

**KAJIAN PEMANFAATAN RESIDU FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL
Ulva rigida SEBAGAI BIOLARVASIDA *Aedes aegypti***

***Study On The Utilization Of Ethyl Acetate Fraction Residue Of Ethanol Extract Of Ulva
Rigida As An Aedes Aegypti Biolarvicide***

Vinsensius Manek Ati^{1*}, Mangadas Lumban Gaol¹, Djefry Amalo¹, Marten U. D. Tanggela¹, Athanas
R. M. Ati²

¹Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknik Universitas Nusa Cendana

²Program Studi Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan Universitas Nusa Cendana
Jl. Adi Sucipto Penfui Kupang
E-mail: vinsenmanekati@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian dilakukan dengan tujuan mengidentifikasi kandungan alkaloid, tanin, flavonoid, saponin dan terpenoid pada residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* serta menguji potensinya sebagai biolarvasida pada larva *Aedes aegypti*. Variabel yang diamati adalah persentase mortalitas, median lethal concentration (LC₅₀) dan median lethal time (LT₅₀). Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap terdiri dari 6 perlakuan residu fraksi etil asetat (0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm dan 800 ppm). Setiap perlakuan diulang 4 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase rendemen *Ulva rigida* relatif rendah (3,37%) dengan metabolit sekunder yang teridentifikasi adalah saponin dan terpenoid. Perlakuan 400 ppm secara nyata memberikan persentase kematian tertinggi pada larvae dengan LC₅₀ dan LT₅₀ secara berurutan 1598,17 ppm dan 80,12 jam. Meskipun berpengaruh sangat nyata terhadap persentase kematian namun residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* tergolong tidak toksik bagi larva *Aedes aegypti* berdasarkan nilai LC₅₀.

Kata kunci : *Ulva rigida*, residu, etil asetat, *Aedes aegypti*, biolarvasida

ABSTRACT

This research was carried out to identify the contents of alkaloids, tannins, flavonoids, saponins, and terpenoids in the residue of the ethyl acetate fraction of the Ulva rigida ethanol extract as well as to determine its potency as a biolarvicidal on Aedes aegypti larvae. The variables observed were the percentage of mortality, median lethal concentration (LC₅₀) and median lethal time (LT₅₀). It was design using completely randomized design consist of 6 treatments of ethyl acetate fraction residual (0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm and 800 ppm) with 4 replications. The results indicated that the yield percentage of Ulva rigida was relatively low (3.37%) and identified secondary metabolites being saponins and terpenoids. The application of 400 ppm had induce highest mortality percentage significantly on Aedes aegypti larvae with LC₅₀ and LT₅₀ were 1598.17 ppm and 80.12 hours respectively. Although the treatment had very significant effect on the percentage of mortality, it was classified as non-toxic to Aedes aegypti larvae based on the LC₅₀ value.

Keywords: *Ulva rigida*, residue, ethyl acetate, *Aedes aegypti*, biolarvacide

PENDAHULUAN

Nyamuk *Aedes aegypti* terutama nyamuk betina menjadi vektor utama penyakit demam berdarah dengue. Nyamuk *Aedes aegypti* (= *Stegomyia aegypti*) dan *Aedes*

albopictus (= *Stegomyia albopicta*) merupakan vektor penting secara global dari beberapa arbovirus antara lain virus dengue, virus demam kuning, virus chikungunya (Kraemer *et al.*, 2015), dan virus Zika (Mourya *et al.*, 2018). Diperkirakan lebih dari 100 negara di Afrika, Amerika, Mediterania Timur, Asia Tenggara, Pasifik Barat, Perancis, Kroasia dan sebagian Negara di Eropa menjadi daerah endemik penyakit DBD. Indonesia menjadi negara dengan kasus DBD tertinggi di Asia Tenggara sejak terdeteksi pertama kali pada tahun 1968 hingga 2011 (Akbar & Syaputra, 2019).

Indonesia sebagai salah satu negara endemik DBD pada tahun 2018 tercatat memiliki *Incidence Rate* (IR) 24,75/100.000 dan meningkat 108 % mencapai 51,53/100.000 pada tahun 2019 dengan case fatality rate (CFR) 0,67% sedikit lebih rendah dibanding tahun 2018 sebesar 0,71%. Jumlah kabupaten/kota terjangkit DBD di Indonesia sebanyak 481 atau sekitar 93,58% dari keseluruhan kabupaten/kota di Indonesia (Widyantoro dkk., 2021). DBD telah menjadi salah satu penyakit yang memicu kejadian luar biasa (KLB) dan wabah serta menyebabkan kematian (Budiman & Oetami, 2020).

Upaya pencegahan dan penanganan kasus DBD harus dilakukan secara menyeluruh dan tuntas. Kegiatan pemberantasan *Aedes aegypti* lebih efisien melalui penggunaan larvasida dibandingkan dengan membunuh nyamuk dewasa (Yasi & Harsanti, 2018). Larvasida sintetis lebih umum digunakan karena lebih mudah diaplikasi, mudah diperoleh, dan lebih efektif. Namun insektisida sintetis berdampak terhadap lingkungan, menimbulkan efek residu, resistensi populasi nyamuk dan kesehatan manusia (Gautam *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2009). Taslisia dkk. (2018) menunjukkan bahwa larva *Aedes aegypti* telah resisten terhadap themephos pada pengujian resistensi menggunakan 0,012 mg/L. Kecenderungan resistensi insektisida disebabkan penggunaan secara terus menerus dalam jangka panjang (Lesmana dkk., 2021). Sehingga perlu dilakukan pengkajian secara cermat penggunaan senyawa organik bahan alam yang mudah terurai, tidak menimbulkan efek residu dan tidak mencemari lingkungan serta tidak bersifat toksik bagi manusia maupun organisme non target lainnya.

Fitokimia dapat berperan sebagai larvasida, pengatur pertumbuhan serangga, repelan dan atraktan oviposisi. Zat aktif flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, fenol dan steroid (Kumara dkk., 2021; Maulana dkk., 2021) dapat digunakan sebagai larvasida nyamuk *A. aegypti*. Berbagai penelitian ilmiah telah dilakukan untuk mengkaji pengaruh senyawa bioaktif flavonoid ekstrak *Vitex negundo* dan *Andrographis paniculata* pada *Anopheles stephensi* dan *Aedes aegypti* (Gautam *et al.*, 2011), alkaloid, tannin (Meye dkk., 2021) dan flavonoid ekstrak *Moringa oleifera* (Ati *et al.*, 2022), maupun flavonoid bersulfat

dari ekstrak *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) terhadap *A. aegypti* (Fernandes *et al.*, 2018).

Ulva sp tergolong dalam makroalga yang tersedia berlimpah (Dewi, 2018) dan tersebar luas pada zona intertidal, di pelabuhan yang tenang dan terlindungi sampai pada kedalaman 10 m, serta tumbuh di sepanjang bebatuan, pantai berpasir di lautan maupun muara (Apaydin *et al.*, 2010). Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa selada laut mengandung metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, mono dan seskuiterpenoid (Windyaswari dkk., 2019). Flavonoid, senyawa fenol, saponin, tanin terdeteksi dalam ekstrak air *Ulva lactuca* yang dikoleksi dari pesisir Raigad Distrik Konkan Maharashtra India. Pada ekstrak etanol terkandung senyawa fenol, steroid, dan tanin. Pada ekstrak etil asetat terdapat senyawa fenol, dan tanin. Pada ekstrak kloroform terkandung flavonoid, senyawa fenol, saponin, dan tanin (Whankatte & Ambhore, 2016).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Ulva* sp berpotensi sebagai sumber antioksidan (Prasedya dkk., 2019; Windyaswari, 2019; Whankatte & Ambhore, 2016), sumber vitamin C dan α -tokoferol (Yunita dkk., 2018)). Ekstrak etanol *Ulva* sp efektif sebagai gastroprotektor (Widyaningsih & Afdaliah, 2020), dan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (Emelda dkk., 2021).

Ulva rigida diketahui terdistribusi luas dan melimpah di alam dan berpotensi sebagai pakan ternak dan obat-obatan (Jha *et al.*, 2009). Namun belum tersedia informasi ilmiah kajian potensi dan pemanfaatan *Ulva rigida* sebagai biolarvasida pada larva *Aedes aegypti*. Penelitian ini sangat penting untuk mengidentifikasi alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, steroid dan terpenoid pada *Ulva rigida* dan menguji potensi residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* sebagai biolarvasida berdasarkan indikator persentase mortalitas, median lethal concentration (LC₅₀) dan median lethal time (LT₅₀).

METODOLOGI PENELITIAN

Pembuatan ekstrak *Ulva rigida*

Sampel *Ulva rigida* dikeringanginkan selama 2 minggu hingga rapuh saat diremas. Selanjutnya sampel dihaluskan dengan blender dan disaring dengan ayakan 60 mesh kemudian ditempatkan dalam botol kaca berpenutup untuk selanjutnya dilakukan maserasi. Maserasi dilakukan selama 24 jam dan diulang dua kali (remaserasi) menggunakan etanol 70% dengan perbandingan simplisia dan etanol 1:4. Pengadukan dilakukan dua kali sehari selama 15 menit. Hasil maserasi dipisahkan antara filtrat dan pellet (Ardinata dkk., 2020) menggunakan kertas saring whatman no. 1. Filtrat dievaporasi menggunakan rotary

evaporator pada suhu 40°C (Yasi dan Harsanti, 2018). Hasil evaporasi berupa larutan sehingga dipanaskan lagi dalam oven dengan suhu 40 °C untuk mendapatkan ekstrak pekat dan dinyatakan sebagai ekstrak etanol *Ulva rigida*. Sediaan ekstrak etanol digunakan dalam fraksinasi bertingkat Persentase rendemen ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot serbuk simplisia}} \times 100 \dots\dots (1)$$

Fraksinasi

Ekstrak etanol difraksinasi mengacu kepada Chasani dkk. (2013) dan Ati *et al.* (2022). Sebanyak 7,5 g ekstrak kasar dilarutkan dalam 150 mL air, diaduk hingga encer dan homogen kemudian dimasukkan dalam corong pisah. Tambahkan 25 mL n-heksan ke dalam corong pisah ditutup rapat kemudian dikocok dengan hati-hati sehingga terbentuk 2 lapisan yaitu fraksi n-heksan dan residu. Lapisan n-heksan dipisahkan dengan residu. Selanjutnya residu difraksinasi dengan 25 mL kloroform dan dikocok dengan hati-hati sehingga diperoleh fraksi kloroform dan residu. Fraksi kloroform dipisahkan dari residu. Residu difraksinasi lagi dengan 25 mL etil asetat dan dikocok dengan hati-hati sehingga terbentuk 2 fraksi yaitu fraksi etil asetat dan residu. Selanjutnya dilakukan penguapan dengan evaporator suhu 40 °C untuk menghilangkan masing-masing pelarut. Hasil evaporasi berbentuk cairan sehingga dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40 °C sampai diperoleh padatan.

Skrining Fitokimia

Uji alkaloid, tanin, saponin, terpenoid dan flavonoid dari residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* mengacu kepada Takaidza *et al.* (2018), dan Solihah dkk. (2020). Uji flavonoid juga dilakukan merujuk kepada Ati *et al.* (2020). Padatan residu fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 0,1 g diencerkan dengan aquades menggunakan labu 10 ml digojok kemudian dipindahkan ke labu erlenmeyer dan dipanaskan menggunakan *hot plate* agar bahan yang masih menggumpal terlarut dan menjadi lebih homogen. Uji alkaloid, tanin dan saponin menggunakan larutan yang telah dihomogenkan sedangkan terpenoid dan flavonoid menggunakan padatan. **Uji alkaloid:** sebanyak 2 ml larutan diambil dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam klorida 1% beberapa tetes digojok sampai homogen. Larutan disaring menggunakan kertas Whatman No.1. Filtrat dipisahkan pada dua tabung reaksi berbeda. Tabung pertama ditetesi reagen Mayer's, kemudian digojok dan dilihat perubahan warna. Tabung kedua diberi tetesan reagen Dragendorff digojok dan dilihat perubahan warna. Jika terbentuk endapan putih pada

reagen Mayer's dan endapan merah pada reagen Dragendorff atau adanya kekeruhan atau endapan pada salah satu reagen menandakan positif mengandung alkaloid. **Uji tanin:** diambil 2 ml larutan menggunakan mikropipet kemudian disaring dengan kertas Whatman No 1. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 2-3 tetes feri klorida (FeCl_3) 1% lalu digojog dan dilihat perubahan warna. Perubahan menjadi hijau kecokelatan atau biru kehitaman berarti positif mengandung tanin. **Uji saponin:** Diambil 2 ml larutan disaring menggunakan kertas Whatman No 1 dicampur dengan 5 ml air destilasi, dikocok dengan kuat dan diamkan selama 15 menit lalu ditambahkan 2 tetes HCl 2 N. Amati buih stabil yang berbentuk. **Uji terpenoid (Uji Salkowski):** 2 mg padatan ditambahkan dengan 1 ml asam asetat glasial dan 1 ml H_2SO_4 asam sulfat pekat ditambahkan secara hati-hati untuk membentuk lapisan. Perubahan warna ungu ke biru berarti positif mengandung steroid dan cokelat kemerahan antara muka menunjukkan positif triterpen. **Uji flavanoid:** 0,5 g padatan dipanaskan dalam 5 ml etil asetat dengan penangas air selama 1 menit. Campuran disaring dengan kertas saring Whatman No 1. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 1 ml amonia encer dan dikocok. Perubahan warna menjadi kuning hijau menandakan positif mengandung flavonoid. Jika tidak ada perubahan warna lanjut dengan pereaksi yang lain yaitu diambil 0,5 g padatan diencerkan dengan etanol 1 ml kemudian ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium (Mg) dan ditambahkan 2-3 tetes HCl pekat. Perubahan warna merah, kuning dan jingga menandakan positif mengandung flavonoid.

Penyediaan larva

Telur *Aedes aegypti* diperoleh dari Loka Litbangkes Waikabubak Sumba Barat. Telur diberi alas tissue dan ditempatkan dalam media air kemudian ditutup dengan jaring untuk menghindari masuknya nyamuk liar. Media berisi telur dijemur setiap hari selama 1 jam untuk meningkatkan daya tetas. Larva nyamuk dipelihara selama 3-5 hari dan diberi makan dogfood hingga instar III dan IV. Karakteristik larva instar III antara lain terdapat duri-duri pada dada, sifon gemuk dan berwarna cokelat kehitaman, corong pernapasan berwarna coklat kehitaman, sifon yang gemuk, gigi sisir pada segmen abdomen ke-8, mengalami pergantian kulit setelah 3-5 hari. Larva instar IV memiliki warna kepala gelap, corong pernapasan pendek dan gelap kontras dengan warna tubuh, setelah 2-3 hari mengalami *molting* dan pupasi). Larva instar III dan IV dicuplik secara acak sebagai hewan percobaan.

Uji larvasida

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari 6 perlakuan

residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* yaitu yaitu 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm dan 800 ppm. Setiap perlakuan diulang 4 kali sehingga diperoleh 24 satuan percobaan. Setiap media percobaan diisi air 200 ml dan residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* sesuai perlakuan. Suhu dan pH air diukur sebelum penempatan larva. Setiap satuan percobaan berisi 25 larva *Aedes aegypti*. Pengamatan dilakukan setiap 6 jam sampai 24 jam. Pengamatan dilanjutkan ke 24 jam berikut jika kematian larva nyamuk belum mencapai 50% sesuai standar WHO sampai 72 jam karena larva akan mengalami pupasi setelah 72 jam.

Variabel Penelitian

Variabel yang berhubungan dengan aktivitas biolarvasida ekstrak *Ulva* sp adalah persentase mortalitas, lethal concentration 50 (LC₅₀) dan lethal time 50 (LT₅₀). Persentase mortalitas adalah jumlah larva yang mati berbanding terbalik dengan jumlah larva mula-mula dinyatakan dalam persentase mengikuti persamaan:

$$M (\%) = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

M (%)= Persentase kematian, M_t= Jumlah larva yang mati, M₀= Jumlah larva mula-mula

Median lethal concentration (LC₅₀) adalah jumlah konsentrasi senyawa metabolit sekunder ekstrak *Ulva* sp yang dapat menyebabkan 50% kematian larva sedangkan median lethal time (LT₅₀) adalah waktu yang dibutuhkan agar tercapai 50% kematian larva (Ati *et al.*, 2022).

Analisis Data

Data hasil eksperimen ditabulasi dan dilakukan analisis ragam (Anova). Jika terdapat perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan. LC₅₀ dan LT₅₀ dianalisis menggunakan analisis probit. Analisis menggunakan software SPSS v.25.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen Ekstrak

Ulva rigida yang diekstraksi dengan etanol 70% diperoleh rendemen 3,37 % dengan filtrat berwarna hijau pekat. Nilai rendemen ini lebih rendah jika dibandingkan dengan persentase rendemen *Ulva lactuca* yang diekstraksi dengan etanol 96% sebagaimana dilaporkan Arbi *et al.* (2016) dan Hudaifah dkk. (2020) secara berurutan 13,54% dan 25%. Perbedaan hasil rendemen dalam penelitian ini dengan penelitian sebelumnya diduga dipengaruhi oleh jenis *Ulva* konsentrasi pelarut yang digunakan, dan perbedaan habitat. Sel tumbuhan termasuk makroalga yang berada di lingkungan yang berpotensi bahaya seperti

paparan polusi, cekaman, kekeringan, UV dan serangan pathogen akan menghasilkan fitokimia untuk melindungi diri (Adusei, Otchere, Oteng, & Mensah, 2019). Nilai rendemen menunjukkan kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam bahan. Semakin tinggi nilai rendemen berarti semakin tinggi kandungan senyawa aktif. Menurut Septiawan dkk. (2020) ukuran partikel sampel, jenis pelarut, kondisi dan waktu penyimpanan turut mempengaruhi nilai rendemen.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida*

Senyawa metabolit	Pereaksi	Residu	Keterangan
Alkaloid	Dragendorf	Negatif	Tidak ada perubahan warna
	Mayer's	Negatif	Tidak ada perubahan warna
Tanin	FeCl ₃	Negatif	Tidak ada perubahan warna
Saponin	HCl 2 N	Positif	Timbul busa yang stabil
Triterpen	Asam asetat glasial & H ₂ SO ₄ pekat	Positif	Coklat kemerahan
Steroid	Asam asetat glasial & H ₂ SO ₄ pekat	Negatif	Tidak ada perubahan warna
Flavonoid	Etil asetat & amonia encer	Negatif	Tidak ada perubahan warna
	Serbuk magnesium	Negatif	Tidak ada perubahan warna

Positif = mengandung senyawa; negatif = tidak mengandung senyawa

Ekstrak etanol *Ulva rigida* difraksinasi secara bertingkat menggunakan n-heksan, kloroform, dan etil asetat. Residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* yang selanjutnya dalam penelitian ini disebut residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* dilakukan uji fitokimia (Tabel 1). Hasil uji menunjukkan bahwa residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* positif mengandung saponin dan triterpen. Sebaliknya, alkaloid, tanin, steroid, dan flavonoid tidak teridentifikasi. Windyaswari dkk., (2019) menunjukkan bahwa selada laut mengandung alkaloid, flavonoid, mono dan seskuiterpenoid. Whankatte & Ambhore (2016) mendeteksi adanya flavonoid, senyawa fenol, saponin, tanin, pada *Ulva lactuca* yang diekstraksi dengan air. Pada ekstrak etanol berhasil diidentifikasi senyawa fenol, steroid, dan tanin sedangkan pada ekstrak etil asetat diperoleh senyawa fenol, dan tanin. Pada ekstrak metanol terkandung flavonoid, glikosida, senyawa fenol, dan tanin sedangkan pada ekstrak kloroform teridentifikasi flavonoid, senyawa fenol, saponin, dan tanin. Hudaifah *et al.* (2020) mengidentifikasi adanya senyawa alkaloid (pereaksi Mayer), flavonoid, tanin, triterpenoid, dan saponin pada *Ulva lactuca*.

Perbedaan hasil uji kualitatif ini diduga selain dipengaruhi oleh metode dan konsentrasi pelarut yang digunakan, disebabkan pula oleh jenis *Ulva*, dan habitat.

Chlorophyta mengandung lebih banyak terpenoid (saponin) (Sahayaraj *et al.*, 2014). Jenis dan proporsi fitokonstituen dipengaruhi pula oleh spesies dan faktor lingkungan (Hakim & Patel, 2020) serta metode ekstraksi (Sahayaraj *et al.*, 2014). Komposisi biokimia makroalga laut secara umum sangat dipengaruhi oleh lokasi geografi dan kondisi lingkungan setempat. Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada rumput laut distimulasi oleh berbagai cekaman lingkungan seperti tingkat pencahayaan yang tinggi, konsentrasi garam yang tinggi dan radiasi ultra violet (Prasedya dkk., 2019). Metabolit sekunder berperan melindungi dari stress lingkungan, perlindungan dari hama dan penyakit (fitoaleksin), perlindungan dari sinar ultraviolet, sebagai pengatur tumbuh, bersaing dengan tanaman lain (alelopati), dan menginduksi pembentukan senyawa tertentu sebagai respon pertahanan tanaman (Perangin-Angin dkk., 2019).

Mortalitas larva *Aedes aegypti* yang terpapar residu fraksi etil asetat *Ulva rigida*

Kematian individu dapat mempengaruhi dinamika populasi. Kematian dapat disebabkan oleh kondisi lingkungan alamiah maupun buatan. Persentase mortalitas larva *Aedes aegypti* setelah 48 jam terpapar residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase kematian larva *Aedes aegypti* setelah 48 jam perlakuan residu fraksi etil asetat *Ulva rigida*

Perlakuan (ppm)	Rerata kematian (ind)	Persentase kematian (%)
P0 (0ppm)	0	$0 \pm 0,000^a$
P1 (50ppm)	0,75	$3 \pm 2,000^a$
P2 (100ppm)	0,75	$3 \pm 2,000^a$
P3 (200 ppm)	1,25	$5 \pm 3,830^a$
P4 (400 ppm)	8,75	$35 \pm 3,830^b$
P5 (800ppm)	6,25	$25 \pm 11,015^c$

Keterangan: angka diikuti dengan superscript yang sama berarti tidak berbeda nyata

Persentase kematian larva *Aedes aegypti* mengalami kenaikan sejalan dengan peningkatan paparan konsentrasi residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* hingga 400 ppm. Dalam penelitian ini konsentrasi 400 ppm menyebabkan kematian mencapai 35% dan diduga merupakan konsentrasi optimum karena ketika ditingkatkan menjadi 800 ppm persentase kematian mengalami penurunan sebesar 10%.

Hasil analisis ragam (Anova) membuktikan bahwa penerapan residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* berpengaruh sangat nyata terhadap persentase kematian larva *Aedes aegypti* ($P = 0,000$). Hasil ini mengindikasikan bahwa minimal salah satu perlakuan berpengaruh secara signifikan terhadap kematian larva *Aedes aegypti*. Hasil uji Duncan

menegaskan bahwa pemberian 400 ppm residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* mengakibatkan persentase kematian tertinggi mencapai 35% dibanding perlakuan lainnya. Persentase kematian larva dalam penelitian ini tergolong rendah dibanding Ati dkk (2023) menggunakan kombinasi 50 mg ekstrak kulit batang kelor dan 450 mg ekstrak batang kemangi.

Larva yang mengalami keracunan menunjukkan gerakan melemah, tenggelam ke dasar media dan mati dengan posisi tubuh memanjang sejajar dasar media. Larva yang mati tidak bergerak dalam waktu lama dan ketika disentuh dengan ujung pipet tidak memberikan respon. Selain itu, larva mengalami perubahan warna menjadi lebih putih dengan tubuh membesar. Ciri inilah yang membedakan larva mati dengan larva yang melakukan pergantian kulit (molting) ke instar berikutnya pada larva instar III atau mengalami pupasi pada larva instar IV. Larva *Aedes aegypti* yang hidup menurut Susanti & Suharyo (2017) bergerak cepat dari bawah ke permukaan air untuk mengambil nafas udara lalu kembali lagi ke bawah.

Senyawa saponin dan terpenoid dalam penelitian ini diduga berkontribusi terhadap kematian larva *Aedes aegypti* melalui mekanisme kontak langsung (racun kontak) dan saluran pencernaan (racun perut). Kedua senyawa mengakibatkan gangguan pada alat pencernaan dan menghambat penyerapan air pada larva sehingga mengakibatkan kematian. saponin mengandung glikosida yang bertindak sebagai racun perut dan dapat menurunkan aktivitas enzim pencernaan dan penyerapan makanan. Saponin menurunkan tegangan permukaan selaput mukosa saluran pencernaan larva sehingga dinding saluran pencernaan menjadi korosif (Utami, Ahmat, & Malik, 2016). Selain itu, saponin mengganggu perkembangan dan gangguan pergantian kulit pada larva (*moulting*) menyebabkan hambatan pada perkembangan larva menuju stadium selanjutnya. Menurut Dalimunthe & Rachmawan (2017) tanaman dan metabolit sekundernya merupakan sumber penting untuk memperoleh pestisida nabati dan produk turunan pestisida nabati. Resistensi hama penyakit, risiko keracunan dan kerusakan lingkungan akibat pestisida buatan telah meningkatkan perhatian pada pemanfaatan metabolit sekunder sebagai pestisida nabati.

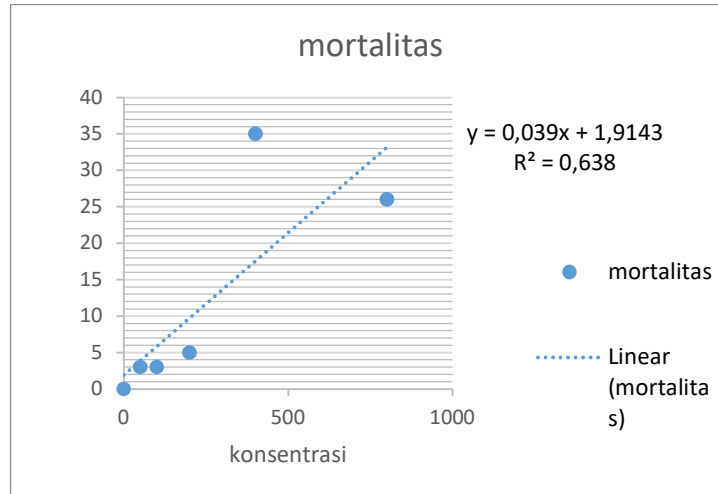
Senyawa terpenoid dapat memicu mortalitas larva *Aedes aegypti* dengan bekerja sebagai *antifeedant*. Senyawa antifeedant tidak bersifat membunuh, mengusir, atau menjerat secara langsung melainkan dengan menghambat aktivitas makan antara lain menghambat nafsu makan serangga (*feeding inhibition*). Mekanisme penghambatan dilakukan dengan menekan aktivitas menggigit (*suppressant*) dan mencegah serangga terus makan (*deterrent*). Yuniati *et al.*, (2020) menyatakan bahwa triterpen dan sterol bersifat

non volatil dan terpenoid merupakan kelompok metabolisme sekunder yang efektif sebagai insektisida.

LC₅₀ Larva Nyamuk *Aedes aegypti* yang Didedah Residu Fraksi Etil Asetat *Ulva rigida*

Hasil analisis probit menunjukkan bahwa median lethal concentration (LC₅₀) pada larva *Aedes aegypti* yang diberi residu fraksi etil asetat dicapai pada 1598,17 ppm. Nilai tersebut bermakna bahwa untuk membunuh 50% dari populasi larva *Aedes aegypti* dalam waktu 48 jam pengamatan dibutuhkan 1598,17 ppm residu etil asetat *Ulva rigida*. Berdasarkan kategori toksisitas bahan maka nilai LC₅₀ ini tergolong tidak toksik karena lebih besar dari 1000 ppm. Kategori toksik nilai LC₅₀ suatu bahan berkisar antara 30-1000 ppm. Semakin rendah nilai LC₅₀ maka semakin efektif pula larvasida tersebut (Martiningsih, 2013). Hubungan antara konsentrasi dan persentase kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* dinyatakan dalam Gambar 1.

Hubungan antara mortalitas larva *Aedes aegypti* dengan konsentrasi residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* dinyatakan dalam persamaan: $Y = 0,039X + 1,914$ dengan koefisien determinasi (R^2) = 0,638. Persamaan tersebut menunjukkan bahwa setiap peningkatan konsentrasi residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* (X) sebesar 1 ppm akan menyebabkan peningkatan persentase mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti* (Y) sebesar 0,039%.



Gambar 1. Hubungan konsentrasi residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* dan persentase mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*

Nilai R^2 sebesar 0,638 menunjukkan bahwa 63,8% mortalitas larva *Aedes aegypti* disebabkan oleh residu fraksi etil asetat *Ulva rigida*, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain yang tidak diamati dalam penelitian ini. Koefisien korelasi (r) yang diperoleh dari menarik akar kuadrat nilai koefisien determinasi adalah 0,799. Nilai koefisien korelasi mengindikasikan bahwa konsentrasi residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* dan persentase

kematian larva *Aedes aegypti* memiliki korelasi yang kuat. Menurut Sanny & Dewi (2020) interval koefisien korelasi 0,60 – 0,799 tergolong memiliki tingkat hubungan kuat. Chasani, Fitriaji, & Purwati (2013) memberikan ekstrak metanol, fraksi n-heksan ekstrak metanol, fraksi etil asetat ekstrak metanol dan residu etil asetat ekstrak metanol kulit batang ketapang bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan fraksi etil asetat ekstrak metanol bersifat paling toksik dengan LC₅₀ sebesar 61,675 ppm.

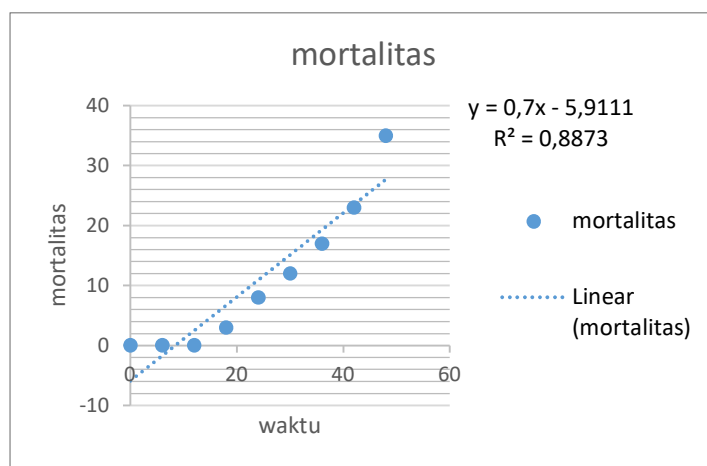
Pengaruh Residu Etil Asetat *Ulva rigida* terhadap LT₅₀ Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

Median lethal time (LT₅₀) menggambarkan waktu yang dibutuhkan untuk membunuh 50% dari populasi larva *Aedes aegypti* yang digunakan sebagai hewan uji. Hasil analisis probit LT₅₀ larva *Aedes aegypti* yang diberi perlakuan residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai LT₅₀ residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida*

Konsentrasi	Nilai LT ₅₀
0 ppm	-
50 ppm	127,27
100 ppm	127,27
200 ppm	112,97
400 ppm	64,4 jam
800 ppm	97,19 jam

Pemaparan 400 ppm residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* dalam waktu 64,4 jam dapat membunuh 50% larva uji berdasarkan hasil analisis probit (Tabel 2). Perkiraan waktu tersebut lebih singkat dibanding kelima perlakuan lainnya. Hubungan antara waktu dan persentase mortalitas mengikuti persamaan $Y = 0,7X - 5,911$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,887. Persamaan tersebut berarti setiap pertambahan waktu pemaparan residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* selama 1 jam menyebabkan peningkatan persentase kematian larva *Aedes aegypti* mencapai 0,7%. Penyebab kematian larva, 88,7% berhubungan dengan lama waktu terpapar residu fraksi etil asetat *Ulva rigida* dan selebihnya oleh faktor lain yang tidak diamati dalam penelitian ini. Nilai koefisien korelasi diperoleh 0,942. Koefisien korelasi yang diperoleh menggambarkan bahwa konsentrasi residu fraksi etil asetat ekstrak etanol *Ulva rigida* dan persentase kematian memiliki korelasi yang sangat kuat. Interval koefisien korelasi 0,80 – 1,00 tergolong memiliki tingkat hubungan sangat kuat (Sanny & Dewi, 2020).



Gambar 2. Hubungan waktu dengan persentase mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti* yang terpapar residu fraksi etil asetat

KESIMPULAN

Ulva rigida yang diekstraksi dengan etanol 70% memiliki rendemen relatif rendah (3,37%). *Ulva rigida* mengandung saponin dan terpenoid namun tidak teridentifikasi alkaloid, tanin, steroid dan flavonoid. Pemberian 400 ppm residu fraksi etil asetat berpengaruh sangat nyata pada persentase kematian larva *Aedes aegypti* dengan LC_{50} sebesar 1598,17 ppm dan LT_{50} dicapai pada 80,1 jam. Meskipun berpengaruh sangat nyata terhadap persentase kematian namun mengacu kepada nilai LC_{50} aka residu fraksi etil asetat bersifat tidak toksik karena memiliki nilai $LC_{50} > 1000$ ppm. Sehingga perlu dilakukan kajian pemanfaatan *Ulva rigida* dan metabolit sekundernya untuk kegunaan lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan ini terselenggara atas dukungan dana yang bersumber dari DIPA Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknik Universitas Nusa Cendana, bantuan telur nyamuk *Aedes aegypti* dari Loka Litbangkes Waikabubak, Laboratorium Biosains Undana dan jasa baik dari Melani Susanti Tasik, Debora Tiran, dan Maria Sofien Alo Pagho.

DAFTAR PUSTAKA

- Adusei, S., Otchere, J. K., Oteng, P., & Mensah, R. Q. (2019). Phytochemical analysis, antioxidant and metal chelating capacity of. *Heliyon*, 5:e02762.
- Akbar, H. & EM Syaputra. 2019. Faktor Risiko Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Kabupaten Indramayu. *MPPKI*. 2(3): 159-164. DOI: <https://jurnal.unismuhpalu.ac.id/index.php/MPPKI/issue/view/58>
- Apaydın, G., V Ayılıcı, E Cengiz, M Saydam, N Küp & E Tıraşoğlu. 2010. Analysis of Metal Contents of Seaweed (*Ulva lactuca*) from Istanbul, Turkey by EDXRF. *Turkish*

- Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 10: 215-220. Diakses pada <http://www.trjfas.org/pdf.php?id=360>. DOI:10.4194/trjfas.2010.0209
- Arbi, B., WF Ma'ruf & Romadhon. 2016. Aktivitas Senyawa Bioaktif Selada Laut (*Ulva lactuca*) sebagai Antioksidan pada Minyak Ikan. *Jurnal Saintek Perikanan*, 12 (1): 12-18
- Ardinata, R., Yulianti, Asmawati, Yunianti, & Manguntung, B. (2020). Inovasi Pemanfaatan Ekstrak Alga Hijau *Ulva* Sp Dari Pantai. *Jurnal Tambora*, 4(3): 1-6.
- Ati, VM, ED Meye, Refli, AOM Dima, Dj Amalo & UL Jebatu. 2022. Moringa leaf (*Moringa oleifera* L) flavonoids utilization in suppressing growth of *Aedes aegypti* larvae. *Jurnal Ilmiah Berkala: Sains dan Terapan Kimia*. 16(1): 64-74. <https://ppjp.ulm.ac.id/journal/index.php/jstk/article/view/12377>. DOI: 10.20527/jstk.v16i1.12377
- Ati, VM., Paula MDS Mau, Ermelinda D. Meye, Alfred OM Dima dan Djefry Amalo. 2023. Aplikasi substitutive ekstrak kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.) dengan batang kemangi (*Ocimum basilicum* L.) terhadap mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. 10(1): 109-119.
- Budiman & H Oetami. 2020. Surveilans Kesehatan Masyarakat: Program Pencegahan Dan Pengendalian Penyakit Demam Berdarah Dengue Di Kota Cimahi. *Dimasejati*. 2(2): 214-233. Diakses pada <https://www.syekhnrjati.ac.id/jurnal/index.php/dimasejati/article/download/7290/3438>
- Chasani, M., R Fitriaji, & Purwati. 2013. Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batang Ketapang (*Terminalia catappa* L) dan Uji Toksisitasnya dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). *Molekul*, 8(1): 89-100. <http://jmolekul.com/downloads/8.1.89.pdf>.
- Dalimunthe, C., & Rachmawan, A. (2017). Prospek Pemanfaatan Metabolit Sekunder Tumbuhan. *Warta Perikanan*, 36(1): 15-28.
- Dewi, EN. 2018. *Ulva Lactuca*. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro Semarang. http://eprints.undip.ac.id/67364/1/BUKU_ULVA_FIX.pdf.
- Emelda, EA Safitri & A Fatmawati. 2021. Aktivitas Inhibisi Ekstrak Etanolik *Ulva lactuca* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Journal Of Indonesia*. 7(1): 43-48. <https://pji.ub.ac.id/index.php/pji/article/download/300/152>.
- Fernandes, D.A., M.S.R. Souza, Y.C.F. Teles, L.H.G. Oliveira, J.B. Lima, A.S. Conceicao, F.C. Nunes, T.M.S. Silva dan M.de Fatima V. de Souza. 2018. New sulphated flavonoids and larvicidal activity of *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae). *Molecules*. 23: 2784-2795. <http://www.mdpi.com/journal/molecules>.
- Ferreira, P.M.P., A.E.U Carvalho, D.F. Farias, N.G. Cariolano, V.M.M. Melo, M.G.R. Queiroz, A.M.C. Martins dan J.G. Machado-Neto. 2009. Larvicidal activity of water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 81(2): 207 – 216. <http://www.scielo.br/aabc>
- Gautam, K., P. Kumar dan S. Poonia. 2013. Larvicidal activity and GC-MS analysis of flavonoid of *Vitex negundo* and *Andrographis paniculata* against two vektor mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *J Vector Borne Dis* 50 September: 171 -178. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24220075/>.
- Hakim, MM & IC Patel. 2020. A review on phytoconstituents of marine brown algae. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 6:129-140. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00147-6>
- Hudaifah, I., Mutahimah, D., & Utami, A. F. (2020). Komponen Bioaktif dari *Euchema cottonii*, *Ulva lactuca*, *Halimeda opuntia*, dan *Padina australis*. *Jurnal Ilmu Perikanan*

- dan Kelautan*, Vol. 2(2): 63-70.
- Jha, B., Reddy, C. R., Thakur, M. C., & Rao, M. U. (2009). Seaweeds of India. *Developments in Applied Phycology*, 1-213.
- Kraemer, MUG, ME Sinka, KA Duda, AQN Mylne, FM Shearer, CM Barker, CG Moore, RG Carvalho, GE Coelho, WV Bortel, G Hendrickx, F Schaffner, IRF Elyazar, HJ Teng, OJ Brady, JP Messina, DM Pigott, TW Scott, DL Smith, GRW Wint, N Golding & SI Hay. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*. 4(e08347): 1-18. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26126267/>. DOI: 10.7554/eLife.08347
- Kumara, CJ, Nurhayani, RS Bestari & LM Dewi. 2021. Efektivitas Flavonoid, Tanin, Saponin dan Alkaloid terhadap Mortalitas Larva *Aedes aegypti*. The 13th University Research Colloquium 2021 Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Muhammadiyah Klaten. 106-118
- Lesmana, SD, E Maryanti, L Haslinda, A Jazila & Mislindawati. 2021. Resistensi *Aedes aegypti* Terhadap Insektisida: Studi pada Insektisida Rumah Tangga. *JIK*. 15(2): 63-68. <http://jik.fk.unri.ac.id/index.php/jik/article/view/261>.
- Maulana, S., F Musthofa, A Yamin, N Juniarti & A Putri. 2021. Pengaruh Biolarvasida Daun Tanaman Sebagai Kontrol Vektor Nyamuk *Aedes Aegypti* Penyebab Demam Berdarah: Literature Review. *Jurnal Medika Utama*. 02(03): 978-989. <http://jurnalmedikahutama.com>
- Meye, E.D., F. Kia Duan, S.R. Toly, V.M. Ati, F.M. Ike Septa, A.N. Momo & T. Hermanus. 2021. Uji efektivitas senyawa alkaloid dan tanin ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap mortalitas larva nyamuk (*Aedes aegypti*). *Jurnal Biotropikal Sains*. 18(1): 24 – 35
- Mourya, DT, MD Gokhale, TD Majumdar, PD Yadav, V Kumar & MS Mavale. 2018. Experimental Zika virus infection in *Aedes aegypti*: Susceptibility, transmission & co-infection with dengue & chikungunya viruses. *Indian J Med Res*. 147: 88-96. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5967223/>. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_1142_17
- Perangin-Angin, Y., Y Purwaningrum, Y Asbur, MS Rahayu & Nurhayati. 2019. Pemanfaatan kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman pada cekaman biotik. *Agriland*. 7(1):39-47. <https://jurnal.uisu.ac.id/index.php/agriland/article/download/3471/2388>
- Prasedya, ES., NWR Martyasari, R Apriani, S Mayshara, RA Fanani & H Sunarpi. 2019. Antioxidant activity of *Ulva lactuca* L. from different coastal locations of Lombok Island, Indonesia. *Proceedings of the 2nd International Conference on Bioscience, Biotechnology, and Biometrics*. <https://doi.org/10.1063/1.5141281>
- Sahayaraj, K., AC Asharaja, S Rajesh & JAM Rathi2. 2014. Qualitative and quantitative profiles of secondary metabolites of chosen Chlorophyta and Ochrophyta from Gulf of Mannor. *Cah. Biol. Mar*. 55 : 69-76
- Sanny, B. I., & Dewi, R. K. (2020). Pengaruh Net Interest Margin (NIM) Terhadap Return on Asset (ROA). *Jurnal E-Bis*, 4(1): 78-87.
- Septiawan, A., Emelda, & Husein, S. (2020). Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol Lidah Buaya (*Aloe vera* L.). *Inpharmmed Journal (Indonesian Pharmacy and Natural Medicine Journal)*, 4 (1): 11-24.
- Sholihah, M., H Nurchahyo & R Febriyanti. 2020. Analisis Fitokimia dan Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) dengan Berbagai Metode Pengeringan Simplisia. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKewiy->

[e97f32AhXR4nMBHdr2AKQQF noECAUQAQ&url=https%3A%2F%2Fperpustakaan.poltektegal.ac.id%2Findex.php%3Fp%3Dfstream-pdf%26fid%3D24683%26bid%3D4209806&usg=AOvVaw13TKHXenJphKyFgbZP-C9q](https://ejournal.undip.ac.id/index.php/jkli/article/download/10039/8000)

- Sucipto, PT., M Raharjo & Nurjazuli. 2015. Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Kejadian Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) Dan Jenis Serotipe Virus Dengue Di Kabupaten Semarang. *Jurnal Kesehatan Lingkungan Indonesia*. 14(2): 51-56. <https://ejournal.undip.ac.id/index.php/jkli/article/download/10039/8000>
- Susanti, & Suharyo. (2017). Hubungan Lingkungan Fisik Dengan Keberadaan Jentik Aedes Ada Area Bervegetasi Pohon Pisang. *Unnes Journal of Public Health*, 6(4): 271-276.
- Takaidza, S., F. Mtunzi & M Pillay. 2018. Analysis of the phytochemical contents and antioxidant activities of crude extracts from Tulbaghia species. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 38(2): 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2018.04.005>
- Taslisia, T., SR Rusjdi & Hasmiwati. 2018. Survei Entomologi, Maya Indeks, dan Status Kerentanan Larva Nyamuk Aedes aegypti terhadap Temephos. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2018; 7(1): 33-41. <http://jurnal.fk.unand.ac.id>.
- Utami, W. W., Ahmat, A. R., & Malik, A. (2016). Uji Aktivitas Larvasida Ekstrak Daun Jarak Kepyar (*Ricinus Communis L.*) Terhadap Larva Nyamuk Aedes aegypti. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 3(1): 141-154.
- Whankatte, VR & JS Ambhore. 2016. Phytochemical screening and Antioxidant Activity of *Ulva lactuca*. *International Journal of Current Research*. 8(09): 38265-38269. <http://www.journalcra.com>
- Widyantoro, W., Nurjazuli, & YH Darundiati. 2021. Pengendalian Demam Berdarah Dengue (DBD) Berbasis Masyarakat di Indonesia: Systematic Review. *Jurnal Ilmu Kesehatan Masyarakat*. 10 (3): 191-199. <http://journals.stikim.ac.id/index.php/jikm>
- Windyaswari, AS., Elfahmi, F Faramayuda, S Riyanti, OM Luthfi, IP Ayu, NTM Pratiwi, KHN Husna & R Maghfira. 2019. Profil fitokimia selada laut (*Ulva lactuca*) dan mikro alga filamen (*Spirogyra* sp) sebagai bahan alam bahari potensial dari perairan Indonesia. *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 7(2): 88-101. DOI: 10.26874/kjif.v7i2.288
- Yasi, RM & RS Harsanti. 2018. Uji daya larvasida ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap mortalitas larva *Aedes aegypti*. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*. 4 (3): 159 – 164. <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/JAMS/article/download/8710/5914>
- Yuniati, R., M Zainuri & H Kusumaningrum. 2020. Qualitative Tests of Secondary Metabolite Compounds in Ethanol Extract of *Spirulina platensis* from Karimun Jawa Sea, Indonesia. *Biosaintifika*. 12(3): 343-349. <https://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/biosaintifika/article/view/23153>
- Yunita, NLGD., LP Wrasati & L Suhendra. 2018. Karakteristik Senyawa Bioaktif Ekstrak Selada Laut (*Ulva lactuca L.*) Pada Konsentrasi Pelarut Etanol Dan Lama Ekstraksi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 6(3): 189-195. DOI: <https://doi.org/10.24843/JRMA.2018.v06.i03.p01>