

IDENTIFIKASI MUTASI NOKTAH PADA” GEN VOLTAGE GATED SODIUM CHANNEL” *Aedes aegypti* RESISTEN TERHADAP INSEKTISIDA PYRETHROID DI SEMARANG JAWA TENGAH

Widiarti¹, Damar Tri Boewono¹, Triwibowo Ambar Garjito², Rima Tunjungsari¹, Puji BS Asih² dan Din Syafruddin³

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga

² Balai Litbang P2B2 Donggala

³ Lembaga Eijkman Jakarta

E mail : widiarti123@gmail.com

IDENTIFICATION OF A POINT MUTATION IN “THE VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL GENE ” OF *Aedes aegypti* FROM SEMARANG MUNICIPALITY CENTRAL JAVA ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PYRETHROID INSECTICIDES.

Abstract

*The identification of a point mutation in voltage-gated sodium channel gene was conducted on the major of dengue vector *Aedes aegypti* from Simongan Village, Semarang Municipality Central Java, which occurred to be resistant toward malathion and cypermethrin base on WHO methodology standard (impregnated paper). The objectives of this study was to identify the point mutation on the codon 1014 of voltage gated sodium channel gene of *Ae. aegypti* mosquitoes which was associated with the vector resistance of pyrethroid group. The detection of a point mutation of voltage-gated sodium channel was conducted using DNA extraction and semi nested polymerase chain reaction (PCR) amplification of the mosquitoes resistant strain. The susceptibility test (as a screening resistant phenotype) showed that few samples of *Ae. aegypti* from Simongan Village, Semarang Municipality Central Java resistant to malathion 0,8 % (organophosphate group) and cypermethrin 0,25 % (pyrethroid group). The sequencing result showed that there has been a mutation from the leucine (TTA) which turned to be phenylalanin (TTT) (*kdr-w* type) on the codon 1014 at the voltage gated sodium channel gene of *Ae. aegypti* mosquitoes from Simongan Village, Semarang Municipality Central Java, which was associated with the pyrethroid insecticide resistance. There were 78 % mosquitoes which brought mutation alel *kdr-w* type on the codon 1014 F. Therefore dengue vector control activities should not use any pyrethroid insecticide group.*

*Key Words : Resistance, *Aedes aegypti*, Voltage Gated Sodium Channel (VGSC), Point Mutation.*

Abstrak

*Identifikasi mutasi noktah pada gen Voltage Gated Sodium Channel (VGSC) telah dilakukan pada nyamuk *Aedes aegypti* dari Kelurahan Simongan Kota Semarang, yang telah resisten terhadap insektisida Malathion dan Cypermethrin pada screening susceptibility test (Standar WHO Impregnated paper). Tujuan penelitian adalah untuk mendeteksi mutasi pada kodon 1014 gen VGSC nyamuk *Aedes aegypti* yang berkaitan dengan resistensi vektor terhadap insektisida kelompok pirethroid. Deteksi mutasi gen VGSC dilakukan dengan metode ekstraksi DNA dan amplifikasi seminested PCR pada*

nyamuk yang telah resisten. Hasil penapisan uji resistensi menunjukkan beberapa sample nyamuk *Aedes aegypti* dari Kota Semarang resisten terhadap insektisida cypermethrin 0,25 % (kelompok pyrethroid) dan malathion 0,8 % (kelompok organofosfat). Berdasarkan hasil konfirmasi sekuensing telah terjadi mutasi pada kodon 1014 dari leusin (TTA) menjadi fenilalanin (TTT) tipe *kdr-w*, gen VGSC pada nyamuk *Aedes aegypti* dari Kelurahan Simongan Kota Semarang, yang berkaitan dengan resistensi terhadap insektisida kelompok pyrethroid. Terdapat 78% dari sembilan larva membawa mutasi alel *kdr-w* pada kodon 1014F. Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan bahwa pengendalian vektor DBD di Kota Semarang menggunakan insektisida bukan dari kelompok pyrethroid.

Kata Kunci : Resistensi, *Aedes aegypti*, Voltage Gated Sodium Channel (VGSC), Mutasi Noktah.

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam upaya pengendalian nyamuk yang berperan sebagai vektor adalah adanya resistensi terhadap insektisida yang digunakan. Resistensi vektor dapat terjadi akibat adanya penekanan secara selektif penggunaan insektisida oleh Program Pemerintah Republik Indonesia, maupun insektisida yang digunakan oleh masyarakat/ rumah tangga. Berbagai kebijakan, strategi penanggulangan Demam Berdarah Dengue (DBD) telah diprogramkan untuk mencapai tujuan penanggulangan DBD, namun masih saja terjadi adanya kejadian luar biasa (KLB) di beberapa daerah di Jawa Tengah⁽¹⁾. Salah satu strategi utama dalam penanggulangan DBD adalah *fogging focus* dengan insektisida. Tujuan melakukan *fogging focus* adalah membunuh nyamuk dewasa dengan sasaran rumah penderita dan sekitarnya dengan radius 100 meter, sebanyak 2 siklus dengan interval satu minggu. *Fogging focus* yang dilakukan di Jawa Tengah menggunakan insektisida malathion dan cynof⁽²⁾. Pelaksanaan pengendalian secara kimia/*fogging* yang tidak berbasis bukti/*evidence based* tentang status kerentanan vektor setempat terhadap insektisida, perilaku vektor dan insektisida yang tepat serta dosis yang digunakan dapat menyebabkan gagalnya usaha pengendalian yang telah

dilakukan. Munculnya resistensi vektor terhadap insektisida yang semakin meluas menambah sulit dalam penanggulangan penyakit tular vektor termasuk DBD. Mekanisme resistensi terhadap insektisida mempunyai dasar secara biokimia. Dua bentuk mekanisme utama resistensi secara biokimia adalah : 1). *Target site resistance* yang terjadi apabila insektisida tidak lagi dapat mengikat target/ sasaran. 2). *Detoxification enzyme-based resistance* yang terjadi karena peningkatan aktivitas enzim esterase, oksidase, atau *glutathione- S-transferase* (GST) untuk degradasi insektisida sebelum mencapai tempat sasaran (target site)⁽³⁾. Deteksi dini status kerentanan vektor terhadap insektisida dapat bermanfaat sebagai informasi program untuk pemilihan insektisida yang tepat dalam pengendalian vektor secara lokal spesifik. Deteksi resistensi vektor terhadap insektisida dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu : 1. Deteksi secara konvensional dengan metode standart WHO *susceptibility test* menggunakan *impregnated paper*, 2. Deteksi secara biokimia atau enzimatik menggunakan mikrotiter, dan 3. Deteksi secara molekuler. Prinsip dasar deteksi resistensi pada vektor secara molekuler adalah mengidentifikasi gen yang menjadi target kelompok insektisida secara konvensional, yang salah satunya adalah gen *voltage gated sodium channel* (VGSC) akibat penekanan

secara selektif insektisi da kelompok Organochlorin dan Pyrethroid serta gen *Acetylcholin esterase (AceI)* akibat penekanan secara selektif insektisida kelompok Organophosphat dan Karbamat ⁽⁴⁾. Pada serangga yang telah resisten terhadap insektisida kelompok pyrethroid dan DDT mekanisme resistensi penting adalah terjadinya perubahan atau mutasi pada gen *VGSC*. Secara molekuler pada gen *VGSC* terjadi perubahan satu basa nukleotida pada asam amino leucine menjadi fenilalanin yang berkaitan dengan resistensi ^(5, 6). Mutasi gen *VGSC* menyebabkan adanya polimorfisme alel *knockdown resistance (kdr)*, yaitu alel *kds*, *kdr-w* dan *kdr-e*. Mutasi pertama kali terdeteksi pada *Anopheles gambiae* dari daerah *West Africa*, sehingga diberi istilah *kdr-w* yang disebabkan adanya perubahan asam amino leucine menjadi phenilalanin (TTA menjadi TTT), yaitu L1014 menjadi 1014F. Kemudian mutasi kedua disebut *kdr-e* atau *East Africa* yang menghasilkan adanya perubahan asam amino leucine menjadi serine (TTA menjadi TCA, yaitu L1014 menjadi 1014S) ^(7, 8). Mutasi pada gen *VGSC* juga telah terjadi pada nyamuk *Anopheles culifacies* pada kodon 1014 dari India ⁽⁹⁾ dan di Indonesia sendiri telah dilaporkan pada nyamuk *Anopheles sundaicus*, *Anopheles aconitus*, *Anopheles subpictus* dan *Anopheles vagus* ⁽¹⁰⁾. Berdasarkan referensi tersebut diatas penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya polimorfisme pada gen *VGSC Aedes aegypti* dari Kota Semarang yang telah resisten terhadap insektisida cypermethrin dan malathion.

CARA

Resistensi vektor demam berdarah terhadap insektisida dilakukan dengan metode *Standard WHO impregnated paper* sebagai metode penapisan, yang kemudian dilanjutkan dengan deteksi alel *kdr* pada gen *VGSC* menggunakan *Semi nested PCR*.

Visualisasi hasil PCR gen *VGSC* menggunakan metode elektroforesis pada gel agarose 2%. Penentuan sekuen tipe alel *kdr* yaitu tipe *kds*, *kdr-w* atau *kdr-e* dilakukan dengan metode sekuensing.

a. Uji resistensi/ uji kerentanan dengan metode standar WHO *susceptibility test* menggunakan *impregnated paper* ⁽¹¹⁾ :

Jentik nyamuk yang tertangkap dipelihara menjadi dewasa di laboratorium B2P2VRP Salatiga. Setiap hari jentik diberi makan yang berupa serbuk campuran bekatul dan daging dengan perbandingan 10 : 4 sebanyak 75 mg – 200 mg disesuaikan besarnya instar larva. Setelah larva menjadi nyamuk dewasa (F1) baru dilakukan uji *susceptibility* /uji resistensi standar WHO menggunakan *impregnated papers* atau uji secara konvensional. Kondisi perut nyamuk dewasa yang digunakan untuk uji *susceptibility* adalah kenyang darah (*blood fed*) dan berumur ± 2-3 hari.

Digunakan metode baku standar WHO dengan “*impregnated paper*”:

- a. Organofosfat : Malation 0,8%.
- b. Karbamat : Bendiokarb 0,1%.
- c. Pirethroid : Deltametrin 0,05%, Permetrin 0,75%, Lambdasilalotrin 0.05 %, Sipermetrin 0,05% dan Etofenprok 0,5%.

Nyamuk yang digunakan adalah hasil penangkaran survei jentik dan dewasa (F1) dengan kondisi perut telah kenyang darah (*blood fed*). Kemudian dipersiapkan 4 - 5 tabung *susceptibility test* standar WHO dan pada setiap tabung uji (yang diberi tanda merah) dipasang kertas berinsektisida secara melingkar. Selanjutnya ke dalam tabung uji dimasukkan nyamuk betina sebanyak 20-25 ekor dengan kondisi perut penuh larutan gula. Nyamuk dikontakkan dengan insektisida selama 1 jam. Sebagai kontrol

digunakan 2 tabung yang diberi tanda hijau dan dilengkapi kertas tanpa insektisida. Nyamuk uji kontak dengan kertas berinsektisida selama 1 jam, kemudian dipindahkan ke dalam tabung *Holding* (penyimpanan) yang diberi tanda hijau. Kematian nyamuk dihitung/diamati setelah 24 jam penyimpanan. Selama penyimpanan kelembaban dijaga dan pada tabung holding dilengkapi handuk basah. Kriteria kerentanan ditentukan menurut Herath ⁽¹²⁾ :

- (i) kematian sebesar 99 – 100% = (peka)
- (ii) 80 – 98% = (diperlukan ferifikasi/ toleran)
- (iii) <80% = (resisten)

b. Isolasi DNA Nyamuk.

Isolasi DNA dilakukan dengan metode Chelex-100 *Ion-Exchanger* ⁽¹³⁾. Secara individual larva dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml. Sebanyak 50 µl PBS ditambahkan ke dalam tabung dan larva di hancurkan secara mekanik dengan menggunakan *Teflon pestle* . Kemudian ke dalam homogenat ditambahkan 1µl 0,5 % saponin dingin dan diaduk pelan-pelan. Setelah selesai tabung diinkubasi pada refrigerator suhu 4⁰C selama 24 jam. Homogenat larva nyamuk selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang untuk menghilangkan saponin. Setelah supernatan dibuang ke dalam tabung ditambahkan 1 ml PBS dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah selesai disentrifus ditambahkan air steril sebanyak 150 µl dan 20 % suspensi chelex sebanyak 50µl. Kemudian dipanaskan/didihkan dalam pada suhu >90⁰ C selama 10 menit. Selesai dipanaskan selama 10 menit, dan dilanjutkan dengan vortex beberapa detik. Untuk memisahkan chelex tabung dicentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan (cairan yang diatas) diambil dan dipisahkan dari pellet (endapan). Super-

natan tersebut yang digunakan untuk dilakukan PCR. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml yang baru. Campuran (supernatan) dibagi ke dalam dua tabung, satu tabung langsung digunakan dan tabung yang lain disimpan.

c. Amplifikasi Gen Voltage Gated Sodium Chanel (VGSC) dengan Metode Semi – Nested PCR.

Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu metode melipatgandakan (amplifikasi) secara eksponensial suatu sekuen nucleotida tertentu dengan cara *in vitro* . *Seminested* 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 polimerase ⁽¹⁴⁾. Sebelum dilakukan PCR, komponen-komponen pereaksi, yaitu 10 x dapar PCR; MgCl₂ 50mM; dNTP 10 mM; primer *kdr* F; Primer *kdr* R, enzim DNA polimerase *Taq* ; ddH₂O; dan sampel DNA dicampur terlebih dahulu dalam tabung mikrosentrifus 0,2 ml. Setelah pembuatan campuran pereaksi PCR selesai, tabung dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* . Primer-primer yang digunakan adalah primer *forward* AgF_ *kdr* ; primer *reverse* An_ *kdr* _R2; dan primer *reverse* AgR_ *kdr* . Sekuen primer yang digunakan dalam strategi amplifikasi gen VGSC pada nyamuk *Anopheles* di Indonesia adalah sebagai berikut ^(7, 10):

AgF_ *kdr* : 5'
GACCATGATCTGCCAAGATGGAAT 3'

An_ *kdr* _R2 : 5'
GAGGATGAACCGAAATTGGACA 3'

AgR_kdr : 5'
GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAGCA 3'

HASIL

Hasil penapisan uji resistensi beberapa sample nyamuk menggunakan metode standart WHO menghasilkan *Aedes aegypti* dari Kota Semarang resisten terhadap insektisida cypermethrin 0,25 % (kelompok pyrethroid) dan malathion 0,8 % (kelompok organofosfat).

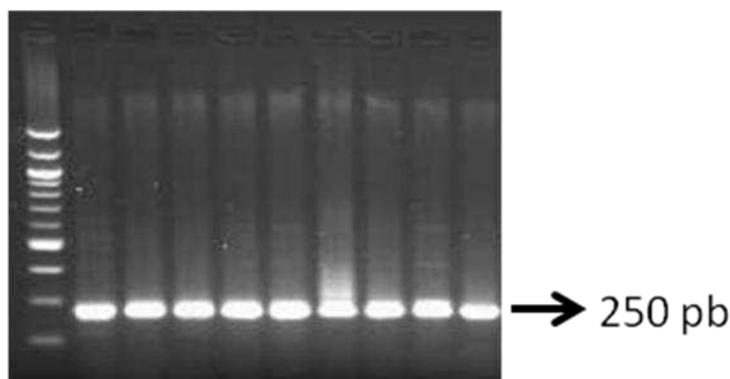
Isolasi larva DNA menggunakan metode Chelex-100, diperoleh DNA dari

larva nyamuk cukup banyak. Fragmen gen *VGSC* diidentifikasi menggunakan metode Semi-Nested PCR. Berdasarkan hasil amplifikasi fragmen target gen *VGSC* yaitu sepanjang 250 base pairs/bp pada Sembilan larva nyamuk yang diuji (Gambar 1).

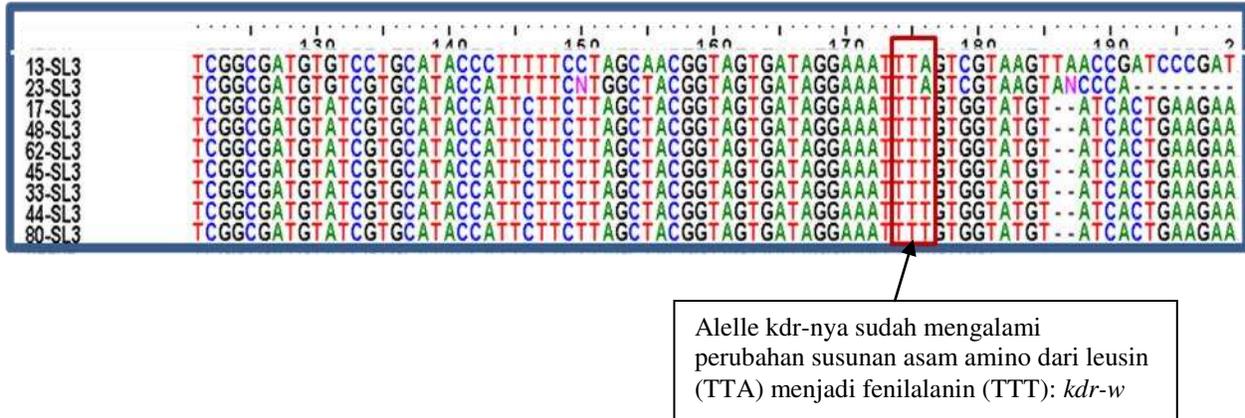
Hasil PCR dilanjutkan dengan sekuensing, yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya mutasi noktah pada gen *VGSC*. Hasil sekuensing dapat dilihat pada Gambar 2. Terdapat 78% dari sembilan larva nyamuk membawa mutasi alel *kdr-w* pada kodon 1014F, gen *VGSC*.

Tabel 1. Hasil uji *susceptibility* *Aedes aegypti* terhadap insektisida di Kota Semarang tahun 2009

LOKASI PENELITIAN MENURUT KECAMATAN	SPESIES VEKTOR	PERSENTASE KEMATIAN NYAMUK VEKTOR (%)					KETERANGAN
		BENDIO CARB 0,1 %	LAMB DASI- HALO THRIN 0,05 %	PERMETH RIN 0,75 %	CYPERME -THRIN 0,05 %	MALAT HION 0,8%	
Mateseh	<i>Ae. aegypti</i>	0	42	16	91	0	Kematian nyamuk 99 – 100% = peka 80 – 98% = perlu verifikasi <80% = terdapat individu resisten (Herath, 1997)
Sendang Mulyo	<i>Ae. aegypti</i>	1	56	7	90	0	
Sendang Guwo	<i>Ae. aegypti</i>	8	41	12	96	0	
Simongan Smg Barat	<i>Ae. aegypti</i>	15	52	15	65	0	
Manyaran Smg Barat	<i>Ae. aegypti</i>	10	48	18	70	0	



Gambar 1. Gambar pita gen *VGSC* *Aedes aegypti*



Gambar 2. Hasil sekuensing gen *VGSC* dari electropherogram data setelah dialignment dengan clustal consensus dari contoh nyamuk resisten pyrethroid

Penapisan resistensi contoh nyamuk menggunakan standart WHO *susceptibility test impregnated paper* sangat membantu dalam mendapatkan bukti adanya mutasi gen *VGSC* yang berperan pada resistensi. Hal tersebut dapat terjadi karena hasil *susceptibility test* memberikan gambaran sangat spesifik pada kejadian resistensi secara fenotip dan didukung dengan adanya mutasi yang ditemukan pada gen *VGSC* nyamuk *Aedes aegypti*. Hasil yang didapat menunjukkan *Aedes aegypti* dari Kota Semarang resisten terhadap insektisida cypermethrin 0,25 % (kelompok pyrethroid) dan malathion 0,8 % (kelompok organo-fosfat).

Mutasi yang ditemukan pada kodon 1014 gen *VGSC* yaitu tipe alel *kdr-w*, dan terdapat sekitar 78% dari sampel DNA yang diperiksa membawa mutasi pada kodon 1014F, yaitu perubahan asam amino leucine menjadi phenilalanin (TTA menjadi TTT). Pada sampel yang dianalisis dari Kota Semarang tidak ditemukan adanya tipe 1014S. Hal demikian dapat diterangkan bahwa spesies-spesies tersebut telah mengalami penekanan secara selectif insektisida kelompok pyrethroid. Seperti diketahui bahwa insektisida kelompok

ini banyak digunakan masyarakat/rumah tangga, sehingga *Ae.aegypti* sering terpapar dengan insektisida tersebut dan ditambah dengan insektisida dari bidang kesehatan. Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Tengah menginformasikan bahwa insektisida cynof telah digunakan di beberapa kota di Jawa Tengah disamping malathion untuk pengendalian *Ae. aegypti* secara *fogging*. Berdasarkan hasil *susceptibility Ae.aegypti* dari Kota Semarang juga sudah resisten terhadap Malathion, dengan demikian kemungkinan mekanisme resistensi lain dapat berlangsung pada nyamuk tersebut. Mekanisme resistensi yang dapat terjadi akibat insektisida golongan organo-fosfat adalah metabolik resisten, yaitu adanya enzim-enzim yang dapat mendegradasi insektisida sebelum mencapai sasaran/ target site⁽³⁾. Pada contoh nyamuk yang digunakan semuanya sudah resisten terhadap cypermethrin (kelompok pyrethroid), kemungkinan tidak ditemukannya tipe *kdr-e*. Tipe *kdr-e* adalah tipe mutasi kedua atau *East Africa* yang menghasilkan adanya perubahan asam amino leucine menjadi serine (TTA menjadi TCA, yaitu L1014 menjadi 1014S)^(7, 8). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ranson dkk, kemungkinan adanya tipe *kdr-e* terjadi pada

individu serangga yang telah mengalami *cross resisten* dari DDT ke pyrethroid⁽¹⁵⁾. Pada studi ini dapat dihasilkan adanya mutasi dari leusine menjadi phenilalanin pada gena *VGSC* *Ae.aegypti* dari Kelurahan Simongan yang telah resisten terhadap sipermethrin 0,05 % dan Malathion 0,8 %. Berdasarkan Ranson, *et al*, perubahan leusin menjadi phenilalanin menggambarkan tingginya resistensi *Ae. aegypti* terhadap insektisida kelompok pyrethroid dan organochlorin (DDT). Apabila mutasi pada *VGSC* terjadi perubahan dari leusin menjadi serine, berkaitan erat dengan resistensi terhadap insektisida kelompok organochlorin (DDT), hal demikian terjadi pada *Anopheles gambiae* dan *Culex pipiens*⁽⁵⁾. Hal demikian umum terjadi pada vektor malaria yang telah dikendalikan dengan insektisida kelompok pyrethroid dengan cara pemberian kelambu berinsektisida. Pada kenyataannya vektor demam berdarah di Kelurahan Simongan Kota Semarang, juga telah terjadi resistensi terhadap kelompok pyrethroid (sipermetrin). Dengan demikian memberikan bukti bahwa insektisida rumah tangga (yang sebagian besar mempunyai bahan aktif pyrethroid) menyumbang terjadinya resistensi dengan didukung hasil uji secara molekuler. Bukti bahwa sudah terjadi mutasi gen sasaran insektisida kelompok pyrethroid (*VGSC*) *Ae.aegypti* dari Kelurahan Simongan Kota Semarang, maka manfaat yang dapat diambil adalah bahwa program pengendalian vektor DBD *Ae.aegypti* seyogyanya menggunakan insektisida yang tepat (yang belum resisten). Telah diketahui juga bahwa populasi *Ae.aegypti* dari Kelurahan Simongan Kota Semarang telah resisten terhadap insektisida kelompok Malathion, padahal beberapa insektisida rumah tangga juga berbahan aktif karbamat. Dengan demikian penting dilakukan studi mekanisme resistensi lain yaitu mutasi glisin menjadi serine pada codon posisi 119

gen AchE 1 yang menyebabkan terjadinya resistensi terhadap insektisida kelompok organophosphat dan karbamat⁽¹⁶⁾.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil konfirmasi sekuen-sing telah terjadi mutasi pada kodon 1014 dari leusin (TTA) menjadi fenilalanin (TTT) tipe *kdr-w*, gen *VGSC* pada nyamuk *Aedes aegypti* dari Kelurahan Simongan Kota Semarang, yang berkaitan dengan resistensi terhadap insektisida kelompok pyrethroid.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan bahwa pengendalian vektor DBD di Kota Semarang menggunakan insektisida bukan dari kelompok pyrethroid.

DAFTAR RUJUKAN

1. Dinas Kesehatan Kota Semarang. Data Kasus DBD dan Klarifikasi Desa di Kota Semarang Tahun 2004.
2. Dinas Kesehatan Kabupaten Pati. Profil Kesehatan Kabupaten Pati Tahun 2006. Pemerintah Kabupaten Pati. 2006. 39 halaman.
3. Brogdon, W.G. and Janet C. McAllister. Insecticide Resistance and Vector Control. Emerging Infectious Diseases. 1998. Vol 4, No. 4., Oktober-Desember. P. 605-613.
4. Ffrench - Constant, R. H.; Philip J. Daborn and Gaele Le Goff. The genetics and genomics of insecticide resistance. TRENDS in Genetics. 2004. Vol. 20 No. 3. p. 163-170.
5. Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A L., Guillet, P., Pasteur, N and Pauron, D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. 1998. Insect Mol Biol 7 : 179-184.

6. Ranson, H., B. Jensen, J.M. Vulule, X. Wang, J. Hemingway and F.H. Collins. Identification of a point mutation in the voltage gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. 2000. *Insect Molecular Biology*. 9 (5), 491-497.
7. Kazanidou, A., D. Nikou, M. Gregoriou, J. Vontas & G. Skavdis. Short report: A multiplex PCR assay for simultaneous genotyping of *kdr* and *ace-1* Loci in *Anopheles gambiae*. 2009. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 80 (2) : 236-238.
8. Soderlund, D.M. Pyrethroid, knockdown resistance and sodium channels. 2008. *Pest Management Science*. 64: 610-616.
9. Singh, Om.P., Prerna Bali, J. Hemingway, Sarala K Subbarao, Aditya P Dash and Tridibes Adak. PCR-based method for the detection of L1014 *kdr* mutation in *Anopheles culicifacies sensu lato*. 2009. *Malaria Journal*, 8: 154. p2-8.
10. Syafruddin, D., A. Hidayati, P. Asih, W. Hawley, S. Sukowati, F. Lobo. Detection of 1014F *kdr* mutation in four major Anopheline malaria vectors in Indonesia. *Malaria Journal* 2010, 9:315.
11. WHO. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine organophosphate and carbamate insecticides. 1981. *Diagnostic Test WHO/VBC/81*. 806. 7p.
12. Herath, P.R.J. Insecticide Resistance Status in Disease Vectors and its Practical Implications. *Intercountry Workshop on Insecticide Resistance of Mosquito*
13. Wooden J, Kyes S, Sibley CH, 1993. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 9:303-305
14. Triwibowo Yuwono. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*, C.V ANDI OFFSET. 2006. 226 Halaman.
15. Etang, J., E. Fondjo, F. Chandre, I. Morlais, C. Brengues, P. Nwane, M. Chouaibou, H. Ndjemai & F. Simard. Short report : First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. 2006. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 74(5): 795-797.
16. Mylene, W; A, Berthomieu; C. Berticat; G, Lutfalla; V, Negre, N, Pasteur; A, Philips; JP, Leonetti; P, Fort and M, Raymond. Insecticide Resistance: a Silent Base Prediction. 2010. *Current Biology Vol 14*. N0 14. p 552-553