementara itu, pada konsentrasi 1,2%, digunakan 60 mL larutan stok yang diencerkan dengan 40 mL akuades hingga mencapai volume akhir 100 mL.

Penggunaan persamaan pengenceran  $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$  memastikan bahwa perbandingan jumlah larutan stok dan akuades pada setiap konsentrasi tetap proporsional, sehingga konsentrasi larutan uji yang diperoleh akurat dan sesuai standar. Penentuan volume akhir 100 mL pada setiap perlakuan mengacu pada pedoman uji larvasida WHO (2005), yang bertujuan menjaga keseragaman kondisi uji dan meminimalkan bias.

Seluruh larutan uji dibuat secara terpisah untuk masing-masing konsentrasi dan jenis pelarut ekstrak, lalu disiapkan sesaat sebelum dilakukan pengujian untuk memastikan stabilitas dan aktivitas senyawa bioaktif di dalam ekstrak.

### 3.4.6 Uji Fitokimia Metabolit Sekunder

Skrining Fitokimia terhadap ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder

yang meliputi saponin, steroid, terpenoid, tanin, alkaloid, flavonoid, dan fenolik. Uji dilakukan berdasarkan metode Kartikasari, dkk. (2022) dengan tahapan sebagai berikut:

**a. Uji Alkaloid**

Sebanyak 50 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL pelarut. Dari larutan ini, diambil 2 mL, kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air. Campuran dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan, dan disaring. Tiga tetes ekstrak ditempatkan pada plat tetes, lalu ditambahkan pereaksi Mayer. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih.

Sampel yang ditambahkan asam klorida kemudian diberi pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan oranye kecoklatan atau merah bata sebagai indikasi alkaloid.

Penambahan pereaksi Wagner pada sampel akan menimbulkan endapan coklat bila alkaloid ada.

**b. Uji Flavonoid**

Sampel 50 mg dilarutkan dalam 10 mL pelarut, kemudian diambil 2 mL, ditambahkan serbuk magnesium dan 3 tetes HCl pekat. Campuran dikocok kuat, dibiarkan memisah, dan perubahan warna pada lapisan dicatat: orange menunjukkan flavon, merah muda flavanol, merah 2,3-dihidroflavanol, dan ungu xantone.

Penambahan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pada sampel menghasilkan larutan kuning tua, merah kebiruan (kalkon atau auron), atau oranye-merah (flavanon), yang menandakan keberadaan flavonoid.

**c. Uji Saponin**

Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan 2 mL aquades dan dikocok selama 10 detik. Terbentuknya busa yang stabil minimal selama 10 menit menunjukkan adanya saponin.

**d. Uji Triterpenoid dan Steroid**

Sampel 50 mg dilarutkan dalam 10 mL pelarut, kemudian diambil 2 mL dan ditetesi pereaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya warna biru, hijau, atau oranye menandakan keberadaan terpenoid.

Larutkan 1 mg sampel dalam 1 mL kloroform, tambahkan 1 mL asam sulfat pekat, sehingga terbentuk dua lapisan. Munculnya lapisan berwarna merah, oranye, atau hijau-biru menunjukkan keberadaan steroid.

**e. Uji Tanin**

Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan 2 tetes larutan gelatin 1% dalam NaCl. Terbentuknya endapan putih menandakan adanya tanin. Alternatifnya, sampel 0,5 g dapat ditambahkan larutan FeCl<sub>3</sub> 5% untuk menguji tannin.

**f. Uji Fenol**

Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan 3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Terbentuknya warna ungu atau biru-hitam menunjukkan keberadaan senyawa fenol.

### **3.4.7 Uji Aktivitas Larvasida**

Uji aktivitas larvasida dilakukan dengan lima perlakuan, yaitu 0,5%, 0,75%, 1%, dan 1,2%, dan akuades sebagai kontrol. Sebanyak 25 larva dimasukkan ke dalam gelas beaker berisi 100 mL larutan uji, yaitu ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. Kontrol menggunakan akuades tanpa ekstrak. Setiap perlakuan

dilakukan sebanyak lima kali ulangan. Larva diamati selama 24 jam dan kematian larva dihitung berdasarkan gejala seperti tidak ada gerakan, tubuh melengkung, atau warna berubah.

Menurut WHO (2005) pengumpulan data dilakukan dengan menghitung jumlah rata-rata dan persentase mortalitas larva sebagai berikut:

$$M = \frac{M_1}{M_0} \times 100\%$$

**Keterangan:**

M : Mortalitas larva nyamuk

M<sub>1</sub> : Jumlah larva mati

M<sub>0</sub> : Jumlah larva uji

Mortalitas larva diamati dengan melihat ciri-ciri seperti larva yang mengambang atau tenggelam pada wadah dan sudah tidak menunjukkan tanda-tanda kehidupan (Tennyson and Arivoli, 2024). Menurut WHO (2005), larva yang dinyatakan mati adalah larva yang tidak menunjukkan pergerakan sama sekali meskipun telah disentuh menggunakan jarum pada bagian siphon atau daerah leher (*cervical region*), sedangkan larva sekarat (*moribund*) adalah larva yang tidak mampu naik ke permukaan air atau tidak menunjukkan respons menyelam ketika air diganggu. Dalam analisis mortalitas, larva mati dan moribund dihitung bersama untuk menentukan persentase kematian.

### 3.4.8 Uji Scanning Electron Microscope (SEM)

Pengamatan morfologi larva *Anopheles* sp. dilakukan menggunakan larva instar III yang telah dinyatakan mati setelah perlakuan dengan ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. Sampel larva tersebut merupakan hasil uji larvasida yang juga

digunakan dalam penentuan nilai  $LC_{50}$ , sehingga dapat digunakan untuk menilai perubahan struktural akibat paparan senyawa bioaktif pada konsentrasi uji tersebut (Moghazy *and* El-Namaky, 2019).

Larva dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (akuades steril) diambil setelah 24 jam perlakuan. Setiap sampel larva dibersihkan dengan akuades steril untuk menghilangkan sisa larutan ekstrak, kemudian difiksasi primer menggunakan larutan glutaraldehid 2,5% dalam buffer fosfat 0,1 M (pH 7,2) selama 24 jam pada suhu 4°C (Supriyono dkk., 2022; Abed *and* Kareem, 2022).

Setelah fiksasi primer, larva dibilas tiga kali dengan buffer fosfat, masing-masing selama  $\pm 15$  menit, kemudian dilakukan fiksasi sekunder menggunakan larutan osmium tetroksida ( $OsO_4$ ) 1% dalam buffer fosfat selama 2 jam pada suhu ruang. Tahap selanjutnya adalah dehidrasi bertahap menggunakan seri etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, dan 100%), masing-masing selama 10-15 menit, dilanjutkan dengan dua kali perendaman dalam aseton absolut untuk memastikan penghilangan air secara sempurna (Molina, 2018; Supriyono dkk., 2022; Abed *and* Kareem, 2022).

Sampel larva dikeringkan menggunakan *critical point dryer* untuk mencegah kerusakan struktur akibat tegangan permukaan. Setelah proses pengeringan, larva ditempatkan pada *stub aluminium* menggunakan perekat karbon, kemudian dibersihkan dengan udara bertekanan dari *mini compressor* untuk menghilangkan partikel halus yang menempel. Selanjutnya, sampel dilapisi emas dengan ketebalan sekitar  $\pm 45$  nm menggunakan *sputter coater* tipe LUXOR Au CT-2201-0116 guna meningkatkan konduktivitas permukaannya (Yu *et al.*, 2015).

Pengamatan dilakukan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) tipe Phenom Prox Thermo Scientific 2022 pada voltase percepatan yang sesuai. Bagian morfologi yang diamati struktur eksternal antara kepala, toraks, abdomen, dan papila anal. Mikrograf SEM diambil pada perbesaran berbeda di berbagai bagian tubuh untuk melihat perubahan ultrastruktur eksternal setelah perlakuan dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi perlakuan. Data morfologi larva hasil perlakuan dibandingkan dengan kontrol untuk mengidentifikasi adanya kerusakan atau aberasi struktural, seperti perubahan bentuk, kerusakan kutikula, keretakan permukaan, atau deformasi organ eksternal (Yu *et al.*, 2015).

#### 3.4.9 Uji Histopatologi

Uji histopatologi dilakukan untuk mengamati perubahan struktur jaringan usus tengah (*midgut*) larva *Anopheles* sp. mati setelah perlakuan dengan ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. Larva yang digunakan merupakan instar III dan telah melalui uji larvasida untuk penentuan konsentrasi LC<sub>50</sub> (Susilowati dan Sari, 2022)

Larva dari kelompok perlakuan kelompok kontrol (akuades) dikumpulkan setelah 24 jam paparan. Larva dibersihkan dengan akuades steril untuk menghilangkan sisa ekstrak, kemudian dilakukan fiksasi primer menggunakan larutan Bouin atau formalin buffer 10% selama 24 jam pada suhu ruang (Adrianto *et al.*, 2024).

Setelah fiksasi, larva dibilas dengan akuades, lalu melalui proses dehidrasi bertingkat menggunakan etanol dengan konsentrasi 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, dan 100%, masing-masing selama 10-15 menit. Selanjutnya dilakukan penjernihan (*clearing*) menggunakan toluen hingga jaringan menjadi transparan (Adrianto *et al.*, 2024).

Tahap berikutnya adalah penyisipan (*embedding*) dalam parafin cair pada suhu  $\pm 60^{\circ}\text{C}$  hingga parafin meresap sempurna ke dalam jaringan. Setelah mengeras, blok parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5  $\mu\text{m}$ . Potongan jaringan ditempelkan pada kaca objek yang telah dilapisi perekat (*adhesive slide*) (Adrianto *et al.*, 2024).

Pewarnaan dilakukan dengan metode Hematoxylin-Eosin (HE). Pewarnaan hematoxylin digunakan untuk menonjolkan inti sel, sedangkan eosin mewarnai sitoplasma dan komponen ekstraseluler. Setelah diwarnai, preparat ditutup dengan cover glass menggunakan mounting medium (Salerno *and* Chiaravalli, 2022).

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran  $400\times$  untuk menilai kondisi histologis jaringan. Bagian yang diamati meliputi epitel usus tengah (*midgut*) (Adrianto *et al.*, 2024).

Hasil pengamatan kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol untuk menilai tingkat kerusakan jaringan yang diinduksi oleh senyawa bioaktif ekstrak *Gracilaria* sp. Metode ini memberikan gambaran detail kerusakan jaringan yang tidak terlihat dengan pengamatan morfologi eksternal

### 3.5 Analisis Data

Data mortalitas larva *Anopheles* sp. setelah 24 jam paparan pada berbagai konsentrasi ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. dianalisis secara kuantitatif. Persentase kematian larva dihitung terlebih dahulu untuk setiap kelompok perlakuan. Selanjutnya, nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration 50*) ditentukan melalui analisis Probit dengan bantuan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versi 30.0, menggunakan tingkat kepercayaan 95% (*Confidence Limit/CL*) guna memastikan ketepatan

estimasi konsentrasi yang mematikan 50% populasi larva (Sangeetha *et al.*, 2018).

Pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak terhadap mortalitas larva dianalisis menggunakan analisis varian dua arah (Two-Way ANOVA). Apabila hasil ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antar kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan *Tukey Honestly Significant Difference* (Tukey HSD) untuk mengidentifikasi kelompok perlakuan yang berbeda nyata satu sama lain. Prosedur ini memungkinkan interpretasi yang lebih rinci terkait konsentrasi ekstrak yang memberikan efek paling signifikan terhadap mortalitas larva (Agbangba *et al.*, 2024).

Data hasil pengamatan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dianalisis secara deskriptif kualitatif dengan membandingkan morfologi eksternal larva pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, meliputi bagian kepala, toraks, abdomen, serta papila anal. Perubahan morfologi yang diamati mencakup adanya deformasi, kerusakan permukaan, perubahan bentuk, gangguan susunan rambut (setae), serta hilangnya struktur tertentu yang didokumentasikan dalam bentuk citra mikrograf resolusi tinggi. Pengamatan morfologi larva mengacu pada penelitian Perumalsamy *et al.* (2013) yang melaporkan adanya deformasi struktur tubuh larva, kerusakan kutikula, gangguan papila anal, dan perubahan susunan rambut akibat paparan larvisida.

Tingkat kerusakan morfologi diklasifikasikan menjadi lima kategori, yaitu tidak ada kerusakan, kerusakan ringan, kerusakan sedang, kerusakan berat, dan kerusakan sangat berat berdasarkan tingkat keparahan perubahan struktur yang diamati, dimodifikasi dari Perumalsamy *et al.* (2013) serta Adrianto *et al.* (2024).

Pada papila anal, kategori tidak ada kerusakan ditandai oleh struktur papila yang utuh, memanjang, dan memiliki susunan rambut yang teratur.

Kerusakan ringan ditandai dengan perubahan awal pada permukaan dan sebagian rambut mulai tidak teratur, namun struktur masih dapat dikenali. Kerusakan sedang menunjukkan permukaan yang tidak teratur disertai gangguan susunan rambut. Kerusakan berat ditandai deformasi papila anal dan susunan rambut yang tidak jelas, sedangkan kerusakan sangat berat menunjukkan kerusakan menyeluruh sehingga struktur papila anal tidak dapat dikenali dengan jelas. Kriteria ini disusun berdasarkan pengamatan kerusakan anal gills/papila anal pada larva *Aedes aegypti* yang dilaporkan oleh Perumalsamy *et al.* (2013).

Pada bagian abdomen, tidak ada kerusakan ditandai oleh permukaan abdomen yang utuh dan segmen yang terlihat jelas. Kerusakan ringan ditandai adanya lipatan pada permukaan namun segmen masih dikenali. Kerusakan sedang menunjukkan permukaan tidak teratur dan segmen mulai terganggu. Kerusakan berat ditandai deformasi permukaan sehingga segmen sulit dikenali, sedangkan kerusakan sangat berat menunjukkan kerusakan menyeluruh dan struktur abdomen tidak dapat dikenali. Pada toraks, tidak ada kerusakan ditandai dengan permukaan toraks utuh dan struktur yang jelas. Kerusakan ringan menunjukkan adanya lipatan pada permukaan toraks namun struktur masih dikenali. Kerusakan sedang ditandai permukaan tidak teratur dan struktur mulai terganggu. Kerusakan berat menunjukkan deformasi toraks sehingga struktur mulai sulit dikenali, sedangkan kerusakan sangat berat menunjukkan kerusakan menyeluruh pada permukaan toraks hingga struktur tidak dapat dikenali.

Pada bagian kepala, kategori tidak ada kerusakan ditandai dengan permukaan kepala yang utuh dan bentuk normal. Kerusakan ringan ditandai mulai adanya deformasi pada permukaan kepala sehingga bentuk kepala mulai berubah namun masih dapat dikenali. Kerusakan sedang menunjukkan deformasi yang lebih luas sehingga bentuk kepala tidak lagi normal. Kerusakan berat ditandai deformasi permukaan kepala dan struktur kepala mulai sulit dikenali, sedangkan kerusakan sangat berat menunjukkan kerusakan menyeluruh

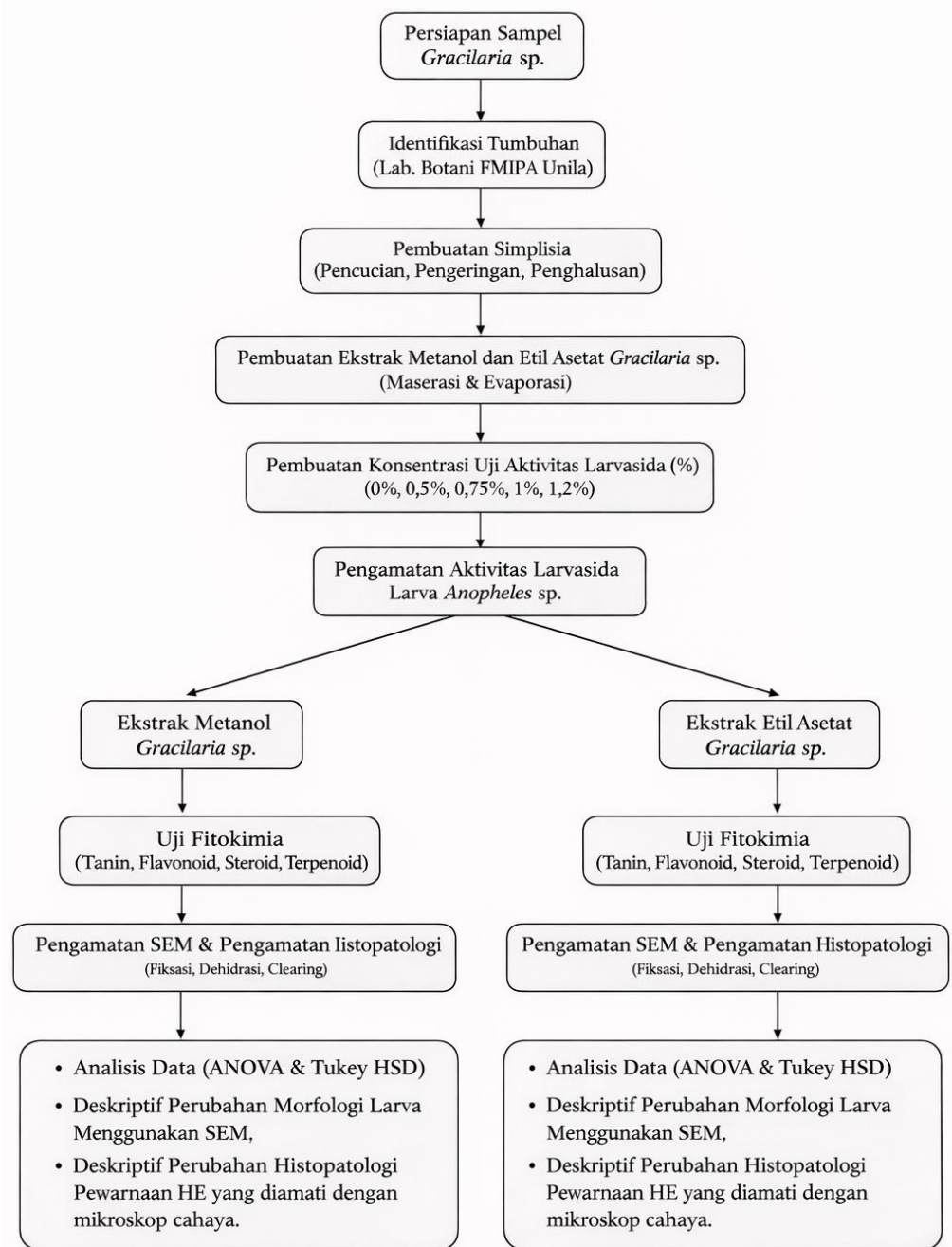
sehingga struktur kepala tidak dapat dikenali. Kriteria ini disusun berdasarkan perubahan morfologi kepala larva yang dilaporkan oleh Perumalsamy *et al.* (2013) dan penelitian mengenai kerusakan kutikula larva akibat larvisida..

Hasil pengamatan histopatologi dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan kondisi jaringan usus tengah (*midgut*) antara larva perlakuan dan larva kontrol. Pengamatan difokuskan pada perubahan histologis lumen dan epitel usus tengah. Tingkat kerusakan jaringan dikategorikan menjadi lima tingkat, yaitu tidak ada kerusakan, kerusakan ringan, kerusakan sedang, kerusakan berat, dan kerusakan sangat berat berdasarkan luas dan tingkat keparahan perubahan histologis yang ditemukan. Penentuan kategori kerusakan histopatologi dimodifikasi dari Adrianto *et al.* (2024), Susilowati dan Sari (2022), serta penelitian histopatologi *midgut* larva nyamuk lainnya.

Kategori tidak ada kerusakan ditandai dengan lumen yang jelas, terbuka, dan teratur, serta epitel tersusun rapi, utuh, dan normal tanpa adanya kerusakan jaringan. Kerusakan ringan ditandai dengan lumen yang sedikit melebar dan mulai tidak teratur, sedangkan epitel masih relatif utuh namun mulai menunjukkan disorganisasi ringan. Kerusakan sedang ditandai dengan lumen yang melebar dan tidak beraturan, disertai epitel yang mulai terdisorganisasi, sebagian sel mengalami kerusakan, dan batas antarsel tampak kabur. Kerusakan berat ditandai dengan lumen yang tidak teratur dan sebagian sulit dikenali, sementara epitel mengalami degenerasi dan struktur jaringan tidak tersusun dengan baik. Kerusakan sangat berat ditandai dengan lumen yang hampir tidak dapat dikenali serta epitel mengalami disintegrasi dan kehancuran jaringan secara menyeluruh. Deskripsi kerusakan lumen dan epitel usus tengah mengacu pada Adrianto *et al.* (2024), Susilowati dan Sari (2022), serta penelitian histopatologi *midgut* larva *Aedes aegypti* lainnya yang melaporkan disorganisasi epitel, degenerasi sel, vakuolisasi, dan kerusakan lumen akibat paparan larvisida.

Seluruh perubahan jaringan didokumentasikan menggunakan mikrofotografi untuk memberikan bukti visual terhadap perubahan histologis yang diamati akibat perlakuan ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp.

### 3.6 Bagan Alir Penelitian



**Gambar 6.** Bagan Alir Penelitian

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Senyawa metabolit sekunder yang teridentifikasi pada ekstrak metanol *Gracilaria* sp. menunjukkan keberadaan alkaloid (++) , serta flavonoid (+) dan steroid (+). Sementara itu, ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. menunjukkan adanya steroid (++) serta tanin (+).
2. Ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. meningkatkan mortalitas larva *Anopheles* sp. instar III seiring peningkatan konsentrasi, dengan metanol menunjukkan efek lebih tinggi.
3. Ekstrak metanol *Gracilaria* sp. lebih toksik ( $LC_{50} = 0,870\%$ ) dibandingkan ekstrak etil asetat *Gracilaria* sp. ( $LC_{50} = 0,973\%$ ).
4. Paparan ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. menyebabkan perubahan morfologi larva *Anopheles* sp. instar III berdasarkan analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM), yang ditandai dengan deformasi pada kepala, toraks, abdomen, dan papila anal.
5. Paparan ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. menyebabkan perubahan histopatologi jaringan usus tengah larva *Anopheles* sp. instar III berdasarkan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE), yang ditandai dengan disorganisasi sel epitel dan gangguan struktur lumen usus.

### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai aktivitas larvasida ekstrak metanol dan etil asetat *Gracilaria* sp. pada spesies nyamuk vektor lain untuk mengetahui spektrum aktivitas yang lebih luas.
2. Penelitian selanjutnya disarankan menambahkan kontrol positif sebagai pembanding.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abed, W. H., and Kareem, D. K. 2022. Identification of Some Fourth Instar Larvae of the Mosquito (Diptera, Culicidae) Using Scanning Electron Microscope (SEM) in Basrah Province, Iraq. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*. 35(2): 173-184.
- Achmadi, U. F. 2013. *Dasar-Dasar Penyakit Berbasis Lingkungan*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Adrianto, H., Rambung, E., and Silitonga, H. T. H. 2024. Histopathology of the Midgut (Longitudinal Section) of *Aedes aegypti* Larvae After Exposure to Kaffir Lime Leaf Extract from Bali, Indonesia. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 17(3): 1346-1351.
- Afonso, N. C., Catarino, M. D., Silva, A. M. S., and Cardoso, S. M. 2019. Brown Macroalgae as Valuable Food Ingredients. *Antioxidants*. 8(365): 1-26.
- Agbangba, C. E., Aide, E. S., Honfo, H., and Kakai, R. G. 2024. On the Use of Post-Hoc Tests in Environmental and Biological Sciences: A Critical Review. *Heliyon*. 10(3): e25131.
- Agyekum, T. P., Botwe, P. K., Arko-Mensah, J., Issah, I., Acquah, A. A., Hogarh, J. N., Dwomoh, D., Robins, T. G., and Fobil, J. N. 2021. A Systematic Review of the Effects of Temperature on *Anopheles* Mosquito Development and Survival: Implications for Malaria Control in A Future Warmer Climate. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(14): 1-22.
- Aiyuba, D. S., Noviadi, A., Rakhmatullah, R., dan Restapaty, R. 2023. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Ramania (*Bouea macrophylla* Griffith.) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Surya Medika (JSM)*. 8(1): 81-87.
- Alam, S., Afzal, G., Hussain, R., et al. 2025. Estimation of Median LC<sub>50</sub> and Toxicity of Environmentally Relevant Concentrations of Thiram in *Labeo rohita*. *npj Clean Water*. 8: 9.

- Alba-Tercedor, J., and Vilchez, S. 2023. Anatomical Damage Caused by *Bacillus thuringiensis* Variety *israelensis* in Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (L.) Larvae Revealed by Micro-Computed Tomography. *Scientific Reports*. 13: 8759.
- Alrasyid, S., Haqiqi, N., Ghazali, M., Julisaniah, N. I., Setyaningrum, T. W., and Prasedya, E. S. 2025. Morphological and Molecular Identification Using the Cox1 Gene in Wild Populations of *Gracilaria* sp. from Ekas Hamlet. *Sam Journal of Biological Sciences*. 4(1): 11-15.
- Anggraini, D. 2022. Perubahan Histopatologis Sel Epitel Midgut Larva Nyamuk *Aedes aegypti* Akibat Paparan Insektisida Nabati. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. 15(1): 45-52.
- Anoopkumar, A. N., Aneesh, E. M., and Sudhikumar, A. V. 2020. Exploring the Mode of Action of Isolated Bioactive Compounds by Induced Reactive Oxygen Species Generation in *Aedes aegypti*: A Microbes-Based Double-Edged Weapon to Fight Against Arboviral Diseases. *International Journal of Tropical Insect Science*. 40: 573-585.
- Apriani, A., Andrianus, A., Marisca, S., dan Diana, P. (2023) Ez Prep Concentrate (Ez Prep) sebagai Alternatif Reagen Deparafinisasi Pada Pewarnaan Hematoksin Eosin. *G-Tech: Jurnal Teknologi Terapan*. 7(1): 96-102.
- Asmah, N., Suniarti, D. F., Margono, A., Mas'ud, Z. A., dan Bachtiar, E. W. 2020. Identification of Active Compounds in Ethyl Acetate, Chloroform, And N-Hexane Extracts from Peels of *Citrus aurantifolia* from Maribaya, West Java, Indonesia. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 11(3): 107-112.
- Avichena, dan Anggriyani, R. 2023. Analisis Penyakit Malaria Akibat Infeksi *Plasmodium* sp terhadap Darah Manusia. *Ekotonia: Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi dan Mikrobiologi*. 8(1): 30-37.
- Banumathi, B., Vaseeharan, B., Chinnasamy, T., Vijayakumar, S., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., and Benelli, G. 2017. *Euphorbia rothiana*-Fabricated Ag Nanoparticles Showed High Toxicity on *Aedes aegypti* Larvae and Growth Inhibition on Microbial Pathogens: A Focus on Morphological Changes in Mosquitoes and Antibiofilm Potential Against Bacteria. *Journal of Cluster Science*. 28: 2857-2872.
- Baskar, K., Chinnasamy, R., Pandey, K., Venkatesan, M., Sebastian, P. J., Subban, M., Thomas, A., Kweka, E. J., and Devarajan, N. 2020. Larvicidal and Histopathology Effect of Endophytic Fungal Extracts of *Aspergillus tamarii* Against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Heliyon*. 6(10): 1-12.

- Bhernama, B. G. 2020. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Rumput Laut *Gracilaria* sp. Asal Desa Neusu Kabupaten Aceh Besar. *AMINA*. 2(1): 1-5.
- Birhis-Dorhoi, E. S., Michiu, D., Pop, C. R., Rotar, A. M., Tofana, M., Pop, O. L., Socaci, S. A., and Farcas, A. C. 2020. Macroalgae – A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. *Nutrients*. 12(3085): 1-23.
- Bouafou, L., Makanga, B. K., Rahola, N., Boddé, M., Ngangué, M. F., Daron, J., Berger, A., Mouillaud, T., Makunin, A., Korlević, P., Nwezeobi, J., Kengne, P., Paupy, C., Lawniczak, M. K. N., and Ayala, D. 2024. Host Preference Patterns in Domestic and Wild Settings: Insights Into *Anopheles* Feeding Behavior. *Evolutionary Applications*. 17(6).
- Cai, J., Lovatelli, A., Garrido Gamarro, E., Geehan, J., Lucente, D., Mair, G., Miao, W., Reantaso, M., Roubach, R., Yuan, X., Aguilar-Manjarrez, J., Cornish, L., Dabbadie, L., Desrochers, A., Diffey, S., Tauati, M., Hurtado, A., Potin, P., and Przybyla, C. 2021. *Seaweeds and Microalgae: An Overview for Unlocking Their Potential in Global Aquaculture Development* (FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1229). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Cania, E., dan Setyaningrum, E. 2012. Larvacide Effectiveness Test of the Legundi's Leaf (*Vitex trifolia*) Extract for Larvae of *Aedes aegypti*. Lampung: Medical Faculty of Lampung University.
- Cania, E., dan Setyaningrum, E. 2013. Uji Efektivitas Larvasida Ekstrak Daun Legundi (*Vitex trifolia*) terhadap Larva *Aedes aegypti*. *Medical Journal of Lampung University*. 2(4): 2337-3776.
- Carpena, M., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Chamorro, F., Otero, P., Lourenço-Lopes, C., Cao, H., Simal-Gandara, J., and Prieto, M. A. 2022. Biological Properties and Potential of Compounds Extracted from Red Seaweeds. *Phytochemistry Reviews*. 1-32.
- Castro, B. M. d. C. e., Martinez, L. C., Barbosa, S. G., *et al.* 2019. Toxicity and Cytopathology Mediated by *Bacillus thuringiensis* in the Midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientific Reports*. 9: 6667.
- Christiansen-Jucht, C. D., Parham, P. E., Saddler, A., Koella. J. C., and Basáñez. M.-G. 2015. Larval and Adult Environmental Temperatures Influence the Adult Reproductive Traits of *Anopheles gambiae* s.s. *Parasites & Vectors*. 8(456): 1-12.

- Costa, M. B. S., Simões, R. C., Silva, M. J. A. D., Oliveira, A. C., Acho, L. D. R., Lima, E. S., Tadei, W. P., Teles, H. L., and Oliveira, C. M. 2022. Oxidative Stress Induction by Crude Extract of *Xylaria* sp. Triggers Lethality in the Larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 55: e03732021.
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., and Marsh, K. 2016. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 167(3): 610-624.
- Cyntya, V. A., Santosa, G. W., Supriyantini, E., dan Wulandar, S. Y. 2018. Pertumbuhan Rumput Laut *Gracilaria* sp. dengan Rasio N:P yang Berbeda. *Journal of Tropical Marine Science*. 1(1): 15-22.
- Dakum, Y. D., C. N. Amajoh, A. Ombugadu, G. Istifanus, F. Agwom, S. T. Joseph, I. R. Jwanse, P. M. Lapang, S. W. Kopdorah, and D. D. Pam. 2021. "Larvicidal Efficacy and GC-MS Analysis of Hyptis Suaveolens Leaf Extracts Against *Anopheles* Species". *International Journal of Biochemistry Research & Review* 30 (1): 8-19.
- Daryono, E. D., Rahman, F. F. A., dan Zukhriyah. 2022. Penggunaan Metanol Sisa Reaksi sebagai Reaktan Pada Proses Transesterifikasi Minyak Kelapa Sawit Menjadi Biodiesel. *Jurnal Teknologi*. 14(2): 155-162.
- De Geyter, E., Geelen, D., and Smagghe, G. 2007. First Results on the Insecticidal Action of Saponins. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 72(3): 645-648.
- De Torres, S. M., Padilha, R. J. R., Brayner, F. A., Alves, L. C., Alves, L. C., and da Silva Júnior, V. A. 2020. Ultra-Structural Changes of *Aedes aegypti* Larvae Submitted to Treatment with Formulated Product. *International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences*. 3(6): 11-14.
- Dey, P., Mandal, S., Goyary, D., and Verma, A. 2023. Larvicidal Property and Active Compound Profiling of *Annona squamosa* Leaf Extracts Against Two Species of Diptera, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Journal of Vector Borne Diseases*. 60(4): 401-413.
- Digambiro, R. A., dan Parwanto, E. 2024. *Panduan prosesing dan pewarnaan jaringan dalam histopatologi*. Klaten: Penerbit Lakeisha.
- Dirar, A. I., Alsaadi, D. H. M., Wada, M., Mohamed, M. A., Watanabe, T., and Devkota, H. P. 2019. Effects of Extraction Solvents on Total Phenolic and Flavonoid Contents and Biological Activities of Extracts from Sudanese Medicinal Plants. *South African Journal of Botany*. 120: 261-267.

- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., and Ju, Y. H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22(3): 296-302.
- Du, G., Zhao, H. Y., Song, Y. L., Zhang, Q. W., and Wang, Y. T. 2011. Rapid Simultaneous Determination of Isoflavones in *Radix puerariae* using High-Performance Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Novel Shell-Type Column. *Journal of Separation Science*. 34(19): 2576-2585.
- Egerton, R. F., Li, P., and Malac, M. 2004. Radiation Damage in the TEM and SEM. *Micron*. 35(6): 399-409.
- Eliza, N., Subahar, R., and Aulung, A. 2021. Larvicidal Activity and Histopathological Midgut Alteration of *Aedes aegypti* Larvae Induced by Methanol Extract Mahkota Dewa Fruit (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl). *Jurnal Profesi Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. 15(2): 215-218.
- Emami, S. N., Vatandoost, H., Oshaghi, M., Mohtarami, F., Javadian, E., and Raeisi, A. 2007. Morphological method for sexing anopheline larvae. *Journal of Vector Borne Diseases*. 44: 245-249.
- FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. Rome: FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- Fischer, E. R., Hansen, B. T., Nair, V., Hoyt, F. H., Schwartz, C. L., and Dorward, D. W. 2024. Scanning Electron Microscopy. *Current Protocols*. 4(5): e1034.
- Ganesan, P., Samuel, R., Mutheeswaran, S., Pandikumar, P., Reegan, A. D., Aremu, A. O., and Ignacimuthu, S. 2023. Phytochemicals for Mosquito Larvicidal Activity and Their Modes of Action: A Review. *South African Journal of Botany*. 152: 19-49.
- Glunt, K. D., Abílio, A. P., Bassat, Q., Bulo, H., Gilbert, A. E., Huijben, S., Manaca, M. N., Macete, E., Alonso, P., and Paaijmans, K. P. 2015. Long-Lasting Insecticidal Nets No Longer Effectively Kill the Highly Resistant *Anopheles Funestus* of Southern Mozambique. *Malaria Journal*. 14(298): 1-7.
- Gunathilaka, U. M. T. M., de Silva, W. A. P. P., Dunuweera, S. P., and Rajapakse, R. M. G. 2021. Effect of Morphology on Larvicidal Activity of Chemically Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles Against Mosquito Vectors. *Royal Society of Chemistry*. 11: 8857-8866.

- Handayani, T. 2019. Peranan Ekologi Makroalga bagi Ekosistem Laut. *Jurnal Oseana*. 44(1): 1-14.
- Haryanto, D., Dalilah, Anwar, C., Prasasti, G. D., Handayani, D., dan Ghifari, A. 2018. Investigasi Resistensi *Anopheles* sp. Terhadap Insektisida Piretroid dan Kemungkinan Terjadinya Mutasi Gen *Voltage Gated Sodium Channel* (VGSC). *Jurnal Entomologi Indonesia*. 15(3): 134-142.
- Hassan, R., Othman, M. N. A., Harith, M. N., and Md Sah, A. S. R. 2019. Morphological Diversity of *Gracilaria blodgettii* Harvey 1853 (*Gracilariaceae, Rhodophyta*) from Sarawak, Malaysian Borneo. *Scientifica*. 2019: 1-9.
- Hasyim, A., Setiawati, W., Lukman, L., dan Marhaeni, L. S. 2019. Evaluasi konsentrasi lethal dan waktu lethal insektisida botani terhadap ulat bawang (*Spodoptera exigua*) di Laboratorium. *Jurnal Hortikultura*. 29(1): 69- 80.
- Hidayah, N. 2022. Efektivitas Berbagai Bentuk Larvasida Nabati terhadap Larva *Aedes aegypti*. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*. 14(2): 280-285.
- Hidayati, J. R., Karlina, I., Ningsih, D. P. N., Wijaya, A., and Bahry, M. S. 2023. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Tropical Red Algae *Gracilaria* sp. from Bintan Island, Indonesia. In *2nd Maritime Continental Fulcrum International Conference. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 1148, 012004:1-8.
- Hinne, I. A., Attah, S. K., Mensah, B. A., Forson, A. O., and Afrane, Y. A. 2021. Larval Habitat Diversity and *Anopheles* mosquito Species Distribution in Different Ecological Zones in Ghana. *Parasites & Vectors*. 14(193): 1-14.
- Hoang, T.-V., Alfarraj, S., and Alharbi, S. A. 2024. An Investigation on Antimicrobial and Anticancer Competence of Macro Red Algae Under *In-Vitro* Condition. *Environmental Research*. 252(Part 4): 119026.
- Hotmian, E., Suoth, E., Fatimawali, and Tallei, T. 2021. GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) Analysis of Nut Grass Tuber (*Cyperus rotundus* L.) Methanolic Extract. *Pharmacon*. 10(2): 849-856.
- Hujjatusnaini, N., Bunga, I., Afitri, E., Widyastuti, R., dan Ardiansyah. 2021. *Ekstraksi*. Palangkaraya: Institut Agama Islam Negeri Palangkaraya, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Jurusan MIPA, Program Studi Tadris Biologi.

- Husna, I., Setyaningrum, E., Handayani, T. T., Kurnia, Y., Palupi, E. K., Umam, R., DAN Andriana, B. B. 2020. Utilization of Basil Leaf Extract As Anti-Mosquito Repellent: A Case Study of Total Mosquito Mortality (*Aedes aegypti* 3rd Instar). In *Young Scholar Symposium on Science Education and Environment 2019. IOP Conference Series: Journal of Physics: Conference Series*. 1467, 012014.
- Insani, A. N., Hafiludin, dan Chandra, A. B. 2022. Pemanfaatan Ekstrak *Gracilaria* sp. dari Perairan Pamekasan sebagai Antioksidan (*Utilization of Gracilaria sp. from Pamekasan waters as antioxidant*). *Juvenil*. 3(1): 16-25.
- Ira. 2018. Struktur Komunitas Makroalga di Perairan Desa Mata, Sulawesi Tenggara. *Jurnal Biologi Tropis*. 18(1): 45-56.
- Kaihena, M., Laliatu, V., dan Nindatu, M. 2011. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Bintaro (*Piper betle* L.) terhadap Mortalitas Larva Nyamuk *Anopheles* sp. dan *Culex. Molucca Medica*. 4(1): 1979-6358.
- Kalpana, V. N., Alarjani, K. M., and Rajeswari, V. D. 2020. Enhancing Malaria Control Using *Lagenaria siceraria* and Its Mediated Zinc Oxide Nanoparticles Against the Vector *Anopheles stephensi* and Its Parasite *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports*. 10(21568): 1-17.
- Karolina, R., Indra, I., Balyan, M., dan Pulungan, I. H. 2022. *Scanning Electron Microscope (SEM): Teori dan Aplikasinya*. Purwokerto: PT Pena Persada Kerta Utama.
- Kartikasari, D., Rahman, I. R., dan Ridha, A. 2022. Uji Fitokimia pada Daun Kesum (*Polygonum minus* Huds.) dari Kalimantan Barat. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*. 5(1): 35-42.
- Kemenkes RI. 2025. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2024. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. 2023. *Profil Pasar Rumpun Laut*. Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan.
- Khair, K., Andayani, Y., dan Hakim, A. 2017. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder pada Hasil Fraksinasi Ekstrak *Phaseolus vulgaris* L. dengan Metode *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS)*. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*. 3(1): 21-30.
- Kirti, J. S., and Shipali. 2014. *Scanning Electron Microscopic (SEM) Studies on Fourth Instar Larva and Pupa of Anopheles (Cellia) stephensi* Liston (*Anophelinae: Culicidae*). *International Journal of Mosquito Research*. 1(4): 42-46.

- Koffi, A. A., Camara, S., Ahoua Alou, L. P., Oumbouke, W. A., Wolie, R. Z., Tia, I. Z., Sternberg, E. D., Yapo, F. H. A., Koffi, F. M., Assi, S. B., Cook, J., Thomas, M. B., and N'Guessan, R. 2023. *Anopheles* Vector Distribution and Malaria Transmission Dynamics in Gbêkê region, Central Côte d'Ivoire. *Malaria Journal*. 22(192): 1-12.
- Kumar, V. A., Ammani, K., Jobina, R., Parasuraman, P., and Siddhardha, B. 2016. Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using *Excoecaria agallocha* L. (*Euphorbiaceae*) Leaf Extract Against *Aedes aegypti*. *IET Nanobiotechnology*. 10(6): 382-388.
- Kumara, C. J., Nurhayani, Bestari, R. S., and Dewi, L. M. 2021. *Efektivitas Flavonoid, Tanin, Saponin dan Alkaloid terhadap Mortalitas Larva Aedes aegypti*. The 13th University Research Colloquium 2021.
- Kurniawan, B., Rapina, R., Sukohar, A., and Nareswari, S. 2015. Effectiveness of the Pepaya Leaf (*Carica papaya* Linn) Ethanol Extract as Larvacide for *Aedes aegypti* Instar III. *J Major*. 4(5): 76-84.
- Lee, J. E., Jayakody, J. T. M., Kim, J. I., Jeong, J. W., Choi, K. M., Kim, T. S., Seo, C., Azimi, I., Hyun, J., and Ryu, B. 2024. The Influence of Solvent Choice on the Extraction of Bioactive Compounds from Asteraceae: A Comparative Review. *Foods*. 13(19): 3151.
- Leksono, W. B., Pramesti, R., Santosa, G. W., dan Setyati, W. A. 2018. Jenis Pelarut Metanol dan N-Heksana terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Gelidium* sp. dari Pantai Drini Gunungkidul - Yogyakarta. *Jurnal Kelautan Tropis*. 21(1): 9-16.
- Li, P., Xu, G., Li, S. P., Wang, Y. T., Fan, T. P., Zhao, Q. S., and Zhang, Q. W. 2008. Optimizing Ultra Performance Liquid Chromatographic Analysis of 10 Diterpenoid Compounds in *Salvia miltiorrhiza* Using Central Composite Design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(4): 1164-1171.
- Li, P., Yin, Z. Q., Li, S. L., Huang, X. J., Ye, W. C., and Zhang, Q. W. 2014. Simultaneous Determination of Eight Flavonoids and Pogostone in *Pogostemon cablin* by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 37(12): 1771-1784.
- Litaay, C., Arfah, H., dan Pattipeilohy, F. 2022. Potensi Sumber Daya Hayati Rumput Laut di Pantai Pulau Ambon sebagai Bahan Makanan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 25(3): 405-417.

- Malathi, P. 2024. Examining the Larval Morphology of *Aedes aegypti* to *Carica papaya* Extracts. *International Journal of Mosquito Research*. 11(2): 49-57.
- Marcellia, S., Ramdini, D. A., Setiawan, G., Septiani, L., Setyaningrum, E., Rosa, E., dan Annasya, B. S. 2024. Uji Efektivitas Biolarvasida pada Minyak Atsiri Daun Tembelekan (*Lantana camara*) terhadap Larva *Anopheles* sp. sebagai Upaya Pengendalian Vektor Malaria. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*. 11(12): 2444-2453.
- Meinita, M. D. N., Marhaeni, B., Oktaviani, D. F., Jeong, G.-T., and Hong, Y.-K. 2018. Comparison of Bioethanol Production from Cultivated Versus Wild *Gracilaria verrucosa* and *Gracilaria gigas*. *Journal of Applied Phycology*. 30(1): 143-147.
- Moghazy, F. M. El, and El-Namaky, A. H. 2019. Larvicidal Effect of *Zingiber officinale* and *Cyperus rotundus* Oils on the Third Instar Larvae *Cephalopina titillator* (L.). *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*. 50(The 8th International Conference of Veterinary Research Division (NRC), Cairo, Egypt, 3rd–5th December 2019): 29-37.
- Mohammed, A., and Abdullah, A. 2018. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. In *Proceedings of the 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HERVEX*. 1-7.
- Molina-Fernández, D., Adroher, F. J., and Benítez, R. 2018. A Scanning Electron Microscopy Study of *Anisakis physeteris* Molecularly Identified: From Third Stage Larvae from Fish to Fourth Stage Larvae Obtained *in vitro*. *Parasitology Research*. 117(7): 2095-2103.
- More, Y. B. 2026. Comparative Extraction Studies of *Azadirachta indica* and *Tagetes erecta* with Different Solvents (Methanol, Ethanol, Ethyl Acetate, and Hexane) Using UV–Visible Spectroscopy. *International Journal of Versatile Research and Analysis*. 4(3): 960-964.
- Nindatu, M., Jotlely, H., Anaktototy, Y., and Lakoan, M. R. 2025. Morphological and Ultrastructure Alteration of Larva *Culex pipiens* Exposed from Cassava Juice Extract. *Biodiversitas*. 26(1): 306-314.
- Nitty, A. R., dan Hafiludin. 2025. Total Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol *Gracilaria* sp. Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom. *Journal of Marine Research*. 14(1): 18-30.
- Othman, M. N. A., Hassan, R., Harith, M. N., and Md Sah, A. S. R. 2018. Morphological Characteristics and Habitats of Red Seaweed *Gracilaria* spp. (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*) in Santubong and Asajaya, Sarawak, Malaysia. *Tropical Life Sciences Research*. 29(1): 87-101.

- Ouahabi, S., Loukili, E. H., Daoudi, N. E., Chebaibi, M., Ramdani, M., Rahhou, I., Bnouham, M., Fauconnier, M.-L., Hammouti, B., Rhazi, L., Gotor, A. A., Dépeint, F., and Ramdani, M. 2023. Study of the Phytochemical Composition, Antioxidant Properties, and *In Vitro* Anti-Diabetic Efficacy of *Gracilaria bursa-pastoris* Extracts. *Marine Drugs*. 21(7): 372.
- Pambudi, L. T., Meinita, M. D. N., dan Ariyati, R. W. 2010. Seaweed Cultivation in Indonesia: Recent Status. *Journal of Marine Bioscience and Biotechnology*. 4(1): 6-10.
- Parwanto, E. 2024. *Pemanfaatan Lantana camara Linn. sebagai Tumbuhan Obat*. Penerbit Lakeisha.
- Pereira, L. 2021. Macroalgae. In *Encyclopedia*. 1: 177-188.
- Pereira, N. S., Fabbri, C., Moya, K. N., Monteiro Ferreira, A. C., Andrade, F. S., Santana, R. A., Ríos-Velásquez, C. M., de Aquino, P. F., and Lopes, S. C. P. 2025. Assessment of Entomopathogenic Fungi Activity from the Fiocruz Amazônia Collection in *Anopheles aquasalis* Mosquitoes. *Journal of Fungi*. 11(464): 1-11.
- Pertiwi, W. R., Pratami, G. D., Setyaningrum, E., dan Nurcahyani, N. 2025. Potensi Bioinsektisida Ekstrak Air dan Metanol *Gracilaria* sp. Terhadap *Aedes aegypti* dengan Metode Spray. *Jurnal Medika Malahayati*. 9(2): 303-311.
- Perumalsamy H, Kim JR, Oh SM, *et al.* 2013. Novel Histopathological and Molecular Effects of Pellitorine on Larval Midgut Epithelium and Anal Gills of *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*. 8(11):e80226.
- Perumalsamy, H., Jang. M. J., Kim J-R., Kadarkarai, M., and Ahn, Y-J. 2015. Larvicidal Activity and Possible Mode of Action of Four Flavonoids and Two Fatty Acids from *Millettia pinnata* (Fabaceae) seed. *PLoS ONE*. 10(9): 1-17.
- Pillay, L. R., Olasehinde, T. A., Olofinson, K. A., Erukainure, O. L., Islam, M. S., and Olaniran, A. O. 2024. Antidiabetic Potentials of Crude and Purified Sulphated Polysaccharides Isolated from *Gracilaria gracilis*, A Seaweed from South Africa. *Heliyon*. 10:1-16.
- Prescott, G. W. 1954. *How to Know the Fresh-Water Algae*. Dubuque, IA: Wm. C. Brown Company.
- Rajagukguk, B. B., Kambey, R. P., Opa, S. L., Pamikiran, V. A., Rumengan, R., dan Sumolang, C. S. 2023. Inventarisasi dan Identifikasi Makroalga di Perairan Talawaan Bajo, Sulawesi Utara (*Macroalgae Inventory and Identification in Talawaan Bajo Waters, North Sulawesi*). *e-Journal Budidaya Perairan*. 11(2): 264-274.

- Rohmah, E. A., Subekti, S., and Rudyanto, M. 2020. Larvicidal Activity and Histopathological Effect of *Averrhoa bilimbi* Fruit Extract on *Aedes aegypti* from Surabaya, Indonesia. *Journal of Parasitology Research*. 2020: 8866373.
- Rollando, and Hariono, M. 2016. Larvicidal Activity of Ethanol Extract, N-Hexane Fraction, Ethyl Acetate, and Methanol Extract from Stinkvine Leaf (*Paederia foetida* L.) Against Larvae of *Aedes aegypti* and *Anopheles* Instar III. *Traditional Medicine Journal*. 21(3): 137-142.
- Rombot, D. V., dan Samuel, M. Y. 2020. Bioaktivitas Larvasida Nyamuk *Anopheles* sp. dari Ekstrak Bunga *Tagetes erecta* L. yang Berasal dari Kota Tomohon. *Jurnal Biomedik (JBM)*. 12(3): 161-167.
- Rosydiati, dan Saleh, E. K. 2019. Karakterisasi Puncak Kromatogram dalam *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) terhadap Perbedaan Fase Gerak, Laju Alir, dan Penambahan Asam dalam Analisis Indole Acetic Acid (IAA) [Characterization of Peak Chromatogram in HPLC Influenced by Differences of Mobile Phase, Flow Rate, and Addition of Acid in Analysis of Indole Acetic Acid (IAA)]. *Kandaga*. 1(2): 65-72.
- Salamah, N., dan Widyasari, E. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (*Euphoria longan* (L.) Steud.) dengan Metode Penangkapan Radikal 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil. *Pharmajiana*. 5(1): 25-34.
- Salerno, S., and Chiaravalli, A. M. 2022. Hematoxylin-Eosin. In: La Rosa, S., and Uccella, S. (eds). *Endocrine Pathology*. Encyclopedia of Pathology. Springer, Cham.
- Sangeetha, P., She, M. M., and Aruljothi, B. 2018. Larvicidal Activities of Selected Essential Oils Against the Housefly, *Musca domestica* L. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research (JETIR)*. 5(12): 337-343.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., and Yoga Latha, L. 2010. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 8(1): 1-10.
- Schaper, S., and Hernández-Chavarría, F. 2006. Scanning Electron Microscopy of the Four Larval Instars of the Dengue Fever Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista de Biología Tropical*. 54(3).

- Senthilkumar, A., Tikar, S. N., Gopalan, N., Sundaramoorthy, P., and Venkatesalu, V. 2012. Larvicidal Potential of Different Solvent Extracts and Oleanolic Acid Derivative from *Coccinia indica* Against Vector Mosquitoes. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 94(7): 1342-1349.
- Senthil-Nathan, S. 2020. A Review of Resistance Mechanisms of Synthetic Insecticides in Mosquitoes. *Journal of Vector Borne Diseases*. 57(1): 1-10.
- Setyaningrum, Endah. 2020. *Mengenal Malaria dan Vektornya*. Lampung: Pustaka Ali Imron.
- Sharma, A., Mishra, M., Dagar, V. S., and Kumar, S. 2022. Morphological and Physiological Changes Induced by *Achyranthes aspera*-Mediated Silver Nanocomposites in *Aedes aegypti* Larvae. *Frontiers in Physiology*. 13: 1031285.
- Sianipar, M. S., Suganda, T., and Hadyarrahan, A. 2020. Effect of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis Leaves Ethanol Extract in Suppressing Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal.) Populations on Rice Plant. *Cropsaver*. 3(2): 42-48.
- Silva, A. P. B., Santos, J. M. M., and Martins, A. J. 2014. Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene of Anophelines and Their Association with Resistance to Pyrethroids - A Review. *Parasites & Vectors*. 7(450): 1-14.
- Sinum, I. M., Kurniawan, B., Soleha, T. U., dan Mutiara, H. 2023. Identifikasi dan Analisis Kepadatan Nyamuk *Anopheles* sp. ang Berpotensi sebagai Vektor Malaria berdasarkan Lingkungan Kecamatan Teluk Pandan, Kabupaten Pesawaran. *Medula*. 13(5): 878-886.
- Sivabalakrishnan, K., Thanihaichelvan, M., Tharsan, A., Eswaramohan, T., Ravirajan, P., Hemphill, A., Ramasamy, R., and Surendran, S. N. 2023. Resistance to the Larvicide Temephos and Altered Egg and Larval Surfaces Characterize Salinity-Tolerant *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*. 13: 8160.
- Soamole, H. H., Sanger, G., Harikedua, S. D., Dotulong, V., Mewengkang, H. W., dan Montolalu, R. I. 2018. Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanol Rumpun Laut Segar (*Turbinaria* sp., *Gracilaria* sp., dan *Halimeda macroloba*). *Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan*. 6(3): 287-291.
- Srimariana, E. S., Kawaroe, M., Lestari, D. F., dan Nugraha, A. H. 2020. Keanekaragaman dan Potensi Pemanfaatan Makroalga di Pesisir Pulau Tunda. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 25(1): 138-144.

- Subhalakshmi, U., Krishnaveni, A., Jelura, L. C., Gayathri, K., and Saranraj, P. 2024. Larvicidal Activity of Marine Seaweeds Against *Anopheles* and *Culex* Mosquitoes. *International Journal of Entomology Research*. 9(11): 129-133.
- Sucipto, M. P. 2015. Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) sebagai Larvasida terhadap Larva *Aedes aegypti*. *Jurnal Majority*. 4(2): 123-128.
- Sumanto, D., Cahyani, M. E. D., Anwar, R., dan Sayono. 2025. Morphological Changes of *Aedes aegypti* Larvae After Exposure to 0.02 ppm Temefos. *Medical Parasitology & Epidemiology Sciences*. 6(3): 88-96.
- Sundar, R., Sundar, V., and Sakkarapani, G. 2013. Toxicity of *Gracilaria verrucosa* Methanol Extract Against Selected Medically Important Vector Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Puducherry, India. *International Journal of Current Research*. 5(11): 3388-3392.
- Suparmi dan Sahri, A. 2009. Mengenal Potensi Rumput Laut: Kajian Pemanfaatan Sumber Daya Rumput Laut dari Aspek Industri dan Kesehatan. *Sultan Agung*. 44(118): 95-116.
- Supriyono, Soviana, S., Novianto, D., Musyaffa, M. F., Tan, S., dan Hadi, U. K. 2022. Morphological Characteristic of Malaria Vector *Anopheles aconitus* (Family: *Culicidae*) Revealed by Advanced Light and Scanning Electron Microscope. *Biodiversitas*. 23(7): 3546-3552.
- Suryani, A., Hariani, N., Majid, A., and Amalia, D. 2020. Histological Changes in the Midgut of *Spodoptera litura* Larvae Exposed by the Extract of *Mirabilis jalapa* Leaves. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 484: 012107.
- Susanti, G., Komalasari, O., dan Rahayu, A. R. 2021. Aktivitas Larvasida Infusa Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap Mortalitas Larva Nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*. 8(2): 136-141.
- Susilowati, Rina, and Sari, Monica. 2022. Histopathological Changes of Midgut Epithelial Cells of *Aedes aegypti* Larvae Exposed to Permot Leaf Extract (*Passiflora foetida*). *Jurnal Pembelajaran dan Biologi Nukleus*. 8: 53-63.
- Sutarto dan B, Eka Cania. 2018. Faktor Lingkungan, Perilaku dan Penyakit Malaria. *J Agromed Unila*. 4(1): 173-184.
- Tandi, E. 2010. *Pengaruh Tanin terhadap Aktivitas Enzim Protease. Dalam Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Makassar: Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

- Tennyson, S., and Arivoli, S. 2024. Toxicity of *Elytraria acaulis* (L. F.) Lindau (Acanthaceae) to the Larvae of Vector Mosquitoes. *Journal of Advanced Zoology*. 45(1): 21-32.
- Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., and Nguyen, H. C. 2019. Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and *In Vitro* Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*. 2019: 1-9.
- Utami, W. W., Ahmad, A. R., dan Malik, A. 2016. Uji Aktivitas Larvasida Ekstrak Daun Jarak Kepyar (*Ricinus communis* L.) terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 3(1): 141-145.
- Vandana, V., Kona, M. P., and Dimopoulos, G. 2026. A Broad-Spectrum *Chromobacterium* Biolarvicide Formulation Disrupts Mosquito Development Through Gut Damage and Apoptotic Cell Death and Compromises Vector Competence. *Communications Biology*.
- Vantaux, A., Riehle, M. M., Piv, E., Farley, E. J., Chy, S., Kim, S., Corbett, A. G., Fehrman, R. L., Pepey, A., Eiglmeier, K., Lek, D., Siv, S., Mueller, I., Vernick, K. D., and Witkowski, B. 2021. *Anopheles* Ecology, Genetics and Malaria Transmission in Northern Cambodia. *Parasites & Vectors*. 14(6458): 1-17.
- Vilvest, J., Milton, M. C. J., and Yagoo, A. 2025. Andrograpanin-induced Growth Disruption and Histopathological Effects on the Larval Midgut of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). *International Journal of Tropical Insect Science*. 45: 3035-3043.
- Wahyuni, D., Mawardika, H., Masruroh, A., 2022. Uji Aktivitas Repellent Ekstrak Etanol Daun Bunga Kertas (*Zinnia elegans*) Terhadap Nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Pengembangan Ilmu dan Praktik Kesehatan*. I(3): 10-18.
- Williams, J., and Pinto, J. 2012. *Training Manual on Malaria Entomology*. Research Triangle Park, North Carolina: United States Agency for International Development (USAID).
- WHO (World Health Organization). 2005. *Guidelines For Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*. World Health Organization Communicable Disease Control, Prevention and Eradication WHO Pesticide Evaluation Scheme.  
<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-WHOPES-GCDPP-2005.13>.

- WHO (World Health Organization). 2020. *Pictorial identification key of important disease vectors in the WHO South-East Asia Region*.
- WHO (World Health Organization). 2021. *World Malaria Report 2021*.  
<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>.
- WHO (World Health Organization). 2024. *World Malaria Report 2024*.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240104440>.
- Wibowo, C. I. 2017. Efektivitas *Bacillus thuringiensis* dalam Pengendalian Larva Nyamuk *Anopheles sp.* *Biosfera*. 34(1): 39-46.
- Widiastuti, D., dan Ikawati, B. 2016. Resistensi Malathion dan Aktivitas Enzim Esterase pada Populasi Nyamuk *Aedes aegypti* di Kabupaten Pekalongan. *Balaba*. 12(2): 47-57.
- Wijayanto, S. O., dan Bayuseno, A. P. 2013. Analisis Kegagalan Material Pipa *Ferrulenickel Alloy N06025* pada *Waste Heat Boiler* Akibat Suhu Tinggi Berdasarkan Pengujian: Mikrografi dan Kekerasan. *Jurnal Teknik Mesin UNDIP*. 1(4): 33-39.
- Wiratmini, N. I., Suartini, N. M., Andani, F., Mileva, T. A. P., Bogoriani, N. W., and Pharmawati, M. 2026. Larvicidal Activity and Midgut Histopathological Effects of *Urena lobata* Leaf Extract on *Aedes aegypti*. *HAYATI Journal of Biosciences*. 33(4): 894-903.
- Wulandari, K., dan Ahyanti, M. 2018. Efektivitas Ekstrak Biji Bintaro (*Cerbera manghas*) sebagai Larvasida Hayati pada Larva *Aedes aegypti* Instar III. *Jurnal Kesehatan*. 9(2): 218.
- Xu, T., Jiang, X., Denton, D., and Kumar, S. 2020. Ecdysone Controlled Cell and Tissue Deletion. *Cell Death and Differentiation*. 27: 1-14.
- Yamany, A. S., and Abdel-Gaber, R. 2024. Identification of Fourth-Instar Larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: *Culicidae*) Employing Scanning Electron Microscopic Tool. *Microscopy Research and Technique*. 87(5): 933-947.
- Yi, Y., Zhang, Q. W., Li, S. L., Wang, Y., Ye, W. C., Zhao, J., and Wang, Y. T. 2012. Simultaneous Quantification of Major Flavonoids in “Bawanghua”, the Edible Flower of *Hylocereus undatus* Using Pressurised Liquid Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry*. 135(2): 528-533.

- Yu, K. X., Wong, C. L., Ahmad, R., and Jantan, I. 2015. Larvicidal Activity, Inhibition Effect on Development, Histopathological Alteration and Morphological Aberration Induced by Seaweed Extracts in *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8(12): 1006-1012.
- Yuandarru, R., Setyaningrum, E., Chrisnawati, L., dan Pratami, G. D. 2025. Uji Bioaktivitas Ekstrak N-Heksana Rumpun Laut *Gracilaria* sp. sebagai Antimalaria Terhadap Parasit *Plasmodium falciparum* secara *In Vitro*. *Jurnal Penelitian Sains*. 27(2D): 1-6.
- Yudhana, A., Praja, R. N., dan Yunita, M. N. 2017. Deteksi Gen Resistensi Insektisida Organofosfat pada *Aedes aegypti* di Banyuwangi, Jawa Timur menggunakan *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Veteriner*. 18(3): 446-452.
- Yuliany, E., dan Fitriani. 2020. Daya Larvasida Ekstrak Daun Tahi Kotok (*Tagetes erecta* L.) Terhadap Mortalitas Larva *Culex quinquefasciatus*. *Jurnal Pendidikan Biologi*. 11(1): 43-50.
- Zahrawana, M., Mutiasari, D., Ratnasari, A., Jabal, A. R., Triawan, N., Kurniawan, M. Y. I., Djajanto, M., and Karmila, M. 2024. Characteristics of *Anopheles* Breeding Places in Dahian Tambuk Village, Gunung Mas District, Central Kalimantan. *Journal of Vocational Health Studies*. 7(13): 161-165.
- Zeng, Z., Xie, E., Tan, H., Wang, X., Yang, W., Li, N., Lai, Q., Lin, K., Lei, M., Wu, X., and Cui, J. 2025. Diversity of *Gracilariaceae* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) Across Distinct Ecosystems in Zhanjiang, China: A Foundation for Screening Potential Cultivable Species in Southern China. *Ecology and Evolution*. 15(7): 1-18.
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., and Ye, W.-C. 2018. Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese Medicine*. 13(20): 1-26.
- Zhou, Y. Q., Zhang, Q. W., Li, S. L., Yin, Z. Q., Zhang, X. Q., and Ye, W. C. 2012. Quality Evaluation of *Semen Oroxyli* through Simultaneous Quantification of 13 Components by High Performance Liquid Chromatography. *Current Pharmaceutical Analysis*. 8(2): 206-213.