

Deteksi Mutasi Titik Gen Natrium Voltage Gated Channel menggunakan Polymerase Chain Reaction pada *Aedes aegypti* Resisten Sintetik Piretroid di Palembang

Ahmad Ghiffari, Dwi Handayani*, Dalilah**

Abstract

Aedes aegypti is a vector of several dangerous disease, for example is the dengue virus. Hundreds of million people are suffered with dengue fever every year in almost a hundred nations worldwide. One way to reduce the dissemination of the virus is to control the population of the mosquitoes. Insecticides was successful in eliminating in the past but unfortunately the resistance against this chemical has occurred recently. Insecticides resistance was first discovered happen with DDT in 1955, followed by Temephos and last the synthetic pyrethroid. The synthetic pyrethroid resistance can be detected with two ways, which is the detection in enzyme and the mutation in natrium voltage gated channel. Detection in enzyme means to detect the raise of the detoxification quantity in neutralizing the insecticide effect, it can be done in biochemical assay and molecular assay. Detection in mutation of natrium voltage gated channel means to detect the receptor mutation of the insecticide site, it can only be done with molecular assay. This research is conducted to determine whether there is a mutation in Palembang *Aedes aegypti* mosquito. The population research has taken in three sub district of Palembang, with the number of sample approximately two hundred mosquitoes. The identification of larvae took place in Parasitology Laboratory Medical Faculty of Sriwijaya University and the identification of mutation took place in Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang. The results showed that there is no mutation detected, the PCR method that been used showed there was no mutant band arise. It can be concluded that the resistance of synthetic pyrethroid has not been found. Following research should be attempt with another proven primers that would able to detect the insecticide resistance, or the following sophisticated research that could detect a new point of mutation.

Keywords: Aedes aegypti, PCR, Point mutation

The Detection of Point Mutation in Voltage Gated Sodium Chanel Gene using Polymerase Chain Reaction in Resistant Synthetic Pyrethroid *Aedes aegypti* in Palembang

Abstrak

Aedes aegypti adalah vektor penyakit berbahaya beberapa, misalnya adalah virus dengue. Ratusan orang dalam sejuta penduduk menderita demam berdarah setiap tahun di hampir seratus negara di seluruh dunia. Salah satu cara untuk mengurangi penyebaran virus adalah mengontrol populasi nyamuk. Awalnya, insektisida berhasil mengatasi, namun resistensi terhadap bahan kimia telah terjadi baru-baru ini. Resistensi insektisida DDT pertama kali ditemukan terjadi pada tahun 1955, diikuti oleh temefos dan terakhir piretroid sintetis. Hambatan piretroid sintetis dapat dideteksi dengan dua cara, deteksi dalam enzim dan mutasi dalam saluran natrium gated tegangan. Deteksi dalam enzim berarti untuk mendeteksi kenaikan kuantitas detoxification dalam menetralkan efek insektisida, dapat dilakukan dalam uji biokimia dan uji molekuler. Deteksi mutasi dalam saluran natrium gated tegangan berarti untuk mendeteksi mutasi reseptor dari situs insektisida, hanya dapat dilakukan dengan uji molekuler. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan apakah ada mutasi *Aedes aegypti* di Palembang. Penelitian populasi telah mengambil di tiga Kecamatan Palembang, dengan jumlah sampel sekitar dua ratus nyamuk. Identifikasi larva berlangsung di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya dan identifikasi mutasi berlangsung di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada mutasi terdeteksi, metode PCR yang digunakan menunjukkan ada yang tidak ada band mutan muncul. Dapat disimpulkan bahwa perlawanan sintetis piretroid belum ditemukan. Setelah penelitian harus dengan upaya lain primer terbukti yang akan mampu mendeteksi resistensi insektisida, atau penelitian canggih berikut yang bisa mendeteksi titik baru mutasi.

Kata kunci: : Aedes aegypti, PCR, mutasi titik

**Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang.*

PENDAHULUAN

Aedes aegypti merupakan vektor dari berbagai patogen, termasuk diantaranya virus dengue, demam kuning dan chikungunya. Virus dengue sebagai penyebab demam berdarah dengue (DBD) telah menginfeksi dunia di lebih dari 100 negara dengan total jumlah penderita lebih dari 100 juta orang per tahun¹. Pemerintah Indonesia telah menetapkan DBD dalam urutan ke empat *Top Ten Health Problem*², dan pemerintah Palembang pernah kewalahan oleh wabah tersebut pada bulan Maret sampai dengan bulan April 1998³.

Salah satu upaya mengurangi penyebaran virus tersebut adalah dengan mengendalikan populasi *Ae. aegypti* mengingat sampai saat ini obat khusus dan vaksinnya belum ditemukan. Upaya untuk mengendalikan *Ae. aegypti* sebagai vektor tersebut antara lain melalui program pemberantasan sarang nyamuk (PSN) dan penggunaan insektisida, tetapi *incidence rate* beberapa tahun terakhir ini tetap sulit diturunkan dan bahkan telah terjadi beberapa kejadian luar biasa⁴. Peningkatan kasus tersebut karena telah terjadi resistensi insektisida pada vektor.

Resistensi insektisida pada *Ae. aegypti* mudah terjadi dan meluas di seluruh dunia. Bermula terhadap *dichloro diphenyl trichloroetane* (DDT) di Karibia pada tahun 1955⁵, lalu terhadap Temephos di Trinidad⁶. Resistensi juga terjadi pada sintetik piretroid di Brazil⁷, Thailand⁸ dan Indonesia⁹.

Resistensi vektor karena pemakaian insektisida bisa dideteksi melalui dua cara yaitu melalui deteksi perubahan enzim dan mutasi gen *voltage gated sodium channel* (VGSC). Perubahan enzim yang dimaksud adalah terdeteksinya peningkatan kadar enzim yang mendetoksifikasi insektisida (resistensi metabolik). Enzim-enzim yang sering digunakan sebagai penanda perubahan antara lain cytochrome P450 monooxygenases (P450s)¹⁰, glutathione S-transferases (GSTs)¹¹ dan carboxyl/cholinesterases (CCEs)⁹. Dalam perkembangan selanjutnya telah ditemukan bahwa kejadian resistensi tanpa adanya peningkatan enzim biokimiawi ternyata telah terjadi¹². Hal tersebut telah mendorong para ahli untuk menemukan cara lain, yaitu menggunakan uji molekuler. Uji tersebut mendeteksi resistensi sintetik piretroid pada *Ae. aegypti* dengan cara menemukan mutasi titik gen VGSC sebagai *target site* tempat kerja insektisida (resistensi target)¹³.

Berdasarkan penelitian Ahmad dkk (2009) telah terjadi resistensi *Ae. aegypti* di Palembang secara metabolik, tetapi hasil penelitian Salim dkk (2009)¹⁴ menyatakan sebaliknya, bahwa resistensi bukan bersifat metabolik. Penyebab hasil penelitian yang kontroversi tersebut mungkin karena perbedaan penyebab resistensi yang terjadi. Resistensi target diprediksi sebagai resistensi yang terjadi, karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendeteksi mutasi gen VGSC tersebut dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) pada *Ae. aegypti* di Palembang sebagai pembuktian.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kejadian mutasi pada VGSC *Ae. aegypti* di Palembang. Dengan teridentifikasinya status resistensi *Ae. aegypti*, dapat ditentukan penggunaan insektisida yang tepat.

BAHAN DAN METODE

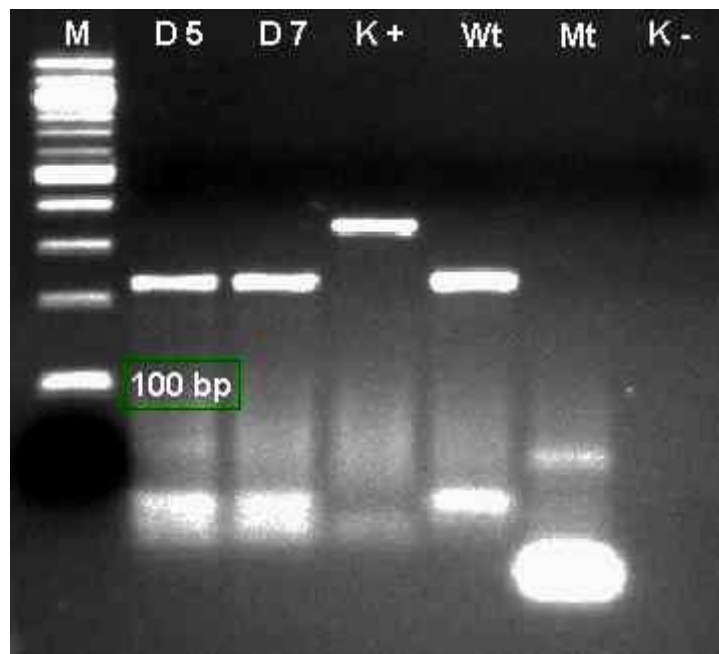
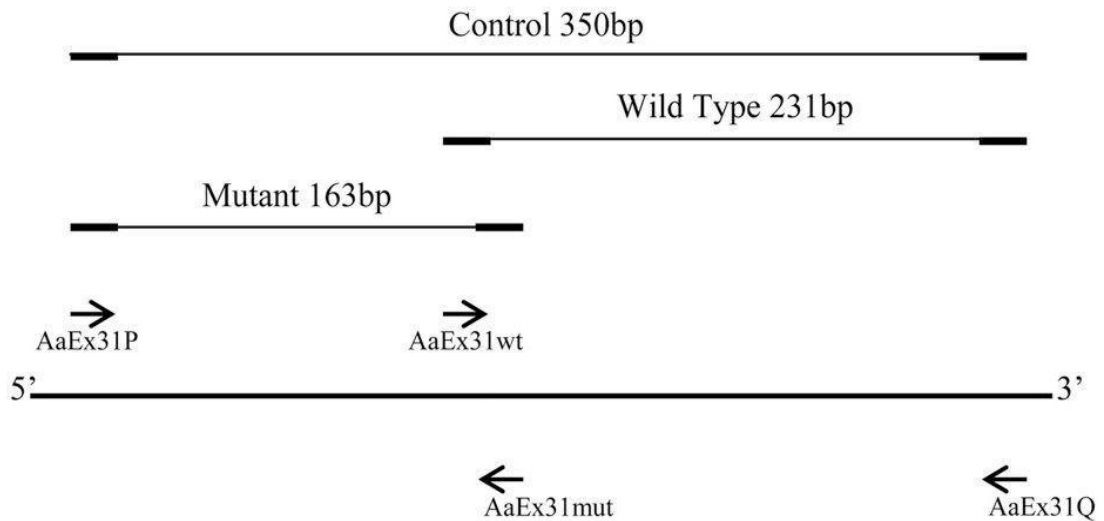
Pengambilan sampel dilakukan di tiga kelurahan Palembang yang memiliki *incidence rate* DBD tinggi dengan jumlah sampel dua ratus larva nyamuk. Tempat identifikasi mikroskopis di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Unsri, tempat Identifikasi molekuler dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang.

Bahan dan alat yang digunakan berupa Ovitrapp (penangkap larva nyamuk), Alat Pemeliharaan Larva (*Rearing*); dan Alat Uji Biomolekuler. Sedangkan metode yang digunakan adalah ekstraksi DNA lalu direaksikan menggunakan primer yang dipilih lalu di amplifikasi menggunakan Polymerase Chain Reaction guna mendeteksi mutasi yang mungkin terjadi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

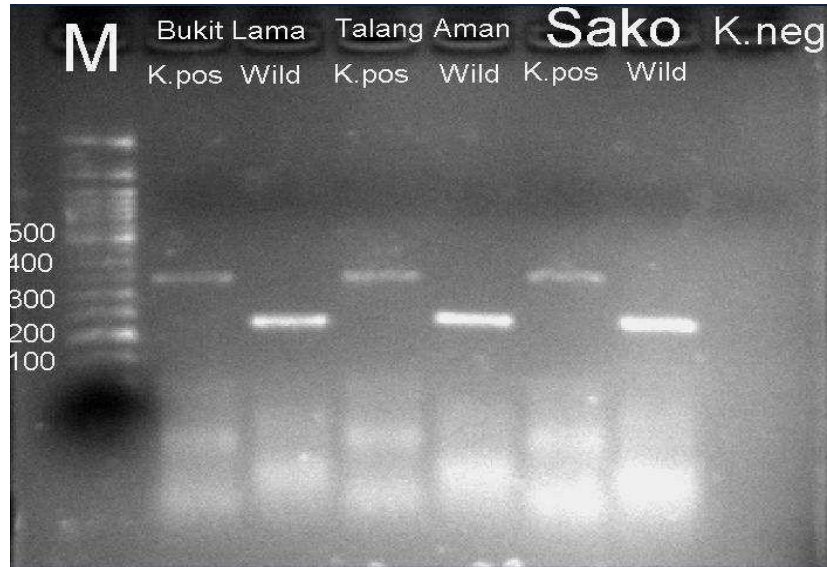
Mutasi adalah kejadian perubahan asam nukleat yang berpengaruh pada ekspresi protein sebagai pembentuk sel. Untuk mengetahui adanya mutasi yang menimbulkan perubahan terhadap kekebalan insektisida, maka digunakan Primer dengan panjang bp dan susunan yang spesifik.

Deteksi mutasi diukur dengan menggunakan alat biomolekuler dengan hasil akhir dari pengoperasian alat adalah berupa tampilan pita pada elektroforesis. Mutasi terjadi apabila muncul pita mutan (Mt).



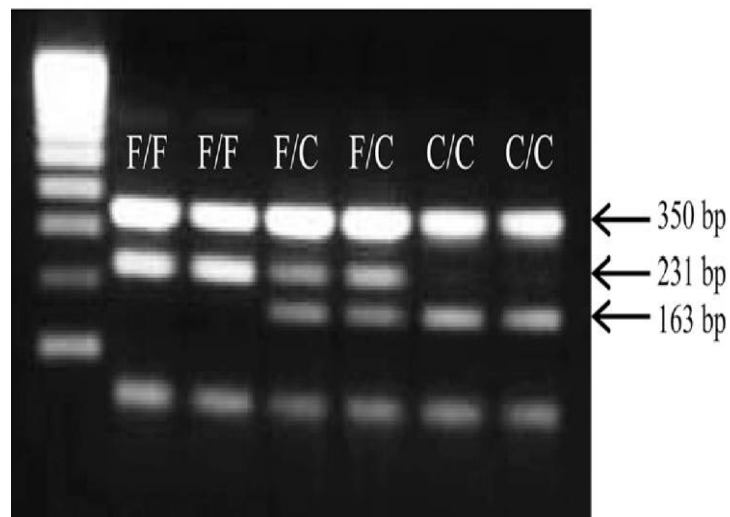
Gambar 1. Hasil identifikasi gen VGSC dengan metode PCR

Keterangan gambar: *D5* dan *D7* menunjukkan perbedaan jumlah DNA yang digunakan, 5 dan 7 mikron, dimana dapat dilihat jumlah DNA yang lebih banyak terlihat memiliki tebal pita yang lebih baik. *K+* menunjukkan kontrol positif yang menunjukkan berat urutan nukleotida spesifik *Ae. aegypti*. *Wt*, menunjukkan berat urutan nukleotida rentan sedangkan *Mt*, menunjukkan berat urutan yang resisten.



Gambar 2. Hasil PCR multipleks

Keterangan gambar: Tulisan horizontal bagian atas yaitu Bukit Lama, Talang Aman dan Sako menunjukkan nama tempat dimana sampel diambil. Tulisan 100, 200, 300, 400, dan 500 menunjukkan berat pasangan basa (berat basa 350 adalah spesifik untuk pita positif identifikasi nyamuk *Aedes aegypti*, berat basa 231 adalah spesifik untuk pita wild/nyamuk rentan, dan terakhir 163 adalah spesifik untuk pita mutan/nyamuk resisten). Pada penelitian ini disimpulkan tidak terjadi mutasi, baik secara heterozigot ataupun homozigot (well mutan tidak dapat ditampilkan karena keterbatasan well yang tersedia).



Acuan penelitian deteksi mutasi pada penelitian ini adalah dengan mengambil contoh penelitian sebelumnya, di Australia, dimana hasil penelitian menunjukkan terjadi mutasi baik yang homozigot maupun heterozigot. Mutasi menyebabkan perubahan

protein fenilalanin menjadi protein sistein pada kodon 1534, ditunjukkan dengan berubahnya susunan TTC menjadi TGC di domain III subunit 6.

Penelitian lainnya menyatakan mutasi dapat terjadi pula pada kodon 1016 terjadi perubahan protein valine menjadi protein isoleucine, yaitu pada domain II, segmen 6. Penelitian deteksi resistensi sintetik piretroid lain telah pula dikerjakan pada nyamuk vektor malaria, *Anopheles aconitus*, dimana diketahui telah terjadi mutasi penyebab resistensi pada kodon 1014¹⁵. Sampel yang diambil di Lampung tersebut terbukti mutasi, sehingga selanjutnya di daerah tersebut telah disusun ulang strategi pemberantasan vektor dan peraturan daerah terkait insektisida yang tidak dapat digunakan lagi oleh masyarakat. Kemungkinan penyebab tidak terekspresinya gen mutasi tersebut pada penelitian di Palembang mungkin karena titik mutasi tidak berada pada titik tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian tentang deskripsi kejadian mutasi titik *Voltage Gated Sodium Channel* yang sebagai penentu terjadi atau tidaknya resistensi terhadap Insektisida Sintetik Piretroid dinyatakan tidak terjadi mutasi. Penelitian tentang mutasi sebagai penyebab terjadi resistensi sintetik piretroid masih memerlukan penelitian lebih lanjut, antara lain penelitian beberapa titik mutasi lain yang diketahui berhubungan dengan kejadian resistensi sintetik piretroid untuk dicobakan kembali pada sampel Palembang. Dan atau penelitian analisis epidemiologi semua kejadian mutasi pada titik apa saja yang banyak terjadi guna mendeteksi titik mutasi yang baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah bahwa penelitian telah dilaksanakan, atas bantuan, arahan dan semangat yang diberikan peneliti ingin mengucapkan terimakasih kepada Prof.dr.Chairil Anwar, PhD, Prof.Dr.dr.HMT.Kamaludin, dr.Theodorus, M.MedSc, Dr.dr.Mgs.Irsan Saleh, M.Biomed, drh.Muhaimin, MSc, dr.Mutiara BA, M.MedSc, Kepala Balai Besar Laboratorium, Prof.Intan Ahmad, PhD, dan Ibu Endang Pujiyanti, MSc.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging Flaviviruses: the Spread and Resurgence of Japanese Encephalitis, West Nile and Dengue viruses. *Nat Med* 10: 98–109. 2004.
2. Depkes RI. Laporan Tahunan Dirjen P2PL, Jakarta. 2004. 2004.
3. Dinas Kesehatan Provinsi. Jumlah Penderita dan Kematian Demam berdarah Dengue (DBD) per Kabupaten/Kota se-Propinsi Sumatera Selatan 1980-2010. Laporan Tahunan Kasubdin PP-PL, Palembang. 1999.
4. Kemenkes RI, Dirjen PP & PL. Peraturan Menteri Kesehatan RI tentang Pengendalian Vektor. Nomor: 374/Menkes/PER/III/2010. 2010.
5. Brown, AW. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc*: 123-140 (*Abstract*). 1986.
6. Vaughn A, Chadee DD, French-Constant R. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes in Trinidad. *Med Vet Entomol* 12 (17):87-94. 1998.
7. Da Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) population collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444. 2005.
8. Paeporn P, Ya-umphan P, Supaphathom K. Insecticide susceptibility and selection for resistance in a population of *Aedes aegypti* from Ratchaburi Province, Thailand. 2002.

9. Ahmad I, Astari S dan Tan M. Resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in 2006 to Pyrethroid Insecticides in Indonesia and its Association with Oxidase and Esterase Level. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (20): 3688-3692. 2007.
10. Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297:2253-2256 (Abstract). 2002.
11. Che Mendoza A, Penilla RP, Rodriguez DA. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *African Journal of Biotechnology* 8 (8): 1386-1397. 2009.
12. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 87-94. 2003.
13. Martins AJ, de Andrade Lins RMM, Linss JGB, Peixoto AA, and Valle D. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81(1): 108–115. 2009.
14. Salim M, Ambarita LP, Yenni A. Efektivitas Malation dalam pengendalian vektor Demam Berdarah Dengue dan uji kerentanan larva *Aedes aegypti* terhadap Temefos di kota Palembang. *Buletin Penelitian Kesehatan* Vo.. 39 : 1. p 10-21. 2011.
15. Syafruddin D, Hidayati APN, Asih PBS, Hawley WA, Sukowati S, Lobo NF. Detection of 1014F kdr mutation in four major Anopheline malaria vectors in Indonesia. *Malaria Journal* 9:315. 2010.