

Deteksi Gen *Ace-1* Sebagai Indikasi Resistensi Insektisida Metomil Pada Nyamuk *Aedes aegypti* Metode *Real-Time PCR*

Kartika Puspitasari

Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; kpuspitasari100@gmail.com

Pestariati

Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; pestariati@poltekkesdepkes-sby.ac.id

Anita Dwi Anggraini

Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; anitadwi676@gmail.com

Syamsul Arifin

Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; syarifin61@gmail.com

ABSTRACT

*One of the main health problems in Indonesian society is dengue fever, a disease that continues to increase every year. Therefore, prevention needs to be carried out through vector control, namely the administration of insecticides followed by molecular-based examinations. This research aimed to detect the presence of the *Ace-1* gene in *Aedes aegypti* mosquitoes that were resistant to the insecticide methomyl. The method used was quantitative descriptive analysis to determine the presence of the *Ace-1* gene, and data collection was carried out through observation or direct collection. The research design applied was descriptive statistics, and the data in this study was compiled using Microsoft Excel. The results of the resistance test showed that 45.33% (34 out of 75) of the mosquitoes were resistant to methomyl insecticide exposure. Resistant mosquitoes were further tested for the *Ace-1* gene, with results appearing in the form of CT values. The results obtained from four test samples showed an N/A (Not Available) result for the CT value, leading to the conclusion that 100% of the tested samples were negative, meaning the *Ace-1* gene was not detected.*

Keywords: *Aedes aegypti* Mosquito, Metomil Insecticide, *Ace-1* Gene, *Real-Time PCR*

ABSTRAK

Salah satu masalah kesehatan utama masyarakat Indonesia adalah DBD, penyakit ini terus meningkat setiap tahun. Sehingga, perlu dilakukan pencegahan dengan cara pengendalian vektor yaitu pemberian insektisida yang dilanjutkan dengan pemeriksaan berbasis molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gen *Ace-1* pada nyamuk *Aedes aegypti* yang resisten terhadap insektisida metomil. Metode yang digunakan adalah deskriptif kuantitatif untuk mengetahui adanya gen *ace-1* dan pengumpulan data dilakukan secara observasi atau pengambilan secara langsung. Desain penelitian yang diterapkan adalah statistik deskriptif, data pada penelitian ini disusun menggunakan Microsoft Excel. Hasil penelitian pada uji resistensi didapatkan 45,33% yaitu 34 ekor dari 75 ekor nyamuk yang resisten terhadap paparan insektisida metomil. Nyamuk yang resisten dilanjutkan untuk deteksi gen *Ace-1* dengan hasil yang muncul berupa nilai CT. Hasil yang didapatkan dari 4 sampel uji menunjukkan hasil N/A (*Not Available*) pada nilai CT, sehingga dapat disimpulkan bahwa 100% sampel yang telah diuji dikatakan negatif atau tidak terdeteksi gen *Ace-1*.

Kata kunci: Nyamuk *Aedes aegypti*, Insektisida Metomil, Gen *Ace-1*, *Real-Time PCR*

PENDAHULUAN

Latar Belakang (Opsional)

Demam berdarah dengue (DBD) merupakan salah satu permasalahan kesehatan masyarakat yang terus meningkat di Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh virus dengue yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*, dengan *Aedes aegypti* sebagai vektor utama ⁽¹⁾. Penyebaran penyakit ini semakin meningkat setiap tahunnya akibat urbanisasi, perubahan iklim, dan kurangnya pengendalian vektor yang efektif ⁽²⁾. Berdasarkan data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, jumlah kasus DBD pada tahun 2021 mencapai 73.518 kasus, sementara pada tahun 2022 meningkat menjadi 143.266 kasus, menunjukkan lonjakan sebesar 94,8%. Selain itu, angka kematian akibat DBD juga mengalami peningkatan, dengan tambahan 532 kasus kematian dari tahun sebelumnya ⁽³⁾. Oleh karena itu, strategi pengendalian vektor nyamuk harus terus diperkuat guna menekan angka kejadian DBD.

Pengendalian vektor nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan dengan metode fisik, biologi, dan kimiawi. Pengendalian kimiawi dengan insektisida masih menjadi metode utama dalam mengurangi populasi nyamuk dewasa karena efektivitasnya yang cepat ⁽⁴⁾. Insektisida yang banyak digunakan meliputi karbamat, organofosfat,

dan piretroid. Namun, penggunaan insektisida yang tidak tepat dalam dosis dan frekuensi dapat menyebabkan resistensi insektisida, yang mengurangi efektivitasnya dalam membasmi nyamuk ⁽⁵⁾.

Resistensi insektisida merupakan tantangan utama dalam pengendalian vektor DBD. Resistensi dapat terjadi melalui berbagai mekanisme, seperti peningkatan metabolisme detoksifikasi, perubahan permeabilitas kutikula, dan mutasi target enzim ⁽⁶⁾. Salah satu mekanisme utama resistensi terhadap insektisida karbamat dan organofosfat adalah mutasi pada gen *Ace-1*, yang mengkode enzim asetilkolinesterase (AChE1). AChE1 berperan dalam transmisi impuls saraf dengan memecah asetilkolin di sinapsis ⁽⁷⁾. Insektisida karbamat bekerja dengan cara menghambat enzim ini, menyebabkan gangguan pada sistem saraf nyamuk. Namun, jika terjadi mutasi pada gen *Ace-1*, insektisida tidak lagi mampu menghambat kerja enzim AChE1, sehingga nyamuk tetap bertahan hidup meskipun terpapar insektisida ⁽⁸⁾. Beberapa penelitian telah meneliti keterkaitan mutasi gen *Ace-1* dengan resistensi insektisida. Namun, sebagian besar penelitian sebelumnya lebih banyak berfokus pada resistensi nyamuk *Aedes aegypti* terhadap organofosfat (malation, temephos) atau piretroid (deltametrin, permethrin). Belum banyak penelitian yang fokus pada resistensi *Aedes aegypti* terhadap insektisida metomil. Alkollo (2020) pada penelitiannya menemukan bahwa uji resistensi terhadap insektisida malation menunjukkan tidak adanya mutasi pada gen *Ace-1* pada populasi nyamuk *Aedes aegypti* yang diuji ⁽⁹⁾. Sementara itu, penelitian oleh Maftukhah (2022) mendeteksi gen *Ace-1* pada 50% sampel nyamuk *Aedes aegypti* yang terbukti resisten terhadap insektisida karbamat ⁽¹⁰⁾. Studi lainnya oleh Rahayu (2022) menemukan bahwa nyamuk *Aedes aegypti* yang resisten terhadap temephos tidak mengalami mutasi pada titik F290V dan F455W pada gen *Ace-1* ⁽¹¹⁾.

Untuk mendeteksi keberadaan gen *Ace-1*, diperlukan metode yang sensitif dan akurat. Sebagian besar penelitian tentang resistensi nyamuk di Indonesia masih menggunakan metode konvensional seperti *bioassay* WHO atau PCR konvensional untuk mendeteksi mutasi genetik. Metode *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (*Real-Time PCR*) merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik karena mampu mendeteksi mutasi secara cepat, spesifik, dan kuantitatif ⁽¹²⁾. Keunggulan *Real-Time PCR* dibandingkan metode konvensional adalah kemampuannya untuk memberikan data real-time, meningkatkan sensitivitas deteksi, dan mengidentifikasi mutasi dengan akurasi tinggi ⁽¹³⁾. Oleh karena itu, metode ini dapat menjadi pilihan utama dalam penelitian resistensi nyamuk terhadap insektisida.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menguji resistensi nyamuk *Aedes aegypti* terhadap insektisida metomil, yang termasuk dalam golongan karbamat. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen *Ace-1* sebagai indikator resistensi menggunakan metode *Real-Time PCR*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dalam strategi pengendalian vektor DBD yang lebih efektif dan berkelanjutan.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain penelitian deskriptif kuantitatif untuk mengetahui keberadaan gen *Ace-1* sebagai penanda resistensi terhadap insektisida metomil pada nyamuk *Aedes aegypti* menggunakan metode *Real-Time PCR*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2024 di Laboratorium Entomologi Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur dan Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya. Uji resistensi dilakukan dengan menggunakan 75 ekor nyamuk *Aedes aegypti*, yang kemudian dimasukkan ke dalam empat botol uji dan satu botol kontrol, masing-masing berisi 15 ekor nyamuk per botol uji. Nyamuk yang menunjukkan resistensi kemudian diperiksa lebih lanjut menggunakan deteksi gen *Ace-1* dengan metode *Real-Time PCR*. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah keberadaan gen *Ace-1*, dengan pengumpulan data dilakukan melalui observasi atau pengambilan sampel secara langsung. Analisis data dilakukan dengan menggunakan statistik deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan atau mengilustrasikan data yang diperoleh tanpa melakukan generalisasi.

HASIL

Uji resistensi dalam penelitian ini menggunakan metode CDC Bottle Assay. Nyamuk *Aedes aegypti* dimasukkan ke dalam 4 botol uji dan 1 botol kontrol, masing-masing berisi 15 ekor. Insektisida metomil diberikan dan dilakukan inkubasi selama 30 menit. Nyamuk dikategorikan resisten jika tingkat mortalitasnya kurang dari 80%. Hasil uji resistensi ditampilkan pada Tabel 1. Berdasarkan hasil uji resistensi, nilai mortalitas nyamuk pada semua replikasi di bawah 80%, sehingga populasi nyamuk yang digunakan dapat dikategorikan resisten terhadap insektisida metomil.

Tabel 1. Hasil Uji Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti*

Replikasi	Nyamuk Hidup		Mortalitas Nyamuk	
	Frekuensi	Presentase	Frekuensi	Presentase
Kontrol	15	100%	0	0%
1	4	26,67%	11	73,33%
2	5	33,33%	10	66,67%
3	6	40%	9	60%
4	4	26,67%	11	73,33%

Nyamuk yang resisten kemudian dibuat suspensi untuk dilakukan ekstraksi DNA sebanyak 3-4 ekor menggunakan metode Real-Time PCR. Sebelum amplifikasi PCR, dilakukan uji kuantifikasi untuk menentukan kemurnian DNA dengan standar 1,8-2,0 dan konsentrasi DNA yang harus lebih dari 5,00 ng/μL. Hasil uji kuantifikasi disajikan pada Tabel 2. Nyamuk resisten akan dibuat suspensi yang digunakan untuk ekstraksi DNA sebanyak 3-4 ekor. Hasil uji menunjukkan bahwa seluruh sampel memiliki kemurnian DNA dalam rentang yang sesuai dengan standar, serta konsentrasi DNA yang cukup untuk dilakukan amplifikasi PCR.

Tabel 2. Hasil Uji Kuantifikasi

Sampel	Kemurnian DNA (A260/A280)	Konsentrasi DNA (ng/μL)
M1	1,87	28,21
M2	1,80	44,11
M3	1,99	44,38
M4	1,91	15,52

Setelah uji kuantifikasi, dilakukan deteksi gen *Ace-1* menggunakan metode Real-Time PCR. Sampel dikatakan positif jika memiliki nilai Cycle Threshold (CT) < jumlah siklus, sedangkan jika hasilnya N/A (Not Available), maka gen *Ace-1* tidak terdeteksi. Hasil amplifikasi ditampilkan pada Tabel 3. Berdasarkan hasil Real-Time PCR, seluruh sampel M1-M4 tidak menunjukkan deteksi gen *Ace-1* (N/A pada nilai CT), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ditemukan gen *Ace-1* pada seluruh nyamuk yang diuji.

Tabel 3. Hasil Real-Time PCR

Kode Sampel	Sampel	Nilai CT (<i>Cycle Threshold</i>)	Keterangan
KP	Kontrol Positif	1,22	Positif
KN	Kontrol Negatif		
M1	1	N/A	Negatif
M2	2		
M3	3		
M4	4		

PEMBAHASAN

Resistensi terhadap insektisida pada *Aedes aegypti* merupakan fenomena adaptasi yang dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu detoksifikasi metabolik (*metabolic detoxification*) dan mutasi situs target (*target site mutation*). Detoksifikasi metabolik terjadi ketika enzim-enzim dalam tubuh nyamuk mampu menetralkan atau mengurangi efektivitas insektisida sebelum mencapai targetnya. Enzim yang paling berperan dalam mekanisme ini adalah esterase, glutathione-S-transferases (GST), dan monooxygenase⁽⁵⁾. Selain detoksifikasi metabolik, mekanisme resistensi lainnya adalah mutasi pada *target site*, yang menyebabkan penurunan sensitivitas terhadap insektisida. Salah satu target utama insektisida golongan karbamat dan organofosfat adalah enzim asetilkolinesterase (AChE), yang berperan dalam penghantaran impuls saraf. Mutasi pada gen *Ace-1* dapat menyebabkan modifikasi pada enzim AChE, sehingga insektisida tidak lagi efektif dalam menghambat aktivitas enzim ini, yang pada akhirnya memungkinkan nyamuk bertahan hidup meskipun terpapar insektisida^(7,14).

Dalam penelitian ini, sampel nyamuk diperoleh dari Laboratorium Entomologi Dinas Kesehatan Jawa Timur, yang berarti bahwa nyamuk dikembangbiakkan dalam lingkungan terkendali tanpa kontak langsung dengan faktor eksternal yang dapat mempengaruhi tingkat resistensi. Uji resistensi terhadap insektisida metomil menunjukkan bahwa 45,33% nyamuk (34 dari 75 ekor) bersifat resisten. Hal ini menunjukkan adanya mekanisme pertahanan biologis dalam populasi nyamuk ini. Nyamuk yang resisten kemudian diekstraksi DNANYa dan diuji menggunakan *Real-Time PCR* untuk mendeteksi keberadaan gen *Ace-1*. Hasil menunjukkan bahwa tidak ada sampel yang positif terhadap gen ini, meskipun populasi nyamuk terbukti resisten terhadap metomil. Temuan ini mengindikasikan bahwa mekanisme resistensi lebih mungkin terjadi akibat peningkatan aktivitas enzim detoksifikasi (*metabolic detoxification*) dibandingkan mutasi pada *target site*⁽¹⁵⁾.

Salah satu enzim yang paling berperan dalam resistensi terhadap insektisida golongan karbamat adalah esterase. Esterase bekerja dengan menghidrolisis atau mengikat insektisida, sehingga senyawa aktifnya tidak dapat mencapai target di sistem saraf nyamuk⁽¹⁶⁾. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa amplifikasi genetik pada enzim esterase dapat menyebabkan peningkatan produksi protein detoksifikasi, yang mengakibatkan berkurangnya efektivitas insektisida⁽⁸⁾. Penelitian oleh Hemingway et al. (2004) mengungkapkan bahwa resistensi yang dimediasi oleh esterase dapat menyebabkan peningkatan aktivitas hidrolitik hingga 10 kali lipat dibandingkan dengan populasi nyamuk yang tidak resisten⁽¹⁶⁾. Hal ini dapat menjelaskan mengapa gen *Ace-1* tidak terdeteksi dalam penelitian ini, karena resistensi lebih mungkin terjadi melalui peningkatan ekspresi enzim esterase daripada mutasi pada *target site*.

Mutasi pada gen *Ace-1* telah terbukti berperan dalam resistensi terhadap insektisida golongan karbamat dan organofosfat. Mutasi utama yang sering ditemukan dalam penelitian sebelumnya adalah:

1. G119S (glisin → serin pada kodon 119)
2. F290V (fenilalanin → valin pada kodon 416)
3. F455W (fenilalanin → triptofan pada kodon 455)

Mutasi ini dapat mengurangi efektivitas insektisida dalam menghambat enzim AChE, sehingga memungkinkan nyamuk bertahan hidup⁽¹⁷⁾. Namun, hasil penelitian ini bertentangan dengan temuan Maftukhah (2020), yang melaporkan bahwa 50% sampel nyamuk resisten terhadap karbamat memiliki gen *Ace-1*. Perbedaan hasil ini dapat disebabkan oleh faktor-faktor seperti variasi genetika antar populasi, tingkat tekanan seleksi insektisida di habitat asli nyamuk, serta teknik deteksi genetik yang digunakan⁽¹⁰⁾.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa resistensi terhadap insektisida metomil kemungkinan besar tidak terkait dengan mutasi *Ace-1*, tetapi lebih terkait dengan mekanisme detoksifikasi metabolik melalui enzim esterase. Oleh karena itu, untuk memastikan mekanisme resistensi yang dominan, diperlukan penelitian lanjutan dengan metode yang lebih canggih, seperti analisis ekspresi gen enzim esterase untuk mengonfirmasi peningkatan produksi protein detoksifikasi, *sequencing* gen *Ace-1* untuk mendeteksi kemungkinan mutasi yang tidak terdeteksi dengan PCR konvensional, dan metode RNA-seq atau proteomik untuk memahami jalur molekuler resistensi yang lebih kompleks. Dengan penelitian lebih lanjut, strategi pengendalian vektor dapat disesuaikan dengan mekanisme resistensi yang ditemukan, sehingga penggunaan insektisida lebih efektif dalam menekan populasi nyamuk *Aedes aegypti* yang resisten.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, nyamuk *Aedes aegypti* yang resisten dan dikembangbiakkan oleh Laboratorium Entomologi Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur tidak ditemukan gen *Ace-1*. Hal ini terjadi karena mekanisme resistensi pada nyamuk *Aedes aegypti* bekerja melalui dua cara yakni detoksifikasi metabolik dan mutasi pada gen target. Sehingga perlu dilakukan pemeriksaan lanjutan yaitu deteksi mutasi gen *Ace-1* menggunakan metode *sequencing* untuk mengetahui hasil spesifik terhadap sampel.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Dengue and severe dengue. WHO; 2021.
2. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453–65.
3. Kementerian Kesehatan RI. Laporan Tahunan Demam Berdarah Dengue di Indonesia. Jakarta: Kemenkes RI; 2022.
4. Achee NL, et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0003651.
5. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000;45:371–91.
6. Poupardin R, et al. Global patterns of gene expression in the response of *Aedes aegypti* to different insecticides. *BMC Genomics*. 2012;13:19.
7. Vontas J, Kioulos I, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol*. 2007;89(2):111-8.
8. Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol*. 2015;60:537–59.
9. Alkollo H. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations. *J Vector Control*. 2020;56(2):203–11.
10. Maftukhah N. Deteksi gen *Ace-1* pada *Aedes aegypti* yang resisten terhadap insektisida di daerah endemis DBD. *J Entomol Kesehat Masyarakat*. 2020;8(1):45-52.
11. Rahayu L. Resistance mechanisms in *Aedes aegypti*: *Ace-1* gene mutations. *J Vector Res*. 2022;18(2):100–10.
12. Smith LB, et al. Mutations in the *Ace-1* gene confer insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes. *PLoS Genet*. 2016;12(2):e1005746.
13. Bass C, et al. Detection of knockdown resistance mutations using real-time PCR. *Insect Mol Biol*. 2011;20(6):658–63.
14. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berticat C, Marquine M, et al. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*. 2003;13(1):1-7.
15. Rahayu N. Identifikasi mutasi gen *Ace-1* pada nyamuk *Aedes aegypti* resisten terhadap insektisida karbamat. *J Biomed Trop*. 2022;10(2):75-84.
16. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34(7):653-65.
17. Alout H, Weill M. Amino-acid substitutions in acetylcholinesterase 1 involved in insecticide resistance in mosquitoes. *Chem Biol Interact*. 2008;175(1-3):138-41.