

KK
KK
TKD. 46/11
Dam
u

TESIS

**UJI RESISTENSI TERHADAP MALATHION PADA NYAMUK
DEWASA *Aedes aegypti* ASAL DENPASAR BARAT DAN
LPT UNAIR SURABAYA**



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**PUTU AYU ASRI DAMAYANTI
090610352M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2008

**UJI RESISTENSI MALATHION PADA NYAMUK DEWASA
Aedes aegypti ASAL DENPASAR BARAT DAN
LPT UNAIR SURABAYA**

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga

Oleh:

Putu Ayu Asri Damayanti
090610352M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Tanggal 29 Juli 2008

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL, 25 JULI 2008

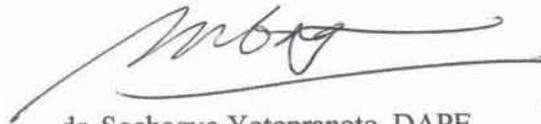
Oleh

Pembimbing I



Prof. Dr. Sri Subekti, DEA, drh
NIP 130687296

Pembimbing II



dr. Soebagyo Yotopranoto, DAPE
NIP 130685847

Mengetahui:

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga,



Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD
NIP 130541984

Telah Diuji pada
Tanggal 29 Juli 2008
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. H Setiawan K, MSc. Drh
Anggota :
1. Prof. Dr. Sri Subekti, DEA. Drh
2. dr. Soebagyo Yotopranoto, DAPE
3. Dr. Hari Basuki N., Mkes, dr
4. dr. Machfudz, DTMH, MS
5. dr. Kusmartisnawati, MS, SpParK

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kehadapan Ida Sang Hyang Widhi Wasa - Tuhan Yang Maha Esa, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis yang berjudul Uji Resistensi Terhadap Malathion pada Nyamuk Dewasa *Aedes aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada pembimbing pertama Prof. Dr. Sri Subekti, DEA, drh. karena di sela-sela kesibukan yang begitu padatnya tanpa mengenal waktu menyempatkan diri untuk membimbing, memberikan saran, masukan, dan koreksi dalam pembuatan tesis ini. Tidak ada satu pun kendala yang saya temui selama di bawah bimbingan beliau. Terima kasih yang tak terkira dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya sampaikan kepada dr. Soebagyo Yotopranto, DAPE yang tidak hanya membantu tanpa kenal waktu dalam pembuatan tesis ini saja, tapi selama dua tahun ini bersedia dengan sabar membimbing dan memberikan begitu banyak informasi yang berharga di bidang entomologi. Dengan ketelitian, kecermatan, dan ketekunan dalam membimbing dan memberi masukan sangat membantu dalam penyusunan tesis ini.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. Hari Basuki N., dr, MKes., atas bimbingannya dalam pembuatan tesis ini khususnya di bidang statistik. Di sela-sela kesibukan yang padat masih menyempatkan diri untuk membimbing dan memberi masukan demi terselesainya tesis ini.

Saya ucapkan terima kasih juga sebesar-besarnya kepada drh. Sitti Rahmah Umniyati, SU yang dengan penuh perhatian dan kesabaran membimbing dalam pelaksanaan uji hayati dan biokemis di Laboratorium Entomologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.

Terima kasih yang tak terhingga juga saya ucapkan kepada Bapak Purwono yang bertugas sebagai pembimbing analisis yang bertugas di Laboratorium Entomologi Fakultas Kedokteran UGM. Beliau dengan sabar dan penuh perhatian membimbing tanpa mengenal waktu, memberikan keterampilan yang sangat berguna baik bagi penyelesaian tesis ini maupun bagi bekal di kemudian hari dalam melakukan uji hayati maupun biokemis.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Bapak Kris Cahyono dari Laboratorium Entomologi Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga atas bantuan yang tak terhingga dalam pengadaan sampel untuk penelitian ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Fasich, Apt, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program magister.

Dekan Fakultas Kedokteran Unair Prof. Dr. Muhammad Amin, dr.Sp.P(K) atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program magister.

Kepala Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dr. Kusmartisnawati, MS, SpParK.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Kepala Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM Prof. dr. Supargiyono, SU, PhD., SpParK atas kesempatan yang diberikan pada saya untuk melakukan penelitian di Laboratorium Entomologi.

Tak lupa saya ucapkan terima kasih pada suami, anak, dan keluarga yang selalu mendukung dan mendampingi setiap saat demi terselesaikannya penelitian ini. Dan akhir kata saya ucapkan terima kasih pada semua pihak yang membantu dalam penyelesaian tesis ini.

RINGKASAN

**Uji Resistensi Terhadap Malathion pada Nyamuk Dewasa *Aedes aegypti*
Asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya**

Penyakit DBD merupakan penyakit yang endemis di seluruh wilayah Indonesia, termasuk juga di kota Denpasar. Adapun vektor penyakit DBD adalah nyamuk *Ae. aegypti* yang memiliki habitat pada air jernih yang terdapat pada tempat penampungan air di dalam maupun di luar rumah. Masa pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *Ae. aegypti* dapat dibagi menjadi empat stadium yaitu: telur, larva, pupa, dan dewasa. Masing-masing stadium memiliki morfologi yang khas

Pengendalian vektor merupakan satu-satunya cara untuk memutus rantai penularan DBD karena sampai saat ini belum ditemukan obat untuk menyembuhkan ataupun vaksin yang tepat untuk mencegah penyakit DBD. Salah satu cara pengendalian vektor nyamuk *Aedes aegypti* yang sering dilakukan adalah dengan menggunakan bahan kimiawi berupa insektisida. Salah satu insektisida organofosfat yang sering digunakan adalah malathion. Malathion digunakan dalam program pengendalian DBD (foging) di seluruh wilayah Indonesia selama bertahun-tahun. Di Denpasar kegiatan foging rutin dilaksanakan 2 kali dalam setahun (foging masal) dan sewaktu-waktu jika ada kasus DBD di masyarakat (foging fokus). Penggunaan insektisida yang lama dapat memunculkan timbulnya resistensi pada nyamuk sasaran, seperti yang terjadi di berbagai negara di dunia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui status resistensi malathion nyamuk *Ae. aegypti* di Denpasar Barat yang merupakan daerah endemis DBD dan yang berasal dari Laboratorium Entomologi Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga Surabaya. Adapun tujuan khususnya adalah untuk mengetahui status resistensi; LC_{50} , LC_{95} , dan LC_{99} dengan menggunakan analisis probit; dosis diagnostik malathion; aktifitas esterase non spesifik nyamuk yang diukur dengan menggunakan ELISA reader BIORAD; perbedaan tingkat resistensi yang dinilai dari besarnya aktifitas esterase non spesifik antara nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari Denpasar Barat dan dari Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga (Unair) Surabaya yang dianalisis dengan menggunakan uji t dan *one way anova*.

Metode penelitian yang dilakukan adalah dengan melakukan uji hayati dan biokemis. Uji hayati dan uji biokemis menggunakan unit sampel berupa nyamuk betina *Ae. aegypti* berumur 2-3 hari yang diberi pakan glukosa 10%. Untuk uji hayati digunakan 6 variasi konsentrasi malathion yang besarnya masing-masing diperoleh dari hasil uji pendahuluan yaitu 20 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm. Dilakukan replikasi empat kali untuk setiap konsentrasi. Nyamuk *Ae. aegypti* berasal dari telur nyamuk yang ditangkap dengan menggunakan *ovitrap* di wilayah Denpasar Barat (Desa Dauh Puri Kauh, Desa Tegak Kerta, dan Desa Padangsambian), dan berasal dari koloni Laboratorium Entomologi LPT Unair.

Uji hayati (*bioassay*) berguna untuk mengetahui tingkat resistensi nyamuk *Ae. aegypti* berdasarkan persentase kematian nyamuk setelah 24 jam, yang dikategorikan sesuai dengan kriteria berdasarkan Davidson dan Zahar (1973) menjadi sensitif atau rentan (SS) jika kematian >98%; toleran atau resisten sedang (RS) jika kematian 80-98%; dan resisten (RR) jika kematian <80%. Pada uji hayati akan dinilai persentase kematian nyamuk setelah dipaparkan malathion dosis standar WHO yaitu malathion 5%.

Uji biokimia dalam penelitian ini menggunakan substrat α -naphthyl acetate dan bertujuan untuk mengukur aktivitas enzim esterase non spesifik yang pada umumnya meningkat pada nyamuk yang mengalami resistensi terhadap insektisida golongan organofosfat. Malathion termasuk ke dalam golongan organofosfat, sehingga jika ingin mengetahui mekanisme yang mendasari resistensi dengan jalan mengukur aktifitas enzim nyamuk, salah satunya adalah mengukur aktifitas esterase non spesifik. Aktifitas esterase non spesifik dapat diukur dengan cara mengamati secara visual intensitas warna terakhir yang muncul. Intensitas warna akhir ini dapat dinilai secara kualitatif dan kuantitatif. Semakin tua warna mencerminkan semakin meningkatnya aktivitas enzim. Secara kualitatif hasilnya dapat diklasifikasikan menjadi skor 0 bila tidak berwarna, 1 bila berwarna biru muda, 2 bila berwarna biru kehijauan, dan 3 bila berwarna biru tua. Secara kuantitatif intensitas warna akhir dapat dinilai dengan pembacaan *absorbance value* (AV) dari tiap replikat dengan ELISA reader pada $\lambda = 450$ nm. Dari nilai AV yang mencerminkan aktifitas esterase non spesifik disertai dengan konfirmasi skor warna, maka tingkat resistensi berdasarkan aktifitas esterase non spesifik dapat digolongkan menjadi (SS), toleran (SR), dan resisten (RR)

Hasil uji hayati adalah nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari Denpasar Barat maupun LPT Unair Surabaya belum resisten (status SS) yaitu terjadi kematian sebesar 100% pada dosis standar WHO malathion 5%. Dari analisis probit diperoleh LC_{50} , LC_{95} , dan LC_{99} malathion Denpasar Barat adalah secara berurutan 32,20 ppm; 86,91 ppm; 131,13 ppm dan LPT Unair Surabaya 51,07 ppm; 121,41 ppm; 245,96 ppm. Dosis diagnostik nyamuk LPT Surabaya lebih besar yaitu 491,92 ppm dibanding Denpasar Barat sebesar 262,26 ppm. Dosis diagnostik nyamuk kedua daerah ini jauh lebih kecil dari dosis standar WHO malathion 5% (50.000 ppm). Dari analisis probit juga ditemukan fakta bahwa untuk membunuh sejumlah nyamuk LPT Unair Surabaya diperlukan dosis yang lebih tinggi dibandingkan Denpasar Barat yang berarti nyamuk LPT Unair Surabaya relatif lebih resisten walaupun keduanya termasuk dalam kategori yang sama yaitu belum resisten terhadap malathion (status SS).

Hasil uji biokemis berdasarkan penilaian besarnya AV yang disertai konfirmasi dengan skor warna diperoleh hasil bahwa nyamuk Denpasar Barat sudah terdapat peningkatan aktifitas esterase non spesifik yaitu 7,78% sudah mulai resisten (RR); 24,45% toleran (SR); dan 67,78% masih sensitif (SS) yaitu tidak ada peningkatan aktifitas esterase non spesifik. Sedangkan nyamuk LPT Unair Surabaya belum ada yang resisten namun 13,33% di antaranya sudah mulai toleran (SR), dan sebagian besar tidak ada peningkatan aktifitas esterase non spesifik yaitu 86,67% masih sensitif (SS). Dari hasil uji t diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna tingkat resistensi antara *Ae. aegypti* Denpasar Barat dengan LPT Unair Surabaya ($p=0,000$).

Sedangkan aktifitas esterase non spesifik tiap daerah yaitu terdapat perbedaan yang sangat bermakna ($p=0.000$) antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Dauh Puri Kauh dan Desa Tegal Kerta serta antara Desa Padangsambian dengan Dauh Puri ($p=0,003$). Perbedaan yang bermakna terdapat antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Padangsambian ($p=0,016$).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa nyamuk dewasa *Ae. aegypti* yang berasal dari Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya belum resisten terhadap malathion tetapi sudah terdapat aktifitas esterase non spesifik yang mengindikasikan adanya mekanisme resistensi terhadap insektisida. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menemukan insektisida apa yang telah mengalami resistensi melalui mekanisme esterase non spesifik.

SUMMARY

**MALATHION RESISTANCE TEST IN *Aedes aegypti*
FROM WEST DENPASAR AND ITD SURABAYA**

Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) is endemic disease in Indonesia including in Denpasar Barat. *Aedes aegypti* serves as DHF vector which lives in clear water inside the container in door or out door. *Ae. aegypti* has four development stages in their life cycles, those are egg, larvae, pupa and adult (imago). Each stage has their own morphological characteristic.

One of the most-common efforts to control the vector of *Ae. aegypti* is by the application of chemical substances, the insecticide, either as larvicide or adulticide. One of the organophosphate insecticides frequently used as adulticide is malathion. Malathion is used in DHF controlling program (fogging) in the whole areas of Indonesia for more than 10 years. In Denpasar, fogging activity is routinely conducted twice a year (mass fogging) and anytime if there is a DHF case in the community (focal fogging). Prolonged use of insecticide may result in resistance in target mosquitoes, as that occurs in various countries worldwide.

The objective of this study was to find malathion resistance status of *Ae. aegypti* in West Denpasar, a DHF endemic area, and the *Ae. aegypti* from Entomology Laboratory, Institute of Tropical Disease (ITD), Airlangga University, Surabaya. The particular objectives of this study were to find the resistance status of LC₅₀, LC₉₅, and LC₉₉ using probit analysis, malathion diagnostic dose; mosquito's non-specific esterase activity measured using ELISA reader BIORAD, the difference of resistance level as measured from the extent of non-specific esterase activity in *Ae. aegypti* from West Denpasar and those from ITD, Airlangga University, Surabaya, as analyzed using t test and one-way anova test.

This study used biological and biochemical test. These tests employed sample unit that comprised of female *Ae. aegypti* aged 2-3 days, which were fed with glucose 10%. For biological test, we used six variations of malathion concentrations. The variations were obtained from the preliminary test, i.e., 20 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 60 ppm, and 80 ppm. Four times replication was conducted for each concentration. The mosquito was obtained from *Ae. aegypti* eggs caught using *ovitrap* in the area of West Denpasar (the villages of Dauh Puri Kauh, Tegal Kerta, and Padangsambian), and those from the colony in Entomology Laboratory, ITD, Airlangga University.

The biological test (bioassay) was used to find the level of resistance of *Ae. aegypti* based on the percentage of died mosquito after 24 hours, which was categorized according to the criteria of Davidson and Zahar (1973), which became sensitive or susceptible (SS) if the death rate > 98%; tolerant or moderately resistant (RS) if the death rate is between 80-98%; and resistant (RR) if death rate is more than 80%. The biological test assessed the percentage of mosquito death after being exposed to malathion 5% WHO standard dose.

The biochemical test in this study used the substrate *a*-naphthyl acetate and was aimed to measure the activity of non-specific esterase enzyme, which is generally increasing in mosquitoes that are resistant against organophosphate insecticide. Malathion belongs to organophosphate, so that in finding the underlying mechanism of resistance by measuring mosquito enzyme activity, one of the methods is by measuring the activity of non-specific esterase. It can be measured by visually observing the intensity of the final color emerged. The intensity of the color can be measured qualitatively and quantitatively. The darker the color, the higher the enzyme activity. Qualitatively, the result can be classified into the scores 0 if no color, 1 if the color is light blue, 2 blue, and 3 dark blue. Quantitatively, the intensity of the final color can be measured by absorbance value (AV) reading from each replicate with ELISA reader in $\lambda = 450$ nm. From AV value that reflects the activity of non-specific esterase activity and confirmed with color scores, the resistance level based on the non-specific esterase activity can be classified as susceptible (SS), tolerant (SR), and resistant (RR).

The result of biological test revealed that both *Ae. aegypti* from West Denpasar and from ITD, Airlangga University, Surabaya, has not been resistant (SS status), in which the death rate was 100% in WHO standard dose of malathion 5%. Probit analysis revealed that malathion LC_{50} , LC_{95} , and LC_{99} of West Denpasar were respectively 32.20 ppm; 86.91 ppm; and 131.13 ppm, while those from ITD, Airlangga University, Surabaya, were respectively 51.07 ppm; 121.41 ppm; and 245.96 ppm. The diagnostic dose of the mosquito from ITD, Surabaya, was higher, i.e., 491.92 ppm as compared to that from West Denpasar, which was 262.26. The diagnostic dose of the mosquito from these two areas was far lower than WHO standard dose malathion 5% (50,000 ppm). Probit analysis also revealed a fact that to kill some mosquitoes from ITD, Airlangga University, Surabaya, a higher dose was needed as compared to the dose for those from West Denpasar. This indicated that the mosquitoes from ITD, Airlangga University, Surabaya, were more resistant, although both belonged to the same category, not resistant to malathion (SS status).

The result of biochemical test based on the assessment of Absorbance Value (AV) along with the confirmation of color scores revealed that the mosquitoes from West Denpasar had increased activity of non-specific esterase which 7.78% began to be resistant (RR), 25.56% tolerant (SR), and 64.44 remained sensitive (SS), in which there was no increase of non-specific esterase activity. Whereas, none of the mosquitoes from ITD, Airlangga University, Surabaya, showed resistance, but 13.33% started to be tolerant (SR), and mostly, 86.67% showed no increase of non-specific esterase activity, indicating that they were sensitive (SS). The activity of non-specific esterase in mosquitoes reflecting the resistance level was measured from AV value. From the result of t test it was found that there was very significant difference in the resistance level between *Ae. aegypti* from West Denpasar and those from ITD, Airlangga University, Surabaya ($p = 0.000$). Whereas, the non-specific esterase activity in each area, between ITD and two villages Dauh Puri Kauh Village and Tegal kerta Village were highly significant difference ($p=0,0000$) and between Padangsambian Village and Dauh Puri Kauh village

(0,003). Also the difference were significant between ITD and Padangsambian Village ($p=0,016$).

It can be concluded that the *Ae. aegypti* in West Denpasar and ITD has not been resistant but there was activity of non-specific esterase in both mosquitoes that indicated there was resistant mechanism happened.

ABSTRAK

**Uji Resistensi Terhadap Malathion pada Nyamuk Dewasa *Aedes aegypti*
Asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya**

Penggunaan insektisida malathion yang lama dan terus menerus menyebabkan timbulnya resistensi terhadap malathion di beberapa negara di dunia. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan status resistensi *Ae. aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya terhadap malathion.

Hasil uji hayati menyatakan baik nyamuk *Ae. aegypti* dari Denpasar Barat maupun LPT Unair Surabaya belum resisten terhadap malathion yaitu 100% nyamuk mati dengan konsentrasi standar WHO. LC_{50} *Ae. aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya secara berurutan 32,20 ppm dan 51,07 ppm; LC_{95} 86,91 ppm dan 121,41 ppm; dan LC_{99} 131,13 ppm dan 245,96 ppm. Dosis diagnostik *Ae. aegypti* Denpasar Barat 262,26 ppm dan LPT Unair Surabaya 491,92 ppm. Hasil uji biokemis nyamuk Denpasar Barat sudah terdapat peningkatan aktifitas esterase non spesifik yaitu 7,78% resisten (RR); 24,45% toleran (SR); dan 67,78% sensitif (SS). Nyamuk LPT Unair Surabaya 0% (RR), 13,33% (SR), dan 86,67% (SS). Terdapat perbedaan yang bermakna aktifitas esterase antara *Ae. aegypti* Denpasar Barat dengan LPT Unair Surabaya ($p=0,000$). Sedangkan aktifitas esterase non spesifik tiap daerah yaitu terdapat perbedaan yang sangat bermakna ($p=0,000$) antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Dauh Puri Kauh dan Desa Tegal Kerta serta antara Desa Padangsambian dengan Dauh Puri ($p=0,003$). Perbedaan yang bermakna terdapat antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Padangsambian ($p=0,016$).

Kesimpulan yang diperoleh bahwa *Ae. aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair belum resisten terhadap malathion berdasarkan uji hayati namun sudah terdapat aktifitas esterase non spesifik dimana terdapat perbedaan aktifitas esterase yang bermakna antara *Ae. aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya.

Key word:

Aedes aegypti, resistensi malathion, uji hayati, uji biokemis.

ABSTRACT

Malathion Resistance in *Aedes aegypti* Adult Mosquito of Denpasar Barat and Institute of Tropical Disease Surabaya

Malathion using for long time and continuously to mosquito populations has generated insecticide resistance in several countries in the world. This study was aimed to determine the malathion resistance in *Aedes aegypti* adult mosquito of Denpasar Barat and Institute of Tropical Disease (ITD) Unair Surabaya.

The bioassay result showed that both *Aedes aegypti* from Denpasar Barat and ITD Unair Surabaya still susceptible to organophosphate because all mosquito killed 100% based on WHO diagnostic standard. LC_{50} *Ae. aegypti* from Denpasar Barat and ITD Unair Surabaya respectively 32,20 ppm and 51,07 ppm; LC_{95} were 86,91 ppm and 121,41 ppm; and LC_{99} were 131,13 ppm and 245,96 ppm. The malathion diagnostic dose from *Ae. aegypti* Denpasar Barat was 262,26 ppm and ITD Unair Surabaya 491,92 ppm. The biochemical assay showed there were activity of esterase non specific of *Ae. aegypti* from Denpasar Barat 7,78% (RR); 24,45% (SR); and 67,78% (SS). And ITD Unair Surabaya 0% (RR); 13,33% (SR) and 86,67 % (SS). There was very significant difference in esterase non specific activity between *Ae. aegypti* from West Denpasar and those from ITD ($p = 0.000$). Whereas, the non-specific esterase activity in each area, between ITD and two villages Dauh Puri Kauh Village and Tegal kerta Village were highly significant difference ($p=0,0000$) and between Padangsambian Village and Dauh Puri Kauh village (0,003). Also the difference were significant between ITD and Padangsambian Village ($p=0,016$).

It can be concluded that *Ae aegypti* from Denpasar Barat and ITD were not resistant to malathion yet, but there were esterase on specific activity which were significantly difference between *Ae. aegypti* from Denpasar Barat and ITD Unair Surabaya.

Key word:

Aedes aegypti, Denpasar Barat, malathion resistance, bioassay, biochemical assay.

DAFTAR ISI

Halaman

Sampul Dalam.....	i
Prasyarat Gelar.....	ii
Persetujuan.....	iii
Penetapan Panitia.....	iv
Ucapan Terima Kasih.....	v
Ringkasan.....	vii
Summary.....	x
Abstrak.....	xii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN.....	xix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	3
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Penyakit Demam Berdarah Dengue.....	6
2.2 Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	10
2.2.1 Morfologi <i>Ae. aegypti</i>	10
2.2.1.1 Telur <i>Ae. Aegypti</i>	11
2.2.1.2 Larva <i>Ae. aegypti</i>	11
2.2.1.3 Pupa.....	14
2.2.1.4 Nyamuk Dewasa.....	14
2.2.2 Siklus Hidup.....	15
2.2.3 Ekologi dan Bionomik Vektor.....	17
2.3 Malathion.....	19
2.2.1 Metabolisme Malathion.....	21
2.2.2 Cara Kerja (<i>Mode of actions</i>).....	21
2.4 Mekanisme Resistensi.....	23
2.4.1 Resistensi Metabolik.....	25
2.4.2 Penurunan Sensitivitas Situs Sasaran.....	28
2.4.3 Penurunan penetrasi.....	28
2.4.4 Perubahan Perilaku.....	29
2.5 Resistensi Insektisida Organophosphat Malathion.....	29
2.6 Pemeriksaan Resistensi.....	31
2.6.1 Dosis diagnostik.....	31
2.6.2 Dose Respon Bioassay.....	34

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	36
3.2 Hipotesis Penelitian.....	38
BAB IV MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	39
4.1 Jenis Rancangan Penelitian.....	39
4.2 Subyek Penelitian	39
4.3 Variabel Penelitian.....	40
4.4 Bahan Penelitian.....	42
4.5 Instrumen Penelitian.....	42
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	43
4.7 Prosedur pengambilan atau pengumpulan data.....	43
4.8 Cara pengolahan dan analisis data.....	50
4.9 Kerangka Operasional.....	53
BAB V HASIL DAN ANALISIS.....	54
5.1 Hasil dan Analisis Uji Hayati.....	54
5.1.1 Hasil Uji Hayati <i>Ae. aegypti</i> LPT dan Denpasar Barat	54
5.1.2 Analisis Uji Hayati <i>Ae. aegypti</i> LPT dan Denpasar Barat	56
5.2 Hasil dan Analisis Uji Biokemis.....	59
5.2.1 Hasil Uji Biokemis LPT Surabaya.....	59
5.2.2 Hasil Uji Biokemis Desa Dauh Puri Kauh.....	61
5.2.3 Hasil Uji Biokemis Desa Tegal Kerta	63
5.2.4 Hasil Uji Biokemis Desa Padangsambian.....	64
5.2.5 Analisis Hasil Uji Biokemis <i>Ae. Aegypti</i> asal LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat	67
BAB VI PEMBAHASAN.....	69
6.1 Status Resistensi <i>Ae. Aegypti</i> asal LPT dan Denpasar Barat terhadap Malathion.....	69
6.2 Penentuan LC ₅₀ , LC ₉₅ , LC ₉₉ , dan Dosis Diagnostik.....	70
6.3 Uji Biokemis.....	72
6.4 Perbedaan Aktifitas Esterase <i>Ae. aegypti</i> antara LPT Unair dan Denpasar Barat.....	75
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	77
6.1 Kesimpulan.....	77
6.2 Saran.....	77
Daftar Pustaka.....	79
Lampiran.....	84

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	: Rekapitulasi kejadian DBD di Kota Denpasar, (Dikes Kota Denpasar, 2007).....	8
Tabel 2.2	: Taksonomi <i>Aedes aegypti</i> (Sumber: James, 1969).....	10
Tabel 2.3	: Karakteristik Larva <i>Ae. Aegypti</i> instar I-IV (Service 1996).....	12
Tabel 2.4	: Perbedaan morfologi <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i>	15
Tabel 3.1	: Distribusi jumlah larutan stok yang diperlukan untuk membuat berbagai serial konsentras.....	47
Tabel 5.1	: Status resistensi nyamuk <i>ae. aegypti</i> LPT Unair dan Denpasar Barat	54
Tabel 5.2	: Hasil Uji Hayati <i>Ae. aegypti</i> LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat terhadap 6 variasi konsentrasi malathion	56
Tabel 5.3	: Nilai LC ₅₀ , LC ₉₅ , LC ₉₉ 24 jam dan nilai <i>Fiducial limits</i> (FI) 95% terhadap nyamuk <i>Ae. aegypti</i> LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat.....	57
Tabel 5.4	: Dosis Diagnostik Malathion (ppm).....	57
Tabel 5.5	: Rekapitulasi hasil uji resistensi biokemis nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dewasa LPT Unair Surabaya	60
Tabel 5.6	: Hasil uji resistensi biokemis nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dewasa Dauh Puri Kauh – Denpasar Barat.....	62
Tabel 5.7	: Hasil uji resistensi biokemis nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dewasa Tegal Kerta – Denpasar Barat.....	63
Tabel 5.8	: Hasil uji resistensi biokemis nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dewasa Padangsambian – Denpasar Barat	64
Tabel 5.9	: Rekapitulasi status resistensi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> Denpasar Barat dengan uji biokemis yang menghidrolisis Substrat α -naphtyl asetat	66
Tabel 5.10	: Rekapitulasi status resistensi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dengan uji biokemis yang menghidrolisis Substrat	66
Tabel 5.11	: Analisis Uji T-test independent perbedaan aktifitas esterase non spesifik antara LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat	67
Tabel 5.12	: Analisis one way anova perbedaan AV daerah LPT Unair, Surabaya, Desa Dauh Puri Kauh, Desa Tegal Kerta, dan Desa Padangsambian	68
Tabel 5.13	: Hasil LSD	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: Grafik Jumlah Kasus DBD di Kota Denpasar Tahun 2002-2006.....	7
Gambar 2.2	: Grafik Angka Kematian (CFR) DBD Kota Denpasar Tahun 2002-2006 (Dikes Kota Denpasar 2007.....	8
Gambar 2.3	: Telur <i>Ae. aegypti</i> (Sumber: Service, 1996).....	11
Gambar 2.4	: Pada segmen terminal larva <i>Ae. aegypti</i> tampak siphon yang pendek dengan 1 pasang subventral hair tuft (Service, 1996	13
Gambar 2.5	: Larva <i>Aedes aegypti</i> mengambil oksigen di permukaan (Sumber Service, 1996)	13
Gambar 2.6	: Pupa <i>Ae. aegypti</i> . (Sumber: Service, 1996).....	14
Gambar 2.7	: Nyamuk Dewasa (Sumber: Service, 1996).....	15
Gambar 2.8	: Siklus Hidup <i>Ae. aegypti</i> (Service, 1996).....	16
Gambar 2.9	: Struktur kimia malathion (Kegley <i>et all</i> , 2007.....	20
Gambar 2.10	: Pola hubungan resistensi silang dari beberapa kelas insektisida yang sering terjadi (Brogdon <i>and</i> McAllister, 1998).....	24
Gambar 2.11	: Mortalitas Log-dose probit untuk strain yang sensitif (SS), toleran (RS), serta strain resisten (RR)	35
Gambar 5.1	: Gambar hubungan antara logaritma konsentrasi malathion dengan persentase kematian nyamuk <i>Ae. aegypti</i> LPT Surabaya dan Denpasar Barat (garis probit)	59
Gambar. 5.2	: Grafik batang pola status resistensi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> LPT Surabaya secara: A. Kuantitatif (AV); B Skor warna dengan konfirmasi AV	61
Gambar. 5.3	: Grafik batang pola status resistensi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> Desa Dauh Puri Kauh secara: A. Kuantitatif (AV); B Skor warna dengan konfirmasi AV	62
Gambar. 5.4	: Grafik batang pola status resistensi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> Desa Tegal Kerta secara: A. Kuantitatif (AV); B Skor warna dengan konfirmasi AV	64
Gambar. 5.5	: Grafik batang pola status resistensi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> Desa Padangsambian secara: A. Kuantitatif (AV); B Skor warna dengan konfirmasi	65

DAFTAR SINGKATAN

ACh	: <i>Acethyl Choline</i>
AChE	: <i>Acethyl Choline Esterase</i>
AV	: <i>Absorbance Value</i>
DBD	: Demam Berdarah Dengue
LC	: <i>Lethal Concentration</i>
LD-P	: Log Dose Probit
FI	: <i>fiducial limit</i>
LPT	: Lembaga Penyakit Tropis
ITD	: <i>Institute of Tropical Disease</i>
SS	: Sensitif (rentan terhadap insektisida atau belum resisten)
RS	: Resisten heterosigot (toleran)
RR	: Resisten homosigot (resisten)
TPA	: Tempat Penampungan Air
USAEHA	: <i>United State Army Environmental Hygiene Agency</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) sampai saat ini masih endemis di seluruh Indonesia. Bahkan berdasarkan angka morbiditas dan mortalitas DBD pada tahun 2004, Indonesia dalam peta wabah DBD di Asia Tenggara berada di urutan kedua setelah Thailand. Di Indonesia insiden DBD tertinggi terjadi pada tahun 2006 yaitu 113.640 orang dengan jumlah kematian 1.184 orang (Koban, 2005).

Dinas Kesehatan Kota Denpasar melaporkan sepanjang tahun 2001-2006 telah terjadi tiga kali kejadian luar biasa di Denpasar yaitu pada tahun 2001, 2002, dan 2006. Jumlah penderita pada tahun 2006 sebanyak 5.627 orang dan 33 orang di antaranya meninggal. Jumlah di Kecamatan Denpasar Barat yaitu 25,2% dari semua kasus DBD di Denpasar (Dinkes Denpasar, 2007).

Obat antivirus Dengue maupun vaksin yang efektif sampai saat ini belum ditemukan, sehingga pengendalian vektor merupakan satu-satunya cara untuk memutus rantai penularan. Salah satu cara pengendalian vektor nyamuk *Aedes aegypti* yang sering dilakukan adalah dengan menggunakan bahan kimiawi sebagai insektisida. Di Indonesia termasuk di Bali golongan organofosfat (malathion dan temefos) sudah digunakan sebagai insektisida sejak tahun 1980-an dalam program nasional pengendalian malaria, DBD,

serta banyak digunakan dalam bidang pertanian. Penggunaan malathion sebagai insektisida foging di Denpasar Barat rutin dilakukan 2 kali dalam setahun sebagai program foging massal dan secara insidental bila ada kasus DBD yang sering disebut dengan foging fokus (Dinkes Denpasar Barat, 2007).

Penggunaan insektisida secara terus menerus dalam jangka waktu yang cukup lama dapat menyebabkan terjadinya penurunan kerentanan yang berakhir dengan terjadinya resistensi pada nyamuk sasaran (Mardihusodo, 1993). Resistensi *Ae. aegypti* terhadap malathion telah terjadi di beberapa negara di dunia. Di Puerto Rico (Fox, 1980), Carolina Selatan, Amerika (Mekuria *et al.*, 1994), Srilanka (Karunaratnel and Hemingway, 2001), Thailand (Jirakanjanakit *et al.*, 2005; Pethuan *et al.*, 2007), Brazil (Montella *et al.*, 2007) dan di Indonesia resistensi *Ae. aegypti* terhadap malathion secara laboratoris telah ditemukan di Yogyakarta dan Sumatera Utara (Mardihusodo, 1993; Sitorus, 2003).

Resistensi nyamuk terhadap insektisida dapat dideteksi dengan melakukan pemeriksaan uji hayati (*bioassay*) dan biokemis. Uji hayati dilakukan untuk menentukan status resistensi nyamuk terhadap suatu insektisida dan uji biokemis digunakan untuk mengetahui mekanisme yang mendasari terjadinya resistensi. Salah satu pemeriksaan biokemis yang sering dilakukan adalah untuk mengukur aktivitas enzim esterase non spesifik pada nyamuk. Esterase non spesifik dalam tubuh nyamuk berperan untuk melakukan proses detoksikasi bahan insektisida sehingga

nyamuk menjadi resisten terhadap insektisida tersebut. Pendeteksian resistensi terhadap insektisida harus dilakukan secara dini dan dilakukan secara berkala demi keberhasilan efisiensi program pengendalian vektor (WHO, 1986).

Resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap malathion di Denpasar Barat yang merupakan salah satu daerah endemis DBD sampai saat ini belum pernah dilakukan sehingga status resistensinya belum diketahui. Hal ini tentunya menyulitkan program pemberantasan vektor dalam rangka menurunkan kejadian DBD. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan diteliti mengenai resistensi *Ae. aegypti* terhadap malathion melalui pemeriksaan uji hayati dan biokemis.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah sudah terjadi resistensi nyamuk dewasa *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya terhadap malathion?
2. Apakah terdapat perbedaan aktivitas esterase non spesifik antara nyamuk *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya ?

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan umum:

Untuk mengetahui status resistensi nyamuk stadium dewasa *Ae. aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya terhadap malathion.

Tujuan khusus:

1. Untuk mengetahui status resistensi nyamuk dewasa *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya terhadap malathion melalui uji hayati
2. Untuk mengetahui LC_{50} , LC_{95} , dan LC_{99} nyamuk dewasa *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya
3. Untuk mengetahui dosis diagnostik malathion pada nyamuk dewasa *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya
4. Untuk mengetahui adanya aktivitas enzim esterase non spesifik pada nyamuk dewasa *Ae. aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya.
5. Untuk mengetahui perbedaan aktivitas esterase non spesifik nyamuk dewasa *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat praktis dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap malathion yang merupakan sumbangan berharga terhadap usaha program pengendalian

vektor dan dalam hal pendeteksian dan pemantauan resistensi nyamuk sebagai vektor penyakit terhadap insektisida malathion.

Manfaat teoritis dari penelitian ini adalah diperolehnya teori, pengetahuan, dan keterampilan yang mendukung pengajaran dan penelitian entomologi kedokteran secara khusus dan memajukan ilmu pengetahuan dan teknologi pada umumnya.

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD)**

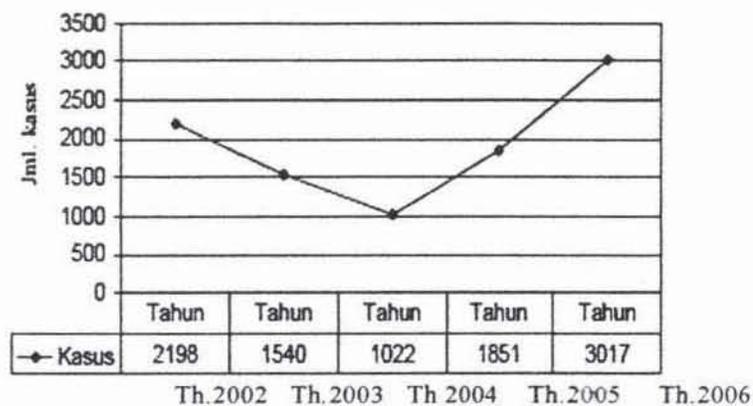
Penyakit DBD adalah penyakit menular yang disebabkan oleh virus dengue dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Sampai saat ini telah diidentifikasi ada empat jenis serotipe virus Dengue yaitu Dengue 1, 2, 3, dan 4. Di dalam tubuh nyamuk, virus dengue berkembang biak dan menyebar ke seluruh bagian tubuh nyamuk dan kemudian berkumpul di kelenjar liur. Selanjutnya ketika nyamuk menggigit manusia, virus dengue ditularkan bersamaan dengan dilepaskannya air liur. Air liur juga mengandung bahan yang berperan agar darah yang dihisap tidak membeku (Soegijanto dkk, 1996).

Penyakit ini telah berkembang sejak lama di dunia, pertama kali dikenali pada tahun 1779 di Kairo, dan pada tahun yang sama juga melanda Asia yaitu di Jakarta yang dahulu masih bernama Batavia. Wabah DBD di Indonesia yang menyebabkan banyak kematian terjadi untuk pertama kalinya pada tahun 1968 di kota Jakarta dan Surabaya dan kemudian menyebar secara cepat ke berbagai daerah di Indonesia. Sampai saat ini hampir semua provinsi di Indonesia pernah mengalami wabah DBD (Koban, 2005).

Berdasarkan laporan WHO pada tahun 2004, Indonesia berada di urutan kedua terbesar setelah Thailand dilihat dari angka morbiditas dan

mortalitas penderita DBD. Selama tahun 1985-2006, di Indonesia tercatat angka penderita DBD terendah pada tahun 1989 sebanyak 10.362 orang dan tertinggi pada tahun 2006 dengan jumlah kasus 113.640 kasus dengan jumlah meninggal sebanyak 1.184 orang (Koban, 2005).

Pulau Bali khususnya di Kecamatan Denpasar Barat merupakan wilayah endemis DBD. Jumlah kasus DBD dalam lima tahun terakhir adalah meningkat setiap tahunnya, dimana jumlah kasus DBD tertinggi terjadi pada tahun 2006 dan dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Dinkes Kota Denpasar, 2007).



Gambar 2.1 Grafik Jumlah Kasus DBD di Kota Denpasar Tahun 2002-2006 (Dinkes Kota Denpasar, 2007)

Adapun angka persentase *Case Fatality Rate* (CFR) DBD Kota Denpasar dari tahun 2002-2006 adalah tertinggi pada tahun 2006 yaitu 0,72% (Gambar 2.2). Adapun CFR dari tahun 2002-2004 adalah 0,36%, 0,32%, 0,39%, dan 0,42 (Dinkes Kota Denpasar 2007).

Penyebaran kasus DBD untuk masing-masing Kecamatan di Denpasar pada tahun 2006 adalah di Denpasar Barat yaitu 25,2% dari

Penyakit DBD sangat cepat penyebarannya disebabkan: (1) meningkatnya mobilitas penduduk karena semakin baiknya sarana transportasi di dalam kota maupun antar daerah; (2) kebiasaan masyarakat menampung air bersih untuk keperluan sehari-hari, apalagi penyediaan air bersih belum mencukupi kebutuhan, sumber yang terbatas, atau letaknya jauh dari pemukiman; (3) sikap dan pengetahuan masyarakat tentang pencegahan penyakit yang masih kurang (Koban, 2005).

Hubungan transportasi yang baik antar daerah memudahkan penyebaran penyakit ini ke daerah lain. Pencegahan berkembangnya nyamuk *Ae. aegypti* sebagai penular DBD menjadi mutlak dilakukan mengingat Indonesia adalah negara yang sangat padat penduduknya (Koban, 2005).

Jumlah penderita DBD umumnya meningkat pada musim penghujan di mana banyak terdapat genangan air jernih yang menjadi tempat berkembang biak nyamuk *Ae. aegypti*. Pada suatu penelitian di Surabaya ditemukan jumlah larva *Aedes* yang sangat tinggi selama musim penghujan dibandingkan pada musim kemarau (Yotopranoto, 2003).

Obat dan vaksin DBD sampai saat ini belum tersedia. Pengobatan yang dilakukan hanya untuk mengurangi gejala sakit (simptomatis) dan mengurangi risiko kematian. Penanggulangan DBD secara umum ditujukan pada pemberantasan rantai penularan dengan memusnahkan vektor yaitu nyamuk *Ae. aegypti* dengan memberantas tempat perindukan (*breeding*

place) yaitu air jernih yang tergenang di tempat penampungan air alami maupun buatan manusia (Koban, 2005).

2.2 Nyamuk *Aedes aegypti*

2.2.1 Morfologi *Ae. aegypti*

Spesies nyamuk yang berperan sebagai vektor penyakit DBD adalah *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, dan *Ae. scutellaris* (Service, 1996). Namun yang telah diteliti mengenai kapasitasnya dalam menularkan virus Dengue di Indonesia adalah *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Adapun taksonomi nyamuk *Ae. aegypti* adalah seperti pada tabel 2.2 berikut:

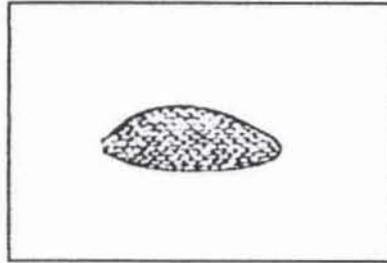
Tabel 2.2 Taksonomi *Aedes aegypti* (Sumber: James, 1969)

Kerajaan:	Animalia
Filum:	Arthropoda
Kelas:	Insecta
Ordo:	Diptera
Famili:	Culicidae
Subfamili	Culicinae
Genus	<i>Aedes (Stegomyia)</i>
Species:	<i>Ae. aegypti</i>

Masa pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *Ae. aegypti* dapat dibagi menjadi empat stadium yaitu: telur, larva, pupa, dan dewasa. Setiap stadium memiliki morfologi yang khas.

2.2.1.1 Telur *Ae. aegypti*

Telur nyamuk genus *Aedes* (Gambar 2.1) berbentuk elips atau oval memanjang, warna hitam, ukuran 0,5-0,8 mm, permukaan poligonal, dan diletakkan satu persatu pada dinding bagian dalam kira-kira 1-2 cm di atas permukaan air dari tempat penampungan air alami atau buatan manusia (Yotopranoto, 2006)



Gambar 2.3. Telur *Ae. aegypti* (Sumber: Service, 1996)

2.2.1.2 Larva *Ae. aegypti*

Larva *Ae. aegypti* terdiri atas kepala, toraks, dan abdomen. Thorax terdiri dari prothorax, mesothorax, dan metathorax. Larva *Ae. aegypti* tubuhnya memanjang tanpa kaki dengan bulu sederhana yang tersusun bilateral simetris. Yang menjadi ciri khasnya adalah pada tiap pangkal bulu pada sisi lateral mesothorax dan metathorax terdapat duri yang besar. Pada ujung abdomen terdapat segmen anal dan corong pernafasan (*siphon*) (Yotopranoto, 2006).

Larva dalam pertumbuhannya mengalami 4 kali pergantian kulit (*ecdysis*) dengan nama larva instar I, II, III, dan IV (Harrison and

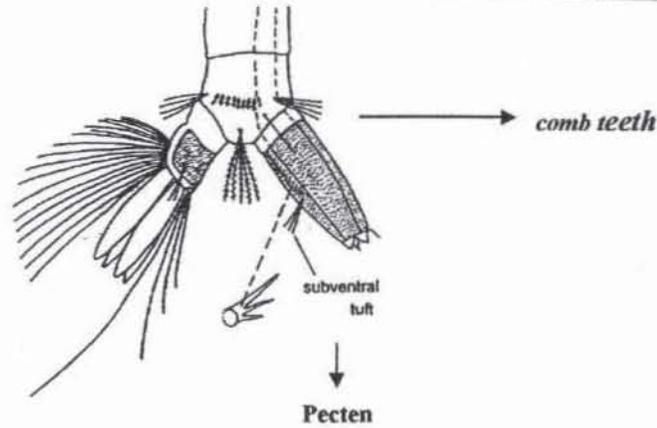
Rattanarithiku, 1973). Adapun masing-masing stadium memiliki ciri khas seperti yang tercantum dalam Tabel 2.3 berikut ini:

Tabel 2.3 Karakteristik Larva *Ae. aegypti* instar I-IV (Service 1996)

Characters	Instars			
	1st	2nd	3rd	4th
egg burster	+	0	0	0
ventral brush (seta 4-X)	0	+	+	+
seta 1-A*	+*	0*	0*	0*
seta 7-P	0	+	+	+
seta 8-M	0	0	+	+
seta 7-T	0	0	+	+
siphon sclerotization	i	i	i	c
saddle sclerotization	i	i	i	c
+ = present	i = incomplete	0* = simple		
+* = with 2-3 branches	0 = absent	c = complete		

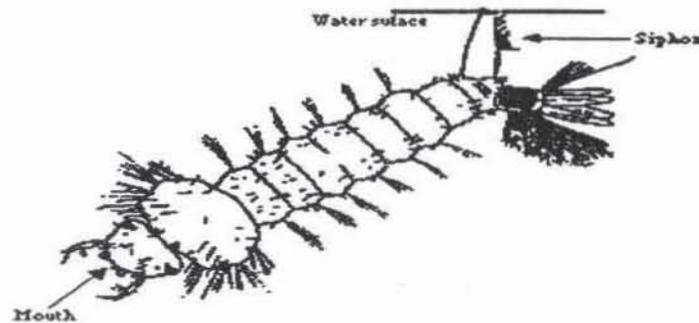
Pada bagian kepala terdapat sepasang mata majemuk dan sepasang antena. Abdomen merupakan bagian terbesar dengan bulu simetris. Pada ruas abdomen ke-8 terdapat *siphon* yang berbentuk kerucut pendek dan gemuk, serta memiliki 1 pasang *subventral hair tuft* (Gambar 2.4) dan duri pecten pada *siphon* yang panjang dan bergerigi. Gigi sisir (*comb teeth*) pada ruas abdomen ke-8 memiliki duri kecil di sisi lateralnya, terdiri dari satu baris dengan jumlah 8-16 gigi sisir (Yotopranoto, 2006).

Larva *Aedes* bergerak sangat lincah dan aktif, dengan memperlihatkan gerak naik ke permukaan untuk mengambil oksigen dan



Gambar 2.4 Segmen terminal larva *Ae. aegypti* tampak siphon yang pendek dengan 1 pasang subventral hair tuft (Service, 1996)

turun ke dasar tempat perindukan. Larva mengambil oksigen dari udara dengan menempatkan ujung *siphon* di atas permukaan air sehingga abdomen tampak menggantung dan seolah-olah badan membentuk sudut terhadap permukaan air seperti yang terlihat pada Gambar 2.5. Larva *Aedes* mengambil makanan di dasar tempat perindukan sehingga sering disebut *bottom feeder* (Service, 1996).



Gambar 2.5 Larva *Aedes aegypti* mengambil oksigen di permukaan. (Sumber: Service, 1996)

2.2.1.3 Pupa

Bentuk pupa *Ae. aegypti* adalah bengkok seperti tanda baca koma (Gambar 2.6), dimana bagian kepala-dada (cephalothorax) lebih besar bila dibandingkan dengan bagian abdomennya. Pada bagian dorsal cephalothorax terdapat sepasang alat bernafas yang disebut sebagai terompet. Dan pada ruas abdomen ke-8 terdapat sepasang alat pengayuh yang berjumbai panjang dan berguna untuk berenang. Pupa merupakan stadium yang tidak melakukan aktivitas makan.



Aedes (Stegomyia) aegypti (Linn.)

Gambar 2.6. Pupa *Ae. aegypti*. (Sumber: Service, 1996)

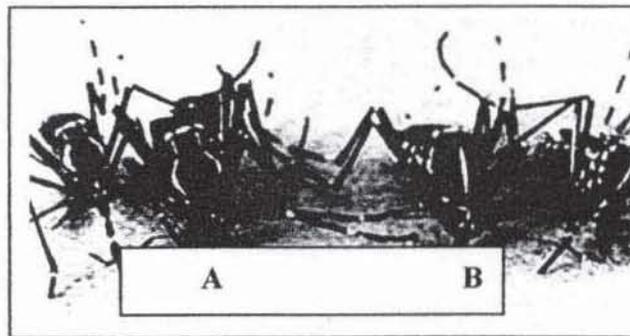
2.2.1.4 Nyamuk Dewasa

Nyamuk dewasa memiliki ciri khas tubuh berwarna hitam dengan bercak-bercak putih, *scale* vena sayap berwarna seragam seperti tubuhnya, dan pada posisi hinggap, sumbu panjang tubuh sedikit membentuk sudut dengan permukaan. Nyamuk dewasa *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* masing-masing memiliki ciri khas yang dapat dilihat pada Tabel 2.4 dan Gambar 2.7

Tabel 2.4 Perbedaan morfologi *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*

Stadium	<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. albopictus</i>
Larva	- <i>Comb teeth</i> pada sisi lateral berduri - Duri pecten panjang - Duri besar pada pangkal bulu ruas thorax II dan III (+)	- <i>Comb teeth</i> pada sisi lateral tidak berduri - Duri pecten pendek - Tanpa duri
Dewasa (permukaan dorsal thorax)	Bentukan "lyre" berwarna putih	Garis median berwarna putih

Pada kepala terdapat sepasang mata majemuk dan di sebelah medial terdapat sepasang antena yang beruas dan berbulu. Pada nyamuk jantan antena berbulu panjang dan lebat yang disebut dengan antena tipe plumose, sedangkan pada nyamuk betina antena berbulu pendek dan jarang yang disebut dengan tipe pilose. Di sebelah medial antena terdapat bentukan yang disebut dengan palpus, dimana palpus pendek pada nyamuk betina dan palpus panjang untuk nyamuk jantan. Pada bagian tengah terdapat mulut (*proboscis*) tipe penusuk dan penghisap (Service, 1996).



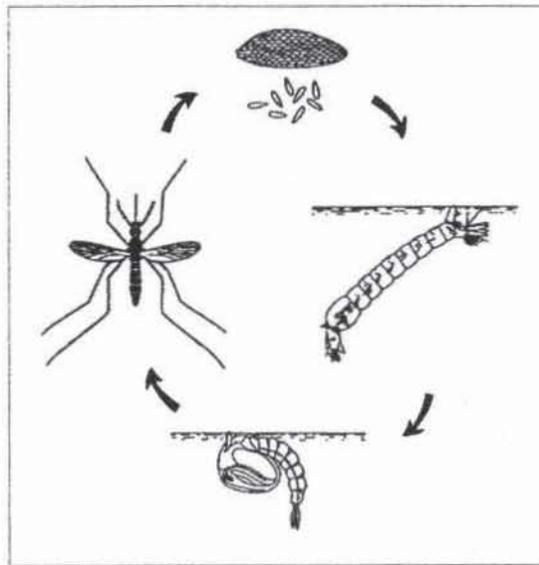
Gambar 2.7. Nyamuk Dewasa (Sumber: Service, 1996)
A. *Aedes aegypti* B. *Aedes albopictus*

2.2.2 Siklus Hidup

Genus *Aedes* dalam siklus hidupnya mengalami metamorfosis sempurna (holometabolus) yaitu melalui tahap telur, larva, pupa, dan dewasa. Siklus

hidup nyamuk genus *Aedes* dari telur sampai menjadi dewasa dan bertelur kembali memerlukan waktu sekitar 1-2 minggu atau bisa lebih lama tergantung pada lingkungan sekitar.

Telur nyamuk *Aedes* di dalam air akan menetas menjadi larva dalam waktu 1-3 hari. Namun demikian telur *Aedes* tahan akan kekeringan dan dapat bertahan hingga satu tahun bahkan lebih. Telur tersebut akan menetas jika terkena atau tergenang air. Kecepatan pertumbuhan dan perkembangan larva dipengaruhi suhu, tempat, keadaan air, dan kandungan zat yang ada di dalam tempat perindukan (Soegijanto dkk, 1996).



Gambar 2.8 Siklus Hidup *Ae. aegypti* (Service, 1996)

Pada kondisi optimum larva berkembang menjadi pupa dalam waktu 5-9 hari. Kemudian pupa menetas menjadi nyamuk dewasa dalam waktu 2-3 hari. Nyamuk betina segera melakukan kopulasi dengan nyamuk jantan,

dimana peristiwa tersebut hanya terjadi sekali seumur hidupnya. Umur nyamuk betina lebih panjang bisa mencapai satu bulan pada kondisi yang optimal (James, 1969)

2.2.3 Ekologi dan Bionomik Vektor

Nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* terdapat hampir di seluruh daerah di Indonesia, kecuali di tempat dengan ketinggian lebih dari 1000 meter di atas permukaan laut (Koban, 2005). Genangan air yang disukai sebagai tempat perindukan (*breeding place*) adalah genangan air jernih yang terdapat di dalam suatu wadah penampung (*container*) yang sering disebut TPA (tempat penampungan air) di dalam maupun di luar rumah seperti bak mandi/WC, tempayan, ember, drum, tandon air, sumur, vas bunga, tempat penampungan air kulkas, pot tanaman hias, kaleng serta ban bekas yang berisi air jernih. Nyamuk meletakkan telurnya di dinding vertikal TPA sedikit di atas permukaan air (Yotopranoto, 2001).

Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi nyamuk untuk meletakkan telurnya pada TPA antara lain jenis wadah, warna wadah, air, suhu, kelembaban, dan kondisi lingkungan setempat. Nyamuk *Ae. aegypti* lebih menyukai tempat perindukan baik di dalam maupun di luar rumah terlindung dari sinar matahari, yang berwarna gelap, permukaan terbuka lebar, berisi air tawar jernih dan tenang. Dan nyamuk *Ae. albopictus* menyukai tempat penampungan air alami maupun tempat penampungan air

buatan di luar rumah seperti di lubang pohon, sela pelepah daun, dan potongan bambu.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yotopranoto dkk. (2001, 2002, dan 2003) di Surabaya diperoleh hasil bahwa tempat perindukkan *Ae. aegypti* di dalam rumah terbanyak ditemukan pada vas keramik atau semen dan bak mandi. Di luar rumah banyak ditemukan pada drum maupun kaleng bekas.

Berdasarkan penelitian Hasyimi dan Soekirno (2004) di Jakarta Utara diketahui habitat nyamuk *Aedes sp.* berdasarkan persentase jentik nyamuk yang ditemukan adalah sebagai berikut: tempayan (66,7%), drum (32,6%), bak mandi (18,8%), dan ember (5,4%).

Hanya nyamuk betina saja yang bersifat antropofilik yaitu menghisap darah manusia untuk mematangkan telurnya. Nyamuk *Aedes* memiliki kebiasaan menggigit berulang-ulang (*multiple biters*) yaitu menggigit beberapa orang secara bergantian dalam waktu yang singkat karena nyamuk *Ae. aegypti* sangat sensitif dan mudah terganggu. Keadaan ini sangat membantu nyamuk dalam memindahkan virus dengue dari satu orang ke orang yang lain di satu rumah (Sumarmo, 1988).

Nyamuk betina sebagian besar hidup domestik, yaitu biasanya menggigit di dalam rumah dan hanya kadang-kadang di luar rumah di tempat yang terlindung sinar matahari. Hal ini dibuktikan pada suatu penelitian ternyata tempat perindukan *Ae. aegypti* di dalam rumah baik pada musim penghujan dan musim kemarau adalah lebih tinggi dibanding di

luar rumah (Yotopranoto, 2006). Pada malam hari nyamuk beristirahat di dalam rumah pada benda yang digantung, seperti pakaian, kelambu, terutama pada tempat yang lebih gelap.

Nyamuk betina mempunyai jangkauan terbang rata-rata 100 meter. Secara aktif nyamuk dapat terbang sampai beberapa kilometer dalam usahanya mencari tempat perindukan untuk meletakkan telurnya (Yotopranoto, 2006).

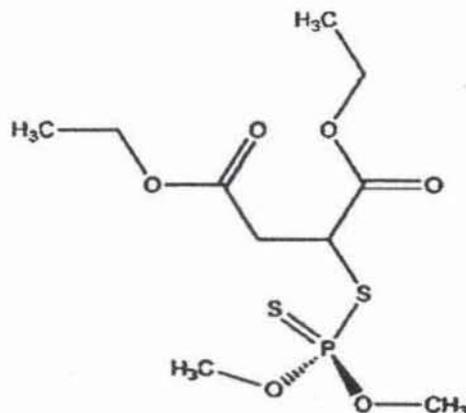
2.3 Malathion

Malathion termasuk dalam golongan organofosfat yang sudah digunakan secara luas sejak tahun 1970 sebagai insektisida dalam pertanian, dan penggunaannya meningkat tajam sejak tahun 1980 termasuk di Indonesia. Terdapat kurang lebih 100 insektisida organofosfat yang direkomendasi oleh WHO sebagai pengendali vektor penyakit. Namun yang digunakan secara luas sampai saat ini adalah parathion dan malathion (WHO, 1986).

Nama kimia malathion adalah 2-(dimethoxyphosphinothioylthio) butanedioic acid diethyl ester. Formula molekul malathion adalah $C_{10}H_{19}O_6PS_2$, dengan masa molekul sebesar 330,358021 (Gambar 2.9).

Malathion adalah salah satu insektisida yang paling aman karena memiliki LC_{50} oral akut pada tikus sebesar 900-5800 mg/kgBB dan diurai pada hati mamalia. Diramalkan malathion menjadi insektisida nomor satu di masa depan karena keamanannya. Malathion membunuh serangga dengan

cara kontak atau *vapor action* (vapor pressure 1.25×10^{-4} mmHg pada 20°C) dan juga racun perut (Matsumura, 1986).



Gambar 2.9. Struktur kimia malathion (Kegley *et al.*, 2007)

Malathion murni berupa liquid yang tidak berwarna dengan titik didih $156-157^{\circ}\text{C}$ pada 7 mmHg, sementara produk teknis adalah berwarna coklat dan berbau seperti bawang putih. Malathion sangat halus dengan kelarutan dalam air rendah (145pp). Malathion terhidrolisis pada pH 5 atau 8 dan terurai pada suhu yang tinggi. Selektivitas malathion berhubungan dengan adanya kelompok karboksil, yang rentan terhadap hidrolisis oleh mamalia sehingga toksisitasnya pada mamalia rendah. Malathion digunakan sebagai insektisida rumah tangga, kebun, pestisida *greenhouse* dan insektisida di berbagai bidang pertanian (Matsumura, 1986).

2.3.1 Metabolisme Malathion

Nyamuk terpapar oleh berbagai jenis *xenobiotic* seperti golongan ester asam fosfor dan ester karbamat yang berasal dari insektisida golongan organofosfat. Bahan yang bersifat toksik atau toksikan yang terkandung dalam insektisida sangat banyak jumlahnya dan enzim yang berperan untuk mendetoksikasi juga tidak khusus. Pada umumnya jumlah enzim yang memetabolisme *xenobiotic* sangat kecil, kecuali pada strain yang resisten dimana ditemukan peningkatan kadar enzim detoksikasi.

Metabolisme malathion sebagai insektisida organofosfat pada serangga, hewan, dan tanaman adalah sama. Metabolisme secara umum bertujuan untuk melakukan detoksikasi bahan beracun (toksikan) termasuk insektisida oleh sistem enzim pada serangga, dalam hal ini nyamuk (Dauterman and Hodgson, 1978).

Detoksikasi oleh enzim atau sistem enzim secara umum merupakan proses untuk meningkatkan kelarutan bahan asing (*xenobiotic*) di dalam air sehingga mudah dikeluarkan melalui organ ekskretoris (Dauterman and Hodgson, 1978).

Proses eliminasi toksikan pada serangga ada dua fase. Pada fase pertama terjadi proses oksidasi, reduksi, dan hidrolisis dengan menghasilkan produk yang bersifat larut dalam air. Pada fase ke-dua terjadi reaksi konyugasi, dimana produk hasil fase pertama ditambah dengan metabolit endogen yang tinggi sifat kelarutannya dalam air seperti glukosa, glutation,

dan asam amino, untuk menghasilkan produk konyugasi yang mudah diekskresi (Dauterman and Hodgson, 1978).

Mekanisme ekskresi *xenobiotic* pada serangga sampai saat ini sangat sedikit diketahui. Namun diperkirakan diekskresi melalui kelenjar malpighi dan *hindgut*. Perkecualian untuk produk yang mudah menguap seperti isopropanolol, diekskresikan melalui sistem trakhea (Dauterman and Hodgson, 1978).

Selektivitas malathion berhubungan dengan adanya kelompok karboksil, yang rentan terhadap hidrolisis oleh mamalia yaitu oleh karboksil esterase. Enzim esterase menghidrolisis senyawa ester dengan penambahan air sehingga menghasilkan air dan asam. Akibat dari aktivitas karboksil esterase inilah yang menyebabkan toksisitas malathion bersifat selektif. Hidrolisis tersebut menghasilkan monoacid yang bersifat tidak toksik. Dimana serangga lebih rentan dibanding manusia (Matsumura, 1986). Peningkatan degradasi malathion oleh enzim karboksil esterase dijumpai pada lalat *Chrysomya putoria* (*blowflies*), nyamuk *Culex tarsalis*, *Cimex lectularius*, *Tribolium castaneum* (kumbang), *Tetranychus urticae* (*spider mite*) yang resisten terhadap malathion (Dauterman and Hodgson, 1978).

2.3.2 Cara Kerja (*Mode of action*)

Malathion berikatan secara ireversibel dengan enzim asetilkolinesterase (AChE) sehingga sering disebut dengan AChE inhibitor. Karena insektisida ini berikatan dengan AChE, maka AChE bersama enzim esterase lainnya

tidak dapat melakukan aktivitasnya menghidrolisis asetilkolin (ACh) menjadi asetat dan kolin. Akibatnya ACh akan terakumulasi dan ketika ACh dilepaskan ke daerah sinaptik, akan terus mengaktifkan reseptor ACh yaitu suatu neurotransmitter yang bersifat eksitatorik yang mengirimkan sinyal melalui sinap saraf. Akibatnya akan terjadi overstimulasi sistem saraf oleh ACh yang merangsang serat otot secara berulang-ulang dan menyebabkan kematian pada serangga termasuk nyamuk (Brown, 2006).

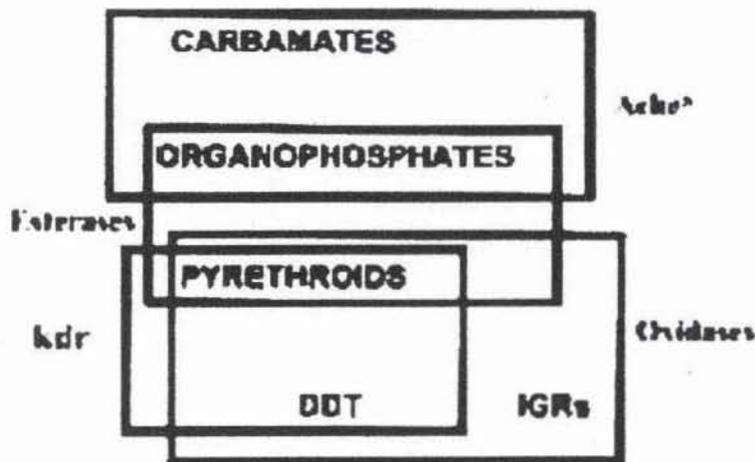
2.4 Mekanisme Resistensi

Insektisida memegang peranan penting dalam program pengendalian serangga sebagai vektor penyakit sejak awal abad ke-20. Namun demikian akibat paparan insektisida yang terus menerus menimbulkan resistensi pada serangga termasuk di antaranya nyamuk.

Definisi resistensi berdasarkan WHO tahun 1986 adalah kemampuan suatu strain organisme untuk mentoleransi suatu dosis toksikan, dimana pada dosis tersebut bersifat lethal pada mayoritas individu pada suatu populasi normal spesies yang sama. Resistensi adalah berbasis genetik dan merupakan hasil dari perubahan komposisi genetik suatu populasi sebagai akibat efek selektif dari toksikan (Ferrari, 1990). Dan *Insecticide Resistance Action Committee* (IRAC) mendefinisikan resisten sebagai sifat yang dapat diturunkan pada suatu populasi serangga sehingga pada pemakaian insektisida pada dosis yang direkomendasikan tidak berhasil mengendalikan serangga.

Resistensi pada satu jenis insektisida bisa juga terjadi pada insektisida lain yang memiliki *target-site* yang sama disebut dengan resistensi silang (*cross-resistance*). Seperti misalnya serangga yang resisten terhadap malathion juga ternyata resisten terhadap karbamat, kedua insektisida tersebut memiliki *target-site* pada AChE nyamuk. Contoh lain yaitu adanya resistensi silang antara DDT dengan pyrethroid yang memiliki *target-site* pada *sodium channel* seperti yang tampak pada Gambar 2.10 (Brogdon and McAllister, 1998).

Resistensi juga dapat terjadi sekaligus pada beberapa insektisida yang berbeda secara simultan yang sering disebut dengan resistensi multipel. Kombinasi dari beberapa mekanisme resistensi yang berbeda dapat mengakibatkan terjadinya resistensi pada beberapa kelas insektisida sekaligus (IRAC, 2006).



Gambar 2.10 Pola hubungan resistensi silang dari beberapa kelas insektisida yang sering terjadi (Brogdon and McAllister, 1998)

Baik resistensi silang maupun resistensi multipel merupakan masalah serius bagi program pengendalian vektor yang harus dicegah. Adapun caranya adalah dengan tidak menggunakan satu jenis insektisida yang sama dalam waktu yang lama, tapi dengan menggunakan insektisida yang memiliki mekanisme resistensi dari kelas yang berbeda secara bergantian. Bersamaan dengan dilakukannya pemantauan resistensi secara dini dan berkala (WHO, 1986).

Menurut WHO pada tahun 1986 diketahui ada empat mekanisme resistensi, yaitu: 1) resistensi metabolik, 2) penurunan sensitivitas situs (*site*) sasaran di dalam tubuh serangga berupa insensitivitas saraf dan enzim asetilkolinesterase (AChE), 3) penurunan penetrasi toksikan (insektisida) ke arah situs aktif (saraf dan AChE), dan 4) perubahan perilaku

2.4.1 Resistensi metabolik

Pada resistensi metabolik terjadi peningkatan metabolisme toksikan (insektisida) dalam tubuh serangga dengan berbagai enzim seperti: *mixed function oxidase*, hidrolase, esterase, dan glutathion-S-transferase. Mekanisme resistensi ini yang paling sering terjadi pada serangga. Mekanisme resistensi secara metabolik ini didasari oleh sistem enzim yang digunakan oleh semua serangga dalam melakukan detoksikasi secara alami dalam menghadapi bahan asing. Sistem enzim ini berperan dalam meningkatkan kelarutan bahan asing (*xenobiotic*), toksikan, atau insektisida dalam tubuh serangga. Hal ini akan menyebabkan tidak terjadinya

penumpukan bahan insektisida di dalam tubuh serangga karena bahan insektisida tersebut segera dikeluarkan oleh organ ekskretoris serangga. Akibatnya serangga terhindar dari efek merugikan dari insektisida atau dengan kata lain menjadi resisten terhadap insektisida tersebut (Ferrari, 1990). Adapun enzim-enzim yang berperan dalam resistensi metabolik ini adalah:

a. *Mixed-function Oxidase*

Sitokrom P-450 monooksigenase atau *mixed-function oxidase (MFO)* adalah sekelompok enzim oksidatif. Kerja oksidase pada suatu substrat menghasilkan peningkatan kelarutan sehingga mudah diekskresikan. Peran MFO dalam menimbulkan resistensi dapat dideteksi dengan *bioassay* menggunakan piperonyl butoxide (Ferrari, 1990).

b. Hidrolase

Adalah enzim yang memecah karboksil ester dan ikatan fosfodiester. Enzim ini banyak berperan dalam resistensi insektisida organofosfat dan sedikit pada pyrethroid. Resistensi terjadi karena peningkatan aktivitas cholinesterase non spesifik yang tampak pada pemeriksaan biokemis menggunakan mikroplat (Ferrari, 1990).

c. Esterase non-spesifik

Esterase non spesifik adalah enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis ikatan ester atau sequester insektisida. Pada

nyamuk yang mengalami resistensi, memiliki salinan gen untuk esterase yang jumlahnya banyak sehingga mereka dapat memproduksi esterase dalam jumlah yang besar. Mekanisme resistensi metabolik ini dapat terjadi pada beberapa kelas insektisida seperti organofosfat, karbamat, pyrethroid, dan DDT (IRAC, 2006). Pada pemeriksaan dengan elektroforesis didapatkan bahwa strain yang resisten menampakkan aktivitas esterase yang tinggi dibanding strain yang peka. Esterase meningkat pada strain serangga yang resisten agar mereka dapat memetabolisme atau menurunkan kerja insektisida (detoksikasi) sebelum mereka dapat mengakibatkan efek toksik. Jadi pada saat terjadi suatu resistensi, aktivitas dan tingkat esterase meningkat (Ferrari, 1990). Terdapat sedikitnya dua tipe enzim esterase non spesifik yaitu enzim yang menunjukkan spesifisitas yang meningkat terhadap α -naphthyl acetate dan yang menunjukkan spesifisitas yang meningkat terhadap β -naphthyl acetate.

d. Gluthatione- S-transferase

Enzim ini juga berperan penting dalam resistensi insektisida organofosfat. Peningkatan aktivitas Gluthatione-S-transferase dapat dideteksi dengan menggunakan sinergis diethylmaleate (DEM). Saat ini diketahui bahwa mekanisme resistensi terhadap DDT pada lalat rumah adalah disebabkan oleh Gluthatione-S-transferase (Ferrari, 1990).

2.4.2. Penurunan sensitivitas situs sasaran (*insensitivitas target-site*)

Penurunan sensitivitas (*insensitivitas*) *target-site* di dalam tubuh serangga berupa insensitivitas asetilkolinesterase (AChE) yang sering juga disebut dengan mekanisme *target-site*.

Insektisida organofosfat memiliki *target site* di dalam sistem saraf serangga yaitu AChE. Pada strain serangga yang resisten, insektisida tidak lagi berikatan secara efektif dengan *target site*-nya yaitu AChE, sehingga insektisida dalam hal ini malathion tidak dapat bekerja secara efektif. Tidak terikatnya insektisida secara aktif atau sensitifitasnya menurun terjadi karena ternyata telah ditemukan beberapa bentuk AChE yang telah bermutasi (yang sering juga disebut MACE, *modified acetylcholinesterase*) sehingga tidak dikenali lagi oleh insektisida sebagai *target site*-nya. Paling tidak telah berhasil diidentifikasi lima titik mutasi pada AChE yang dapat mengurangi sensitivitas terhadap penghambatan insektisida. Adanya insensitivitas ini menyebabkan terjadinya resistensi terhadap organofosfat dan karbamat dalam derajat yang bervariasi (Feyereisen, 1995; IRAC, 2006).

2.4.3 Penurunan Penetrasi Toksikan

Penurunan penetrasi toksikan (insektisida) ke arah situs aktif (saraf dan AChE) dapat terjadi karena modifikasi pada kutikula serangga dan lapisan saluran cerna yang menyebabkan terjadinya penurunan absorpsi atau penetrasi insektisida dari berbagai kelas. Mekanisme resistensi ini baru

hanya ditemukan pada lalat rumah (*Musca domestica*), dan belum ditemukan pada serangga lain (IRAC, 2006).

2.4.4 Perubahan perilaku

Perubahan perilaku menyebabkan berkurangnya kontak dengan insektisida sehingga serangga dapat tetap bertahan hidup. Perubahan lain dapat berupa kecenderungan untuk menghindari tempat yang sedang terpapar insektisida. Perubahan perilaku ini biasanya menyertai mekanisme resistensi lainnya.

2.5 Resistensi Insektisida Organofosfat Malathion

Permasalahan besar yang dihadapi dalam pemberantasan vektor dengan bahan kimia insektisida adalah adanya resistensi nyamuk terhadap insektisida. Terjadinya resistensi vektor terhadap insektisida telah meluas di seluruh dunia dan menghambat program pengendalian vektor. Resistensi meliputi semua kelas insektisida yang mengandung organochlorine (DDT dan diendrin/kelompok HCH), organofosfat, karbamat, dan pyrethroid. Bahkan telah ditemukan pada studi di laboratorium bahwa telah terjadi resistensi pada insektisida golongan hormonal, diflubenzuron, dan *Bacillus thuringiensis* serotipe H-14. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya reaksi silang dengan insektisida konvensional (WHO, 1986).

Resistensi terhadap organofosfat malathion terutama disebabkan oleh peningkatan aktivitas esterase pada serangga termasuk nyamuk. Esterase berperan dalam meningkatkan hidrolisis insektisida menjadi bentuk yang

tidak toksik. Resistensi terhadap malathion juga disebabkan oleh terjadinya penurunan sensitifitas situs sasaran AChE dan peningkatan metabolisme oleh sitokrom P-50, glutathione S-transferase, dan karboksil esterase (Ferrari, 1990; Karunaratne and Hemingway, 2001; Wongkoon, 2005).

Resistensi serangga terhadap malathion telah terjadi di berbagai belahan dunia termasuk di Indonesia. Penelitian tentang adanya resistensi nyamuk terhadap insektisida khususnya malathion sebenarnya telah banyak dilakukan, hanya saja hasil penelitian tersebut tidak dipublikasi dengan baik. Beberapa yang telah tercatat adalah resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap temefos dan malathion di Yogyakarta oleh Mardihusodo (1993), resistensi nyamuk vektor malaria terhadap organofosfat di Jawa Tengah dan Yogyakarta oleh Widiarti, dkk (2005), resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap malathion di Medan oleh Sitorus (2003). Di Bali, khususnya di Denpasar Barat sampai saat ini belum pernah dilakukan penelitian mengenai resistensi malathion pada *Ae. aegypti*.

Di negara lain juga telah banyak dilaporkan adanya kasus resistensi terhadap malathion di Puerto Rico (Fox, 1980), Carolina Selatan, Amerika (Mekuria *et al.*, 1994), Srilanka (Karunaratnel and Hemingway, 2001), Thailand (Jirakanjanakit *et al.*, 2005; Pethuan *et al.*, 2007), Brazil (Montella *et al.*, 2007) dan banyak lagi kasus resistensi yang lain.

2.6 Pemeriksaan Resistensi

Resistensi merupakan masalah serius yang menghambat program pengendalian vektor. Saat ini deteksi dini dan monitoring resistensi merupakan bagian penting dari manajemen resistensi. Hal ini bertujuan untuk meminimalkan laju evolusi resistensi. Cara untuk mendeteksi adanya resistensi adalah dengan melakukan uji hayati (*bioassay*) insektisida dengan menggunakan 1) Dosis diagnostik dan 2) *Dose-response Bioassay* (Ferrari, 1990).

Sebelumnya sejak tahun 1960, WHO juga sudah menetapkan standardisasi *bioassay* untuk mendeteksi resistensi serangga terhadap insektisida sehingga hasil yang diperoleh dari berbagai daerah bisa dibandingkan. Ada dua metode yang dilakukan pada *bioassay* adalah berdasarkan dosis diagnostik dan *estimating resistance ratio (ERR)* (WHO,1986).

2.6.1 Dosis diagnostik.

Pada tahun 1980-an WHO menetapkan berbagai dosis diagnostik untuk bermacam-macam insektisida yang banyak dipakai untuk berbagai jenis nyamuk vektor penyakit di dunia sebagaimana yang telah dimuat dalam buletin WHO (1986). Dosis diagnostik yang dimaksud adalah dosis tunggal insektisida (*adultisida* atau *larvasida*) yang jika diaplikasi kepada serangga uji yang memenuhi persyaratan uji hayati dalam waktu tertentu (misalnya, 1 atau 24 jam) akan menghasilkan data angka (%) kematian, yang atas dasar

angka tersebut dapat langsung ditetapkan status kerentanan/resistensinya. Sebagai contoh, malathion 5% adalah dosis diagnostik malathion untuk nyamuk dewasa *Anopheles sp.* dan *Culex sp.*

Pemakaian dosis diagnostik dewasa ini menyebabkan proses kerja uji hayati banyak dipersingkat dan dipermudah. Namun demikian, sampai sekarang belum tersedia dosis diagnostik untuk semua jenis insektisida dan untuk berbagai jenis serangga sebagai vektor penyakit di dunia.

Hasil uji hayati dapat menggambarkan status kerentanan/resistensi serangga uji terhadap insektisida uji yang digunakan jika semua persyaratan yang dibakukan seperti tentang stadium, jenis kelamin, umur, ukuran, kondisi fisiologis (misalnya harus hidup dan kenyang darah), dan jumlah yang cukup telah terpenuhi.

Kelemahan uji hayati adalah waktu yang diperlukan untuk memperoleh hasil uji diperlukan sekurang-kurangnya 24 jam perlakuan, jangka waktu yang cukup lama untuk pengambilan keputusan yang cepat di masa kritis. Di samping itu untuk mendapatkan serangga uji yang memenuhi persyaratan uji hayati itu diperlukan waktu yang lama, fasilitas untuk melakukan kolonisasi serangga uji harus lengkap yang sesuai dengan standar WHO, dan diperlukan banyak tenaga yang terampil dan terlatih karena pelaksanaannya sendiri juga cukup sulit (Mardihusodo, 1993).

WHO juga mengembangkan berbagai metode baru dalam hal deteksi resistensi insektisida, terutama uji biokemis yang lebih sederhana untuk mendapati resistensi insektisida pada serangga vektor atau hama secara

individual. Jika dikembangkan sepenuhnya metode baru tersebut memiliki banyak keunggulan antara lain: 1) metode ini memungkinkan untuk deteksi gen resisten ganda dalam bahan yang sama dari satu ekor serangga; 2) metode ini memungkinkan untuk deteksi dan mengetahui tipe mekanisme resistensi dan kemungkinan adanya resistensi silang; 3) metode ini memungkinkan untuk mengetahui lebih banyak informasi dari sejumlah kecil sampel serangga uji yang hanya diperoleh dari suatu lokasi survei; dan 4) metode ini tidak memerlukan alat yang rumit karena sifatnya kolorimetrik yang dapat dinilai secara visual, dengan mata telanjang (WHO, 1986).

Metode biokemis mempunyai beberapa keterbatasan, antara lain (WHO, 1986): 1) metode ini tidak memungkinkan untuk mengetahui semua mekanisme resistensi yang mungkin terjadi dari banyak jenis dan macam insektisida pada individu serangga uji; 2) beberapa bahan kimia seperti acetylcholine iodide, AChI yang digunakan dalam metode ini harus disimpan dalam freezer (-20°C), 3) uji resistensi ini harus dikerjakan oleh tenaga terampil dan terlatih sehingga lebih banyak dilaksanakan di laboratorium pusat karena belum ada staf lapangan yang terlatih untuk pengerjaannya di lapangan.

Dewasa ini metode uji resistensi yang paling banyak mendapat perhatian para pakar adalah metode enzimatik untuk deteksi resistensi serangga, khususnya terhadap insektisida senyawa organofosfat. Hal ini berkaitan dengan sangat banyaknya macam insektisida senyawa

organofosfat yang diaplikasikan di bidang kesehatan dan pertanian. Dua mekanisme resistensi serangga terhadap bahan senyawa organofosfat yang diketahui dengan baik adalah peningkatan aktivitas enzim esterase dan insensitivitas AChE. Deteksi resistensi ini dilakukan secara berkala sebelum dilakukan program pemberantasan nyamuk (Mardihusodo, 1993).

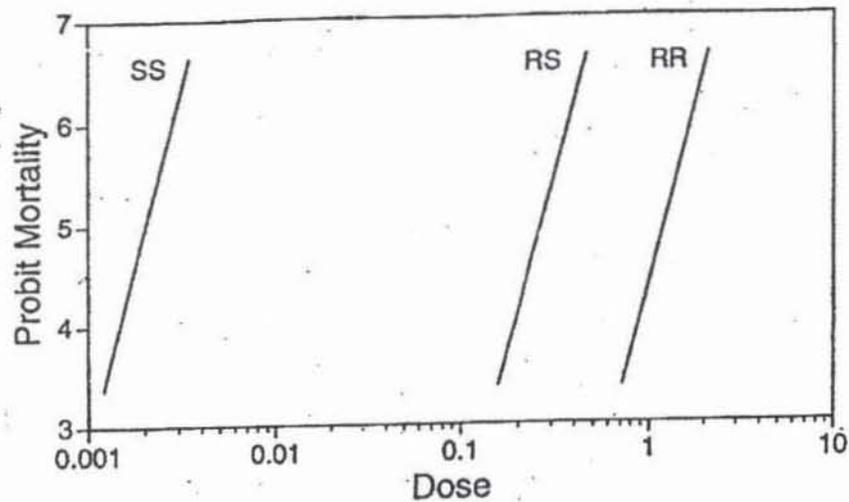
2.6.2 *Dose-Response Bioassay.*

Ini digunakan untuk memonitor kemajuan resistensi pada strain dan pada analisis genetik. Pada pengukuran ini sampel dari satu individu strain diberi beberapa rentangan dosis yang telah dipilih untuk menciptakan rentangan mortalitas pada sampel.

Analisis probit Finney dapat digunakan untuk menggambarkan karakteristik dari respon strain terhadap toksikan. Jika persentase mortalitas kumulatif ditransformasi ke dalam unit probit dan dibuat plot dengan dosis toksikan dalam bentuk logaritma, maka akan terbentuk *garis log-dose probit mortality* (LD-P). Dengan mengolah data mortalitas dosis ke dalam analisis probit, maka akan dimungkinkan menggambarkan respon strain terhadap toksikan dan mendapatkan dosis insektisida yang diperlukan untuk membunuh strain coba. Dosis konsentrasi insektisida yang dapat membunuh 50% dari seluruh sampel disebut LC_{50} dan 95% disebut LC_{95} . *Convidence interval* analisis probit adalah 95% dan begitu pula dengan kemiringan garis LD-P. Kemiringan dari garis LD-P mencerminkan variabilitas dari strain

(Gambar 2.11). Semakin curam kemiringan (*steeper slope*) garis LD-P maka makin seragam dari respon strain terhadap insektisida (Ferrari, 1990).

Analisis probit dirancang untuk menggambarkan respon kelompok organisme homogen terhadap toksikan. Jika koloni yang bersifat heterogen secara genetik yang didapat dari lapangan diuji dengan *dose-response bioassay*, akan menghasilkan garis LD-P yang kemiringannya semakin landai (*shallow slope*) yang berarti bahwa individu yang menjadi sampel memiliki tingkat toleransi terhadap insektisida yang bervariasi. Semakin resisten individu terhadap insektisida, garis LD-P akan bergeser ke kanan dan akan menjadi lebih miring (Ferrari, 1990).

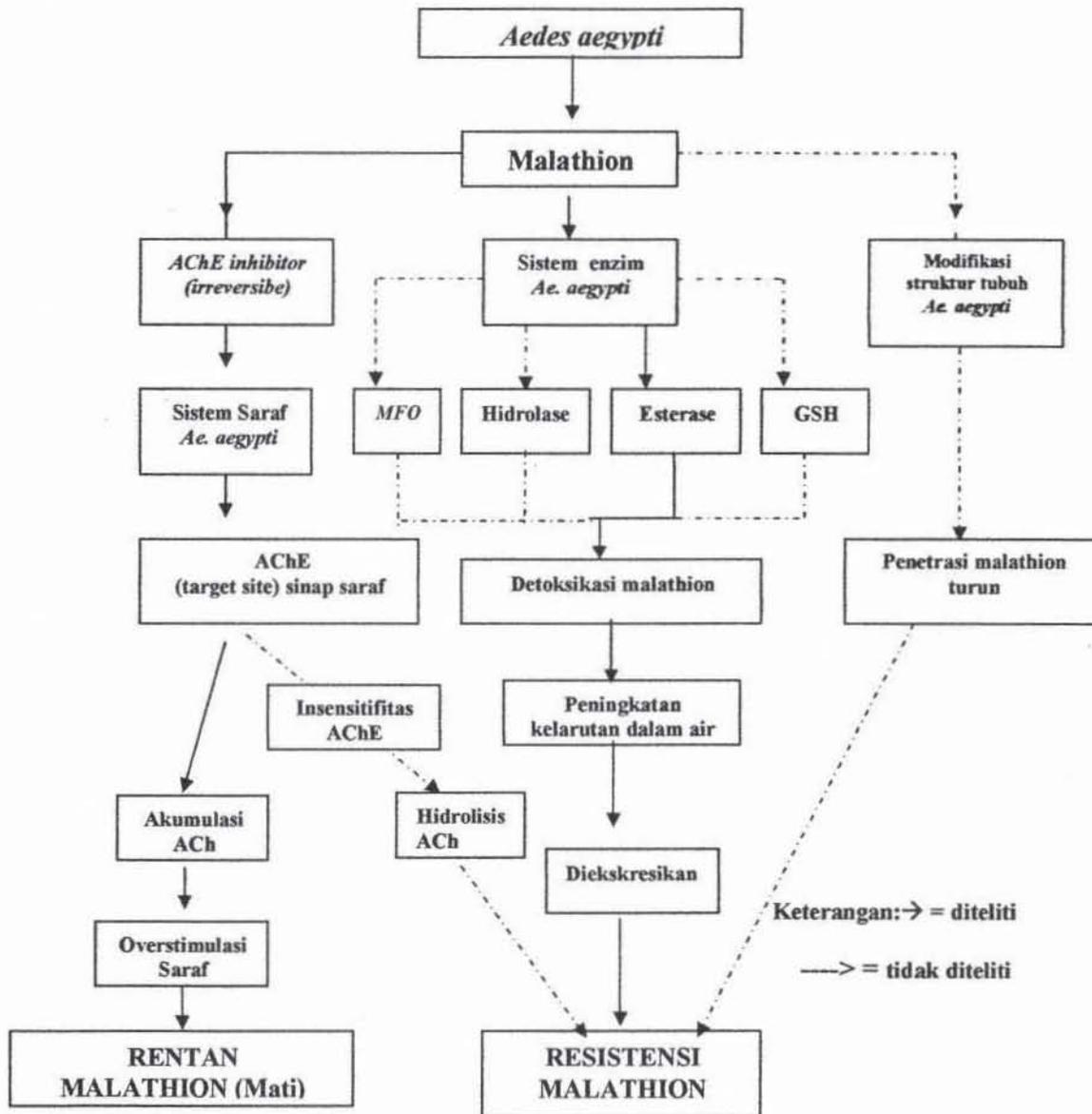


Gambar 2.11. Mortalitas Log-dose probit untuk strain yang sensitif (SS), toleran (RS), serta strain resisten (RR)

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan Kerangka Konsep:

Pemakaian insektisida yang terus-menerus dan pemakaian yang tidak tepat akan merangsang terjadinya resistensi nyamuk terhadap insektisida sehingga tidak efektif lagi untuk membunuh nyamuk.

Malathion adalah senyawa organofosfat yang bekerja sebagai penghambat AChE (AChE inhibitor) yang bersifat ireversibel. *Target site* malathion pada tubuh nyamuk adalah pada AChE di sinap saraf. AChE dalam tubuh nyamuk berperan dalam memecah (hidrolisis) ACh menjadi acetat dan choline. Dalam keadaan normal dimana belum terjadi resistensi maka malathion bekerja secara normal yaitu menghambat AChE untuk menghidrolisis ACh, sehingga menyebabkan terjadinya penumpukan ACh yang berakhir dengan kematian akibat overstimulasi saraf. Namun dalam keadaan tertentu malathion sebagai penghambat AChE tidak dapat bekerja sebagaimana mestinya seperti halnya pada fenomena resistensi. Misalnya karena terjadi penurunan sensitivitas dari AChE dalam tubuh nyamuk. Sensitivitas ini menurun bahkan menghilang disebabkan oleh beberapa sebab, yang di antaranya diketahui karena terjadinya mutasi pada AChE. Hal ini menyebabkan malathion tidak dapat mengenali AChE sebagai *target site*-nya pada tubuh nyamuk. Dengan tidak dihambatnya AChE oleh malathion maka tidak akan terjadi penumpukan ACh, yang berarti nyamuk tetap hidup atau resisten.

Pada keadaan lain yaitu terjadinya peningkatan sistem enzim yang berperan dalam metabolisme malathion dalam tubuh nyamuk. Enzim

tersebut diduga berperan dalam melakukan detoksikasi malathion dalam tubuh nyamuk salah satunya oleh enzim esterase non spesifik, yang berakibat meningkatnya kelarutan bahan insektisida dalam air sehingga segera diekskresikan oleh organ ekskretoris serangga. Hal ini menyebabkan malathion tidak dapat membunuh nyamuk (menjadi resisten). Sedangkan terjadinya modifikasi pada tubuh nyamuk seperti modifikasi pada kutikula dan sistem pencernaan masih perlu diteliti lebih jauh. Modifikasi struktur tubuh pada nyamuk ini menyebabkan turunya penetrasi malathion ke dalam tubuh nyamuk.

3.2 Hipotesis Penelitian

- 1 Terdapat perbedaan aktivitas esterase non spesifik nyamuk dewasa *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dengan LPT Unair Surabaya .
- 2 Terdapat perbedaan aktivitas esterase non spesifik nyamuk dewasa *Ae. aegypti* Desa Dauh Puri Kauh, Desa Tegal Kerta, Desa Padangsambian, dan LPT Unair Surabaya.

BAB 4**MATERI DAN METODE PENELITIAN****4.1 Jenis Rancangan Penelitian**

Penelitian dilakukan dengan rancangan kuasi eksperimental *post test only control group*.

4.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah nyamuk betina dewasa *Ae. aegypti* yang berumur 2-3 hari yang diberi pakan larutan gula 10%. Nyamuk berasal dari 1) Kolonisasi di Laboratorium Entomologi LPT Unair Surabaya, 2) Kelompok nyamuk dari hasil koleksi lapangan dari 3 desa di Kecamatan Denpasar Barat (Dauh Puri Kauh, Tegal Kerta, Padangsambian), dan 3) Nyamuk hasil kolonisasi Laboratorium Entomologi Universitas Gajah Mada sebagai kontrol. Besar sampel untuk uji hayati berdasarkan ketentuan WHO adalah 25 ekor untuk tiap replikat. Pada penelitian ini dilakukan replikasi sebanyak empat kali pada enam variasi konsentrasi, hasil perhitungan dengan menggunakan Rumus Frederer.

$$\text{Rumus: } (t - 1)(r - 1) \geq 15$$

Keterangan: t = treatment (dosis perlakuan) = 6 dosis

r = replikasi

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel :

1. Variabel bebas adalah malathion dalam berbagai konsentrasi
2. Variabel tergantung adalah
 - a. Persentase kumulatif kematian nyamuk *Ae. aegypti* stadium dewasa pada masing-masing perlakuan.
 - b. *Absorbance Value* (AV) nyamuk *Ae. aegypti* masing-masing daerah
3. Variabel terkendali adalah waktu pengamatan 24 jam, umur nyamuk, jenis kelamin nyamuk, dan makanan nyamuk
4. Variabel pengacau adalah kondisi fisiologis nyamuk uji, suhu, dan kelembaban ruangan.

4.3.2 Definisi operasional variabel;

1. Malathion adalah insektisida organofosfat yang mengandung bahan aktif (*active ingredient*) malathion 95% (v/v)
2. Status resistensi (uji hayati atau *bioassay*) adalah tingkat resistensi nyamuk *Ae. aegypti* stadium dewasa berdasarkan persentase kematian nyamuk setelah 24 jam, yang dikategorikan sesuai dengan kriteria berdasarkan Davidson dan Zahar (1973) menjadi sensitif atau rentan (SS) jika kematian >98%, toleran atau resisten sedang (RS) jika kematian 80-98%, dan resisten (RR) jika kematian < 80%

3. Status resistensi melalui uji biokemis dengan substrat α -naphthyl aasetat adalah tingkat resistensi nyamuk *Ae. aegypti* stadium dewasa yang diperoleh berdasarkan hasil analisis kualitatif (visualisasi warna) menjadi tidak berwarna berarti skor 0, biru muda =1, biru kehijauan=2, dan biru tua = 3. Secara kuantitatif dengan menilai besarnya AV (*Absorbance Value*) hasil ELISA Reader BIORAD pada $\lambda = 450$ nm
4. *Absorbance Value* (AV) adalah nilai yang menunjukkan besarnya intensitas warna yang terjadi dari hasil reaksi enzimatik yang diukur dengan ELISA reader BIORAD pada $\lambda=450$ nm yang dalam penelitian ini mencerminkan besarnya aktivitas esterase non spesifik yang dikategorikan menjadi SS, SR, dan RR.
5. *Lethal Concentration 50%* (LC_{50}) 24 jam adalah konsentrasi yang diperlukan agar populasi nyamuk uji mengalami kematian sebesar 50% setelah pengamatan 24 jam (WHO, 1996)
6. *Lethal Concentration 95%* (LC_{95}) 24 jam adalah konsentrasi yang diperlukan agar populasi nyamuk uji mengalami kematian sebesar 95% setelah pengamatan 24 jam (WHO, 1996)
7. *Lethal Concentration 99%* (LC_{99}) 24 jam adalah konsentrasi yang diperlukan agar populasi nyamuk uji mengalami kematian sebesar 99% setelah pengamatan 24 jam.

8. Dosis diagnostik adalah dosis yang aman dan efektif digunakan dalam pemberantasan serangga yang ditetapkan oleh WHO atau dapat dihitung dengan cara mengalikan dua LC_{99} .

4.4 Bahan Penelitian

Bahan untuk kolonisasi nyamuk di laboratorium adalah telur *Ae. aegypti* yang dikoleksi dari lapangan maupun dari hasil kolonisasi laboratorium, larutan gula 10% sebagai pakan nyamuk dewasa yang diresapkan pada kapas, tikus putih, dan pakan larva berupa hati ayam yang telah dikeringkan.

Bahan untuk uji hayati adalah malathion dengan kandungan aktif 95% dalam aceton yang diimpregnasikan pada selebar kertas filter Whatman no. 2, ukuran 15 x 12 cm², dan etanol.(WHO, 1986).

Bahan untuk uji biokemis meliputi: a) larutan substrat berupa 0,5 ml α -naphthyl acetate dalam aceton (6 gr/l) dicampur dengan 50 ml fosfat buffer (0,02 M, pH=7,0) dan b) *coupling reagent* berupa 150 mg garam Fast Blue B (o-dianisidine, tetrazotized; sigma) dalam 15 ml aquades dan 35 ml aqueous (5%; w/v) sodium dodecyl sulfat (sigma) (Lampiran1).

4.5 Instrumen Penelitian

Alat untuk kolonisasi nyamuk adalah *ovitrap* (Lampiran 1), loyang plastik, pipet bermulut besar untuk memindahkan pupa, kertas saring, gelas plastik, sangkar nyamuk (Lampiran 1), dan kapas berisi larutan gula 10%.

Alat untuk deteksi resistensi secara uji hayati adalah tes kit untuk nyamuk dewasa yang telah dibakukan oleh WHO (1981), yang berupa tabung silinder plastik dengan ukuran panjang 15 cm dan diameter 10 cm dan aspirator.

Alat utama untuk uji resistensi secara biokemis adalah kertas tisu untuk menyaring homogenat, homogenizer, mikropipet 50 mikroliter, mikro plat (*microplate flat bottom*) dan Elisa Reader BIORAD (Lampiran 1).

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi pengambilan sampel adalah di wilayah Kecamatan Denpasar Barat, Kota Denpasar yaitu: Desa Dauh Puri Kauh, Desa Tegal Kerta, dan Desa Padangsambian dalam kurun waktu Januari-April 2008. Khusus untuk nyamuk LPT Unair Surabaya diperoleh dari kolonisasi nyamuk Surabaya yang dilakukan di Laboratorium Entomologi LPT Unair Surabaya. Selanjutnya kolonisasi nyamuk, uji hayati, dan uji biokimia dikerjakan di Laboratorium Entomologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

4.7 Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan Data

1. Koleksi nyamuk

Koleksi nyamuk dilakukan dengan mengumpulkan telur menggunakan *ovitrap*. *Ovitrap* diletakkan di dalam rumah (di kamar mandi atau sekitar tempat penampungan air) untuk koleksi telur nyamuk *Ae. aegypti*. Pada setiap desa dipilih 15 buah rumah sehingga total pada tiga desa adalah 45

rumah. *Ovitrap* dipasang di tiap rumah sebanyak 2 buah. *Ovitrap* dibuat dari pipa plastik yang berwarna hitam (Lampiran 1) pada bagian luarnya dan salah satu lubangnya ditutup dan kemudian diisi air jernih tiga perempatnya. Pada bagian dalamnya dipasang kertas saring melingkar (telah diberi label identitas, asal daerah, dan waktu pemasangan), dimana sebagian kertas saring tercelup air. Kertas saring pada *ovitrap* diperiksa dan dipasang kembali setiap 5 – 7 hari. Kertas saring yang berisi telur didiamkan pada suhu kamar sampai kering kemudian disimpan sampai terkumpul sesuai dengan jumlah yang diinginkan untuk ditetaskan secara bersamaan.

2. Kolonisasi nyamuk

Kertas saring yang mengandung telur nyamuk direndam di dalam loyang plastik yang berisi air keran PDAM yang didiamkan semalam dengan ketinggian 2 cm. Setelah menetas menjadi larva, diberikan pakan berupa irisan tipis hati ayam yang telah dikeringkan ke dalam air dalam jumlah secukupnya. Air dalam loyang harus dijaga kebersihannya agar tidak ada kotoran yang menutupi permukaan air karena dapat menghambat larva untuk memperoleh oksigen. Pupa yang terbentuk diambil dengan pipet bermulut lebar untuk dimasukkan ke dalam gelas plastik dan dipindahkan ke dalam sangkar nyamuk.

Segera setelah menjadi nyamuk dewasa ditangkap menggunakan aspirator untuk diidentifikasi. Nyamuk yang diidentifikasi sebagai *Ae. aegypti* dipindahkan ke dalam sangkar baru dan diberi pakan berupa larutan

gula 10% yang diresapkan ke dalam kapas. Setelah berumur 2-3 hari diberi darah dengan memasukkan tikus putih yang difiksasi ke dalam sangkar selama 1-2 jam. *Ovitrap* dimasukkan ke dalam sangkar sebagai tempat bertelurnya nyamuk betina yang telah menghisap darah. Kertas saring yang mengandung telur kemudian diambil dan dikeringkan dalam suhu kamar dan kemudian disimpan sampai mendapatkan jumlah yang diinginkan untuk uji hayati.

3. Pembuatan serial konsentrasi malathion

Langkah awal dalam membuat serial konsentrasi adalah dengan membuat larutan standar (stock) malathion dengan konsentrasi 1000 µg/ml yang setara dengan 1000 ppm sebanyak 10 ml. Karena malathion yang digunakan memiliki bahan aktif hanya 95%, maka faktor koreksinya adalah sebesar 1,05. Adapun malathion yang dibutuhkan untuk membuat larutan standar adalah dengan cara menghitung $1000 \mu\text{g/ml} \times 1,05 \times 10 \text{ ml} = 10,5 \text{ mg}$ malathion, yang kemudian ditambahkan aseton sampai volumenya tepat 10 ml. Ini merupakan stok larutan standar malathion untuk membuat berbagai serial konsentrasi.

Berbagai serial konsentrasi dapat dibuat dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$$

Keterangan:

n_1 = konsentrasi malathion standar/stok

v_1 = volume larutan standar/stok

n_2 = konsentrasi malathion yang akan dibuat

v_2 = volume larutan yang akan dibuat.

Pada penelitian ini akan dibuat 6 serial konsentrasi malathion, yang merupakan hasil dari uji pendahuluan. Perhitungan untuk memperoleh variasi konsentrasi ditentukan dengan menggunakan *factor increament* yang dapat dilihat pada Lampiran 3. Adapun hasilnya adalah akan dibuat 6 serial konsentrasi yaitu 20 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm.

Cara pembuatan konsentrasi larutan malathion 20 ppm adalah dengan menggunakan rumus di atas, dan didapat hasil bahwa stok larutan malathion yang diperlukan adalah 0,2 ml atau 200 μ l yang kemudian dimasukkan dalam tabung ukur, lalu ditambahkan aseton sampai mencapai volume tepat 10 ml. Begitu pula seterusnya untuk membuat serial konsentrasi malathion lainnya (Tabel. 3.1).

Tabel 3.1. Distribusi jumlah larutan stok yang diperlukan untuk membuat berbagai serial konsentrasi

n1 (ppm)	v1 (ml)	n2 (ppm)	v2 (ml)
1000	0,20	20	10
1000	0,25	25	10
1000	0,35	35	10
1000	0,45	45	10
1000	0,60	60	10
1000	0,80	80	10

3. Uji hayati (*bioassay*) untuk nyamuk dewasa

Uji pendahuluan harus dilaksanakan sebelum melakukan uji hayati (*bioassay*) yang sesungguhnya untuk menentukan status resistensi. Hal ini dilakukan agar dapat mengetahui besarnya rentangan konsentrasi dosis malathion yang akan digunakan dalam penelitian. Adapun banyaknya variasi konsentrasi yang akan diujikan pada uji sesungguhnya dalam penelitian ini adalah enam variasi konsentrasi. Uji pendahuluan ini dilakukan masing-masing 3 replikasi untuk daerah Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya dengan besar sampel masing-masing sebanyak 25 ekor nyamuk.

Proses uji pendahuluan dilakukan dengan cara menyiapkan gelas plastik sesuai dengan jumlah variasi konsentrasi yang akan dicoba yang dalam penelitian ini disiapkan 33 gelas plastik untuk nyamuk LPT Unair Surabaya dengan penghitungan konsentrasi yang akan dicoba sebanyak 10

konsentrasi dengan 3 replikasi dan 1 gelas untuk nyamuk kontrol tiap replikat. Nyamuk betina *Ae. aegypti* yang berumur 2-3 hari ditangkap menggunakan aspirator secara random dan dimasukkan sebanyak 25 ekor ke dalam masing-masing gelas plastik. Lalu disiapkan kertas Whatmann seluas 15 x 12 cm yang telah diimpregnasikan dengan malathion sesuai dengan konsentrasi yang ingin diujikan sebanyak 2,75 ml (USAEHA, 1992). Setelah kering dimasukkan ke dalam tabung tes kit WHO dan dipasang melingkar sedemikian rupa sehingga posisi kertas tidak mudah tergeser (dijepit dengan kawat). Setelah tes kit WHO siap, nyamuk yang berada di dalam gelas plastik dipindahkan ke dalam tabung tes kit WHO menggunakan aspirator dan didiamkan terpapar selama 1 jam. Setelah itu nyamuk dikeluarkan dari dalam tabung tes kit WHO menggunakan aspirator elektrik dan dipindahkan ke dalam tabung pemulihan yang bebas insektisida sampai 24 jam.

Selama dalam tabung pemulihan nyamuk diberi pakan larutan glukosa yang diresapkan ke dalam kapas. Setelah 24 jam, kematian nyamuk diamati dan dicatat. Hal ini dilakukan 3 kali pada uji pendahuluan dan empat kali pada uji sesungguhnya untuk konsentrasi yang sama dan menyertakan 1 tes kit WHO untuk nyamuk kontrol, dimana ke dalam tabung tes kit WHO ini hanya berisi kertas Whatmann yang diimpregnasikan dengan aseton.

Setelah mendapat rentangan konsentrasi dosis malathion (6 variasi konsentrasi) baru dilakukan uji hayati yang sesungguhnya untuk menguji 6 variasi konsentrasi tersebut. Uji hayati dilakukan sama seperti prosedur uji

pendahuluan, hanya saja pada uji hayati yang diuji adalah variasi konsentrasi hasil uji pendahuluan.

4. Uji biokemis

Uji ini dilakukan untuk mengetahui adanya peningkatan aktivitas enzim esterase non spesifik yang mendasari terjadinya resistensi. Metode yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan metode Lee (1990), yang merupakan modifikasi dari cara Sawicki dkk (1978). Langkah pembuatannya adalah dengan membuat homogenat dari sampel nyamuk dewasa yang telah memenuhi persyaratan subyek uji. Nyamuk digerus secara individual dengan menggunakan ujung tabung reaksi pada cawan porselin, kemudian dicampur dengan PBS sebanyak 0,5 ml, kemudian diaduk sampai homogen. Sepotong kertas tisu diletakkan di atas homogenat untuk menyaring homogenat. Sampel diambil sebanyak 50 µl per sumuran yang kemudian dipindahkan ke sumur mikroplat dengan menggunakan mikropipet, dengan replikasi sebanyak 3 kali. Jadi homogenat larva dimasukkan ke dalam tiga sumuran sehingga tiap mikroplat berisi 30 sampel, 1 kontrol negatif dan 1 kontrol positif. Masing-masing ke dalam setiap sumuran yang berisi homogenat ditambahkan 50 µl bahan substrat dan dibiarkan selama 60 detik. Setelah itu ke dalam setiap sumuran ditambahkan 50 µl bahan *coupling reagent*. Segera setelah reaksi berlangsung selama 10 menit, warna merah yang mula-mula timbul berubah

menjadi biru. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl asam asetat 10% ke dalam tiap sumuran yang berisi homogenat.

Aktivitas enzim esterase non spesifik dicerminkan dengan mengamati secara visual intensitas warna terakhir yang muncul. Intensitas warna akhir ini dapat dinilai secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif hasilnya dapat diklasifikasikan menjadi skor 0 bila tidak berwarna, 1 bila berwarna biru muda, 2 bila berwarna biru kehijauan, dan 3 bila berwarna biru tua. Jadi semakin tua warna mencerminkan semakin meningkatnya aktivitas enzim. Secara kuantitatif intensitas warna akhir dapat dinilai dengan pembacaan *absorbance value* (AV) dari tiap replikat dengan ELISA reader pada $\lambda = 450$ nm.

4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Hasil uji hayati berupa persentase kematian dari nyamuk uji dari LPT Unair Surabaya, Denpasar Barat dan kontrol. Jika kematian kontrol mencapai 5%-20% maka akan dilakukan koreksi dengan formula Abbot, dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{kematian kelompok uji} - \text{kematian kelompok kontrol}}{100\% \text{ kematian kontrol}} \times 100\%$$

Jika kematian kelompok kontrol melebihi 20%, maka dilakukan pengulangan. Untuk mengetahui status kerentanan nyamuk *Ae. aegypti* yang diuji, dilakukan uji hayati dengan konsentrasi yang telah ditetapkan WHO sebagai dosis diagnostik yaitu WHO (50.000 ppm) dan USAEHA (12.850

ppm). Hasil uji hayati ini dianalisis secara deskriptif. Hasil dari uji hayati kemudian dianalisis dengan program probit untuk mendapatkan LC_{50} ; LC_{95} ; dan LC_{99} .

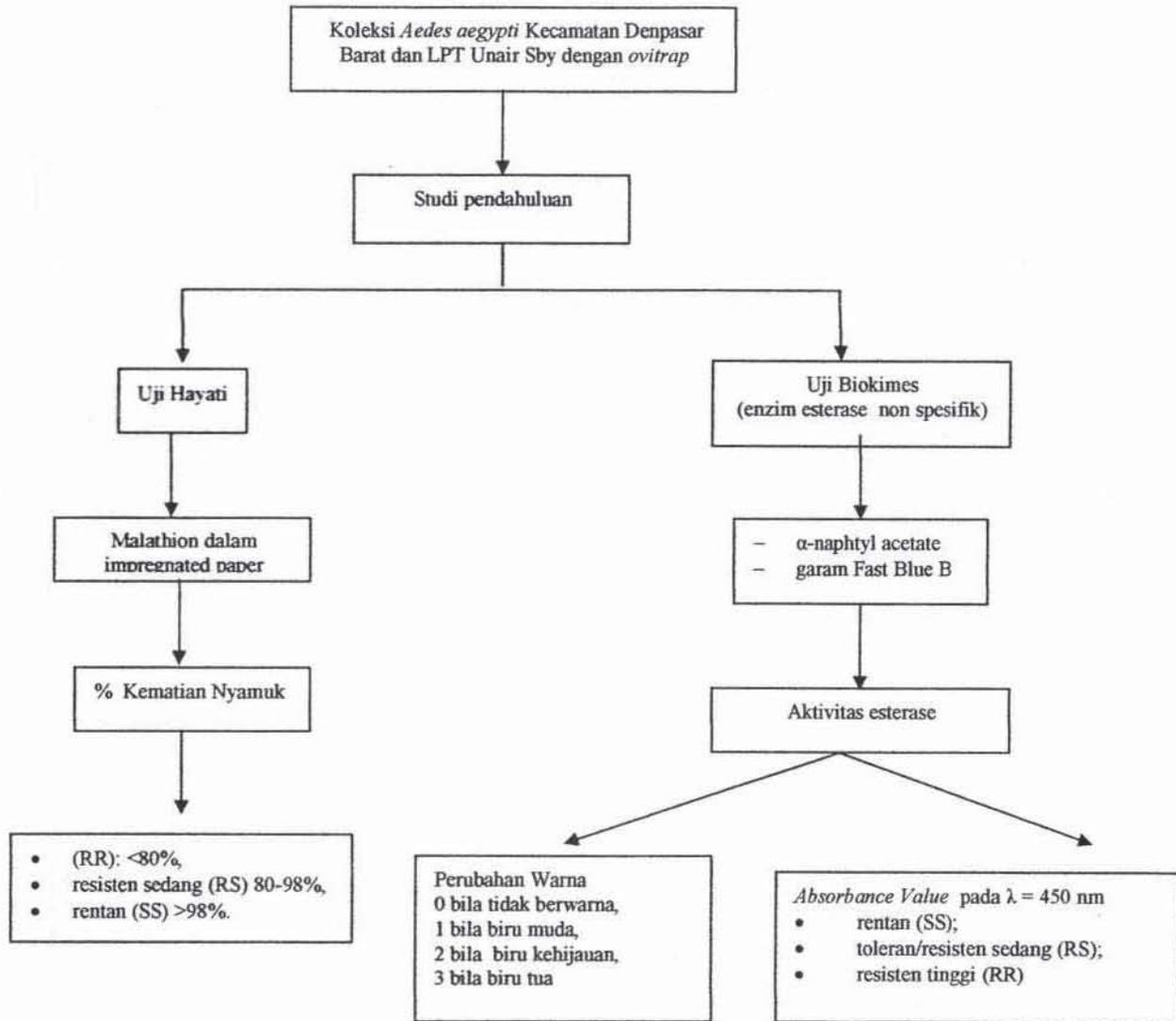
Hasil uji biokemis untuk mendeteksi resistensi insektisida organofosfat yang berkaitan dengan peningkatan aktivitas esterase non spesifik pada nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya ditabulasikan bersama untuk dianalisis secara deskriptif.

Penilaian status resistensi uji biokemis dapat dilakukan dengan dua cara. Cara pertama yaitu menggunakan kategori Lee (1990) secara kuantitatif dimana status resistensi dinilai berdasarkan besarnya nilai AV saja. Lee (1990) yang menetapkan kriteria sebagai berikut: SS bila $AV < 0,600$; RS bila $AV = 0,600-0,900$; dan RR bila $AV > 0,900$. Cara kedua dengan menggunakan kriteria Lee (1990) modifikasi Mardihusodo dimana status resistensi dinilai dari skor warna secara visual (kualitatif) menurut Lee (1990) yang disertai dengan konfirmasi AV dari ELISA Reader. Penetapan status rentan (SS) dan resisten (RR) diperoleh dengan cara mengamati warna yang tampak pada kontrol negatif. Jika kontrol negatif tidak berwarna maka status rentan (SS) ditetapkan dengan menghitung 2 kali rata-rata kontrol negatif. Sedangkan status RR ditetapkan dengan menghitung 3 kali rerata kontrol negatif. Tapi jika kontrol negatif berwarna biru muda, maka untuk menetapkan SS digunakan dua kali rerata sampel

negatif (sampel yang tidak berwarna atau yang berwarna kuning) dan RR dengan 3 kali rerata sampel negatif.

Untuk mengetahui adanya perbedaan tingkat resistensi *Ae. aegypti* melalui aktivitas esterase non spesifik antara Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya dianalisis menggunakan uji t dan uji one way anova untuk membedakan antar desa di Denpasar Barat dengan LPT Unair Surabaya.

4.9 Kerangka Operasional.



BAB 5

HASIL DAN ANALISIS

5.1 Hasil dan Analisis Uji Hayati

5.1.1 Hasil uji hayati *Ae. aegypti* asal LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat

Uji hayati dilakukan dengan menggunakan dosis diagnostik WHO (1986) untuk nyamuk dewasa yaitu malathion 5% yang setara dengan 50.000 ppm dan *United State Army Environmental Hygiene Agency* (USAEHA, 1992) menetapkan dosis malathion yang diimpregnasikan ke kertas sebesar 12,85 mg/ml yang setara dengan 12.850 ppm.

Hasilnya adalah terjadi kematian 100% pada nyamuk LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat dalam waktu kurang dari satu jam. Ini berarti baik nyamuk *Ae. aegypti* Denpasar Barat maupun LPT Unair Surabaya belum resisten terhadap malathion yang dilambangkan dengan SS (sensitif) (Tabel. 5.1).

Tabel 5.1 Status resistensi nyamuk hasil uji hayati *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat

Daerah	% kematian		Status Resistensi
	50.000 ppm (WHO)	12.850 ppm (USAEHA)	
LPT Unair Surabaya	100 %	100%	SS
Denpasar Barat	100%	100%	SS

Keterangan:

SS berarti sensitif (rentan terhadap insektisida atau belum resisten)

Pada penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui LC_{50} , LC_{95} , LC_{99} dan besarnya dosis diagnostik dari malathion yang diujikan pada nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat. Untuk itu akan dilakukan uji pendahuluan untuk memperoleh rentangan konsentrasi malathion.

Hasil uji pendahuluan didapatkan konsentrasi malathion yang menyebabkan kematian 10-90% nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat adalah berada di antara konsentrasi 20 ppm sampai dengan konsentrasi 80 ppm. Karena diperlukan 6 variasi konsentrasi malathion maka dilakukan penghitungan dengan menggunakan *increment factor* (Lampiran 3). Adapun hasil digunakan dalam uji hayati nyamuk uji dari LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat yaitu 20 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm. Hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada Lampiran 2.

Hasil uji hayati sesungguhnya pada nyamuk dewasa *Ae. aegypti* asal LPT Unair Surabaya dengan menggunakan beberapa variasi konsentrasi dari 0 ppm (sebagai kontrol), 20 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm diperoleh rata-rata jumlah kematian nyamuk dari empat replikasi sebesar 4%, 12%, 16%, 24%, 43%, 51%, dan 82% (Tabel 5.2). Karena rata-rata kematian nyamuk uji pada kelompok kontrol lebih kecil dari 5% maka tidak perlu dilakukan koreksi dengan formula Abbot.

Hasil uji hayati sesungguhnya nyamuk *Ae. aegypti* stadium dewasa asal Denpasar Barat terhadap malathion dengan konsentrasi 0 ppm, 20 ppm,

25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm diperoleh rata-rata kematian nyamuk sebesar 3%, 17%, 35%, 65%, 70%, 80%, dan 93% (Tabel 5.2). Pada uji hayati ini kematian nyamuk uji juga tidak melebihi 5% sehingga tidak perlu dikoreksi dengan formula Abbot.

Tabel 5.2 Hasil Uji Hayati *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat terhadap 6 variasi konsentrasi Malathion dan kontrol (0 ppm)

Asal Subyek Uji	Konsentrasi (ppm)	Jumlah total nyamuk (ekor)	Jumlah kematian Nyamuk (@ replikasi 25 ekor)				Kematian Nyamuk (%)
			R1	R2	R3	R4	
LPT Unair Surabaya	0	100	0	2	1	1	4.0
	20	100	2	4	2	4	12.0
	25	100	3	4	4	5	16.0
	35	100	14	5	3	2	24.0
	45	100	19	17	3	4	43.0
	60	100	21	7	13	10	51.0
	80	100	22	22	18	20	82.0
Denpasar Barat	0	100	2	1	0	0	3.0
	20	100	9	2	5	1	17.0
	25	100	7	13	12	3	35.0
	35	100	21	14	19	11	65.0
	45	100	18	16	24	12	70.0
	60	100	20	19	21	20	80.0
	80	100	25	22	23	23	93.0

5.1.2 Analisis Uji Hayati *Ae. aegypti* asal LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat

Hasil uji hayati dalam 6 variasi konsentrasi malathion dianalisis dengan menggunakan program probit untuk mengetahui besarnya LC_{50} , LC_{95} , LC_{99} , dosis diagnostik. Hasil analisis probit dapat dilihat pada Lampiran 4 dan 5

Hasil analisis probit nyamuk *Ae. aegypti* dari LPT Unair Surabaya diperoleh hasil bahwa nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya memiliki

LC₅₀ pada konsentrasi malathion 51,07 ppm; LC₉₅ sebesar 155,2 ppm dan LC₉₉ sebesar 245,96 ppm (Tabel 5.3). Hasil analisis probit nyamuk *Ae. aegypti* daerah Denpasar Barat diperoleh hasil bahwa LC₅₀ adalah sebesar 32,20 ppm, LC₉₅ sebesar 86,91 ppm, dan LC₉₉ sebesar 131,13 ppm (Tabel 5.3).

Tabel 5.3 Nilai LC₅₀, LC₉₅, LC₉₉ 24 jam dan nilai *Fiducial limits* (FI) 95% terhadap nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat

Asal Subyek uji	LC ₅₀ & FI 95% (ppm)	LC ₉₅ & FI 95% (ppm)	LC ₉₉ & FI 95% (ppm)
LPT Unair Sby	51,07 (47,07-55,40)	121,41 (100,00-147,39)	245,96 (180,52 -335,13)
Denpasar Barat	32,20(29,98-34,58)	86,91(74,40-101, 52)	131,13(105,65-162,77)

Keterangan : LC = *Lethal Concentration*
FI = *fiducial limit*

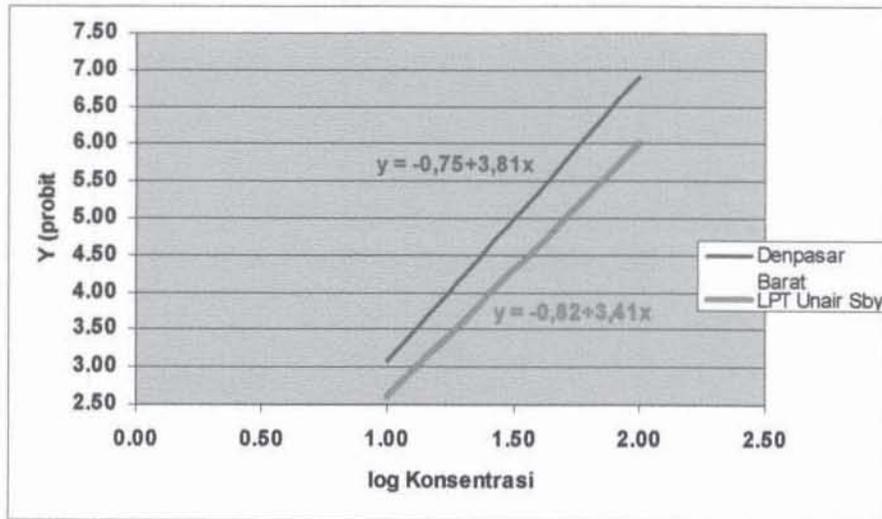
Dengan diketahuinya LC₉₉ maka dosis diagnostik malathion untuk nyamuk LPT Unair Surabaya dapat diketahui dengan menghitung 2 kali LC₉₉ yaitu 491,92 ppm. Untuk Denpasar Barat dapat diketahui dengan menghitung 2 kali LC₉₉ yaitu 262,26 ppm (Tabel 5.4). Dosis diagnostik kedua daerah tersebut jauh lebih kecil dibandingkan dengan yang ditetapkan WHO ataupun USAEHA.

Tabel 5.4 Dosis Diagnostik Malathion (ppm)

	Dosis Diagnostik Malathion (ppm)
WHO	50.000
USAEHA	12.850
LPT Unair Surabaya	491,92
Denpasar Barat	262,26

Pada analisis probit juga dihasilkan persamaan garis probit. Persamaan garis regresi dirumuskan dengan $y = a + bx$, dimana y adalah nilai probit, nilai b sebagai *slope of line* yang menunjukkan arah kemiringan garis regresi probit pada grafik, nilai a sebagai intersept yang menunjukkan konstanta yang digunakan sebagai faktor koreksi dan x yang menunjukkan log dosis. Untuk LPT Unair Surabaya diperoleh nilai $b = 3.4083$ dan nilai $a = -0.822$. Hasil persamaan garis probit untuk LPT Unair Surabaya adalah $y = -0.82 + 3.41x$ (Gambar 5.1). Sedangkan Denpasar Barat diperoleh nilai $b = 3.815112$, dan nilai $a = -0.7525211$ dengan persamaan garis probit yaitu $y = -0.75 + 3.81x$. Tampak kedua garis probit bernilai positif yaitu nilai b positif dan garis lurus yang timbul dari kiri ke kanan. Garis probit LPT Unair Surabaya berada paling kanan (Gambar 5.1).

Pada analisis probit juga dapat diketahui mengenai sifat homogenitas data yang diperoleh dari sampel yang diuji. Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat masing-masing heterogenitasnya insignifikan yang artinya sampel bersifat homogen. Adapun hasil selengkapnya dari analisis probit dapat dilihat pada Lampiran 4 dan 5.



Gambar 5.1 Hubungan antara konsentrasi malathion dengan kematian nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat (garis probit)

5.2 Hasil dan Analisis Uji Biokemis

5.2.1 Hasil Uji Biokemis *Ae. aegypti* asal LPT Unair Surabaya

Penilaian status resistensi uji biokemis dapat dilakukan dengan dua cara. Cara pertama yaitu menggunakan kategori Lee (1990) secara kuantitatif dimana status resistensi dinilai berdasarkan besarnya nilai AV saja menjadi kategori SS bila $AV < 0,600$; RS bila $AV = 0,600-0,900$; dan RR bila $AV > 0,900$.

Hasil uji biokemis dengan cara pertama (Kriteria Lee, 1990) adalah status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari LPT Unair Surabaya adalah semuanya masih sensitif (SS) karena 100% $AV < 600$, belum tampak adanya peningkatan aktivitas esterase non spesifik. (Tabel 5.5).

Cara kedua yaitu dengan jalan menggunakan kriteria Lee modifikasi Mardihusodo. Pada mikroplat tampak kontrol negatif tidak berwarna

(Lampiran 6) sehingga untuk menetapkan status SS digunakan dua kali rata-rata kontrol negatif yaitu dua kali 0,178 (yang hasilnya 0,3560).

Tabel 5.5 Rekapitulasi hasil uji resistensi biokemis nyamuk *Ae. aegypti* dewasa LPT Unair Surabaya

STATUS RESISTENSI BIOKEMIS LPT UNAIR							
Kode	CARA 1			CARA 2			
	AV	JUMLAH	%	Visual	AV	Jumlah	%
SS	< 0.600	30	100	<2.00	< 0.356	26	86.67
RS	0.600-0.900	0	0	2.00-2.50	0.356-0.534	4	13.33
RR	> 0.900	0	0	>2.5-3.0	> 0.534	0	0
TOT		30	100			30	100

Keterangan:

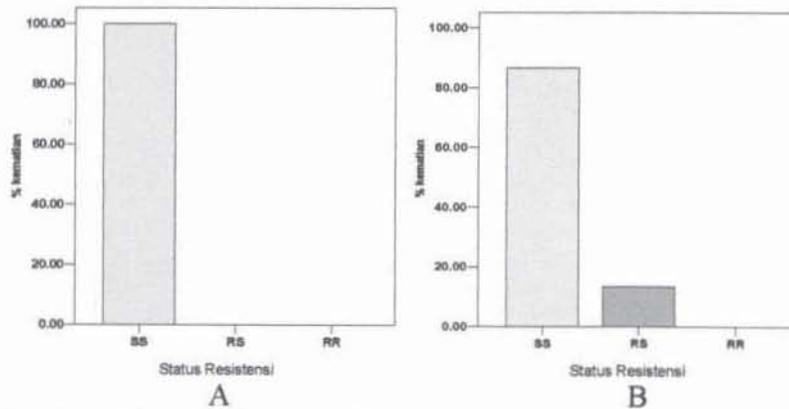
Cara 1: Hasil yang diperoleh hanya berdasarkan AV menurut kriteria Lee (SS bila $AV \leq 0,600$; RS bila $AV = 0,601-0,899$; RR bila $AV \geq 0,900$)

Cara 2: Hasil yang diperoleh berdasarkan Kriteria Lee modifikasi Mardihusodo: skor warna secara visual menurut Lee (1990) dengan konfirmasi AV dari ELISA Reader

Dan untuk status RR yaitu tiga kali rata-rata kontrol negatif yaitu 0,354. sedangkan untuk status RS berada di antara kedua nilai tersebut. Untuk nilai AV nyamuk *Ae. aegypti* TDC Unair Surabaya dapat dilihat pada (Lampiran 6). Hasil yang diperoleh bahwa 13,33% nyamuk sudah menampakkan status toleran yaitu sudah mulai tampak peningkatan aktivitas esterase non spesifik, namun demikian sebagian besar yaitu 86,6% masih sensitif (status SS) yang artinya tidak ada peningkatan aktivitas esterase non spesifik (Tabel 5.5 dan Gambar 5.2).

Kedua cara di atas memberikan hasil yang berbeda namun cara yang kedua (kriteria Lee 1990 modifikasi Mardihusodo) lebih menggambarkan situasi sebenarnya di lapangan. Hal ini dikarenakan alat ELISA yang dipakai di lapangan seringkali berbeda dengan yang digunakan oleh peneliti Lee ketika menemukan cara penetapan kriteria skor status resistensi pada

tahun 1990. Di samping itu pada penelitian yang bersifat enzimatik hasilnya sangat tergantung pada kontrol yang digunakan pada saat penelitian. Untuk selanjutnya dalam pembahasan dan kesimpulan penelitian, peneliti menggunakan kriteria Lee (1990) modifikasi Mardihusodo.



Gambar. 5.2 Grafik batang pola status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya secara: A. Kriteria Lee Kuantitatif (AV); B Skor warna dengan konfirmasi AV

5.2.2 Hasil Uji Biokemis Desa Dauh Puri Kauh Kecamatan Denpasar Barat

Uji biokemis secara kuantitatif (kriteria Lee) untuk nyamuk *Ae. aegypti* Desa Dauh Puri Kauh diperoleh hasil bahwa 20% nyamuk di daerah ini sudah mulai tampak peningkatan aktivitas esterase non spesifik yaitu sudah mulai toleran (RS) dan 80% masih sensitif (SS) yaitu belum ada peningkatan aktivitas esterase non spesifik.

Tabel 5.6 Hasil uji resistensi biokemis nyamuk *Ae. aegypti* dewasa Dauh Puri Kauh – Denpasar Barat

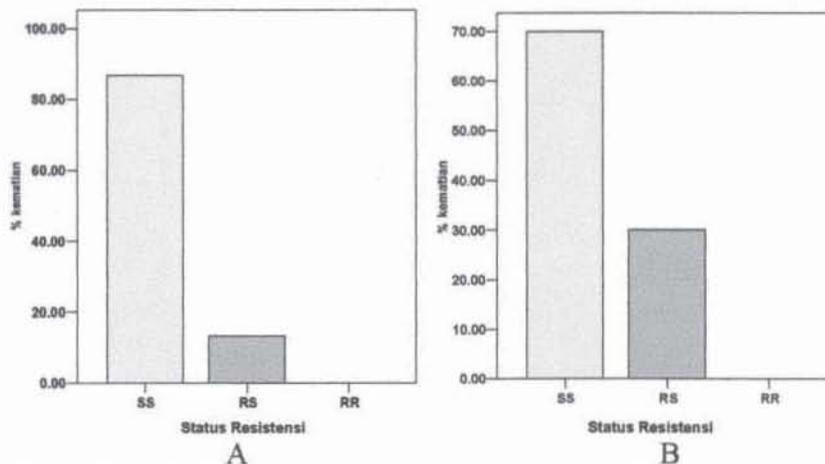
STATUS RESISTENSI BIOKEMIS DAUH PURI KAUH							
Kode	CARA 1			CARA 2			
	AV	JUMLAH	%	Visual	AV	Jumlah	%
SS	< 0.600	24	80.00	<2.00	< 0.522	21	70.00
RS	0.600-0.900	6	20.00	2.00-2.5	0.522-0.784	9	30.00
RR	>0.900	0	0.00	>2.5-3.0	> 0.784	0	0.00
TOT		30	100			30	100

Keterangan:

Cara 1: Hasil yang diperoleh hanya berdasarkan AV menurut kriteria Lee (SS bila $AV \leq 0,600$; RS bila $AV = 0,601-0,899$; RR bila $AV \geq 0,900$)

Cara 2: Hasil yang diperoleh berdasarkan Kriteria Lee modifikasi Mardihusodo: skor warna secara visual menurut Lee (1990) dengan konfirmasi AV dari ELISA Reader

Dengan cara kedua yaitu dengan menggunakan skor warna yang disertai dengan konfirmasi nilai AV diperoleh kriteria untuk status SS bila $AV < 0,522$; RS bila $AV = 0,522-0,784$ dan RR bila $AV > 0,784$. Untuk perhitungannya dilihat pada Lampiran 7.



Gambar. 5.3 Grafik batang pola status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* Desa Dauh Puri Kauh secara: A. Kriteria Lee Kuantitatif; B Skor warna dengan konfirmasi AV

Diperoleh hasil untuk cara kedua yaitu nyamuk Dauh Puri Kauh telah menampakkan peningkatan aktivitas esterase non spesifik yaitu

terbukti sebanyak 30% menunjukkan status toleran dan 70% masih sensitif yaitu tidak ada peningkatan aktivitas esterase non spesifik (Tabel 5.6 dan Gambar 5.3).

5.2.3 Hasil Uji Biokemis Desa Tegal Kerta Kecamatan Denpasar Barat

Hasil uji biokemis secara kuantitatif (kriteria Lee) untuk daerah Desa Tegal Kerta adalah 6,67% nyamuk asal *Ae. aegypti* Tegal Kerta sudah menunjukkan status toleran dan sebagian besar yaitu 93.33 % masih sensitif yaitu belum ada peningkatan aktivitas esterase non spesifik.

Tabel 5.7 Hasil uji resistensi biokemis nyamuk *Ae. aegypti* dewasa Tegal Kerta Denpasar Barat

STATUS RESISTENSI BIOKEMIS TEGAL KERTA							
Kode	CARA 1			Visual	CARA 2		
	AV	JUMLAH	%		AV	Jumlah	%
SS	< 0.600	28	93.33	<2.00	< 0.560	25	83.33
RS	0.600-0.900	2	6.67	2.00-2.5	0.560-0.840	5	16.67
RR	>0.900	0	0.00	2.6-3.0	> 0.840	0	0.00
TOT		30	100			30	100

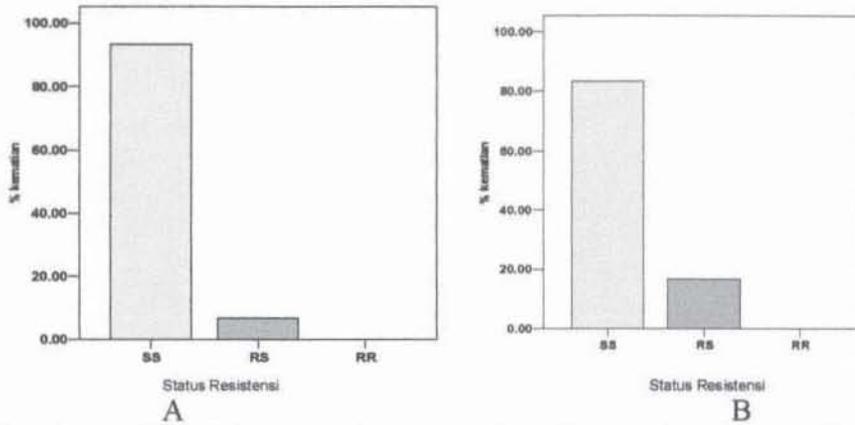
Keterangan:

Cara 1: Hasil yang diperoleh hanya berdasarkan AV menurut kriteria Lee (SS bila $AV \leq 0,600$; RS bila $AV = 0,601-0,899$; RR bila $AV \geq 0,900$)

Cara 2: Hasil yang diperoleh berdasarkan Kriteria Lee modifikasi Mardihusodo: skor warna secara visual menurut Lee (1990) dengan konfirmasi AV dari ELISA Reader

Hasil uji biokemis dengan cara kedua yaitu dengan menggunakan skor warna yang disertai dengan konfirmasi nilai AV. Dengan cara ini diperoleh kriteria SS bila $AV \leq 0,560$; RS bila $AV = 0,560-0,840$; RR bila $AV \geq 0,840$ (Lampiran 8). Adapun dari cara kedua ini diperoleh hasil bahwa nyamuk Tegal Kerta telah mulai ada peningkatan aktivitas esterase non

spesifik yaitu 16,67% termasuk toleran (RS) dan 83,33% masih sensitif yaitu tidak ada peningkatan aktivitas esterase non spesifik (Tabel 5.7).



Gambar. 5.4 Grafik batang pola status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* Desa Tegal Kerta secara: A.Kriteria Lee Kuantitatif; B Skor warna dengan konfirmasi AV

5.2.4 Hasil Uji Biokemis Desa Padangsambian Kecamatan Denpasar Barat

Hasil uji biokemis secara kuantitatif dengan melihat nilai AV diperoleh hasil bahwa 6,67 % nyamuk *Ae. aegypti* Padangsambian telah menunjukkan status toleran yang berarti telah mulai terjadi peningkatan aktivitas esterase non spesifik dan sisanya sebagian besar 93,3% masih sensitif belum ada peningkatan aktivitas esterase non spesifik (Tabel 5.8).

Tabel 5.8 Hasil uji resistensi biokemis nyamuk *Ae. aegypti* dewasa Padangsambian – Denpasar Barat

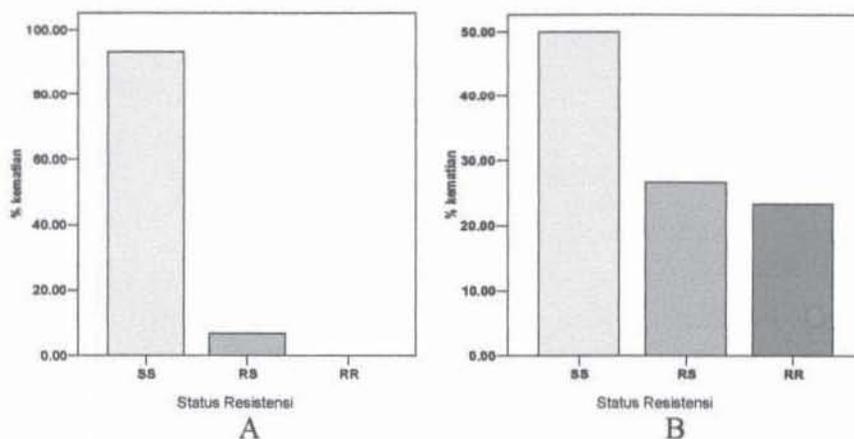
STATUS RESISTENSI BIOKEMIS PADANGSAMBIAN							
Kode	CARA 1			CARA 2			
	AV	JUMLAH	%	Visual	Absorbance Value	Jumlah	%
SS	< 0.600	28	93.33	<2.00	< 0.316	15	50.00
RS	0.600-0.900	2	6.67	2.00-2.5	0.316-0.474	8	26.67
RR	>0.900	0	0.00	>2.5-3.0	> 0.474	7	23.33
TOT		30	100			30	100

Keterangan:

Cara 1: Hasil yang diperoleh hanya berdasarkan AV menurut kriteria Lee (SS bila $AV \leq 0,600$; RS bila $AV = 0,601-0,899$; RR bila $AV \geq 0,900$)

Cara 2: Hasil yang diperoleh berdasarkan Kriteria Lee modifikasi Mardihusodo: skor warna secara visual menurut Lee (1990) dengan konfirmasi AV dari ELISA Reader

Dengan cara kedua yaitu dengan menggunakan skor warna yang disertai dengan konfirmasi nilai AV. Dari cara ini diperoleh kriteria untuk status SS bila $AV \leq 0,316$; RS bila $AV = 0,316-0,474$; dan RR bila $AV \geq 0,474$ (Lampiran 9). Hasil yang diperoleh dengan cara ini adalah telah terjadi peningkatan aktivitas esterase non spesifik yaitu sebanyak 23,33 % nyamuk Padangsembian telah mulai resisten, 26,67% menunjukkan toleran, dan 50% masih sensitif (Tabel 5.8).



Gambar. 5.5 Grafik batang pola status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* Desa Padangsembian secara: A. A.Kriteria Lee Kuantitatif; B Skor warna dengan konfirmasi AV

Dari hasil uji biokemis masing-masing desa di kecamatan Denpasar Barat maka rata-rata status resistensi sesuai kategori Lee (1990) adalah untuk daerah Denpasar Barat adalah 11,11% nyamuk sudah mulai

menunjukkan status toleran, jadi sudah mulai tampak peningkatan aktivitas esterase non spesifik namun sebagian besar 88,89% masih rentan atau tidak terdapat peningkatan aktivitas esterase non spesifik (Tabel 5.9). Berdasarkan hasil nilai AV dengan konfirmasi skor warna diperoleh bahwa sudah terdapat peningkatan aktivitas esterase non spesifik yaitu sudah 7,78 mengalami resisten, 24,45 menunjukkan toleran, dan 67,78% masih sensitif yaitu belum terdapat peningkatan aktivitas esterase non spesifik.

Tabel 5.9 Rekapitulasi status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* Denpasar Barat dengan uji biokemis yang menghidrolisis substrat α -naphtyl asetat

Daerah	Cara 1			Cara 2		
	SS	RS	RR	SS	RS	RR
Dauh Puri Kauh	80,00	20,00	0,00	70,00	30,00	0,00
Tegal Kerta	93,33	6,67	0,00	83,33	16,67	0,00
Padangsambian	93,33	6,67	0,00	50,00	26,67	23,33
Denpasar Barat	88,89	11,11	0,00	67,78	24,45	7,78

Hasil uji biokemis selengkapnya untuk nyamuk asal LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat adalah dirangkum dalam Tabel 5.10.

Tabel 5.10 Rekapitulasi status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair Sby dengan uji biokemis yang menghidrolisis substrat α -naphtyl asetat

Daerah	Cara 1			Cara 2		
	%SS	%RS	%RR	%SS	%RS	%RR
LPT Unair Sby	100,00	0,00	0,00	86,67	13,33	0,00
Denpasar Barat	88,89	11,11	0,00	67,78	24,45	7,78

5.2.5 Analisis Hasil Uji Biokemis *Ae. aegypti* asal LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat

Untuk mengetahui adanya perbedaan aktivitas esterase antara nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat dilakukan uji t. Namun sebelumnya data yang ada akan diuji terlebih dahulu normalitasnya dengan Uji Kolmogorov-Smirnov. Data yang diuji normalitasnya adalah nilai AV yang mencerminkan aktivitas esterase non spesifik nyamuk *Ae. aegypti*. Hasil uji normalitas data didapatkan bahwa semua AV yang berasal dari Denpasar Barat maupun LPT Unair Surabaya berdistribusi normal namun data bersifat heterogen (Lampiran 10).

Hasil uji t yaitu terdapat perbedaan aktivitas esterase non spesifik yang sangat bermakna antara LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat dengan nilai $p=0,000$ (Tabel.5.11)

Tabel 5.11. Analisis *independent T-test* perbedaan aktivitas esterase non spesifik antara LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat

Variabel	Rerata		t	p
	LPT Unair Surabaya	Denpasar Barat		
AV	0.271±0,08	0.405±0,15	-6,132	0,000

Analisis varians satu arah (*one way anova*) digunakan untuk melihat perbedaan aktivitas esterase non spesifik dengan membandingkan nilai AV antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Dauh Puri Kauh, Desa Tegal Kerta, dan Desa Padangsambian. Adapun hasilnya adalah terdapat

perbedaan tingkat resistensi yang sangat bermakna di antara keempat kelompok daerah dengan nilai $p=0,000$ (Tabel 5.12 dan Lampiran 11).

Tabel 5.12 Analisis *one way anova* perbedaan AV daerah LPT Unair Surabaya, Desa Dauh Puri Kauh, Desa Tegal Kerta, dan Desa Padangsambian

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-hitung	Sig
Antar Kelompok	3	0,566	0,189	11,245	0,000
Dalam Kelompok	116	1,947	0,017		
Total	119	2,513			

Selanjutnya untuk membandingkan kemaknaan perbedaan AV dari setiap daerah maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) yaitu dengan menggunakan uji *Least Significance Difference* (LSD). Hasil uji LSD (Lampiran 12) adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p=0.000$) antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Dauh Puri Kauh dan Desa Tegal Kerta serta antara Desa Padangsambian dengan Dauh Puri (0,003). Perbedaan yang bermakna terdapat antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Padangsambian (0,016) (Tabel 5.13)

Tabel 5.13 Hasil LSD Nilai AV antar daerah

Daerah	LPT Unair Sby	Dauh Puri Kauh	Tegal Kerta	Padangsambian
LPT Unair Sby		0.000	0.000	0,016
Dauh Puri Kauh				0,003
Tegal Kerta				
Padangsambian				

BAB 6

PEMBAHASAN

Dalam pembahasan ini akan dibahas lima hal pokok yang berhubungan dengan permasalahan penelitian ini yaitu: 1) status resistensi dari hasil uji hayati, 2) besarnya LC₅₀, LC₉₅, LC₉₉, dan dosis diagnostik malathion, 3) hasil uji biokemis, dan 4) perbedaan aktivitas esterase antara nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dengan Denpasar Barat.

6.1 Status Resistensi *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya Terhadap Malathion

Hasil uji hayati dari nyamuk *Ae. aegypti* baik yang berasal dari Denpasar Barat maupun LPT Unair Surabaya menunjukkan belum ada yang resisten terhadap malathion. Ini terlihat dari persentase kematian yang mencapai 100 % ketika terpapar malathion pada dosis diagnostik WHO 50.000 ppm ataupun pada dosis yang ditetapkan oleh USAEHA 12.850 ppm.

Malathion telah digunakan sebagai insektisida foging selama lebih dari 10 tahun walaupun demikian ternyata nyamuk *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya belum mengalami resistensi. Hal ini mungkin disebabkan intensitas dan frekuensi pemakaian malathion yang hanya dilakukan secara rutin dua kali dalam setahun dalam program foging masal dan hanya sewaktu-waktu saja bila ada kasus DBD. Walaupun kasus DBD tinggi tapi pemerintah tidak mampu melakukan program foging setiap

waktu dan masyarakat sendiri pun banyak yang tidak mampu melakukan foging swakarsa karena kendala biaya yang mahal. Bahan insektisida berbahan malathion juga tidak dapat ditemui di pasaran dengan mudah seperti halnya obat nyamuk lain yang komersil, seperti contohnya golongan karbamat, pyrethroid sintetik, fenitroin, atau golongan organofosfat lainnya seperti temefos (abate®). Namun semua kemungkinan di atas harus diteliti lebih lanjut kebenarannya.

Kondisi belum resistennya nyamuk *Ae. aegypti* terhadap malathion juga terjadi di beberapa negara lain di dunia, seperti contohnya di Venezuela, Jamaica, Kuba, Costarica (Magdalena *et al.*, 2000); India (Katyal *et al.*, 2001); dan Vietnam (Huong *et al.*, 2004) dan untuk di Indonesia yaitu di Sumatera Selatan, Bandung, dan Surabaya (Nurrahman, 2008).

6.2 Penentuan LC₅₀, LC₉₅, LC₉₉, dan Dosis Diagnostik Malathion

Nilai LC₅₀, LC₉₅, dan LC₉₉ nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya lebih tinggi dibandingkan Denpasar Barat. Begitu juga halnya dengan dosis diagnostik malathion LPT Unair Surabaya juga lebih tinggi dibandingkan dengan Denpasar Barat. Namun demikian, besarnya dosis diagnostik malathion LPT Unair Surabaya maupun di Denpasar Barat masih jauh lebih kecil jika dibanding dosis diagnostik malathion yang ditetapkan oleh WHO maupun USAEHA. Hasil ini mendukung hasil uji hayati yang menyatakan

nyamuk kedua daerah ini belum resisten sehingga malathion masih layak digunakan untuk program pemberantasan vektor DBD di Denpasar Barat.

Semakin kecil nilai LC_{50} suatu bahan maka semakin toksik bahan tersebut bagi suatu organisme karena cukup dengan dosis yang kecil dapat membunuh organisme sasaran sebanyak 50%. LC_{50} malathion pada nyamuk LPT Unair lebih tinggi dibandingkan Denpasar Barat ini berarti malathion bersifat kurang toksik bagi nyamuk LPT Unair atau dengan kata lain lebih resisten.

Dari analisis probit dengan menggunakan program probit diperoleh hasil persamaan garis probit untuk LPT Unair Surabaya adalah $y = -0,82 + 3,41x$ dan Denpasar Barat $y = -0,75 + 3,81x$. Jika digambarkan dalam garis probit diperoleh suatu hubungan yang positif antara peningkatan konsentrasi malathion dengan peningkatan jumlah kematian nyamuk di kedua daerah di mana peningkatan konsentrasi malathion meningkatkan mortalitas nyamuk *Ae. aegypti*.

Garis probit LPT Unair Surabaya berada lebih di kanan dibanding Denpasar Barat. Hal ini menggambarkan bahwa nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya lebih resisten dibanding dengan Denpasar Barat. Fakta ini sesuai dengan teori garis LD-P yaitu semakin resisten suatu organisme terhadap insektisida maka garis LD-P akan bergeser ke kanan dan akan menjadi lebih miring (Ferrari, 1990). Fakta berikutnya yang dapat diambil dari perbandingan dua garis probit tersebut adalah diperlukan konsentrasi malathion yang lebih tinggi untuk membunuh nyamuk asal LPT Unair

Surabaya dibandingkan dengan nyamuk asal Denpasar Barat. Walaupun nyamuk asal LPT Unair Surabaya relatif lebih resisten dibandingkan dengan Denpasar Barat, namun nyamuk yang berasal dari kedua daerah tersebut dari hasil uji hayati masih sama-sama dalam status belum resisten (SS).

Nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya cenderung lebih resisten dibanding Denpasar Barat mungkin dikarenakan tingkat intensitas foging menggunakan malathion lebih tinggi, mengingat jumlah penduduk yang sangat padat tentunya disertai kasus DBD yang juga tinggi. Pemakaian insektisida malathion sebagai bahan foging di masyarakat juga sering tidak memenuhi standar yaitu konsentrasi malathion yang digunakan kurang dari 5% di mana lebih banyak bahan pencampur lainnya seperti solar.

Tingkat penggunaan yang tinggi dan lama serta penggunaan dosis insektisida sub letal, merupakan salah satu penyebab yang memacu timbulnya resistensi. Hal ini akan menimbulkan mekanisme adaptasi dari serangga untuk melakukan detoksikasi terhadap bahan toksikan insektisida atau serangga melakukan mutasi pada *target-site*, mengalami perubahan anatomis sehingga menurunkan penetrasi insektisida ke dalam tubuh nyamuk.

6.3 Uji Biokemis

Pada penelitian ini terdapat dua kriteria yang berbeda dalam menentukan status resistensi berdasarkan aktivitas esterase non spesifik yang tercermin

dari besarnya nilai AV. Kriteria pertama berdasarkan kriteria Lee (1990) dan yang kedua berdasarkan Lee-Modifikasi Mardihusodo.

Dalam penelitian ini yang digunakan selanjutnya dalam kesimpulan akhir adalah dengan menggunakan kriteria Lee Modifikasi Mardihusodo. Alasan penggunaan kriteria ini adalah kriteria ini lebih mencerminkan kondisi di lapangan yang sebenarnya. Besarnya suatu nilai AV yang diukur pada satu ELISA bisa berbeda jika diukur menggunakan ELISA yang spesifikasinya berbeda. Hal ini tentunya akan mengakibatkan kategori status resisten yang dibuat berdasarkan nilai AV di lapangan juga berbeda-beda. Di samping itu pada penelitian yang bersifat enzimatik hasilnya sangat tergantung pada kontrol yang digunakan pada saat penelitian. Oleh karena itu dalam menentukan status resistensi digunakan kriteria dari Lee modifikasi Mardihusodo.

Hasil uji biokemis berdasarkan kriteria dari Lee modifikasi Mardihusodo adalah pada nyamuk *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat sudah ada yang menunjukkan resisten sebesar 7,78% yang berarti ada peningkatan aktivitas esterase sedangkan pada nyamuk asal LPT Unair Surabaya belum ada yang resisten namun sudah ada yang menunjukkan status toleran sebesar 13,33%.

Jika hasil uji hayati dibandingkan dengan hasil uji biokemis maka ternyata tidak terdapat kesesuaian antara hasil uji hayati dengan uji biokemis yang menguji aktivitas esterase non spesifik tipe α -naphthyl asetat pada nyamuk *Ae. aegypti* dari LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat. Ini

dicerminkan dari hasil uji hayati menunjukkan nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat adalah masih dalam status SS (sensitif) yaitu belum ada yang resisten terhadap malathion sedangkan hasil uji biokemis menunjukkan sudah mulai tampak adanya peningkatan aktivitas esterase non spesifik yaitu sudah ada yang resisten pada nyamuk asal Denpasar Barat dan toleran pada nyamuk LPT Unair Surabaya. Fakta ini mencerminkan bahwa mekanisme resistensi nyamuk dewasa *Ae. aegypti* di LPT Unair Surabaya dan Denpasar Barat terhadap malathion kemungkinan bukan disebabkan oleh peningkatan aktivitas esterase non spesifik tipe α -naphthyl asetat.

Terjadinya peningkatan aktivitas esterase non spesifik pada nyamuk *Ae. aegypti* Di Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya mungkin disebabkan karena pemakaian insektisida golongan organofosfat yang lain (selain malathion). Mekanisme resistensi organofosfat pada umumnya melalui mekanisme enzim esterase, namun demikian tidak menutup kemungkinan tidak melalui mekanisme enzim esterase tapi melalui mekanisme enzim lain. Untuk itu perlu dicari insektisida organofosfat mana yang telah resisten pada nyamuk *Ae. aegypti* di kedua daerah tersebut melalui uji hayati. Misalnya dengan menguji resistensi terhadap insektisida golongan organofosfat lainnya seperti temefos yang juga termasuk ke dalam golongan organofosfat ataupun insektisida golongan karbamat yang sering memiliki resistensi silang dengan golongan organofosfat

Terdapat banyak enzim lain yang berperan terhadap terjadinya resistensi terhadap insektisida organofosfat, namun yang telah berhasil diteliti sampai saat ini adalah enzim karboksil esterase, glutathione S tranferase, dan *mixed function oxidase* (Dauterman and Hodgson, 1978). Sebagai contoh di Sriilanka, resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap malathion disebabkan oleh enzim karboksil esterase (Karunaratnel and Hemingway , 2001). Peningkatan enzim esterase non spesifik pada nyamuk *Ae. aegypti* yang resisten terhadap malathion ditemukan di beberapa daerah di Yogyakarta (Mardihusodo, 1993) dan di Jawa Tengah (Widiarti dkk, 2005).

6.4 Perbedaan Aktivitas Esterase non Spesifik antara Nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dengan Denpasar Barat

Secara statistik terdapat perbedaan aktivitas esterase yang bermakna antara nyamuk *Ae. aegypti* LPT Unair Surabaya dengan Denpasar Barat. Jika aktivitas esterase antara LPT Unair Surabaya dibandingkan dengan tiga desa yang terdapat di Denpasar Barat diperoleh perbedaan yang sangat bermakna ($p=0.000$) antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Dauh Puri Kauh dan Desa Tegal Kerta serta antara Desa Padangsambian dengan Dauh Puri (0,003). Perbedaan yang bermakna terdapat antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Padangsambian (0,016) (Tabel5.13)

Seperti diketahui aktivitas esterase mencerminkan terjadinya mekanisme detoksikasi pada tubuh nyamuk dalam usaha menetralkan efek toksikan dalam tubuh nyamuk yang berakibat resistennya nyamuk terhadap

insektisida (Ferrari, 1990). Dengan demikian nilai AV yang lebih tinggi mencerminkan tingkat resistensi yang lebih tinggi.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Nyamuk dewasa *Ae. aegypti* dari Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya dari hasil uji hayati belum menunjukkan adanya resistensi terhadap malathion, sedangkan hasil uji biokemis berdasarkan kriteria dari Lee modifikasi Mardihusodo pada nyamuk *Ae. aegypti* asal Denpasar Barat sudah ada ditemukan resisten dan pada nyamuk asal LPT Unair Surabaya menunjukkan status toleran yang berarti sudah ada aktivitas esterase yang merupakan penanda adanya mekanisme detoksikasi terhadap suatu bahan insektisida, namun bukan terhadap malathion.

Terdapat perbedaan tingkat resistensi yang bermakna antara nyamuk *Ae. aegypti* Denpasar Barat dengan LPT Unair Surabaya. Dan terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Dauh Puri Kauh dan Desa Tegal Kerta serta antara Desa Padangsambian dengan Dauh Puri Kauh. Perbedaan yang bermakna terdapat antara LPT Unair Surabaya dengan Desa Padangsambian.

7.2 Saran

Uji hayati perlu dilakukan dengan insektisida organofosfat lain yang mekanisme resistensinya melalui aktivitas esterase non spesifik. Uji biokemis lain juga perlu dilakukan untuk menemukan mekanisme enzim

yang menyebabkan timbulnya resistensi pada malathion. Faktor apa yang menjadi penyebab masih sensitifnya nyamuk *Ae. aegypti* di Denpasar Barat, mengingat penggunaan malathion sudah melebihi 10 tahun perlu diteliti lebih lanjut.

Malathion masih bisa digunakan dalam program pengendalian nyamuk *Ae. aegypti* karena malathion dari hasil uji hayati menunjukkan belum ada nyamuk *Ae. aegypti* yang resisten. Namun demikian perlu dipertimbangkan untuk menggunakan insektisida dari berbagai jenis golongan secara bergantian, karena penggunaan yang lama dan terus menerus memicu terjadinya resistensi.

Pemantauan resistensi insektisida terhadap vektor penyakit perlu dilakukan secara berkala dan berkesinambungan. Hal ini sangat diperlukan untuk mendukung program pengendalian vektor seperti misalnya dapat menggunakan insektisida yang masih sensitif sesuai hasil pemantauan resistensi secara bergantian dalam jangka waktu yang singkat untuk menghindari terjadinya resistensi.

Pengendalian vektor dengan cara memberantas tempat perindukan nyamuk harus lebih ditingkatkan dibandingkan dengan menggunakan bahan kimia insektisida. Pemakaian insektisida walaupun dikatakan aman namun masih memiliki efek merugikan bagi lingkungan sekitar termasuk bagi manusia. Sosialisasi gerakan memberantas sarang nyamuk harus terus menerus diupayakan karena untuk mengubah perilaku diperlukan waktu yang lama.

Daftar pustaka

- Brogdon WG, and McAllister JC, 1998. Insecticide Resistance and Vector Kontrol. Centers for Disease Kontrol and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. *Emerging Infectious Diseases* 4(4): 605-613
- Brown AE, 2006. Mode of Action of Insecticides and Related Pest Kontrol Chemicals for Production agriculture, Ornamentals, and Turf. *Pesticide Information* 43: 1-13
- Dauterman WC and Hodgson E, 1978. Detoxication Mechanism in Insects. In *Biochemistry of Insects*. New Yok: Academic Press. pp 541-577
- Dinas Kesehatan Denpasar, 2007. Profil Kota Denpasar Tahun 2006.
- Feyereisen R, 1995. Molecular biology of insecticides resistance. *Toxicology Letters* 82-83: 83-90
- Ferrari JA, 1990. Insecticide resistance. In *The Biology of Disease Vectors*. United States: University Press of Colorado, pp 512-528
- Fox I, 1980. Malathion Resistance in *Aedes Aegypti* of Puerto Rico Induced by Selection Pressure on Larvae. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 29(6): 1456-1459
- Hasyimi M dan Soekirno M, 2004. Pengamatan Tempat Perindukan *Aedes aegypti* pada Tempat Penampungan Air Rumah Tangga pada Masyarakat Pengguna Air Olahan. *Jurnal Ekologi Kesehatan* 3 (1): 37-42
- Harrison BA, and Rattarithiku R, 1973. Comparative Morphology of the Early Larval Instars of *Aedes aegypti* and *A. seatoi* in Thailand. *Mosquito Systematics* 5(4): 280-294

- Huang VD, Ngoc NTB, Hien DT, and Lien NTB, 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to insecticide in Vietnam. *Dengue Bulletin* 28: 179-183
- IRAC, 2006. Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance. WHO: Insecticide Resistance Action Committee, pp 7-12
- James MT, 1969. Mosquitoes. In *Herm's Medical Entomology*, 6th ed. United Staes.: The MacMillan Company, pp 167-222.
- Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharapit S, Chareonviriyaphap T, Duchon S, Bellec C, and Yoksan S., 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *Journal Econ Entomology* 100(2): 545-550
- Karunaratne SHPP, and Hemingway J, 2001. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in RSi Lanka. *Bulletin of the WorLC Health Organization*, 2001, 79: 1060-1064.
- Katyaj R, Tewari P, Rahman SJ, PajniHR, Kumar K, and Gill KS, 2002. Susceptibility Status of Immature and Adult Stages of *Ae. aegypti* Against Conventional Insecticides in Delhi, India. *Dengue Bulletin* 25:84-87
- Kegley S, Hill B, and Orne S, 2007. Pesticide Action Network Database. North America San Fransisco. Alamat <http://www.pesticideinfo.org> yang diakses pada tanggal 20 Desember 2007.
- Kusumawati Y, Suswardany DL, Yuniarno S, dan Darnoto S, 2007. Upaya Pemberantasan Nyamuk *Aedes aegypti* dengan pengasapan (Foging) dalam Rangka Mencegah Peningkatan Kasus Demam Berdarah. *Surakarta. Warta* 2A, 10(1): 1-9
- Koban AW, 2005. Kebijakan Pemberantasan Wabah Penyakit Menular: Kasus Kejadian Luar Biasa Demam Berdarah Dengue (KLB DBD).

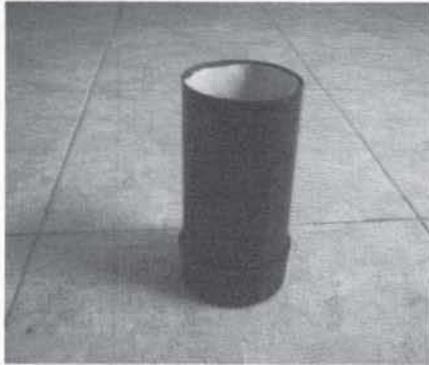
Dalam Policy Assessment. www.theindonesianinstitute.com (diakses tanggal 10 Nopember 2007)

- Macoris, 2005. Standardization of Bioassays for Monitoring Resistance to Insecticides in *Ae. aegypti*. *Dengue bulletin*, 29:177-182
- Macoris MLG, Macoris MT, Andrighetti, Otrera VCG, Carvalho LRC, Junior ALC, Brogdon WG, 2007. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Memorias do Instituto OswalCo Cruz*, 102(8):895-900.
- Magdalena M., Coto R., Lazcano J.A.B., Soca A., Fernandez, 2000. Malathion Resistance in *Aedes Aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after Its Use in *Aedes aegypti* Kontrol Programs. *Journal of the American Mosquito Kontrol Association*, 16(4): 124-132
- Matsumura F, 1976. Anticholinesterase Organophosphat. In *Toxicology of Insecticides*. New York: Plenum Press, pp 17-41
- Mardihusodo, 1993. Deteksi Dini Resistensi *Aedes aegypti* terhadap Malathion dan Temefos. Yogyakarta: Lembaga Penelitian Universitas Gajah Mada.
- Mekuria Y, Williams DC, Hyatt MG, Zack RE, and Gwinn TA, 1994. Malathion resistance in mosquitoes from Charleston and Georgetown counties of coastal South Carolina. *Jornal American Mosquito Control Assoc.* 10(1):56-63
- Mochammadi N, Rosmanida, dan Yotopranoto S, 2002. Analisis Densitas *Aedes aegypti* Pada Daerah Endemis Demam Berdarah di Kecamatan Sawahan, Kotamadya Surabaya. *Jurnal Penelitian Medika Eksata* 3(3): 242-252
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima, Braga IA, and Valle D, 2007. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 77(3):. 467-477

- Nurrahman Y, 2008. Uji Kerentanan nyamuk *Aedes aegypti* Linn.dari beberapa wilayah di Indonesia dan beberapa lokasi di Bandung terhadap insektisida malathion. Skripsi mahasiswa S1 ITB.
- Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P., 2007. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Tropical Biomedicine* 24(1):7-15
- Service M.W., 1996. *Aedes* Mosquitoes. In *Medical Entomology for Students*. London: Chapman & Hall, pp58-62
- Sitorus, 2003. Deteksi Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* terhadap Insektidia Malathion dengan Teknik Bioassay di Kota Medan. Skripsi mahasiswa S1 Universitas Gajah Mada.
- Soegijanto S, 2006. Demam Berdarah Dengue, Edisi Dua. Surabaya: Penerbit Airlangga University Pres.
- Sumarmo S, 1988. Demam Berdarah (*Dengue*) pada Anak. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia
- USAEHA, 1992. Procedures for Diagnostic Dose Resistance Test Kits for mosquitoes, Body Lice, and Beetle Pets of Stored Products. USAEHA TG No. 189: (3-7)-(3-9)
- WHO, 1986. Resistance of Vectors and Reservoirs of Disease to Pesticides. In *WorLC Health Organization Technical; Report Series 737*. Switzerland
- Widiarti, Damar Tri Boewon, Umi Widyastuti, dan Mujiono, 2005. Uji BiokemisKerentanan Vektor Malaria Terhadap Insektisida Organofosfat dan Karbamat di Provinsi Jawa tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta. Balai Penelitian Vektor dan Reservoir Penyakit Ltibangkes, Salatiga.

- Wongkoon S, Jaroensutasinee M., and Jaroensutasinee K., 2005. Larval Infestations of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in NakhonR Sithammarat, Thailand. *Dengue Bulletin*. 29(1): 15-25
- Yotopranoto S, 2001. Analisis Dinamika Populasi Vektor pada Lokasi dengan Kasus Demam Berdarah Tinggi di Kotamadya Surabaya. Badan Litbang Kesehatan. Report from JKPKBPPK / 2005-05-23 11:11
- Yotopranoto, 2003. Vector Situation in Dengue Haemorrhagic Fever Endemic Area's of Surabaya Municipality, Indonesia. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia* 14(2): 146-154
- Yotopranoto, 2006. Peran Serta Kader PKK dalam Pengendalian Vektor Penyakit DBD di Kelurahan Patemon, Kecamatan Sawahan, Kota Surabaya. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia* 16(1): 1-10
- Yotopranoto S, 2006. Nyamuk *Aedes aegypti* sebagai Vektor Penyakit Demam Berdarah Dengue. Dalam Demam Berdarah Dengue. Edisi Dua. Surabaya: Airlangga University Press. Hal 247-266

Lampiran 1: BAHAN DAN ALAT PENELITIAN



A. Ovitrap



B Sangkar Nyamuk



C. Test Kit Tabung WHO



D Coupling reagent & Substrat



E. Instrumen Penelitian Uji Biokemis



F. ELISA Reader BIORAD

**Lampiran 2: PERSENTASE KEMATIAN NYAMUK HASIL UJI
PENDAHULUAN**

Daerah	Konsentrasi (ppm)	Jumlah Nyamuk	Jumlah kematian Nyamuk			Kematian Nyamuk (%)
			R1	R2	R3	
TDC	1	25	0	0	0	0.0
	5	25	0	0	1	1.3
	10	25	0	0	1	1.3
	20	25	4	0	6	13.3
	30	25	8	7	10	33.3
	40	25	5	8	4	22.7
	50	25	13	17	18	64.0
	70	25	20	20	20	80.0
	80	25	23	22	24	92.0
	90	25	25	25	24	97.3
Denbar	10	25	0	0	0	0.0
	20	25	3	6	2	14.7
	30	25	7	6	6	25.3
	40	25	8	5	10	30.7
	50	25	12	10	14	48.0
	60	25	10	16	8	45.3
	70	25	15	18	20	70.7
	80	25	23	22	22	89.3
	90	25	25	25	25	100.0

Lampiran 3: PERHITUNGAN VARIASI KONSENTRASI MALATHION

Rumus *increment factor* :

$$F = \sqrt[n-1]{\frac{LD}{SD}}$$

F = *increment factor*
 N = *number of dose*
 LD = *Large Dose*
 SD = *Small Dose*

Pada penelitian ini digunakan 6 variasi konsentrasi yang berada pada rentangan konsentrasi antara 20 ppm sampai dengan 80 ppm (hasil uji pendahuluan yang menyebabkan kematian 10% sampai 90% nyamuk *Ae. aegypti* Denpasar Barat dan LPT Unair Surabaya). Variasi konsentrasi disimbulkan dengan 20 ppm, a, b, c, d, 80 ppm.

$$F = \sqrt[n-1]{\frac{LD}{SD}}$$

$$F = \sqrt[6-1]{\frac{80}{20}} = \sqrt[5]{4}$$

$$\longrightarrow \begin{aligned} \text{Log } F &= 1/5 \text{ Log } 4 \\ \text{Log } F &= 0,1204 \\ \text{Antilog } 0,1204 &= 1,32 \end{aligned}$$

$$a = 20 \times 1,32 = 26,40 \text{ ppm}$$

$$a = 25 \text{ ppm}$$

$$b = 26,4 \times 1,32 = 34,85 \text{ ppm} \quad \text{dibulatkan}$$

$$b = 35 \text{ ppm}$$

$$c = 34,85 \times 1,32 = 46 \text{ ppm}$$

$$c = 45 \text{ ppm}$$

$$d = 46 \times 1,32 = 60,72 \text{ ppm}$$

$$d = 60 \text{ ppm}$$

Jadi variasi konsentrasi konsentrasi malathion yang digunakan adalah 20 ppm, 25 ppm, 35 ppm, 45 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm.

**Lampiran 4: ANALISIS PROBIT UJI HAYATI PADA MALATHION
DENPASAR BARAT**

THE INSECT : *Aedes aegypti* (Denpasar Barat)
 THE INSECTICIDE : Malathion
 REPLICATION NUMBER : 4
 THE HOURS AFTER EXPOSURE : 24
 DOSAGES (ppm) : 20 25 35 45 60 80

SLOPE OF LINE (B) = 3.815112, INTERSEPT (A) = -.7525211
 HETEROGENETY INSIGNIFICANT, CHI SQUARE = 7.486206 DF = 4

VARIANCE = 2.503377E-04
 X= .5 LCX = 32.19771
 95% LIMITS = 29.97878 AND 34.5809

VARIANCE = 7.675506E-04
 X = .9 LCX= 69.78916
 95% LIMITS = 61.5867 AND 79.08411

VARIANCE = 1.185636E-03
 X.95 LCX = 86.90861
 95% LIMITS = 74.4002 AND 101. 5201

VARIANCE 2,292871E-03
 X.99 LCX 131.1338
 95%LIMITS=105.6482 AND 162,7673

**Lampiran 5: ANALISIS PROBIT UJI HAYATI PADA MALATHION
LPT UNAIR SURABAYA**

Analisis Probit Uji Hayati pada Malathion TDC

THE INSECT : *Aedes aegypti* (LPT Unair Surabaya)
 THE INSECTICIDE : Malathion
 REPLICATION NUMBER : 4
 THE HOURS AFTER EXPOSURE : 24
 DOSAGES (ppm) : 20 25 35 45 60 80

SLOPE OF LINE (B) = 3.4083 INTERSEPT (A) = -.822
 HETEROGENETY INSIGNIFICANT, CHI SQUARE = 8.756897 DF = 4

VARIANCE = 3.260068E-04
 X= .5 LCX = 51,07201
 95% LIMITS = 47.07539 AND 55.40794

VARIANCE = 1.846921E-03
 X = .9 LCX= 121.4076
 95% LIMITS = 100.0031 AND 147.3936

VARIANCE = 2.674581E-03
 X.95 LCX = 155.2004
 95% LIMITS = 122.8934 AND 196.0003

VARIANCE =4,698631E-03
 X=.99 LCX=245.9621
 95% LIMITS=180,5165 AND 335.134895% LIMITS = 122.8934 AND
 196.0003

**Lampiran 10: UJI NORMALITAS DATA AV NYAMUK *Ae. aegypti*
LPT UNAIR SURABAYA DAN DENPASAR BARAT**

NPar Tests AV LPT UNAIR SURABAYA

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Absorbance Value
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.27080
	Std. Deviation	.080345
Most Extreme Differences	Absolute	.159
	Positive	.159
	Negative	-.080
Kolmogorov-Smirnov Z		.872
Asymp. Sig. (2-tailed)		.432

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar AV DENPASAR BARAT

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Absorbance Value
N		90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.40540
	Std. Deviation	.146823
Most Extreme Differences	Absolute	.082
	Positive	.082
	Negative	-.066
Kolmogorov-Smirnov Z		.778
Asymp. Sig. (2-tailed)		.580

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 11: UJI T-TEST INDEPENDENT AV LPT UNAIR SURABAYA DAN DENPASAR BARAT

T-Test AV TDC DAN DENBAR

Group Statistics

	Daerah	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Absorbance Value	TDC	30	.27080	.080345	.014669
	Denbar	90	.40540	.146823	.015477

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Absorbance Value	Equal variances assumed	9.913	.002	-4.779	118	.000	-.134600	.028163	-.190370	-.078830
	Equal variances not assumed			-6.312	92.250	.000	-.134600	.021324	-.176949	-.092251

**Lampiran 12: UJI ANOVA ONE WAY LPT UNAIR SURABAYA
DAN ANTAR DESA DI DENPASAR BARAT**

Descriptives

Absorbance Value

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
LPT Unair Sby	30	.27080	.080345	.014669	.24080	.30080	.158	.521
PADANGSAMBIAN	30	.35297	.153675	.028057	.29558	.41035	.084	.753
DAUH PURI	30	.45573	.152593	.027859	.39875	.51271	.256	.781
TEGAL KERTA	30	.40750	.117423	.021438	.36365	.45135	.245	.646
Total	120	.37175	.145331	.013267	.34548	.39802	.084	.781

ANOVA

Absorbance Value

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.566	3	.189	11.245	.000
Within Groups	1.947	116	.017		
Total	2.513	119			

Robust Tests of Equality of Means

Absorbance Value

	Statistic(a)	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	11.245	3	98.178	.000

a. Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Absorbance Value

LSD

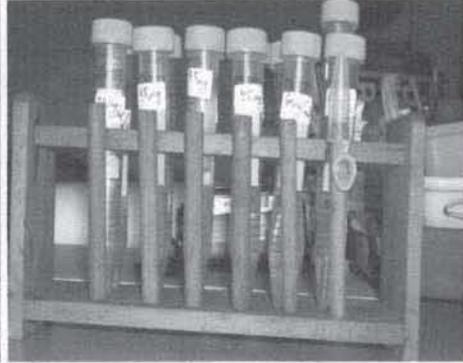
(I) Daerah	(J) Daerah	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
TDC	PADANGSAMBIAN	-.082167*	.033452	.016	-.14842	-.01591
	DAUH PURI	-.184933*	.033452	.000	-.25119	-.11868
	TEGAL KERTA	-.136700*	.033452	.000	-.20296	-.07044
PADANGSAMBIAN	TDC	.082167*	.033452	.016	.01591	.14842
	DAUH PURI	-.102767*	.033452	.003	-.16902	-.03651
	TEGAL KERTA	-.054533	.033452	.106	-.12079	.01172
DAUH PURI	TDC	.184933*	.033452	.000	.11868	.25119
	PADANGSAMBIAN	.102767*	.033452	.003	.03651	.16902
	TEGAL KERTA	.048233	.033452	.152	-.01802	.11449
TEGAL KERTA	TDC	.136700*	.033452	.000	.07044	.20296
	PADANGSAMBIAN	.054533	.033452	.106	-.01172	.12079
	DAUH PURI	-.048233	.033452	.152	-.11449	.01802

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 13: PEMBUATAN *IMPREGNATED PAPER* DENGAN MALATHION BERBAGAI KONSENTRASI



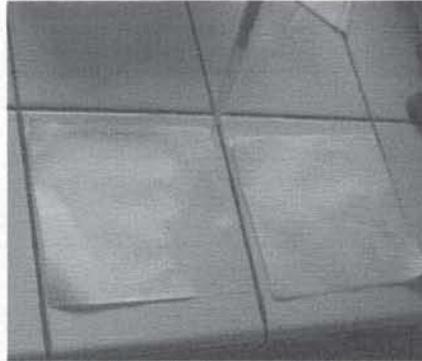
1 Penimbangan Malathion



2 Malathion ditambahkan aceton



3 Larutan malathion-aceton diambil 2,75 ml



4 Diteteskan ke kertas Whatmann ukuran 15x12 cm



5. Setelah kering dimasukkan ke tabung WHO



6 Tabung yang telah berisi impregnated paper