

KOLONISASI NYAMUK *Aedes aegypti* MENGGUNAKAN TEHNIK MEMBRAN ARTIFISIAL DI LABORATORIUM

Lusiyana N¹, Cahyani MST²

¹ Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

² Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

ABSTRAK

Latar belakang

Kolonisasi nyamuk *Aedes aegypti* di laboratorium dapat menggunakan AMF (*Artificial Membrane Feeding*). Membran artifisial yang sering digunakan seperti parafilm M, latek kondom, dan kulit mencit. Penggunaan membran artifisial mempengaruhi kemampuan reproduksi nyamuk *Ae. aegypti*.

Tujuan

Mengetahui pengaruh penggunaan membran artifisial parafilm M, latek kondom, dan kulit mencit terhadap persentase nyamuk dewasa yang mampu menghisap darah, rerata jumlah telur dan persentase daya tetas telur nyamuk *Ae. aegypti* di laboratorium.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni. Nyamuk *Ae. aegypti* sebanyak 30 ekor (8 replikasi) dimasukkan ke dalam gelas *rearing* yang telah diberi AMF berisi darah dengan membran yang berbeda jenisnya yaitu, parafilm M, latek kondom dan kulit mencit. *Blood feeding* dilaksanakan selama 60 menit, setelah 60 menit kemudian dihitung jumlah nyamuk yang mampu menghisap darah. Nyamuk yang telah menghisap darah kemudian dimasukkan ke dalam gelas *rearing* secara individu untuk bertelur. Jumlah telur yang diproduksi dihitung setelah 7 hari paska pemberian umpan darah. Telur kemudian direndam dengan air selama 7 hari untuk pengamatan daya tetas. Hasil dianalisis dengan Uji *One way ANNOVA*.

Hasil

Persentase nyamuk *Ae. aegypti* yang mampu menghisap darah menunjukkan perbedaan signifikan ($p=0,000$) antara membran parafilm M (88,33%), latek kondom (45,42%), dan kulit mencit (86,66%). Jumlah telur per ekor nyamuk betina juga menunjukkan beda signifikan ($p=0,002$) antara membran parafilm M (51,63), latek kondom (50,53), dan kulit mencit (53,65), sedangkan persentase daya tetas telur juga menunjukkan perbedaan signifikan ($p=0,02$) antara membran parafilm M (99,94%), latek kondom (99,91%), dan kulit mencit (99,96%).

Kesimpulan

Membran artifisial kulit mencit menunjukkan hasil yang lebih baik sehingga lebih direkomendasikan sebagai metode *rearing* nyamuk *Ae. aegypti* di laboratorium.

Kata kunci:

Artificial Membrane Feeding (AMF), *blood feeding*, membran parafilm M, latek kondom dan kulit mencit

ABSTRACT

Introduction

The colonization of *Aedes aegypti* is using AMF (Artificial membrane feeding) routinely. Artificial membrane that usually use such as parafilm M, latex condom, and rat skin. Those membrane artificial can reduce the reproductive ability of *Ae aegypti* in laboratory.

Aims

This study was carried-out to investigate the effect of membrane artificial parafilm M, latex condom, and rat skin on sucking number of mosquitoes, fecundity and hatchability of *Ae. aegypti* .

Method

This was an experimental study. Thirty female of *Ae. aegypti* were inserted into rearing glass that has been given AMF contains blood with different membrane there are parafilm M, latex condom and mice skin. Blood feeding carried out for 60 minutes and then after 60 minute, the the number of blood fed mosquitoes were calculate. Sucking blood mosquitoes were inserted into glass rearing individually to spawn. The number of eggs produced was calculated after 7 days after blood feeding. Eggs were soaked in water for 7 days for observation the hatchabilit . Test results were analyzed by One way Annova .

Result

The percentage of *Ae . aegypti* that capable sucking the blood showed a significant difference ($p=0.000$) between the membrane parafilm M (88.33%) , latex condoms (45.4 %) , and skin of mice (86.66 %) . The number of eggs per female mosquitoes also showed a significant difference ($p=0.002$) between the membrane parafilm M (51.63) , latex condoms (50.53) , and the skin of mice (53.65) , while the percentage hatchability of eggs also show differences significant ($p =0.02$) between the membrane parafilm M (99.94%) , latex condoms (99.91 %) , and skin of mice (99.96 %) .

Conclusion

Artificial membrane of mice skin show better results so it is recommended as a method of rearing *Ae. aegypti* in the laboratory .

Keywords

Artificial membrane feeding (AMF), blood feeding, parafilm M, latex condom, mice skin

LATAR BELAKANG

Nyamuk *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) merupakan vektor utama penyakit DBD.¹ Masih tingginya angka kematian DBD di Indonesia menjadikan nyamuk ini banyak

dikembangbiakan di laboratorium guna penelitian mengenai peranannya sebagai vektor maupun untuk mengetahui bionomik nyamuk.

Serangga termasuk nyamuk dapat dikolonisasi di laboratorium dan salah satu bagian penting dari proses kolonisasi nyamuk di laboratorium adalah pemberian umpan darah pada nyamuk betina (*blood feeding*).²

Darah sangat diperlukan oleh nyamuk betina untuk pematangan sel telurnya. Di dalam darah juga terdapat banyak asam amino yang sangat diperlukan nyamuk betina untuk produksi telur dan sumber energi.² Asam amino dan ion dalam darah penting untuk proses oogenesis, maturasi oosit, pembentukan *fat body* melalui proses previtelogenik, dan vitellogenik.^{3,4}

Nyamuk lebih menyukai darah manusia dibandingkan darah hewan karena darah manusia mengandung fagostimulan yang dapat mengaktifkan reseptor cibarial nyamuk.^{5,6} Reseptor cibarial ini akan teraktifasi jika di dalamnya *host* terdapat fagostimulan. Fagostimulan dapat berasal dari darah maupun dari permukaan kulit *host*.

Pemberian darah pada nyamuk di laboratorium dapat menggunakan umpan langsung ataupun menggunakan AMF (*Artificial membrane feeding*). Penggunaan umpan langsung mengakibatkan terjadinya transmisi virus dengue dari manusia kepada

nyamuk *Ae. aegypti*, sehingga diperlukan perangkat pengganti umpan langsung yaitu menggunakan AMF.^{5,6}

Komponen AMF terdiri dari *Membrane feeding* dan *Artificial feeding*. Membran artifisial yang banyak digunakan dalam *blood feeding* nyamuk di laboratorium adalah parafilm M, latek kondom dan kulit mencit.

Membran artifisial parafilm M dan juga latek kondom tidak memiliki komponen yang dapat merangsang reseptor cibarial nyamuk seperti pada umpan langsung, sedangkan keberhasilan nyamuk dalam menghisap darah sangat dipengaruhi oleh faktor *host*.^{7,8} Membran artifisial juga memiliki struktur yang berbeda dengan kulit manusia ataupun kulit vertebrata lainnya yang sering digunakan untuk umpan langsung, sehingga dapat mempengaruhi jumlah nyamuk yang mampu menghisap darah, jumlah telur, dan daya tetas. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka pengaruh penggunaan membran artifisial tersebut terhadap kemampuan reproduksi nyamuk *Ae. aegypti* di laboratorium penting untuk diteliti.

METODE

Kolonisasi nyamuk *Ae. aegypti* menggunakan metode Gaio.⁴ Nyamuk *Ae. aegypti* dipelihara pada suhu 25⁰C-28⁰C, kelembaban 70%-80%, dan pencahayaan 12:12 (gelap:terang). Nyamuk jantan dan betina dikawinkan selama 5 hari pada sebuah sangkar berukuran (30cmx30cmx30cm) dan diberi larutan sukrosa 10%. Nyamuk betina kemudian dipisahkan dari jantan kemudian dipuaskan selama 24 jam untuk *blood feeding*.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komite etik FK UGM. Prosedur dan penanganan hewan coba dalam penelitian ini menggunakan teknik dekapitasi kemudian diambil kulitnya. Darah untuk *blood feeding* dari sukarelawan juga menggunakan protokol yang terstandar. AMF pada penelitian ini menggunakan metode Gaio.⁴

Membran artifisial yang digunakan dalam penelitian ini parafilm M, latex kondom, kulit mencit. Membran parafilm dipotong dengan dengan diameter 5cm x 5cm. Membran latek kondom dibersihkan menggunakan sabun kemudian dibilas dengan air mengalir dan dipotong dengan ukuran 5cmx5cm. Membran kulit mencit didapatkan dengan mengguliti mes tajam

setelah didekapitasi dan dipotong dengan ukuran 5cm x 5cm. Membran artifisial dilekatkan di bawah AMF menggunakan selotip. Darah sebanyak 2cc dimasukkan ke dalam AMF kemudian dialiri dengan air dengan suhu 37⁰C melalui *waterbath*. AMF diletakkan di atas gelas *rearing* selama 60 menit. Pada setiap kelompok dimasukkan 30 ekor nyamuk betina.

Jumlah nyamuk yang mampu menghisap darah setelah 60 menit pada masing-masing kelompok kemudian dihitung. Pengulangan pada tiap kelompok adalah 8 kali. Jumlah nyamuk yang menghisap darah = (jumlah nyamuk yang menghisap darah/30)x100%.

Nyamuk betina yang telah kenyang menghisap darah kemudian dimasukkan ke dalam gelas *rearing* yang telah diberi kapas lembab dan kertas saring secara individu. Nyamuk betina dibiarkan bertelur selama 7 hari dan diberi larutan sukrosa 10% menggunakan kapas pada bagian atap gelas *rearing*. Setelah 7 hari telur pada kertas saring kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian dihitung jumlah telurnya menggunakan mikroskop disecting. Jumlah telur (fekunditas) adalah (total jumlah telur yang dihasilkan/jumlah nyamuk betina yang menghisap darah).

Telur nyamuk yang diproduksi oleh masing-masing nyamuk betina kemudian ditetaskan. Telur direndam air sebanyak 250 ml dalam wadah berukuran 300ml. Dihitung telur yang menetas menjadi larva sampai hari ke-7. Daya tetas yaitu jumlah telur yang menetas menjadi larva/jumlah telur yang ditetaskan.

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini kemudian dianalisis menggunakan Uji *One Way ANOVA* dan *Kruskal-Wallis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data jumlah nyamuk *Ae. aegypti* yang mampu menghisap darah pada kelompok perlakuan membran parafilm M,

lingkungan.^{9,10,11} Faktor nyamuk meliputi anatomi probosis, kemampuan menghisap, *withdrawal* stylet, rangsangan visual dan olfaktori. Faktor lingkungan meliputi suhu dan kelembaban ruangan.^{7,12,13} Faktor host meliputi fagostimulan yang mampu mengaktifkan reseptor neuron olfaktori nyamuk yang terletak pada antena, labelar, dan palpus maksilaris.¹⁴ Fagostimulan dalam darah meliputi ATP, ADP, L-lactid acid, bau keringat dan suhu tubuh manusia.¹⁵

Jumlah nyamuk yang menghisap darah melalui membran membran kulit mencit lebih banyak dapat dipengaruhi oleh bau yang berasal dari kulit mencit itu sendiri. Pada kulit mencit terdapat

Tabel 1. Jumlah nyamuk *Ae. aegypti* yang mampu menghisap darah melalui AMF

Kelompok	n	Persentase±SD	p
Parafilm M	240	88,33±3,95	0,000
Latek kondom	240	45,42±5,52	
Kulit mencit	240	86,66±4,37	

P Uji One Way Anova bermakna jika nilai $p < 0,05$

latek kondom dan kulit mencit disajikan pada Tabel 1. Jumlah nyamuk yang mampu menghisap darah melalui membran kulit mencit sebesar 86,66% berbeda signifikan ($p=0,000$) dengan kelompok membran parafilm M dan kulit mencit.

Kemampuan nyamuk betina dalam menghisap darah dipengaruhi oleh faktor nyamuk, daya tarik terhadap *host* dan

fagostimulan yang memicu keinginan nyamuk untuk menghisap darah, sedangkan pada membran parafilm dan latek kondom karena terbuat dari bahan karet sintetis.

Jumlah telur nyamuk *Ae. aegypti*

Seekor nyamuk *Ae. aegypti* dalam satu siklus gonotrofik pada penelitian ini memiliki produksi telur berkisar antara 27-81 butir telur. Jumlah telur yang diproduksi

oleh seekor nyamuk betina ditampilkan pada Tabel 2.

Kelompok membran kulit mencit

pada Tabel 3.

Kelompok membran kulit mencit memiliki

daya tetas terbaik (99,96%) dan berbeda

Tabel 2. Jumlah telur pada berbagai kelompok perlakuan

Kelompok	Telur/ekor (butir)	<i>p</i> *
Parafilm M	51,63±9,27	0,002
Latek kondom	50,53±11,15	
Kulit mencit	53,65±9,19	

*p** uji Kruskals-Wallis bermakna jika nilai $p < 0,05$

memiliki jumlah telur paling banyak (53,65±9,19) dan berbeda signifikan ($p=0,002$) dengan kelompok membran parafilm M dan kulit mencit. Jumlah telur yang diproduksi oleh seekor nyamuk betina sangat dipengaruhi oleh volume darah yang dihisap, semakin banyak darah yang mampu dihisap, semakin banyak pula jumlah telur yang akan dihasilkan.^{13,16,18} Hal ini terkait dengan adanya fagostimulan yang berada pada kulit mencit sehingga diduga meningkatkan volume darah yang dihisap dan berdampak pada jumlah telur yang dihasilkan oleh seekor nyamuk betina.

Daya tetas nyamuk *Ae. aegypti*

Daya tetas telur pada masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan

signifikan ($p=0,000$) dengan kelompok membran parafilm M dan kulit mencit. Daya tetas telur juga dipengaruhi oleh fase previtelogenik dan vitelogenik yang dipengaruhi oleh jumlah asam amino darah. Protein vitelogeni dalam oosit didapatkan dari darah yang dihisap oleh nyamuk betina.^{17,19} Telur yang steril atau tidak berembrio juga dapat menyebabkan telur tidak dapat menetas menjadi larva, selain faktor kepadatan populasi, saat menetas telur juga sangat mempengaruhi daya tetas telur.^{16,19}

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa membran artifisial kulit mencit

Tabel 3. Daya tetas telur pada berbagai kelompok perlakuan

Kelompok	Daya tetas (%)
Parafilm M	99,94
Latek kondom	99,91
Kulit mencit	99,96

memiliki jumlah nyamuk yang mampu menghisap darah lebih banyak, produksi telur lebih banyak dan daya tetas telur lebih baik dibandingkan membran parafilm M dan juga latek kondom. Berdasarkan hasil penelitian ini peneliti lebih merekomendasikan membran kulit mencit untuk digunakan dalam *blood feeding* nyamuk *Ae. aegypti* di laboratorium yang menggunakan AMF.

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan RI. *Demam Berdarah Dengue di Indonesia Tahun 1968-2009*. Buletin Jendela Epidemiologi. 2010.vol 2.
2. Zhou G, Miesfeld R. Differential utilization of blood meal amino acids in mosquitoes. *J Insect Physiol*. 2009.1:1-12.
3. Gaio AO, Gusmao, DS, Santos AV, Berbert-Molina MA, Pimenta PFP, Lemos FJA. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae). *BMC Parasites & Vectors*. 2011.4:105.
4. Bohdot JD, Jones PL, Wang G, Pitts RJ, Pask GM, Zwiebel LJ. Conservation of indol responsif odorant reseptor in mosquitoes reveals an ancient olfactory trait. *Cem.Senses*. 2011.36:140-160.
5. Costa-da-silva AL, Navarrete FR, Salvador FS, Karina-Cost M, Ioshino RS, Azevedo DS, Rocha DR, Romanoz CM, Capurro ML. Glytube: A conical tube and parafilm M- based method as a simplifield device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. *PloS One*. 2013.8 (1): e53816.
6. Mardihusodo SJ, Satoto TBT, Mulyaningsih B, Umniyati SR, Ernaningsih. Bukti adanya penularan virus dengue secara transovarial pada nyamuk *Aedes aegypti* di Kota Yogyakarta. *Simposium Nasional Aspek Biologi Molekuler, Patogenesis, Manajemen dan Pencegahan KLB*; 16 Mei 2007: Yogyakarta.
7. Ferdowsian HR, Beck N. Ethical and scientific consideration regarding animal testing and research. *PloS One*. 2011.6(9): e24059.
8. Mukabana WR, Takken W, Coe R, Knol BGJ. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria JourNal*.2007.1:17.
9. MacDougall C. Effect of blood meal size on mosquito response to disturbance while blood feeding on a simlated host. University of Victoria. 2005.
10. Colless DH, Chellapah WT. Effect ob blood-meal size on the number of eggs produced by the mosquito *Aedes aegypti*. *Ann. Trop. Med. Parasit*. 1960.54(4):475-82.
11. Chilaka, N, Perkins, E, Tripet, F., 2012. Visual and olfactory associative learning in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto*. *J.Mal*. 11:27.
12. Takken W, Klowlwen MJ, Chambers GM. Effect of body size on host seeking and blood meal utilization in *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera:Culicidae): the disadvantages of being small. *J Med Entomol* .1998. 35:639-645.
13. Bohdot JD, Jones PL, Wang G, Pitts RJ, Pask GM, Zwiebel LJ. Conservation of indol responsif odorant reseptor in mosquitoes reveals an ancient olfactory trait. *Cem.Senses*. 2011.36:140-160.
14. Saeaeu L, Morales NP, Komalamisra N, Vargas REM. Antioxidative system defense againts oxidative stressinduce by blood meal in *Aedes aegypti*. *Southeast Asian.J.Trop. Med. Publich Health*. 2011.42(3): 542-549.
15. Clements AN. *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition, and Reproduction*, vol.1. New York, NY: CABI Publishing.1992.
16. Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, van Warmerdam T, Awono-Ambene PH, *et al*. Mosquito feeding assay

- to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS One*. 2012.7(8): e42821.
17. Atella GC, Gondim KC, Machado EA, Medeiros MN, Silva-Neto MAC, Masuda H. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *BioScien*. 2005.77(3).
 18. Hoshino K, Isawa K, Tsuda Y, Kobayashi M. Laboratory colonization of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera:Culicidae) collected in Narita, Japan and biological properties of the establish colony. *Jpn.J.Infect.Dis*. 2010.63:401-404.
 19. Price DP, Nagarajan V, Churbanov A, Houde P, Milligan B. The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquitoes *Aedes aegypti*, pre- and post-blood meal. *PloS One*. 2011.6(7):e22573.