

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu: bayi, anak balita dan ibu hamil. Selain itu malaria secara langsung menyebabkan anemia dan dapat menurunkan produktivitas kerja. Penyakit ini juga masih endemis di sebagian besar wilayah Indonesia.¹ Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit Plasmodium yang hidup dan berkembang biak dalam sel darah merah manusia. Penyakit ini secara alami ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles ssp betina*.²

Indonesia merupakan salah satu negara yang masih beresiko terhadap malaria terutama Indonesia bagian Timur, 80% Kabupaten/kota masih termasuk kategori endemis malaria dan 45% penduduk yang berdomisili di daerah yang beresiko tertular malaria. terutama di luar Jawa, yaitu: Papua, Maluku, Nusa Tenggara, Kalimantan dan Sumatra.³

Provinsi Maluku merupakan salah satu daerah endemis malaria dengan angka kesakitan Annual Parasite Incidence (API) tahun 2008 sebesar 12,3 0/00 penduduk tahun 2009 sebesar 7,0 0/00 penduduk, tahun 2010 sebesar 10,4 0/00 penduduk dan tahun 2011 sebesar 11,4 0/00 penduduk.⁴ Provinsi Maluku Tengah dan Seram Bagian Timur merupakan daerah endemis malaria tinggi (API > 5 0/00 penduduk). Sedangkan daerah Pulau Buru, Maluku Tengah, Ambon dan Tual merupakan endemis sedang (API 1-5 0/00 penduduk).⁵ Angka kesakitan Annual Parasite Incidence (API) pada tahun 2013 yaitu 56,9 0/00 penduduk di Puskesmas Alusi kelaan dan 108,2 0/00 penduduk di puskesmas Waturu, API

tahun 2014 di puskesmas Alusi 29 0/00 penduduk dan puskesmas Waturu 36,1 0/00 penduduk (Kab. MTB), API tahun 2013 di Puskesmas Ilwaki 57,8 0/00 penduduk, puskesmas Wonreli 26,60/00 penduduk, tahun 2014 API di puskesmas Ilwaki 46,80/00 penduduk dan puskesmas Wonreli 13,6 0/00 penduduk .⁵

Satu metode pengendalian vektor malaria yaitu dengan cara kimiawi adalah menggunakan insektisida melalui penggunaan kelambu berinsektisida. Insektisida adalah bahan kimia dan non kimia yang digunakan untuk mengendalikan serangga.⁶ Menurut World Health Organization (WHO), penggolongan insektisida dikategorikan melalui tingkat persistensi, letal dosis, dan toksisitas terhadap sasaran. WHO menggolongkan insektisida menjadi empat golongan yaitu: Organoklorin, Organofosfat, Karbamat dan Piretroid. Penggunaan bahan insektisida pada kelambu yang dizinkan oleh WHO adalah kelompok Piretroid.⁷

Tingginya prevalensi malaria di Maluku memerlukan tindakan untuk mengontrol dan menekan kasus tersebut dengan beberapa metode antara lain: penggunaan indoor residual spraying (IRS) dan insecticide-treated bed nets (ITNs). termasuk Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs) dan pemberian obat anti Malaria.⁸ Penggunaan metode tersebut tidak luput dari kekurangan antara lain terjadinya resistensi karena penggunaan yang kurang tepat, sehingga perlu dilakukan penelitian tentang vektor malaria dan uji efikasi di Provinsi Maluku.

Penggunaan kelambu dengan bahan kimia piretroid banyak digunakan di negara endemis malaria di Afrika dan juga dipergunakan sebagai IRS. Dua pendekatan pencegahan malaria yaitu dengan LLINs dan IRS selama ini tidak memberikan hasil yang nyata. Penggunaan LLINs di daerah endemis sangat terbatas dan penggunaan IRS untuk mengurangi penyebaran nyamuk, memerlukan banyak pertimbangan termasuk kebijakan pemimpin negara. Uji coba penggunaan IRS dan LLINs di daerah rentan *Anopheles gambiae* sangat efektif terhadap kedua metode tersebut dan tidak ada perbedaan nyata, namun

perbandingan ini berbeda nyata terhadap beberapa daerah lainnya dengan populasi yang resisten terhadap piretroid.⁹

Penggunaan bahan piretroid ini mulai menyebabkan resistensi pada nyamuk khususnya di Negara Afrika dan Asia. Mekanisme resistensi piretroid dengan dua cara yaitu: Melalui metabolit (aktifitas enzim detoksifikasi) dan target sasaran (keterikatan pada titik kontak dengan reseptor gen yang dikenal mutasi *knock down resistance (kdr)*). Resistensi *An. gambiae* terhadap insektisida piretroid menyebar di Negara Afrika Barat dan sejumlah daerah disekitarnya.¹⁰⁻¹¹ Fenomena resistensi telah diamati pada lebih dari 500 jenis serangga di seluruh dunia, 50 diantaranya adalah golongan *Anopheline*.¹² Menurut WHO, resistensi terhadap serangga paling tidak satu insektisida telah diidentifikasi pada 64 negara endemis malaria.¹³

Penelitian untuk mendeteksi mutasi pada gen *kdr* pernah dilakukan terhadap *An. sundaicus*, *An. aconitus*, *Anopheles subpictus* dan *An. Vagus* di Provinsi Lampung pada tahun 2010. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mutasi pada posisi 1014 tidak terdeteksi pada keempat jenis *Anopheles* tersebut.¹⁴ Kajian menunjukkan adanya mutasi pada gen *kdr* dengan resistensi terhadap piretroid menyatakan bahwa mutasi pada gen *kdr* telah dideteksi. Pada 13 spesies *Anopheles* (*An.gambiae*, *An.arabiensis*, *An. sinensis*, *An. stephensi*, *An.subpictus*, *An.sacharovi*, *An.culicifacies*, *An. sundaicus*, *An. aconitus*, *An. vagus*, *An. paraliae*, *An. peditaeniatus* and *An. albimanus*).¹⁵

Dalam penelitian ini akan dilakukan uji efikasi kelambu berinsektisida LLINs dalam penanggulangan vektor malaria di Kabupaten Maluku Barat Daya dan Maluku Tenggara Barat, untuk melihat efektivitas insektisida menggunakan teknik uji bioassay dan kuesioner untuk mengetahui karakteristik masyarakat dalam penggunaan kelambu LLINs, uji resistensi *Anopheles* terhadap insektisida menggunakan teknik uji kerentanan (Uji subseptibilitas) *Anopheles ssp* yang resisten terhadap insektisida selanjutnya akan dianalisa secara molekular

untuk mengetahui ada atau tidaknya mutasi pada gen *kdr*, secara spesifik pada posisi asam amino ke 1014. Konsep pemberian kelambu LLINs tanpa diberikan penyuluhan yang memadai tentang cara penggunaan dan perawatan kelambu tentu menyebabkan program penurunan angka prevalensi tidak berhasil dan menimbulkan resistensi pada vektor malaria.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah penggunaan insektisida piretroid yang terdapat pada LLINs masih aktif membunuh vektor malaria di Kabupaten Maluku Barat Daya dan Maluku Tenggara Barat. Dengan pengawasan yang berkala akan memberikan informasi kepada pengambil kebijakan agar dapat digunakan dalam mengambil kebijakan dalam penggunaan jenis insektisida.

Dalam penelitian ini akan dilakukan *mass blood survey* (MBS) di Kabupaten Maluku Barat Daya, untuk melihat angka kesakitan malaria di Kabupaten Maluku Barat Daya (MBD) khususnya di kampung Kisar dan kampung Wetar dengan kasus malaria tinggi. Pemeriksaan MBS ini merupakan penelitian DIPA tahun 2015, Namun karena adanya pemotongan anggaran penelitian tahun 2015 sehingga lokasi penelitian di MBD ditunda untuk penelitian di tahun 2016 maka kegiatan MBS dan uji elisa untuk plasmodium di Kabupaten MBD dilakukan pada tahun 2016. Kegiatan MBS di Kabupaten MTB telah dilakukan bersamaan dengan penelitian yang dilakukan oleh samuel sandy dkk pada tahun 2015 dan hasilnya terjadi penurunan jumlah kasus malaria dikarenakan satu bulan sebelum kegiatan MBS dinkes Kabupaten MTB juga melakukan MBS sehingga masyarakat yang positif malaria langsung diberi pengobatan.

B. Rumusan Masalah

Masih tingginya angka kejadian malaria di Puskesmas Alusi, Puskesmas Waturu, Puskesmas Ilwaki dan Puskesmas Wonreli sehingga diperlukan penilaian transmisi vektor *Anopheles* spp dalam menularkan parasit malaria di Wilayah tersebut juga penilaian terhadap efektifitas LLINs

C. Tujuan Penelitian

1) Tujuan Umum

Menentukan Situasi Malaria (angka kesakitan, vektor potensial, efektifitas kelambu LLINs) di Kabupaten Maluku Barat Daya dan Kabupaten Maluku Tenggara Barat Provinsi Maluku.

2) Tujuan Khusus

- a) Menentukan angka kesakitan malaria di Kabupaten MBD di Provinsi Maluku
- b) Menentukan Bionomik nyamuk tersangka vektor malaria di Kabupaten MBD di Provinsi Maluku
- c) Menentukan vektor potensial di Kabupaten MBD di Provinsi Maluku
- d) Menentukan efektifitas kelambu LLINs di Kabupaten MTB dan Kabupaten MBD, Provinsi Maluku
- e) Menentukan resistensi vektor malaria terhadap insektisida golongan piretroid di Kabupaten MTB dan Kabupaten MBD di Provinsi Maluku
- f) Menentukan mutasi *gen knock down* (kdr) pada vektor malaria di Kabupaten MTB dan Kabupaten MBD, Provinsi Maluku

D. Manfaat Penelitian

1. Tersedianya data dasar mengenai bionomik dan vektor potensial, vektor malaria di Kabupaten MBD sehingga menjadi pertimbangan untuk melakukan intervensi terhadap vektor malaria.
2. Tersedianya data evaluasi efektivitas kelambu LLINs dan resistensi vektor malaria terhadap insektisida golongan piretroid yang digunakan pada kelambu LLINs

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan parasit *Plasmodium sp* yang hidup dan berkembang biak dalam sel darah merah (eritrosit) manusia ditularkan oleh nyamuk *Anopheles spp* betina, dapat menyerang semua orang baik laki-laki ataupun perempuan pada semua golongan umur dari bayi, anak-anak dan orang dewasa.

Malaria merupakan permasalahan kesehatan di masyarakat yang dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok berisiko tinggi, seperti pada bayi, anak balita, dan ibu hamil. Selain itu, malaria secara langsung menyebabkan anemia dan dapat menurunkan produktivitas kerja¹⁶.

World Malaria Report tahun 2011 menyebutkan bahwa malaria terjadi di 106 Negara bahkan 3,3 milyar penduduk dunia tinggal di daerah berisiko tertular malaria. Jumlah kasus malaria di dunia sebanyak 216 juta kasus, dimana 28 juta kasus terjadi di ASEAN. Setiap tahunnya sebanyak 660 ribu orang meninggal dunia karena malaria terutama anak balita (86%), 320.000 di antaranya berada di Asia Tenggara termasuk Indonesia¹⁷.

Penyakit malaria masih ditemukan di seluruh provinsi di Indonesia. Berdasarkan *annual parasite incidence* (API), dilakukan stratifikasi wilayah dimana Indonesia bagian Timur masuk dalam stratifikasi malaria tinggi, stratifikasi sedang di beberapa wilayah di Kalimantan, Sulawesi dan Sumatera sedangkan di Jawa-Bali masuk dalam stratifikasi rendah, meskipun masih terdapat desa/fokus malaria tinggi¹⁸.

Selama tahun 2005-2013, kejadian malaria di seluruh Indonesia cenderung menurun, yaitu 4,10‰ (tahun 2005) menjadi 1,38‰ (tahun 2013). Jumlah pemeriksaan Sediaan Darah (SD) untuk uji diagnosis malaria meningkat, dari 47% (982.828 pemeriksaan SD dari

2.113.265 kasus klinis) pada tahun 2005, menjadi 63% (1.164.405 pemeriksaan SD dari 1.849.062 kasus klinis) pada tahun 2011. Walaupun demikian selama tahun 2011 masih sering terjadi KLB malaria di 9 kabupaten/kota dari 7 Provinsi dengan kasus mencapai 1.139 kasus dengan 14 kasus diantaranya meninggal (CFR = 1,22%)¹⁹.

Pembagian *zoogeografi* jenis nyamuk di Indonesia ada tiga daerah yaitu wilayah Australia, wilayah Oriental, dan wilayah pertemuan Oriental dan Australia. Wilayah Australia memiliki jumlah nyamuk *Anopheles* sp yang banyak (Indonesia Bagian Timur meliputi Papua) dibanding wilayah oriental (Indonesia Bagian Barat) yang jumlahnya sedikit. Sedangkan wilayah pertemuan Oriental dan Australia yaitu Maluku memiliki spesies *Anopheles* sp Oriental dan Australia. Penyebaran nyamuk sangat ditentukan oleh faktor lingkungan yang membentuk suatu ekosistem. Dalam suatu ekosistem tentunya sangat dipengaruhi oleh faktor abiotik, biotik dan kimiawi. Lingkungan abiotik meliputi suhu, kelembaban, intensitas penyinaran matahari, iklim, curah hujan. Sedangkan biotik meliputi vegetasi daratan, vegetasi air kolam, sungai, rawa, adanya predator dan parasit²⁰.

Di Indonesia timur, nyamuk yang terbukti berperan sebagai vektor primer yaitu *An. bancrofti*, *An. koliensis*, *An. farauti*, *An. subpictus*, *An. barbirostris* dan *An. sondaicus* dan yang berperan sebagai vektor sekunder yaitu *An. vagus* (ditemukan adanya oosit pada pembedahan).

Insektisida untuk kesehatan masyarakat adalah insektisida yang digunakan untuk pengendalian vektor penyakit dan hama permukiman seperti nyamuk, serangga pengganggu lain (lalat, kecoak/lipas), tikus, dan lain-lain yang dilakukan di daerah permukiman endemis, pelabuhan, bandara, dan tempat-tempat umum lainnya. Pengendalian vektor penyakit secara umum dikenal dua jenis insektisida yang bersifat kontak/*non-residual* dan insektisida *residual*. Insektisida kontak/*non-residual* merupakan insektisida yang langsung berkontak dengan tubuh serangga saat diaplikasikan. Aplikasi kontak langsung dapat berupa

penyemprotan udara (*space spray*) seperti pengkabutan panas (*thermal fogging*), dan pengkabutan dingin (*cold fogging*) / *ultra low volume* (ULV). Jenis-jenis formulasi yang biasa digunakan untuk aplikasi kontak langsung adalah *emulsifiable concentrate* (EC), *microemulsion* (ME), *emulsion* (EW), *ultra low volume* (UL) dan beberapa Insektisida siap pakai seperti *aerosol* (AE), anti nyamuk bakar (MC), *liquid vaporizer* (LV), *mat vaporizer* (MV) dan *smoke*.

Insektisida residual adalah Insektisida yang diaplikasikan pada permukaan suatu tempat dengan harapan apabila serangga melewati/hinggap pada permukaan tersebut akan terpapar dan akhirnya mati. Umumnya insektisida yang bersifat residual adalah insektisida dalam formulasi *wet table powder* (WP), *water dispersible granule* (WG), *suspension concentrate* (SC), *capsule suspension* (CS), dan serbuk (DP). Cara kerja Insektisida dalam tubuh serangga dikenal istilah *mode of action* dan cara masuk atau *mode of entry*. *Mode of action* adalah cara Insektisida memberikan pengaruh melalui titik tangkap (target site) di dalam tubuh serangga. Titik tangkap pada serangga biasanya berupa enzim atau protein.

Dalam PP no 7 tahun 1973. Beberapa jenis Insektisida dapat mempengaruhi lebih dari satu titik tangkap pada serangga. Cara kerja Insektisida yang digunakan dalam pengendalian vektor terbagi dalam 5 kelompok yaitu:

- 1). mempengaruhi sistem saraf,
- 2). menghambat produksi energi,
- 3). mempengaruhi sistem endokrin,
- 4). menghambat produksi kutikula dan
- 5). menghambat keseimbangan air.

Pengendalian vektor malaria, dapat dilakukan dengan menggunakan insektisida maupun tanpa insektisida. Pengendalian vektor dengan insektisida dapat dilakukan dengan sasaran larva (larva control / larvasidasi) dan sasaran nyamuk (*adult control*)

Pengendalian nyamuk vektor malaria dapat dilakukan:

1) Indoor Residual Spraying(IRS)

Penyemprotan rumah dengan efek residual (IRS=*Indoor Residual Spraying*) adalah suatu cara pemberantasan vektor dengan menempelkan racun serangga tertentu dengan jumlah (dosis) tertentu secara merata pada permukaan dinding yang disemprot. Tujuan penyemprotan adalah untuk memutuskan penularan karena umur nyamuk menjadi lebih pendek sehingga tidak sempat menghasilkan sporozoit di dalam kelenjar ludahnya.

2) Kelambu berinsektisida (ITN's dan LLINs)

Penggunaan kelambu berinsektisida (ITN's dan LLINs), merupakan kelambu yang sebelum digunakan harus dicelupkan ke dalam larutan insektisida, dan dapat dilakukan pencelupan insektisida ulang setiap 6 bulan. Sedangkan LLIN (*Long Lasting Insecticide Net*) merupakan kelambu yang sudah mengandung insektisida sehingga langsung siap digunakan efektif dalam jangka waktu panjang, sekitar 3 sampai 5 tahun tanpa perlu dilakukan pencelupan ulang.

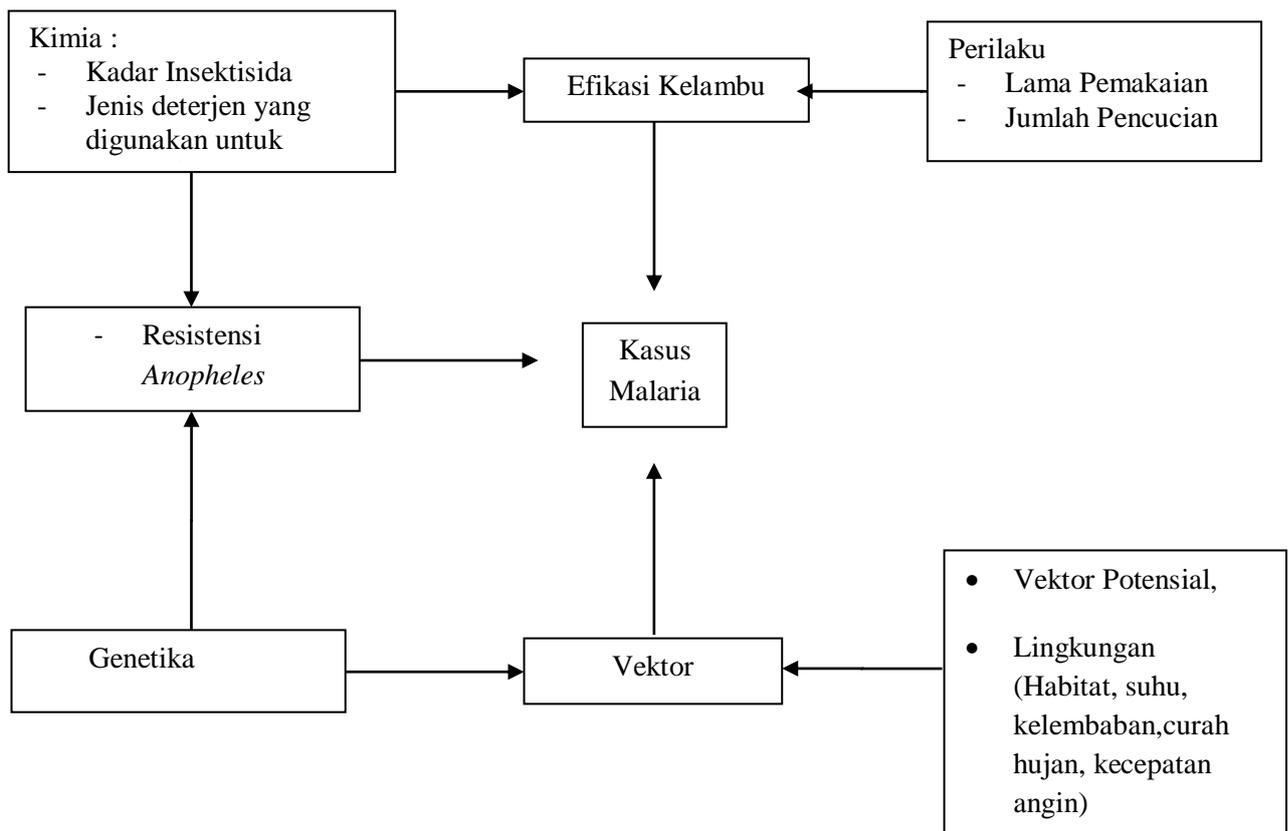
3) Penggunaan Repelen.

Repelan merupakan bahan aktif yang mempunyai kemampuan untuk menolak serangga (nyamuk) mendekati manusia, mencegah terjadinya kontak langsung antara nyamuk dan manusia, sehingga manusia terhindar dari penularan penyakit akibat gigitan nyamuk. Repelan berbentuk lotion dianggap praktis karena dapat digunakan pada kegiatan *out door*.

BAB III

METODOLOGI

A. Kerangka Konsep



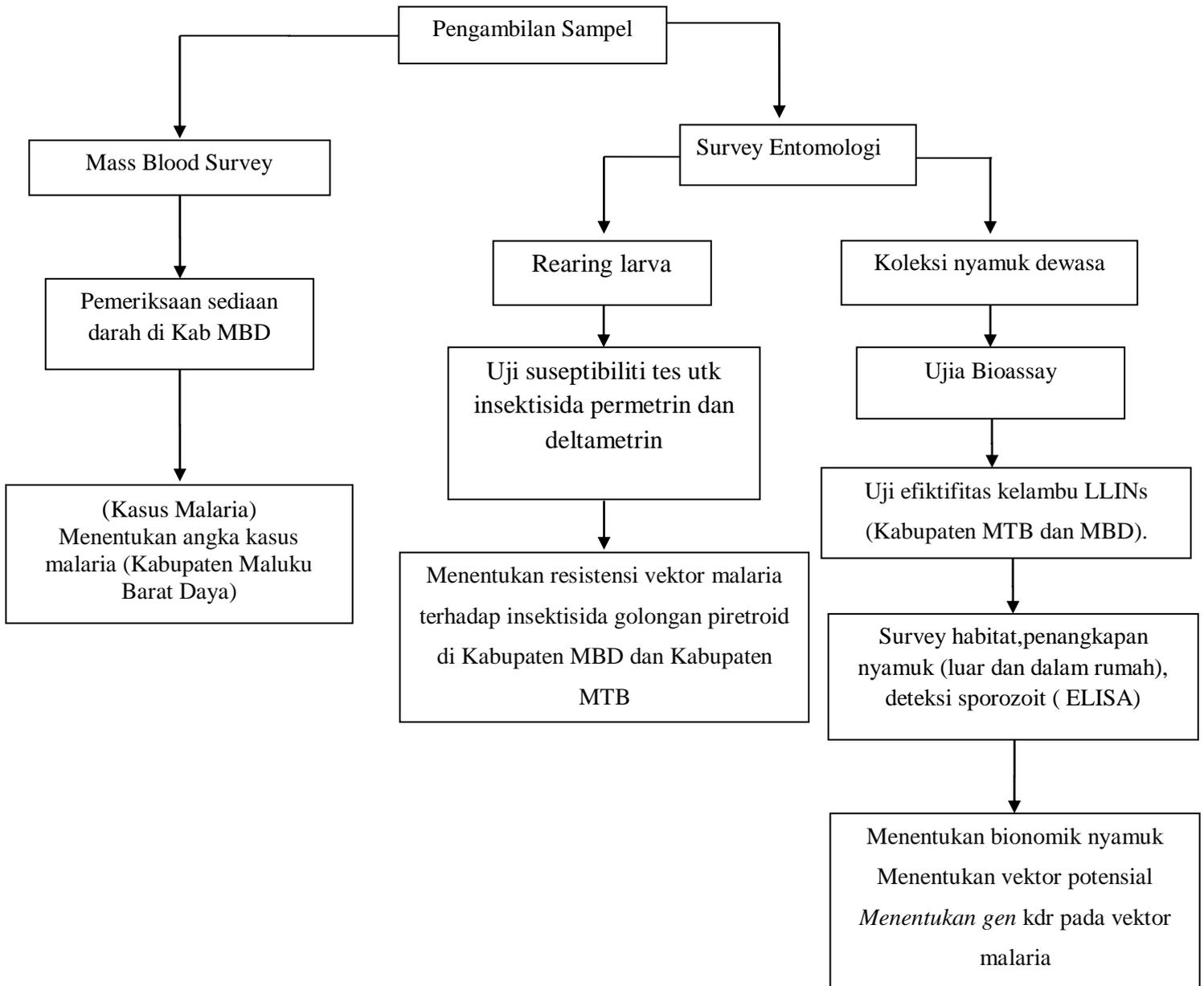
Kasus malaria dimasyarakat dipengaruhi oleh faktor host/inang, lingkungan, agent *Plasmodium* spp, vektor malaria. Keberadaan vektor ditentukan oleh lingkungan habitat dimana vektor hidup meliputi faktor suhu, kelembaban, curah hujan, intensitas cahaya, kecepatan angin. Sedangkan faktor dari vektor malaria sendiri adalah genetik nyamuk *Anopheles* spp dalam merespon adanya pengaruh perubahan lingkungan dan adanya insektisida. Paparan insektisida terhadap vektor malaria dapat menyebabkan terjadinya

resistensi genetik sehingga dalam program pengendalian vektor akan semakin sulit dan menyebabkan peningkatan kasus malaria di masyarakat. Disamping itu kebijakan penggunaan kelambu berisektisida dimasyarakat perlu ditinjau kembali. Penggunaan dan pemakaian kelambu yang tidak sesuai dengan panduan dinas kesehatan menyebabkan masa penggunaan kelambu akan singkat dan menyebabkan resistensi. Dalam menilai apakah kelambu masih efektif diperlukan evaluasi oleh dinas kesehatan sehingga program pengendalian vektor malaria dapat berjalan dengan baik, yaitu dengan melakukan survei entomologi dan *mass blood survei* untuk menemukan positif malaria di masyarakat.

B. Variabel Penelitian

- 1) Variabel bebas : Kimia (kadar insektisida, jenis deterjen yang digunakan untuk mencuci), perilaku manusia (lama pemakaian, jumlah pencucian)
- 2) Variabel Terikat : efikasi kelambu, resistensi *Anopheles*, kasus malaria, vektor
 - ✓ Angka kasus malaria dapat dipengaruhi oleh berbagai macam faktor diantaranya adalah vektor, kelambu dan sifat genetis nyamuk.
 - ✓ Angka kasus malaria sangat terkait keberadaan vektor, yang didukung oleh faktor lingkungan (habitat, suhu, kelembaban, curah hujan dan kecepatan angin).
 - ✓ Angka kasus malaria juga dipengaruhi oleh faktor kelambu yang telah digunakan sebagai salah satu metode pengendalian malaria, yaitu perilaku manusia dalam menggunakan kelambu (waktu pemakaian dan jumlah pencucian), juga bahan kimia yang terkandung dalam kelambu tersebut (kadar dan jenis yang digunakan).
 - ✓ Angka kasus malaria juga dapat dipengaruhi oleh respon vektor terhadap bahan kimia yang digunakan pada kelambu. Paparan bahan kimia pada vektor dapat mengakibatkan munculnya resistensi terhadap bahan kimia tersebut. Resistensi dapat disebabkan oleh mutasi titik pada gen yang bertanggung jawab terhadap perubahan respon vektor terhadap bahan kimia.

C. Alur Penelitian



Pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan berupa 2 kegiatan yaitu MBS dan survey Entomologi. Untuk kegiatan MBS sampel yang diambil berupa sampel darah untuk melihat angka kesakitan di Kabupaten MBD di Provinsi Maluku.

Untuk kegiatan Entomologi sampel yang diambil berupa jentik dan nyamuk dewasa. Jentik yang diperoleh akan direaring dan selanjutnya akan digunakan untuk uji resistensi vektor

malaria terhadap insektisida golongan piretroid di Kabupaten MBD dan Kabupaten MTB, Sedangkan nyamuk dewasa yang diperoleh selanjutnya akan digunakan untuk efektifitas kelambu LLINs, sebagai data Bionomik nyamuk malaria di Kabupaten MBD, sebagai data vektor potensial di Kabupaten MBD, dan untuk melakukan uji mutasi *gen knock down* (*kdr*) di Kabupaten MTB dan Kabupaten MBD

E. Definisi Operasional

| No | Variabel | Definisi operasional | Ukuran/Skala |
|----|--------------------------------|---|---------------|
| 1 | <i>Mass Blood Survei (MBS)</i> | Survey darah jari pada penduduk untuk pemeriksaan terhadap malaria (secara mikroskopis) | Numerik/rasio |
| 2 | <i>Sporozoit rate</i> | Jumlah nyamuk <i>Anopheles ssp</i> betina yang positif CS (sirkum sporozoit) dibagi jumlah nyamuk yang diperiksa | Numerik/rasio |
| 3 | <i>Man Biting Rate (MBR)</i> | Jumlah rata-rata gigitan vector <i>Anopheles ssp</i> tiap orang dalam satu malam (cara pengukuran observasi) | Numerik/rasio |
| 4 | Curah hujan | Jumlah curah hujan harian dari data BMG (<i>Badan Meteorologi dan Geofisika</i>) di lokasi penelitian | Numerik/rasio |
| 5 | Suhu | Suhu udara harian yang tercatat di BMG dan suhu habitat jentik <i>Anopheles ssp</i> (diukur menggunakan thermometer) | Numerik/rasio |
| 6 | Kelembaban | Kelembaban udara di lokasi penelitian sekitar habitat jentik <i>Anopheles ssp</i> (diukur menggunakan sling psychrometer) | Numerik/rasio |
| 7 | Intensitas cahaya | intensitas sinar yang menyinari habitat jentik <i>Anopheles ssp</i> (diukur menggunakan luxmeter) | Numerik/rasio |
| 8 | Bionomik | Perilaku nyamuk <i>Anopheles ssp</i> meliputi <i>Breeding site</i> <i>Resting site</i> <i>Feeding</i> (meliputi indoor dan outdoor) Kepadatan jentik <i>Anopheles ssp</i> Kepadatan vector <i>Anopheles ssp</i> (cara pengukuran observasi) | Numerik/rasio |
| 9 | Kecepatan angin | Kecepatan angin berhembus di lokasi penelitian (diukur menggunakan anemometer) | Numerik/rasio |
| 11 | EIR (WHO, 2003) | Nilai MBR (<i>man biting rate</i>) x sporozoit rate | Numerik/rasio |

F. Disain Penelitian

Survey yang dilakukan secara *cross sectional* bersifat deskriptif eksploratif

G. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Kabupaten Maluku Barat Daya (MBD) dan Maluku Tenggara Barat (MTB) pada bulan Maret – Oktober 2016 (selama 8 bulan)

H. Populasi dan Sampling

Populasi dan sampel (Kelambu)

Populasi adalah seluruh penduduk yang menggunakan kelambu di Kabupaten Maluku Tenggara Barat dan Maluku Barat Daya

Sampel adalah 2 (dua) kampung di Maluku Tenggara Barat dan 2 (Dua) kampung di Maluku Barat Daya dan setiap kampung dipilih secara acak 20 (Dua Puluh) Rumah tangga untuk melakukan pengumpulan data survey dan pengambilan kelambu untuk uji efikasi kelambu LLINs,

a. **Kriteria Inklusi**

1. Masyarakat yang menggunakan kelambu LLINs
2. Bersedia ikut dalam penelitian dengan menandatangani informed consent

b. **Kriteria eksklusi**

1. **Responden tidak ditempat**

Populasi dan sampel (MBS)

Populasi adalah seluruh masyarakat yang berada di Kampung Kisar dan Kampung Wetar di Kabupaten Maluku Barat Daya

Sampel adalah Masyarakat yang berada di 2 (dua) kampung di Kabupaten Maluku Barat Daya yaitu Kampung Wetar dan Kampung Kisar dan setiap kampung diambil sebanyak 200 sampel

a. **Kriteria Inklusi**

1. **Responden usia diatas 1 bulan**
2. **Bersedia ikut dalam survei pemeriksaan darah jari malaria (*mass blood survey*) dengan menandatangani persetujuan setelah penjelasan (*informed consent*)**

b. **Kriteria eksklusi**

- 1) **Responden menderita sakit berat**

Populasi dan Sampel (Nyamuk)

Populasi adalah seluruh nyamuk yang berada di Kabupaten Maluku Tenggara Barat (MTB) dan Kab. Maluku Barat Daya (MBD)

Sampel adalah Nyamuk *Anophelessp* yang tertangkap di Kampung Alusi dan Waturu Kabupaten Maluku Tenggara Barat (MTB) dan kampung Kisar dan Wetar Kabupaten Maluku Barat Daya (MBD)

I. **Instrumen Pengumpulan Data**

1. Pengukuran persepsi masyarakat terhadap kelambu berinsektisida LLINs dilakukan dengan menggunakan kuesioner terstruktur
2. MBS dengan cara mengambil sediaan darah pada ujung jari manis sebelah kiri kemudian dilakukan pewarnaan dan diperiksa menggunakan mikroskop.
3. Uji resistensi insektisida terhadap vektor malaria menggunakan metode *impregnated paper* dan uji bioassay metode cone
4. Pemeriksaan Sporozoit terhadap vektor malaria menggunakan metode ELISA
5. Deteksi *gen knock down (kdr)* mutasinya.

J. **Bahan dan Prosedur Pengumpulan Data**

a) **Alat Penelitian**

1. Salinometer

2. pH meter
 3. Anemometer
 4. Lux meter
 5. *Sling Psychrometer*
 6. GPS
 7. Cidukan
 8. Aspirator
 9. Peper cup
 10. Kain tile
 11. Dipper
 12. Lampu senter
 13. Counter
 14. Cone uji bioassay
 15. Papan akrilik
 16. *ELISA Washer*
 17. *ELISA reader*
 18. Mikroplate ELISA
- b) Bahan penelitian
1. Silica gel
 2. Tabung ependorf
 3. *MAB Capture*
 4. Larutan anti IgG manusia (*affinity purified antibody to human IgG H+L*)
 5. Substrat ABTS
 6. Konjugat peroksidase (*peroksidase labelled affinity purified antibody to human IgG H+L*)

7. *Human Immunoglobulin calibrator*
8. Kertas insektisida WHO
9. PBS pH 7,4
10. Tween20,
11. 2,5 N HCL.
12. PBS (pH 4 Dulbeco' 10 x sigma Chem. D557),
13. Blocking buffer
14. Casein
15. ABTS peroksidase substrat,
16. NP-40,
17. Tween 20,
18. Kloroform
19. Alkohol
20. Xylol
21. Enthellan

Cara Kerja:

1. Pengukuran kadar garam

Pengukuran kadar garam dilakukan dengan alat salinometer, kelembaban menggunakan hygrometer, suhu menggunakan termometer, dan intensitas cahaya menggunakan lux meter. Pada lokasi penelitian serta melakukan pemetaan distribusi penggunaan kelambu LLINs dan pemetaan kasus malaria pada masyarakat di Kabupaten Maluku Barat Daya dan Maluku Tenggara Barat menggunakan GPS.

2. MBS (Mass Blood Survey)

Mass Blood Survey akan dilakukan dengan mengambil sediaan darah tepi masyarakat di daerah endemis malaria dan melakukan pemeriksaan mikroskopis parasit malaria untuk

menentukan jumlah kasus. Pada proses MBS dilakukan juga pemetaan koordinat sampel rumah tangga menggunakan GPS untuk data pendukung analisis epidemiologi malaria.

Pemeriksaan slide malaria dengan mikroskop:

- a) Siapkan alat autoklik dan lancet steril, *alcohol swab* dan kapas kering.
- b) Jarum lancet dipasang pada alat autoklik kemudian diatur skala kedalaman jarum lanset sesuai skala yang tertera pada autoklik.
- c) Ujung jari manis sebelah kiri diusap dengan *alcohol swab* kemudian dikeringkan dengan kapas kering lalu digunakan alat autoklik untuk menusuk ujung jari.
- d) Darah sebanyak 1 – 2 tetes pada slide yang telah diberi kode responden, kemudian dibuat diameter lingkaran 1 – 1,5 cm. diusahakan sediaan tidak terlalu tebal caranya dengan menempatkan kertas koran dibagian belakang slide, kalau tulisan pada koran masih dapat terbaca maka sediaan sudah bagus.
- e) Slide yang mengandung sediaan darah dikeringkan pada suhu kamar, dan usahakan agar terhindar dari kurumunan lalat/serangga dan terpaan debu, setelah itu dilakukan pewarnaan menggunakan giemsa
- f) Slide yang telah diwarnai dengan giemsa kemudian dibaca menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10 x 100 menggunakan minyak emersi.

3. Spesies dan Bionomik Vektor

- a) Tempat Istirahat Nyamuk.

*Hand Collection of indoor-resting mosquitoes*²¹.

Umumnya nyamuk vektor malaria spesies *Anopheles* beristirahat dalam rumah. *Hand collection of indoor-resting mosquitos* memberikan informasi mengenai lokasi dimana nyamuk sering beristirahat, resting density, perubahan kepadatan vektor, penggunaan

untuk uji kerentanan dan bioassay dan digunakan dalam pengamatan mortaliti vektor akibat penggunaan insektisida dan ITNs.

Penangkapan nyamuk dilakukan jam 18.00 – 06.00 dengan jumlah penangkap 4 orang dengan pembagian didalam rumah 2 orang dan di luar rumah 2 orang. Lama penangkapan tiap 40 menit untuk *landing collection*, 10 menit penangkapan di dinding dalam rumah dan luar rumah, 10 menit penangkapan di sekitar kandang pada pagi hari dilakukan penangkapan nyamuk didalam rumah (06.00-08.00) oleh 2 orang petugas (tiap 15 menit/rumah) kurang lebih 10 rumah.

Memelihara nyamuk agar tetap hidup di lapangan sebelum dibawa ke laboratorium.

1. Kapas direndam pada larutan gula 5 - 8%, kemudian diperas sehingga larutan gulanya berkurang lalu ditempatkan di bagian atas *paper cup*.
2. *Paper cup* diletakan dengan posisi tegak pada box.
3. *Paper cup* ditutupi dengan kain basah sebagai pelembab selama perjalanan menuju laboratorium.
4. *Paper cup* yang berisi nyamuk dari kontaminasi bahan insektisida dan gangguan semut.
5. Sebelum dibawa ke laboratorium, *paper cup* dikemas secara aman untuk mengurangi guncangan selama dalam perjalanan.

b) *Outdoor collection of adult mosquitoes*²¹

Pengumpulan spesies nyamuk di luar rumah diperlukan untuk mengukur dampak dari pengendalian vektor dengan memberikan informasi mengenai kebiasaan nyamuk istirahat diluar rumah atau adanya perubahan jumlah nyamuk yang istirahat diluar rumah akibat program IRS dan ITNs. Penangkapan nyamuk istirahat dilakukan pada pagi – siang hari, habitat aslinya (saluran irigasi, sungai, selokan, vegetasi/semak)

oleh 2 orang petugas. Penangkapan nyamuk disekitar kandang sapi dilakukan oleh 1 orang (15 menit/kandang).

c) Survei Habitat

Survei jentik dan pupa nyamuk dilakukan pada tempat genangan air yang potensial sebagai tempat perkembangbiakan nyamuk di daerah penelitian dan untuk mengetahui habitat nyamuk pra dewasa. Untuk menghitung kepadatan jentik dilakukan cara pencidukan sesuai standar WHO 2002. Pencidukan dilakukan menggunakan *dipper plastic* (gayung = 350 ml) 10 cidukan (dilakukan acak) disetiap tempat perindukan. Jentik yang diperoleh kemudian dihitung kepadatannya, kemudian diberi label dan dipelihara di laboratorium untuk diidentifikasi. Koordinat lokasi tempat pencidukan jentik/jentik akan di data menggunakan GPS.

Cara pengumpulan jentik:

- 1) Peralatan yang biasanya digunakan untuk mengumpulkan jentik nyamuk antara lain: cidukan, nampan, pipet plastic, vial, kapas, pensil, senter. Apabila specimen jentik digunakan untuk pengujian insektisida maka dibutuhkan wadah botol yang besar dengan bagian lubang mulut yang lebar.
- 2) Gayung plastik didekatkan secara hati-hati pada permukaan air di lokasi cidukan membentuk sudut 45°.
- 3) Saat gayung dicidukan ke dalam air, gayung tidak langsung diangkat karena menyebabkan jentik terganggu dan jentik akan tenggelam ke dasar kolam. Jika terjadi hal demikian tunggu 1 – 2 menit sampai jentik naik ke permukaan air dan kemudian lanjutkan pengangkatan.
- 4) Lakukan dengan mengitari kolam habitat jentik, dan lakukan pencidukan di permukaan kolam air.

- 5) Angkat gayung dari kolam perlahan-lahan, dan pastikan tidak menumpahkan air yang mengandung jentik dan pupa.
- 6) Gayung dibiarkan beberapa saat sampai jentik dan pupa naik dipermukaan air, kemudian jentik dan pupa dikumpulkan dengan cara menggunakan pipet plastik dan dipindahkan ke vial atau botol.
- 7) Jangan menumpahkan kembali air yang digayung pada kolam habitat karena dapat menyebabkan jentik dan pupa akan terganggu.
- 8) Dihitung jumlah cidukan pada tiap habitat jentik dan pupa, hal ini dilakukan untuk menghitung kepadatan jentik pada setiap habitat.

d) Cara Pemindahan Jentik dari Lokasi ke Laboratorium:

1. Semua jentik di tempatkan pada botol atau vial dan diberi label, label harus ditulis menggunakan pensil. Jangan menggunakan balpoin atau yang menggunakan tinta karena akan larut di air.
2. Jentik dan pupa yang dikumpulkan harus tetap hidup dan tidak rusak sampai tiba di laboratorium. Tutup botol atau vial harus rapat sehingga media air tidak tumpah.
3. Pastikan terdapat udara di dalam botol dan vial sekitar 1-2 cm dari permukaan air didalam vial terhadap tutupnya sehingga jentik dan pupa dapat bernapas untuk beberapa jam. Jika terdapat udara dalam jumlah besar akan menyebabkan gangguan selama dalam perjalanan yang menyebabkan kerusakan khususnya hilangnya rambut pada jentik dan pupa.
4. Jika waktu tempuh lokasi habitat dari laboratorium lebih dari 2 – 3 jam, buka tutup botol/vial setiap 2 jam untuk memberikan udara segar pada jentik dan pupa.
5. Jika jentik yang digunakan untuk keperluan uji kerentanan maka diperlukan labu vacuum yang besar atau wadah penyimpanan yang lebih besar.

e) Aktifitas Menggigit Nyamuk ^{7,23}

Untuk mengetahui aktifitas menggigit dari nyamuk digunakan manusia sebagai umpan yang dilakukan di dalam dan luar rumah dengan jumlah penangkap 2 orang. Juga mengamati aktivitas menggigit hewan ternak sapi atau kambing ¹⁰⁾.

$$\text{Man Biting Rate} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk Yang Didapat}}{\text{Jumlah Penangkapan} \times \text{Jumlah Waktu}}$$

$$\text{Man Hour Density} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk Yang Didapat}}{\text{Jumlah Penangkapan} \times \text{Jumlah Waktu (Jam)}}$$

f) Penentuan Umur relative Nyamuk ^{7,23}

Untuk mengetahui umur nyamuk di alam dilakukan pembedahan ovarium nyamuk kaitannya dengan penetapan vektor dan kapasitas vektor. Metode yang digunakan adalah metode WHO di mana nyamuk yang fed dimatikan menggunakan kloroform dan diletakan di atas kaca objek. Bagian ujung abdomen ditetesi garam fisiologis. Bagian dada ditusuk dengan jarum bedah dan jarum lain menusuk segmen ke enam dan ketujuh. Secara perlahan jarum pada abdomen digeser ke arah kandal sampai segmen abdomen dan isi perut di tarik keluar, kemudian dipisahkan isi perut dari masing-masing ovary. Ovari yang diletakan pada kaca objek diberi aquadest untuk melihat *tracheolus skein*, sedangkan ovari yang ditetesi garam fisiologis untuk melihat isi telur dan ada tidaknya dilatasi pada tangkai ovariole. Melalui metode ini dapat ditentukan umur nyamuk melalui kondisi parus dan maliparus serta menghitung proporsi parus:

$$\text{Proporsi Parus} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk Parus}}{\text{Jumlah Nyamuk Parus dan Nuliparus}}$$

g) Pemeriksaan sporozoit ²²

Beberapa nyamuk *Anopheles ssp.* yang diperoleh dari daerah penelitian dilakukan uji ELISA untuk mengetahui adanya kandungan sporozoit berdasarkan spesies plasmodium.

Uji ELISA untuk mendeteksi keberadaan sirkum sporozoit protein antigen. Untuk mendeteksi keberadaan sporozoit digunakan antibodi monoklonal Pf Pemeriksaan ELISA untuk mendeteksi vektor. *Plasmodium falciparum* / Pf dan *Plasmodium vivax* /Pv menggunakan teknik sandwich ELISA dimana Ab terikat pada plate yang nantinya akan mendeteksi adanya protein antigen sporozoit

Cara kerja:

1) Sampel nyamuk.

Nyamuk diuji adalah nyamuk *Anopheles ssp* betina ditangkap saat istirahat dan nyamuk yang hinggap/menggigit manusia di dalam dan di luar rumah pada malam hari dan pagi hari serta menggigit orang di dalam/luar rumah pada malam hari. diidentifikasi nyamuk untuk menentukan spesiesnya, nyamuk dipotong menjadi dua bagian dengan menggunakan bantuan pisau dan jarum, guna memisahkan bagian thorax-kepala dan abdomen. Untuk mengurangi terjadinya *false positif* (positif palsu) maka yang digunakan hanya bagian thorax-kepala (protoraks) yang diuji secara ELISA

2) Persiapan larutan ELISA sporozoit ²¹.

Untuk pemeriksaan ELISA terhadap sporozoit *Plasmodium* pada nyamuk, dipersiapkan larutan-larutan ELISA sebagai berikut :

- a) *Phosphate Buffer Saline* (PBS), pH 7,2 (Dulbecco's 10 x 1L, Sigma Chemical Co. # D5773) yang disimpan pada suhu 4⁰C, dicampur dalam 1 liter aquades.
 - b) *Blocking Buffer* (BB), terbuat dari casein (Sigma, C-0376, C-3400). BB casein dibuat dengan komposisi 0,5 % casein (2,50 g), 0,1 N Na OH (50,00 ml) dan PSB, pH 7,4 (450 ml). Suspensi casein dalam 0,1 N NaOH dididihkan, setelah larut ditambahkan PSB secara perlahan dan dibiarkan sampai dingin, pH diatur dengan menambahkan HCl.
 - c) *Blocking Buffer / Nonidet P-40* (BB/NP-40). Larutan ini dipakai untuk menggerus nyamuk yang diuji, terdiri dari 1 ml BB + 5 µl NP-40, keduanya dicampur sampai NP-40 larut dalam BB.
 - d) Larutan pencuci (PBS/Tween 20). Dimasukan 0,5 ml Tween 20 ke dalam 1 liter PSB, dicampur sampai homogen.
 - e) Larutan substrat, terdiri dari campuran 2,2-azinodi (3-ethylbenzthiazolin sulfonate 6) atau ABTS (larutan A) dan Hidrogen peroksida (larutan B) dengan perbandingan 1:1 yang digunakan 100 µl/sumuran.
 - f) Kontrol positif, merupakan protein CS rekombinan yang dimurnikan dari *P. falciparum* (*Pf-PC*) dan *P. vivax* (*Pv210-PC*) akuades (*Mab P. f*, KPL. Lot No. WE 092, Cat. No. 37.00.24.2) dan *P. vivax* 0,5 µl/vial (*Mab P.v-210*, KPL. Lot No. KA 52-5) serta *peroxidase-conjugated MAb P. f* 0,25 ug (KPL. Lot No. WE 092, Cat No. 37.00.24.4) dan *peroxidase-conjugated MAb P. v-210* 0,2 µg (KPL. Lot No. KA 51-5)
- 3) Persiapan sampel / penghancuran nyamuk ^{7,8,21}
- Nyamuk yang diperiksa secara individu atau dapat juga dikelompokkan / dipooled (5-10 ekor) ditempatkan dalam tabung eppendorf (*eppendorf tube*)

berukuran 1,5 ml yang berisi campuran 50 µl larutan BB dan NP-40. Nyamuk dihancurkan/ digerus dengan alat penumbuk (pestel) yang digerakkan otomatis memakai batu baterai (*electric grinder*). Setelah nyamuk hancur, ditambahkan 2 x 125 µl larutan BB, sehingga volume campuran bahan dalam masing-masing tabung eppendorf menjadi 300 µl. Homogenat nyamuk disimpan pada suhu – 20⁰C sampai saatnya untuk diuji. Pengujian sporozoit dilakukan pada sumuran mikropelat yang terpisah berdasarkan jenis *Plasmodium* yang digunakan.

- 4) Uji *ELISA* sporozoit *Plasmodium* pada nyamuk *Anopheles ssp.* (Verifikasi Vektor)⁸
 - a. *Coating* mikropelat dengan 50 µl larutan antibodi monoklonal (*Mab*), dipisahkan berdasarkan spesies sporozoit yang diuji, yaitu *Mab p. f* 0,1 µg/50 µl PBS dan *Mab P. v* 210 0,025 µl/50 µl PBS. Plat ditutup dengan *aluminium foil* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.
 - b. *Sumuran* diaspirasi dan diisi dengan BB 200 µl/sumuran, inkubasi selama 60 menit (tertutup).
 - c. *Sumuran* diaspirasi, 50 µl homogenat nyamuk dimasukkan ke dalam sumuran demikian juga untuk kontrol positif dan negatif. Inkubasi selama 2 jam (tertutup).
 - d. *Sumuran* dicuci dengan PBS/Tween 20 sebanyak 2 kali.
 - e. Konjugat (larutan *peroxidase-conjugated Mab*) dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran (0,050 µl/50 µl BB untuk *peroxidase-conjugated Mab P. f* dan *peroxidase-conjugated Mab P. v-210*). Inkubasi 1 jam (tertutup).
 - f. *Sumuran* dicuci 3 kali dengan PBS/Tween 20.
 - g. 100 µl larutan substrat (campuran ABTS dan H₂O₂) dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran, ditutup, diamati hasilnya setelah 30 menit.

- h. Hasil positif secara visual akan terlihat menunjukkan warna hijau dan untuk mengetahui nilai absorben / *absorbance value* (AV) secara kuantitatif dapat dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm. Intensitas warna sebanding dengan jumlah antigen CS yang terdapat dalam sampel.
- i. Sampel yang positif harus dikonfirmasi / diuji ulang, dibandingkan dengan kurva standar ekuivalensi antigen CS (dari kontrol positif) terhadap sporozoit *P. falciparum* atau *P. vivax*. Pembuatan kurva kontrol positif dilakukan dengan membuat seri pengenceran mulai dari konsentrasi 100; 50; 25; 12; 6; 3 dan 1,5 pg/50 ul BB, masing-masing 3 kali ulangan. Pada plat yang sama diletakan pula kontrol negatif dan sampel positif yang diuji ulang. Prosedur pengujian sama dengan ELISA sporozoit, mulai dari coating mikroplat sampai dengan pembacaan hasil di ELISA reader.

$$\text{Sporozoite rate (SR)} = \frac{\text{JUMLAH SPESIES (X) YANG MENGANDUNG SPOROZOIT}}{\text{JUMLAH SPESIES (X) YANG DIBEDAH}} \times 100\%$$

5) Uji Pakan Darah menggunakan metode ELISA

Uji pakan darah dilakukan dengan metode ELISA untuk memperoleh ketepatan dalam menentukan sensitifitas dan spesifisitas jenis darah yang dihisap oleh nyamuk (darah manusia/hewan). Nyamuk *Anopheles* yang akan diidentifikasi pakan darahnya adalah dalam kondisi perut kenyang darah (*blood fed* atau *half gravid*)

Cara Kerja:

- a) Bagian perut nyamuk dipisahkan dari kepala-dada (Protoraks). Darah dalam bagian perut setiap spesimen nyamuk *Anopheles* dipencet pada kertas filter Whatman diameter 11 cm (yang sudah dibagi menjadi 16 bagian).

- b) Setiap bagian kertas filter Whatman (berisi sediaan darah sampel) dimasukkan ke dalam 1 ml PBS (minimal dalam waktu 1 jam sebelum diuji atau dapat disimpan dalam refrigerator (kulkas) untuk pengujian lebih lanjut).
- c) Sumuran mikropelat ditambahkan 100 μ l larutan anti IgG manusia (4 μ l/ml PBS) lalu mikropelat ditutup dengan *aluminiumfoil*, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4⁰C.
- d) Sumuran diaspirasi terlebih dahulu kemudian ke dalam sumuran dimasukkan 200 μ l BB dan di inkubasi selama 1 jam. Sumuran diaspirasi kemudian mikropelat ditepuk-tepukkan pada kertas tisu untuk menghilangkan sisa-sisa buffer.
- e) Dalam sumuran dimasukkan 100 μ l homogenat, demikian pula pada kontrol positif dan kontrol negatif. Pada kontrol positif, ditambahkan 100 μ l IgG (5 μ l/500 ml PBS). Pada kontrol negatif digunakan nyamuk *Anopheles ssp* hasil koloni laboratorium yang tidak menghisap darah.
- f) Setelah selesai mikropelat ditutup dan diinkubasi selama 2 jam. Selanjutnya sumuran diaspirasi dan dicuci dengan PBS/Tween dua kali dan dikeringkan.
- g) Tambahkan 100 μ l konjugat peroksidase ke dalam sumuran, (2 μ l /1 ml BB Tween) dan diinkubasi selama 1 jam. Sumuran diaspirasi dicuci dengan PBS/Tween sebanyak tiga kali ulangan.
- h) Tambahkan 100 μ l larutan substrat ABTS (Substrat disiapkan dengan mencampurkan ABTS dan H₂O₂ perbandingan 1:1). Setelah penambahan substrat mikropelat ditutup dan ditempatkan di ruang gelap selama 20 menit. Untuk menghentikan reaksi ditambahkan 1 tetes 2,5 N HCl pada tiap-tiap sumuran.

- i) Pembacaan hasil dilakukan secara visual dan kuantitatif. Pembacaan secara visual pada kontrol positif akan menunjukkan warna hijau sedangkan pada kontrol negatif tidak berwarna. Penilaian secara kuantitatif dengan membaca nilai *absorbance value* (AV) pada *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm setelah 20 menit.
- 6) Uji Bioassay
- a) Uji efikasi insektisida yang terpapar di permukaan
 - b) Corong plastik pada bagian lingkaran tepinya diberi tip perekat
 - c) Corong plastik disemprotkan pada bidang permukaannya (dibuat variasi dosis: rendah, menengah, tinggi)
 - d) Tempelkan kertas karton bebas insektisida pada dinding dan kemudian lekatkan corong pada karton tersebut (digunakan sebagai control)
 - e) Pindahkan 10 ekor nyamuk pada setiap cone dan letakan kapas secukupnya pada sisi corong yang terbuka (gunakan aspirator secara terpisah untuk kontrol)
 - f) Setelah 30 menit, secara hati-hati pindahkan nyamuk dari corong dan pindahkan secara terpisah (berikan label) pada masing-masing paper cup.
 - g) Hitung jumlah nyamuk yang mati (*knok down*) pada akhir paparan, tetapi jangan memindahkan nyamuk yang masih keliatannya mati, beberapa diantaranya akan baik kembali.
 - h) Tempatkan kapas basah di atas paper cup, kemudian ditempatkan pada box kayu dan ditutupi kain basah
 - i) Setelah 24 jam, hitung jumlah nyamuk yang mati dan hitung persentase kematian tiap paparan dan juga control

- j) Jika mortalitas control 5-20% persentase mortalitas harus dikoreksi menggunakan rumus Abbott's. jika mortalitas control lebih 20% experiment harus diulang.

$$\text{Control Mortaliti (C)} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk Yang Mati}}{\text{Total Jumlah Nyamuk Kontrol tube}}$$

$$\text{Exposure Mortaliti(E)} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk yang Mati}}{\text{Total jumlah Nyamuk pada tube yang mengandung insectisida}}$$

$$\text{Abbot's Formula Corrected exposure Mortaliti (\%)} = \left(\frac{E-C}{100-C} \right) \times 100$$

- 7) Uji efikasi (Bioassay) untuk *Insectiside-treated bed nets* dan LLNs pada Vektor Malaria

- Untuk uji metode cone WHO digunakan *Non blood fed* nyamuk sebanyak 5 ekor agar lebih leluasa kontak dengan kelambu yang diuji.
- Dipergunakan empat cone yang sama pada kelambu uji dengan replikasi sebanyak 10 kali, dengan tiap cone 5 ekor nyamuk dengan total nyamuk 50 ekor dengan lama waktu kontak 3 menit.
- Setelah exposure nyamuk ditempatkan pada gelas plastik 150 ml (10 ekor nyamuk tiap gelas) kemudian diberi makan sukrosa, dan ditempatkan pada suhu 27 C dengan kelembaban 80%.
- Di catat persentase knock down setelah 60 menit dan persentase setelah 24 jam²¹.

$$\text{Control Mortaliti (C)} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk Yang Mati}}{\text{Total Jumlah Nyamuk Kontrol tube}}$$

$$\text{Exposure Mortaliti(E)} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk yang Mati}}{\text{Total jumlah Nyamuk pada tube yang mengandung insectisida}}$$

$$\text{Abbot's Formula Corrected exposure Mortaliti (\%)} = \left(\frac{E-C}{100-C} \right) \times 100$$

- 8) Uji kadar insektisida pada kelambu LLINs (*Long Lasting Insecticide Nets*) Untuk mengetahui kadar Insektisida pada LLINs digunakan uji Gas Kromatografi Langkah kerja uji Gas Kromatografi (GC) = *High Pressure Liquid Chromatograph* (HPLC). Reagen atau peralatan yang diperlukan:

- a) Deltametrin standar : standar referensi
- b) Aseton: HPLC
- c) Dibutylphtalate: Analisis
- d) Pengocok: Yamato
- e) Ultrasonik (ultra) untuk mengultrasonik fase gerak dan sampel yang akan masuk dalam kolom sehingga udara tidak ada dan tidak mengakibatkan sumbatan dalam kolom.
- f) HPLC : Aligent 1100
- g) Pelarut untuk ekstrasi: Aseton 80 %
- h) Cairan standar internal : 0,05% dibutylphtalate dalam campuran ekstrasi
- i) Solution deltametrin standart: 0,05% deltametrin standar dalam campuran ekstrasi

Persiapan Sampel

- a) Masing-masing kelambu dipotong 2-3cm
- b) Masukkan 0,3 gram kelambu (mengandung 50 mg deltametrin) ke dalam botol gelas yang berisi 50 ml air
- c) Tambahkan 1 ml cairan standar internal (dibutylphtalate)
- d) Tambahkan 14 ml hasil ekstrasi
- e) Kocok dengan kuat menggunakan pengocok (yamato) selama 30 menit
- f) Saring campuran sampel kemudian filtrasi hasil saringan disiapkan untuk injeksi.

Persiapan larutan kalibrasi

- a) Masukkan 1 ml deltamethrin standar dengan menggunakan pipet kedalam botol gelas berisi 50 ml air
- b) Tambahkan 1ml larutan standar internal
- c) Tambahkan 14 ml ekstrasi
- d) Campur larutan untuk membuat larutan kalibrasi

Kondisi Kerja

- a) Kolom : Lichrosob SI-60, 25 cm x 4,6 mm, 5µm
- b) Detector : Ultra Violet
- c) Fase Gerak : 94% Volume Aseton
- d) Laju aliran : 1ml/menit
- e) Volume Injeksi : 5-10 µl
- f) Suhu kolom : 25⁰C

Penentuan Hasil

Kandungan Deltametrin = $\frac{S_s \times I_c \times W_c \times P}{I_s \times S_c \times W_s}$

$I_s \times S_c \times W_s$

Keterangan :

- S_s : Area puncak deltametrin dalam larutan sampel
- S_c : Area puncak deltametrin dalam larutan kalibrasi
- I_s : Area puncak standar internal larutan sampel
- I_c : Area puncak standar internal larutan kalibrasi
- W_s : mg berat kelambu
- W_c : mg deltametrin dalam larutan kalibrasi
- P : deltametrin standar referensi

Pengujian Konsentrasi Insektisida Permethrin Dalam Kelambu

Prinsip Kerja : Contoh diekstraksi dengan aseton dan diklorometana dan ditetapkan dengan kromatografi gas menggunakan detektor FID (*Flame Ionization detector*)

Peralatan dan pereaksi yang digunakan adalah rotavapor, kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor FID, alat gelas, aseton GR, diklorometana GR, isooktan GR

Tahapan :

Ekstraksi : Kelambu ditimbang dengan timbangan analitik dan dimasukkan ke dalam erlemeyer asah (bertutup), ditambahkan campuran aseton : diklorometana 100 ml (50:50 v/v) dengan menggunakan pipet volume. Dibiarkan selama satu malam untuk proses ekstraksi statis. Kemudian hasil ekstraksi disaring dan disuntikkan ekstrak ke dalam kromatograf gas.

Penetapan

Hasil ekstraksi diambil 1µl ekstrak kemudian diinjeksikan ke dalam kromatograf gas dengan kondisi :

1. Kolom kapiler : Hp-5, panjang 30 m x 320 µm x 0,25 µm
2. Program suhu : 100⁰C-250⁰C, laju peningkatan 15⁰C/menit
3. Suhu Injektor : 250⁰C
4. Suhu detektor : 250⁰C
5. Gas Nitrogen UHP : 2 ml/menit
6. Detektor : FID (*Flame Ionization Detector*)

9) Uji Susceptibility (Resistensi Vektor) Nyamuk Metode Impregnated Paper

- a) Metode ini menggunakan kertas saring persegi panjang dengan ukuran 12 x 15 cm (Whatman No.1 atau sejenisnya) kemudian di impregnated/dilapisi dengan 2 ml pelarut, aseton yang dicampur dengan pembawa yang tidak menguap seperti minyak silicon (BDH Dow Corning 556 atau Risella (Shell) atau minyak santon. Selama melakukan test insektisida perlu dikonsultasikan mengenai pelarut dan zat pembawa yang akan digunakan.
- b) 25 batch *non blood fed* nyamuk betina dengan umur 2-5 hari ditempatkan pada tube dengan titik berwarna hijau dan dibiarkan pada suhu 25 C dengan kelembaban 80% untuk penyesuaian.
- c) Nyamuk dipindahkan secara perlahan-lahan pada tube yang terexposure (tube dengan titik merah), alat ini dibiarkan pada posisi vertikal selama 1 jam terlindung dari cahaya.
- d) Pada akhir waktu exposure, nyamuk akan berpindah pada tube titik hijau kemudian tube ini secara vertikal disimpan pada tempat gelap selama 24 jam dengan memberikan larutan sukrosa dan suhu ruangan 25 C dengan kelembaban 80%. Nyamuk yang mati dihitung setelah 24 jam²¹.

$$\text{Control Mortaliti (C)} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk Yang Mati}}{\text{Total Jumlah Nyamuk Kontrol tube}}$$

$$\text{Exposure Mortaliti(E)} = \frac{\text{Jumlah Nyamuk yang Mati}}{\text{Total jumlah Nyamuk pada tube yang mengandung insektisida}}$$

$$\text{Abbot's Formula Corrected exposure Mortaliti (\%)} = \left(\frac{E-C}{100-C} \right) \times 100$$

10) Deteksi Mutasi Terkait Resistensi *Anopheles flavirostris* terhadap piretroid

Deteksi mutasi dilakukan pada seluruh *Anopheles flavirostris* yang masih hidup setelah terpapar piretroid. Analisis dilakukan pada tingkat DNA dengan tahapan sebagai berikut:

- a) Ekstraksi DNA dari nyamuk.
- b) Letakan 180 ul dapar PBS pada setiap tabung yang akan digunakan untuk menghancurkan nyamuk.
- c) Letakan nyamuk utuh atau abdomen dari serangga yang lebih besar pada dapar.
- d) Lakukan maserasi secara keseluruhan menggunakan pestle. Segera tambahkan 20 ul Proteinase K, dan 200 ul dapar pelisis. Vortex selama 10 detik. Inkubasi selama 10 menit pada suhu 70°C.
- e) Tambahkan 200 ul Ethanol absolute. Vortex selama 10 detik.
- f) Ambil larutan pada dari langkah 4, pindahkan ke kolom minispin yang sudah diletakan di dalam tabung penampung. Sentrifuga kolom selama 1 menit pada 8.000 rpm.
- g) Pindahkan kolom ke tabung penampung baru, lakukan langkah 5 pada sisa larutan. Buang lisat.
- h) Tambahkan dapar pencuci 1, sentrifuga selama 1 menit pada 8.000 rpm. Buang lisat.

- i) Tambahkan 500 ul dapar pencuci 2, sentrifuga selama 3 menit pada 13.000 rpm.
- j) Pindahkan minispin kolom ke tabung mikrosentrifuga 1,5 ml, tambahkan 100 ul dapar pengelusi kedalam minispin kolom. Inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, lalu sentrifuga selama 1 menit pada 8.000 rpm.
- k) DNA siap untuk dianalisis lanjut

11) Deteksi gen kdr menggunakan probe.

Komponen PCR

| Bahan | ul/reaksi (25ul) |
|--------------------|------------------|
| DNA genomic | 1 |
| 2x PCR Master Mix | 12,5 |
| Enzyme | 0,25 |
| Primer forward | 0,5 |
| Primer reverse | 0,5 |
| Probe | 0,25 |
| Air bebas nuclease | 10 |

Deteksi mutasi dilakukan secara kuantitatif menggunakan teknik *PCR Real-time* menggunakan primer dan probe yang sudah dirancang pada penelitian yang dilakukan oleh Bass pada 2007.¹⁹ Program PCR yang akan digunakan adalah:

| Step | Siklus | Suhu | Waktu |
|------|--------|------|----------|
| 1 | 1x | 95°C | 10 menit |
| 2 | 40x | 95°C | 10 detik |
| 3 | | 60°C | 45 detik |

Primer yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Primer *kdr-Forward* (5'-CATTTCCTTGGCCACTGTAGTGAT-3'), dan primer *kdr Reverse* (5'-CGATCTTGGTCCATGTAAATTTGCA-3'). Probe yang akan digunakan untuk mendetik galur murni WT (5'-CTTACGACTAAATTC- 3') dilabeli dengan VIC pada

ujung 5'. Probes *kdrW* (5'-ACGACAAAATTTTC-3') dan *kdrE* (5'-ACGACTGAATTTTC-3') dilabelidengan 6-FAM untuk mendeteksi mutan *kdr-w* dan *kdr-e*. Data qPCR ini dikonfirmasi menggunakan PCR konvensional dan sekuensing DNA. Primer yang digunakan untuk PCR ini adalah An. F 5' GACCATGATCTGCCAAGATGGAAT3 dan An. R 5' GAGGATGAACCGAAATTGGAC 3'. Produk PCR yang diperoleh selanjutnya dielektroforesis pada agarose 1%. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA berukuran sekitar 300 pasang basa gambar 2. Produk PCR yang diperoleh dikarakterisasi lebih lanjut dengan sekuensing DNA. Analisis hasil sekuensing menunjukkan produk PCR yang diperoleh terkonfirmasi sebagai *kdr Anopheles* dan merupakan *wild type* V1010 dan L1040.

K. Pengolahan Dan Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan dianalisis secara deskriptif