

**UJI BIOKIMIA KERENTANAN *ANOPHELES ACONITUS* TERHADAP
INSEKTISIDA ORGANOFOSFAT (FENITROTHION) DAN KARBAMAT
(BENDIOCARB) DI KABUPATEN JEPARA**

Widiarti*, Sugeng Juwono Mardihusodo** dan Damar Tri Boewono*

ABSTRACT

***BIOCHEMICAL ASSAYS OF SUSCEPTIBILITY OF ANOPHELES ACONITUS TO
THE ORGANOPHOSPHATE (FENITROTHION) AND THE CARBAMATE
(BENDIOCARB) INSECTICIDES IN JEPARA REGENCY***

Organophosphate insecticide (fenitrothion) has been used in the vector control program on An. aconitus, the malaria vector, in Jepara Regency. However carbamate insecticides are recommended and used in many An. aconitus breeding sites (ricefield) for agricultural purposes. A large scale and continued applications of both insecticides can not control the target, because of various reasons such as reduced susceptibility or the development of vector resistance.

The objectives of this study are (1) to determine the susceptibility status of An. aconitus larvae to organophosphate (fenitrothion) and (2) to investigate the presence of two biochemical resistance mechanisms, possibly related to elevated esterase (non-specific esterase) and insensitive acetylcholinesterase.

This research is a quasi-experimental with the Post-test Only Control Group Design, which was done at 9 districts of Jepara Regency. The methods used were biochemical assays (microplate assays) for elevated esterase and insensitive acetylcholinesterase in mosquito larvae collected from the field, as well as those from the Vector and Reservoir Control Research Units (VRCRU) laboratory colony (control area). The biochemical tests were respectively cross checked with bioassays.

The results were analyzed with One Way ANOVA and indicated that there was a statistically significant difference between the susceptibility status of An. aconitus mosquito larvae collected from the study area (Jepara Regency) and the control area (VRCRU colony).

It can be concluded that An. aconitus mosquito larvae collected from the fields in Jepara Regency has shown reduced susceptibility to insecticides (fenitrothion) due to the elevated esterase rather than insensitive acetylcholinesterase.

Key words: An. aconitus – insecticide resistance – fenitrothion – insensitive acetylcholinesterase – non-specific esterase.

* Balai Penelitian Vektor dan Reservoir Penyakit, Puslitbang Ekologi Kesehatan Badan Litbang Kesehatan Jl. Hasanudin 123 Salatiga.

** Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

PENDAHULUAN

Kabupaten Jepara pada tahun 1998 termasuk tujuh kabupaten endemis malaria di Jawa Tengah, selain Purworejo, Banjarnegara, Wonosobo, Magelang, Pekalongan dan Kebumen¹⁾. Situasi malaria di Kabupaten Jepara dari tahun 1995 sampai tahun 1997 mengalami kenaikan yang sangat mencolok. Pada tahun 1995 *Annual Parasite Incidence* (API) adalah 0,55 per 1000 penduduk, meningkat menjadi 3,56 per 1000 penduduk pada tahun 1996 dan 3,61 per 1000 penduduk pada tahun 1997²⁾. Upaya pemberantasan penyakit malaria saat ini di samping pengobatan penderita juga dilakukan pengendalian terhadap vektornya.

Sejak tahun - 1983 pengendalian vektor di Kabupaten Jepara dilaksanakan secara kimiawi menggunakan insektisida organofosfat (fenitrothion) dan diprioritaskan pada daerah *High Case Incidence* (HCI)³⁾. Pengendalian vektor malaria *Anopheles aconitus* dilakukan secara *Indoor Residual Spraying* (IRS) dan mempunyai efek residu selama tiga bulan. Insektisida apabila digunakan secara terus menerus, dalam waktu cukup lama dan frekuensi tinggi, dapat menyebabkan terjadinya penurunan kerentanan pada nyamuk sasaran⁴⁾.

Keberhasilan dalam pengendalian tergantung kerentanan vektor terhadap insektisida yang digunakan. Deteksi kerentanan *An. aconitus*, vektor malaria utama di Jawa Tengah, terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion) secara hayati (*bioassay*) terakhir dilakukan pada tahun 1991. Uji kerentanan *An. aconitus* terhadap insektisida karbamat (bendiocarb) dilakukan pada tahun 1996 dan dilaporkan masih rentan terhadap kedua golongan insektisida tersebut⁵⁾. Namun demikian adanya penggunaan pestisida golongan organofosfat dan karbamat lain di bidang

pertanian secara intensif untuk pengendalian hama (Suyono, komunikasi pribadi) dapat memacu terjadinya penurunan kerentanan *An. aconitus* yang berkembang biak di sawah⁶⁾.

Penentuan status kerentanan spesies vektor secara berkala sangat diperlukan untuk mendapatkan data dasar deteksi lebih lanjut dan pemantauan terjadinya resistensi. Dengan demikian karakteristik potensial terjadinya resistensi dapat diketahui lebih awal untuk bahan pertimbangan dalam strategi pengendalian vektor⁷⁾.

Uji biokimia merupakan salah satu uji kerentanan serangga terhadap insektisida, di samping uji hayati (*bioassay*) yang telah dibakukan oleh WHO. Keunggulan uji biokimia dibandingkan dengan uji hayati adalah dapat digunakan untuk mengetahui mekanisme resistensi serangga terhadap insektisida secara individu. Diketuainya mekanisme resistensi yang berperan dapat membantu dalam meramalkan adanya *cross resistance spectrum* dan memudahkan pemilihan insektisida alternatif^{8,9)}. Deteksi kerentanan serangga saat ini lebih banyak diarahkan ke mekanisme enzimatis yang berhubungan dengan insektisida organofosfat dan karbamat. French Constant dan Bonning melaporkan bahwa dua mekanisme resistensi serangga terhadap insektisida organofosfat dan karbamat adalah peningkatan aktivitas enzim esterase nonspesifik dan insensitivitas asetilkolinesterase¹⁰⁾. Terbukti kedua mekanisme tersebut berperan dalam resistensi *An. nigerrimus*, *Cx. quinquefasciatus* dan *An. albimanus* di Srilanka dan Guatemala^{11,12)}. Oleh karena itu kedua mekanisme di atas digunakan sebagai dasar mendeteksi kerentanan *An. aconitus* di Jepara yang sudah tercemar insektisida organofosfat (fenitrothion) dan karbamat dari sektor pertanian.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui status kerentanan nyamuk *An. aconitus*, vektor malaria utama di Kabupaten Jepara, terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion) dan deteksi mekanisme penurunan kerentanan secara biokimia (peningkatan aktivitas enzim esterase nonspesifik dan insensitivitas asetilkolinesterase).

Diharapkan hasil penelitian dapat digunakan sebagai data dasar dan bahan pertimbangan dalam manajemen penggunaan insektisida selanjutnya, khususnya dalam pengendalian *An. aconitus* di Jepara.

BAHAN DAN CARA

BAHAN

Penelitian ini adalah eksperimen semu dengan rancangan penelitian *The Post-test Only Control Group Design*¹³⁾. Kelompok perlakuan adalah larva nyamuk *An. aconitus* ditangkap dari 9 kecamatan di Kabupaten Jepara. Kecamatan yang dipilih yaitu: 3 kecamatan yang termasuk dalam kategori *High Case Incidence* (Mlonggo II, Batealit dan Mayong I), 3 kecamatan kategori *Middle Case Incidence* (Bangsri III, Keling I dan Tahunan) dan 3 kecamatan kategori *Low Case Incidence* (Nalumsari, Pecangaan I dan Keling II). Kelompok pembanding adalah larva nyamuk *An. aconitus* hasil kolonisasi laboratorium Balai Penelitian Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga (BPVRP) generasi ke-130.

Penelitian dilaksanakan dalam dua tahap. Pertama yaitu pengumpulan nyamuk *An. aconitus* dari lokasi penelitian yang kemudian dipelihara di laboratorium BPVRP Salatiga sampai menjadi larva instar IV awal. Tahap berikutnya adalah uji biokimia di laboratorium Ilmu Kedokteran Tropis. Penelitian dilakukan selama bulan Maret – Mei 2000.

CARA PENELITIAN

1. Penangkapan nyamuk

Penangkapan nyamuk dilakukan di habitat aslinya (*resting place*) pada pagi hari dari pukul 05.00-08.00 WIB dan di sekitar kandang ternak pada pukul 22.00-24.00 WIB. Nyamuk *An. aconitus* betina kenyang darah (*fed*), *half gravid* dan *gravid* diidentifikasi menggunakan buku Reid kemudian dipelihara secara individual menjadi generasi pertama (F1)¹⁴⁾. Generasi pertama (F1) larva instar IV awal digunakan untuk uji biokimia. Uji biokimia yang dilakukan meliputi aktivitas enzim esterase nonspesifik dan insensitivitas asetilkolinesterase. Uji hayati (*bioassay*) juga dilakukan menurut standar WHO yang digunakan sebagai uji silang (*cross check*)⁷⁾.

2. Uji aktivitas enzim esterase nonspesifik berdasarkan metode Lee (1990)¹⁵⁾.

Larva nyamuk *An. aconitus* instar IV awal digerus secara individual untuk dibuat homogenat dan dilarutkan dengan 0,5 ml larutan *phosphate buffer saline* (PBS) 0,02 M, pH=7. Homogenat kemudian dipindahkan ke dalam mikroplat menggunakan mikropipet sebanyak 50 µl bahan substrat α -naftil asetat dalam acetone (6 g/l) dicampur dengan 50 ml buffer fosfat (0,02 M; pH=7) dan dibiarkan selama 60 detik. Selanjutnya pada setiap mikroplat ditambahkan 50 µl bahan *coupling reagent* berupa 150 mg garam *Fast Blue B* (*o-dianisidine, tetrazotized; sigma*) dalam 15 ml akuades dan 35 ml *aqueous* (5%;w/v) *sodium dodecyl sulfat* (*sigma*). Segera setelah reaksi berlangsung 10 menit, warna merah yang mula-mula timbul berangsur-angsur berubah menjadi biru. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl asam asetat 10% ke dalam tiap-tiap

mikroplat yang berisi homogenat. Intensitas warna akhir produk reaksi menggambarkan aktivitas enzim esterase nonspesifik dan tingkatannya dapat dibedakan secara visual. Aktivitas enzim secara kuantitatif kemudian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang (λ) 450 nm.

3. Uji insensitivitas asetilkolinesterase berdasarkan metode Peiris dan Hemingway (1990)¹⁶.

Larva nyamuk *An. aconitus* instar IV awal secara individu dibuat homogenat di dalam larutan 1 ml larutan *buffer phosphate* (PBS) 0,02 M; pH 7,0. Homogenat kemudian diencerkan dengan PBS pada perbandingan 1: 9. Homogenat diambil dengan mikropipet sebanyak 2 x 200 μ l (H1 & H2), kemudian masing-masing dipindahkan ke dalam sumur mikroplat. Pada sumur mikroplat yang telah diisi H1 ditambahkan 10 μ l insektisida karbamat atau bendiocarb (52,3 mg bendiocarb dalam 2,5 ml acetone + 7,5 ml PBS). Campuran H1 tersebut dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam sumur yang berisi H1 dan H2, masing-masing ditambahkan 25 μ l larutan asetilkolin-iodida (AsChI) 0,036 M (Sigma); sebagai substrat enzim asetilkolinesterase dan ditambahkan 20 μ l larutan 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid/DTNB) 0,01 M (Sigma); sebagai *coupling reagent*. Reaksi yang terjadi dibiarkan selama 60 menit. Intensitas warna kuning yang muncul kemudian menunjukkan reaksi positif (resisten). Densitas warna kemudian dibaca dengan ELISA reader pada $\lambda=405$ nm.

4. Interpretasi data

Data uji biokimia berupa intensitas warna hasil reaksi aktivitas

enzim esterase nonspesifik bersifat kualitatif (skor warna) ditetapkan menurut kriteria empiris Lee (1990)¹⁵, yaitu: skor < 2,0 (tidak berwarna) = sangat rentan (SS); 2,0-2,5 (biru muda) = resisten sedang (RS); 2,6-3,0 (biru tua) = resisten tinggi (RR).

Data uji biokimia insensitivitas asetilkolinesterase berupa intensitas warna hasil reaksi enzimatis bersifat kualitatif ditetapkan menurut Peiris dan Hemingway¹⁶. Apabila reaksi berwarna kuning menggambarkan nyamuk sudah resisten, sedangkan tidak berwarna nyamuk masih rentan.

Data uji biokimia intensitas warna aktivitas enzim esterase nonspesifik dan insensitivitas asetilkolinesterase secara kuantitatif diukur dengan pembacaan *absorbance value* (AV) menggunakan ELISA reader pada $\lambda=450$ nm dan 405 nm. Nilai AV < 0,700 (sangat rentan/SS); AV = 0,700-0,900 (resisten sedang/RS); AV > 0,900 (resisten tinggi/RR).

Data hasil penelitian dianalisis dengan uji statistik *One Way ANOVA*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji biokimia aktivitas enzim esterase nonspesifik (yang menghidrolisis substrat α -naftil asetat) larva *An. aconitus* secara kualitatif dengan skor warna terdapat perbedaan skor antara lokasi penelitian dengan laboratorium BPVRP. (Tabel 1). Pada tabel tersebut terlihat bahwa pada tiga kecamatan HCI (Mlonggo II, Batealit dan Mayong I) rerata skor masing-masing 2,2; 2,0 dan 2,0. Status kerentanan *An. aconitus* pada ketiga kecamatan tersebut sudah resisten sedang (RS). Rerata skor pada tiga kecamatan MCI yaitu (Kecamatan Bangsri III,

Kecamatan Keling I dan Kecamatan Tahunan) masing-masing sebesar 2,1; 1,1 dan 0,3. Dengan demikian hanya di Kecamatan Bangsri III kerentanan *An. aconitus* sudah resisten sedang, sedangkan dua kecamatan yang lain masih rentan. Rerata skor tiga kecamatan LCI (Kecamatan Nalumsari, Kecamatan Pecangaan I dan Kecamatan Keling II) dan laboratorium BPVRP Salatiga masing-masing 1,1; 0,2, 0,2 dan 1,2. Hasil rerata

skor tersebut menunjukkan bahwa *An. aconitus* di tiga kecamatan LCI dan laboratorium BPVRP masih rentan. Hasil uji biokimia kualitatif (Tabel 1) tersebut dianalisis dengan uji *One Way* ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada status kerentanan *An. aconitus* dari sembilan kecamatan di Kabupaten Jepara dengan koloni laboratorium BPVRP Salatiga dengan nilai $p < 0,05$.

Tabel 1. Status Kerentanan Larva Nyamuk *An. aconitus* Berdasarkan Aktivitas Enzim Esterase nonspesifik (substrat α -naftil asetat) Diamati dengan Skor Warna, Menurut Kecamatan di Kabupaten Jepara, Maret – Mei 2000.

Lokasi penelitian menurut wilayah kecamatan	Jumlah		Skor hasil uji biokimia (*)			Rerata Skor	Status Kerentanan
	Larva uji	Replikat	% Rentan	% Resisten Sedang	% Resisten Tinggi		
HCI							
1. Mlonggo II	70	140	1,4 (70)	2,3 (17,1)	2,9 (12,9)	2,2 ^a	RS
2. Batealit	70	140	1,4 (74,3)	2,2 (20,0)	2,6 (5,7)	2,0 ^a	RS
3. Mayong I	68	136	1,3 (86,8)	2,1 (8,9)	2,7 (4,4)	2,0 ^a	RS
MCI							
1. Bangsri III	70	140	1,1 (62,8)	2,2 (8,6)	3,0 (28,6)	2,1 ^a	RS
2. Keling I	70	140	1,2 (78,6)	2,1 (21,4)	0	1,1 ^b	SS
3. Tahunan	70	140	0,9 (100)	0	0	0,3 ^b	SS
LCI							
1. Nalumsari	65	130	1,3 (91,7)	2,0 (8,3)	0	1,1 ^b	SS
2. Pecangaan I	69	138	0,8 (100)	0	0	0,2 ^b	SS
3. Keling II	65	130	0,8 (100)	0	0	0,2 ^b	SS
Kab. Jepara	617	1234	1,1 (84,9)	2,1 (9,4)	2,8 (5,7)	2	RS
Lab BPVRP (Pembanding)	80	160	1,2 (100)	0	0	1,2 ^b	SS

Keterangan:

(*) Status kerentanan larva *An. aconitus* hasil uji biokimia :

- 1. Rentan (SS) : Rerata skor < 2,0 : tidak berwarna
- 2. Resisten Sedang (RS) : Rerata skor 2,0 – 2,5 : biru muda
- 3. Resisten Tinggi (RR) : Rerata skor 2,6 – 3,0 : biru tua

Angka rerata skor yang diikuti huruf berbeda adalah berbeda nyata pada uji ANOVA $P < 0,05$.

Analisis lanjutan *Least Significancy Different* (LSD) menunjukkan bahwa tiga kecamatan HCI yaitu Mlonggo II, Batealit dan Mayong I serta kecamatan MCI Bangsri III berbeda bermakna dengan 5 kecamatan yang lain dan koloni BPVRP Salatiga. Keadaan ini menggambarkan bahwa *An. aconitus* dari Kecamatan Mlonggo II, Batealit dan Mayong I serta Kecamatan Bangsri III sudah menurun kerentanannya terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion).

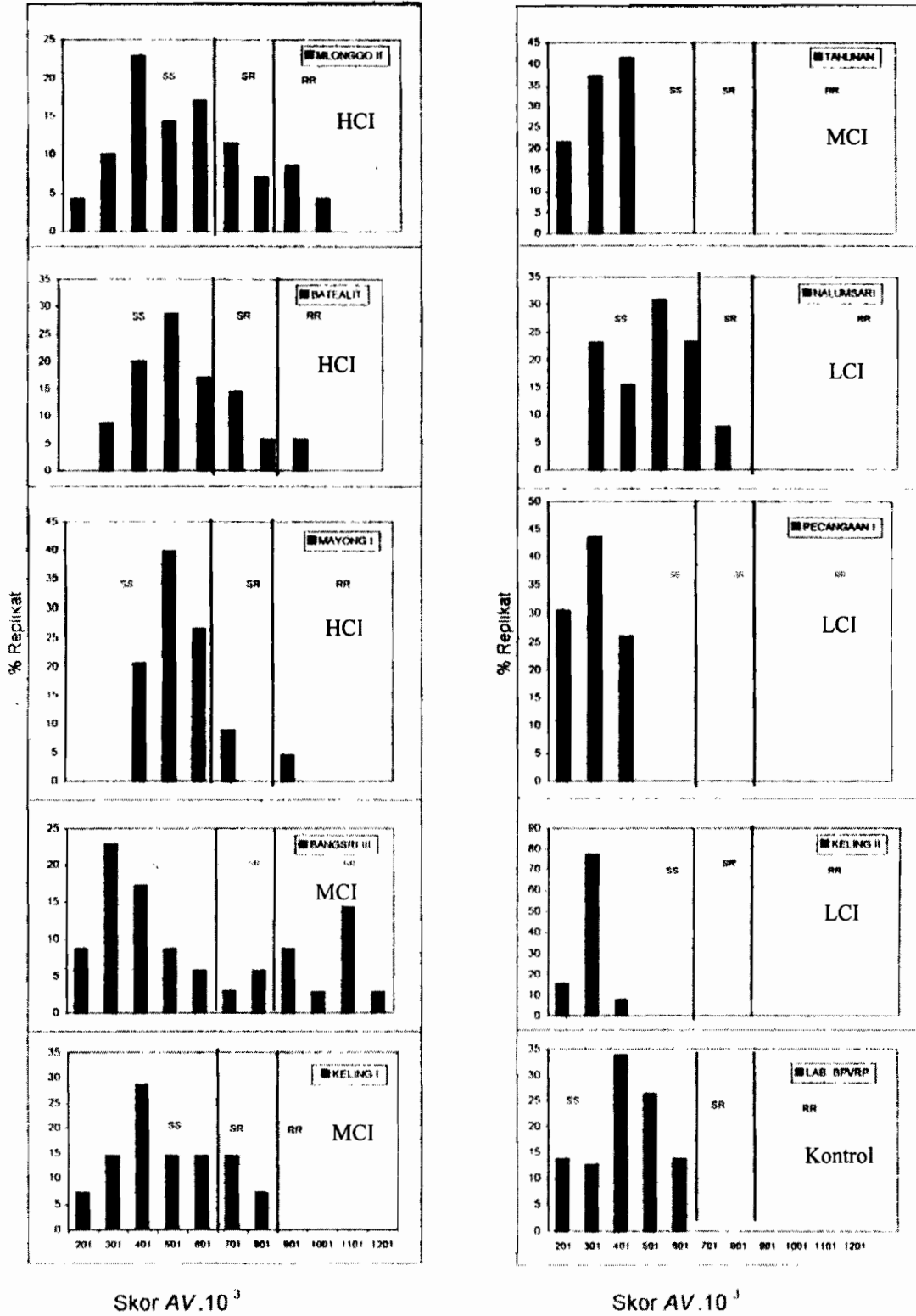
Uji biokimia aktivitas enzim esterase nonspesifik yang menghidrolisis substrat α -naftil asetat secara kuantitatif dibaca dengan ELISA reader pada $\lambda = 450$ nm. Hasil pembacaan dengan ELISA reader memperoleh kisaran AV yang berbeda dan sangat bervariasi terhadap lokasi penelitian. Pola kisaran AV yang menggambarkan status kerentanan larva nyamuk *An. aconitus* di sembilan kecamatan di Kabupaten Jepara dan koloni laboratorium BPVRP Salatiga dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa kisaran AV pada tiga kecamatan HCI dan satu kecamatan MCI (Bangsri III) sudah sampai pada tingkat resisten tinggi ($AV > 0,900$). Satu Kecamatan MCI dan satu Kecamatan LCI yaitu Keling I dan Nalumsari, sudah sampai tingkat resisten sedang ($AV = 0,700 - 0,900$). Sedangkan satu kecamatan MCI (Tahunan), dua kecamatan LCI (Pecangaan I dan Keling II) serta laboratorium BPVRP Salatiga AV masih pada kisaran rentan ($AV < 0,700$).

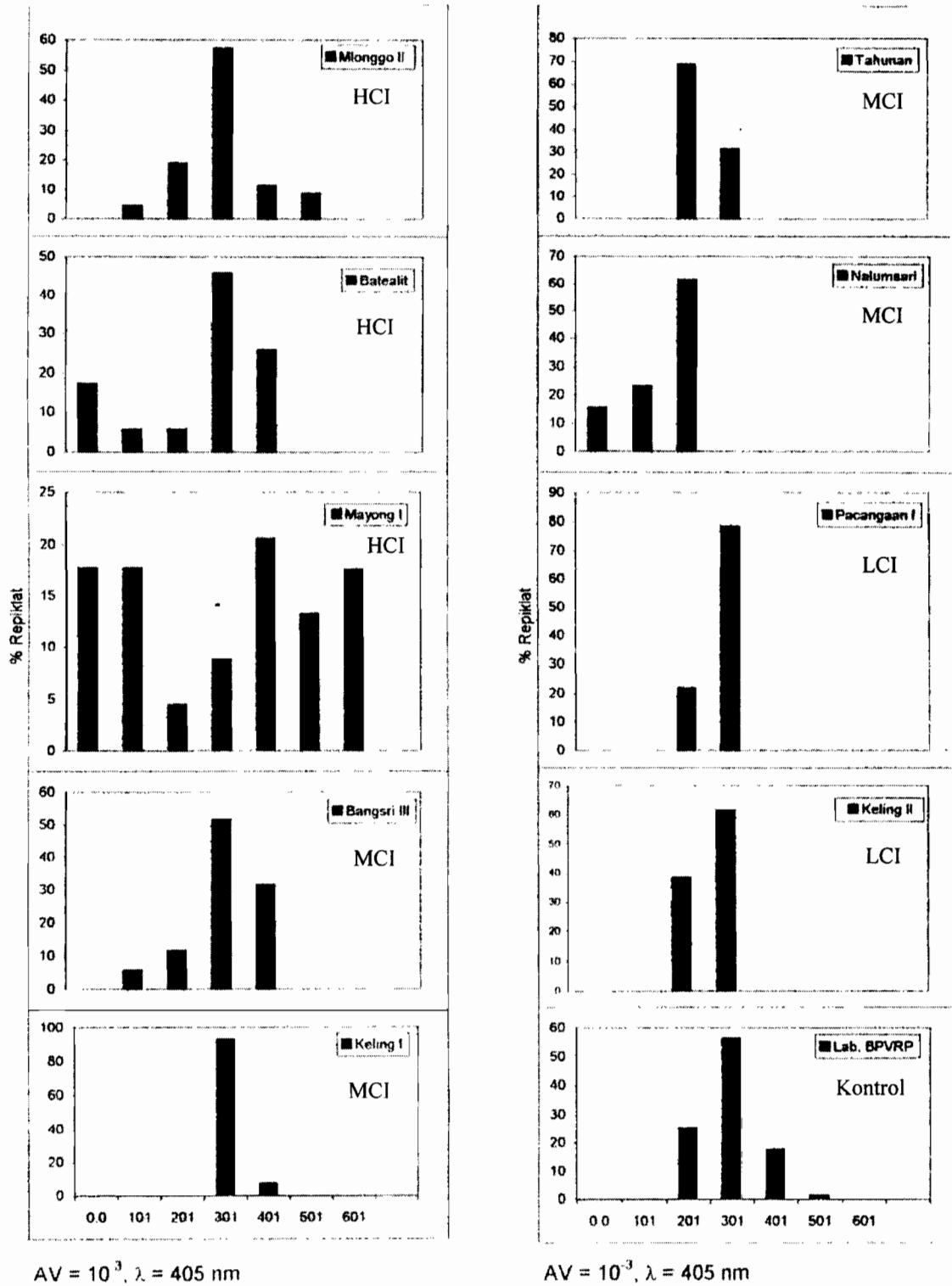
Seperti diketahui bahwa esterase nonspesifik merupakan enzim penting untuk detoksifikasi insektisida, sehingga

menyebabkan serangga resisten¹⁷⁾. Peningkatan esterase berhubungan dengan warna yang dihasilkan oleh karena hidrolisis substrat (α -naftil asetat). Peningkatan aktivitas esterase nonspesifik pada penelitian ini menunjukkan bahwa hidrolisis substrat α -naftil asetat sangat nyata. Pada *An. albimanus*, warna yang terbentuk disebabkan oleh hidrolisis β -naftil asetat menjadi β -naphthol dan asam asetat¹⁸⁾. Pada nyamuk *Culex quinquefasciatus* dari Sri Lanka, insektisida fenitrothion dimetabolisme lebih cepat daripada malathion dan esterase mampu menghidrolisis substrat baik α -naftil asetat maupun β -naftil asetat¹⁹⁾. Jadi pada nyamuk ditemukan dua tipe enzim esterase; (1) menghidrolisis α -naftil asetat dan esterase; (2) menghidrolisis β -naftil asetat, yang masing-masing disandi pembentukannya oleh gen yang berbeda yaitu Esterase II dan Esterase III²⁰⁾. Secara molekuler peningkatan enzim esterase nonspesifik pada strain resisten karena adanya amplifikasi gen yang menyandi enzim esterase (esterase α -2 dan esterase β -2)²¹⁾. Fournier *et al.* (1992) mengatakan bahwa peningkatan esterase terjadi karena amplifikasi dan *over* transkripsi gen, dan lebih dari 250 *copy* gen yang menyandi enzim esterase²²⁾.

Hasil uji biokimia insensitivitas asetilkolinesterase secara kualitatif tidak terjadi perubahan warna kuning, sehingga memberikan gambaran bahwa *An. aconitus* masih rentan. Uji biokimia insensitivitas asetilkolinesterase secara kualitatif yang dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang $\lambda = 405$ nm, menghasilkan kisaran (AV) masih di bawah 0,700 (Gambar 2).



Gambar 1. Pola Penyebaran, Status Kerentanan Larva Nyamuk *An. aconitus* dari Tiga Kecamatan HCI, Tiga Kecamatan MCI, Tiga Kecamatan LCI di Kabupaten Jepara dan Laboratorium BPVRP Salatiga pada Berbagai Internal AV yang Diukur dengan Substrat α -naftil asetat (Maret--Mei 2000).



Gambar 2. Pola Penyebaran, Aktivitas Enzim Asetilkolinesterase (AChE) Berdasarkan Absorbance Value (AV) pada Larva Nyamuk *An. aconitus* dari Lokasi Penelitian (Kabupaten Jepara) dan Kontrol (Laboratorium BPVRP) Salatiga, dengan Substrat AsChI + Inhibitor yang Diukur dengan Elisa Reader $\lambda = 405$ nm.

Nilai AV masih dibawah 0,700 menggambarkan bahwa *An. aconitus* dari tiga Kecamatan HCI (Mlonggo II, Batealit dan Mayong I); tiga kecamatan MCI (Bangsri III, Keling I dan Tahunan) serta tiga kecamatan LCI (Nalumsari, Pecangaan I dan Keling II) juga laboratorium BPVRP Salatiga masih rentan.

Uji biokimia insensitivitas asetilkolinesterase (AChE) merupakan salah satu cara untuk mengetahui mekanisme terjadinya penurunan status kerentanan atau resistensi serangga terhadap insektisida organofosfat dan karbamat. Insensitivitas asetilkolinesterase dapat diketahui dengan mengukur aktivitas enzim secara visual. Aktivitas enzim tersebut ditandai dengan bertambahnya intensitas warna kuning yang secara kuantitatif dapat diukur dengan ELISA reader berdasarkan AV pada $\lambda = 405$ nm. Penelitian uji insensitivitas AChE larva nyamuk *An. aconitus* dari 9 kecamatan (3 kecamatan HCI, 3 kecamatan MCI dan 3 kecamatan LCI) di Kabupaten Jepara dan dari koloni BPVRP Salatiga, tidak terjadi perubahan warna kuning. Hasil uji hayati dengan menggunakan insektisida bendiocarb (karbamat) menunjukkan kematian larva nyamuk *An. aconitus* 100%.

Tidak timbulnya warna kuning pada nyamuk yang masih rentan (*susceptible*), disebabkan tidak terjadi hidrolisis asetilkolin iodide (AsChI) sebagai substrat. Hidrolisis tidak terjadi karena enzim asetilkolinesterase mengikat bendiocarb (sebagai *inhibitor*) secara kovalen pada tapak aktif. Seperti diketahui bahwa kolinesterase mengandalkan hidrolisis dari asetilkolin, yaitu *neurotransmitter* yang dihasilkan oleh vesikel-vesikel pada akson dekat celah sinaptik. Asetilkolin merupakan

penghantar impuls pada celah sinaptik (komponen essensial dalam transmisi impuls pada sistem saraf mamalia dan serangga). Setelah impuls dihantarkan, asetilkolin oleh kolinesterase dihidrolisis menjadi kolin. Dalam keadaan tidak terdapat kolinesterase, asetilkolin yang dihasilkan berakumulasi sehingga terjadi gangguan transmisi impuls yang menyebabkan menurunnya koordinasi otot-otot, konvulsi dan kematian serangga^{23,24,25}). Sebaliknya pada larva nyamuk yang sudah resisten, AsChI (substrat) dihidrolisis oleh enzim asetilkolinesterase (pada larva nyamuk) untuk menghasilkan thiocholin yang akan bereaksi dengan *dithiobis-nitrobenzoic acid* (DTNB) sebagai *coupling reagent* sehingga terjadi warna kuning²⁵).

Pada *strain* resisten, tapak aktif enzim asetilkolinesterase mengalami modifikasi struktur, sehingga kurang sensitif. Secara molekuler menurut Fournier *et al.* (1992) terjadi mutasi gen (*point mutation*) atau terjadi substitusi basa T pada basa A yang menghasilkan perubahan dari *phenylalanine* menjadi *tyrosine* pada posisi 368 dari sekuen gen Ace²²). Demikian juga dari hasil pengamatan secara kuantitatif dengan ELISA reader pada $\lambda = 405$ nm, diperoleh pola penyebaran aktivitas AChE dengan AV yang masih di bawah 0,700, baik pada homogenat yang ditambahkan bendiocarb sebagai *inhibitor* maupun homogenat tanpa *inhibitor*. Dengan demikian mekanisme insensitivitas AChE tidak berperan dalam penurunan status kerentanan atau *An. aconitus* masih rentan terhadap insektisida karbamat.

Tidak ditemukannya mekanisme penurunan sensitivitas AChE pada penelitian ini, kemungkinan karena penekanan secara selektif insektisida

golongan karbamat terhadap larva *An. aconitus* di sawah (tempat perindukan) tidak ada. Hal ini diperkuat oleh kenyataan bahwa meskipun di bidang pertanian dianjurkan digunakan karbamat, namun dalam kenyataannya selama penulis melakukan pengamatan di lapangan petani cenderung menggunakan insektisida golongan lain yaitu *pyrethroid* (*Decis*) untuk mengendalikan hama pertanian di sawah.

Mekanisme penurunan sensitivitas AChE ini ditemukan pada penelitian lain di bidang kesehatan maupun pertanian. Pada serangga kesehatan *Musca domestica*, *An. nigerrimus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *An. albimanus* dan serangga pertanian *Bemisia tabaci* dominan ditemukan tipe mekanisme ini, karena penekanan selektif benar-benar akibat penggunaan insektisida golongan karbamat^{26,27}. Namun apabila di sawah tidak digunakan insektisida karbamat seperti juga di Jepara, jarang ditemukan mekanisme ini seperti yang terjadi pada populasi nyamuk *An. sacharovi* dari Turki²⁸.

Tempat perindukan *An. sacharovi* juga di sawah yang sebelumnya dilaporkan telah resisten terhadap DDT dan *dieldrin*. Pada *An. sacharovi* tersebut mekanisme yang berperan dalam penurunan status kerentanan adalah peningkatan aktivitas enzim *glutathion S-transferase* yang dominan. Penekanan melalui tipe mekanisme insensitivitas AChE sebaiknya dihindari jika mungkin, sebab dapat menimbulkan *cross resistance* skala luas sehingga secara drastis membatasi pemilihan dalam penggantian insektisida di kemudian hari⁹. Seperti diketahui bahwa asetilkolin merupakan target insektisida baik karbamat maupun organofosfat, sehingga apabila terjadi insensitivitas AChE tidak saja resisten terhadap karbamat tetapi juga organofosfat⁹.

Memperhatikan *An. aconitus* di Kabupaten Jepara yang berkembang biak di sawah juga telah dilaporkan resisten terhadap DDT dan *dieldrin*, maka perlu dilakukan juga penelitian adanya *cross resistance* terhadap golongan insektisida lain yaitu *pyrethroid*. Menurut Hemingway (1997) *cross resistance* akan terjadi dari golongan *organochlorin* (DDT dan *dieldrin*) ke golongan *pyrethroid*⁶. Pada saat ini insektisida golongan *pyrethroid* banyak digunakan petani di Kabupaten Jepara. Telah diketahui pula bahwa DDT sangat persisten (sulit terurai di alam/sawah), sehingga kemungkinan terjadi *cross resistance* sangat besar. Hasil uji hayati yang dilakukan Barodji dkk. (2000) terhadap *Anopheles sp* memperkuat dugaan bahwa *cross resistance* mungkin terjadi oleh karena *Anopheles* yang berkembang biak di sawah 67,5% mati dengan insektisida permethrin 0,25%²⁹. Kematian *Anopheles sp* 67,5% menurut Herath dikategorikan telah resisten menurut standar WHO³⁰.

Uji hayati larva *An. aconitus* instar IV awal dengan dosis diagnostik fenitrothion 0,125 mg/l pada tiga kecamatan HCI menghasilkan kematian berturut-turut dari Kecamatan Mlonggo II sebesar 90%, Kecamatan Batealit 92% dan Kecamatan Mayong I 94%. Kematian *An. aconitus* dari tiga kecamatan MCI masing-masing: Kecamatan Bangsri III sebesar 89%, Kecamatan Keling I 98% dan Kecamatan Tahunan 100%. Tiga kecamatan LCI masing-masing yaitu Kecamatan Nalumsari sebesar 98%, Kecamatan Pecangaan I 100% dan Kecamatan Keling II juga 100%.

Uji hayati *An. aconitus* dengan dosis diagnostik bendiocarb 0,0125 mg/l dari 10 lokasi penelitian semuanya menghasilkan kematian 100% (Tabel 2).

Tabel 2. Uji Hayati Larva *An. aconitus* dengan Dosis Diagnostik Fenitrothion 0,125 mg/l* (Organofosfat) dan Bendiocarb 0,0125 mg/l* (Karbamat).

Lokasi penelitian menurut Kecamatan	Fenitrothion 0,125 mg/l		Bendiocarb 0,0125 mg/l	
	Jumlah (%) larva mati	Status kerentanan	Jumlah (%) larva mati	Status kerentanan
HCI				
1. Mlonggo II	90	RS	100	SS
2. Batealit	92	SS	100	SS
3. Mayong I	94	SS	100	SS
MCI				
1. Bangsri III	89	RS	100	SS
2. Keling I	98	SS	100	SS
3. Tahunan	100	SS	100	SS
LCI				
1. Nalumsari	98	SS	100	SS
2. Pecangaan I	100	SS	100	SS
3. Keling II	100	SS	100	SS
Lab. BPVRP	100	SS	100	SS

Keterangan :

Jumlah (%) kematian

> 90% = Rentan (SS)

50-90% = Toleran (RS)

< 50% = Resisten (RR)

* Dosis fenitrothion (0,125 mg/l) dan bendiocarb (0,0125 mg/l) ⁸.

Berdasarkan hasil uji hayati tersebut di atas menggambarkan bahwa sudah terjadi penurunan kerentanan *An. aconitus* terhadap insektisida fenitrothion (organofosfat). Sedangkan terhadap insektisida bendiocarb (karbamat) *An. aconitus* dari lokasi penelitian semuanya masih rentan.

Hasil uji hayati terlihat bahwa pada populasi *An. aconitus* di Kecamatan Batealit dan Mayong I terdapat perbedaan status kerentanan. Hasil uji hayati masih rentan (SS), sedangkan hasil uji biokimia *An. aconitus* sudah toleran/resisten sedang. Adanya perbedaan kerentanan ini kemungkinan disebabkan pada uji hayati larva dipaksakan untuk terpapar sehingga

kematian tinggi yang menyebabkan status rentan. Kemungkinan yang lain kondisi fisiologi nyamuk yang belum adaptif dengan kondisi laboratorium sehingga dihasilkan kematian tinggi yang menyebabkan adanya perbedaan kerentanan. Hal demikian juga terjadi pada penelitian *An. albimanus* di Mexico, yang ternyata hasil uji secara biokimia tidak konsisten dengan hasil uji hayati ²⁵⁾. Hemingway dan Smith (1986) menyatakan bahwa penekanan selektif terjadinya penurunan kerentanan dapat terjadi pada saat nyamuk berada pada stadium larva maupun dewasa ⁹⁾. Menurut Davidson dan Zahar (1973) kematian uji hayati 80% - 98% perlu dilakukan verifikasi akan status kerentanannya secara biokimia, walaupun menurut kriteria WHO

masih rentan³¹⁾. Perbedaan status kerentanan antara uji hayati dengan uji biokimia pada Kecamatan Batealit dan Kecamatan Mayong I, masih berkaitan dengan paparan insektisida fenitrothion⁶⁾. Beberapa pakar entomologi mengatakan bahwa uji biokimia lebih sensitif dan spesifik. Menurut Barodji dkk. (2000) uji hayati yang dilakukan menunjukkan bahwa nyamuk *An. aconitus* di Kecamatan Mlonggo II, Batealit dan Bangsri III masih peka terhadap insektisida fenitrothion dengan kematian 100%²⁹⁾. Pada penelitian ini dengan uji biokimia secara umum kerentanan *An. aconitus* di Kabupaten Jepara sudah toleran (RS) dan dengan uji hayati di Kecamatan Mlonggo II, Kecamatan Batealit, Kecamatan Mayong I dan Kecamatan Bangsri III masing-masing dengan kematian 90%, 92%, 94% dan 89%. Dengan demikian hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kerentanan nyamuk *An. aconitus* terhadap insektisida fenitrothion (organofosfat) cenderung menurun.

KESIMPULAN

Hasil penelitian kerentanan *An. aconitus* terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion) dan karbamat (bendiocarb) secara biokimia dan uji hayati (*bioassay*) dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Uji biokimia kerentanan nyamuk *An. aconitus* sudah menurun terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion) melalui mekanisme peningkatan aktivitas enzim esterase nonspesifik yang menghidrolisis substrat α -naftil asetat.
2. Uji hayati kerentanan nyamuk *An. aconitus* terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion) di daerah HCI (Kecamatan Mlonggo II, Batealit dan Mayong I) menurun sebesar 8% dan di daerah MCI (Kecamatan

Bangsri III) penurunan sebesar 11%. Belum terjadi penurunan kerentanan terhadap insektisida karbamat (bendiocarb) disemua daerah penelitian di Kabupaten Jepara.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada: WHO dan Pusdiknakes yang telah memberikan dana penelitian, Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Jepara beserta staf atas izin dan bantuan selama penulis melakukan penelitian, laboratorium Ilmu Hayati dan laboratorium Ilmu Kedokteran Tropis Universitas Gadjah Mada atas segala fasilitas yang diberikan selama penelitian ini, serta semua pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat berjalan lancar.

DAFTAR RUJUKAN

1. Kanwil Depkes Prop. Jawa Tengah (1998). Analisa Situasi Malaria Pelita VI. Kanwil Depkes Prop. Jawa Tengah, Semarang.
2. Dinkes, Jepara (1998). Laporan Hasil Kegiatan Program Intensifikasi P2M Kabupaten Jepara Tahun 1997/1998. Dinas Kesehatan Kabupaten Daerah Tingkat II Jepara. 22 hal.
3. Depkes, R.I. (1997). Malaria Pelita VI. Suatu Tinjauan oleh Pokja Ditjen PPM & PLP dan WHO Indonesia.
4. WHO Study Group (1995). Vector Control For Malaria and Other Mosquito-Borne Diseases. WHO *Technical Report Series*. No. 857. WHO. Geneva. 91 p.
5. Bahang, Z.B., P.D., Pitojo, F.J. Laihat and Barodji (1997). Insecticide Uses in Public Health and Other Sectors (1990-1996) and Insecticide Resistent Status in Mosquito Vectors (1985-1996) in Indonesia, Paper Intercountry Workshop on Insecticide Resistance of Mosquito Vectors, Salatiga Indonesia.
6. Hemingway, J. (1997). Insecticide Resistance Mechanisms and Cross Resistance Implications. Intercountry Workshop on Insecticide Resistance of Mosquito Vectors. Salatiga Indonesia 5-8 August. 8 p.
7. WHO (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides WHO/VBC/81.807.

8. WHO Expert Committee on Vector Biology and Control (1992). Vector Resistance to Pesticide. WHO. *Technical Report Series*. No. 818. Geneva. 62 p.
9. Hemingway, J. and C. Smith (1986). Field and Laboratory Detection of the Altered Acetylcholinesterase Resistance Genes Which Confer Organophosphate and Carbamate Resistance in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bulletin. Entomological Research*. 76. 559 – 565.
10. French - Constant, R.H. and B.C. Bonning (1989). Rapid Microplate Test Distinguishes Insecticide Resistant Acetylcholinesterase Genotypes in The Mosquitoes *Anopheles albimanus*, *An. nigerimus* and *Culex pipien*. *Medical & Veterinary Entomology*. 3 : 9-16.
11. Hemingway, J., K. G. I., Jayawardena and P.R.J. Herath (1986). Pesticide Resistance Mechanisms Produced by Field Selection Pressures on *Anopheles nigerrimus* and *An. culicifacies* in Sri Lanka. *Bulletin. World. Health. Organization*. 64 (5) ; 753-758.
12. Brogdon, W.G., R.F. Beach; J.M., Stewart and L. Castanaza (1988). Microplate Assay Analysis of the Distribution of Organofosphate and Carbamate Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Bulletin of The World Health Organization*. 66. (3) : 339-346.
13. Cambell, D.T., and Stanley, J.C. (1966). *Experimental and quasi experimental design for research*, Ron Mc. Nally College Publishing Co., Chicago.
14. Reid, J.A. (1968). *Anopheles mosquitoes of Malaya and Borneo*. Studies from the Institute for Medical Research Malaysia, No. 31. Kuala Lumpur Malaysia. 320-325.
15. Lee, H.L. (1990). A Rapid and Simple Biochemical Method For The Detection of Insecticide Resistance Due to Elevated Esterase Activity in *Culex quinquefasciatus*. *Tropical Biomedicine*. 7: 21-26.
16. Peiris. H.T.R., and J. Hemingway (1990). Mechanisms of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Langka. *Bulletin of Entomological Research*. 80, 453-457.
17. Yasutomi, K. (1976). Role of detoxication esterase in insecticide resistances in G.P. Georghiou & T. Saiti (ed) : *Pest Resistance To Pesticide*, Plenum Press, New York.
18. Beach, R.F., W.G. Brogdon; L.A. Castanaza; C. Cordon-Rosales; and M. Calderon (1989). Effect of Temperature on an Enzyme Assay to Detect Fenitrothion Resistance in *Anopheles albimanus* Mosquitoes. *Bulletin of the World Health Organization*, 67. (2) : 203-208.
19. Peiris, H.T.R., and J. Hemingway (1993). Characterization and Inheritance of Elevated esterases in Organophosphorus and Carbamate Insecticide Resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) from Sri Lanka. *Bulletin of Entomological Research*. 83. 127-132.
20. Tarumingkeng, R.C. (1989). Pengantar Toksikologi Insektisida. Fakultas Pasca Sarjana IPB. Bogor. hal 193-194.
21. Parakrama, K; S.H.P., J. Hemingway; K.G.I., Jayawardena; V. Dassanayaka and A. Vaughan (1995). Kinetic and Molecular Differences in The Amplified and Non-Amplified Esterases from Insecticide Resistant and Susceptible *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes. *The Journal of Biological Chemistry*. 270. 52. pp 31124-31128.
22. Fournier, D; J.M. Bride; F. Hoffmann and F. Karch (1992). Acetylcholinesterase, two types of modifications confer resistance to insecticide. *The Journal of Biological Chemistry*. 267.20. pp 14270-14274.
23. O'Brien, R.D. (1971). *Insecticides: Action and Metabolism*. Academic Press, New York. 332 pp.
24. Morris, R. (1978). *Biochemistry of Insects* Academic Press. New York San Francisco London p.572.
25. Cordon - Rosales, C; R.F. Beach and W.G. Brogdon (1990). Field Evaluation of Methods Estimating Carbamate Resistance in *Anopheles albimanus* Mosquitoes From a Microplate Assay for Insensitive Acetylcholinesterase. *Bulletin of the World Health Organization*. 68 (3) : 323 – 329.
26. Mores, G.D., A.L. Devonshire . and I, Denholm (1988). A Microtitre Plate Assay for Characterizing in Sensitive Acetylcholinesterase Genotypes of Insecticide – Resistant Insects. *Bulletin Entomological Research*. 78. 537 – 544.
27. Byrne, F. J.; M, Cahill; I, Denholm and A. L., Devonshire (1994). A Biochemical and Toxicological Study of The Role of Insensitive Acetylcholinesterase in Organophosphate Resistant *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) from Israel. *Bulletin of Entomological Research*. 84 179-184.
28. Hemingway, J., G.J. Small, A. Monro, B.V. Sawyer and H. Kasap (1992). Insecticide resistance gene frequencies in *Anopheles sacharovi* populations of the Cukurova plain, Adana Province, Turkey. *Medical and Veterinary Entomology* 6,342 - 348.
29. Barodji, H, Suwasono dan H. Boesri (2000). Monitoring Resistensi Vektor Malaria Terhadap Insektisida Yang Digunakan Program P2M di Daerah Endemis Malaria di Jawa dan Bali. Laporan Akhir Penelitian Rutin Balai Penelitian Vektor Tahun Anggaran 1999/2000.
30. Herath, P.R.J. (1997). Insecticide Resistance Status in Disease Vectors and its Practical Implications Intercountry Workshop on Insecticide Resistance of Mosquito Vectors. Salatiga Indonesia 5-8 August. 25 p.
31. Davidson, G . and A.R. Zahar (1973). The Practical Implications of Resistance of Malaria Vectors to Insecticides. *Bulletin World Health Organization*. 49. 475-483.