



Uji mikroplat aktivitas enzim esterase untuk mendeteksi resistensi *Anopheles aconitus* terhadap insektisida organofosfat

Microplate assay analysis of esterase enzyme activity for the detection of Anopheles aconitus resistance to organophosphate insecticide

Widiarti

Vector and Reservoir Control Research Unit, National Institute of Health Research and Development, Salatiga

KEYWORDS *Biochemical assay, vector control, metabolic resistance*

ABSTRACT *Non specific esterase are known to be important detoxification enzyme contributing to development of insecticides resistance in mosquitoes. Elevated esterase activity is one of the mechanisms of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in the mosquitoes. Such metabolic resistance can be detected by a microplate assay method. Mosquitoes vector resistance can occurs as a result of continuous exposure to the insecticide. Organophosphate insecticide has been used in the vector control program on Anopheles. aconitus, the malaria vector in Jepara Regency since 1983. The use of organophosphate and carbamate insecticides for five years for controlling Anopheles nigerrimus in Srilanka contribute to the selective resistance. This could happen to the population of An. aconitus in Jepara Regency. The objectives of this studies was to determine the potency of An. aconitus from Jepara Regency to be resistant to organophosphate insecticide related to esterase activity mechanism. The study methods used was biochemical assays (microplate assays) for elevated esterase. The level of esterases in larvae was determined using r and S naphthyl acetate, as the substrate and Fast Blue B as the coupling reagent. The esterase activity was measured at 450 nm with Dytech ELISA plate reader. Microplate assay (Biochemical assays) on individual An. aconitus from Mlonggo II and Bangsri III subdistricts revealed that 12,9% and 28,6% population was resistant to organophosphate insecticide. The result showed that there was significant difference of elevated of esterase activity with both r and S naphthyl acetate substrate hydrolysis, which appeared to be the major resistance mechanism in this multiple organophosphate resistant strain. Therefore the use of another insecticide group for vector control (An. aconitus) was suggested.*

Pengendalian vektor malaria (nyamuk) mendapat perhatian beberapa pengelola program karena merupakan bagian dari upaya menurunkan kasus malaria. Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan pengendalian vektor malaria adalah penggunaan insektisida kimia yang tepat. Sayangnya seiring dengan peningkatan beberapa kasus malaria, resistensi terhadap insektisida yang digunakan juga meningkat. Memperhatikan begitu meluasnya masalah resistensi vektor malaria terhadap insektisida, maka pemilihan penggunaan insek-

tisida harus didasarkan pada hasil tes kepekaannya terhadap serangga sasaran dan mekanisme yang berperan dalam penurunan kepekaan atau resistensi. Mekanisme resistensi yang berperan pada serangga terhadap sebagian besar insektisida secara umum di kategorikan menjadi 2 yaitu tidak sensitifnya tempat

Correspondence

Dra. Widiarti, M.Kes, Vector and Reservoir Control Research Unit, National Institute of Health Research and Development, Salatiga. Jl. Hasanudin 123, PO BOX 200, Salatiga 50721. Telephone (0298) 327096.

sasaran (target site) dan resistensi metabolik. Resistensi metabolik pada serangga vektor malaria (nyamuk) terjadi karena perubahan enzim secara kualitatif dan atau kuantitatif yang mampu memetabolisasi atau menyingkirkan insektisida sebelum mencapai tempat sasaran. Produk metabolisme umumnya lebih hidrofilik daripada substrat insektisidanya sehingga lebih mudah dikeluarkan dari tubuh serangga (Small, 1998). Peningkatan aktivitas enzim estrase merupakan salah satu dari mekanisme resistensi nyamuk terhadap insektisida organofosfat dan karbamat. Resistensi metabolik yang berupa peningkatan aktivitas enzim estrase dapat di deteksi dengan metode uji mikroplat (uji biokimia). Penekanan secara selektif insektisida organofosfat meningkatkan aktivitas enzim esterase pada sebagian besar populasi nyamuk *Culex quinquefasciatus* di alam. Berdasarkan pemilihan substrat α atau β naftil asetat digolongkan esterase type A atau B (Raymond *et. al.*, 1987). Sebagian besar resistensi *Culex quinquefasciatus* meningkatkan enzim esterase A₂ dan diikuti esterase B₂. Fungsi A₂ dan B₂ pada resistensi adalah menyingkirkan insektisida dan bukan memetabolisasi insektisida. Penekanan secara selektif insektisida organofosfat terhadap vektor malaria *An. aconitus* di Jepara terjadi baik pada saat stadium larva di sawah di bidang pertanian dan stadium dewasa pada saat dilakukan pengendalian vektor secara *indoor residual spraying* di bidang kesehatan. Hal tersebut menimbulkan pemikiran bahwa kemungkinan terjadi peningkatan enzim esterase non spesifik pada *An. Aconitus* di Jepara yang memacu resistensi terhadap insektisida organofosfat.

Tujuan penelitian adalah mendeteksi potensi resistensi *An. aconitus* terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion) dengan mengukur peningkatan enzim esterase non spesifik di Kabupaten Jepara menggunakan dua substrat yaitu α dan β naftil asetat.

BAHAN DAN CARA KERJA

Lokasi penelitian

Penelitian ini adalah eksperimen semu dengan rancangan penelitian *The Posttest Only*

Control Group Design (Cambell and Stanley, 1966). Kelompok perlakuan adalah larva nyamuk *An. aconitus* yang diperoleh dari 9 Kecamatan di Kabupaten Jepara. Kecamatan yang dipilih yaitu 3 Kecamatan *High Case Incidence* (Mlonggo II, Batealit dan Mayong I), 3 Kecamatan *Middle Case Incidence* (Bangsri III, Keling I dan Tahunan) dan 3 Kecamatan *Low Case Incidence* (Nalumsari, Pecangaan I dan Keling II). Kelompok pembandingan adalah larva nyamuk *An. aconitus* hasil kolonisasi laboratorium Balai Penelitian Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga (BPVRP) generasi ke-130. Penelitian dilaksanakan dua tahap yaitu pengumpulan nyamuk *An. aconitus* dari lokasi penelitian yang kemudian dipelihara secara individu di laboratorium BPVRP Salatiga sampai menjadi larva instar IV awal. Tahap berikutnya adalah uji biokimia di laboratorium Ilmu Kedokteran Tropis Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Cara penelitian

1. Penangkapan nyamuk

Penangkapan nyamuk dilakukan di habitat aslinya (*resting place*) pada pagi hari dari jam 05.00-08.00 dan di sekitar kandang ternak pada jam 22.00-24.00. Nyamuk *An. aconitus* betina kenyang darah (*fed*), *half gravid* dan *gravid* diidentifikasi menggunakan buku Reid kemudian dipelihara secara individual menjadi generasi pertama (F1) (Reid, 1969). Generasi pertama (F1) larva instar IV awal digunakan untuk uji biokimia. Uji biokimia yang dilakukan adalah peningkatan aktivitas enzim esterase non-spesifik.

2. Uji aktivitas enzim esterase non-spesifik berdasarkan metode Lee (1990)

Larva nyamuk *An. aconitus* instar IV awal digerus secara individual untuk dibuat homogenat dan dilarutkan dengan 0,5 ml larutan fosfat buffer saline (PBS) 0,02 M, pH=7. Homogenat kemudian dipindahkan ke dalam mikroplat menggunakan mikropipet sebanyak 50 μ l bahan substrat α -naftil asetat dan 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 μ l 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 sulfat (sigma). Segera setelah reaksi berlangsung 10 menit, warna merah yang mula-mula timbul berangsur-angsur berubah menjadi biru. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 μ l asam asetat 10% ke dalam tiap-tiap mikroplat yang berisi homogenat. Intensitas warna akhir produk reaksi menggambarkan aktivitas enzim esterase non-spesifik dan tingkatannya dapat dibedakan secara visual. Aktivitas enzim esterase non-spesifik diukur secara kuantitatif menggunakan *ELISA reader* dan dibaca pada panjang gelombang (λ) 450 nm.

3. Interpretasi Data

Data uji biokimia aktivitas enzim esterase non spesifik secara kuantitatif diukur dengan pembacaan *absorbance value* (AV) menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang (λ) = 450 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

a. Uji biokimia kuantitatif aktivitas enzim esterase menggunakan substrat γ -naftil asetat

Hasil uji biokimia kuantitatif, aktivitas enzim esterase nonspesifik larva nyamuk *An. aconitus* yang diukur dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang (λ) = 450 nm, menunjukkan bahwa status kerentanan larva *An. aconitus* koloni laboratorium BPVRP Salatiga (generasi ke 130) 100% (AV < 0,70) masih rentan terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion) seperti terlihat pada Tabel 1.

Terlihat juga pada Tabel 1 tersebut bahwa pada koleksi *An. aconitus* dari tiga Kecamatan HCI yaitu Kecamatan Mlonggo II, Kecamatan Batealit dan Kecamatan Mayong I telah dijumpai status resisten tinggi (AV >

0,900). Persentasi *An. aconitus* resisten tinggi dari masing-masing Kecamatan adalah 12,9%; 5,7% dan 4,4%. Status resisten sedang *An. aconitus* juga dijumpai pada ketiga Kecamatan HCI masing-masing Kecamatan Mlonggo II 17,1%, Kecamatan Batealit 20,0% dan Kecamatan Mayong I 8,8%. Status rentan terdapat di Kecamatan Mlonggo II sebesar 70,0%, Kecamatan Batealit 74,3% dan Kecamatan Mayong I 86,8%. Daerah MCI hanya terdapat di Kecamatan Bangsri III yang ditemukan status resisten tinggi yaitu sebesar 28,6%. Status resisten sedang (RS) ditemukan pada dua Kecamatan MCI, masing-masing Kecamatan Bangsri III sebesar 8,6% dan Kecamatan Keling I sebesar 21,4%. Status rentan ditemukan pada ketiga Kecamatan MCI, masing-masing Kecamatan Bangsri III sebesar 62,8%, Kecamatan Keling I sebesar 78,6% dan Kecamatan Tahunan sebesar 100%. Daerah LCI dari ketiga Kecamatan antara lain Kecamatan Nalumsari, Kecamatan Pecangaan I dan Kecamatan Keling II belum ditemukan status resisten tinggi *An. aconitus* terhadap insektisida organofosfat. Status resisten sedang hanya ditemukan pada Kecamatan Nalumsari yaitu sebesar 8,3%. Status rentan *An. aconitus* pada ketiga Kecamatan LCI masing-masing Kecamatan Nalumsari sebesar 91,7%, Kecamatan Pecangaan I sebesar 100% dan Kecamatan Keling II sebesar 100%.

Hasil pembacaan *absorbance value* (AV) dapat menggambarkan berbagai kisaran status kerentanan *An. aconitus* berdasarkan aktivitas enzim esterase nonspesifik yang diukur secara *ELISA* pada λ = 450 nm, menurut Kecamatan di Kabupaten Jepara dan koloni laboratorium BPVRP Salatiga. Koloni *An. aconitus* laboratorium BPVRP Salatiga 100% masih rentan terhadap insektisida organofosfat (fenitrothion) dengan perincian 13,7% pada kisaran AV 0,201-0,300, 12,5% pada AV 0,301-0,400, 33,8% pada AV 0,401-0,500, 26,3% pada AV 0,501-0,600 dan 13,7% AV 0,601-0,700 seperti terlihat pada Tabel 2.

Terlihat juga pada Tabel 2 tersebut bahwa aktivitas enzim esterase nonspesifik menghidrolisis substrat α -naftil asetat pada tiga Kecamatan HCI, tiga Kecamatan MCI dan tiga

Kecamatan LCI. Daerah HCI yaitu Kecamatan Mlonggo II kisaran AV berada di antara 0,201 - 1,00 dan puncak AV pada 0,401 sebesar 22,2%, Kecamatan Batealit AV berkisar antara 0,301 - 0,901 dengan puncak AV pada nilai 0,501 sebesar 28,6%, Kecamatan Mayong I nilai AV berkisar pada 0,401 - 0,901 dengan puncak AV pada 0,501 (39,7%). Kecamatan MCI Bangsri III kisaran AV pada 0,201 - 1,201 dan puncaknya pada 0,301 sebesar 22,9%, Kecamatan Keling I AV berkisar antara 0,201 - 0,801 dan puncak AV 0,401 (28,6%), Kecamatan Tahunan kisaran AV antara 0,201 - 0,401 dengan puncak AV pada 0,401 sebesar 41,4%. Kecamatan LCI Nalumsari kisaran AV diantara 0,301 - 0,701 dengan puncak AV pada nilai 0,501 sebesar 30,8%, Kecamatan Pecangaan I AV berkisar antara 0,201 - 0,401 dan puncak AV pada 0,301 sebesar 43,5%, Kecamatan Keling II kisaran AV diantara 0,201 - 0,401 dan puncak AV pada 0,301 sebesar 76,9%. Nilai AV *An. aconitus* dari koloni laboratorium BPVRP Salatiga berkisar antara 0,201-0,600 dan puncak AV pada 0,400 (33,8 %) seperti terlihat pada Tabel 2.

Pola penyebaran status kerentanan larva nyamuk *An. aconitus* berdasarkan aktivitas enzim esterase nonspesifik (yang menghidrolisis substrat α -naftil asetat) yang diperiksa secara ELISA pada $\lambda = 450$ nm, baik koloni laboratorium BPVRP Salatiga dan dari sembilan Kecamatan (3 Kecamatan HCI, 3 Kecamatan MCI dan 3 Kecamatan LCI) di Kabupaten Jepara dapat dilihat pada Gambar 1,2 dan 3.

b. Uji biokimia kuantitatif aktivitas enzim esterase non-spesifik menggunakan substrat s-naftil asetat

Aktivitas enzim esterase nonspesifik yang diukur secara kuantitatif dengan ELISA pada $\lambda = 450$ nm, yang berupa *absorbance value* (AV) pada koloni *An. aconitus* laboratorium BPVRP Salatiga menunjukkan masih rentan dengan AV sebesar 0,501 (Tabel 3). Terlihat pada Tabel 3 tersebut koleksi *An. aconitus* dari tiga Kecamatan HCI yaitu: Kecamatan Mlonggo II, Kecamatan Batealit dan Kecamatan Mayong I tidak ditemukan AV > dari 0,900 atau status

kerentanan resisten tinggi. Status resisten sedang ditemukan pada Kecamatan Mlonggo II yaitu sebesar 1,4%. Status rentan masing-masing Kecamatan Mlonggo II 98,6%, Kecamatan Batealit 100% dan Mayong I 100%. Di Kecamatan MCI yaitu Bangsri III ditemukan kerentanan *An. aconitus* resisten tinggi yaitu sebesar 2,9%. Di dua Kecamatan MCI lain yaitu Kecamatan Keling I dan Tahunan tidak dijumpai status resisten tinggi. Status resisten sedang dijumpai juga hanya pada Kecamatan Bangsri III sebesar 17,1%. Status rentan dari ketiga Kecamatan MCI masing-masing Kecamatan Bangsri III sebesar 80,0%, Kecamatan Keling I 100% dan Kecamatan Tahunan sebesar 100%. Di Kecamatan LCI yaitu Kecamatan Nalumsari, Kecamatan Pecangaan I dan Kecamatan Keling II tidak ditemukan aktivitas enzim esterase nonspesifik yang menghidrolisis substrat β -naftil asetat. Koleksi *An. aconitus* dari ketiga Kecamatan LCI tersebut 100% masih rentan, demikian juga koleksi *An. aconitus* dari Laboratorium BPVRP Salatiga 100% masih rentan seperti terlihat pada Tabel 3.

Hasil pemeriksaan aktivitas enzim esterase nonspesifik menunjukkan sebagian besar *An. aconitus* dari Kabupaten Jepara juga masih rentan yaitu 97,5 % (AV < 0,700), 2,8% resisten sedang AV 0,700-0,900 dan 0,3% resisten tinggi dengan AV > 0,900 (Tabel 3). Kisaran AV aktivitas enzim esterase nonspesifik yang menghidrolisis substrat β -naftil asetat dapat dilihat pada Tabel 4. Daerah HCI yaitu Kecamatan Mlonggo II kisaran AV antara 0,201 - 0,701 dengan puncak AV pada nilai 0,401 sebesar 34,3%, Kecamatan Batealit AV berkisar antara 0,201 - 0,501 dan tertinggi pada 0,401 sebesar 42,9%, dan Kecamatan Mayong I AV berkisar antara 0,201 - 0,501 dan puncak AV pada 0,401 sebesar 51,5%. Tiga Kecamatan MCI menunjukkan kisaran AV yaitu Kecamatan Bangsri III antara 0,201 - 0,901 dan puncak AV pada nilai 0,201 sebesar 48,6%, Kecamatan Keling I AV berkisar antara 0,201 - 0,501 dan puncak AV pada 0,201 sebesar 64,3%, Kecamatan Tahunan AV berkisar antara 0,201 - 0,301 dan tertinggi pada 0,201 sebesar 60,0%. Tiga Kecamatan LCI

yaitu Kecamatan Nalumsari, AV berkisar antara 0,201 - 0,401 dan tertinggi pada 0,201 sebesar 76,9%, Kecamatan Pecangaan I AV berkisar antara 0,201 - 0,301 dan tertinggi pada 0,201 sebesar 78,3%, Kecamatan Keling II AV berkisar antara 0,101 - 0,301 dan puncak AV pada 0,201 sebesar 76,9%. Kisaran AV koloni *An. aconitus* dari laboratorium BPVRP Salatiga berkisar antara 0,101 - 0,601 dan puncak AV pada 0,201 dan 0,301 masing-masing sebesar 41,2%.

Pola penyebaran status kerentanan larva nyamuk *An. aconitus* diamati berdasarkan aktivitas enzim esterase nonspesifik (yang menghidrolisis substrat β -naftil asetat) yang diperiksa secara ELISA pada $\lambda = 450$ nm. Hasilnya baik koloni laboratorium BPVRP Salatiga dan dari sembilan Kecamatan (3 Kecamatan HCI, 3 Kecamatan MCI dan 3 Kecamatan LCI) di Kabupaten Jepara dapat dilihat pada Gambar 1,2 dan 3.

Uji biokimia kualitatif (Tabel 2) dan kuantitatif (Tabel 3) dianalisis dengan uji statistik One Way ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna secara statistik status kerentanan *An. aconitus* dari Kabupaten Jepara dengan koloni laboratorium BPVRP dengan nilai $p < 0,05$. Analisis dilanjutkan dengan LSD untuk mengetahui Kecamatan mana saja yang berbeda. Hasil analisis menunjukkan bahwa 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. Status kerentanan *An. aconitus* Kecamatan MCI Keling I dan Kecamatan Tahunan serta tiga Kecamatan LCI Nalumsari, Kecamatan Pecangaan I dan Kecamatan Keling II tidak berbeda dengan *An. aconitus* dari laboratorium BPVRP Salatiga.

Tabel 1. Status kerentanan larva nyamuk *An. aconitus* menurut Kecamatan di Kabupaten Jepara berdasarkan aktivitas enzim esterase non-spesifik (substrat α -naftil asetat) secara ELISA yang dibaca pada $\lambda = 450$ nm

Lokasi penelitian menurut wilayah Kecamatan	Jumlah		Absorbance Value (AV) (*) Hasil Uji Biokimia		
	Larva uji	Replikat	% Rentan	% Resisten Sedang	% Resisten Tinggi
HCI					
1. Mlonggo II	70	140	70,0	17,1	12,9
2. Batealit	70	140	74,3	20,0	5,7
3. Mayong I	68	136	86,8	8,8	4,4
MCI					
1. Bangsri III	70	140	62,8	8,6	28,6
2. Keling I	70	140	78,6	21,4	0
3. Tahunan	70	140	100	0	0
LCI					
1. Nalumsari	65	130	91,7	8,3	0
2. Pecangaan I	69	138	100	0	0
3. Keling II	65	130	100	0	0
Kab. Jepara	617	1234	84,9	9,4	5,7
Lab. BPVRP Salatiga	80	160	100	0	0

Keterangan :

(*) AV = Absorbance Value pada $\lambda = 450$ nm
 Rentan (SS) = AV < 0,700 HCI = High Case Incidence
 Resisten Sedang (RS) = AV 0,700 - 0,900 MCI = Middle Case Incidence
 Resisten Tinggi (RR) = AV > 0,900 LCI = Low Case Incidence

Tabel 2. Kisaran *absorbance value* (AV) status kerentanan larva nyamuk *An. aconitus* berdasarkan aktivitas enzim esterase nonspesifik (substrat α -naftil asetat) secara ELISA yang dibaca pada $\lambda = 450$ nm.

Lokasi/ Kecamatan	Jumlah Larva Pada Kisaran AV * X 10 ⁻³ (%)											Total Replika t (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
HCI 1. Mlonggo II	6 (4,3)	14 (10,0)	32 (22,9)	20 (14,3)	24 (17,1)	16 (11,4)	10 (7,1)	12 (8,6)	6 (4,3)			140 (100)
2. Batealit		12 (8,6)	28 (2,0)	40 (28,6)	24 (17,1)	20 (14,3)	8 (5,7)	8 (5,7)				140 (100)
3. Mayong I			28 (20,6)	54 (39,7)	36 (26,5)	12 (8,8)		6 (4,4)				136 (100)
Rara-rata 3 HCI	1,4	6,2	21,2	27,2	20,2	11,8	4,2	6,2	1,4			
MCI 1. Bangsri III	12 (8,6)	32 (22,9)	24 (17,1)	12 (8,6)	8 (5,7)	4 (2,9)	8 (5,7)	12 (8,6)	4 (2,8)	20 (14,3)	4 (2,8)	140 (100)
2. Keling I	10 (7,1)	20 (14,3)	40 (28,6)	20 (14,3)	20 (14,3)	20 (14,3)	10 (7,1)					140 (100)
3. Tahunan	30 (21,4)	52 (37,2)	58 (41,4)									140 (100)
Rata-rata 3 MCI	12,3	24,8	25,3	7,6	6,6	6,4	4,2	2,8	1	4,7	1	
LCI 1. Nalumsari		30 (23,0)	20 (15,4)	40 (30,8)	30 (23,1)	10 (7,7)						130 (100)
2. Pecangaan I	42 (30,4)	60 (43,5)	36 (26,1)									138 (100)
3. Keling II	20 (15,4)	100 (76,9)	10 (7,7)									130 (100)
Rata-rata 3 LCI	15,2	47,8	13,1	10,2	7,3	2,5						
Lab. BPVRP	22 (13,7)	20 (12,5)	54 (33,8)	42 (26,3)	22 (13,7)							160 (100)

Keterangan :

AV (*) *Absorbance Value* pada $\lambda = 450$ nm

Rentan (SS) : AV < 0,700 Resisten Sedang (RS) : AV 0,700 - 0,900 HCI = High Case Incidence

1. 0,201 - 0,300

6. 0,701 - 0,800

MCI = Middle Case Incidence

2. 0,301 - 0,400

7. 0,801 - 0,900

LCI = Low Case Incidence

3. 0,401 - 0,500

Resisten Tinggi (RR) : AV > 0,900

4. 0,501 - 0,600

8. 0,901 - 1,000

5. 0,601 - 0,700

9. 1,100 - 1,200

10. 1,200 - 1,300

11. 1,300 - 1,400

Tabel 3. Status kerentanan larva nyamuk *An. aconitus* berdasarkan aktivitas enzim esterase nonspesifik (substrat α -naftil asetat), secara ELISA yang dibaca pada $\lambda = 450$ nm.

Lokasi penelitian menurut Wilayah Kecamatan	Jumlah		Absorbance Value (AV) (*) Hasil Uji Biokimia		
	Larva uji	Replikasi	% Rentan	% Resisten Sedang	% Resisten Tinggi
HCI					
1. Mlonggo II	70	140	98,6	1,4	0
2. Batealit	70	140	100	0	0
3. Mayong I	68	136	100	0	0
MCI					
1. Bangsri III	70	140	80	17,1	2,9
2. Keling I	70	140	100	0	0
3. Tahunan	70	140	100	0	0
LCI					
1. Nalumsari	65	130	100	0	0
2. Pecangaan I	69	138	100	0	0
3. Keling II	65	130	100	0	0
Kab. Jepara	617	1234	97,6	2,0	0,3
Lab. BPVRP Salatiga	80	160	100	0	0

Keterangan :

(*) AV = Absorbance Value pada $\lambda = 450$ nm.

Rentan (SS) = AV < 0,700

Resisten Sedang (RS) = AV 0,700 - 0,900

Resisten Tinggi (RR) = AV > 0,900

HCI = High Case Incidence

MCI = Middle Case Incidence

LCI = Low Case Incidence

Tabel 4. Kisaran *absorbance value* status kerentanan larva nyamuk *An. aconitus* berdasarkan aktivitas enzim esterase non-spesifik (substrat β -naftil asetat) secara *ELISA* yang dibaca pada $\lambda = 450 \text{ nm}$

Lokasi Kecamatan	Jumlah Larva Pada Kisaran AV * X 10 ⁻³ (%)									Total Replikasi (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
HCI										
1. Mlonggo II		26 (18,6)	34 (24,3)	48 (34,3)	26 (18,6)	4 (2,8)	2 (1,4)			140 (100)
2. Batealit		16 (11,4)	44 (31,4)	60 (42,9)	20 (14,3)					140 (100)
3. Mayong I		30 (22,0)	24 (17,7)	70 (51,5)	12 (8,8)					136 (100)
Rata-rata 3 HCI		17,3	24,4	42,9	13,2	1	0,5			
MCI										
1. Bangsri III		68 (48,6)	16 (11,4)	12 (8,6)	4 (2,9)	12 (8,6)	16 (11,4)	8 (5,7)	4 (2,8)	140 (100)
2. Keling I		90 (64,3)	20 (14,3)	20 (14,3)	10 (7,1)					140 (100)
3. Tahunan		84 (60,0)	56 (40,0)							140 (100)
Rata-rata 3 MCI		57,6	21,9	7,6	3	2,5	3,3	3,9	0,9	
LCI										
1. Nalumsari		100 (76,9)	20 (15,4)	10 (7,7)						130 (100)
2. Pecangaan I		108 (78,3)	30 (21,7)							138 (100)
3. Keling II	20 (14,3)	100 (76,9)	10 (7,7)							130 (100)
Rata-rata 3 LCI	5,1	77,4	14,9	2,5						
Lab. BPVRP	4 (2,5)	66 (41,2)	66 (41,2)	12 (7,5)	8 (5,0)	4 (2,5)				160 (100)

Keterangan :

(*) AV = Absorbance Value pada $\lambda = 450 \text{ nm}$

Rentan (SS) : AV < 0,700

1. 0,101 - 0,200

2. 0,201 - 0,300

3. 0,301 - 0,400

4. 0,401 - 0,500

5. 0,501 - 0,600

6. 0,601 - 0,700

Resisten Sedang (RS) : AV 0,700 - 0,900

7. 0,701 - 0,800

8. 0,801 - 0,900

Resisten Tinggi (RR) : AV > 0,900

9. 0,901 - 1,000

10. 1,000 - 1,100

HCI = High Case Incidence

MCI = Middle Case Incidence

LCI = Low Case Incidence

PEMBAHASAN

Seperti diketahui bahwa esterase merupakan enzim penting untuk detoksifikasi insektisida, sehingga menyebabkan serangga resisten (Yasutomi, 1983; Herath dan Davidson, 1981). Dengan di detoksifikasinya insektisida

dari tubuh serangga, maka serangga tidak mati (*survive*). Peningkatan aktivitas enzim esterase dapat diperiksa dengan peningkatan intensitas warna yang dihasilkan oleh karena hidrolisis substrat (α naphthyl asetat dan β naphthyl asetat). Peningkatan aktivitas esterase pada penelitian ini menunjukkan bahwa hidrolisis

substrat α naphthyl asetat lebih nyata dari pada hidrolisis β naphthyl asetat. Hidrolisis substrat α naphthyl asetat diikuti β naphthyl asetat lebih jelas terlihat pada daerah HCI Kecamatan Mlonggo II dan MCI Bangsri III yang relatif lebih lama menggunakan insektisida untuk pengendalian vektor sehingga nyamuk vektor juga lebih sering kontak dengan insektisida. Sementara itu di daerah lain hanya substrat α naphthyl asetat yang dihidrolisis dengan jelas. Adanya peningkatan esterase yang menghidrolisis baik substrat α naphthyl asetat maupun β naphthyl asetat, menurut Jayawardena *et. al.*, (1994) menggambarkan bahwa nyamuk *An. aconitus* telah resisten terhadap insektisida kelompok organofosfat skala luas. Hal tersebut dapat terjadi karena *An. aconitus* berkembang biak di sawah. Dengan demikian disamping terpapar insektisida organofosfat dari pertanian pada stadium larva juga terpapar insektisida bidang kesehatan pada saat dilakukan pengendalian stadium dewasanya. Namun tidak demikian halnya yang terjadi pada *An. albimanus*. Disini warna yang terbentuk disebabkan oleh hidrolisis β naphthyl asetat menjadi β naphthol dan asam asetat (Beach, 1987). Pada nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Sri Lanka insektisida fenitrothion dimetabolisasi lebih cepat daripada malathion dan esterase mampu menghidrolisis substrat baik α maupun β naphthyl asetat (Peiris dan Hemingway, 1993). Jadi pada nyamuk ditemukan dua tipe enzim esterase (1) menghidrolisis α naphthyl asetat dan esterase (2) menghidrolisis β naphthyl asetat, yang masing-masing dikode pembentukannya oleh gena yang berbeda yaitu Esterase II dan Esterase III (Tarumingkeng, 1986). Secara molekuler peningkatan enzim esterase pada strain resisten disebabkan oleh adanya amplifikasi gena yang menyandi (mengkode) enzim esterase (esterase α 2 dan esterase β 2) (Parakrama *et al.*, 1995; Vaughan & Hemingway, 1995). Fournier *et. al.*, (1992) mengatakan bahwa dasar genetis resistensi terhadap insektisida pada aras molekular kurang mendapat perhatian. Ditunjukkan bahwa amplifikasi dan over transkripsi gena ikut berperan dalam resistensi. Pada beberapa serangga resisten dijumpai lebih dari 250 alel

yang menjadi enzim esterase. Informasi genetic yang berhubungan dengan resistensi sangat diperlukan dalam penggunaan strategi yang tepat untuk mengukur resistensi, sejak frekuensi gena merupakan kunci penentu kecepatan seleksi terjadinya resistensi (Cordon *et al.*, 1990).

KESIMPULAN

Terjadi peningkatan aktivitas enzim esterase yang menghidrolisis substrat α -naftil asetat di 3 Kecamatan HCI Mlonggo II, Batealit dan Mayong I serta 1 Kecamatan MCI Bangsri III, sehingga sebagian populasi *An. aconitus* yang tertangkap telah resisten terhadap insektisida organofosfat. Persentasi *An. aconitus* resisten masing-masing Kecamatan adalah Mlonggo II 12,9%, Batealit 5,7%, Mayong I 4,4% dan Bangsri III 28,6%. Peningkatan aktivitas enzim esterase yang menghidrolisis baik α naftil asetat maupun β naftil asetat hanya terdapat di dua Kecamatan yaitu Kecamatan HCI Mlonggo II dan Kecamatan MCI Bangsri III. Dengan demikian *An. aconitus* dari kedua Kecamatan telah resisten terhadap insektisida organofosfat skala luas.

KEPUSTAKAAN

- Beach RF, Brogdon WG, Castanaza LA, Cordon-Rosales C Calderon M 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.
- Cambell DT and Stanley JC 1966. *Experimental and quasi experimental design for research*, Ron Mc. Nally College Publishing Co., Chicago..
- Cordon - Rosales C, Beach RF and Brogdon WG 1990. Field Evaluation of Methods Estimating Carbamate Resistance in *Anopheles albimanus* Mosquitos From a Microplate Assay for Insensitive Acetylcholinesterase, *Bulletin of the World Health Organization*. 68 (3): 323-329.
- Fournier D, Bride JM, Hoffmann F and Karch F 1992. Acetylcholinesterase, two types of modifications confer resistance to insecticide. *The Journal of Biological Chemistry*. 267.20. pp 14270-14274.
- Herath PRJ 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.
- Jayawardena KGI, Karunaratne SHPP, Ketterman AJ and Hemingway J 1994. determination of role of elevated B2 esterase in insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) from studies on

- the purified enzyme. *Bulletin of Entomological Research*. 84. 039-044. 5p.
- Lee HL 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.
- Parakrama K, Hemingway SHPJ, Jayawardena KGI, Dassanayaka V and Vaughan A 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.
- Peiris HTR and Hemingway J 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
- Raymond M, Pasteur N, Georghiou GP, Mellon RB, Wirth MC & Hawley M 1987. Detoxification Esterases new to California in Organophosphate Resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 24. 24-27.
- Reid JA 1968. *Anopheles mosquitoes of Malaya and Borneo*. Studies from the Institute for Medical Research Malaysia, No. 31. Kuala Lumpur Malaysia. 320-325.
- Small G 1998a. Genetical background of insecticide resistance. Paper Molecular Entomology Workshop, Center for Tropical Medicine Gadjah Mada University 9-20 Februari Yogyakarta. 15 p.
- Tarumingkeng RC 1989. Pengantar Toksikologi Insektisida. Fakultas Pasca Sarjana IPB. Bogor. hal 193-194.
- Vaughan A and Hemingway J 1995. Mosquito Carboxylesterase Est α 2 (A2). Cloning and Sequence of the Full Length cDNA for a Major Insecticide Resistance Gene Worldwide in the Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 28. pp 17044-17049.
- 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.