

Deteksi Resistensi Insektisida Nyamuk *Aedes Aegypti* Berdasarkan Aktifitas Enzim Glutation S-Transferase

Detection of Aedes Aegypti Mosquito Resistance Based on Glutation-S-Transferase Enzyme Activity

Sri Sundari¹, Salmah Orbayinah²

¹Bagian Parasitologi Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, ²Bagian Biokimia Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
Email: sundari_purbo@yahoo.com.sg

Abstract

Organophosphate insecticide especially temephos and malathion have been used to eliminate mosquito and larvae *Aedes aegypti* in Yogyakarta province since 1974 up to now. Using by inappropriate chemical insecticide in long term causes resistance of mosquito to the insecticide. It indicates the increasing of Glutation-S-transferase and hydrolyses activity. The biochemical research method conducted at 1995 in Yogyakarta demonstrated that mosquito and larvae *Ae. aegypti* based on enzyme esterase activity tend to be resist to organophosphate insecticide. The purpose of this research is to evaluate the resistance status of *Ae. Aegypti* mosquito to malathion insecticide in some villages in Bantul district based on Glutation-S-transferase activity. This research design was cross sectional study. Sample was collected randomly from these villages: Badegan, Palbapang and Bogoran in Bantul District. There were 48 mosquitos taken for examination of Glutation-S-transferase activity. The result of examination based on Glutation-S-transferase activity showed that the average of *Ae. Aegypti* mosquito resistance in three villages of Bantul District such as: moderate resistance (RS) 15%, susceptible (SS) 85%. However, statistically, there was no significant difference of resistance status of mosquito among three villages based on Glutation-S-transferase ($p > 0,05$).

Key words: *Aedes Aegypti*, gluthation s-transferase, insecticide resistance

Abstrak

Insektisida kimia organofosfat (OP), khususnya temefos dan malathion selalu dipakai untuk memberantas *Aedes aegypti* stadium dewasa dan larva di Daerah Istimewa Yogyakarta sejak tahun 1974. Penggunaan insektisida dengan dosis yang kurang tepat dalam jangka waktu yang lama akan menyebabkan resistensi nyamuk terhadap insektisida. Keadaan ini akan ditandai dengan peningkatan aktifitas enzim Glutation-S-transferase dan hidrolase. Penelitian yang dilakukan pada tahun 1995 melaporkan bahwa sudah terjadi kecenderungan resistensi nyamuk dan larva *Ae. Aegypti* terhadap organofosfat di Yogyakarta yang didasarkan pada aktifitas enzim esterase. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat resistensi nyamuk *Ae. Aegypti* di beberapa wilayah Bantul yang didasarkan pada aktifitas enzim Glutation-S-transferase. Penelitian ini merupakan penelitian analitik nonparametrik dengan desain *cross sectional*. Penentuan sampel dengan sampel random sampling dari 3 wilayah di Kabupaten Bantul yaitu Badegan, Palbapang dan Bogoran. Dari masing-masing wilayah diambil 48 nyamuk yang dilakukan pemeriksaan Glutation-S-transferase. Hasil penelitian yang didasarkan aktifitas

ensim Glutation-S- transferase menunjukkan bahwa rata-rata tingkat resistensi nyamuk di 3 wilayah Kabupaten Bantul adalah sebagai berikut: resistensi sedang (RS) 15%, rentan (SS) 85%. Dari hasil analisis statistis diperoleh hasil bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna status resistensi nyamuk berdasarkan aktifitas Glutation-S- transferase di 3 wilayah tersebut ($p>0,05$).

Kata kunci: *Aedes Aegypti* , Glutation-S-transferase, resistensi insektisida

Pendahuluan

Insektisida kimia organofosfat (OP), khususnya temefos dan malathion selalu dipakai untuk memberantas *Aedes aegypti* stadium dewasa dan larva di Daerah Istimewa Yogyakarta sejak tahun 1974.¹

Tindakan pengasapan dan abatisasi masal memang berhasil menekan populasi *Ae. aegypti*, namun hal tersebut tidak mungkin dilaksanakan secara terus menerus, karena biaya operasional yang mahal, penggunaan insektisida dengan dosis yang kurang tepat (*sublethal dose*) akan mengakibatkan timbulnya resistensi nyamuk terhadap insektisida yang digunakan dan menyebabkan timbulnya pencemaran lingkungan.²

Di beberapa kelurahan di kota Yogyakarta menunjukkan bahwa dengan uji hayati, nyamuk dan larva *Ae. aegypti* umumnya masih rentan terhadap malathion dan temefos, tetapi dengan uji biokimia jenis nyamuk tersebut terbukti telah menunjukkan kecenderungan resisten terhadap insektisida organofosfat yang berkaitan dengan adanya peningkatan enzim esterase.¹ Selain itu detoksikasi toksikan (insektisida) dalam tubuh serangga dapat dilakukan oleh enzim-enzim *mixed function oxydase* (MFO) yang lain misalnya hidrolase dan *glutation dependent transferase*. Selain melalui resistensi metabolik, tingkat resistensi serangga dapat terjadi karena adanya penurunan penetrasi melalui kutikula, penurunan penetrasi akan menyebabkan serangga membutuhkan waktu yang lebih lama untuk detoksifikasi sehingga serangga akan memiliki kemampuan untuk tetap bertahan.

Reaksi konjugasi dengan glutation (GSH) sangat penting pada detoksifikasi senyawa-senyawa elektrofilik baik yang mengganggu maupun senyawa-senyawa elektrofilik untuk tujuan pengobatan termasuk senyawa yang digunakan untuk kemoterapi kanker. Reaksi konjugasi ini dapat terjadi dengan atau tanpa adanya katalis glutation S-transferase (GST). Salah satu mekanisme resistensi serangga dapat diketahui dengan peningkatan aktifitas enzim antara lain esterase dan glutation S-transferase.

Kabupaten Bantul merupakan salah satu wilayah kabupaten di Daerah Istimewa Yogyakarta yang memiliki endemisitas tinggi terhadap angka kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD), sehingga pelaksanaan pengasapan dengan insektisida malathion juga tinggi. Seringnya dilakukan tindakan pengasapan menyebabkan kemungkinan terjadinya resistensi terhadap insektisida yang digunakan juga akan semakin meningkat. Berdasarkan penelitian Well pada tahun 2004 menyebutkan bahwa tidak semua nyamuk memiliki kecenderungan untuk terjadi resistensi yang tinggi.³ *Anopheles gambiae* yang merupakan vektor malaria memiliki kecenderungan yang tinggi untuk mengalami resistensi terhadap insektisida, tetapi *Aedes segypti* tidak memiliki kecenderungan untuk terjadi resistensi. Resistensi ditandai dengan adanya mutasi ganda basa pada sisi protein G119S. Apabila mutasi basa yang terjadi hanya tunggal, maka tidak akan terjadi resistensi pada serangga tersebut. Pada percobaan ditemukan bahwa, *Aedes aegypti* yang diberi paparan insektisida pada tes tabung, ternyata hanya mengalami

mutasi basa tunggal G119S sehingga *Aedes aegypti* tidak mudah mengalami resistensi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat resistensi nyamuk *Ae. Aegypti* di beberapa wilayah Bantul yang didasarkan pada aktifitas enzim Glutation-S-transferase.

Bahan dan Cara

Penelitian ini bersifat noneksperimental menggunakan rancangan *cross sectional* termasuk jenis eksperimental semu, karena pembagian subyek dalam penelitian ini tidak dilakukan secara random.⁴

Subyek penelitian adalah larva nyamuk *Ae. aegypti* yang terdapat di tiga dusun di tiga kecamatan di Kabupaten Bantul.

Variabel bebas dalam penelitian adalah (1) aplikasi insektisida malathion dari foging DBD maupun insektisida OP pertanian dan (2) aktivitas enzim glutation –S-transferase

pada nyamuk *Ae. aegypti* yang terjadi secara alami. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap malathion karena peningkatan enzim glutation S-transferase

Cara menentukan resistensi nyamuk *Aedes* adalah sebagai berikut: menggerus nyamuk *Ae. aegypti* sampai lumat untuk mendapatkan homogenat, homogenat, kemudian dilarutkan dalam 0,5 ml larutan buffer fosfat. Supernatan yang diperoleh merupakan fraksi yang mengandung enzim GST. Fraksi yang diperoleh disimpan pada suhu –80°C sampai saat digunakan untuk konjugasi DCNB dengan GSH.

Penetapan kadar protein total pada nyamuk dilakukan menggunakan Reagen Kit untuk Total Protein (DiaSys). Prinsip dasar penetapan protein total adalah protein bersama-sama dengan ion Cu membentuk kompleks warna biru ungu dalam larutan alkali. Absorbansi yang terbaca sebanding dengan konsentrasi total protein. Skema cara kerja penetapan protein total disajikan dalam Tabel 1. di bawah ini. Total protein dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Total protein [g/dl]} = \frac{A \text{ sample} - A \text{ blanko}}{A \text{ standar} - A \text{ blanko}} \times \text{Konsentrasi Standar}$$

Tabel 1. Skema Cara Kerja Penetapan Protein Total Metode Spektrofotometer

	Blanko	Sampel	standar
Sampel	-	20 µl	-
Standar	-	-	20 µl
Aquadest	20 µl	-	-
Monoreagent	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Dicampur, diinkubasi 5 menit pada suhu 20-25°C/37°C dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm, dalam waktu tidak lebih dari 60 menit

Penentuan aktivitas GST kelas mu dengan substrat DCNB digunakan kondisi campuran inkubasi sebagai berikut.⁶

R/	Bufet fosfat 0,1 M pH 7,5	600,0 ml
	Fraksi sitosol (kadar protein tertentu)	60,0 ml
	GSH (50 mM dalam akuades)	75,0 ml
	DCNB (50 mM dalam etanol)	15,0 ml

Produk konjugat GS-CNB yang terbentuk diukur pada λ 345 nm dari menit ke 0 sampai menit ke-3 menggunakan spektrofotometer (program *simple kinetic*). Hasil pengukuran berupa *rate* (= Δ serapan per menit).

Dari hasil pengukuran serapan produk konjugat GS-CNB secara spektrofotometri diperoleh nilai Δ serapan permenit (*rate*).

$V =$ Produk konjugat GS-CNB

$V = \Delta$ serapan permenit / $\Delta\epsilon$ GS-CNB .b/ kadar protein enzim GST per ml.

Data yang diperoleh merupakan produk konjugat GS-CNB dari nyamuk secara individual

Untuk menetapkan perbedaan kecenderungan resistensi larva nyamuk *Ae. aegypti* terhadap malathion antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dilakukan uji statistik *One Way Anova*. Bila ada perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.

Hasil

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nyamuk *Aedes aegypti* di Kabupaten Bantul memiliki rata-rata resistensi dengan substrat

DCNB (enzyme glutation-S-transferase) sebagai berikut: resisten tinggi (RR) 0%, resisten sedang (RS) 15% dan rentan (SS) 85%. Data selengkapnya ada pada Tabel 4.

Proporsi nyamuk uji dengan status resisten tinggi tidak dijumpai pada ketiga wilayah. Sedangkan proporsi nyamuk dengan status resisten rendah (rentan tinggi) secara berurutan adalah Bogoran, Badegandan Palbapang dengan persentase kerentanan masing-masing 95%, 85% dan 75%. Proporsi nyamuk terendah dengan status rentan terdapat di Palbapang (75%). Dari hasil uji *One Way Anova* hasilnya ($\alpha > 0,05$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara status resistensi nyamuk yang sudah mengalami kenaikan status resistensinya.

Dari ketiga desa yang diambil sampelnya diketahui bahwa Badegan (Bantul II) termasuk dalam daerah endemis, Palbapang (Bantul I) masuk dalam daerah Sporadis dan Bogoran yang termasuk desa Trirenggo (Bantul I) masuk dalam daerah Endemis. Adapun data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel.1. Uji Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* dengan Substrat DCNB

Lokasi	Status Resistensi	Jumlah	Persentase (%)
Badegan	Tinggi	0	0
	Sedang	6	15
	Rendah	34	85
Palbapang	Tinggi	0	0
	Sedang	10	25
	Rendah	30	75
Bogoran	Tinggi	0	0
	Sedang	2	5
	Rendah	38	95

Tabel 2. Data Penderita DBD per Desa Kabupaten Bantul, tahun 2002-2005

No	Puskesmas	Desa	Tahun					Keterangan th 2006
			2002	2003	2004	2005	2006	
1	Bantul II	Badegan	4	11	7	4	5	Endemis
2	Bantul I	Palbapang	7	4	0	0	1	Sporadis
3	Bantul I	Bogoran	4	12	5	1	5	Endemis

Dari 3 dusun yang diambil sampelnya, 2 dusun termasuk ke dalam kategori daerah endemis dan 1 dusun termasuk ke dalam kategori daerah sporadis untuk kejadian tahun 2006.

Jumlah fogging yang dilakukan untuk masing-masing dusun sangat tergantung dengan angka kejadian DBD, bagi daerah yang termasuk ke dalam kategori daerah endemis akan dilakukan fogging lebih sering dibandingkan dengan daerah sporadis. Dari ketiga wilayah, Palbapang yang merupakan daerah sporadis mengalami kenaikan aktivitas enzim esterase, sedangkan berdasarkan aktivitas *glutathion S transferasenya*, daerah ini juga paling tinggi jumlah nyamuknya yang mengalami resistensi sedang dibandingkan wilayah lainnya. Jadi kemungkinan kedua enzim ini bekerja semua dalam detoksifikasi insektisida di daerah Palbapang, meskipun belum masuk ke dalam kategori resisten (nyamuk masih rentan). Daerah Balbapang merupakan daerah sporadik, berarti jumlah fogging yang dilakukan lebih sedikit dibandingkan dengan dua daerah lainnya yang termasuk ke dalam daerah endemis. Meskipun termasuk daerah sporadik, daerah Palbapang ternyata memiliki aktivitas enzim esterase dan *glutathion S transferase* paling tinggi. Hal ini kemungkinan menunjukkan bahwa resistensi serangga tidak hanya ditentukan dari jumlah paparan yang terjadi tetapi juga dipengaruhi dari bagaimana reaksi yang terjadi pada saat terjadi paparan, apakah akan menyebabkan mutasi basa G119S yang tunggal atau ganda.³ Meskipun jumlah *fogging* yang dilakukan sangat berbeda tetapi kadar enzim esterase dan *glutathion-S-transferase* rata-rata yang terkandung di dalam tubuh nyamuk dari masing-masing daerah secara statistik tidak berbeda secara bermakna ($p > 0,05$).

Diskusi

Kabupaten Bantul merupakan salah satu wilayah di Daerah Istimewa Yogyakarta dengan batas sebelah Utara adalah Kodya Yogyakarta dan sebelah Selatan adalah Pantai Selatan. Semakin ke utara cenderung semakin tinggi di atas permukaan laut. Hampir sebagian besar wilayah Bantul merupakan daerah endemik Demam Berdarah Dengue.

Penentuan aktivitas enzim GST dilakukan untuk mengetahui seberapa besar aktivitas enzim yang mengkatalisis reaksi konjugasi antara GSH dengan DCNB. Aktivitas enzim GST nyamuk dihitung sebagai produk konjugat GS-CNB yang dihasilkan dari reaksi konjugasi antara GSH dengan DCNB yang dikatalisis oleh masing-masing enzim GST dari nyamuk di daerah endemic dan non endemic malaria. yang diukur secara spektrofotometri (Habig dkk., 1974).⁵ Penetapan aktivitas enzim dilakukan secara individual dengan jumlah sample 40 ekor nyamuk dan memberikan nilai *rate* (serapan permenit).

Dalam penelitian ini, sebagai medium inkubasi digunakan bufer fosfat 0,1 M pH 7,5 yang dibuat dari campuran K_2HPO_4 dan KH_2PO_4 sesuai dengan penelitian Habig dkk. tahun 1974 yang menyatakan bahwa medium inkubasi pada pH 7,5 diperlukan untuk inkubasi pada reaksi konjugasi GSH dengan substrat DCNB.⁵ Hasil penelitian lain juga menyatakan bahwa reaksi konjugasi antara GSH dengan DCNB optimum pada pH 7,5 sampai 9,0.⁶ Selain itu berdasarkan hasil optimasi pH bufer fosfat 0,1 M untuk konjugasi DCNB dengan GSH dengan katalis enzim GST yang telah dilakukan oleh Tjokronegoro *cit* Sudibyo (1997), diketahui bahwa medium inkubasi pada pH 7,5 merupakan medium yang paling baik untuk enzim GST serta memberikan produk konjugat yang tinggi.⁷ Apabila digunakan komponen *buffer* lain yang mengandung ion-ion halida, SCN^- , NO_3^- , arsenat atau molibdat dilaporkan dapat menghambat aktivitas enzim GST.⁸

Pengukuran produk konjugat dilakukan pada panjang gelombang 345 nm, yang merupakan panjang gelombang maksimum dalam suatu spektrum yang berbeda mulai dari awal pencampuran dan pengujian sampai pembentukan produk sempurna. Menurut Habig dkk. (1974), hasil pengukuran adalah linier jika pengukuran produk konjugat dilakukan dalam waktu kurang dari tiga menit dengan perubahan serapan kurang dari 0,05 per menit. Oleh sebab itu, pengukuran produk konjugat yang terbentuk dilakukan dari menit ke 0 sampai menit ke 3. Harga koefisien ekstingsi molar untuk konjugat GS-CNB pada λ 345 nm adalah $8,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.⁵

Habig dan Jakoby pada tahun 1981 telah melaporkan bahwa adanya pelarut organik (misal etanol) dalam kadar lebih besar dari 5,0 % dapat menghambat aktivitas GST. Penggunaan pelarut organik dalam penelitian ini (etanol untuk melarutkan DCNB) diusahakan dengan konsentrasi akhir pada campuran inkubasi kurang dari 5,0 % untuk menghindari penghambatan aktivitas GST oleh adanya pelarut-pelarut organik tersebut.⁹

Aktivitas enzim dinyatakan sebagai aktivitas spesifik yang diartikan sebagai jumlah enzim yang mengkatalisis pembentukan 1 μmol produk konjugat per menit per mg protein yang terkandung dalam medium akhir inkubasi.

Dari hasil pengukuran aktivitas enzim dari tiga kelompok perlakuan didapatkan hasil bahwa tidak ada kenaikan yang signifikan ($\alpha > 0.05$) aktivitas enzim GST pada ketiga kelompok nyamuk. Dengan kata lain tidak terjadi resistensi pada ketiga kelompok nyamuk tersebut (masih rentan).

GST merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi konjugasi antara senyawa elektrofilik dengan GSH.¹⁰ Enzim GST terlibat dalam mekanisme inflamasi dalam pembentukan beberapa mediator inflamasi.

Dari hasil pengukuran aktifitas enzim Glutathione S-transferase menunjukkan bahwa hampir semua nyamuk di semua tiga wilayah yang ada di Kabupaten bantul (Bogoran, Palbapang, Badegan) tidak ditemukan adanya kenaikan aktifitas enzim tersebut hal ini berarti bahwa di tiga wilayah tersebut nyamuk *Ae. aegypti* masih rentan terhadap insektisida malathion.

Kesimpulan

Hasil pengukuran aktifitas enzim glutathione S-transferase terhadap nyamuk *Ae. Aegypti* dari ketiga lokasi penelitian (Palbapang, Bogoran dan Badegan) tidak menunjukkan kenaikan aktifitas kedua enzim tersebut dan nyamuk di tiga lokasi penelitian masih rentan terhadap insektisida malathion, sehingga penggunaan insektisida ini untuk pengendalian nyamuk masih dapat digunakan, tetapi harus mempertimbangkan efek samping insektisida tersebut.

Daftar Pustaka

1. Mardihusodo, S.J., 1995. *Deteksi Resistensi Insektisida Organofosfat pada Nyamuk Ae. Aegypti Linn. Dengan Metode uji Noda Kertas Saring*. Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada, 3-17
2. Hoedjo. 1993. *Sektor Demam Berdarah dan Penanggulangannya :Majalah Parasitologi Indonesia 6*, Jakarta, hal 32-42.
3. Weill M., Berthomeu A., Berticat C., Lutfalla G., Negre V., Pasteur N., Philips A., Leonetti J.P., Fort P., and Raymond M. 2004. Insecticide resistance: a silent base prediction, *Current Biology*, Vol.14, No. 14:552-553
4. Pratiknya, W. 1986. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*, C.V. Rajawali. Jakarta
5. Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione-S-Transferase The first Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation, *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
6. Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., and Jermin, L.S. 1997. Zeta, a novel class of glutathione S-transferase in a range of species from plants to human, *Biochem. J.*, 328: 929-935.
7. Sudiby. 1997. *Penelusuran Senyawa Kandungan Tumbuhan Insektisida Indonesia Bioaktif terhadap Serangga, Disertasi Universitas Padjajaran*, Bandung.
8. Clark, A.G., Hamilton, J.F., and Marshall, S.N. 1991. Inhibition by inorganic anions of glutathione S-transferase from insect and mammalian sources, *Biochem. J.*, 278: 193-198.
9. Habig, W.H. and Jakoby, W.B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferase, *Methods of Enzymol.*, 77: 398-403..
10. Van Der Aar. 1997. *Structure-activity relationships and active site characterization of glutathione S-transferase*, Ph.D Thesis, Division of Molecular Toxicology, Department of Pharmacochemistry, LACDR-Vrije II, Amsterdam.