



50th
Anniversary
1964 - 2014
Golden
Jubilee

MALAYSIAN SOCIETY
OF PARASITOLOGY
AND TROPICAL MEDICINE

ACTMP 2014

5-7 March 2014

Intercontinental Hotel Kuala Lumpur

6th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology

**GLOBAL CHALLENGES
IN TROPICAL DISEASES:**

Bridging Gaps and Building Partnerships

Programme Book



ACTMP 2014

Certificate of Appreciation

This is to certify that
CHAIRIL ANWAR

an Oral Abstract

has presented

at the

**6th ASEAN Congress of
Tropical Medicine and Parasitology**

"Bridging Gaps and Building Partnerships"

5-7 March 2014 Intercontinental Hotel Kuala Lumpur

Indra Vythilingam
Chairperson
Golden Jubilee of MSPTM
6th ACTMP 2014

Reuben Sharma
President
MSPTM

O1.14	Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotype vii isolated from Perak between 1999-2012 <i>Syamsiah Aini (Malaysia)</i>	12.55-13.05
Ballroom 1, Junior Ballroom 1 & Foyer Level 2	Lunch Break	13.00-14.00
Ballroom 2 & 3	Key Note Address - Paul Tambyah (Singapore) Emerging Infectious Diseases in Southeast Asia <i>Chairman: Indra Vythilingam</i>	14.00-14.45
Ballroom 2 & 3	Symposium Sigma-Tau Advancing And Optimizing Treatment For <i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i> Uncomplicated Malaria: Which Role For Eurartesim® (DHA-PQP) Chairman: Nicholas J White, Francois Nosten	Time
S4.1	From Abele Sola to Ho Chi Minh: Malaria historical references & treatment <i>Marco Corsi (Italy)</i>	14.45-15.00
S4.2	Resistance to artemisinins and/or to the partner drugs: Update and what if it will spread <i>Nicholas J White (Thailand)</i>	15.00-15.15
S4.3	DHA-PQP in combination with primaquine for vivax malaria radical treatment <i>Kevin Baird, (Indonesia)</i>	15.15-15.30
S4.4	Can the efficacy of DHA-PQP be increased in children ? <i>Francois Nosten (Thailand)</i>	15.30-15.45
S4.5	The role of the MMV-Sigma Tau partnership in developing eurartesim as a quality act for malaria endemic countries <i>George Jagoe (Switzerland)</i>	13.45-16.15
Level 2, Foyer	Tea Break	16.15-16.45
Orchid & Dahlia	Symposium Omics in Parasitology Chairman: Patricia Lim, Wan Kiew Lan	Time
S5.1	Metagenomic approach to identify tick-borne pathogens by using ultra high throughput DNA sequencing and data analyzing technologies <i>Chihiro Sugimoto (Japan)</i>	14.45-15.15
S5.2	Metabonomics: Concept and application in parasitology <i>Ivan Yap Kok Seng (Malaysia)</i>	15.15-15.45
S5.3	Discovery of novel targets for coccidiosis control via transcriptome analysis <i>Kiew-Lian Wan (Malaysia)</i>	15.45-16.15
Level 2, Foyer	Tea Break	16.15-16.45
Junior Ballroom 1	Symposium Vector Control and Insecticide Resistance Chairman: Lee Han Lim, Ridad Agoes	14.45-16.15
S6.1	Urban pests revisited – What comes next <i>Ridad Agoes (Indonesia)</i>	14.45-15.05
S6.2	Field evaluation of DEET and picaridin repellents reveals differences in repellent sensitivity between Southeast Asian vectors of malaria and arboviruses <i>Durnez Lies (Belgium)</i>	15.05-15.15
S6.3	Studies on <i>kdr</i> mutations associated with insecticide resistance in <i>Aedes aegypti</i> in Singapore <i>Koou Sin Ying (Singapore)</i>	15.15-15.25
S6.4	The detection of insecticide synthetic pyrethroid resistance on dengue vector, <i>Aedes aegypti</i> in Palembang, using polymerase chain reaction technique <i>Chairil Anwar (Indonesia)</i>	15.25-15.35
S6.5	Larvicidal efficacy of the methanolic extracts of <i>Allium sativum</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> and <i>Murraya koenigii</i> against <i>Aedes albopictus</i> <i>Ho Lai Yee (Malaysia)</i>	15.35-15.45
S6.6	Residual larvicidal activity of fenitrothion (sumithion® 50 Ec) against <i>Aedes aegypti</i> (L.) and <i>Culex quinquefasciatus</i> Say applied using a compression sprayer, Jacto® hd400 <i>Chandru Angamuthu (Malaysia)</i>	15.45-15.55
S6.7	Effect of the seaweed extracts towards the larvicidal activity, growth, and development of <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> (Diptera: Culicidae) <i>Yu KeXin (Malaysia)</i>	15.55-16.05
S6.8	Reception of visual stimuli: effects of ipomoea plant extract on <i>Culex quinquefasciatus</i> Say gravid females in choosing oviposition site <i>Wan Fatma Zuharah (Malaysia)</i>	16.05-16.15
Level 2, Foyer	Tea Break	16.15-16.45
Junior Ballroom 2	Extended Parasitology and Entomology II Chairman: Rohela Mahmud, Praphathip Eamsobhana	14.45-16.15

ACTMP 2014 Local Organizing Committee

Advisors	CP Ramachandran Joon Wah, Mak Inder Singh
Chairperson	Indra Vythilingam, University of Malaya
Co- Chairperson	Reuben Sharma, Universiti Putra Malaysia
Secretary	Adela I Jiram, Institute for Medical Research
Scientific Programme	Indra Vythilingam, University of Malaya
Finance	Kiew Lian, Wan, Universiti Kebangsaan Malaysia
Publicity	Stephen Ambu, International Medical University
Exhibition	Rahmah Noordin, Universiti Sains Malaysia
Technical	Mun Yik Fong, University Malaya
Publication	Nazni Wasi Ahmad, Institute for Medical Research
Protocol	Yvonne Ai Lian, Lim, University of Malaya
Social Programme	Chandrawathani P. Veterinary Research Institute

ACTMP 2014 International Scientific Advisory Committee

- **Agoes, Ridad** (*Indonesia*)
Padjadjaran University
- **Akira Ito** (*Japan*)
Asahikawa University
- **BK Tyagi** (*India*)
Centre for Research in Medical Entomology
- **Bouasy Hongvanthong** (*Lao PDR*)
Center for Malariology, Parasitology and Entomology
- **Coosemans, Marc** (*Belgium*)
Institute of Tropical Medicine
- **Drake, Chris** (*United Kingdom*)
London School of Hygiene and Tropical Medicine
- **Eamsobhana, Praphathip** (*Thailand*)
Mahidol University
- **Ooi Hong Kean** (*Taiwan*)
National Chung Hsing University
- **Leonardo, Lydia R** (*Philippines*)
College of Public Health, University Philippines
- **Lee-Ching, Ng** (*Singapore*)
Environmental Health Institute
- **Mohammad, Bagher Rokni** (*Iran*)
Tehran University of Medical Sciences
- **Shin-Ichiro Kawazu** (*Japan*)
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
- **Thang, Ngo Duc** (*Vietnam*)
National Institute of Malariology, Parasitology and Entomology
- **Tho Sochantha** (*Cambodia*)
National Center for Parasitology, Entomology and Malaria Control
- **Thompson, Andrew** (*Australia*)
Murdoch University
- **W. Abeyewickreme** (*Sri Lanka*)
University of Kelaniya
- **Yazdanbakhsh, Maria** (*The Netherlands*)
University of Leiden
- **Zhou, Xiao-Nong** (*China*)
National Institute of Parasitic Diseases

DETEKSI RESISTENSI INSEKTISIDA SINTETIK PIRETROID PADA VEKTOR DENGUE, *Aedes aegypti* PALEMBANG MENGGUNAKAN POLYMERASE CHAIN REACTION

Ahmad Ghiffari¹, Humairo Fatimi², Chairil Anwar^{1*}

¹ Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Jl. Moh Ali Km 3,5; 30126 Palembang

² Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang, Jl. Inspektur Yazid no.2 Km 2,5; 30126 Palembang

Abstrak. *Aedes aegypti* merupakan vektor dari berbagai patogen, termasuk diantaranya virus *dengue fever*. Sebanyak 500 ribu kasus baru demam berdarah dengue (DBD) terjadi tiap tahunnya di seluruh dunia. Pengendalian nyamuk vektor merupakan cara efektif memutus rantai penularan DBD. Namun penggunaan satu jenis insektisida secara intensif dalam waktu lama terbukti menyebabkan resistensi. Resistensi *Ae.aegypti* terhadap insektisida awalnya terjadi pada *dichloro diphenyl trichloroetane* (DDT), lalu terhadap temefos kemudian sintetik piretroid. Tiga cara mendeteksi resistensi sintetik piretroid menurut WHO yaitu bioassay, biokimia dan molekuler. Deteksi biokimia yang pernah dilakukan di Palembang menunjukkan hasil negatif, tetapi kenyataan *incidence rate* DBD belum turun. Penelitian lebih lanjut menggunakan deteksi molekuler diperlukan untuk mengetahui mekanisme resistensi insektisida. Deteksi molekuler dapat mendeteksi mutasi pada gen enzim metabolisme dan gen target site insektisida, semisal pada *voltage gated sodium channel* (VGSC). Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi mutasi titik gen VGSC *Val1016Ile* dan *Val1016Gly* *Aedes aegypti*. Desain penelitian ini adalah berupa deskriptif laboratoris dengan uji molekuler. Populasi adalah seluruh larva instar III-IV *Ae. aegypti* yang berasal dari pembiakan telur yang diperoleh dari kelurahan-kelurahan di Kecamatan Bukit Kecil, Sukarami dan Ilir Timur I kota Palembang. Identifikasi larva dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Palembang dan uji molekuler dilakukan di Departemen Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Muhammad Hoesin Palembang dan BBLK Palembang. Hasil penelitian menunjukkan terjadi mutasi titik *Val1016Ile* serta tidak terjadi mutasi titik *Val1016Gly* gen VGSC. Disimpulkan terjadi mutasi titik *Val1016Ile* gen VGSC *Ae.aegypti* sebagai penanda resistensi yang bersifat *target site* atas sintetik piretroid di Palembang.

Kata Kunci: *Aedes aegypti*, resistensi insektisida, mutasi titik, *target site*, *Val1016Ile*

*Alamat Korespondensi: Chairil Anwar, Ph.D, Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Jl. Moh Ali Km.3,5; 30126 Palembang, E-Mail: chairil53@yahoo.co.id

THE DETECTION OF INSECTICIDE SYNTHETIC PYRETHROID RESISTANCE ON DENGUE VECTOR, *Aedes aegypti* IN PALEMBANG USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Ahmad Ghiffari¹, Humairo Fatimi², Chairil Anwar^{1*}

¹ Parasitology Department, Faculty of Medicine, Sriwijaya University, Jl. Moh Ali Km.3,5; 30126, Palembang

² Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang, , Jl. Inspektur Yazid no.2 Km 2,5; 30126, Palembang

Abstract: *Aedes aegypti* is a vector of several pathogens including dengue fever/dengue hemorrhagic fever virus. Five hundred thousand dengue haemorrhagic fever new cases occur every year throughout the world. Vector control is an effective way to break the transmission; unfortunately constant insecticide ultimately caused resistance. Insecticides resistance in *Ae.aegypti* was first discovered on trichloroetane

diphenyl dichloro (DDT), followed by temephos and synthetic pyrethroid. Three detection ways according to WHO procedure are bioassay, biochemistry and molecular. The biochemical detection that conducted previously in Palembang were turned out negative, nevertheless incidence rate has not yet decreased. Molecular detection is needed to determine the mechanisms of insecticide resistance. Molecular detection can detect gene mutations in the metabolic enzyme and target site insecticides, such as the voltage gated sodium channel (VGSC). The purpose of research was to identify the Val1016Ile and Val1016Gly point mutation in the VGSC gene of Ae.aegypti in Palembang. Population were all 3rd and 4th instar larvae of Ae.aegypti derived from breeding eggs obtained from villages of Bukit Kecil, Ilir timur I and Sukarami sub distric. Identification took place in BBLK Palembang while molecular test took place both in BBLK Palembang and Clinical Microbiology Department of Muhammad Hoesin Hospital Palembang. Results showed that there has been Val1016Ile point mutation and there is no Val1016Gly point mutation of voltage gated sodium channel gene. It can be concluded that there has been Val1016Ile point mutation in the voltage gated sodium channel gene of Ae.aegypti as the marker of synthetic pyrethroid insecticides resistance in Palembang.

Keywords: Aedes aegypti, synthetic pyrethroid resistance, point mutation VGSC, target site, Val1016Ile

*Address of correspondence: Chairil Anwar, Ph.D, Parasitology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University, Jl. Moh Ali Km.3,5; 30126 Palembang. E-Mail: chairil53@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Aedes aegypti merupakan vektor dari berbagai patogen, termasuk diantaranya virus dengue. Penyakit hiperendemis di Asia Tenggara ini berakibat fatal dengan bentuk yang paling berbahaya berupa *dengue shock syndrome* (DSS) pada anak-anak. Diperkirakan lebih kurang 2,5 milyar orang beresiko terinfeksi dengan kasus demam berdarah per tahunnya¹. Pada tahun 2011, total kasus DBD di seluruh provinsi di Indonesia mencapai 26.015, dengan jumlah kematian sebanyak 389 orang (CFR=1,53%), dan di kota Palembang incidence rate tercatat sebesar 49,68%. Dengan 3 tempat kasus terbanyak terjadi di kecamatan Ilir Timur I (IR=90,77%), kecamatan Bukit Kecil (IR= 79,89%) dan kecamatan Sukarami (68,31)².

Sampai saat ini obat untuk pengobatan DBD maupun vaksin untuk mencegahnya belum ditemukan dan pengendalian vektor merupakan cara untuk memutus rantai penularannya. Upaya penanggulangan DBD telah dilakukan dengan penggunaan insektisida melalui teknik *fogging*, abatisasi serta pemberantasan sarang nyamuk (PSN), tetapi incidence rate beberapa tahun terakhir ini tetap sulit diturunkan dan bahkan telah terjadi beberapa kejadian luar biasa³. Peningkatan kasus DBD tersebut dapat terjadi akibat penggunaan satu jenis insektisida secara intensif dalam waktu lama atau terus menerus untuk mengontrol nyamuk vektor DBD yang pada akhirnya menyebabkan resistensi vektor⁴. Resistensi insektisida pada *Aedes aegypti* mudah terjadi dan meluas di seluruh dunia. Bermula terhadap dichloro diphenyl trichloroetane (DDT) di Karibia pada tahun 1955⁵ dan Thailand⁴. Resistensi juga terjadi pada sintetik piretroid di Brazil⁶, Thailand⁷ dan Indonesia⁸.

Tiga cara mendeteksi resistensi sintetik piretroid menurut WHO yaitu bioassay, biokimia dan molekuler. Mekanisme deteksi biokimia ialah dengan mendeteksi peningkatan kadar enzim yang mendetoksifikasi insektisida (resistensi metabolik). Enzim-enzim yang sering digunakan sebagai penanda perubahan antara lain cytochrome P450 monooxygenases (P450s)⁹, glutathione S-transferases (GSTs)¹⁰ dan carboxy/cholinesterases (CCEs)¹¹. 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 tersebut¹³ mendeteksi resistensi sintetis piretroid pada *Ae.aegypti* dengan cara menemukan mutasi titik gen *voltage-gated sodium channel* VGSC sebagai target site tempat kerja insektisida (resistensi target).

Di Palembang didapatkan kontroversi hasil uji biokimia deteksi resistensi *Ae.aegypti* terhadap insektisida sintetis piretroid dengan tingkat kejadian DBD yang cukup tinggi¹⁴. Hasil penelitian menyatakan belum terjadi peningkatan kadar enzim pendetoksifikasi insektisida yang menetralkan insektisida sintetis piretroid. Resistensi target dicurigai sebagai mekanisme resistensi insektisida yang terjadi, karenanya perlu dilakukan penelitian molekuler untuk mendeteksi mutasi gen (VGSC) tersebut dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) pada *Ae.aegypti* di Palembang sebagai pembuktian.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pengambilan sampel dilakukan di tiga kelurahan Palembang yang memiliki *incidence rate* 2012 DBD tinggi yaitu Sukarame, Bukit Kecil dan Ilir Timur I. Tempat identifikasi mikroskopis pada Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang (BBLK), sementara tempat Identifikasi Molekuler dilakukan di BBLK dan Departemen Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Muhammad Hoesin Palembang. Bahan. Alat yang digunakan dalam memperoleh larva berupa Ovitrapp (penangkap larva nyamuk); Rearing (alat pemeliharaan larva).

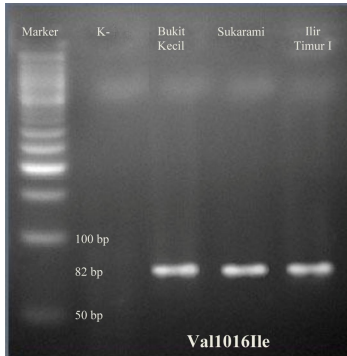
Metode biomolekuler yang digunakan adalah sebagai berikut:

- Total DNA diisolasi menggunakan metode *Promega Wizard Purification*¹⁵ berdasarkan protokol penyelia. 'Masukkan 600 μ l nuclei lysis solution dalam tabung 1,5 ml, dinginkan. Tambahkan 10-20 mg (\pm 20 ekor) larva. Homogenkan selama 10 detik. Tambahkan 17,5 μ l protein kinase K ke dalam campuran. Selanjutnya diinkubasi selama 15-30 menit dalam suhu 65⁰C. Tambahkan 3 μ l RNAase solution, homogenkan. Diinkubasi 30 menit 37⁰C. Diamkan pada suhu ruangan selama 5 menit. Tambahkan 200 μ l protein precipitation solution. Vorteks selama 20 detik. Dinginkan sampel pada es selama 5 menit. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 4 menit. Sementara itu, siapkan 600 μ l isopropanol ke dalam tabung 1,5 ml baru. Pindahkan supernatan ke dalam tabung yang telah diisi isopropanol tersebut. Aduk perlahan sampai terbentuk benang putih. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Buang supernatan, kemudian tambahkan etanol 70% pada suhu ruang. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Hisap etanol pakai mikropipet, sisa etanol menggunakan kertas saring. Keringkan pelet dalam suhu ruangan selama 10-15 menit. Larutkan pelet DNA dengan 100 μ l DNA dehydration solution. Inkubasi sampel pada suhu 65⁰C selama 1 jam (atau 40⁰C selama 24 jam)'.
- Fragment gen diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer Ile1016r/ Val1016f/ Ile1016f/ Gly1016r/ Val1016f/ Gly1016f. Kondisi PCR terdiri dari tahap Denaturasi Awal selama 12 menit pada 95⁰C dan tahap 39 siklus Denaturasi selama 20 detik pada 95⁰C, *annealing* 60 detik pada 60⁰C, dan elongation 30 detik 72⁰C, tahap terakhir Tahap Ekstensi Tambahan 5 menit pada 72⁰C.
- Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada agarose 2% gel Tris/Borate/Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (TBE buffer, 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA). Gels di-*running* selama 90 menit pada 80 volt, dan dievaluasi dibawah sinar UV (300 nm). Sampel yang mengandung produk PCR berada pada berat basa masing-masing 82 dan 60 bp. Master mix terdiri dari 5 μ l DNA template, 24 μ l ddH₂O, Go Taq 10

uL dan masing-masing 1 uL primer Ile1016r/ Val1016f/ Ile1016f/ Gly1016r/ Val1016f/ Gly1016f.

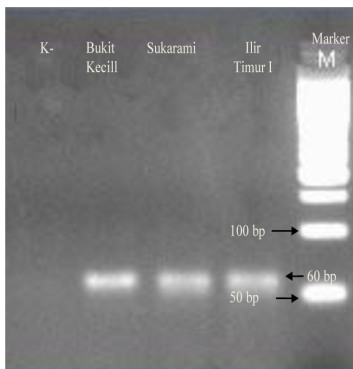
HASIL

Deteksi mutasi diukur dengan menggunakan alat biomolekuler dengan hasil akhir pengoperasian alat berupa tampilan pita (berat basa) pada elektroforesis.



Keterangan Gambar 1:

- Tulisan Horizontal pada bagian atas yaitu: Bukit Kecil, Sukarami dan Ilir Timur I, menunjukkan nama tempat dimana sampel nyamuk diambil
- Tulisan 50 dan 100 bp menunjukkan berat pasangan basa; 82 bp adalah spesifik untuk berat pita mutan/nyamuk resisten
- Dari gambar di samping, terdapat satu pita (band) dengan berat basa 82

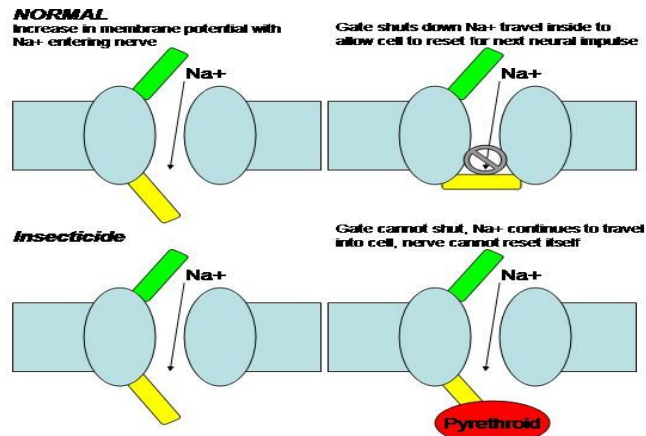


Keterangan Gambar 2:

- Tulisan Horizontal pada bagian atas yaitu: Bukit Kecil, Sukarami dan Ilir Timur I, menunjukkan nama tempat dimana sampel nyamuk diambil
- Tulisan 50 dan 100 bp menunjukkan berat pasangan basa; 60 bp adalah spesifik untuk berat pita wild/nyamuk suseptible;
- Dari gambar di samping, terdapat satu pita (band) dengan berat basa 60

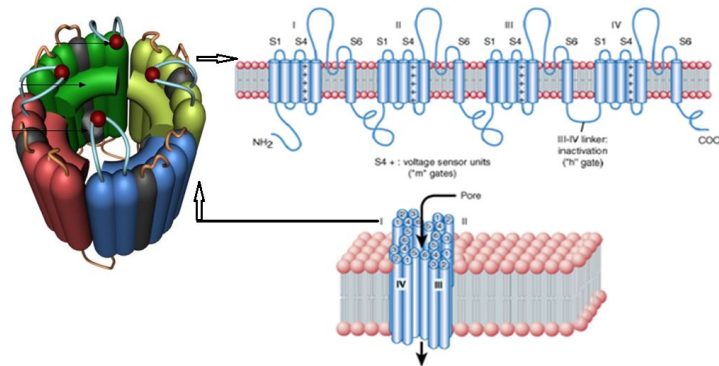
PEMBAHASAN

Mekanisme insektisida sintetik piretroid bekerja pada sistem syaraf serangga yaitu menghambat akson pada kanal ion sehingga terjadi aksi potensial yang terus menerus¹⁶. Sintetik piretroid mengikat protein *voltage-gated sodium channel* (VGSC) yang mengatur denyut impuls syaraf. Akibatnya impuls syaraf akan mengalami stimulasi secara terus menerus dan mengakibatkan serangga mengalami hipereksitasi (kegelisahan) dan konvulsi (kekejangan).



Gambar 3. Cara Kerja Sintetik Piretroid pada VGSC (Krischik VA, 2004)¹⁷

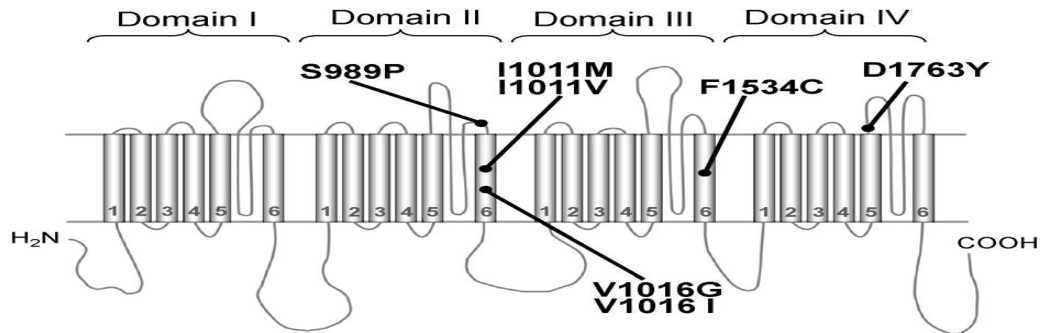
Deteksi resistensi insektisida sintetik piretroid secara uji molekuler diketahui melalui dua cara yaitu perubahan enzim detoksifikasi dan perubahan target site, *voltage-gated sodium channel* (VGSC). Deteksi enzim detoksifikasi yaitu deteksi mutasi titik gen yang menyebabkan peningkatan kadar enzim yang mendetoksifikasi insektisida (resistensi metabolik). Tiga enzim yang berhubungan dengan detoksifikasi insektisida antara lain cytochrome P450 monooxygenases (P450s)⁹, glutathione S-transferases (GSTs)¹⁰ dan carboxy/cholinesterases (CCEs)¹¹. Dan deteksi resistensi *target site*, gen VGSC. Mutasi VGSC pertama kali diidentifikasi pada L1014F domain II S6 gen VGSC *Musca domestica*, dimana kodon pengkode leusin disubstitusi oleh fenilalanin¹⁸. Deteksi mutasi yang sering diteliti pada *Aedes aegypti* adalah Val1016Ile, yaitu perubahan kodon pengkode valine menjadi isoleucine. Pada mutasi Val1016Ile terjadi transisi basa guanin dengan adenin pada susunan GTA menjadi ATA pada populasi *Ae.aegypti* di Brazil¹¹.



Gambar 4. Struktur Voltage-gated Sodium Channel (Shuyi LQ, 2004)¹⁹

Penelitian resistensi insektisida sintetik piretroid secara biomolekuler sebelumnya di Palembang²⁰ mendapatkan tidak adanya titik mutasi pada gen VGSC *Ae.aegypti*. Titik mutasi yang diperiksa saat itu adalah F1534C, yang tidak mengekspresikan gen mutasi sebagaimana yang terjadi pada *Ae.aegypti* Australia di Kepulauan Cayman²¹. Sampai saat ini telah ditemukan 26 titik mutasi yang berhubungan dengan resistensi VGSC namun pada titik yang berbeda pada masing-masing serangga, dan pada *Ae.aegypti* diketahui mutasi gen terjadi pada tujuh titik, yaitu:

(1). Ile1011Met; ATA pada kodon pengkode isoleusin berubah menjadi ATG (metionin)⁹; (2). Ile1011Val, ATA pada kodon pengkode isoleusin berubah menjadi GTA (valin)²²; (3). F1552C, TTC pada kodon pengkode fenil alanin berubah menjadi TGC (cysteine)²³; (4). F1534C, TTC pada kodon pengkode fenil alanin berubah menjadi TGC (cysteine)²¹; (5). Val1023Gly, kodon pengkode valine berubah menjadi glycine²⁴; (6). Val1016Gly, kodon pengkode valine berubah menjadi glycine.^{25,26}; (7). F1023C, TTC pada kodon pengkode fenilalanin berubah menjadi TGC (cysteine).²⁶



Gambar 5. Lokasi mutasi kdr pada *Ae. aegypti*²⁷.

Lanjutan penelitian resistensi insektisida secara biomolekuler di Palembang dilanjutkan dengan pengujian titik lainnya, yaitu Val1016Ile dan Val1016Gly. Pada mutasi Val1016Gly terjadi transisi basa timin dengan guanin pada susunan GTA menjadi GGA, sebagaimana didapatkan pada populasi di Thailand²⁶ dan Vietnam²⁴. Terjadinya titik mutasi pada gen Val1016Ile terlihat dengan adanya gambaran satu pita (band) dengan panjang 82 bp (resisten homozigot) atau dua pita dengan panjang 82 bp dan 102 bp (resisten heterozigot). Sementara *wild type* (suseptibel) akan tampak satu pita dengan panjang 102 bp. Sedangkan bila terjadi titik mutasi pada gen Val1016Gly terlihat dengan adanya gambaran satu pita dengan panjang 80 bp (resisten homozigot), atau dua pita dengan panjang 80 bp dan 60 bp (resisten heterozigot). Sementara *wild type* akan tampak satu pita dengan panjang 60 bp. Penelitian kali ini mendapatkan hasil temuan titik mutasi untuk gen Val1016Ile VGSC *Ae. aegypti* dan tidak ada titik mutasi untuk gen Val1016Gly.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian uji diagnostik molekuler ditemukan mutasi gen VGSC pada titik Val1016Ile; sebagai pembuktian mekanisme resistensi yang bersifat *target site* insektisida sintetik piretroid pada vektor Dengue, *Ae. aegypti* di Palembang.

SARAN

Penelitian molekuler memberikan alternatif uji diagnostik resistensi insektisida sintetik piretroid lanjutan, terutama pada daerah dengan kejadian DBD tinggi namun uji diagnostik biokimia yang negatif (masih suseptibel). Hasil penelitian dapat menjadi masukan bagi instansi kesehatan untuk pilihan kebijakan strategi pengendalian vektor.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO, 2011. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>
2. Dinkes Kota Palembang. 2012. Laporan Tahunan Dinas Kesehatan Kota Palembang, (<http://dinkes.palembang.go.id/tampung/dokumen/dokumen-56-57.pdf>, diakses tanggal 20 Oktober 2013).
3. Kementerian Kesehatan RI, Dirjen PP & PL. 2010. Peraturan Menteri Kesehatan RI tentang Pengendalian Vektor. Nomor: 374/Menkes/PER/III/2010.
4. Ponlawat, A., J.G. Scott, and L.C. Harrington. 2005. Insecticide Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Across Thailand. *J. Med. Entomol.* 42(5): 821-825.
5. WHO. 1992. Vector Resistance to Pesticides. *Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Bioogy and Control.*
6. Da Cunha, M.P., J.B.P. Lima, W.G. Brogdon, G.E. Moya, and D. Valle. 2005. 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.
7. Paeporn, P., P. Ya-umphan, and K. Supaphathom. 2002. Insecticide Susceptibility and Selection for Resistance in A Population of *Aedes aegypti* from Ratchaburi Province, Thailand. National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand.
8. Ahmad, I., S. Astari, and M. Tan. 2007. Resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in 2006 to Pyrethroid Insecticides in Indonesia and its Association with Oxidase and Esterase Level. *Pakistan J Biol Sci* 10 (20): 3688-3692.
9. Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in Drosophila. *Science* 297:2253-2256
10. Che Mendoza A, Penilla RP, Rodriguez DA, 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *African Journal of Biotechnology* 8 (8): 1386-1397.
11. Martins, A.J., R.M.M. de Andrade, J.G.B Linss, A.A. Peixoto., and D. Valle. 2009. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81(1): 108–115
12. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J, 2003. 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.
13. Saavedra-Rodriguez K, Strobe C, Soares AF, Salas IF, Ranson H, Hemingway J, Black WC, 2008. QTL mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 180:1137-1152.
14. Salim M, Ambarita LP, Yenni A, 2009. Efektivitas Malation dalam pengendalian vektor Demam Berdarah Dengue dan uji kerentanan larva *Aedes aegypti* terhadap Temefos di kota Palembang. Laporan Diseminasi Penelitian, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementrian Kesehatan RI, Baturaja.
15. Promega Wizard Purification. Available from: <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf> (diakses pada tanggal 13.12.2013)
16. Soderlund, D.M., and D.C. Knipple. 2003. The Molecular Biology of Knockdown Resistance to Pyrethroid Insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:563-577

17. Shuyi, LQ. 2004. Tetrodotoxin : Concepts of Ion Channels and Action Potential. Department of Chemistry Imperial College London (<http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/quek/chnact.htm>, diakses 9 Mei 2012).
18. Hollingworth RM dan Dong K, 2008. Biochemical and Molecular Basis of Resistance. In: Global Pesticide Resistance in Arthropods; Whalon ME, Sanchez DM, Hollingworth RM (eds). pp. 48-51
19. Shuyi, LQ. 2004. Tetrodotoxin : Concepts of Ion Channels and Action Potential. Department of Chemistry Imperial College London (<http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/quek/chnact.htm>, diakses 9 Mei 2012).
20. Ghiffari, A., H. Fatimi. 2011. Deteksi Mutasi Titik Gen *Sodium Voltage Gated Channel* Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* pada *Aedes aegypti* Resisten Sintetik Piretroid di Palembang. *Buletin Spirakel* ed.2 pp.17-24 <http://ejournal.litbang.depkes.go.id/index.php/spirakel/article/view/2967>
21. Harris, A.F., S. Rajatileka, and H. Ranson. 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 83(2): 277-284.
22. Yanola, J., P. Somboon, C. Walton, W. Nachaiwieng, and L. Prapanthadara. 2010. A Novel F1552/C1552 Point Mutation in The *Aedes aegypti* Voltage-Gated sodium Channel Gene Associated with Permethrin Resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96:127-131.
23. Yanola, J., P. Somboon, C. Walton, W. Nachaiwieng, P. Somwang, and L. Prapanthadara. 2011. High Throughput Assays for Detection of The F1534C Mutation in The Voltage Gated Sodium Channel Gene in Permethrin Resistant *Aedes aegypti* and The Distribution of This Mutation Throughout Thailand. *Tropical Medicine and International Health*, 16(4):501-509
24. Kawada, H., Y. Higa, and O. Komagata. 2009. Widespread Distribution of A Newly Found Point Mutation in Voltage-Gated Sodium Channel in Pyrethroid Resistant *Aedes aegypti* Populations in Vietnam. *PloS Neglected Tropical Diseases* 3, 5271-5277
25. Lima, E.P., Paiva M.H.S., de Araújo A.P., da Silva É.V.G., da Silva U.M., de Oliveira, A.E.G. Santana, C.N.Barbosa, C.C.P. Neto, M.O.F Goulart, C.S. Wilding, Ayres L.N., and Santos M.A.V.M.. 2008. Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* Populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors* 4(5):1-12.
26. Srisawat, R., N. Komalamisra, and Y. Eshita. 2010. Point Mutations in Domain II of the Voltage Gated Sodium Channel Gene in Deltamethrin Resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl. Entomol. Zool* 45, 275-282.
27. Kasai, S., L. Ching, S.G. Lam-Phua, C.S. Tang, K. Itokawa, O. Komagata, M. Kobayashi, and T. Tomita. 2011. First Detection of a Putative Knockdown Resistance Gene in Major Mosquito Vector, *Aedes albopictus*. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 217-221.