

Deteksi Gen Kdr pada Nyamuk *Anopheles* di Kabupaten Maluku Tenggara Barat

Detection of kdr gene in Anopheles Mosquitoes in West-Southeast Maluku Regency

Hanna S.I Kawulur*, Hotma Martogi Lorensi Hutapea, Ivon Ayomi, Melda Suebu, Mardi Raharjo Pardi

Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Papua
Jalan Ahmad Yani Nomor 48 Gurabesi Jayapura, Indonesia
*E_mail: hanna22papua@gmail.com

Received date: 23-03-2021, Revised date: 26-11-2021, Accepted date: 29-11-2021

ABSTRAK

Malaria masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia, terutama di Indonesia bagian timur. Penggunaan kelambu berinsektisida *long lasting insecticide net* (LLIN) adalah salah satu upaya untuk mengurangi angka kesakitan malaria dengan melindungi masyarakat dari gigitan vektor malaria. Nyamuk *Anopheles flavirostris*, *Anopheles barbirostris*, dan *Anopheles subpictus* adalah tiga dari beberapa spesies yang dilaporkan sebagai vektor malaria di Kabupaten Maluku Tenggara Barat. Tujuan penelitian adalah mendeteksi gen kdr pada nyamuk *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, dan *An. subpictus* yang dikoleksi dari Desa Alusi Kelaan Kabupaten Maluku Tenggara Barat. Penelitian dilakukan di Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua pada bulan Juni tahun 2016. Sebanyak 6 nyamuk *An. flavirostris*, 42 nyamuk *An. barbirostris*, dan 24 nyamuk *An. subpictus* di *pool* secara terpisah untuk proses ekstraksi genom DNA. Sampel yang digunakan adalah nyamuk *An. flavirostris*, *An. barbirostris* dan *An. subpictus* yang bertahan hidup setelah dilakukan uji *impregnated paper*. Deteksi gen kdr dilakukan menggunakan PCR secara kuantitatif (qPCR) pada titik V1010 dan L1014. Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat galur mutan kdr pada *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, dan *An. subpictus*. Hal ini mengindikasikan bahwa tidak terjadi penurunan sensitivitas insektisida piretroid yang terdapat pada kelambu LLIN terhadap *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, dan *An. subpictus* di Kabupaten Maluku Tenggara Barat.

Kata kunci: kdr, piretroid, *Anopheles flavirostris*, *Anopheles barbirostris*, *Anopheles subpictus*

ABSTRACT

Malaria is still a health problem in Indonesia, particularly in Eastern part of Indonesia. The use of LLIN insecticide bed nets is one of the efforts to reduce the malaria morbidity rate by protecting human from malaria vector bites. The *Anopheles flavirostris*, *Anopheles barbirostris*, and *Anopheles subpictus* mosquitoes are three of the species reported as malaria vectors in West-Southeast Maluku Regency. The aim of this research was to detect the kdr gene in *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, and *An. subpictus* mosquitoes collected from Alusi Kelaan village, West-Southeast Maluku Regency. The research was conducted at the Papua Biomedical Research and Development Center, in June 2016. A total of six *An. flavirostris*, 42 *An. barbirostris*, and 24 *An. subpictus* were pooled separately for genomic DNA extraction. The sample used was the *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, and *An. subpictus* that survived after the impregnated paper test. The kdr gene detection was carried out using quantitative PCR (qPCR) focused on points V1010 and L1014. The results showed that there were no kdr mutant strains in the *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, and *An. subpictus*. These results indicated that the sensitivity of pyrethroid insecticides contained in LLIN mosquito nets to *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, and *An. subpictus* mosquitoes was not decreased in West Southeast Maluku Regency.

Keywords: kdr, pyrethroid, *Anopheles flavirostris*, *Anopheles barbirostris*, *Anopheles subpictus*

PENDAHULUAN

Malaria masih menjadi masalah kesehatan dunia, terutama di negara-negara beriklim tropis termasuk Indonesia. Berdasarkan *Annual Parasite Incidence* (API), beberapa provinsi di Indonesia Timur masih termasuk daerah

endemis malaria tinggi. Salah satu provinsi yang termasuk wilayah endemis malaria adalah Provinsi Maluku. Beberapa kabupaten yang dilaporkan sebagai daerah endemis malaria (API > 1%) di Provinsi Maluku antara lain Kabupaten Maluku Barat Daya, Kabupaten

Maluku Tenggara, Kabupaten Seram Bagian Barat, Kabupaten Maluku Tengah, dan Kabupaten Seram Bagian Timur.¹

Desa Alusi Kelaan terletak di Kabupaten Maluku Tenggara Barat yang merupakan wilayah kerja Puskesmas Alusi yang dilaporkan memiliki jumlah kasus malaria klinis sebanyak 509 pada tahun 2010, meningkat menjadi 846 kasus pada tahun 2011, kemudian turun lagi menjadi 266 kasus pada tahun 2012. Tahun 2013 API dilaporkan sebesar 53,5 kemudian tahun 2014 turun menjadi 29,99.¹ Salah satu upaya yang dilakukan pemerintah untuk mencegah peningkatan jumlah penderita malaria adalah distribusi kelambu berinsektisida *long lasting insecticide net* (LLIN) yang diharapkan dapat melindungi masyarakat dari gigitan nyamuk vektor pada saat tidur. Resistensi insektisida adalah kemampuan vektor untuk bertahan hidup dari suatu dosis, yang dalam keadaan normal mampu membunuh vektor tersebut dan dapat berkembang pada populasi.

Resistensi insektisida adalah kemampuan vektor untuk bertahan hidup dari suatu dosis, yang dalam keadaan normal mampu membunuh vektor tersebut dan dapat berkembang pada populasi.² Resistensi insektisida dapat mengakibatkan populasi vektor di alam meningkat, dan selanjutnya semakin tinggi pula risiko masyarakat terjangkit malaria dan penyakit tular vektor lainnya.

Beberapa spesies yang dilaporkan sebagai vektor malaria di Kabupaten Maluku Tenggara Barat adalah *Anopheles farauti*, *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, dan *An. campestris*.³ Resistensi vektor malaria terhadap insektisida yang digunakan sebelumnya telah dilaporkan,^{4,5} demikian juga insektisida golongan piretroid terhadap penyakit demam berdarah *dengue* (DBD).⁶ Di wilayah Indonesia Timur, kajian serupa masih jarang dilakukan, sebab itu masih dibutuhkan banyak informasi terkait status resistensi vektor terhadap insektisida di tiap daerah endemis malaria.

Organisasi kesehatan dunia (WHO) hanya

mengizinkan pembelian/penggunaan kelambu berinsektisida LLIN yang sesuai spesifikasi WHOPEs, salah satunya golongan piretroid.⁷ Piretroid adalah racun yang bersifat neurotoksik, menyerang sistem saraf pusat dan tepi pada gen *voltage gated sodium channel* (VGSC) yang menyebabkan kelemahan juga kematian nyamuk. Piretroid melekat pada gen VGSC di neuron serangga, dapat menimbulkan loncatan respon saraf secara berulang atau paralisis dan kehilangan koordinasi atau *knockdown effect* sehingga dapat menyebabkan serangga kehilangan kontrol terhadap sistem motoriknya.⁸ Mekanisme terjadinya mutasi, pada gen VGSC terkait resistensi adalah terjadinya perubahan satu basa nukleotida pada asam amino leusin menjadi fenilalanin yang berkaitan dengan resistensi.^{9,10} Mutasi gen VGSC menyebabkan polimorfisme alel *kdr*, yaitu alel *kds*, *kdr-w* dan *kdr-e*. Mutasi pertama kali terdeteksi pada *An. gambiae* dari Afrika Barat (*kdr-w*), disebabkan perubahan asam amino leusin menjadi fenilalanin (TTA menjadi TTT), yaitu L1014 menjadi 1014F. Mutasi kedua ditemukan di Afrika Timur (*kdr-e*) disebabkan perubahan asam amino leusin menjadi serin (TTA menjadi TCA), yaitu L1014 menjadi 1014S).^{11,12} Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya, mutasi terkait *kdr* yang sering muncul adalah pada kodon V1010 dan L1014 pada gen pengkode VGSC.

Teknik molekuler dilaporkan dapat mendeteksi resistensi sintetik piretroid pada nyamuk *Ae. aegypti* dengan cara menemukan mutasi titik gen VGSC sebagai titik target mutasi insektisida (resistensi target).¹³ Kajian kerentanan insektisida penyakit tular vektor menggunakan berbagai pendekatan seperti *impregnated paper* telah dilaporkan,^{14,15} demikian juga dengan menggunakan teknik molekuler.^{16,17} Penelitian ini bertujuan mendeteksi mutasi gen VGSC atau mutasi gen *kdr* pada vektor malaria *An. flavirostris*, *An. barbirostris* dan *An. subpictus* di Kabupaten Maluku Tenggara Barat menggunakan teknik molekuler.¹⁸ Penelitian ini diharapkan menjadi

informasi penting bagi pemegang program, terutama program malaria di berbagai daerah, sebagai upaya memutus rantai penularan malaria, juga penyakit tular vektor lainnya.

METODE

Penelitian ini menggunakan sampel uji hasil penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti Balai Litbangkes Papua di Desa Alusi Kelaan Kabupaten Maluku Tenggara Barat Tahun 2016 menggunakan teknik impregnated paper,⁷ dengan nomor surat Persetujuan Etik: LB.02.01/5.2/KE.131/2016.

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Juni tahun 2016, menggunakan teknik *polymerase chain reaction* secara kuantitatif (qpCR), dilaksanakan di Laboratorium Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua. Prosedur ekstraksi genom DNA dilakukan secara duplo terhadap dua kelompok nyamuk, yaitu untuk qPCR (nyamuk hidup dan mati saat uji *susceptibility*). Sampel untuk PCR konvensional yaitu kelompok nyamuk yang secara morfologi teridentifikasi sebagai *An. barbirostris*, *An. flavirostris*, dan *An. subpictus*. DNA genom yang digunakan untuk qPCR juga diidentifikasi asam nukleatnya. Nyamuk yang digunakan sebagai sampel adalah *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, dan *An. subpictus* yang bertahan hidup setelah dilakukan uji *impregnated paper*. Proses yang dikerjakan di laboratorium adalah ekstraksi DNA dan amplifikasi gen kdr secara parsial untuk mendeteksi mutasi pada titik V1010 dan L1014. Karakterisasi produk qPCR menggunakan sekuensing dengan metode Sanger untuk mendeteksi mutasi pada titik V1010. Proses sekuensing dilakukan di laboratorium Biologi Molekular Balai

Litbangkes Papua. Pemeriksaan secara molekular dilakukan dengan proses ekstraksi DNA nyamuk menggunakan kit ekstraksi DNA komersil. Spesimen nyamuk di *pool* berdasarkan spesiesnya hingga di dalam 1 *pool* terdapat 6 nyamuk. Total nyamuk yang digunakan dalam penelitian ini adalah 90. DNA yang diperoleh dilanjutkan ke tahap PCR. Produk PCR yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi pada gel elektroforesis. Sampel dengan kualitas DNA yang baik diteruskan ke tahap sekuensing. Proses sekuensing dilakukan dengan menerapkan metode Sanger dan menggunakan 1 pasang primer yang sama dengan yang digunakan saat PCR. Produk PCR dimurnikan menggunakan ExoSAP IT dengan rasio 1:5. Produk PCR yang sudah murni selanjutnya di PCR untuk sekuensing menggunakan kit BigDye terminator v3.1. DNA pGEM -3Zf digunakan sebagai kontrol positif sekuensing dengan primer kontrolnya adalah -21 M13. Reaksi PCR dilakukan pada kondisi 96 °C 1 menit, 25 siklus (96 °C 10 detik, 50 °C 5 detik, 60 °C 4 menit). Produk yang diperoleh dimurnikan menggunakan XTerminator Solution dan SAM Solution dengan rasio 10:45. Sebanyak 20µL produk PCR sekuensing yang murni dianalisis nukleotidanya menggunakan 3500 genetic analyzer dengan polimer POP 7. Hasil analisis berupa susunan basa nukleotida disubmit ke *gene bank* untuk diidentifikasi.

Keberadaan mutasi pada titik L1014 dideteksi menggunakan primer dan probe yang telah dirancang sebelumnya oleh Bass,¹⁹ yaitu untuk mendeteksi mutasi L1014F dan L1014S. Program PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi gen kdr dapat dilihat dilihat pada Tabel 1.²⁰

Tabel 1. Program PCR dalam Uji Lanjut *Anopheles*

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

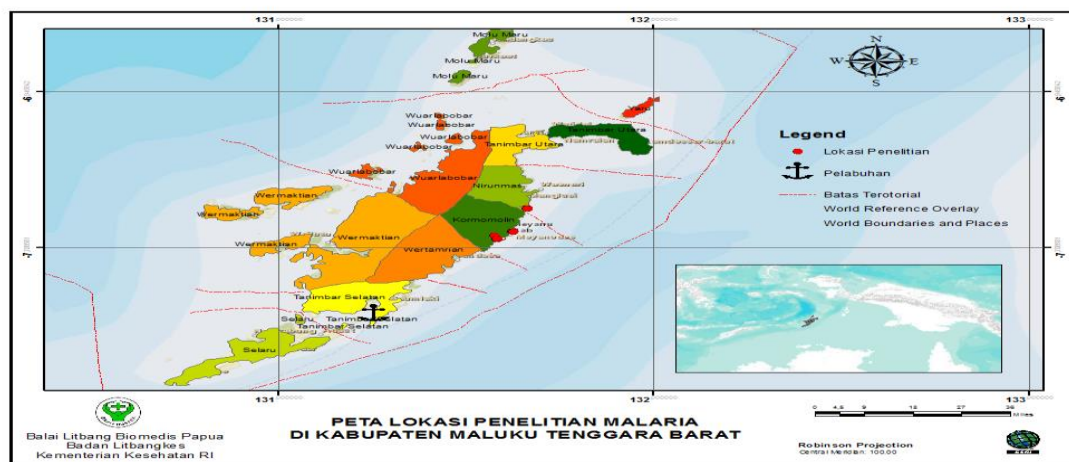
Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer kdr-forward (5'CATTTTCTT GGCCACTGTAGTGAT-3', dan kdr-reverse 5'CGATCTTGGTCCATGTTAATTTGCA-3. Probe yang digunakan untuk mendeteksi galur murni L1014 adalah WT (5'-CTTACGACTAAATTTTC-3') dilabeli dengan HEX pada ujung 5'. Deteksi mutasi L1014F dilakukan oleh Probe kdrW (5'-ACGACAAAATTTTC-3') dan L1014S menggunakan probe kdr (5'ACGACTGAATTTTC-3') dilabeli dengan 6-FAM untuk mendeteksi mutan kdr-e.²¹ Keberadaan mutasi di titik L1014 juga dikonfirmasi dengan sekuensing nukleotida produk qPCR.

HASIL

Wilayah kerja Puskesmas Alusi Kelaan Kabupaten Maluku Tenggara Barat dapat

dilihat pada Gambar 1. Peta lokasi penelitian diperoleh berdasarkan koordinat yang di ambil pada saat koleksi nyamuk dan pengambilan data pendukung lainnya.

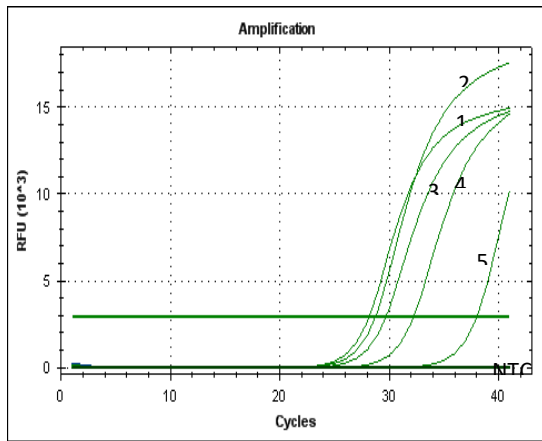
Kabupaten Maluku Tenggara Barat terletak pada 6° – 8°30'' lintang selatan dan 125°45 – 133° bujur timur, berbatasan dengan Laut Arafura di sebelah timur, sebelah selatan dengan Laut Timor dan Australia, sebelah barat dengan Kabupaten Maluku Barat Daya, dan sebelah utara dengan Laut Banda. Kabupaten Maluku Tenggara Barat merupakan daerah kepulauan yang meliputi seluruh Kepulauan Tanimbar. Desa Alusi Kelaan berada di Kecamatan Kromomolin yang berbatasan langsung dengan dua kecamatan yang dilaporkan memiliki angka kasus malaria tinggi yaitu Kecamatan Nirunmas dan Kecamatan Tanimbar Selatan.¹



Gambar 1. Peta lokasi penelitian

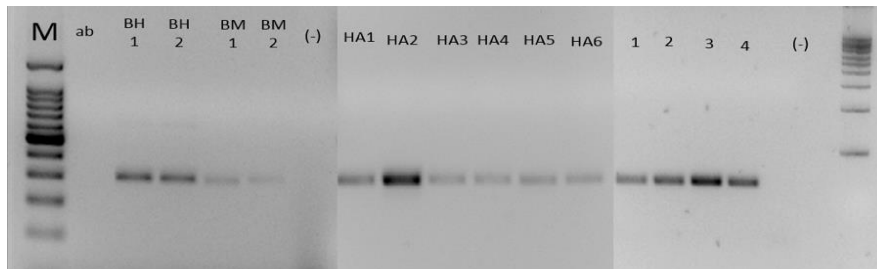
Hasil deteksi gen kdr menggunakan qPCR menunjukkan bahwa kedua spesies yang menjadi sampel uji adalah galur *wild-type* (Gambar 2). Hal tersebut ditunjukkan dengan tidak adanya kurva amplifikasi *probe* yang

melacak baik L1014F maupun L1014S. Kurva amplifikasi terlihat pada *probe* yang melacak *wild-type*. Konfirmasi produk qPCR pada gel *agarose* menunjukkan adanya pita DNA berukuran sekitar 200 pasang basa (Gambar 3).



Well	Fluorescence	Target	Cq
Specimen 1	FAM	kdr	
Specimen 2	FAM	kdr	
Specimen 3	FAM	kdr	
Specimen 4	FAM	kdr	
Specimen 5	FAM	kdr	
NTC	FAM	kdr	
Specimen 1	HEX	kdr	23.66
Specimen 2	HEX	kdr	23.59
Specimen 3	HEX	kdr	18.34
Specimen 4	HEX	kdr	27.96
Specimen 5	HEX	kdr	34.47
NTC	HEX	kdr	

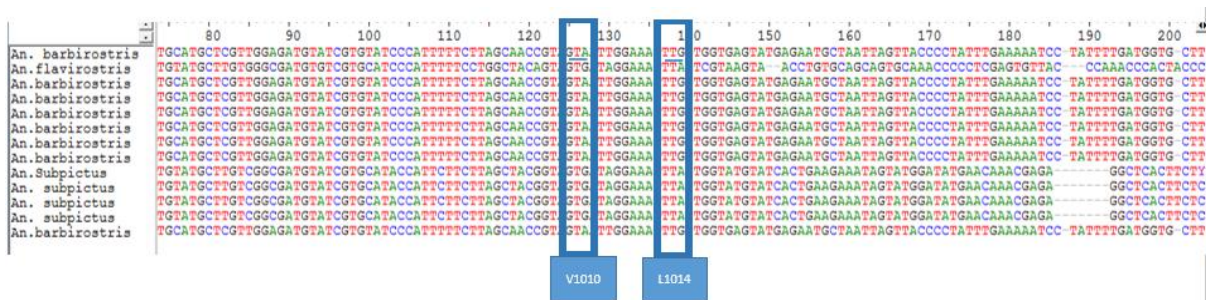
Gambar 2. Kurva qPCR Deteksi Mutan *kdr* pada Nyamuk *Anopheles*



Gambar 3. Hasil Elektroforesis Gen *Kdr* Nyamuk *Anopheles* sp. pada Agarose 1%. BH1 dan BH2 adalah nyamuk *An. barbirostris* hidup pool 1 dan 2, BM1 dan BM2 adalah nyamuk *An. barbirostris* mati pool 1 dan 2, HA1 adalah pool nyamuk hidup *An. flavirostris*, HA2-4 adalah pool nyamuk teridentifikasi *An. barbirostris*, HA5-6 adalah pool nyamuk teridentifikasi *An. subpictus*, dan 1-4 adalah sampel yang digunakan untuk qPCR

Analisis nukleotida terhadap produk PCR menunjukkan bahwa tidak terdapat mutasi pada titik V1010. Hasil konfirmasi dengan sekuensing terhadap keberadaan mutasi pada titik L1014 sejalan dengan hasil qPCR yang menunjukkan tidak adanya mutasi pada titik

tersebut. Penelitian ini tidak melakukan analisis mutasi pada gen lain yang dikaitkan dengan resistensi insektisida seperti gen pengkode ACE-1. Hasil analisis homologi setelah proses sekuensing produk PCR *Anopheles* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Pensejajaran Sekuens DNA Pengkode VGSC *Anopheles*

PEMBAHASAN

Penggunaan insektisida pada kelambu adalah salah satu upaya yang dilaporkan mampu menurunkan jumlah penderita malaria, namun di beberapa daerah tidak menunjukkan keberhasilan. Kegagalan penggunaan kelambu dalam upaya menurunkan penyakit tular vektor dapat disebabkan beberapa alasan antara lain: penggunaan/perawatan yang tidak tepat,²² ketahanan fisik,²³ tingkat pengetahuan pengguna, tetapi dapat juga disebabkan penurunan efisiensi insektisida.²⁴ Kurangnya informasi tentang berbagai aspek biologi, perilaku dan status resistensi insektisida yang bersifat spesifik lokal, diduga menjadi salah satu penyebab fundamental berkembangnya penyakit tular vektor.

Resistensi vektor terhadap insektisida adalah ancaman serius bagi upaya pengendalian penyakit tular vektor, mengingat salah satu intervensi yang digunakan saat ini adalah penggunaan insektisida. Beberapa negara belum menjadikan resistensi vektor terhadap insektisida sebagai fokus perhatian dalam pengendalian penyakit, tetapi di daerah tropis, masalah tersebut telah menjadi perhatian utama karena dianggap sebagai salah satu penyebab wabah sekaligus kematian, seperti yang dilaporkan di Burkina Faso.²⁵

Hasil uji resistensi *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, dan *An. subpictus* terhadap insektisida piretroid yang dilakukan sebelumnya di Alusi Kelaan menggunakan teknik *impregnated paper* menunjukkan bahwa ketiga spesies tersebut toleran terhadap insektisida yang digunakan pada kelambu LLIN dengan tingkat kematian masing-masing spesies sebesar 92,0% (tidak di publikasi). Kriteria resistensi insektisida menurut standard WHO yang dijadikan acuan hingga saat ini adalah: 1) jika rata-rata kematian 98-100% termasuk kategori rentan; 2) jika rata-rata kematian nyamuk 90-97% termasuk kategori toleran; dan 3) jika kematian <90% maka nyamuk telah resisten terhadap insektisida tersebut dan harus diganti dengan golongan lain.²⁶ Hasil tersebut tidak sejalan dengan uji

molekular yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perubahan struktur genetik pada titik V1010 dan L1014 pada nyamuk *An. flavirostris*, *An. barbirostris*, dan *An. subpictus* yang dikoleksi dari Desa Alusi Kelaan. Hasil tersebut juga dapat berarti bahwa tidak terdapat mutasi pada gen penanda resistensi insektisida piretroid (gen *kdr* allele) pada tiga spesies yang dilaporkan sebagai vektor malaria di wilayah tersebut.

Laporan adanya perubahan frekuensi alel telah dilaporkan sebelumnya di Lampung Selatan, berdasarkan kajian yang dilakukan pada nyamuk *An. sundaicus*, *An. aconitus*, *An. subpictus*, dan *An. vagus*.¹¹ Variasi mortalitas dan resistensi nyamuk *Anopheles* terhadap insektisida sebelumnya juga telah di laporkan di berbagai negara bahkan untuk vektor demam berdarah terdeteksi pada beberapa generasi nyamuk.²⁷

Meskipun mutasi pada V1010 dan L1014 tidak ditemukan pada sampel nyamuk hidup saat uji kerentanan insektisida dalam penelitian ini, potensi mutasi masih dapat ditemukan pada titik lain dan dapat menjadi penyebab *kdr* pada nyamuk. Suatu studi menyebutkan adanya mutasi F1534L, yang dikaitkan dengan resistensi piretroid bersamaan dengan adanya tiga mutasi lainnya yaitu F1534C, S989P dan V1016G pada *Ae. aegypti* di India.²⁸ Kondisi tersebut tentu menjadi persoalan baru dalam upaya pengendalian penyakit tular vektor.

Resistensi nyamuk terhadap insektisida dapat disebabkan berbagai faktor, diantaranya adalah perbedaan bio-ekologi pada setiap spesies. Sifat tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah perubahan aktivitas enzim, tinggi rendahnya metabolisme enzim *monooxygenase*, *esterase*, *acetylcholinesterase* (AChE), *glutathione-s-transferase* (GST) dalam mendetoksifikasi insektisida, yang berakibat terjadi perbedaan tingkat penyerapan insektisida oleh nyamuk target.^{20,29} Perubahan aktivitas enzim pada tubuh nyamuk menyebabkan penyerapan insektisida mengalami perubahan titik tangkap atau target *site specific* dan selanjutnya dapat

menurunkan fungsi efektor dari insektisida. Cekaman perubahan lingkungan, terutama oleh insektisida secara terus menerus terhadap semua stadia nyamuk dapat memicu terjadinya perubahan struktur gen kdr serangga vektor yang pada akhirnya berdampak pada mekanisme resistensi insektisida.

Kdr adalah resistensi yang terjadi akibat mutasi gen *paragated sodium channel/voltage gate codium channel*, yang merupakan protein sub-unit yang menyusun *voltage-sensitive* saluran sodium pada membran saraf. Insektisida golongan piretroid bekerja pada bagian VGSC neuron nyamuk. Reseptor molekuler pada insektisida piretroid akan melekat dan membuka *channel sodium* dan membiarkannya tetap terbuka, sehingga menimbulkan loncatan respons saraf secara berulang, dan menimbulkan aktifitas di luar kendali, sehingga serangga tidak dapat mengontrol seluruh sistem motoriknya.^{1,30} Mutasi titik target pada gen VGSC, dapat berakibat menurunnya sensitivitas insektisida terhadap serangga target. Mutasi mengakibatkan perubahan asam amino tunggal yang mengurangi afinitas situs target molekul insektisida.

Setiap organisme memiliki sifat berbeda dalam merespon tekanan lingkungan, termasuk respon nyamuk terhadap insektisida. Faktor genetik, perubahan lingkungan dan sifat kimia insektisida yang digunakan adalah faktor-faktor yang diduga menjadi penyebab terjadinya kondisi tersebut. Tingkat resistensi serangga vektor dapat juga terjadi karena adanya penurunan penetrasi melalui kutikula yang kemudian menyebabkan organisme tersebut membutuhkan waktu lebih lama untuk detoksifikasi bahan-bahan yang bersifat toksik sehingga kemampuan bertahan bertambah. Penggunaan satu golongan insektisida (organofosfat, piretroid, karbamat) secara terus menerus dalam jangka waktu lama dapat meningkatkan risiko resistensi insektisida serangga target. Merotasi pemakaian dengan insektisida golongan lain atau dengan peningkatan dosis dapat dijadikan solusi untuk menekan terbentuknya serangga resisten.²

Penelitian ini juga menunjukkan bahwa penilaian terhadap efektifitas kelambu, baik status resistensi vektor terhadap insektisida maupun *durability*, menggunakan satu pendekatan tidaklah cukup. Penggunaan beberapa pendekatan, penting dilakukan sebagai upaya konfirmasi. *Impregnated paper* hanyalah salah satu teknik yang digunakan untuk menguji resistensi vektor terhadap insektisida, baik pada kelambu maupun intervensi lain. Kajian resistensi vektor terhadap insektisida dengan teknik *impregnated paper* telah menunjukkan keberhasilan,^{31,32} demikian juga dengan teknik molekuler, baik pada vektor malaria maupun DBD.³³⁻³⁶ Sebab itu, pendekatan-pendekatan tersebut patut diaplikasikan dalam penentuan resistensi insektisida.

KESIMPULAN

Hasil penelitian di Alusi Kelaan Kabupaten Maluku Tenggara Barat menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan struktur genetik pada titik V1010 dan L1014 pada nyamuk *An. flavirostris*, *An. barbirostris* dan *An. subpictus* yang juga berarti bahwa tidak terjadi penurunan sensitivitas insektisida piretroid terhadap spesies-spesies tersebut.

KONTRIBUSI PENULIS

Kontribusi setiap penulis dalam artikel ini adalah HK sebagai kontributor utama yang bertanggung jawab dalam konsep penulisan artikel secara menyeluruh. HH, IA, MS, dan MR sebagai kontributor anggota yang bertanggung jawab dalam analisis dan penyajian data.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Litbang Biomedis Papua, Dinas Kesehatan Kabupaten Maluku Tenggara Barat serta semua pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung termasuk dalam memberikan saran untuk penyusunan tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dinas Kesehatan Provinsi Maluku. Profil kesehatan Provinsi Maluku Tahun 2014. Maluku: Dinas Kesehatan Provinsi Maluku; 2015.
2. Majawati ES. Kerentanan vektor demam berdarah dengue terhadap insektisida golongan organofosfat. *Jurnal Kedokteran Meditek*. 2015;21(56):1-4.
3. Sandy S, Ayomi I, Suebu MS, Maladan Y, Pardi MR, Lewier J. Entomological surveillance of malaria vectors in Saumlaki, Maluku Tenggara Barat Regency, Maluku Province. *J Kesehat Masy*. 2017;12(2):96-103. doi: 10.15294/kemas.v12i2.5970.
4. Sayono, Syafruddin D, Sumanto D. Distribusi resistensi nyamuk *Aedes aegypti* terhadap insektisida sipermetrin di Semarang. *Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian - LPPM UNIMUS*. 2012:263-9.
5. Ikawati B, Sunaryo S, Widiastuti D. Peta status kerentanan *Aedes aegypti* (Linn.) terhadap insektisida cypermethrin dan malathion di Jawa Tengah. *ASPIRATOR*. 2015;7(1):23-8.
6. Ghiffari A, Fatimi H, Anwar C. Deteksi resistensi insektisida sintetik piretroid pada *Aedes aegypti* (L.) strain Palembang menggunakan teknik polymerase chain reaction. *ASPIRATOR*. 2013;5(2):37-44.
7. World Health Organization. Malaria entomology and vector control guide for participants. Malta: WHO Press; 2013. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85890/9789241505819_eng.pdf.
8. Syafruddin D, Hidayati APN, Asih PBS, Hawley WA, Sukowati S, Lobo NF. Detection of 1014F kdr mutation in four major Anopheline malaria vectors in Indonesia. *Malar J*. 2010; 9(315):1-8. doi: 10.1186/1475-2875-9-315.
9. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*. 2001;9(5):491-7. doi: 10.1046/j.1365-2583.2000.00209.x.
10. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 1998;7(2):179-84. doi: 10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x.
11. Kazanidou A, Nikou D, Grigoriou M, Vontas J, Skavdis G. Short report: a multiplex PCR assay for simultaneous genotyping of kdr and ace-1 loci in *Anopheles gambiae*. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(2):236-8. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.236.
12. Duke SO, Powles SB. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci*. 2008;64(4):319-25. doi: 10.1002/ps.1518.
13. Saavedra-rodriguez K, Strode C, Suarez AF, Salas IF, Ranson H, Hemingway J, et al. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. 2008;180(2):1137-1152. doi: 10.1534/genetics.108.087924.
14. Rahayu N, Sulasmi S, Suryatinah Y. Status kerentanan *Aedes aegypti* terhadap beberapa golongan insektisida di Provinsi Kalimantan Selatan. *JHECDS*. 2017;3(2):56-62. doi: 10.22435/jhecds.v3i2.1792.
15. Sunaryo S, Widiastuti D. Resistensi *Aedes aegypti* terhadap insektisida kelompok organopospat dan sintetik piretroid di Provinsi Sumatera Utara dan Provinsi Jambi. *BALABA*. 2018;14(1):95-106. doi: 10.22435/blb.v14i1.304.
16. Yudhana A, Praja RN, Yunita MN. Deteksi gen resisten insektisida organofosfat pada *Aedes aegypti* di Banyuwangi, Jawa Timur menggunakan polymerase chain reaction. *J Vet*. 2017;18(3):446-52. doi: 10.19087/jveteriner.2017.18.3.446.
17. Purwaningsih, Umniyati SR, Mulyaningsih. Combined target site VGSC mutations play a primary role in pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* as dengue vector from Palu City, Central Sulawesi. *Indones J Trop Infect Dis*. 2019;7(5):93-8. doi: 10.20473/ijtid.v7i5.10384.
18. Singh OP, Dykes CL, Lather M, Agrawal OP, Adak T. Knockdown resistance (kdr)-like mutations in the voltage-gated sodium channel of a malaria vector *Anopheles stephensi* and PCR assays for their detection. *Malar J*. 2011;10(59):1-7. doi: 10.1186/1475-2875-10-59.
19. Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, Williamson

- MS, Ranson H, Ball A, et al. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malar J*. 2007;6(111):1–14. doi: 10.1186/1475-2875-6-111.
20. Nwane P, Etang J, Chouaïbou M, Toto JC, Koffi A, Mimpfoundi R, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. *Parasit Vectors*. 2013;6(41):1–14. doi: 10.1186/1756-3305-6-41.
21. World Health Organization. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. France: WHO Press; 2012. Available form: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44846/9789241564472_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=.
22. Sousa JO, De Albuquerque BC, Coura JR, Suárez-Mutis MC. Use and retention of long-lasting insecticidal nets (LLINs) in a malaria risk area in the Brazilian Amazon: a 5-year follow-up intervention. *Malar J*. 2019;18(100):1–13. doi: 10.1186/s12936-019-2735-9.
23. Kilian A, Obi E, Mansiangi P, Abílio AP, Haji KA, Blaufuss S, et al. Variation of physical durability between LLIN products and net use environments: summary of findings from four African countries. *Malar J*. 2021;20(26):1–11. doi: 10.1186/s12936-020-03549-2.
24. Vinit R, Timinao L, Bubun N, Katusele M, Robinson L, Kaman P, et al. Decreased bioefficacy of long-lasting insecticidal nets and the resurgence of malaria in Papua New Guinea. *Nat Commun*. 2020;11(1):1–7. doi: 10.1038/s41467-020-17456-2.
25. Sombié A, Saiki E, Yaméogo F, Sakurai T, Shirozu T, Fukumoto S, et al. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. *Trop Med Health*. 2019;47(2):1–8. doi: 10.1186/s41182-018-0134-5.
26. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. 1998. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/64879>.
27. Contreras-Perera Y, Ponce-Garcia G, Villanueva-Segura K, Lopez-Monroy B, Rodríguez-Sánchez IP, Lenhart A, et al. Impact of deltamethrin selection on kdr mutations and insecticide detoxifying enzymes in *Aedes aegypti* from Mexico. *Parasit Vectors*. 2020;13(224):1–22. doi: 10.1186/s13071-020-04093-3.
28. Kushwah RBS, Kaur T, Dykes CL, Kumar RH, Kapoor N, Singh OP. A new knockdown resistance (kdr) mutation F1534L in the *Aedes aegypti* associated with insecticide resistance. *bioRxiv*. 2019;13(1):1–30. doi: 10.1101/740829.
29. Surendran SN, Jude PJ, Weeraratne TC, Karunaratne SHPP, Ramasamy R. Variations in susceptibility to common insecticides and resistance mechanisms among morphologically identified sibling species of the malaria vector *Anopheles subpictus* in Sri Lanka. *Parasit Vectors*. 2012;5(34):1–9.
30. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Laporan hasil riset kesehatan dasar Provinsi Maluku Tahun 2008. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan; 2009.
31. Nurmaliani R, Oktarina R, Arisanti M, Asyati D. Daya bunuh kelambu berinsektisida long lasting insecticidal nets (LLINS) terhadap nyamuk *Anopheles maculatus*. *ASPIRATOR*. 2016;8(1):1–8.
32. Sugiarto, Hadi UK, Soviana S, Hakim L. Efektivitas kelambu berinsektisida terhadap nyamuk *Anopheles sundaicus* (Diptera: Culicidae) dan penggunaannya di Desa Sungai Nyamuk, Kalimantan Utara. *SPIRAKEL*. 2018;10(1):1–11. doi: 10.22435/spirakel.v10i1.1159.
33. Hidajat MC, Dharmana E, Prihatin MT, Martini, Ambargarjito T. Molecular resistance status of *Aedes aegypti* to the organophosphate and pyrethroid insecticides in Central Sulawesi and East Nusa Tenggara Provinces, Indonesia. *Proceedings of the 5th Universitas Ahmad Dahlan Public Health Conference (UPHEC 2019)*. 2020;24:122-7. doi: 10.2991/ahsr.k.200311.023.
34. Zhou X, Yang C, Liu N, Li M, Tong Y, Zeng X, et al. Knockdown resistance (kdr) mutations within seventeen field populations of *Aedes albopictus* from Beijing China: first report of a novel V1016G mutation and evolutionary origins of kdr haplotypes. *Parasit Vectors*. 2019;12(180):1–16. doi: 10.1186/s13071-019-

3423-x.

35. Brito LP, Carrara L, Freitas RM, Lima JBP, Martins AJ. Levels of resistance to pyrethroid among distinct kdr alleles in *Aedes aegypti* laboratory lines and frequency of kdr alleles in 27 natural populations from Rio de Janeiro, Brazil. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1-10. doi: 10.1155/2018/2410819.
36. Villanueva-Segura K, Ponce-Garcia G, Lopez-Monroy B, Mora-Jasso E, Perales L, Gonzalez-Santillan FJ, et al. Multiplex PCR for simultaneous genotyping of kdr mutations V410L, V1016I and F1534C in *Aedes aegypti* (L.). *Parasit Vectors*. 2020;13(325):1-8. doi: 10.1186/s13071-020-04193-0.