

PENENTUAN STATUS RESISTENSI *Aedes aegypti* DARI DAERAH ENDEMIS DBD DI KOTA DEPOK TERHADAP MALATHION

Roy Nusa¹, Mara Ipa¹, Titin Delia¹ dan Marliah Santi¹

¹ Loka Litbang P2B2 Depkes R.I. Ciamis

DETERMINATION of Aedes aegypti RESISTANCE STATE FROM DHF ENDEMIC AREA IN DEPOK TO MALATHION

Abstract. *The mosquito Aedes aegypti is the primary vector of Dengue haemorrhagic fever throughout the tropical countries. As present, this species is known to be resistant to several insecticides, causing problems in the control of the disease. To gain knowledge on insecticide resistance mechanism may help to solve the problems of insecticide resistance of the vector in the future. Chemical insecticides have been widely used in Depok city for several years to mosquitoes control. Malathion was employed as the main insecticide for DHF vector control until pyrethroids were introduced in decade 1990. This exposes mosquito populations to an intense selection pressure can result resistance to insecticides. To determine the extent of this resistance, the susceptibility of Ae. aegypti from endemic area in Depok city to malathion was evaluated. Biochemical and susceptibility test to determine the susceptibility of Ae. aegypti to malathion had been conducted from Depok city. The technique standardized by the World Health Organization for tests with insecticides was used. The objectives of this study were to determine the susceptibility status of Ae. aegypti from Depok city by susceptibility test and biochemical assays. The susceptibility of Ae. aegypti to malathion was evaluated by means of samples of eggs and larvae from endemic area in Depok city were collected at 2005 periode. Biochemical and susceptibility test indicated that population of Ae. aegypti collected from Depok city was susceptible. Therefore the use of malathion insecticide for DHF vector control was suggested.*

Key word: *Resistance, Aedes aegypti, Malathion, Depok city*

PENDAHULUAN

Pengasapan (*fogging*) dengan insektisida biasanya digunakan dalam keadaan darurat/Kejadian Luar Biasa (KLB) terutama untuk kasus Demam Berdarah Dengue (DBD). Tujuan kegiatan ini untuk membunuh *Aedes aegypti* dewasa agar terputus mekanisme penularan. Sejak tahun 1972 dan sampai saat ini pengasapan ruang masih menjadi pilihan utama untuk pengendalian vektor DBD saat KLB. Penggunaan malathion untuk fogging telah digunakan sejak tahun 1972⁽¹⁾. Upaya ini akan efektif jika nyamuk yang menjadi sasaran belum resisten terhadap insektisida yang dipakai. Munculnya serangga resisten

pertama kali dilaporkan pada tahun 1914 pada *Quadraxipidiotus pernicious*⁽²⁾. Contoh kasus resistensi pernah terjadi pada penggunaan pestisida DDT yang digunakan sejak tahun 1946. Sejak itu kasus resistensi *Aedes spp* terhadap DDT pertama kali dilaporkan tahun 1947, sejak itu lebih dari seratus spesies nyamuk resisten terhadap satu insektisida atau lebih⁽³⁾.

Munculnya galur serangga resisten dipicu dengan adanya pajanan yang berlangsung lama. Hal ini terjadi karena nyamuk *Ae. aegypti* dan vektor dengue lainnya mampu mengembangkan sistem kekebalan terhadap insektisida yang sering dipakai⁽⁴⁾. Beberapa penelitian

menunjukkan pula adanya resistensi silang, yaitu timbulnya resistensi terhadap suatu insektisida karena pajanan oleh insektisida lainnya⁽⁵⁾.

Dalam lingkungan manusia saat ini banyak sumber penggunaan insektisida, antara lain pertanian, rumah tangga, industri, kesehatan dan lainnya yang berpeluang berkontribusi memicu munculnya resistensi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui status resistensi nyamuk *Aedes aegyti* terhadap insektisida malathion di kota Depok propinsi Jawa Barat.

BAHAN DAN CARA

Penelitian ini berupa penelitian observasional, jenis penelitian yang akan dilaksanakan termasuk penelitian laboratorium. Populasi dalam penelitian ini adalah jumlah rumah di daerah penelitian yang akan dipasang *ovitrap*. Unit sampel dalam penelitian ini adalah rumah yang akan di pilih secara random untuk dipasang *ovitrap*. Dari data Puskesmas Cimanggis jumlah rumah di wilayah kajian sebanyak 695 rumah. Dari perhitungan jumlah sampel diperoleh jumlah rumah sebanyak 195 rumah. Adapun persamaan untuk memperoleh jumlah sampel random sebagai berikut :

$$E = Z_c \cdot \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} \cdot \sqrt{\left(\frac{N - n}{N - 1}\right)}$$

di mana

E = 0.05 Zc = 1,96

N = 695 p = 0,5 q = 0,5

Nyamuk *Aedes aegypti*

Nyamuk untuk bahan uji dalam penelitian ini berasal dari telur yang diperoleh dari lokasi. Pengambilan telur dengan *ovitrap* dilaksanakan selama 6 minggu. Pemasangan *ovitrap* dilakukan secara random

dengan dibantu oleh petugas Puskesmas, Jumantik dan Kader. Sebelum pelaksanaan dilakukan pelatihan yang cukup untuk tenaga yang akan terlibat sesuai kegiatannya. Kertas saring di dalam *ovitrap* diambil setiap tiga hari sekali oleh Jumantik dan Kader di bawah supervisi petugas Dinas Kesehatan Kota dan Puskesmas. Setelah masa pemasangan *ovitrap* selesai maka semua *ovitrap* dikumpulkan kembali supaya tidak menjadi tempat nyamuk bertelur.

Generasi pertama dari telur yang terkumpul akan digunakan untuk uji resistensi secara biokimia. Uji biokimia yang dilakukan meliputi aktivitas enzim esterase non spesifik dan asetilkholinesterase. Uji resistensi *bio-assay* dilakukan menurut standar baku WHO yang digunakan sebagai *cross check*.

Pemeliharaan nyamuk di laboratorium

Telur *Aedes aegypti* yang didapat dari setiap lokasi akan ditetaskan di dalam nampan berisi air bersih. Setelah menjadi larva diberi *dog food*. Besarnya kebutuhan makanan larva tergantung pada jumlah dan instar larva. Untuk uji biokimia nyamuk dipelihara sampai menjadi instar IV, sedangkan uji suseptibilitas memerlukan nyamuk betina dewasa yang kenyang darah/air gula.

Uji Resistensi

Uji aktivitas enzim esterase non spesifik

Uji aktivitas enzim esterase non spesifik berdasarkan metode Lee⁽⁶⁾. Jentik nyamuk instar IV awal digerus secara individual untuk dibuat homogenat dan dilarutkan dengan 0,5 ml larutan *phosphat buffer saline* (PBS) 0,02 M, pH = 7. Homogenat kemudian dipindahkan ke dalam *microplate* menggunakan *micro-pipette* sebanyak 50 µl bahan substrat α *naftil asetat* dalam *acetone* (6 g/l) dicampur dengan 50 ml *buffer phosphate* (0,02 M; pH=7) dan dibiarkan selama 60 detik.

Selanjutnya pada setiap *microplate* ditambahkan 50 µl bahan *coupling reagent* berupa 150 mg garam *Fast blue B* (o-dianisidine, tetrazotized; sigma) dalam 15 ml akuades dan 35 ml *aquous* (5%;w/v) *sodium dodecyl sulphate* (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 *microplate* 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 450 nm.

Uji insensitivitas asetilkolinesterase

Uji insensitivitas asetilkolinesterase berdasarkan metode Peiris dan Hemingway⁽⁷⁾. Jentik nyamuk instar IV awal secara individu dibuat homogenat di dalam larutan 1 ml larutan *buffer phosphate saline* (PBS) 0,02 M; pH 7,0. Homogenat diambil dengan *micropipette* sebanyak 2 x 200 µl (H1 & H2), kemudian masing-masing dipindahkan ke dalam sumuran mikroplat. Pada sumuran *microplate* yang telah diisi H1 ditambahkan 10 µl insektisida Bendiocarb (0,125 ml Bendiocarb dalam 2,5 ml aceton + 7,5 ml PBS). Campuran H1 tersebut dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam sumuran yang berisi H1 dan H2, masing-masing ditambahkan 25 µl larutan asetilkolin-iodida (AsChI) 0,036 M (Sigma®) sebagai sustrat enzim asetilkolinesterase dan ditambahkan 20 µl 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 menunjukkan reaksi positif (resisten). *Absorbance value* dibaca dengan *Elisa reader* pada $\lambda = 405$ nm.

Uji suseptibilitas

Uji suseptibilitas yang digunakan sesuai standar WHO dengan *susceptibility test kit* dengan *impregnated paper* yang berbahan aktif malathion. Nyamuk yang digunakan adalah hasil pembiakan dari telur yang berhasil dikumpulkan. Disiapkan 4 pasang tabung standar WHO dan pada setiap tabung uji (yang diberi tanda merah) dipasang kertas berinsektisida secara melingkar. Selanjutnya ke dalam tabung uji dimasukkan nyamuk betina sebanyak 15-20 ekor dengan kondisi perut kenyang air gula. Nyamuk dikontakkan dengan insektisida selama 30 menit. Sebagai kontrol digunakan 2 tabung yang diberi tanda hijau dan dilengkapi kertas tanpa insektisida. Setelah nyamuk uji kontak selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tabung *holding* (penyimpanan) yang diberi tanda hijau. Kematian nyamuk dihitung/diamati setelah 24 jam penyimpanan. Selama penyimpanan kelembaban dijaga dan pada tabung *holding* yang dilengkapi handuk basah. Kriteria kerentanan ditentukan sebagai berikut: 1) kematian antara > 98 - 100% (peka) 2) kematian antara 80 - 98% (diperlukan verifikasi/toleran) 3) kematian sebesar <80% (resisten).

Interpretasi data

Interpretasi data untuk uji Biokimia yang berupa intensitas warna hasil reaksi aktivitas enzim esterase nonspesifik bersifat kualitatif (skor warna) ditetapkan menurut kriteria empiris Peiris dan Hemingway, Mardihusodo 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 Hemingway (1990). 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 $\lambda = 405$ nm. Nilai AV < 0,700 (sangat rentan/SS); AV = 0,700 - 0,900 (resisten sedang/RS); AV > 0,900 (resisten tinggi/RR).

HASIL

Penggunaan insektisida oleh responden

Selama kegiatan pengumpulan data diperoleh informasi mengenai insektisida yang digunakan oleh responden untuk upaya menghindarkan diri mereka dari gigitan nyamuk. Insektisida yang digunakan oleh responden berasal dari golongan piretroid, karbamat dan organofosfat. Selain insektisida juga terdapat responden yang menggunakan *lotion* penolak nyamuk dengan bahan aktif DEET dan dengan cara fisik menggunakan kipas angin, AC atau kelambu.

Insektisida yang digunakan oleh masyarakat didominasi dari golongan piretroid sebesar 42,96% pengguna insektisida dari golongan karbamat sebesar 25,35% dan organofosfat sebesar 6,34%. Responden yang menggunakan *lotion* penolak nyamuk sebesar 19,72% dan yang menggunakan cara fisik sebanyak 5,63%.

Pengumpulan Telur

Ovitrap yang positif terdapat telur *Ae. aegypti* ditemukan di 98 rumah (50,2%). Kepadatan telur nyamuk dalam setiap *ovitrap* yang positif berkisar 12 butir sampai 46 butir telur. *Ovitrap* yang dipasang mendapat telur nyamuk *Ae. aegypti* yang jumlahnya relatif sedikit. Penyebab dari sedikitnya jumlah telur yang diperoleh adalah karena pada waktu pemasangan *ovitrap* tidak bertepatan dengan puncak musim penularan. Data dari Dinas Kesehatan kota Depok menunjukkan peningkatan kasus DBD mulai terjadi sejak bulan Desember sampai Februari, kemudian jumlah kasus menurun pada bulan-bulan berikutnya. Kasus terendah terjadi pada bulan Oktober⁽⁸⁾.

Uji Biokimia

Aktivitas enzim esterase non spesifik

Hasil pengukuran dengan substrat α -naftil asetat menunjukkan keberadaan gen resisten sebesar 22%. Hasil pengukuran dengan substrat β -naftil asetat tidak terdapat gen resisten atau semua individu masih rentan. Distribusi hasil uji enzim esterase disajikan Tabel 1.

Uji insensitivitas asetilkolinesterase

Hasil uji terhadap AChE dapat digunakan untuk mendeteksi adanya mekanisme resistensi terhadap insektisida dari

Tabel 1 Distribusi hasil uji biokimia terhadap enzim esterase non spesifik dengan substrat α -naftil asetat dan β -naftil asetat.

		β -naftil asetat			Total
		SS	RS	RR	
α -naftil asetat	SS	50,00%			50,00%
	RS	27,55%			27,55%
	RR	22,45%			22,45%
	Total	100,00%			100,00%

Keterangan SS : Rentan
RS: Toleran
RR: Resisten

Tabel 2 Distribusi hasil uji biokimia terhadap enzim asetilkolinesterase dengan kontrol positif bendiocarb.

		Kontrol positif			
		SS	RS	RR	Total
Tanpa perlakuan	SS	89,80%			89,80%
	RS	7,14%			7,14%
	RR	3,06%			3,06%
	Total	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%

Keterangan SS : Rentan
 RS: Toleran
 RR: Resisten

Tabel 3 Persentase kematian pada uji suseptibilitas antar perlakuan dan ulangan.

Ulangan	Perlakuan			
	Malathion	Malathion	Kontrol	Kontrol
1	100,0%	90,0%	4,5%	0,0%
2	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%
3	100,0%	100,0%	4,5%	0,0%
4	100,0%	100,0%	4,76%	5,0%

golongan organofosfat dan karbamat. Pada kelompok tanpa perlakuan hasilnya menunjukkan terdapat individu resisten sebesar 3,06%, toleran 7,14% dan sisanya 89,80% masih rentan. Sedangkan kontrol positif (diberi insektisida bendiocarb) semuanya masih rentan. Distribusi hasil uji enzim esterase disajikan pada Tabel 2.

Uji Suseptibilitas

Hasil uji suseptibilitas menunjukkan persentase kematian nyamuk uji antara 90% sampai 100%. Rata-rata persentase kematian pada perlakuan dengan malathion dari ke empat ulangan sebesar 98,75%. Sedangkan rata-rata persentase kematian kontrol sebesar 2,36%. Tabel 3 menyajikan persentase kematian hasil uji suseptibilitas dari setiap perlakuan dan ulangan.

PEMBAHASAN

Adanya peningkatan aktivitas enzim esterase nonspesifik pada sebagian anggota populasi yang diuji bisa dipicu

oleh tiga kelompok insektisida, yaitu organofosfat, karbamat dan piretroid. Hasil uji dengan substrat α -naftil asetat dan β -naftil asetat menunjukkan hanya ada satu kelompok insektisida yang memicu munculnya gen resisten pada populasi yang diamati ⁽⁹⁾. Hasil yang diperoleh menunjukkan kemunculan gen resisten hanya terjadi pada substrat α -naftil asetat. Sedangkan pada substrat β -naftil asetat semua individu uji masih rentan. Hasil ini menunjukkan kejadian resistensi karena aktivitas enzim esterase hanya terjadi karena salah satu golongan insektisida dari organofosfat, karbamat atau piretroid saja.

Asetilkolinesterase merupakan target sasaran insektisida organofosfat dan karbamat, sehingga jika ada mekanisme resistensi maka berkaitan dengan insektisida organofosfat dan karbamat. Selanjutnya uji insensitivitas asetilkolinesterase menunjukkan tingkat gen resisten yang rendah, uji ini untuk mendeteksi adanya mekanisme resistensi terhadap kelompok insektisida organofosfat dan karbamat.

Hasil uji terhadap aktivitas asetilkolinesterase pada kontrol positif tidak menunjukkan adanya individu yang resisten. Sehingga diduga gen resisten yang ada pada populasi bukan dipicu oleh insektisida dari golongan organofosfat atau karbamat.

Uji suseptibilitas dengan malathion memastikan bahwa populasi nyamuk yang diuji masih rentan terhadap malathion (kematian mencapai 98,75%). Meskipun hasil uji biokimia menunjukkan adanya gen resisten namun kematian yang tinggi pada uji suseptibilitas bisa dikarenakan adanya paksaan kontak nyamuk dengan insektisida selama pengujian. Dugaan lain adalah kemunculan individu resisten pada populasi pada saat ini bukan dipicu oleh insektisida malathion.

Masih rentannya *Ae. aegypti* terhadap malathion juga dilaporkan oleh Rodriguez *et al.* ⁽¹⁰⁾ terhadap malathion meskipun telah digunakan selama 25 tahun di Venezuela. Diduga perlakuan dengan malathion terhadap nyamuk dewasa tidak memberikan tekanan yang berarti untuk memicu resistensi. Faktor lain yang menyebabkan minimnya kontak *Ae. aegypti* dengan insektisida adalah sifat bionomiknya yang suka bertelur pada tempat-tempat kecil dan hinggap di baju yang tergantung. Tempat kecil yang terisi air biasanya tidak pernah diberi insektisida karena sifatnya yang cenderung temporer dan sering tidak terpantau. Demikian juga dengan baju atau kain yang tergantung hampir tidak pernah diberi perlakuan dengan insektisida.

UCAPAN TERIMAKASIH

Atas bantuan dan dukungan yang telah diberikan selama penelitian sehingga penelitian ini dapat berlangsung, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada Kepala Dinas Kesehatan Kota Depok beserta staf, Kepala Badan Litbang Kesehatan, Kepala Puslit

Ekologi Kesehatan, Ibu Pretty Multihartina, Bapak Nagiot Cansalony Tambunan, Bapak. Sudomo, Ibu Widiarti dan berbagai pihak yang belum kami sebutkan namanya satu per satu.

DAFTAR RUJUKAN

1. WHO. Instruction for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine organophosphate and carbamate insecticides. Diagnostic test WHO/VBC/81.806. 1981.
2. Metcalf, R.F. Insect Resistance to Insecticide. *Pestic. Sci.* 26:333-358. 1989
3. Knobler, S.L., Stanley M. L., Marjan N., & Tom B. The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors. The National Academies Press. Washington. 2003
4. WHO & Departemen Kesehatan RI. Pencegahan dan Penanggulangan Penyakit Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue. Jakarta. Depkes RI. 2003.
5. Johnson, P.W. Chemical Resistance in Livestock. Elizabeth Mc Arthur Agricultural Institute. Camden NSW. 1998.
6. Lee, H.L. 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. 1990.
7. Peiris HTR & Hemingway J. Mechanism of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae) strain from Sri Lanka. *Bulletin of Entomological Research.* 80:453-457. 1990.
8. Dinas Kesehatan Kota Depok. (Laporan internal tidak dipublikasikan). Depok. 2004.
9. Widiarti, D.T. Boewono, U. Widyastuti & Mujiono. Uji biokimia kerentanan vektor malaria terhadap insektisida organofosfat dan karbamat di propinsi Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta. *Buletin penelitian kesehatan.* 33.2: 80-88.2005.
10. Rodriguez, M.M., J. Bisset, D.M.D. Fernandez, L. Lauzan & A. Soca. Detection of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) from Cuba and Venezuela. *J. Med. Entomol.* 38(5):623-628.2001.