



**DETEKSI RESISTENSI *Aedes aegypti* TERHADAP  
SIPERMETRIN MENGGUNAKAN TEKNIK  
*POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)  
DI AMBARAWA KABUPATEN SEMARANG  
TAHUN 2019**

**SKRIPSI**

Diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk  
Memperoleh Gelar Sarjana Kesehatan Masyarakat

**Disusun oleh:**

Laila Fitriani

NIM 6411415099

**JURUSAN ILMU KESEHATAN MASYARAKAT  
FAKULTAS ILMU KEOLAHRAGAAN  
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG**

**2019**

## ABSTRAK

Laila Fitriani

### **Deteksi Resistensi *Aedes aegypti* terhadap Sipermetrin Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Ambarawa Kabupaten Semarang Tahun 2019**

XIX + 102 halaman + 11 tabel + 17 gambar + 8 lampiran

Kecamatan Ambarawa adalah salah satu kecamatan endemis sejak tahun 2017 selalu menyumbang kasus DBD tertinggi di Kabupaten Semarang. Deteksi resistensi *Aedes aegypti* terhadap sipermetrin secara molekuler menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian dilakukan untuk melihat adanya mutasi pada gen VGSC *Ae. aegypti*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni. Sampel *Ae. aegypti* yang diperiksa berjumlah 10 tiap kelurahan diambil dari 3 kelurahan endemis DBD dengan intensitas fogging tinggi di Ambarawa. Pengambilan sampel menggunakan teknik *random sampling* diambil dengan ovitrap yang terlebih dahulu telah dipasang selama Bulan Agustus. Uji deteksi resistensi dengan metode PCR dilakukan di Balai Litbangkes Banjarnegara pada Bulan September. Data dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan hasil penelitian.

Hasil penelitian menunjukkan di Kelurahan Tambakboyo 2 sampel susceptible (V/V), 7 sampel terdeteksi resisten homozigot (G/G), 1 sampel terdeteksi resisten heterozigot (V/G); di Kelurahan Kupang 5 sampel terdeteksi resisten homozigot (G/G) dan 5 sampel terdeteksi resisten heterozigot (V/G); dan di Kelurahan Panjang 1 sampel susceptible (V/V), 8 sampel terdeteksi resisten homozigot (G/G), 1 sampel terdeteksi resisten heterozigot (V/G).

Berdasarkan hasil penelitian mutasi telah ditemukan pada gen VGSC pada kodon V1016G. Pelaksanaan manajemen penggunaan, pemilihan, dan rotasi jenis insektisida secara tepat diharapkan dapat mengurangi resiko terjadinya resistensi pada populasi nyamuk *Ae. aegypti*.

**Kata kunci:** Resistensi, *Aedes aegypti*, Sipermetrin, PCR

**Kepustakaan:** 62 (1992-2019)

## ABSTRACT

Laila Fitriani

### **Detection of *Aedes aegypti* Resistance towards Sipermetrin with Polymerase Chain Reaction (PCR) Techniques in Ambarawa Semarang Regency 2019**

XIX + 102 pages + 11 tables + 17 images + 8 appendices

Ambarawa Regency is one of the endemic sub-districts since 2017 which always accounts for the highest DHF cases in Semarang Regency. Molecular detection of *Aedes aegypti* resistance towards sipermetrin using Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques. The study was conducted to see mutations in the *Ae. aegypti* VGSC gene.

This research was a true experimental study. The *Ae. aegypti* samples examined were 10 in every village taken from 3 endemic DHF villages with high fogging intensity in Ambarawa. The research used random sampling techniques taken with ovitrap which was first installed during the month of August. Resistance detection test using the PCR method were conducted at the Banjarnegara Research and Development Center in September. Data were analyzed descriptively to illustrate the results of the study.

The results showed that in Tambakboyo Village, 2 samples were susceptible (V/V), 7 samples were detected as homozygous (G/G) resistant, 1 sample was detected as heterozygous (V/G) resistant; in Kupang District 5 samples were detected as being homozygous resistant (G/G) and 5 samples were detected as heterozygous resistant (V/G); and in Panjang Village 1 susceptible sample (V/V), 8 samples were detected as homozygous resistant (G/G), 1 sample was detected as heterozygous resistant (V/G).

Based on the results of mutation studies have been found in the VGSC gene in codon V1016G. The proper implementation of management, selection and rotation of insecticides is expected to reduce the risk of resistance in the *Ae. aegypti* mosquito population.

**Keywords:** Resistance, *Aedes aegypti*, Cypermethrin, PCR

**Literatures:** 62 (1992-2019)

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam pustaka.

Semarang, 19 Juni 2019

Penulis,



  
Laila Fitriani  
NIM 6411415099

**PENGESAHAN**

Skripsi dengan judul “Deteksi Resistensi *Aedes aegypti* terhadap Sipermetrin Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Ambarawa Kabupaten Semarang Tahun 2019” yang disusun oleh Laila Fitriani, NIM 6411415099 telah dipertahankan di hadapan panitia ujian pada Ujian Skripsi Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Ilmu Keolahragaan, Universitas Negeri Semarang, yang dilaksanakan pada:

Hari, tanggal : Senin, 18 November 2019

Tempat : Ruang Ujian Jurusan IKM A



Panitia Ujian

Prof. Dr. Pardiyo Rahayu, M.Pd.  
NIP.196103201984032001

Sekretaris,

Mardiana, S.K.M., M.Si.  
NIP 198004202005012003

Dewan Penguji

Tanggal

Penguji I drh. Dyah Mahendrasari S, M.Sc.  
NIP 198303092008122001

6 Desember 2019

Penguji II Lukman Fauzi, S.K.M., M.P.H.  
NIP 198811122015041002

9 Desember 2019

Penguji III Dr. Widya Hary C, S.K.M., M.Kes(Epid).  
NIP 197712272005012001

10 Desember 2019

## PRAKATA

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, shalawat dan salam penulis limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW atas hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyusun skripsi yang berjudul “Deteksi Resistensi *Aedes aegypti* terhadap Sipermetrin Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Wilayah Kerja Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang Tahun 2019”. Penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan berkat motivasi, dukungan, bimbingan, arahan, dan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Tandiyo Rahayu, M.Pd., selaku Dekan Fakultas Ilmu Keolahragaan Universitas Negeri Semarang atas izin penelitian.
2. Dr. Irwan Budiono, S.K.M., M.Kes(Epid)., selaku Ketua Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Ilmu Keolahragaan, Universitas Negeri Semarang atas izin penelitian.
3. Dr. Widya Hary Cahyati, S.K.M., M.Kes(Epid)., selaku Dosen Pembimbing atas bimbingan, arahan, masukan, dan dukungannya selama penyusunan skripsi ini.
4. drh. Dyah Mahendrasari Sukendra, M.Sc., selaku Dosen Penguji I atas bimbingan, saran, dan masukan dalam perbaikan skripsi ini.
5. Lukman Fauzi, S.K.M., M.P.H., selaku Dosen Penguji II atas bimbingan, saran, dan masukan dalam perbaikan skripsi ini.
6. Mardiana, S.K.M. M.Si., selaku Pendamping Akademik yang telah mendampingi sejak awal perkuliahan hingga akhir.
7. Staf pengajar dan Staf administrasi Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat, atas dukungan dan bantuan, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
8. Petugas Sanitarian Puskesmas Ambarawa, Bapak Sunaryono atas dukungan dan bantuan serta keterlibatan dalam lancarnya pelaksanaan penelitian ini.
9. Kepala Balai Litbang Kesehatan Kelas 1 Banjarnegara, atas izin penelitian yang diberikan dan Petugas Laboratorium Biomolekuler Ibu Dyah, Ibu

Isya, Ibu Ani, dan Bapak Wella atas bantuan pelaksanaan penelitian ini serta kesabaran dalam memberikan ilmu baru bagi peneliti.

10. Kader Busungan, Kelurahan Tambakboyo (Ibu Kurtiningsih), Kader Kupang Dukuh, Kelurahan Kupang (Ibu Djalal), dan Kader Kelurahan Panjang (Ibu Chatrin) atas bantuan yang diberikan.
11. Orangtua yang tersayang dan tercinta, Bapak Cahyono dan Ibu Mundriyah, keluarga tersayang, adikku Rosi, kakakku Mila dan Mela, keponakanku Abiel, yang selalu mendoakan dengan tulus ikhlas dan memberikan semangat tiada henti serta memberikan dukungan secara moral dan material.
12. Sahabat dan teman-teman terbaik yang selalu memberikan motivasi dan dukungan.

Semoga amal baik yang telah diberikan bagi seluruh pihak yang terlibat mendapatkan balasan yang setimpal dari Yang Maha Kuasa. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih belum sempurna, sehingga membutuhkan kritik dan saran yang bersifat membangun.

Semarang, 19 September 2019

Penulis

Laila Fitriani

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
ABSTRAK .....	ii
<i>ABSTRACT</i> .....	iii
PERNYATAAN.....	iv
PENGESAHAN .....	v
PRAKATA.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. LATAR BELAKANG.....	1
1.2. RUMUSAN MASALAH .....	5
1.3. TUJUAN PENELITIAN .....	5
1.4. MANFAAT PENELITIAN.....	5
1.4.1. Manfaat Bagi Masyarakat .....	5
1.4.2. Manfaat Bagi Instansi Pemerintah .....	6
1.4.3. Manfaat Bagi Peneliti.....	6
1.5. KEASLIAN PENELITIAN.....	6
1.6. RUANG LINGKUP PENELITIAN .....	8
1.6.1. Ruang Lingkup Tempat.....	8
1.6.2. Ruang Lingkup Waktu .....	8
1.6.3. Ruang Lingkup Keilmuan.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. LANDASAN TEORI.....	9
2.1.1. Resistensi .....	9
2.1.2. Tinjauan Tentang Vektor DBD di Kabupaten Semarang .....	13
2.1.3. Insektisida .....	20
2.1.4. Sipermetrin.....	24
2.1.5. Kode Genetik .....	26
2.1.6. Mutasi DNA.....	29
2.1.7. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	33
2.2. KERANGKA TEORI.....	37
BAB III METODE PENELITIAN.....	38
3.1. ALUR PIKIR .....	38
3.2. FOKUS PENELITIAN.....	38
3.3. HIPOTESIS PENELITIAN.....	38
3.4. JENIS DAN RANCANGAN PENELITIAN .....	39
3.5. DEFINISI OPERASIONAL DAN SKALA PENGUKURAN.....	39
3.6. SAMPEL PENELITIAN .....	39
3.7. BAHAN DAN ALAT .....	43
3.7.1. Bahan dan Alat Pembuatan Ovitrap.....	43
3.7.2. Bahan dan Alat Penelitian di Laboratorium.....	43

3.8. PROSEDUR PENELITIAN .....	51
3.8.1. Persiapan Larva Nyamuk <i>Aedes aegypti</i> Instar IV .....	51
3.8.2. Pelaksanaan Penelitian .....	52
3.9. TEKNIK ANALISIS DATA .....	56
BAB IV HASIL PENELITIAN .....	58
4.1. GAMBARAN UMUM .....	58
4.2. HASIL PENELITIAN .....	61
BAB V PEMBAHASAN .....	67
5.1. PEMBAHASAN .....	67
5.2. HAMBATAN DAN KELEMAHAN PENELITIAN .....	74
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN .....	76
6.1. SIMPULAN .....	76
6.2. SARAN .....	76
DAFTAR PUSTAKA .....	77
LAMPIRAN .....	81

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Keaslian Penelitian .....	6
Tabel 2.1.	Daftar Kodon.....	27
Tabel 2.2.	Kode Genetik <i>Aedes aegypti</i> .....	28
Tabel 3.1.	Definisi Operasional, Cara Pengukuran, dan Skala .....	39
Tabel 3.2.	Jumlah Rumah diperiksa untuk Mendeteksi Larva .....	40
Tabel 3.3.	Urutan Basa Forward Primer dan Reverse Primer .....	54
Tabel 4.1.	Rincian Jumlah RT dan RW di Wilayah Kerja Puskesmas Ambarawa .....	59
Tabel 4.2.	Hasil Pemeriksaan Sampel Larva <i>Aedes aegypti</i> dari Kelurahan Tambakboyo.....	64
Tabel 4.3.	Hasil Pemeriksaan Sampel Larva <i>Aedes aegypti</i> dari Kelurahan Kupang .....	65
Tabel 4.4.	Hasil Pemeriksaan Sampel Larva <i>Aedes aegypti</i> dari Kelurahan Panjang .....	65
Tabel 4.5.	Hasil Pemeriksaan Sampel Larva <i>Aedes aegypti</i> menurut Kelurahan .....	66

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Telur Nyamuk <i>Ae. aegypti</i> .....	13
Gambar 2.2. Larva <i>Ae. aegypti</i> Instar I.....	15
Gambar 2.3. Larva <i>Ae. aegypti</i> Instar II .....	15
Gambar 2.4. Larva <i>Ae. aegypti</i> Instar III .....	16
Gambar 2.5. Larva <i>Ae. aegypti</i> Instar IV .....	16
Gambar 2.6. Pupa <i>Ae. aegypti</i> .....	17
Gambar 2.7. Nyamuk <i>Ae. aegypti</i> Dewasa .....	17
Gambar 2.8. Siklus PCR.....	36
Gambar 2.9. Kerangka Teori .....	37
Gambar 3.1. Alur Pikir .....	38
Gambar 3.2. Proses Penelitian .....	56
Gambar 4.1. Hasil PCR pada Gel Doc Sampel Kode 448, 449, 450, 458, 459, 460, dan 461 .....	61
Gambar 4.2. Hasil PCR pada Gel Doc Sampel Kode 462, 463, 464, 465, 466, 468, 469, dan 470.....	62
Gambar 4.3. Hasil PCR pada Gel Doc Sampel Kode 451, 452, 453, 454, dan 455. ....	62
Gambar 4.4. Hasil PCR pada Gel Doc Sampel Kode 473, 471, 472, dan 456.....	63
Gambar 4.5. Hasil PCR pada Gel Doc Sampel Kode 477 dan 453. ....	63
Gambar 4.6. Hasil PCR pada Gel Doc Sampel Kode 467, 457, 474, 475, dan 476. ....	64

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Tugas Pembimbing.....	81
Lampiran 2. Surat Izin Penelitian dari Fakultas Ilmu Keolahragaan, UNNES.....	82
Lampiran 3. Surat izin penelitian dari Kesbangpol dan Dinas Kesehatan.....	84
Lampiran 4. Salinan <i>Ethical Clearance</i> .....	86
Lampiran 5. Surat Keterangan Selesai Penelitian .....	87
Lampiran 6. Instrumen Penelitian .....	89
Lampiran 7. Data Mentah Hasil Penelitian .....	90
Lampiran 8. Dokumentasi.....	93

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. LATAR BELAKANG**

Penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus *Dengue* yang tergolong *Arthropod-Borne Virus*, genus *Flavivirus*, dan famili *Flaviviridae*. DBD ditularkan melalui gigitan nyamuk dari genus *Aedes*, terutama *Aedes aegypti* atau *Aedes albopictus*. Penyakit DBD dapat muncul sepanjang tahun dan dapat menyerang seluruh kelompok umur. Penyakit ini berkaitan dengan kondisi lingkungan dan perilaku masyarakat (Kemenkes RI, 2017).

Penyakit DBD merupakan masalah kesehatan utama bagi setengah dari populasi dunia. Data WHO tahun 2014 mencatat 198 juta kasus DBD terjadi secara global dan penyebab 584.000 kematian pada tahun 2013. Tahun 2015 WHO memperkirakan ada 214 juta kasus baru DBD dengan kematian sekitar 438.000 orang di seluruh dunia (WHO, 2014). DBD menyebar di seluruh wilayah Indonesia, di beberapa daerah mempunyai tingkat endemisitas yang cukup tinggi. Tahun 2017 kasus DBD berjumlah 68.407 kasus, dengan jumlah kematian sebanyak 493 orang. Angka Bebas Jentik (ABJ) secara nasional belum mencapai target program yang sebesar  $\geq 95\%$  (Kemenkes RI, 2017). Penyakit DBD masih merupakan permasalahan serius di Provinsi Jawa Tengah, dari 35 kabupaten/kota seluruhnya sudah terjangkit penyakit DBD (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, 2017). *Incidence Rate* (IR) DBD Kabupaten Semarang tahun 2018

sebesar 16,63 per 100.000 penduduk, sedangkan *Case Fatality Rate* (CFR) sebesar 1,16%. Meskipun IR mengalami penurunan, Kabupaten Semarang merupakan salah satu kabupaten/kota di Jawa Tengah dengan kasus DBD tinggi (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, 2018).

Kasus DBD menurut puskesmas di Kabupaten Semarang tahun 2015-2017 menunjukkan 3 puskesmas dengan jumlah kasus tertinggi berturut-turut yaitu Puskesmas Ambarawa, Puskesmas Bergas, dan Puskesmas Pringapus. Puskesmas Ambarawa jumlah kasus 247 kasus dan 2 kasus kematian, dengan jumlah penduduk 62.310. Puskesmas Pringapus jumlah kasus 235 kasus dan 1 kasus kematian, dengan jumlah penduduk 57.344. Puskesmas Bergas jumlah kasus 216 kasus dan 3 kasus kematian, dengan jumlah penduduk 85.022 (Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang, 2017). IR DBD per 100.000 penduduk di Kecamatan Ambarawa pada tahun 2018 yaitu 30,5 per 100.000 penduduk dan CFR tahun 2018 sebesar 5,3%. Data suspek DBD Puskesmas Ambarawa tahun 2015-2019 menurut desa/kelurahan menunjukkan 3 desa/kelurahan dengan jumlah kasus tertinggi adalah Kelurahan Kupang sebanyak 66 kasus dengan jumlah penduduk 14.850; Kelurahan Panjang 45 kasus dengan jumlah penduduk 8.557; dan Kelurahan Tambakboyo 28 kasus dan 1 kasus kematian dengan jumlah penduduk 5.699 (Puskesmas Ambarawa, 2019).

Data Puskesmas Ambarawa tahun 2019 menunjukkan bahwa di wilayah kerja Puskesmas Ambarawa sepanjang tahun 2016-2019 telah dilakukan fogging sebanyak 47 kali yang dilakukan di 8 kelurahan dari 10 kelurahan. Fogging dilaksanakan oleh Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang diantaranya 9 kali di

Kelurahan Kupang, 8 kali di Kelurahan Panjang, dan 5 kali di Kelurahan Tambakboyo menggunakan insektisida merk dagang zeta 15 UL yang mengandung bahan aktif utama zeta-sipermetrin 15 g/l (Puskesmas Ambarawa, 2019). Kecamatan Ambarawa adalah salah satu kecamatan endemis sejak tahun 2017 selalu menyumbang kasus DBD tertinggi (Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang, 2017).

Sipermetrin adalah insektisida golongan piretroid yang sering digunakan sebagai salah satu bahan aktif dalam aplikasi fogging di Indonesia (Arasy & Nurwidayati, 2017). Fogging yang dilakukan di Jawa Tengah menggunakan insektisida malathion dan *cynof* (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, 2011). Insektisida piretroid yang paling lama (lebih dari 10 tahun) dan sering digunakan di Jawa Tengah adalah jenis sipermetrin (Sayono et al., 2012). Berdasarkan data Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang, wilayah kerja Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang telah menggunakan insektisida sipermetrin sejak tahun 2013 sampai sekarang (Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang, 2017). Sipermetrin telah digunakan sebagai bahan aktif pengendalian vektor di Indonesia sehingga menyebabkan adanya resistensi terhadap sipermetrin (Susanti & Boesri, 2012). Penelitian di Yogyakarta melaporkan bahwa *Ae. aegypti* telah resisten terhadap sipermetrin 0,05% dengan angka kematian rata-rata 4,03% (Mulyani et al., 2017).

Sipermetrin dapat berikatan dengan protein pada saraf yang dikenal sebagai *voltage-gate sodium channel*. Ikatan tersebut akan mencegah penutupan *voltage-gate sodium channel* secara normal sehingga menyebabkan ion natrium tetap mengalir pada membran saraf dan akan timbul impuls ganda. Timbulnya

impuls ganda akan menginduksi pengeluaran neurotransmitter asetilkolin dan menstimulasi saraf lainnya sehingga menimbulkan kelumpuhan hingga kematian serangga dalam waktu singkat (Cox, 2009).

Deteksi resistensi vektor terhadap insektisida dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu deteksi secara konvensional dengan metode standar WHO *susceptibility test* menggunakan impregnated paper, deteksi secara biokimia atau enzimatis menggunakan mikroplate, dan deteksi secara molekuler. Prinsip dasar deteksi resistensi pada vektor secara molekuler adalah mengidentifikasi gen yang menjadi target kelompok insektisida secara konvensional, salah satunya adalah gen *voltage gated sodium channel* (VGSC). Pada serangga yang telah resisten terhadap insektisida kelompok *pyrethroid* dan DDT mekanisme resistensi penting adalah terjadinya perubahan atau mutasi pada gen VGSC (Widiarti et al., 2012). Secara molekuler pada gen VGSC terjadi perubahan satu basa nukleotida pada asam amino valin menjadi glisin, dimana terjadi transisi basa timin dengan guanin pada susunan GTA menjadi GGA yang berkaitan dengan resistensi. Uji molekuler digunakan untuk mendeteksi resistensi piretroid pada *Ae. aegypti* dengan cara menemukan mutasi titik gen VGSC sebagai resistensi target (Ghiffari et al., 2013). Mutasi gen VGSC di beberapa posisi dapat terjadi secara bersamaan dalam satu nyamuk individu dan efek yang mungkin akan lebih besar pada sifat resistensi nyamuk (Widiastuti et al., 2015).

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah salah satu metode yang digunakan dalam melipatgandakan DNA. PCR penting digunakan sebagai alat diagnostik untuk mendeteksi dan menentukan serotipe virus. Penelitian ini

menggunakan metode PCR dengan mendeteksi mutasi DNA gen VGSC. Mutasi gen VGSC menandai adanya resistensi. Dengan demikian, peneliti ingin meneliti tentang “Deteksi Resistensi *Aedes aegypti* terhadap Sipermetrin Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Ambarawa Kabupaten Semarang Tahun 2019”.

## **1.2. RUMUSAN MASALAH**

Bagaimana status resistensi *Aedes aegypti* terhadap sipermetrin menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Ambarawa Kabupaten Semarang tahun 2019?

## **1.3. TUJUAN PENELITIAN**

Untuk mengetahui status resistensi *Aedes aegypti* terhadap sipermetrin menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Ambarawa Kabupaten Semarang tahun 2019.

## **1.4. MANFAAT PENELITIAN**

### **1.4.1. Manfaat Bagi Masyarakat**

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan wawasan dan pencerahan kepada masyarakat secara khusus terkait status resistensi vektor utama DBD yaitu *Ae. aegypti* terhadap insektisida.

### 1.4.2. Manfaat Bagi Instansi Pemerintah

Bagi Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi rekomendasi penggunaan insektisida tertentu dalam pengendalian penyakit tular vektor, terutama DBD.

### 1.4.3. Manfaat Bagi Peneliti

Bagi peneliti sendiri hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dan wawasan, meningkatkan kebermanfaatan, serta dapat menerapkan pembelajaran secara langsung sebagai wujud pengabdian kepada masyarakat.

## 1.5. KEASLIAN PENELITIAN

**Tabel 1.1. Keaslian Penelitian**

No	Peneliti	Judul	Rancangan Penelitian	Variabel	Hasil Penelitian
1	Widiarti, Damar Tri Boewono, Triwibowo Ambar Garjito, Rima Tunjungsari, Puji BS Asih, Din Syafuruddin (Widiarti, Boewono, Syafuruddin, Garjito, Tunjungsari, & Asih, 2012)	Identifikasi mutasi noktah pada gen <i>voltage gated sodium channel Aedes aegypti</i> resisten terhadap insektisida pyrethroid di Semarang Jawa Tengah.	Eksperimen murni.	Insektisida piretroid, mutasi noktah pada gen <i>voltage gated sodium channel Ae. aegypti</i> .	Mutasi pada kodon 1014 dari leusin(TTA) menjadi fenilalanin (TTT) tipe kdr-w, gen VGSC pada nyamuk <i>Ae. aegypti</i> yang berkaitan dengan resistensi terhadap insektisida kelompok pyrethroid.
2	Ahmad Ghiffari, Humairo Fatimi, Chairil Anwar	Deteksi resistensi insektisida sintetik piretroid pada <i>Aedes aegypti</i>	Eksperimen murni.	Deteksi resistensi insektisida sintetik piretroid, teknik	Mutasi gen VGSC pada titik Val1016Ile; sebagai pembuktian mekanisme

	(Ghiffari, Fatimi, & Anwar, 2013).	(1.) strain Palembang menggunakan teknik <i>polymerase chain reaction</i> .		<i>polymerase chain reaction</i> .	resistensi yang bersifat <i>target site</i> insektisida sintetik piretroid pada vektor dengue, <i>Ae. Aegypti</i> di Palembang.
3	Dyah Widiastuti, Sunaryo, Nova Pramestuti, Tika Fiona Sari, Nastiti Wijayanti (Widiastuti, Sunaryo, Pramestuti, Sari, & Wijayanti, 2015).	Deteksi mutasi V1016G pada Gen <i>Voltage-Gated Sodium Channel</i> pada populasi <i>Aedes aegypti</i> ( <i>Diptera: Culicidae</i> ) di Kabupaten Klaten, Jawa Tengah dengan metode <i>Allele-Specific PCR</i> .	Eksperimen murni.	Mutasi gen VGSC, metode <i>Allele-specific PCR</i> .	22,7% nyamuk belum mengalami mutasi (V/V), 59,1% nyamuk mengalami mutasi heterozigot (V/G), dan 18,2% nyamuk mengalami mutasi homozigot (G/G).
4	Aditya Yudhana, Ratih Novita Praja, Maya Nurwartanti Yunita (Yudhana, Praja, & Yunita, 2017).	Deteksi gen resisten insektisida organofosfat pada <i>Aedes aegypti</i> di Banyuwangi, Jawa Timur menggunakan <i>polymerase chain reaction</i> .	Eksperimen murni.	Deteksi gen resisten insektisida organofosfat, <i>polymerase chain reaction</i> .	Hasil deteksi gen melalui PCR didapatkan <i>band</i> yang muncul dengan panjang 250 bp. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen VGSC telah terdeteksi pada sampel yang diuji.

Beberapa hal yang membedakan penelitian ini dengan penelitian-penelitian sebelumnya adalah tempat penelitian. Penelitian dengan judul sejenis belum pernah di lakukan di Kabupaten Semarang.

## **1.6. RUANG LINGKUP PENELITIAN**

### **1.6.1. Ruang Lingkup Tempat**

Penelitian ini dilakukan di wilayah kerja Puskesmas Ambarawa. Pengujian dilakukan di Laboratorium Balai Litbang Kesehatan Kelas I Banjarnegara.

### **1.6.2. Ruang Lingkup Waktu**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Agustus sampai bulan September 2019.

### **1.6.3. Ruang Lingkup Keilmuan**

Penelitian ini merupakan penelitian berbasis ilmu kesehatan masyarakat bidang entomologi yaitu mengenai pengendalian vektor DBD *Ae. aegypti*.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. LANDASAN TEORI**

##### **2.1.1. Resistensi**

###### 2.1.1.1. Pengertian Resistensi

Resistensi vektor merupakan suatu kemampuan populasi serangga untuk bertahan terhadap suatu dosis insektisida yang dalam keadaan normal dapat membunuh serangga tersebut. Resistensi dapat berlangsung secara cepat ataupun lambat. Faktor pendukung terjadinya resistensi yaitu penggunaan insektisida yang sama secara terus menerus, penggunaan bahan aktif atau formulasi yang mempunyai aktifitas sama, efek residual lama, dan faktor biologis vektor (Kemenkes RI, 2012).

###### 2.1.1.2. Mekanisme Resistensi

Mekanisme resistensi suatu serangga terhadap insektisida dapat dibagi menjadi 3 yaitu:

1. Peningkatan detoksifikasi dalam tubuh insektisida oleh karena bekerjanya enzim-enzim tertentu, seperti enzim *mixed function oxidase*, hidrolase, esterase, dan *glutathion-S-transferase*.
2. Penurunan kepekaan tempat sasaran insektisida pada tubuh serangga yang berupa insensitivitas saraf dan insensitivitas enzim asetilkolinesterase (AChE).
3. Penurunan laju penetrasi insektisida melalui kulit atau integumen (Untung, 2004).

Proses terjadinya penurunan resistensi pada beberapa serangga termasuk nyamuk dapat dipengaruhi oleh 3 faktor, yaitu:

1. Faktor genetik, diketahui adanya sejumlah gen yang berperan dalam pengendali resisten (R-gen), baik dominan atau resesif, homozigot maupun heterozigot yang terdapat pada nyamuk maupun serangga lainnya. Faktor genetik seperti gen-gen yang menjadi pembentukan enzim esterase, yang dapat menyebabkan resistensi serangga terhadap insektisida organofosfat dan piretroid. Faktor genetik lain seperti adanya gen *knockdown resistance* (*kdr*) sehingga serangga resisten terhadap DDT dan dieldrin.
2. Faktor biologis, meliputi biotik (adanya pergantian generasi, perkawinan monogami atau poligami, dan waktu berakhirnya perkembangan setiap generasi pada serangga di alam), perilaku serangga misalnya migrasi, isolasi, monofagi atau polifagi, serta kemampuan serangga di luar kebiasaannya dalam melakukan perlindungan terhadap bahaya atau perubahan tingkah laku.
3. Faktor operasional, meliputi bahan kimia yang digunakan dalam pengendalian vektor (golongan insektisida, kesamaan target dan sifat insektisida yang pernah digunakan, persistensi residu dan formulasi insektisida yang digunakan), serta aplikasi insektisida tersebut di lapangan (cara aplikasi, frekuensi, dan lama penggunaan).

Faktor operasional merupakan tekanan seleksi terhadap populasi serangga. Faktor operasional pertama adalah jenis insektisida yang digunakan. Jenis insektisida yang satu ternyata menyebabkan proses terjadinya resistensi lebih cepat dibandingkan dengan insektisida lainnya. Ada insektisida yang telah

digunakan selama berpuluh tahun tidak menimbulkan resistensi, tetapi ada insektisida yang baru dipakai beberapa tahun sudah menimbulkan resistensi. Penggunaan insektisida lain sebelumnya juga memiliki pengaruh (*cross resistance*). Misalnya telah diketahui adanya *cross resistance* antara DDT dan insektisida piretroid, serta *cross resistance* antara insektisida organofosfat dan karbamat. Populasi serangga yang sudah resisten terhadap insektisida DDT cenderung resisten terhadap piretroid. Demikian halnya populasi serangga yang sudah kebal terhadap insektisida golongan organofosfat cenderung resisten terhadap insektisida karbamat. Penggunaan insektisida secara terus menerus cenderung mempercepat proses terjadinya resistensi serangga. Sementara penggunaan insektisida secara bergantian dengan insektisida dari kelompok kimia yang berbeda dan cara kerja yang berbeda akan menghambat terjadinya resistensi serangga (Sucipto, 2011).

Mekanisme resistensi terhadap insektisida piretroid dapat dideteksi secara molekuler. Target site mutasi pada gen VGSC mengenai ketahanan terhadap piretroid menunjukkan bahwa ada mekanisme resistensi yang sedang berlangsung. Deteksi mutasi gen VGSC bisa langsung menilai transformasi sel target yang menjadi sasaran insektisida. Mutasi gen menyebabkan perubahan konformasi dalam saluran natrium karena tidak dapat dibuka oleh molekul insektisida. Mutasi seperti ini hanya dapat dideteksi dengan metode molekuler. Prinsip dasar dari deteksi molekuler resistensi vektor adalah mengidentifikasi gen. Mutasi adalah penanda untuk memantau resistensi (Purwaningsih et al., 2019).

*Target site resistance*, yaitu tempat ikatan target site berubah pada serangga, sehingga insektisida tidak dapat mengikat target/sasaran secara efektif. Target site organofosfat dan karbamat adalah acetylcholinesterase (AChE) pada sel syaraf synapsis yang akan memecah neurotransmitter. Target site untuk insektisida DDT (*dichloro-diphenyl-trichloroethane*) dan piretroid adalah sel saraf membran *Voltage Gated Sodium Channel* (VGSC). Terjadi mutase gen yang menyebabkan penghalangan antara ikatan insektisida dengan VGSC. Dalam hal ini terjadi penurunan afinitas VGSC dalam mengikat metabolik insektisida sintetik piretorid. Struktur VGSC adalah protein transmembran yang terdapat pada sel syaraf dan sel otot dan berperan pada potensial aksi sel. Sub unit penyusun VGSC adalah rantai polipeptida yang terdiri dari lebih 1.800 asam amino. Prinsip kerja VGSC, bila digunakan insektisida piretroid maka yang seharusnya channel tertutup maka akan tetap terbuka, sehingga sodium tetap banyak berada di dalam sel dan menyebabkan *discharge* aksi potensial yang terjadi terus menerus di dalam syaraf serangga menyebabkan *hiperexitability* dan kejang pada serangga (Safar, 2010).

Uji kerentanan adalah suatu tes untuk mengetahui tingkat kerentanan atau kekebalan serangga terhadap suatu racun/insektisida. Kekebalan serangga terhadap insektisida adalah kemampuan populasi serangga untuk bertahan terhadap pengaruh insektisida yang biasanya mematikan. Beberapa cara untuk menguji kerentanan sesuai panduan WHO yaitu dengan uji *impregnated paper*, uji MPA (*microplate assays*), dan menggunakan marker DNA (Kemenkes RI, 2012).

### 2.1.2. Tinjauan Tentang Vektor DBD di Kabupaten Semarang

Menurut Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang vektor utama DBD di Kabupaten Semarang adalah *Ae. aegypti*.

#### 2.1.2.1. Klasifikasi Nyamuk *Aedes aegypti*

Klasifikasi *Aedes aegypti* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Filum : Arthropoda

Kelas : Insecta

Ordo : Diptera

Famili : Culicidae

Genus : Aedes

Spesies : *Aedes aegypti* (Borror, 1992)

#### 2.1.2.2. Siklus Hidup *Aedes aegypti*

##### 1. Telur



**Gambar 2.1. Telur Nyamuk *Ae. aegypti***  
(Zottel & Kaufman, 2016).

Telur nyamuk *Aedes aegypti* berwarna hitam dengan ukuran sangat kecil kira-kira 0,80 mm (Kemenkes RI, 2011). Nyamuk *Ae. aegypti* betina meletakkan sekitar 50 hingga 120 telur pada wadah yang berukuran kecil seperti vas bunga, stoples penyimpanan air, dan penampungan air lain yang berada dalam ruangan, serta di air hujan yang berada di dalam wadah berukuran kecil seperti cangkir, ban, dll. di luar ruangan. Telur diendapkan di permukaan lembab tepat di atas permukaan air. Kebanyakan nyamuk *Ae. aegypti* betina bertelur dalam beberapa masa oviposisi selama satu siklus gonotropik. Perkembangan embrio biasanya selesai dalam 48 jam di lingkungan yang hangat dan lembab. Setelah perkembangan embrio selesai, telur dapat bertahan lama dengan kekeringan (selama lebih dari satu tahun). Telur menetas begitu kontainer dibanjiri oleh air, tetapi tidak semua telur menetas pada saat yang bersamaan (WHO, 2011).

## 2. Larva

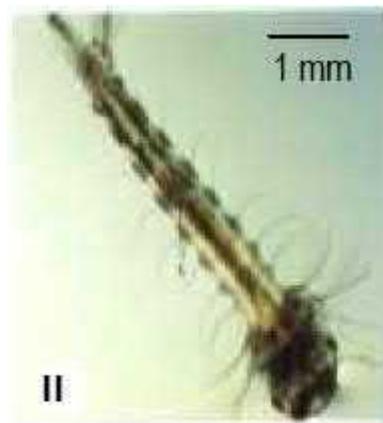
Larva *Ae. aegypti* terdiri dari kepala, toraks, dan abdomen yang pada ujung abdomen terdapat *siphon* sehingga ekor tampak bercabang. Larva kecil yang menetas dari telur akan tumbuh menjadi besar yang panjangnya 0,5-1 cm, larva selalu bergerak aktif di dalam air. Gerakannya berulang-ulang dari bawah ke atas permukaan air untuk bernafas (mengambil udara) kemudian turun kembali ke bawah dan seterusnya. Pada waktu istirahat, posisi larva hampir tegak lurus dengan permukaan air, biasanya berada di sekitar dinding tempat penampungan air. Setelah 6-8 hari larva tersebut akan berubah menjadi kepompong atau pupa (Kemenkes RI, 2011). Larva melewati empat tahap perkembangan. Durasi perkembangan larva tergantung pada suhu, ketersediaan makanan, dan kepadatan larva di wadah (WHO, 2011).

- 1) Larva instar I berukuran paling kecil yaitu 1-2 mm atau satu sampai dua hari setelah telur menetas, duri-duri (*spinae*) pada dada belum jelas dan corong pernapasan pada *siphon* belum menghitam.



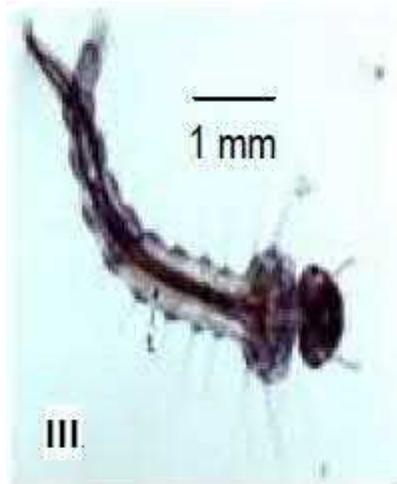
**Gambar 2.2. Larva *Ae. aegypti* Instar I**  
(Zottel & Kaufman, 2016).

- 2) Larva instar II berukuran 2,5-3,5 mm berumur dua sampai tiga hari setelah telur menetas, duri-duri dada belum jelas, corong pernapasan sudah mulai menghitam.



**Gambar 2.3. Larva *Ae. aegypti* Instar II**  
(Zottel & Kaufman, 2016).

- 3) Larva instar III berukuran 4-5 mm berumur tiga sampai empat hari setelah telur menetas, duri-duri dada mulai jelas dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman.



**Gambar 2.4. Larva *Ae. aegypti* Instar III**  
(Zottel & Kaufman, 2016).

- 4) Larva instar IV berukuran paling besar yaitu 5-6 mm berumur empat sampai enam hari setelah telur menetas dengan warna kepala gelap.



**Gambar 2.5. Larva *Ae. aegypti* Instar IV**  
(Zottel & Kaufman, 2016).

### 3. Pupa



**Gambar 2.6. Pupa *Ae. aegypti***  
(Zottel & Kaufman, 2016).

Dalam kondisi optimal, waktu yang diambil dari menetas sampai munculnya nyamuk dewasa dapat menjadi perkiraan 10 hari dan singkat-singkatnya 7 hari, dua hari di tahap kepompong atau pupa (WHO, 2011). Pupa atau kepompong berbentuk seperti koma, gerakannya lamban, sering berada di permukaan air, setelah 1-2 hari berkembang menjadi nyamuk (Kemenkes RI, 2011).

### 4. Dewasa



**Gambar 2.7. Nyamuk *Ae. aegypti* Dewasa**  
(Zottel & Kaufman, 2016).

Nyamuk *Ae. aegypti* berwarna hitam dengan belang-belang atau loreng putih pada seluruh tubuhnya. Mampu terbang sampai kurang lebih 100 meter. Hanya nyamuk betina yang aktif menghisap darah manusia. Waktu menghisap darah pada pagi hari dan sore hari setiap 2 hari. Protein darah yang dihisap tersebut diperlukan untuk pematangan telur yang dikandungnya, setelah menghisap darah nyamuk akan mencari tempat untuk hinggap (istirahat). Nyamuk jantan hanya menghisap sari bunga/tumbuhan yang mengandung gula. Umur nyamuk *Ae. aegypti* rata-rata 2 minggu, tetapi ada yang dapat bertahan hingga 2-3 bulan (Kemenkes RI, 2011).

#### 2.1.2.3. Bionomik Nyamuk *Aedes aegypti*

##### 1. Tempat Perindukan

*Ae. aegypti* menyukai tempat gelap yang tersembunyi di dalam rumah untuk berkembang biak. Nyamuk *Ae. aegypti* berkembang biak di tempat penampungan air untuk keperluan sehari-hari atau barang-barang lain yang memungkinkan air tergenang dan tidak beralaskan tanah, misalnya bak mandi/WC, tempayan, drum, tempat minum burung, vas bunga, kaleng bekas, ban bekas, botol, tempurung kelapa, sampah plastik, dan lain-lain yang dibuang sembarang tempat (Kemenkes RI, 2011).

##### 2. Perilaku Beristirahat

Lebih dari 90% dari populasi *Ae. aegypti* terletak pada permukaan yang gelap, lembab, tempat-tempat terpencil di dalam rumah atau bangunan, termasuk kamar tidur, lemari, kamar mandi, dan dapur. Istirahat dalam ruangan yang disukai adalah permukaan bagian bawah furnitur, menggantung benda-benda

seperti pakaian dan gordena, dan dinding. Oleh karena itu, alat semprot dalam ruangan bukan pilihan untuk pengendaliannya seperti vektor DHF (WHO, 2011).

### 3. Aktivitas Menghisap Darah

*Ae. aegypti* sangat antropofilik, meskipun mungkin menggigit hewan berdarah panas lainnya yang tersedia. Nyamuk *Ae. aegypti* betina memiliki dua periode aktivitas menggigit yaitu pada pagi hari untuk beberapa kali waktu setelah fajar dan di sore hari selama beberapa jam sebelum gelap. *Ae. aegypti* dapat menggigit lebih dari satu orang. Perilaku ini sangat luar biasa meningkatkan efisiensi transmisi epidemi. Dengan demikian, tidak jarang melihat beberapa anggota rumah tangga yang sama dengan timbulnya penyakit yang terjadi dalam 24 jam, menunjukkan bahwa mereka terinfeksi oleh nyamuk infeksi yang sama (WHO, 2011).

### 4. Aktivitas Terbang

Ketinggian merupakan faktor penting dalam membatasi distribusi *Ae. aegypti*. *Ae. aegypti* di India berkisar sekitar 1.200 meter di atas permukaan laut. Di negara-negara Asia Tenggara, ketinggian terbang *Ae. aegypti* mencapai 1.000 hingga 1.500 meter. Di Kolumbia *Ae. aegypti* ditemukan di ketinggian hingga 2.200 meter. Penyebaran nyamuk dewasa *Ae. aegypti* betina dipengaruhi oleh sejumlah faktor termasuk ketersediaan tempat perindukan dan ketersediaan darah sebagai pematangan telurnya, tetapi tampaknya sering terbatas dalam jarak 30-50 meter dari kemunculannya. Namun, penelitian terbaru di Puerto Rico (AS) menunjukkan bahwa mereka mungkin menyebar lebih dari 400 meter terutama

mencari tempat perindukan. Transportasi pasif dapat terjadi melalui telur kering dan larva dalam wadah (WHO, 2011).

#### 5. Masa Hidup

*Ae. aegypti* dewasa memiliki masa hidup sekitar 3-4 minggu. Selama musim hujan bertahan hidup lebih lama, risiko penularan virus lebih besar. Penelitian lebih lanjut diperlukan pada kelangsungan hidup alami *Ae. aegypti* di berbagai kondisi lingkungan (WHO, 2011).

### 2.1.3. Insektisida

Insektisida adalah bahan yang mengandung senyawa kimia yang digunakan untuk membunuh serangga. Aplikasi insektisida dibagi menjadi dua yaitu bersifat kontak/non-residual dan insektisida residual. Insektisida non-residual yaitu insektisida yang langsung berkontak dengan tubuh serangga saat diaplikasikan berupa penyemprotan udara (*sprace spray*), sedangkan insektisida residual yaitu insektisida yang diaplikasikan pada permukaan suatu tempat dengan tujuan apabila serangga melewati/hinggap pada permukaan tersebut akan terpapar dan mati (Kemenkes RI, 2012).

Cara kerja insektisida dalam tubuh serangga dikenal dengan istilah *mode of action* dan *mode of entry*. *Mode of action* adalah cara insektisida memberikan pengaruh melalui titik tangkap (*target site*) di dalam tubuh serangga. Titik tangkap tersebut biasanya berupa enzim atau protein. Cara kerja insektisida yang digunakan dalam pengendalian vektor terbagi menjadi 5 kelompok yaitu mempengaruhi sistem saraf, menghambat produksi energi, mempengaruhi sistem

endokrin, menghambat produksi kutikula, dan menghambat keseimbangan air. *Mode of entry* adalah cara insektisida masuk ke dalam tubuh serangga dapat melalui kutikula (racun kontak), alat pencernaan (racun perut), dan pernapasan (racun pernapasan). Suatu insektisida dapat mempunyai satu atau lebih cara masuk ke dalam tubuh serangga (Kemenkes RI, 2012).

Sifat yang terkandung dalam insektisida yang baik dan ideal adalah sebagai berikut:

1. Mempunyai daya bunuh yang besar dan cepat serta tidak berbahaya bagi manusia, mikroorganisme bukan sasaran, serta hewan vertebrata;
2. Harganya murah dan mudah didapat;
3. Mempunyai susunan kimia stabil dan tidak mudah terbakar;
4. Mudah digunakan dan dapat dicampur dengan bahan pelarut;
5. Tidak berwarna dan tidak berbau yang tidak menyenangkan (Safar, 2010).

Ada beberapa golongan insektisida yang berasal dari bahan sintetik, yaitu:

1) Organofosfat

Insektisida paling toksik terhadap nyamuk, namun tidak membahayakan manusia. Mengandung fosfat dalam susunan kimianya. Contoh insektisida golongan ini adalah *malathion* (Sembiring, 2009).

2) Organoklorin

Organoklorin (*chlorinated hydrocarbon*) terdiri dari beberapa kelompok yang diklasifikasi menurut bentuk kimianya. Yang paling populer dan pertama kali digunakan disintesis adalah “*Dichloro-diphenyl-trichloroethan*” atau disebut

DDT. Mekanisme toksisitas terfokus pada neurotoksin dan otak. DDT tidak mudah larut dalam air dan larut dalam pelarut organik (Safar, 2010).

### 3) Karbamat

Insektisida dari golongan karbamat adalah racun saraf yang bekerja dengan menghambat kolinesterase. Pada karbamat hambatan bersifat *reversible*. Insektisida dari golongan ini relatif mudah terurai di lingkungan dan tidak terakumulasi oleh jaringan lemak (Djojsumarto, 2008).

### 4) Piretroid (Sintetik Piretroid)

Insektisida kelompok piretroid merupakan insektisida sintetik yang merupakan tiruan atau analog dari piretrum. Kebanyakan piretroid merupakan racun yang mempengaruhi saraf serangga dengan cara kerja yang cepat dan menimbulkan paralisis bersifat sementara. Contoh golongan sintetik piretroid adalah sipermetrin. Insektisida piretroid digunakan karena terajadnya resistensi pada insektisida *organochlorin*, *organophosphat*, dan karbamat. Saat ini piretroid digunakan sebagai senjata ampuh dalam pengendalian serangga dalam kepentingan umum maupun kesehatan (Sembiring, 2009).

Insektisida piretroid dapat pula disebut sebagai sintetik piretroid, merupakan insektisida yang secara kimia memiliki kemiripan dengan pirethrin yang ditemukan dalam pyretrum alami pada ekstrak bunga *chrisanthemum*, dan diketahui memiliki aktivitas toksik. Generasi piretroid pertama muncul pada tahun 1949 dan satu satunya insektisida golongan ini adalah allethrin. Generasi kedua adalah tetametrin, resmetrin, bioresmetrin, bioalletrin, dan ponotrin. Generasi ketiga piretroid adalah fenvalerat dan permetrin yang menjadi piretroid pertama

dalam bidang pertanian karena aktivitasnya pada serangga dan stabilitas pada cahaya matahari. Piretroid golongan keempat adalah bifentrin, sipermerin, cyhalotrin, deltametrin, dan esfenfalerat (Firmanta, 2008).

Secara garis besar piretroid dibagi menjadi 2 jenis, yaitu piretroid tipe 1 dan tipe 2. Piretroid tipe 1 umumnya tidak stabil pada lingkungan ketika digunakan sebagai insektisida dalam bidang pertanian, sedangkan tipe 2 lebih stabil dalam lingkungan. Efek mematikan sebagai hasil toksisitas piretroid terjadi pada impuls saraf pada sistem saraf pusat dan sistem saraf tepi. Mekanisme kerja piretroid yaitu memodifikasi saluran garam pada saraf dengan cara memperlambat gerakan aktivasi maupun inaktivasi dari saluran garam tersebut, sehingga saluran tersebut akan membuka dalam waktu lama dan pada proses selanjutnya akan terjadi paralisis bahkan kematian. Efek piretroid pada serangga dapat terjadi dalam waktu 1-2 menit setelah digunakan dan menghasilkan *knockdown effect*, yaitu kehilangan keseimbangan tubuh dan gerakan. Tanda khusus toksisitas piretroid pada serangga terjadi dengan cepat, termasuk hiperereksia, konvulsi, ataksia, sampai kehilangan koordinasi gerak (Sembiring, 2009).

Berdasarkan struktur dasarnya (keberadaan gugus cyano pada posisi alfa), piretroid tipe 1 tidak mempunyai gugus cyano, efek khususnya adalah onset yang cepat sehingga terjadi tingkah agresif, peningkatan sensitivitas pada rangsangan luar, dilanjutkan dengan terjadi tremor, peningkatan suhu tubuh, koma, dan kematian. Piretroid tipe 2 terdapat gugus cyano pada struktur kimianya, karakteristik efeknya antara lain tingkah laku mencakar dan menggali, dilanjutkan dengan profusi saliva, peningkatan respon kejut, serta gerakan mundur yang abnormal (Firmanta, 2008).

#### 2.1.4. Sipermetrin

Insektisida sipermetrin merupakan insektisida yang termasuk golongan peritroid. Rumus molekul sipermetrin adalah  $C_{22}H_{19}Cl_{12}NO_3$ . Sipermetrin berbentuk bubuk putih, memiliki bau kimia yang ringan, berwarna kuning hingga coklat untuk cairan atau semisolid, dan memiliki bau yang khas (Perdana, 2016). Sipermetrin lebih dikenal sebagai *Synthetic Pyrethroid* (SP) yang bekerja mengganggu sistem saraf, sehingga dapat mengganggu impuls ke organ (Kemenkes RI, 2012).

Sipermetrin dilaporkan efektif digunakan pada hasil penelitian yang menunjukkan insektisida berbahan aktif *cypermethrin* 100 g/l pada dosis 100, 150, dan 200 ml/ha dengan pelarut solar yang diaplikasikan secara pengasapan (*thermal fogging*) efektif digunakan untuk membunuh nyamuk vektor DBD *Ae. aegypti*, vektor filariasis *Cx. quinquefasciatus*, dan vektor malaria *An. aconitus* di dalam dan di luar rumah dengan tingkat kematian 100% (Susanti & Boesri, 2012).

Insektisida sipermetrin merupakan insektisida piretroid sintetik yang memiliki efek kuat dalam melawan sejumlah serangga. Insektisida ini selain merupakan racun perut juga merupakan racun kontak yang berefek pada sistem saraf hewan vertebrata maupun invertebrata sipermetrin relatif aman untuk mamalia dan burung, namun sangat toksik untuk ikan dan organisme air. Tempat aksi sipermetrin adalah pada sel saraf, yaitu dengan menginduksi peningkatan permeabilitas garam pada membran saraf selama terjadi rangsangan. Aksi tersebut dapat menyebabkan terjadinya impuls berulang-ulang pada serabut saraf sensori (*efferent*). Hal tersebut dapat mengakibatkan terjadinya rangsangan yang lama

pada permeabilitas garam membran saraf dan saluran garam akan membuka selama proses rangsangan (Sembiring, 2009).

Sipermetrin memiliki nama kimia cyano-(3-phenoxyphenyl) methyl-3-(2,2-dichloroethenyl)-2, 2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate, dengan rumus kimia  $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ . Sipermetrin memiliki berat molekul sebesar 416,298 g/mol (Perdana, 2016). Senyawa ini larut dalam pelarut organik seperti metanol dan aseton (Susanti & Boesri, 2012). Sipermetrin banyak digunakan pada sektor pertanian, peternakan, dan pengendalian hama pemukiman terutama vektor penyakit. Insektisida ini memiliki efektivitas dan daya bunuh yang baik serta memiliki harga yang murah, sehingga banyak digunakan di Indonesia maupun di dunia. Di Indonesia, produk sipermetrin banyak digunakan untuk pengendalian rayap, nyamuk, lalat, lipas (Arasy & Nurwidayati, 2017). Sipermetrin adalah senyawa racun kontak dan perut yang biasa digunakan untuk insektisida rumah tangga. Sipermetrin dapat berikatan dengan protein pada saraf yang dikenal sebagai *voltage gate sodium channel*. Ikatan tersebut akan mencegah penutupan VGSC secara normal, sehingga menyebabkan ion natrium tetap mengalir pada membran saraf dan akan timbul impuls ganda. Timbulnya impuls ganda akan menginduksi pengeluaran neurotransmitter asetilkolin dan menstimulasi saraf lainnya, sehingga menimbulkan kelumpuhan hingga kematian serangga dalam waktu singkat (Cox, 2009).

Insektisida sipermetrin termasuk dalam golongan insektisida *Synthetic Pyrethroid* (SP) yang bekerja mengganggu sistem saraf. Golongan SP banyak digunakan di Indonesia dalam pengendalian vektor untuk serangga dewasa (*space spraying* dan IRS), kelambu celup atau *Insecticide Treated Net* (ITN), *Long*

*Lasting Insecticidal Net* (LLIN), dan berbagai formulasi insektisida rumah tangga (Sukmawati et al., 2018). Sipermetrin mempunyai aktivitas insektisida yang dapat menyebabkan *knockdown* pada serangga dan bekerja dengan cara membloking *channel ion natrium* yang terdapat pada membran syaraf serangga. Insektisida sipermetrin sangat efektif sebagai racun kontak dan racun lambung dalam mengendalikan serangga pada laju aplikasi yang relatif rendah. Insektisida sipermetrin lebih dikenal dengan sintetik piretroid yang bekerja mengganggu sistem syaraf yang menyebabkan neurotoksik dengan cara mengganggu transduksi sinyal dalam sistem syaraf dengan mempengaruhi transportasi ion yang melintasi membran sel (Arasy & Nurwidayati, 2017).

#### **2.1.5. Kode Genetik**

DNA merupakan material genetik yang tersusun dari gula, fosfat, dan basa nitrogen yang membawa informasi genetik dari satu sel ke sel yang lain. Urutan untuk setiap molekul DNA gula dan fosfat mempunyai urutan yang sama, tetapi berbeda untuk urusan basa-basa nitrogennya. Urutan basa nitrogen yang menyusun DNA membedakan DNA satu dengan lainnya. Informasi genetik yang terdapat pada DNA berbentuk kode yang disusun oleh tiga diantara empat basa nitrogen yang ada yaitu Adenin (A), Sitosin (C), Guanin (G), dan Urasil (U). Kode genetik melambangkan macam asam amino sebagai bahan utama penyusun protein. Kode genetik (kodon) tersusun dari tiga basa nitrogen, sehingga empat macam basa nitrogen akan menghasilkan 64 kode. Asam amino berjumlah 20 yaitu phenylalanin, leusin, isoleusin, metionin, valin, serin, prolin, threonin, alanin, tyrosin, histidin, glutamine, asparagin, lysine, asam aspartat, asam

glutamat, cystein, tryptophan, arginin, dan glysin. Ada beberapa asam amino yang mempunyai kode lebih dari satu. Meskipun ada 64 kode genetik, hanya 61 kodon yang mengkode asam amino, dan 3 kodon lainnya berfungsi sebagai kodon terminasi (*stop codon*) yaitu UAA, UAG, dan UGA. Ketiga kodon tersebut disebut kodon nonsense yang berfungsi menghentikan proses sintesis protein. Selain kodon terminasi, terdapat pula kodon awal (*starting codon*) yaitu AUG yang mengawali proses sintesis protein (Widianti & Anggraito, 2017).

**Tabel 2.1. Daftar Kodon**

Basa I	Basa II								Basa III
	U		C		A		G		
U	UUU	phe	UCU	ser	UAU	tyr	UGU	cys	U
	UUC	phe	UCC	ser	UAC	tyr	UGC	cys	C
	UUA	leu	UCA	ser	UAA	stop	UGA	stop	A
	UUG	leu	UCG	ser	UAG	stop	UGG	trp	G
C	CUU	leu	CCU	pro	CAU	his	CGU	arg	U
	CUC	leu	CCC	pro	CAC	his	CGC	arg	C
	CUA	leu	CCA	pro	CAA	gln	CGA	arg	A
	CUG	leu	CCG	pro	CAG	his	CGG	arg	G
A	AUU	ileu	ACU	thr	AAU	asn	AGU	ser	U
	AUC	ileu	ACC	thr	AAC	asn	AGC	ser	C
	AUA	ileu	ACA	thr	AAA	lys	AGA	arg	A
	AUG	met	ACG	thr	AAG	lys	AGG	arg	G
G	GUU	val	GCU	ala	GAU	asp	GGU	gly	U
	GUC	val	GCC	ala	GAC	asp	GGC	gly	C
	GUA	val	GCA	ala	GAA	glu	GGA	gly	A
	GUG	val	GCG	ala	GAG	glu	GGG	gly	G

(Griffiths et al., 2007; Widianti & Anggraito, 2017).

Keterangan:

phe : phenylalanin

his : histidin

leu : leusin

gln : glutamine

ileu : isoleusin

asn : asparagin

met : metionin

lys : lysine

ser : serin

glu : asam glutamat

pro	: prolin	cys	: cystein
thr	: threonin	trp	: tryptophan
ala	: alanin	arg	: arginin
val	: valin	asp	: asam aspartat
tyr	: tyrosin	gly	: glysin

Panjang pasangan basa (*base pairs*) standar nyamuk *Ae. aegypti* normal adalah 764 bp linear DNA. Jumlah asam amino nyamuk *Ae. aegypti* sebanyak 658 asam amino yang menunjukkan kode genetik, dengan urutan sebagai berikut:

**Tabel 2.2. Kode Genetik *Aedes aegypti***

Urutan Asam Amino ke	Kode Genetik
1	ACC AAT TAT AAT TGG AGG ATT TGG AAA TTG ATT AGT TCC TTT AAT ATT AGG AGC CCC TGA
61	TAT AGC TTT TCC TCG AAT AAA TAA TAT AAG TTT TTG AAT ACT ACC TCC TTC ATT GAC TCT
121	TCT ATT ATC AAG CTC AAT AGT AGA AAA TGG GGC AGG AAC TGG GTG AAC AGT TTA TCC TCC
181	TCT CTC TTC AGG AAC AGC TCA TGC TGG AGC TTC TGT TGA TTT AGC TAT TTT TTC TCT TCA
241	TTT AGC TGG AAT TTC CTC AAT TTT AGG GGC AGT AAA TTT TAT TAC AAC TGT AAT TAA TAT
301	ACG ATC GTC AGG AAT TAC TTT AGA TCG ACT ACC CTT ATT TGT TTG ATC TGT AGT TAT TAC
361	AGC TAT CTT ATT ACT TCT TTC TCT TCC TGT TTT AGC TGG AGC TAT TAC TAT GTT ATT AAC
421	AGA CCG AAA CTT AAA TAC ATC TTT CTT TGA TCC AAT CGG AGG AGG AGA TCC TAT TTT ATA
481	CCA ACA CTT ATT CTG ATT CTT TGG ACA CCC AGA AGT TTA TAT TTT AAT TTT ACC CGG ATT
541	TGG AAT AAT TTC TCA TAT TAT TAC TCA AGA AAG TGG AAA AAA GGA AAC ATT TGG AAC TTT
601	AGG AAT AAT TTA TGC TAT ATT AAC AAT TGG ATT ATT GGG ATT TAT TGT TTG AGC TCA TCA
661	TAT ATT TAC AGT AGG TAT AGA CGT AGA TAC TCG AGC TTA TTT TAC TTC AGC AAC TAT AAT
721	TAT TGC TGT TCC TAC AGG AAT TAA AAT TTT TAG TTG ATT AGC AA

(Salgueiro et al., 2019).

### 2.1.6. Mutasi DNA

Molekul DNA yang rusak atau berubah dapat mengakibatkan meningkatnya mutasi, kromosom menjadi tidak stabil, karsinogenesis, atau kematian sel. Apabila DNA atau gen mengalami mutasi dan akibat yang ditimbulkan bersifat tidak menguntungkan, maka perlu ada mutasi balik sehingga sifat yang dikendalikan oleh gen menjadi normal kembali. Sel mempunyai kemampuan untuk merespon perubahan pada DNA dengan cara memperbaiki dan memulihkan sehingga DNA kembali normal fisik dan fungsinya. Mutasi yang terjadi pada hewan terutama serangga vektor penyakit akan menyebabkan terhambatnya pengendalian penyakit menular.

Mutasi DNA dapat digolongkan menurut perubahan-perubahan yang terjadi pada struktur gen, yaitu:

1. Mutasi titik (*point mutations*), yaitu mutasi yang terjadi pada unit gen paling kecil yakni pada 1 pasang nukleotida.
2. Mutasi banyak basa (*multi base mutations*), yaitu mutasi yang terjadi pada beberapa pasang nukleotida.
3. Mutasi pada segmen DNA, sehingga dapat mengubah struktu kromosom (aberasi kromosom).

Mutasi gen terjadi melalui beberapa cara antara lain penggantian basa (substitusi basa), penambahan atau penyisipan basa, dan pengurangan basa. Struktur basa-basa dalam DNA tidak statik, sebab atom hidrogen dapat berpindah dari satu posisi ke posisi lain dalam satu purin atau pirimidin. Kasus ini disebut dengan pergeseran tautomerik. Mutasi yang diakibatkan oleh pergeseran

tautomerik menyebabkan penggantian atau substitusi basa yang satu oleh basa yang lain.

Mutasi substitusi basa dapat terjadi karena satu nukleotida menggantikan nukleotida yang lain. Kejadian ini membuat perubahan atau penggantian satu asam amino. Mutasi karena substitusi basa dikenal ada dua macam yaitu transisi dan transversi. Transisi adalah mutasi yang disebabkan oleh penggantian basa sejenis, misal basa purin diganti basa purin, basa pirimidin diganti basa pirimidin. Transversi adalah penggantian basa yang tidak sejenis, misal basa purin diganti basa pirimidin. Beberapa contoh mutasi digambarkan sebagai berikut:

1. Mutasi *Silent*

Mutasi ini tidak menimbulkan perubahan asam amino yang menyusun polipeptida, karena perubahan terjadi pada basa ketiga dari triplet sehingga saat translasi kodon-kodon ini diterjemahkan kedalam asam amino yang sama.

GTT -> GTC -> GTG -> GTA = Valin

Perubahan GTT menjadi GTC, GTG, atau GTA tetap mengkode asam amino yang sama yaitu valin.

2. Mutasi *Missens*

Mutasi *missens* adalah mutasi salah arti yang membuat perubahan nukleotida diikuti dengan perubahan asam amino.

DNA normal : ATG GCA ATT GCT TTT **TTA** CGT AAC CCG

Asam amino : met – ala – ile – ala – phe – **leu** – arg – asn – pro

DNA mutan : ATG GCA ATT GCT TTT **TCA** CGT AAC CCG

Asam amino : met – ala – ile – ala – phe – **ser** – arg – asn – pro

### 3. Mutasi *Nonsens*

Mutasi *nonsens* adalah mutasi tidak berarti. Mutasi *nonsens* terjadi apabila penggantian basa menyebabkan munculnya kodon *nonsens* atau kodon stop yang menghentikan proses sintesis protein, sehingga tidak mengkode asam amino apapun.

DNA normal : ATG GCA ATT GCT TTT **TTA** CGT AAC CCG

Asam amino : met – ala – ile – ala – phe – **leu** – arg – asn – pro

DNA mutan : ATG GCA ATT GCT TTT **TGA** CGT AAC CCG

Asam amino : met – ala – ile – ala – phe – **stop**

### 4. Mutasi Penambahan/Penyisipan Basa (Adisi)

Pada mutasi ini satu atau lebih nukleotida menyisip ke dalam rantai polinukleotida, menyebabkan semua asam amino pada dan sesudah titik mutasi mengalami perubahan, sehingga mutasi ini disebut juga sebagai mutasi perubahan kerangka baca (*frame shift mutations*).

DNA normal  $\longrightarrow$  DNA mutan nukleotida dengan basa G menyisip

**AGA GTC TTC**

**AGA GGT CTT C**

ser gln lis

ser pro glu

### 5. Mutasi Pengurangan Basa (Delesi)

Pada mutasi ini satu nukleotida hilang saat replikasi DNA. Seperti halnya mutasi adisi, mutasi delesi juga dapat menyebabkan terjadinya perubahan kerangka baca, menyebabkan semua asam amino pada dan sesudah titik mutasi berubah. Contoh dari mutasi ini adalah penyakit talasemia.

DNA normal  $\longrightarrow$  DNA mutan nukleotida dengan basa T hilang

AGA GTC TTC

ser gln lis

AGA GCT TC

ser arg

(Widianti & Anggraito, 2017).

#### 2.1.6.1. Mutasi Kodon V1016G Gen *Voltage-Gated Sodium Channel* (VGSC)

*Voltage-Gated Sodium Channel* memiliki peran penting dalam mengelola fisiologi untuk mengirimkan impuls depolarisasi secara cepat ke seluruh sel dan jaringan sel, sehingga memungkinkan proses koordinasi daya penggerak kepada kognisi. VGSC dapat ditemukan pada banyak organisme sebab berperan penting untuk inisiasi dan propagasi dalam sel saraf dan sel yang mengalami rangsangan (Cox, 2009).

Sejumlah polimorfisme pada VGSC strain *Ae. aegypti* yang telah dilaporkan tahan terhadap sipernetrin antara lain S989P dan V1016G (Purwaningsih et al., 2019). Polimorfisme yang diyakini berkaitan terhadap interaksi piretroid di sodium channel yaitu V1016G karena koeksistensi substitusi kodon berada pada domain II dan III yang sangat sensitif menimbulkan *knockdown resistance* pada *Ae. aegypti* dari paparan insektisida sipernetrin. Adanya polimorfisme V1016G menjadi penanda perubahan substitusi asam amino valin menjadi glisin pada kodon 1016 dengan transisi basa Timin-Guanin pada susunan GTA menjadi GGA (Tyasningrum, 2017).

Mutasi target pada gen VGSC mengenai resistensi terhadap piretroid menunjukkan bahwa ada mekanisme resistensi yang sedang berlangsung. Deteksi mutasi gen VGSC secara langsung dapat menilai transformasi sel target yang menjadi target insektisida. Mutasi gen menyebabkan perubahan konformasi dalam

saluran natrium karena tidak dapat dibuka oleh molekul insektisida. Mutasi seperti ini hanya dapat dideteksi dengan metode molekuler. Prinsip dasar deteksi molekuler resistensi dalam vektor adalah mengidentifikasi gen (Purwaningsih et al., 2019). Insektisida piretroid bekerja dengan cara melekat pada bagian VGSC yang terletak di bagian neuron serangga vektor (Ghiffari et al., 2013).

### **2.1.7. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu metode melipatgandakan (amplifikasi) secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *invitro*. PCR merupakan suatu teknik enzimatik dalam biomolekuler untuk menghasilkan salinan urutan DNA. PCR merupakan metode amplifikasi DNA target dengan dua kali running PCR. *Running* PCR pertama menggunakan satu pasang primer (*forward* dan *reverse*), sedangkan pada running PCR kedua salah satu primernya (*forward* atau *reverse*) adalah primer yang digunakan pada PCR pertama. Primer adalah suatu sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai *polymerase* (Triwibowo, 2006). Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama adalah:

1. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 105-106 molekul.
2. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18-28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Dan mempunyai kandungan G+C sebesar 50-60%.

3. Deoksiribonukelotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion  $Mg^{2+}$  sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion.
4. Enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA.
5. Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10–50 mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20°C); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%; disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM  $MgCl_2$ .

Pada proses PCR menggunakan menggunakan alat termosiklus. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi. Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat:

1. Denaturasi

Denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polimerase. Aktifitas enzim tersebut

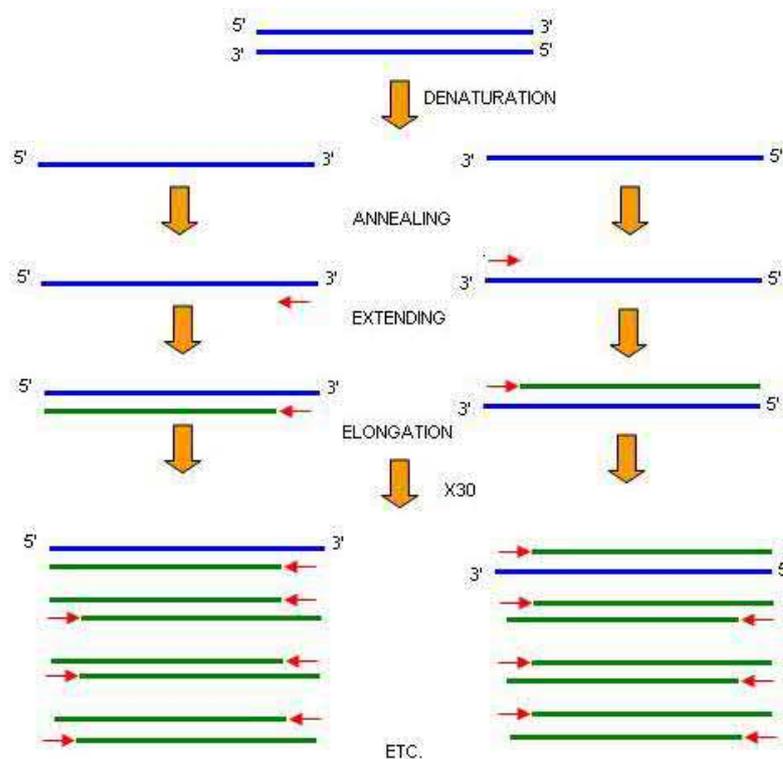
mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5°C.

## 2. Annealing (Penempelan Primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18–25 basa, mengandung 50–60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30-45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50–60°C.

## 3. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini *Taq polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35-100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit, sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.

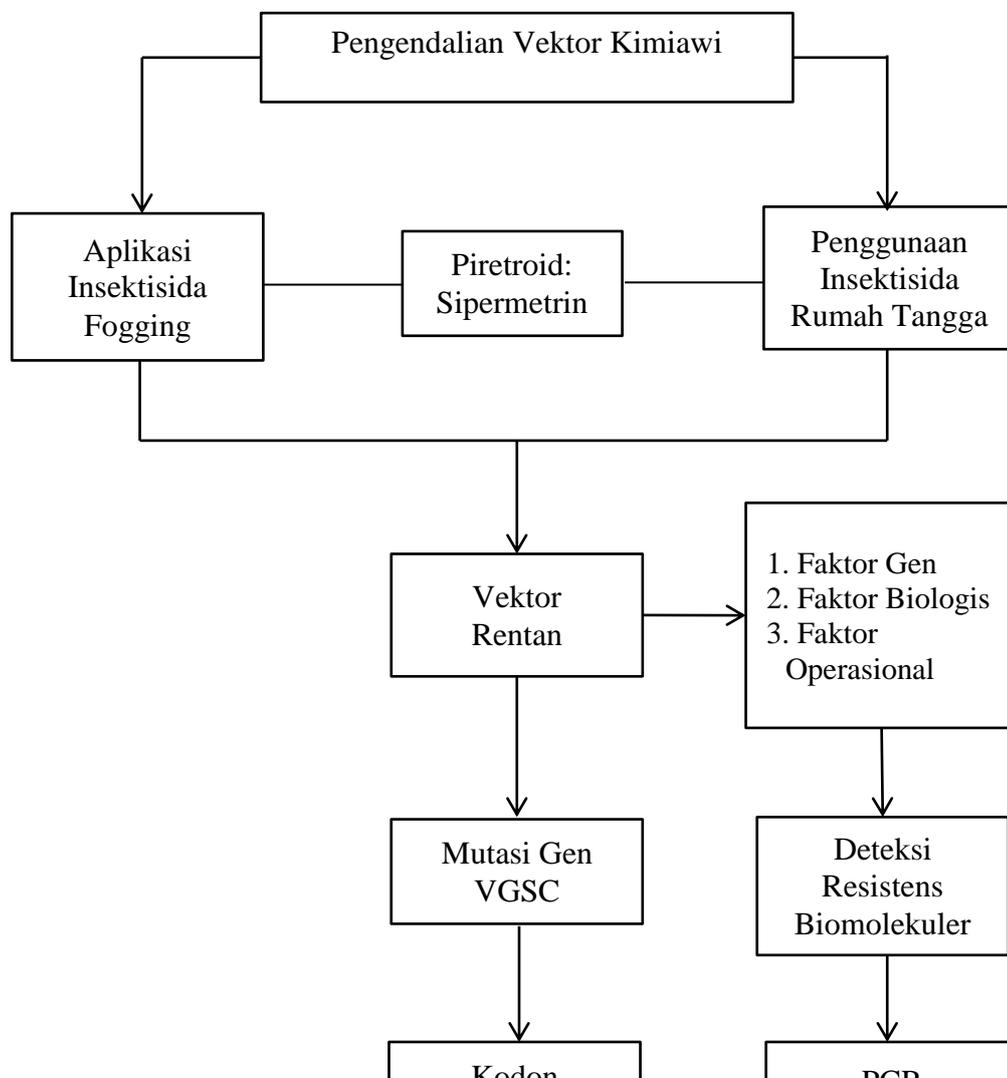


**Gambar 2.8. Siklus PCR**

Reaksi-reaksi tersebut di atas diulangi lagi dari 25–30 kali siklus, sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi. Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif. Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi, dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi, sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan

pada amplifikasi produk. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi. Selain itu kelebihan lain metode PCR dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp,  $5 \times 10^{-9}$  mol) sebesar 200.00 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Reaksi ini dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5  $\mu$ g oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dari reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100  $\mu$ l. DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu, sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR (Yusuf, 2010).

## 2.2. KERANGKA TEORI



## **BAB V**

### **PEMBAHASAN**

#### **5.1. PEMBAHASAN**

Hasil penelitian menunjukkan di Kelurahan Tambakboyo 8 dari 10 sampel yang diperiksa telah terdeteksi resisten (80%), Kelurahan Kupang 10 dari 10 sampel yang berarti seluruh sampel yang diperiksa telah terdeteksi resisten (100%), dan Kelurahan Panjang 9 dari 10 sampel yang diperiksa telah terdeteksi resisten (90%). Hal ini berarti sampel larva *Ae. aegypti* pada ketiga kelurahan tersebut telah mengalami mutasi pada gen VGSC tepatnya pada kodon V1016G. Hanya 2 sampel dari Kelurahan Tambakboyo dan 1 sampel dari Kelurahan Panjang yang masih normal.

Mutasi pada gen VGSC yang disebabkan insektisida piretroid juga terjadi di dunia dan di Indonesia. Deteksi resistensi dengan melihat mutasi pada gen VGSC di dunia terjadi pada populasi *Ae. aegypti* di Panama dengan ditemukannya mutasi pertama kali di Amerika pada kodon V1016G dan I1011M (Murcia et al., 2019), serta di Taiwan yang mendeteksi mutasi pada kodon V1016G (28,03%), S989P (17,83%), F1534C (21,97%), dan D1763Y (66,69%) (Chung et al., 2019). Mutasi serupa juga ditemukan di Indonesia pada sampel *Ae. aegypti* yang berasal dari Palembang pada penelitian yang menunjukkan hasil gen V1016G dengan target DNA 82 bp (Ghiffari et al., 2013). Selain itu, mutasi pada VGSC kodon V1016G dan S989P *Ae. aegypti* juga terjadi di Padang dengan target DNA 579 bp (Hasmiwati et al., 2016), di Sumatera Barat identifikasi titik mutasi pada gen

VGSC menunjukkan hasil positif pada kodon S989P dan V1016G (Hasmiwati & Supargiyono, 2018), dan di Palu mutasi pada VGSC terdeteksi pada sampel yang diperiksa dari Balaroa kodon V1016G dan S989P dengan target DNA 619 bp (Purwaningsih et al., 2019).

Hal demikian dapat mengindikasikan bahwa larva *Ae. aegypti* yang diperiksa tersebut telah mengalami tekanan secara selektif insektisida kelompok piretroid dalam hal ini sipermetrin. Seperti diketahui bahwa insektisida kelompok piretroid banyak digunakan masyarakat/rumah tangga, sehingga *Ae. aegypti* sering terpapar dengan insektisida tersebut, dan ditambah dengan insektisida dari bidang kesehatan. Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah menginformasikan bahwa insektisida *cynof* telah digunakan di beberapa kota di Jawa Tengah disamping malathion untuk pengendalian *Ae. aegypti* secara fogging (Widiarti et al., 2012). Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang menggunakan insektisida merk dagang zeta 15 UL yang mengandung bahan aktif utama zeta-sipermetrin 15 g/l pada fogging yang dilakukan di Ambarawa (Puskesmas Ambarawa, 2019). Mutasi V1016G adalah perubahan pada kodon pengkode valin menjadi glisin, dimana terjadi transisi basa timin dengan guanin pada susunan GTA menjadi GGA (Ghiffari et al., 2013). Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa sebagian besar nyamuk *Ae. aegypti* telah mengalami mutasi V1016G pada gen VGSC yang merupakan sasaran target insektisida sintetik piretroid (Widiastuti et al., 2015).

Mekanisme resistensi terhadap insektisida piretroid dapat dideteksi secara molekuler. Mutasi target pada gen VGSC mengenai resistensi terhadap piretroid

menunjukkan bahwa ada mekanisme resistensi yang sedang berlangsung. Deteksi mutasi gen VGSC secara langsung dapat menilai transformasi sel target yang menjadi target insektisida. Mutasi gen menyebabkan perubahan konformasi dalam saluran natrium karena tidak dapat dibuka oleh molekul insektisida. Mutasi seperti ini hanya dapat dideteksi dengan metode molekuler. Prinsip dasar deteksi molekuler resistensi dalam vektor adalah mengidentifikasi gen (Purwaningsih et al., 2019). Insektisida piretroid bekerja dengan cara melekat pada bagian VGSC yang terletak di bagian neuron serangga vektor (Ghiffari et al., 2013).

Insektisida piretroid mengikat protein VGSC yang mengatur denyut impuls saraf. Pada awalnya, molekul insektisida piretroid akan melekat untuk membuka channel sodium dan mengikatnya hingga tetap dalam kondisi terbuka. Hal ini akan memicu terjadinya *repetitive-nerve-firing* yang akan menimbulkan gerakan atau aktivitas di luar kontrol. Serangga target akan mengalami *convulsion* dan tidak dapat mengontrol perilaku terbangnya. Apabila ada mutasi pada gen VGSC, maka asam amino yang dihasilkan akan berubah, sehingga dapat menurunkan sensitivitas molekul insektisida piretroid untuk membentuk ikatan pada bagian tersebut (Widiastuti et al., 2015).

Deteksi resistensi insektisida piretroid secara uji molekuler diketahui melalui dua cara yaitu perubahan enzim detoksifikasi dan perubahan target site VGSC. Deteksi enzim detoksifikasi yaitu deteksi mutasi titik gen yang menyebabkan peningkatan kadar enzim yang mendetoksifikasi insektisida (resistensi metabolik) (Ghiffari et al., 2013). Pada penelitian ini hanya dilakukan uji molekuler dengan melihat perubahan atau mutasi pada gen VGSC. Perubahan

gen nyamuk *Ae. aegypti* sebagai mayor vektor virus *dengue* yang diperkirakan menjadi penyebab sulitnya pengendalian penyakit DBD. Resistensi terhadap insektisida juga berpotensi masih tingginya siklus nyamuk vektor DBD tidak bisa ditanggulangi secara tuntas. Ekspresi gen spesifik dan autosom diindikasikan memengaruhi lokus pada gen terlebih lagi apabila timbul efek resistensi dari paparan insektisida (Yudhana et al., 2017).

VGSC dapat dijadikan indikasi penting sejauh mana perkembangan nyamuk *Ae. aegypti* resisten terhadap insektisida golongan tertentu, sehingga penggunaannya bisa dievaluasi dan diperbaiki untuk meningkatkan tindakan preventif. Hasil penelitian tersebut berkaitan dengan spesies *Ae. aegypti* yang telah mengalami penekanan secara selektif terhadap insektisida dari golongan piretroid (Sinkins, 2010). Diketahui bahwa insektisida golongan piretroid telah banyak digunakan masyarakat atau rumah tangga sehingga nyamuk *Ae. aegypti* sering terpapar dengan insektisida tersebut dan ditambah dengan insektisida dari golongan lain. Berdasarkan hasil penelitian *susceptibility test* nyamuk *Ae. aegypti* dari Kabupaten Semarang sudah resisten terhadap insektisida sipermetrin. Dengan demikian kemungkinan mekanisme resistensi lain dalam hal ini mekanisme secara molekuler dapat berlangsung pada spesies nyamuk tersebut (Ilham et al., 2017).

Penggunaan insektisida piretroid yang dilakukan secara terus menerus dalam waktu lama, tidak membunuh 100% nyamuk *Ae. aegypti* yang terpapar dan selalu ada serangga yang tetap hidup. Pada awalnya jumlahnya hanya sedikit, tetapi dalam periode tertentu akan mengalami peningkatan populasi nyamuk yang hidup karena terjadi proses berkembangbiak sekaligus mewariskan kemampuan

untuk resisten terhadap insektisida yang sama kepada keturunan selanjutnya (Yudhana et al., 2017).

Pada penelitian ini ditemukan adanya mutasi 2 jenis mutasi yaitu mutasi homozigot (G/G) dan mutasi heterozigot (V/G). Hasil penelitian menunjukkan bahwa di Kelurahan Tambakboyo 2 nyamuk belum mengalami mutasi (V/V), 7 nyamuk mengalami mutasi homozigot (G/G), dan 1 nyamuk mengalami mutasi heterozigot (V/G). Seluruh nyamuk yang diperiksa di Kelurahan Kupang telah mengalami mutasi, 5 nyamuk mengalami mutasi homozigot (G/G) dan 5 nyamuk mengalami mutasi heterozigot (V/G). Hasil dari Kelurahan Panjang menunjukkan 1 nyamuk belum mengalami mutasi (V/V), 8 nyamuk mengalami mutasi homozigot (G/G), dan 1 nyamuk mengalami mutasi heterozigot (V/G). Hal ini dapat diartikan bahwa dari keseluruhan sampel yang diperiksa terdapat 3 nyamuk yang belum mengalami mutasi (V/V), 20 nyamuk mengalami mutasi homozigot (G/G) pada alel 1016G, dan 7 nyamuk mengalami mutasi heterozigot pada domain kedua gen V1016G.

Terdapat 3 dari 30 sampel yang belum mengalami mutasi, selaras dengan hasil penelitian di Thailand yang menunjukkan bahwa 74 dari 170 sampel nyamuk *Ae. aegypti* masih *susceptible* atau belum mengalami mutasi (V/V) (Stenhouse et al., 2013). *Ae. aegypti susceptible* juga ditemukan pada penelitian yang dilakukan di Bengal Barat, India, memeriksa 5 sampel menunjukkan bahwa hasil penelitian tidak ditemukan mutasi pada alel 1016G terkait dengan resistensi yang diamati, baik mutasi homozigot maupun heterozigot, seluruhnya masih *susceptible*. Pada wilayah dengan individu nyamuk *Ae. aegypti susceptible*, frekuensi penggunaan

piretroid yang digunakan dan polimorfisme pada gen target harus dipantau secara berkala untuk mendeteksi munculnya resistensi piretroid pada populasi *Ae. aegypti* (Saha et al., 2018).

Hasil penelitian ini menunjukkan 20 dari 30 sampel *Ae. aegypti* yang diperiksa terdeteksi telah mengalami mutasi homozigot (V/V). Hal tersebut sejalan dengan penelitian di Yogyakarta, nyamuk *Ae. aegypti* didapatkan telah mengalami perkembangan resistensi terhadap piretroid. Individu nyamuk yang homozigot hampir sama mutasi genetiknya dengan tingkat resistensi individu yang heterozigot. Belum ditemukan adanya generasi strain rentan homozigot murni. Resistensi secara genetik diturunkan dan tingkat perkembangan resistensi bergantung pada frekuensi gen resisten, frekuensi penggunaan insektisida, dan lamanya aplikasi. Studi resistensi juga akan memberikan informasi penting untuk mengenali mekanisme resistensi. Hasil *screening* molekuler ditemukan adanya mutasi target-site dan mutasi kdr V10161 yang tinggi (87%). Pembentukan strain homozigot rentan memerlukan waktu di atas lima generasi (Isfanda et al., 2017).

Sebuah hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua individu nyamuk yang mengalami mutasi V1016G homozigot mampu bertahan hidup atau bersifat resisten pada paparan insektisida permetrin (0,75%) dan 23,4% dari kelompok yang mengalami mutasi heterozigot mampu bertahan hidup (Harris et al., 2010). Hal ini mengindikasikan bahwa kemungkinan mekanisme resistensi terhadap insektisida piretroid pada nyamuk *Ae. aegypti* dipengaruhi oleh beberapa faktor yang tidak berdiri sendiri-sendiri. Selain melalui mutasi V1016G, resistensi *Ae. aegypti* terhadap insektisida sintetik piretroid juga dapat disebabkan karena

beberapa mutasi gen VGSC pada posisi yang lain diantaranya mutasi V1016G, F1534C, dan S989P (Kawada et al., 2014).

Mutasi heterozigot ditemukan pada 7 dari 30 sampel *Ae. aegypti* yang diperiksa pada penelitian ini. Alel 1016G bersifat resesif. Hal ini mengindikasikan bahwa nyamuk yang mengalami mutasi heterozigot masih berpeluang besar untuk tetap sensitif terhadap insektisida piretroid (Stenhouse et al., 2014). Hasil penelitian menunjukkan sebagian besar mutasi terjadi secara heterozigot, namun hal ini perlu menjadi perhatian dalam menentukan jenis insektisida yang akan digunakan dalam program pengendalian nyamuk *Ae. aegypti*. Adanya mutasi ini akan menyebabkan resistensi juga pada jenis insektisida lain yang berasal dari golongan sintetik piretroid (Widiastuti et al., 2015). Adanya perbedaan tingkat resistensi pada setiap strain disebabkan oleh perbedaan tingkat penggunaan dan jenis insektisida di tiap wilayah tersebut, selain latar belakang genetik dan variasi ekologis. Aplikasi insektisida yang dihentikan akan memberikan kesempatan bagi genotip rentan untuk bertahan hidup. Genotip rentan berasal dari pewarisan sifat gen resesif resisten heterozigot yang dihasilkan oleh perkawinan silang antara individu yang rentan dan resisten (Mantolu et al., 2016).

Frekuensi yang lebih tinggi pada mutasi heterozigot dibandingkan mutasi homozigot mempercepat terjadinya resistensi di masa depan karena tidak ada mekanisme pelindung pada nyamuk. Mekanisme perlindungan tergantung pada faktor genetik; tunggal atau resesif, semi dominan, atau dominan dalam proses keturunan. Resistensi heterozigot jarang terjadi pada suatu populasi, tetapi jika mutasi heterozigot muncul dan bertahan hidup hingga terjadi perkawinan dengan

heterozigot lainnya menghasilkan mutan-mutan homozigot dengan resistensi lebih kuat terhadap insektisida. Jika mutan homozigot menjadi dominan, resistensi menyebar dengan cepat dalam suatu populasi dikarenakan kemudahan *Ae. aegypti* untuk beradaptasi dengan lingkungannya (Hasmiwati & Supargiyono, 2018).

## 5.2. HAMBATAN DAN KELEMAHAN PENELITIAN

Hambatan dalam penelitian ini antara lain ovitrap untuk mengambil sampel beberapa ada yang tumpah atau bahkan dijadikan mainan anak-anak. Tetapi sejak kasus DBD di Kecamatan Ambarawa meningkat pada tahun 2017 dan ditetapkan sebagai wilayah endemis, penduduk di wilayah kerja Puskesmas Ambarawa telah membuat ovitrap secara mandiri sehingga sampel larva *Ae. aegypti* dapat diambil dari ovitrap yang sudah ada tersebut.

Selain itu pada pelaksanaan uji deteksi resistensi *Ae. aegypti* menggunakan teknik PCR di laboratorium beberapa kali terjadi *human errors* salah satunya adalah saat sedang melaksanakan serangkaian teknik isolasi DNA sampai pada tahap *wash buffer* II, seluruh sampel dari Kelurahan Tambakboyo tumpah dan hasil PCR pada *gel documentation system* tidak dapat terbaca, sehingga harus dilakukan pengambilan sampel ulang dari Kelurahan Tambakboyo.

Kelemahan pada penelitian ini diantaranya yaitu uji PCR seharusnya adalah uji lanjutan dari uji konvensional. Namun pada penelitian ini tidak dilakukan uji konvensional dan langsung mengambil sampel dari lapangan untuk dilakukan uji molekuler karena keterbatasan waktu. Secara metodologi uji lanjutan tanpa uji konvensional tidak menjadi masalah selama dapat dipastikan

tidak adanya penggunaan insektisida jenis lain dan *cross-resisten* yang terjadi. Dalam penelitian ini penggunaan insektisida hanya dapat dipastikan dengan paparan insektisida dari fogging yang telah dilaksanakan. Kelemahan lain pada penelitian ini adalah hanya melihat satu mutasi saja yaitu mutasi V1016G. Mutasi gen VGSC pada beberapa posisi dapat terjadi secara bersamaan dalam satu individu nyamuk, seperti yang dilakukan peneliti-peneliti terdahulu salah satunya dilakukan di Palu dengan temuan mutasi pada titik V1016G dan S989P (Purwaningsih et al., 2019).

## **BAB VI**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. SIMPULAN**

Hasil penelitian menggunakan uji molekuler menunjukkan bahwa 80% sampel dari Kelurahan Tambakboyo telah terdeteksi resisten, 100% dari Kelurahan Kupang telah terdeteksi resisten, dan 90% sampel dari Kelurahan Panjang telah terdeteksi resisten. Hal tersebut mengindikasikan adanya mutasi pada gen VGSC pada kodon 1016 *Ae. aegypti* yang diperiksa.

#### **6.2. SARAN**

Beberapa saran yang dapat diberikan antara lain:

1. Manajemen penggunaan, pemilihan, dan rotasi jenis insektisida yang dilakukan oleh Dinas Kesehatan secara tepat diharapkan dapat mengurangi risiko terjadinya resistensi pada populasi nyamuk *Ae. aegypti* khususnya di wilayah kerja Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang.
2. Peneliti selanjutnya diharapkan melaksanakan lebih banyak deteksi pada beberapa kodon, tidak hanya mendeteksi pada kodon V1016G. Perlu diteliti lebih lanjut kejadian *double-mutant* atau bahkan *multiple-mutant Ae. aegypti*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, I., Astari, S., Rahayu, R., & Hariani, N. (2009). Status Kerentanan *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) pada Tahun 2006-2007 terhadap Malathion di Bandung, Jakarta, Surabaya, Palembang, dan Palu. *Biosfera*, 26 (2): 82-89.
- Arasy, A. A., & Nurwidayati, A. (2017). Status Resistensi *Anopheles barbirostitis* terhadap Permethrin 0,75% Desa Wawosangula, Kecamatan Puriala, Kabupaten Konawe, Provinsi Sulawesi Tenggara. *Jurnal Vektor Penyakit*, 11 (1): 27-32.
- Borror, D. J. (1992). *Pengenalan Pelajaran Serangga* (Edisi Keenam ed.). (S. Partosoedjono, Trans.) Yogyakarta: Yrama Widya.
- Chung, H.-H., Cheng, I.-C., Chen, Y.-C., Lin, C., Tomita, T., & Teng, H.-J. (2019). Voltage-Gated Sodium Channel Intron Polymorphism and Four mutations Comprise Six Haplotypes in an *Aedes Aegypti* Population in Taiwan. *PLOS Neglected Tropical Disease*, 13 (3): 1-16.
- Cox, R. H. (2009). New Expression Profiles of Voltage-gated Sodium Channels. *Microcirculation*, 48 (3): 243-257.
- Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang. (2017). *Laporan Tahunan*. Kabupaten Semarang: Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang.
- Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang. (2017). *Profil Kesehatan Kabupaten Semarang*. Kabupaten Semarang: Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang.
- Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. (2017). *Profil Kesehatan Jawa Tengah*. Semarang: Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah.
- Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. (2018). *Buku Saku Kesehatan Jawa Tengah*. Semarang: Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah.
- Djojosumarto, P. (2008). *Teknik Aplikasi Pestisida Pertanian*. Yogyakarta: Kanisius.
- Firmanta, Y. (2008). Deteksi Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* yang Berasal dari Daerah Endemis dan Non Endemis Dengue di Kota Jambi. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Ghiffari, A., Fatimi, H., & Anwar, C. (2013). Deteksi Resistensi Insektisida Sintetik Piret *Aedes Aegypti* (L.) Strain Palembang Menggunakan Polymerase Chain Reaction. *Aspirator*, 5 (2): 37-44.
- Harris, A. F., Rajatileka, S., & Ranson, H. (2010). Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83 (2): 277-284.
- Hasmiwati, & Supargiyono. (2018). Short Communication: Genotyping of Kdr Allele in Insecticide Resistant *Aedes aegypti* Populations from West Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*, 19 (2): 552-558.
- Hasmiwati, Tjong, D. H., & Novita, E. (2016). Detection and Identification of Synthetic Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) Vector in Padang. *Seminar Nasional Biologi* (pp. 277-284). Medan: USU Press.
- Ilham, M. M., Rahmi, D. T., & Lusiyana, N. (2017). Survei Entomologi, Kerentanan *Aedes aegypti* terhadap Insektisida Sintetik Piretroid, dan

- Identifikasi Gen VGSC di Desa Gondoriyo, Kabupaten Semarang. *Aspirator*, 1 (3): 40-48.
- Isfanda, Hadi, U. K., & Soviana, S. (2017). Determination of Homozygous Strain in *Aedes aegypti* (Linn.) Using Single Sib-selection Method. *Aspirator*, 9 (1): 21-28.
- Jahan, N., & Shahid, A. (2013). Evaluation Of Resistance Against Deltamethrin And Cypermethrin In Dengue Vector From Lahore, Pakistan. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23 (5): 1321-1326.
- Kawada, H., Oo, T. S., Kawashima, E., Maung Maung, Y. N., & Thant, M. (2014). Co-occurrence of Point Mutations in the Voltage-gated Sodium Channel of Pyrethroid Resistant *Aedes aegypti* Populations in Myanmar. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7 (17): 8-13.
- Kemenkes RI. (2011). *Modul Pengendalian Demam Berdarah Dengue*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kemenkes RI. (2012). *Pedoman Penggunaan Insektisida (Pestisida) dalam Pengendalian Vektor*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Kemenkes RI. (2013). *Survei Entomologi DBD*. Jakarta: Ditjen P3M dan PLP Depkes RI.
- Kemenkes RI. (2017). *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Lima, E., Araujo, S., & Oliveira, S. S. (2011). Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* Populations from Ceara, Brazil. *Parasites & Vectors*, 4 (1): 5.
- Mantolu, Y., Kustiati, Ambarningrum, T. B., Yusmalinar, S., & Ahmad, I. (2016). Status dan Perkembangan Resistensi *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) strain Bandung, Bogor, Makassar, Palu, dan VCRU terhadap Insektisida Permetrin dengan Seleksi Lima Generasi. *Jurnal Entomologi Indonesia*, 13 (1): 1-8.
- Martins, A., Lins, R., Linss, J., Peixoto, A., & Valle, D. (2009). Voltage-gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 81 (2): 108-15.
- Mulyani, A., Boewono, D. T., & Baskoro, T. (2017). A Study of *Aedes aegypti* Susceptibility Against Cypermethrin at Elementary Schools Yogyakarta. *TMJ*, 4 (1): 25-33.
- Murcia, O., Henríquez, B., Castro, A., Koo, S., Josue, Y., Márquez, R., Pérez, D., Cáceres, L., & Valderrama, A. (2019). Presence of the Point Mutations Val1016Gly in the Voltage-Gated Sodium Channel Detected in a Single Mosquito from Panama. *Parasites and Vectors*, 12 (62): 1-7.
- Perdana, F. (2016). Penetapan Kadar Pestisida Sipermetrin dalam Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dengan Metode KCKT. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Purwaningsih. (2017). Status Kerentanan dan Mekanisme Resistensi Nyamuk *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Sebagai Vektor *Dengue* terhadap Insektisida Malation dan Sipermetrin di Kecamatan Palu Barat . *Tesis*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Purwaningsih, Umniyati, S. R., & Mulyaningsih, B. (2019). Combined Target Site VGSC Mutations Play a Primary Role in Pyrethrod Resistant Phenotypes

- of *Aedes aegypti* as Dengue Vector from Palu City, Central Sulawesi. *Indonesian Jurnal Of Tropical and Infectious Disease*, 7 (5): 93-98.
- Puskesmas Ambarawa. (2019). *Laporan Tahunan*. Semarang: Puskesmas Ambarawa.
- Safar, R. (2010). *Insektisida dan Resistensi, Buku Parasitologi Kedokteran*. Bandung: Yrama Widya.
- Saha, P., Moytre, C., Ballav, S., Chowdhury, A., Basu, N., & Maji, A. K. (2018). Prevalence of Kdr Mutations and Insecticide Susceptibility Among Natural Population of *Aedes aegypti* in West Bengal. *Plos One*, 14 (4): 10-15.
- Salgueiro, P., Serrano, C., Gomes, B., Alves, J., & Sous. (2019). *Aedes aegypti* Isolate CV\_01 Cytochrome c Oxidase Subunit I (COI) Gene, Partial CDS; Mitochondrial. *GenBank*.
- Sarkar, Bhattacharyya, K., Borkotoki, A., Goswami, D., Rabha, B., Baruah, I., & Srivastava, R. B. (2009). Insecticide Resistance and Detoxifying Enzyme Acticity in The Principal Bancroftian Filariasis Vector, *Culex quinquefasciatus* in Northeastern India. *Medical and Veterinary Entomology*, 23 (2): 122-131.
- Sayono, Syafruddin, D., & Sumanto, D. (2012). Distribusi Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* terhadap Insektisida Sipermetrin di Semarang. *Jurnal UNIMUS*, 6 (1): 263-269.
- Sembiring, O. (2009). Efektifitas Beberapa Jenis Insektisida terhadap Nyamuk *Aedes Aegypti*. *Tesis*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Sinkins, S. (2010). Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vectors. *J Sci*, 16 (5832): 1718-1723.
- Stenhouse, S. A., Plernsub, S., Yanola, J., Lumjuan, N., Dantrakool, A., Choochote, W., & Soombon, P. (2013). Detection of the V1016G Mutation in the Voltage-gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by Allele-specific PCR assay, and Its Distribution and Effect on Deltamethrin Resistance in Thailand. *Parasit Vectors*, 6 (1): 1756-1763.
- Sucipto, C. D. (2011). *Vektor Penyakit Tropis*. Yogyakarta: Gosyen Publishing.
- Sukmawati, Ishak, H., & Arsin, A. A. (2018). Uji Kerentanan untuk Insektisida Malathion dan Cypermethrine (Cyf 50 EC) terhadap Populasi Nyamuk *Aedes aegypti* di Kota Makassar dan Kabupaten Barru. *Higiene*, 4 (1): 41-47.
- Susanti, L., & Boesri, H. (2012). Insektisida Sipermetrin 100 g/l terhadap Nyamuk dengan Metode Pengasapan. *Kemas*, 7 (2): 156-163.
- Triwibowo, Y. (2006). *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: CV Andi Offset.
- Tyasningrum, W. S. (2017). Distribusi Alel 1016G Gen Voltage-Gated Sodium Channel pada Populasi *Aedes aegypti* Strain Dataran Tinggi. *Skripsi*. Semarang: Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Untung, K. (2004). *Manajemen Resistensi Pestisida Sebagai Penerapan Pengelolaan Hama Terpadu*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.

- WHO. (2011). *Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2013). *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Vector Mosquitoes*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2014). *Dengue and Severe Dengue*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2016). *Monitoring and Managing Insecticide Resistance in Aedes mosquito populations (Interim Guidance for Entomologists)*. Geneva: World Health Organization.
- Widianti, T., & Anggraito, Y. U. (2017). *Buku Ajar Biologi Molekuler*. Semarang: UNNES.
- Widiarti, Boewono, D. T., Syafruddin, D., Garjito, T. A., Tunjungsari, R., & Asih, P. B. (2012). Identifikasi Mutasi Noktah pada "Gen Voltage Gated Sodium Channel" *Aedes aegypti* Resisten terhadap Insektisida Pyrethroid di Semarang Jawa Tengah. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 40 (1): 31-38.
- Widiastuti, D., Sunaryo, Pramestuti, N., Sari, T. V., & Wijayanti, N. (2015). Deteksi Mutasi V1016G pada Gen Voltage-Gated Sodium Channel pada Populasi *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) di Kabupaten Klaten, Jawa Tengah dengan Metode Allele-Specific PCR. *Vektora*, 7 (2): 65-70.
- Yudhana, A., Praja, R. N., & Yunita, M. N. (2017). Deteksi Gen Resisten Insektisida Organofosfat. *Jurnal Veteriner*, 18 (3): 446-452.
- Yusuf, Z. K. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*, 5 (6): 1-6.
- Zottel, C., & Kaufman, P. (2016). *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). *University of California*.