



Investigasi resistensi *Anopheles* sp. terhadap insektisida piretroid dan kemungkinan terjadinya mutasi gen *voltage gated sodium channel (VGSC)*

Investigation of *Anopheles* sp. resistance on pyrethroid insecticide and possibility of mutation occurrence on voltage gated sodium channel (VGSC) gene

Didid Haryanto¹, Dalilah^{2*}, Chairil Anwar², Gita Dwi Prasasti²,
Dwi Handayani², Ahmad Ghifari³

¹Magister Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
Jalan Dr. Moh. Ali Komplek RSMH, Palembang 30126

²Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
Jalan Dr. Moh. Ali Kompleks RSMH, Palembang 30126

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Palembang
Jalan Seberang Ulu II, Palembang 30116

(diterima April 2018, disetujui September 2018)

ABSTRAK

Penggunaan insektisida golongan piretroid secara luas dan terus menerus dalam pencegahan penularan malaria dapat menimbulkan mutasi gen *voltage gate sodium channel (VGSC)* pada vektor nyamuk yang dikenal dengan mutasi *knockdown resistance (kdr)*. Mutasi gen ini membuat sensitifitas ikatan protein *VGSC* dengan insektisida menurun sehingga menyebabkan resistensi. Timbulnya resistensi insektisida piretroid pada nyamuk vektor dapat menjadi penghambat keberhasilan pemutusan penularan penyakit malaria sehingga deteksi adanya mutasi mutlak diperlukan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui status resistensi insektisida piretroid dan mengidentifikasi mutasi pada gen *VGSC* kodon 1014 penanda resistensi nyamuk *Anopheles* sp. yang menjadi vektor malaria di Provinsi Sumatra Selatan. Sampel diambil di tiga Kabupaten, yaitu Muara Enim, Ogan Komering Ulu (OKU), dan Lahat. Uji awal kerentanan terhadap insektisida piretroid (permetrin 0,75%) dilakukan sesuai standar WHO tahun 2016 pada spesies dominan, yaitu *Anopheles vagus* Dönitz. Selanjutnya, identifikasi mutasi gen *VGSC* pada kodon 1014 dilakukan pada *An. vagus* dan spesies *Anopheles barbirostris* van der Wulp yang tertangkap, dengan teknik *seminested-PCR* dan dilanjutkan dengan analisis sekuensing. Hasil uji kerentanan *Anopheles* sp. di Kabupaten Muara Enim menunjukkan resisten terhadap piretroid, sedangkan di Kabupaten Lahat dan OKU masih rentan terhadap insektisida piretroid. Sementara itu, analisis sekuensing PCR menunjukkan tidak terjadi perubahan basa alel *kdr* pada *target site* insektisida gen *VGSC* sehingga dapat disimpulkan secara molekuler belum ditemukan adanya mutasi pada gen *VGSC kdr allele* penanda resistensi insektisida piretroid.

Kata kunci: *Anopheles vagus*, insektisida piretroid, *knock down resistance*, mutasi gen, *voltage gated sodium channel*

ABSTRACT

Extensive and continuous use of pyrethroid insecticides to prevent the transmission of malaria can lead to mutations in the voltage gate sodium channel gene (VGSC) in mosquito vectors. This

*Penulis korespondensi: Dalilah. Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
Jalan Dr. Moh. Ali Kompleks RSMH, Palembang 30126, Tel: 0711-373438; Faks: 0711-352342, Email: dalilah@fk.unsri.ac.id

gene mutation associated with insensitivity pyrethroid is known as knockdown resistance (kdr). The emergence of resistance to pyrethroid insecticides in vector mosquitoes can be a barrier to the successful termination of malaria transmission. Therefore, detection of mutation is necessary to prevent the resistency from build up. The aim of the study was to determine the resistance status of pyrethroid insecticides and identify mutations in the VGSC gene codon 1014 marker for resistance to *Anopheles* sp. which is a malaria vector in South Sumatra Province. Samples were taken from three districts in South Sumatra: Muara Enim, OKU, and Lahat. The susceptibility enzymatic test of pyrethroid insecticide (permethrin 0.75%) was preliminarily carried out according to WHO 2016 standard on *Anopheles vagus* Dönitz species. Identification of VGSC gene mutation was performed on all *An. vagus* that were previously tested for susceptibility and on *An. barbirostris* van der Wulp species using seminested-PCR and followed by sequencing. The result showed that samples from Muara Enim regency had resistance, whereas in Lahat and OKU regencies were still susceptible to permethrin. From the sequence analysis it is shown that there are no change in DNA kdr bases in VGSC gene insecticide target sites from all regencies. In conclusion, based on molecular studies, there were no pyrethroid insecticide resistance in South Sumatra Province.

Key words: *Anopheles vagus*, gene mutation, knock down resistance, pyrethroid insecticides, the voltage gated sodium channel

PENDAHULUAN

Infeksi malaria disebabkan oleh parasit Genus *Plasmodium* yang ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Tercatat sebanyak 80 spesies *Anopheles* di Indonesia, dengan 22 spesies di antaranya merupakan vektor malaria. *Anopheles vagus* Dönitz yang sebelumnya hanya bersifat zoofilik, kini telah ditemukan adanya *Plasmodium* melalui pemeriksaan ELISA di manusia (Munif 2009). Hasil riset khusus vektor dan reservoir di Provinsi Sumatra Selatan tahun 2015 ditemukan nyamuk *Anopheles barbirostris* van der Wulp positif mengandung *Plasmodium* dengan pemeriksaan *Nested-polymerase chain reaction* (PCR) di Kabupaten Lahat, sedangkan di Kabupaten OKI *An. barbirostris* dan *An. vagus* juga telah terkonfirmasi mengandung *Plasmodium* (Aïzoun et al. 2014).

Keadaan geografis dan perubahan kondisi lingkungan menjadi salah satu faktor yang memungkinkan perkembangbiakan nyamuk *Anopheles* sp. sebagai vektor malaria khususnya di Sumatra Selatan. Berdasarkan laporan rutin Dinas Kesehatan, terdapat sembilan kabupaten/kota di Provinsi Sumatra Selatan yang merupakan daerah endemis malaria, yaitu Lahat, Ogan Komering Ulu (OKU), Muara Enim, Lubuk Linggau, OKU Timur, OKU Selatan, Musi Banyuasin, Musi Rawas, dan Muratara, sedangkan delapan kabupaten/kota lainnya telah mendapatkan sertifikat eliminasi malaria dan tidak terdapat penularan setempat di daerah

tersebut (Dinas Kesehatan Provinsi Sumsel 2017). Pengendalian vektor nyamuk secara kimia yang direkomendasikan WHO adalah penyemprotan rumah menggunakan insektisida (*indoor residual spraying* [IRS]) dan kelambu berinsektisida (*long lasting insecticed nets* [LLINs]) (Glunt et al. 2015; Kitau et al. 2014). Penggunaan LLINs dapat menurunkan kasus malaria sebesar 44% tiap tahunnya di Kenya (Nwane et al. 2011). Program pengendalian malaria di negara-negara Afrika dengan IRS dan LLINs efektif dalam menurunkan kasus malaria (Glunt et al. 2015). Hingga saat ini, insektisida kimia golongan piretroid merupakan satu-satunya insektisida yang disetujui oleh World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) untuk digunakan sebagai bahan aktif kelambu berinsektisida (Silva et al. 2014; Schleier & Peterson 2011).

Piretroid merupakan racun yang dapat mengganggu sistem saraf pusat dan tepi pada gen *voltage gated sodium channel* (VGSC) sehingga menyebabkan kelemahan dan kematian pada nyamuk (Silva et al. 2014). Piretroid bersifat neurotoksik, melekat pada bagian VGSC di neurin serangga yang dapat menimbulkan loncatan respons saraf secara berulang (paralisis) dan kehilangan koordinasi (*knock down effect*) sehingga serangga tidak dapat mengontrol seluruh sistem motoriknya (Silva et al. 2014; Syafruddin et al. 2010).

Namun, penggunaan insektisida yang sama atau sejenis secara terus menerus, penggunaan bahan aktif atau formulasi yang mempunyai

aktifitas yang sama, efek residual lama, dan biologi spesies vektor dapat menjadi faktor munculnya resistensi vektor terhadap insektisida (Glunt et al. 2015; Silva et al. 2014). Dampak resistensi insektisida pada vektor malaria semakin diperkuat dengan adanya perubahan genotipe pada populasi vektor. Salah satu mekanisme resistensi piretroid pada serangga, yaitu *knock down resistance (kdr)* yang disebabkan oleh menurunnya sensitifitas *target site* insektisida (Du et al. 2013).

Knock down resistance adalah mutasi pada *VGSC L1014F* pada nyamuk *An. gambiae* Giles dari Afrika Barat dan mutasi *L1014S* di Afrika Timur (Ibrahim et al. 2014). Di Indonesia sendiri telah dilaporkan adanya resistensi piretroid *Anopheles sp.* di Jawa Tengah. Untuk Pulau Sumatra telah ditemukan resistensi piretroid pada *kdr allele L1014F* pada nyamuk *An. subpictus* (Grassi), *An. vagus*, dan *An. aconitus* Dönitz di Lampung Selatan (Syafuruddin et al. 2010). Mutasi gen ini menyebabkan menurunnya sensitifitas terhadap insektisida sehingga serangga menjadi resisten (Liu 2015; Du et al. 2013; Yadouleton et al. 2010).

Sejak tahun 2006, Dinas Kesehatan Provinsi Sumatra Selatan telah mendistribusikan LLINs bagi ibu hamil dengan berbagai merk dengan komposisi zat aktif deltamethrin dan permethrin. Khusus pada tahun 2016, telah dilakukan distribusi LLINs massal fokus di desa endemis malaria dengan merk Interceptor® (*alpha cypermethrin*) sebanyak 80.000 buah di 6 kabupaten/kota endemis malaria (Dinkes Prov.Sumsel 2016). Pengendalian vektor dengan LLINs yang telah dijalankan di Sumatra Selatan belum pernah dilakukan uji resistensi insektisida secara molekuler. Identifikasi kemungkinan adanya mutasi gen pada vektor malaria di Provinsi Sumatra Selatan perlu dilakukan sebagai bahan evaluasi dan rekomendasi alternatif pengendalian vektor malaria selanjutnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui status resistensi insektisida golongan piretroid dan mendeteksi apakah terdapat mutasi pada gen *VGSC* kodon 1014 nyamuk *Anopheles sp.* vektor malaria di Provinsi Sumatra Selatan.

BAHAN DAN METODE

Studi area

Lokasi penelitian, yaitu tiga kabupaten endemis malaria di Provinsi Sumatra Selatan

dengan kriteria mendapatkan distribusi LLINs dalam 5 tahun terakhir dan terdapat populasi kepadatan vektor *Anopheles sp.* yang tinggi. Setiap kabupaten/kota diambil 1 desa endemis malaria, desa tersebut adalah di Desa Padang Bindu, Kabupaten OKU (4°3'49.7"LS/103°56'29.9"BT); Kabupaten Lahat di Desa Lebak Budi (4°47'4.1604"LS/103°39'21.081"BT); dan Kabupaten Muara Enim di Desa Muara Emil (3°56'38.1624"LS/103°47'45.9774"BT).

Koleksi nyamuk

Penelitian dilakukan dari bulan Juli 2017 sampai Desember 2017, dimulai dari survei lokasi, penangkapan nyamuk, uji kerentanan insektisida, dan uji laboratorium. Penangkapan nyamuk dilakukan pada bulan Oktober 2017. Waktu penangkapan dimulai jam 19:00–24:00 WIB dengan target penangkapan nyamuk minimal sebanyak 150 individu per lokasi. Sampel adalah nyamuk *Anopheles* betina yang tidak kenyang darah (*non blood fed*) hasil penangkapan di lapangan (*wild-caught female mosquitos*) yang telah berlaku sebagai vektor malaria di Sumatra selatan, yakni nyamuk *An. vagus* dan *An. barbirostris*. Penangkapan nyamuk dilakukan di sekitar kandang ternak. Semua nyamuk Genus *Anopheles* dikumpulkan menggunakan aspirator. Nyamuk diseleksi dan diidentifikasi langsung di lapangan menggunakan mikroskop stereo dengan menggunakan kunci identifikasi nyamuk Genus *Anopheles* bergambar (Boewono 2011; O'Connor & Soepanto 1999). Setelah proses identifikasi, *Anopheles* betina dipisah ke dalam *paper cup* dan diistirahatkan selama 1 jam.

Uji kerentanan insektisida

Uji kerentanan dilakukan pada sampel nyamuk dominan karena dibutuhkan nyamuk dengan spesies sama dan jumlah yang mencukupi untuk pengujian agar sesuai dengan standar WHO (2016). Kertas insektisida (*impregnated paper*) berasal dari Subdit Pengendalian Vektor dan Binatang Pembawa Penyakit Kementerian Kesehatan RI. Insektisida yang digunakan adalah golongan piretroid (permethrin 0,75%) menyesuaikan dengan insektisida yang digunakan dalam LLINs.

Seluruh sampel *An. vagus* dari tiga kabupaten diuji kerentanannya, dimasukkan masing-masing sebanyak 25 individu ke dalam 4 tabung uji replikasi (pengulangan) yang telah dimasukkan

impregnated paper insektisida piretroid dan 2 tabung berisi kertas *silicone oil* sebagai kontrol. Kemudian, tiap tabung dihitung jumlah kematian selama 1 jam dengan interval waktu 10, 15, 20, 30, 50, dan 60 menit. Setelah satu jam, nyamuk dipindahkan ke dalam *paper cup* dan diberi air gula serta dihitung jumlah kematian setelah 24 jam (Yadouleton et al. 2010; Aïzoun et al. 2014). Kriteria resistensi untuk penggunaan *impregnated paper* konsentrasi 1X (permetrin 0,75%) sesuai standar dari WHO (2016), yaitu nyamuk bisa dinyatakan rentan/*susceptible* terhadap insektisida jika jumlah kematian $\geq 98\%$; kemungkinan resisten jika jumlah kematian 90–97%, lalu dilakukan uji ulang dan jika hasil ulang kematian $< 98\%$ dapat dinyatakan resisten; dan konfirmasi resisten jika kematian $< 90\%$.

Identifikasi mutasi pada gen *VGSC*

Setelah dilakukan uji resistensi, sampel nyamuk lalu dikumpulkan dalam *pool* nyamuk yang berisi 10 individu nyamuk tiap *pool*. Sampel nyamuk yang tidak dilakukan uji resistensi dipisahkan *pool*-nya. Ekstraksi DNA dilakukan dengan prosedur *Wizard Purification*® dari Promega.

Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan *seminested* PCR sesuai protokol penelitian sebelumnya: AgF_ *kdr* (5' GAC CAT GAT CTG CCA AGA TGG AAT 3') dan AgR_ *kdr* (5' GCA AGG CTA AGA AAA GGT TAA GCA 3') dengan modifikasi. Modifikasi meliputi penggunaan *external reverse oligos*, An. *kdr*_R2 (5' GAG GAT GAA CCG AAA TTG GAC 3') sebagai *single-step* PCR (Syafuruddin et al. 2010). PCR tahap pertama menggunakan oligos AgF_ *kdr* x An. *kdr*_R2 dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit, aneling pada suhu 45 °C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik (1 siklus), denaturasi pada suhu 94 °C

selama 30 detik, aneling pada suhu 50 °C selama 30 detik, ekstensi selama 72 °C selama 1 menit (29 siklus). PCR tahap kedua menggunakan AgF_ *kdr* x An.R_ *kdr* dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit, aneling pada suhu 45 °C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit (1 siklus) dan denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, aneling pada suhu 50 °C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72 °C selama 40 detik (39 siklus) (Syafuruddin et al. 2010). Hasil amplifikasi dideteksi dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1%. Sampel yang terdeteksi gen *VGSC* dengan hasil pita amplifikasi pada 260 pasang basa (pb) selanjutnya digunakan untuk analisis sekuensing/peruntutan. Sekuensing dilakukan di PT Indolab Utama, dan hasil sekuensing kemudian dianalisis dengan teknik Motifs menggunakan program Genenius pada referensi AY533850 dan AY625628 (<http://www.geneious.com/>).

HASIL

Status kerentanan insektisida

Ada 4 spesies nyamuk *Anopheles* yang diperoleh dari hasil penangkapan nyamuk di Desa Muara Emil, Kabupaten Muara Enim, yakni *An. vagus*, *An. kochi* Dönitz, *An. barbirostris*, dan *An. tessellatus* Theobald. Desa Ulak Pandan OKU diperoleh 2 spesies nyamuk *Anopheles* dan 3 spesies *Anopheles* dari Desa Lebak Budi, Lahat (Tabel 1). Nyamuk *An. vagus* adalah spesies nyamuk dominan, sekitar 70% dari total nyamuk yang ditangkap sehingga nyamuk ini menjadi nyamuk yang diuji status kerentanannya.

Berdasarkan hasil uji, didapatkan persentase kematian uji, yaitu di Kabupaten Muara Enim sebesar 90% (setelah dilakukan uji ulang, tetap didapatkan kematian sebesar 95% atau $< 98\%$)

Tabel 1. Hasil penangkapan nyamuk di tiga kabupaten/kota Provinsi Sumatra Selatan

Spesies	Kab. Muara Enim		Kab. OKU		Kab. Lahat	
	Jumlah (individu)	Persentase (%)	Jumlah (individu)	Persentase (%)	Jumlah (individu)	Persentase (%)
<i>Anopheles vagus</i>	316	53	158	81,4	220	89,4
<i>An. kochi</i>	257	43,1	36	18,6	25	10,2
<i>An. barbirostris</i>	22	3,7	0	0	1	0,4
<i>An. tessellatus</i>	1	0,2	0	0	0	0
Total	596	100	194	100	246	100

maka disimpulkan bahwa *An. vagus* terkonfirmasi resisten terhadap insektisida permetrin, sedangkan hasil uji resistensi untuk Kabupaten Lahat dan OKU menunjukkan persentase kematian uji sebesar 98% maka disimpulkan *An. vagus* masih rentan/*susceptible* terhadap insektisida permetrin (Tabel 2).

Identifikasi mutasi gen VGSC alel *kdr*

Terdapat 51 *pool* sampel terdiri atas 17 *pool* sampel *An. vagus* Kabupaten Muara Enim, 13 *pool* sampel nyamuk *An. vagus* Kabupaten Lahat, 18 *pool* sampel nyamuk *An. vagus* Kabupaten OKU, 2 *pool* sampel *An. barbirostris* yang berasal dari Kabupaten Muara Enim, dan 1 *pool*

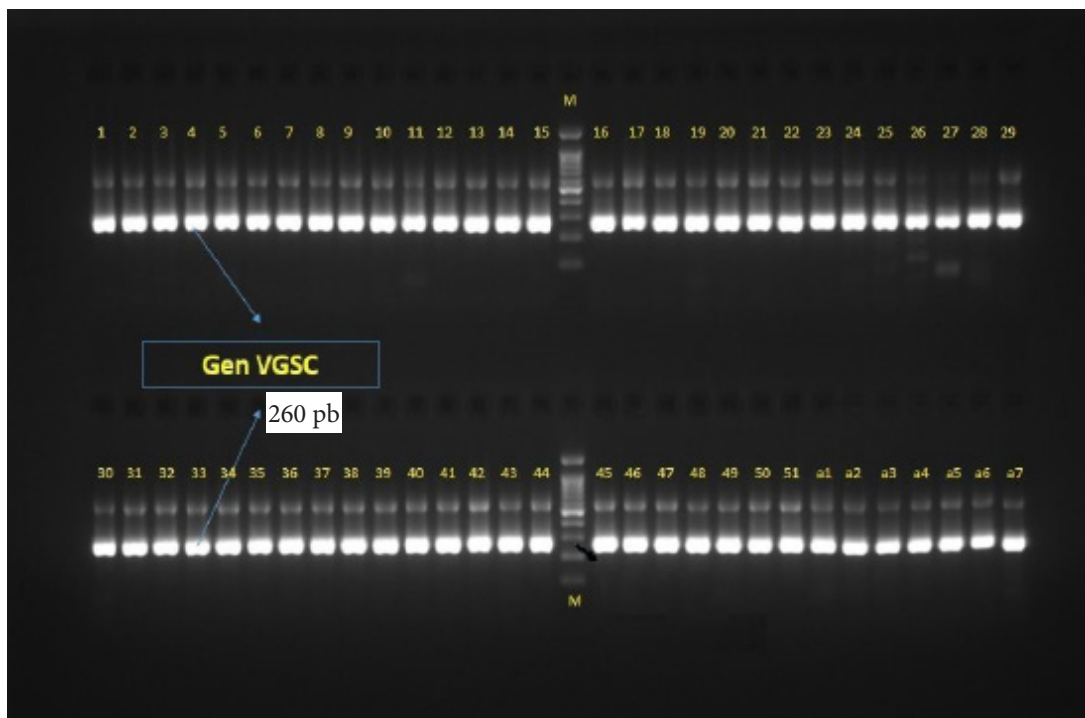
Tabel 2. Hasil uji kerentanan *Anopheles vagus* terhadap insektisida permetrin 0,75% di tiga kabupaten

Kabupaten	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Replikasi 4		Total		Mortalitas (%)	Kriteria WHO
	KD	Hidup	KD	Hidup	KD	Hidup	KD	Hidup	KD	Hidup		
Muara Enim	21	4	23	2	24	1	22	3	90	10	90	Kemungkinan resisten
Muara Enim (uji ulang)	24	1	23	2	25	0	23	2	95	5	95	Konfirmasi resisten
Lahat	24	1	25	0	24	1	25	0	98	2	98	Rentan
Oku	25	0	25	0	24	1	24	1	98	2	98	Rentan

KD: *knock down*

Tabel 3. Hasil *pooling* sampel nyamuk

Asal kabupaten	Jumlah <i>pool</i>		Total <i>pool</i>
	<i>Anopheles vagus</i>	<i>Anopheles barbirostris</i>	
Muara Enim	17	2	19
Lahat	13	1	14
OKU	18	0	18
Total	48	3	51



Gambar 1. Hasil elektroforesis kodon 1014, menunjukkan pita amplifikasi pada 260 pb. Nomor 1–48 sampel nyamuk *Anopheles vagus*; dan 49–51: sampel nyamuk *Anopheles barbirostris*. Nomor a1–a7: nyamuk spesies lain yang tidak berlaku sebagai vektor (*Anopheles kochi*). Marker yang digunakan dari Promega 100bp DNA ladder.

An. barbirostris dari Kabupaten Lahat (Tabel 3). Nyamuk *An. kochi* yang bukan berlaku vektor (nonsampel) juga diekstraksi dan PCR, namun tidak disekuensing. Dari hasil elektroforesis semua nyamuk sampel *An. vagus* dan *An. barbirostris* serta nyamuk nonsampel (*An. kochi*) terlihat pita gen *VGSC* pada 260 pb (Gambar 1). Dari hasil tersebut, semua sampel dinilai cukup baik untuk dilakukan sekuensing untuk melihat ada atau tidaknya perubahan/mutasi pada gen tersebut.

Berdasarkan hasil sekuensing DNA sampel *An. vagus* dari Kabupaten Muara Enim, OKU, dan Lahat tidak ditemukan adanya mutasi gen *VGSC* kodon 1014, dengan tidak adanya perubahan titik mutasi leusin (TTA) menjadi fenilalanina (TTT) atau serina (TTC). Pada sampel yang tidak diuji kerentanan insektisida, yaitu *An. barbirostris*, juga tidak ditemukan adanya mutasi gen *VGSC* kodon 1014 (Gambar 2).

PEMBAHASAN

Penangkapan nyamuk yang dilakukan di tiga Kabupaten didapatkan spesies *An. vagus* sebagai spesies dominan. Ketiga kabupaten dengan kondisi geografis yang berdekatan memiliki iklim dan cuaca serta kondisi lingkungan yang sama, dimana habitat *An. vagus* dapat hidup dengan baik. Pengambilan sampel di sekitar lokasi kandang ternak juga dapat menjadi penyebab banyaknya *An. vagus* tertangkap. Nyamuk diduga dapat menjadi vektor bila jumlah populasinya mendominasi dan kontak terhadap manusia cukup tinggi. Hal ini dapat dinilai dengan perhitungan rata-rata aktivitas menggigit dan dilokasi lain telah terbukti berperan sebagai vektor (Munif 2009). Selain itu, *An. vagus* telah terbukti mengandung parasit *Plasmodium* (Elyazar et al. 2013; Budiyanto et al. 2017). *An. vagus* yang sebelumnya cenderung bersifat zoofilik sebagai nyamuk dominan yang ditemukan, ternyata memiliki aktivitas menggigit manusia cukup tinggi sehingga menjadi salah satu vektor potensial yang dapat menularkan parasit *Plasmodium* (Permadi et al. 2014; Munif 2009).

An. barbirostris ditemukan dalam jumlah sedikit karena habitatnya di hutan, sedangkan lokasi penelitian di sekitar kandang dekat pemukiman yang merupakan habitat *An. vagus* (Elyazar et

al. 2013). Berdasarkan riset khusus vektor dan reservoir yang dilakukan Balitbang Kemenkes RI (2016) di Kabupaten Lahat, didapatkan bahwa *An. barbirostris* terbukti menjadi vektor malaria dengan ditemukannya *Plasmodium*.

Selain *An. vagus*, nyamuk kedua terbanyak yang ditemukan, yaitu *An. kochi* dan dua spesies ini dikenal sebagai nyamuk kandang. Meskipun *An. kochi* belum menjadi vektor di Sumatra Selatan, tetapi spesies ini juga harus diwaspadai karena di Sulawesi telah terbukti menjadi vektor malaria (Munif 2009).

Pada hasil uji kerentanan terbukti piretroid masih bekerja optimal dalam *target site An. vagus* di Kabupaten OKU dan Lahat. Sebaliknya, di Kabupaten Muara Enim berdasarkan uji kerentanan ulang dapat diindikasikan adanya resistensi insektisida permetrin. Insektisida piretroid dapat masuk ke dalam tubuh organisme serangga (*mode of action*), antara lain melalui *non stereo specific* dengan penetrasi ke dalam lapisan epidermis, ke dalam aliran darah atau *hemolymph carrier protein* dan masuk ke dalam tubuh (Silva et al. 2014). Berdasarkan penelitian Ibrahim et al. (2014) dan Widiarti et al. (2012) bahwa tidak semua nyamuk yang resisten dari uji kerentanan menunjukkan adanya mutasi gen *VGSC*. Hal ini karena nyamuk bisa saja sensitif terhadap satu jenis insektisida tapi resisten terhadap insektisida jenis lainnya.

Berdasarkan hasil sekuensing DNA seluruh sampel pada penelitian ini, tidak terjadi perubahan/mutasi pada kodon 1014F dan leusin/TTA (*knockdown susceptible/kds allele/wild type*) pada spesies *An. vagus* menjadi fenilalanina/TTT (*knockdown resistance west (kd-w allele/ west african type)*) atau serina/TCA (*knockdown resistance east (kd-e allele/wes african type)*). Hal ini dapat menjadi kajian lanjutan mengingat kemungkinan akan munculnya mutasi gen *VGSC* pada kodon 1014F terutama di Kabupaten Muara Enim yang telah terkonfirmasi resisten terhadap permetrin. Berdasarkan penelitian Ibrahim et al. (2014) dan Widiarti et al. (2012) bahwa tidak semua nyamuk yang resisten dari uji kerentanan menunjukkan adanya mutasi gen *VGSC*.

Selain mutasi *target site* insektisida, adanya mekanisme resistensi metabolisme melalui mutasi gen enzim-enzim detoksifikasi juga menjadi penyebab munculnya resistensi. Karena banyak

1014L

Sampel 1 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 2 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 3 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 4 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 5 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 6 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 7 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 8 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 9 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 10 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 11 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 12 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 13 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 14 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 15 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 16 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 17 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 18 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 19 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 20 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 21 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 22 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 23 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 24 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 25 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 26 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 27 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 28 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 29 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 30 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 31 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 32 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 33 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 34 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 35 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 36 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 37 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 38 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 39 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 40 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 41 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 42 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 43 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 44 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 45 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 46 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 47 : <i>An. vagus</i>	AGTAATAGGAAATTTA	GTGGTATGTATCAATGAAGA
Sampel 48 : <i>An. barbirostris</i>	TAATAGGAAATTTA	GTGGTACGTACGCAGATAGTTT
Sampel 49 : <i>An. barbirostris</i>	TAATAGGAAATTTA	GTGGTACGTACGCAGATAGTTT
Sampel 50 : <i>An. barbirostris</i>	TAATAGGAAATTTA	GTGGTACGTACGCAGATAGTTT
Sampel 51 : <i>An. barbirostris</i>	TAATAGGAAATTTA	GTGGTACGTACGCAGATAGTTT

Gambar 2. Hasil perunutan 51 sampel. Sampel nomor 1–47: *Anopheles vagus*; sampel nomor 48–51: *Anopheles barbirostris*. Pada urutan basa di titik kodon 1014 tidak ditemukan perubahan TTA (leusin) menjadi TTT (fenilalanina)/L1014F atau TTA (leusin) menjadi TCA (serina)/L1014S.

faktor yang berpengaruh terhadap munculnya resistensi maka penggunaan insektisida termasuk LLINs dan IRS harus dilakukan *monitoring/pemantauan* secara terus menerus untuk mendukung keberhasilan pengendalian penyakit malaria (Briët et al. 2013).

KESIMPULAN

Pada penelitian ini disimpulkan bahwa *An. vagus* terkonfirmasi resisten terhadap insektisida permetrin di Kabupaten Muara Enim, sedangkan di Kabupaten OKU dan Lahat masih berstatus rentan terhadap insektisida permetrin. Mutasi gen *VGSC* alel *kdr* pada kodon 1014 pada nyamuk *Anopheles* sp. tidak ditemukan di tiga kabupaten/kota di Provinsi Sumatra Selatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai melalui dana Hibah Penelitian Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Subdit Pengendalian Vektor dan BPP Ditjen P2P Kemenkes RI; Laboratorium Parasit dan Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya; Dinas Kesehatan Provinsi Sumatra Selatan; Dinas Kesehatan Kabupaten Muara Enim, Dinas Kesehatan Kabupaten OKU, Dinas Kesehatan Kabupaten Lahat dan staf yang terlibat dalam penelitian ini; Kepala beserta staf Puskesmas tempat penelitian dilaksanakan; Balai Litbang P2B2 Baturaja; serta semua pihak yang telah membantu langsung maupun tidak langsung termasuk dalam memberikan saran untuk penyusunan tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aïzoun N, Aïkpon R, Akogbéto M. 2014. Evidence of increasing L1014F *kdr* mutation frequency in *Anopheles gambiae* s.l. pyrethroid resistant following a nationwide distribution of LLINs by the Beninese National Malaria Control Programme. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4:239–243. doi: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60238-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60238-0).
- Balitbang Kemenkes RI. 2016. *Diseminasi Hasil Riset Khusus Vektor dan Rervoir Penyakit Provinsi Sumatra Selatan Tahun 2015*. Laporan. Jakarta: Kemenkes RI.
- Boewono D. 2011. *Kunci Identifikasi Nyamuk Bergambar Beberapa Spesies Anopheles di Daerah Oriental (Indonesia Bagian Barat dan Tengah)*. Salatiga: B2P2VRP Salatiga.
- Briët OJ, Penny MA, Hardy D, Awolola TS, Van Bortel W, Corbel V, Dabiré RK, Etang J, Koudou BG, Tunku PK, Chitnis N. 2013. Effects of pyrethroid resistance on the cost effectiveness of a mass distribution of long-lasting insecticidal nets: a modelling study. *Malaria Journal* 12:77. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-77>.
- Budiyanto A, Ambarita LP, Salim M. 2017. Konfirmasi *Anopheles sinensis* dan *Anopheles vagus* sebagai vektor malaria di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatra Selatan. *Aspirator* 9:51–60 doi: <https://doi.org/10.22435/aspirator.v9i2.5998.51-60>.
- Dinas Kesehatan Provinsi Sumatra Selatan. 2017. *Situasi Terkini Malaria Sumsel Tahun 2017*. Laporan. Palembang: Bidang P2P Dinas Kesehatan Provinsi Sumatra Selatan.
- Dinas Kesehatan Provinsi Sumatra Selatan, 2016. *Situasi Terkini Malaria Sumsel Tahun 2016*. Laporan. Palembang: Bidang P2P Dinas Kesehatan Provinsi Sumatra Selatan.
- Du Y, Nomura Y, Satar G, Hu Z, Nauen R, He SY, Zhorov BS, Dong K. 2013. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:11785–11790. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1305118110>.
- Elyazar IRF, Sinka ME, Gething PW, Tarmidzi SN, Surya A, Kusriastuti R, Winarno, Baird JK, Hay SI, Bangs MJ. 2013. The distribution and bionomics of *Anopheles* malaria vector mosquitoes in Indonesia, Di dalam: Rollinson D (Ed.) *Advances in Parasitology*. hlm. 173–266. London: Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407705-8.00003-3>.
- Glunt KD, Abílio AP, Bassat Q, Buloh, Gilbert AE, Huijben S, Manaca MN, Macete E, Alonso P, Paaijmans KP. 2015. Long-lasting insecticidal nets no longer effectively kill the highly resistant *Anopheles funestus* of Southern Mozambique. *Malaria Journal* 14:298. doi: <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0807-z>.
- Ibrahim SS, Manu YA, Tukur Z, Irving H, Wondji CS. 2014. High frequency of *kdr* L1014F is associated with pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzii*

- in Sudan Savannah of Northern Nigeria. *BMC Infectious Diseases* 14:441 doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-441>.
- Kitau J, Oxborough R, Kaye A, Chen-Hussey V, Isaacs E, Matowo J, Kaur H, Magesa SM, Moshia F, Rowland M, Logan J. 2014. Laboratory and experimental hut evaluation of a long-lasting insecticide treated blanket for protection against mosquitoes. *Parasites & Vectors* 7:129. doi: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-129>.
- Liu N. 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annual Review of Entomology* 60:537–559. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>.
- Munif A. 2009. Nyamuk vektor malaria dan hubungannya dengan aktivitas kehidupan manusia di Indonesia. *Aspirator* 1:94–102.
- Nwane P, Etang J, Chouaïbou M, Toto J, Mimpfoundi R, Simard F. 2011. Kdr-based insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.s populations in. *BMC Research Notes* 4:463. doi: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-463>.
- O'Connor C, Soepanto A. 1999. *Kunci Bergambar Nyamuk Anopheles Dewasa di Indonesia*. Jakarta: Direktorat Pemberantasan Penyakit Bersumbu Binatang Direktorat Jenderal PPM & PL.
- Permadi IGWD, Wibowo T, Wigati. 2014. *Anopheles vagus* sebagai tersangka vektor di Indonesia. *Spirakel* 6:33–36.
- Schleier III JJ, Peterson RKD. 2011. Pyrethrins and pyrethroid insecticides. Di dalam: López Ó, Fernández-Bolaños JG (Eds.), *Green Trends in Insect Control*. hlm. 94–131. Cambridge: Royal Society of Chemistry. doi: <https://doi.org/10.1039/9781849732901-00094>.
- Silva APB, Santos JMM, Martins AJ. 2014. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids—a review. *Parasites & Vectors* 7:450. doi: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-450>.
- Syafruddin D, Hidayati AP, Asih PB, Hawley WA, Sukowati S, Lobo NF. 2010. Detection of 1014F kdr mutation in four major Anopheline malaria vectors in Indonesia. *Malaria Journal* 9:315. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-315>.
- [WHO] World Health Organization. 2016. *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes*. Geneva: WHO.
- Widiarti, Garjito TA, Tunjungsari R, Asih PB, Syafruddin D. 2012. Identifikasi mutasi noktah pada gen *voltage gated sodium channel Aedes aegypti* resisten terhadap insektisida pyrethroid di Semarang Jawa Tengah. *Buletin Penelitian Kesehatan* 40:31–38.
- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto MC. 2010. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal* 9: 83. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-83>.