

Kertas Cadangan Penyelidikan

1. Tajuk kajian

Penilaian Bersepadu Kerintangan Insektisid dalam *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* Menggunakan Asai Biokimia dan Analisis Molekul di Hulu Langat, Selangor.

2. Pengenalan

Pada tahun 2024, secara kumulatif, kes kumulatif denggi di Malaysia adalah sebanyak 122,423 kes dengan 117 kematian, berbanding 123,133 kes dan 100 kematian pada tahun 2023. Setiap tahun, kes denggi di Malaysia telah mencatatkan jumlah kes jangkitan yang tidak menentu, di mana terdapat laporan kes denggi yang amat tinggi pada tahun tertentu, sementara tahun yang lain mencatatkan kes jangkitan yang amat rendah. Peningkatan dan penurunan kes kumulatif tahunan ini sememangnya berlaku akibat dipengaruhi oleh faktor, seperti iklim, cuaca, urbanisasi, mobiliti populasi, demografi dan banyak lagi.

Terdapat banyak teknik dalam mengawal nyamuk ini, terutamanya pengurusan alam sekitar, kawalan kimia dan biologi serta perlindungan diri melalui kaedah kawalan kimia (Rajendran et al. 2021). Ini termasuk penggunaan racun serangga dalam beberapa bentuk seperti racun larva, semburan sisa, kelambu yang telah dicampur racun serangga dan produk perlindungan peribadi. Walau bagaimanapun, penggunaan racun serangga yang tidak sistematik telah mengakibatkan kerintangan nyamuk terhadap racun serangga yang digunakan. Rintangan racun serangga dalam vektor serangga melibatkan empat mekanisme iaitu, ketidakpekaan tapak sasaran, rintangan berasaskan metabolik, penyesuaian fisiologi dan perubahan pada tingkah laku (Rajendran et al. 2021). Mekanisme terbaik bagi menentukan kerintangan *Ae. aegypti* terhadap racun serangga adalah dengan melibatkan mutasi pada tapak sasaran saluran natrium berpagar voltan (VGSC), iaitu tapak sasaran bagi piretroid dan Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT) serta detoksifikasi metabolik (Badolo et al. 2019).

Beberapa kajian terdahulu menyatakan bahawa *Ae. aegypti* di Johor, Melaka dan Selangor telah rintang terhadap permethrin (Rasli et al. 2017), manakala *Ae. albopictus* di Sabah tahan terhadap malathion, temephos dan DDT (Elia-Amira et al. 2018). Kedua-dua spesies *Aedes* telah membangunkan kerintangan terhadap permethrin, lambda-cyhalothrin, DDT, malathion dan propoxur di kawasan panas denggi di Kuala Lumpur dan Selangor (Ahmad et al. 2020). Kajian ke atas larva *Aedes* juga telah merekodkan kerintangannya terhadap racun temephos. Berdasarkan (Othman et al. 2023), kerintangan nyamuk *Aedes* terhadap temephos di Malaysia pernah direkodkan oleh beberapa kajian terdahulu, di mana hasil bagi kajian mendapati sebahagian besar populasi nyamuk *Aedes aegypti* menunjukkan kerintangan terhadap temephos pada dos diagnostik (0.012 mg/L) dan/atau dos operasi (1 mg/L) (Chen et al. 2005, 2013; Ishak et al. 2015; Leong et al. 2018; Loke et al. 2010; Rasli et al. 2021). Bagi spesies *Ae. albopictus*, beberapa darjah rintangan temephos dikesan dalam kalangan populasi dari kawasan denggi di Kuala Lumpur, Selangor dan Pulau Pinang (Chen et al. 2005, 2013; Ishak et al. 2015; Rasli et al. 2021).

Kajian perkembangan rintangan vektor terhadap insektisid telah dibincangkan sejak sekian lama. Namun, sesetengah kajian hanya mengendalikan ujian perubahan tapak enzim sahaja tanpa mengambil kira ujian molekul untuk mengenal pasti mutasi pada tapak sasaran tertentu sebagai kaedah sokongan dalam mengesahkan kerintangan. Atas faktor denggi yang dinamik dan kompleks, kebarangkalian wujud percanggahan keputusan kerintangan jika digabungkan dua kaedah utama ini masih menjadi perbincangan yang perlu diambil perhatian. Dalam erti kata lain, seekor nyamuk *Aedes* berkemungkinan tidak menunjukkan perubahan

pada bacaan enzim setelah diuji dengan asai biokimia, tetapi telah dikenal pasti berlaku mutasi pada tapak sasaran yang spesifik, seterusnya memberi dapatan kajian yang kurang tepat bagi membantu usaha mengawal vektor. Oleh sebab itu, kajian ini akan dijalankan untuk menentukan tahap kerintangan nyamuk *Aedes* terhadap insektisid utama yang digunakan dalam kawalan vektor di Malaysia. Pendekatan untuk menentukan kerintangan adalah dengan memerhati perubahan aktiviti enzim vektor melalui kaedah asai biokimia, seperti yang dicadangkan oleh Hemingway & Brogdon 1998 serta menentukan perubahan pada tapak mutasi nyamuk dengan menguji secara molekul melalui kaedah Tindak Balas Berantai Polimerase (PCR).

3. Kepentingan kajian

Kajian akan dikendalikan di sebuah kawasan perumahan baharu di Hulu Langat, dengan jangkaan peningkatan kepadatan penduduk di kawasan tersebut. Peningkatan kepadatan penduduk ini berkait rapat dengan pembangunan di negeri Selangor, termasuk di Hulu Langat yang semakin pesat bagi menampung jumlah penduduk yang semakin meningkat dari semasa ke semasa. Kajian ini berpotensi mampu membantu menambah dapatan kajian kerintangan vektor terhadap insektisid di negeri Selangor, dalam masa yang sama menggalakkan usaha kerjasama antara agensi kerajaan dan industri melalui kajian dan pembangunan insektisid baharu yang lebih efektif dalam mengawal populasi vektor denggi.

4. Persoalan kajian

- i. Adakah terdapat sebarang perubahan pada tapak enzim nyamuk *Aedes* setelah diuji dengan asai biokimia dan molekul?
- ii. Adakah nyamuk *Aedes* yang telah rintang secara perubahan enzim ini juga mengalami mutasi pada tapak sasarannya?
- iii. Bagaimanakah faktor persekitaran dan ketinggian bangunan mempengaruhi corak kerintangan di lokasi yang berbeza?

5. Objektif kajian

- i. Menentukan tahap kerintangan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* terhadap insektisid di lokasi terpilih menggunakan kaedah asai biokimia
- ii. Menentukan perubahan pada tapak mutasi pada nyamuk *Aedes* setelah diuji secara asai biokimia.
- iii. Menilai hubungan antara tahap kerintangan larva dengan profil biokimia dan faktor ekologi habitat pembiakan.

6. Hipotesis

- i. Ho: Ketinggian perumahan dijangka tidak memberi kesan langsung terhadap taburan kerintangan. Nyamuk mampu hinggap pada pakaian manusia bagi memudahkannya bergerak dengan lebih jauh.
- ii. Ha: Nyamuk *Aedes* akan menunjukkan kerintangan yang lebih ketara, terutamanya pada aras yang lebih rendah. Nyamuk pada aras rendah dipercayai lebih terdedah dengan semburan *fogging* yang lebih tertumpu pada aras tanah sesuatu bangunan.

7. Jangkaan hasil

Kajian ini dijangka mendapati bahawa spesies *Aedes aegypti* akan dijumpai lebih banyak berbanding spesies *Aedes albopictus* atas sebab perilakunya yang lebih cenderung untuk bertelur pada tapak pembiakan buatan manusia. Setelah diuji menggunakan asai biokimia, nyamuk *Aedes* ini akan menunjukkan perubahan pada enzim sebagai tanda rintangan metabolik

terhadap insektisid. Dapatan ini akan disokong oleh pendekatan secara molekul, di mana nyamuk *Aedes* yang telah rintang secara metabolik ini turut dikesan telah mengalami mutasi pada tapak sasaran. Hasil kajian juga akan melihat taburan kerintangan *Aedes* yang semakin berkurang terutamanya di aras tingkat yang lebih tinggi kerana dipengaruhi oleh faktor ketinggian. Nyamuk *Aedes* di aras bawah kebiasaannya lebih terdedah dengan insektisid semasa aktiviti fogging nyamuk.

8. Metodologi

i. Persampelan nyamuk

Larva nyamuk *Aedes* dewasa akan disampel di dalam kawasan perumahan untuk diuji dengan ujian insektisid menggunakan ovitrap. Ovitrap diperbuat daripada bekas ringkas yang terdiri daripada bekas plastik berwarna hitam, diisi dengan 250ml air infusi jerami bagi mendapatkan kesan yang lebih semula jadi bagi tapak biakan. Sebatang kayu nipis akan direndamkan ke dalam ovitrap secara menegak bagi menyediakan permukaan yang sesuai untuk oviposisi. Semua larva yang terdapat dalam ovitrap akan diambil dan dikira. Larva *Aedes* yang menetas daripada telur akan dibiarkan membesar sehingga mencapai peringkat instar ketiga atau keempat sebelum identifikasi spesies dibuat. Mana-mana larva yang tidak dapat dikenal pasti semasa peringkat larva akan dibiarkan untuk membesar sehingga dewasa. Menggunakan kaedah pemeliharaan standard, nyamuk ditenak di bawah keadaan makmal pada 25°C dan 65±20% RH. Sepanjang tempoh kajian, semua data jumlah hujan, min suhu dan min kelembapan relatif bagi kawasan Hulu Langat akan diambil kira dan diperolehi daripada Jabatan Meteorologi Malaysia.

ii. Asai biokimia

Asai biokimia dilakukan untuk mengesan rintangan racun serangga dalam *Ae. Aegypti* dan *Ae. albopictus* dengan mengkaji aktiviti enzim nyamuk. Protokol asai biokimia akan dilakukan mengikut yang telah ditetapkan oleh WHO, dengan sedikit pengubahsuaian pada masa inkubasi, kepekatan reagen dan jumlah homogenat. Nyamuk dewasa daripada enam perumahan berbeza di Selangor telah diuji secara individu terhadap Mixed Function Oxidase (MFO) dan Glutathione S-transferase (GST). Secara ringkas, nyamuk betina berusia tiga hingga lima hari dihomogenkan secara individu dalam 200 µL air suling. Untuk mengelakkan enzim degradasi, penyediaan homogenat nyamuk akan dilakukan di atas ais. Kemudian, 25 µL homogenat dipipet untuk ujian enzim. Baki homogenat telah disentrifugasi pada 14,000 × rpm pada 4 ° C selama satu minit, dan supernatan digunakan sebagai sumber enzim untuk semua ujian enzim lain. Secara keseluruhan, 94 nyamuk betina dari setiap tapak akan diuji. Semua ujian dijalankan dalam pendua menggunakan plat mikro 96-telaga. Penyerapan [nilai ketumpatan optik (OD)] diukur menggunakan pembaca plat mikrotiter Infinite M200Pro (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland). Ujian bagi setiap enzim dan aktiviti enzimatik akan dikira dan dimuatkan ke dalam mesin spectrophotometer pada Panjang gelombang 450nm untuk diperhatikan.

iii. Ujian Tindak Balas Berantai Polimerase (PCR)

Untuk menentukan hubungan mutasi F1534C, V1016G, dan S989P dengan rintangan terhadap organoklorin dan piretroid, bahagian kepala-toraks nyamuk yang positif denggi NS1 akan dianalisis dengan menggunakan AS-PCR. Untuk penjenisan genotip alel kdr pada residu S989 dan V1016, ujian PCR spesifik alel yang berasingan telah direka kerana PCR sedia ada yang dibangunkan oleh Li et al. sering menunjukkan alel nol. Proses PCR akan dijalankan menggunakan campuran reaksi siap DreamTaq® Hot Start DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). Syarat kitaran termal PCR adalah

seperti berikut: denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 3 minit, diikuti oleh 20 kitaran dengan setiap kitaran melibatkan denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 saat, penyatuan selama 30 saat pada suhu dari 65 °C hingga 45 °C dengan penurunan 1 °C setiap kitaran, dan pemanjangan pada suhu 72 °C selama 60 saat. Dalam 15 kitaran seterusnya, syarat kitaran adalah serupa kecuali suhu penyatuan dikekalkan pada 45 °C. Proses ini diakhiri dengan langkah pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 10 minit. Ujian kerintangan menggunakan pendekatan molekul boleh membantu dalam memilih racun serangga alternatif yang terbaik, mengetahui rintangan silang-corak serangan yang dikaitkan dengan beberapa alel rintangan yang boleh memetabolismekan racun serangga daripada pelbagai keluarga yang tidak berkaitan (Kushwah et al. 2020; Leong et al. 2019).

9. Garis masa kajian

Kajian ini dijangka disiapkan dalam tempoh 12 hingga 24 bulan, merangkumi fasa kajian literatur dan pengumpulan data, kerja lapangan dan analisis makmal, analisis data bersepadu, serta penulisan dan penyebaran hasil kajian.

Aktiviti	Tempoh masa
Perbincangan dan penyediaan proposal kajian.	3 bulan
Persampelan nyamuk di kawasan perumahan bertingkat di daerah Hulu Langat menggunakan perangkap lekit. Sampel dikutip selepas 7 hari dan diganti dengan perangkap yang baharu.	6 bulan
Kajian morfologi bagi menentukan spesies nyamuk yang disampel.	4 bulan
Nyamuk yang telah selesai melalui penentuan morfologi akan diuji secara asai biokimia terhadap empat jenis insektisid utama.	5 bulan
Nyamuk yang telah disahkan rintang terhadap insektisid melalui perubahan tapak enzim akan melalui kaedah ujian Tindak Balas Polimerase Berantai (PCR) untuk mengesahkan kerintangannya melalui perubahan pada tapak mutasi.	6 bulan

10. Rujukan

Ishak, I.H., Jaal, Z., Ranson, H. & Wondji, C.S. 2015. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & Vectors* 8(1): 181.

Lau, S.-M., Vythilingam, I., Doss, J., Sekaran, S., Chua, T., Wan Sulaiman, W., Chinna, K., Lim, Y. & Venugopalan, B. 2015. Surveillance of adult *Aedes* mosquitoes in Selangor, Malaysia. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 20: 1271–1280.

Leong, C.S., Vythilingam, I., Liew, J., Wong, M.L., Wan Sulaiman, W. & Lau, Y.-L. 2019. Enzymatic and molecular characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* from Selangor, Malaysia. *Parasites & Vectors* 12: 236–253.

Rasli, R., Cheong, Y.L., Ibrahim, M., Fikri, S.F., Norzali, R., Nazarudin, N., Hamdan, N., Asuad, M., Hafisool, A., Azmi, R.A., Ismail, H., Ali, R., A. Hamid, N., Taib, M., Omar, T., Wasi Ahmad,

N. & Hanlim, L. 2021. Insecticide resistance in dengue vectors from hotspots in Selangor, Malaysia. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15: e0009205.

Roslan, M., Ngui, R., Vythilingam, I., Chan, K., Ong, P., Low, C., Muhammed, N. & Wan Sulaiman, W. 2022. Surveillance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in high-rise apartment buildings in Selangor, Malaysia. *International Journal of Tropical Insect Science* 42: 1959–1969.

Ahmad, N., Othman, W. N., Wasi Ahmad, N., Noramiza, S., Shafa'ar-Ko'ohar, S., Azirol-Hisham, A., Nor-Hafizah, R., et al. 2010. Vertical dispersal of *Aedes* (Stegomyia) spp. in high-rise apartments in Putrajaya, Malaysia. *Tropical biomedicine* 27: 662–667.