

MUTASI TITIK F1534C GEN *VOLTAGE GATED SODIUM CHANNEL* (VGSC) PADA *Aedes aegypti* DI KELURAHAN PANCUR PUNGAH

Fadjar Sidiq Hidayatullah¹, Chairil Anwar², dan Dwi Handayani²

¹Mahasiswa BKU Parasitologi, Program Studi Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya,

²Dosen BKU Parasitologi Program Studi Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Jl.Raya

Palembang-Prabumulih KM 32 Indralaya, Ogan Ilir

Email: fchapuchinno@yahoo.com

ABSTRACT

Background: The incidence of dengue hemorrhagic fever (DHF) has increased significantly throughout the world in the last decade. One of the challenges in eradicating DHF is the occurrence of vector resistance to insecticides. This study aimed to look at the mutation site of the VGSC codon F1534C *Aedes aegypti* on RT 5 & 6 Pancur Pungah Village, Muara Dua District, Ogan Komering Ulu Selatan Regency as a marker of resistance.

Methods: The samples in this study were larvae and pupae of *Aedes aegypti*. Larvae and pupae were bred into F1 generation and then tested for susceptibility and followed by polymerase chain reaction (PCR).

Result: The results of the susceptibility test carried out obtained mosquito mortality of 10.5% so it was categorized resistant based on WHO criteria. Continued PCR test found no mutation point occurred in the VGSC gene mutation point F1534C in *Aedes aegypti*. Therefore, the possibility of mutations in the VGSC gene is at another mutation point.

Keyword: Mutation, *Aedes aegypti*, F1534C

ABSTRAK

Latar Belakang: Kejadian demam berdarah *dengue* (DBD) telah meningkat signifikan di seluruh dunia dalam dekade terakhir. Salah satu tantangan dalam pemberantasan DBD adalah kejadian resistensi vektor terhadap insektisida. Penelitian ini bertujuan untuk melihat titik mutasi gen VGSC kodon F1534C *Aedes aegypti* di RT 5 & 6 Kelurahan Pancur Pungah Kecamatan Muara Dua Kabupaten Ogan Komering Ulu Selatan sebagai penanda terjadinya resistensi.

Metode: Sampel pada penelitian ini adalah larva serta pupa nyamuk *Aedes aegypti*. Larva dan pupa dibiakkan menjadi generasi F1 lalu dilakukan uji *susceptibility* dan dilanjutkan uji *polymerase chain reaction* (PCR).

Hasil: Hasil penelitian pada uji *susceptibility* yang dilakukan didapat kematian nyamuk sebesar 10,5% sehingga dikategorikan resisten berdasarkan kriteria WHO. Dilanjutkan uji PCR didapat tidak terjadi titik mutasi pada gen VGSC mutasi titik F1534C pada *Aedes aegypti*. Oleh karena itu, kemungkinan terjadinya mutasi pada gen VGSC berada pada titik mutasi yang lain.

Kata kunci: Mutasi, *Aedes aegypti*, F1534C

Pendahuluan

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) merupakan penyakit yang sangat mudah ditemukan di daerah tropis. DBD ditularkan oleh gigitan nyamuk *Aedes aegypti* kepada manusia. Banyak reaksi yang ditimbulkan salah satunya pendarahan dan syok sehingga menyebabkan angka kematian menjadi cukup tinggi.¹³

Kejadian DBD telah meningkat secara dramatis di seluruh dunia dalam beberapa dekade terakhir. Jumlah kasus yang dilaporkan meningkat dari 2,2 juta pada 2010 menjadi 3,2 juta pada 2015. Satu perkiraan baru-baru ini menunjukkan 390 juta infeksi DBD per tahun. Pada tahun 2018, DBD juga dilaporkan dari Bangladesh, Kamboja, India, Myanmar, Malaysia, Pakistan, Filipina, Thailand, dan Yaman. Diperkirakan 500.000 orang dengan DBD berat memerlukan rawat inap setiap tahun, dan dengan perkiraan 2,5% kasus kematian, setiap tahun.²⁰ Sedangkan di Indonesia angka DBD sejak tahun 1968 telah terjadi peningkatan jumlah kasus DBD, pada tahun 1968 hanya 58 kasus menjadi 158.912 kasus pada tahun 2009.⁷ Hal ini diperkuat dengan kejadian penyakit DBD per 1 Februari 2019 tercatat 15.132 kasus dengan angka kematian mencapai 145 jiwa di seluruh Indonesia. Provinsi dengan kasus DBD dan kematian akibat DBD paling tinggi saat ini adalah Provinsi Jawa Timur dengan 3.074 kasus dan 52 kematian.⁵ Untuk Sumatera Selatan tercatat 1449 kasus DBD dengan angka kematian 7 kasus.¹ Sampai dengan Februari 2019, menurut Direktur Penyakit Tular Vektor dan Zoonotik Kemenkes tercatat 11,280 kasus DBD di 22 provinsi di Indonesia dan beberapa diantaranya berstatus Kejadian Luar Biasa (KLB). Dengan angka kematian sebesar 110 jiwa, Indonesia termasuk kategori darurat DBD. Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan mencatat 486 kasus DBD dan

empat diantaranya meninggal dunia.⁸ Sebanyak 17 kasus terjadi di Kabupaten Ogan Komering Ulu Selatan (OKUS) dan 2 orang meninggal dunia.²²

Upaya pengendalian nyamuk yang merupakan vektor penyakit ini perlu dilakukan selain dengan tindakan pengobatan terhadap penderita. Hal ini merupakan usaha yang penting untuk menurunkan kasus yang diakibatkan oleh nyamuk tersebut.¹⁷ Ikatan insektisida piretroid terhadap VGSC memunculkan fenomena yang dikenal dengan istilah *knockdown*, yaitu pergerakan yang cepat diikuti dengan kelumpuhan dan kematian.¹⁰ Mekanisme timbulnya resistensi terhadap piretroid adalah perubahan struktur VGSC di susunan syaraf pusat nyamuk sebagai target utama piretroid, sehingga terjadi penurunan afinitas terhadap insektisida. Salah satu titik mutasi *Ae. aegypti* yang tersebar luas di seluruh Asia yaitu V1016G dan F1534C.¹⁴

Titik mutasi F1534C resisten terhadap piretroid tipe I dan dilaporkan terdapat pada banyak negara Asia, Amerika Latin dan Afrika.¹¹ Mutasi F1534C berada pada susunan TTC pada kodon pengkode fenil alanin berubah menjadi TGC (cysteine) sedangkan Mutasi V1016G adalah perubahan pada kodon pengkode valine menjadi glycine dengan transisi basa timin menjadi guanin pada susunan GTA menjadi GGA.²

Ada tiga cara mendeteksi resistensi sintetik piretroid menurut WHO yaitu *bioassay*, biokimia dan molekuler. Keberhasilan mengendalikan vektor nyamuk tergantung pada kerentanannya terhadap insektisida.³

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan uji di lapangan. Penangkapan larva *Ae. aegypti* akan dilakukan di semua Tempat

Penampungan Air (TPA) yang berada di 100 buah rumah yang berlokasi di Kelurahan Pancur Pungah, Kecamatan Muara Dua, Kabupaten OKUS, Provinsi Sumatera Selatan. Populasi adalah seluruh larva dan pupa *Ae. aegypti* yang berasal dari TPA yang berada di Kelurahan Pancur Bunga, Kecamatan Muara Dua, Kabupaten OKUS Provinsi Sumatera Selatan. Pengambilan sampel dilakukan secara *stratified random sampling* yaitu cara mengambil sampel dengan mengelompokkan rumah berdasarkan jumlah gang dan dilanjutkan dengan *simple random sampling* yaitu pengambilan sampel secara acak tanpa membagi kelompok kembali. Sampel yang diperoleh kemudian dibiakkan dan identifikasi secara *purposive sampling* yaitu berdasarkan pertimbangan sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan oleh peneliti. Pengambilan sampel dilakukan dengan mendatangi dan menyaring sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Kemudian dilakan proses *rearing* untuk mendapatkan nyamuk dewasa betina generasi F1.

Selanjutnya dilakukan uji kerentanan nyamuk *Ae. aegypti* terhadap bahan aktif insektisida tersebut menggunakan metode standar WHO berbasis *impregnated paper*. Nyamuk betina dewasa *Ae. aegypti non blood* umur 3-5 hari dimasukkan ke dalam tabung uji yang dindingnya dilapisi *impregnated paper* berbahan aktif insektisida tersebut. Nyamuk dikontakkan selama 60 menit dan dicatat jumlah nyamuk yang pingsan (*knockdown*) tiap 10 menit. Pasca kontak, nyamuk di *holding* selama 24 jam dan dihitung jumlah yang mati dan hidup. Setelah pemaparan selama 1 jam pertama ditemukan bahwa 100% nyamuk uji tidak mengalami pingsan atau kematian dan hal tersebut berlanjut sampai pada pengamatan pada 24 jam kemudian.

Nyamuk hasil uji *susceptibility* kemudian dilakukan elektroforesis menggunakan alat *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Metode biomolekuler yang digunakan adalah sebagai berikut: total DNA diisolasi menggunakan metode *Premiere Spesific Allel* berdasarkan protokol penyelia. Sampel nyamuk hasil uji bioassay tadi dilakukan proses *pooling* dengan memisahkan nyamuk hidup dan nyamuk mati dalam satu tabung effendorf. Dipisahkan per individu dan ditambahkan larutan PbS 1x sebanyak 300 µl dan divortex. Digerus dengan pestles. Sampel yang ada dalam tabung effendorf sebanyak 171 tabung effendorf, diambil 30 µl tiap sampel sebanyak 10 sampel lalu dimasukkan ke dalam 1 tabung effendorf baru dan menjadi 1 *pool* sampel ekstraksi. divortex kembali kemudian disimpan di suhu -4°C untuk sampel yang belum dilakukan ekstraksi DNA.

Tahap selanjutny dilakukan Isolasi dengan menggunakan *DNA Wizard Purification Kit*. Dimasukkan 600 ul *nuclei lysis solution* dalam tabung 1,5 ml, dinginkan dalam es dan dihomogenkan selama 10 detik. Ditambahkan 17,5 ul *protein kinase* ke dalam campuran, lalu diinkubasi selama 15-30 menit dalam suhu 65°C. Ditambahkan 300 µl *RNAase solution*, dihomogenkan. Dan diinkubasi 15-30 menit pada suhu 37°C. Didiamkan pada suhu ruangan selama 5 menit. Ditambahkan 200 µl *protein presipitation solution* pada suhu ruang, kemudian atur waktu penggunaan vorteks pada kecepatan tinggi selama 20 detik. Didinginkan sampel pada es selama 5 menit. Disentrifugasi 13.000 rpm selama 4 menit. Protein *precipitated* akan berbentuk endapan pelet putih. Ditambahkan 600 µl isopropanol ke dalam tabung 1,5 ml baru. Dipindahkan supernatan ke dalam tabung yang telah diisi isopropanol tersebut. Diaduk perlahan sampai terbentuk benang putih. Disentrifugasi

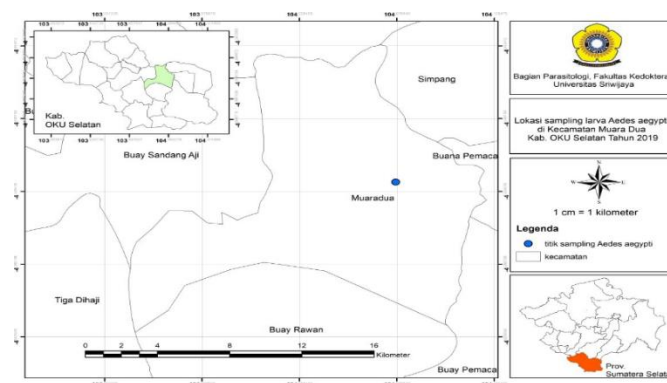
13.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. DNA akan terlihat seperti benang putih. Dibuang supernatan, kemudian ditambahkan etanol 70% pada suhu ruang. Disentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Diambil etanol pakai mikropipet, kemudian disaring sisa etanol menggunakan kertas saring. Dikeringkan pelet dalam suhu ruangan selama 10-15 menit. Dilarutkan pelet DNA dengan 100 μ l DNA *dehydration solution*. Diinkubasi sampel pada suhu 65^oC selama 1 jam atau pada suhu 4^oC selama 24 jam.

Dibuat campuran master mix yang terdiri dari *Go Green Taq* (Promega USA), 12,5 μ l ddH₂O, 3 μ l DNA cetakan (template) serta primer oligonukleotida reverse (R) dan forward (F) masing-masing 1 μ l, hingga volume total yang didapatkan 25 μ l. Kemudian dilakukan amplifikasi DNA dengan menggunakan sepasang primer spesifik alel. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Thermal cyclor*. Untuk menentukan suhu optimal amplifikasi, sebelumnya akan dilakukan optimasi terlebih

dahulu. Secara umum siklus PCR meliputi predenaturasi, denaturasi, *annealing*, *extension*, dan *final extension*

Hasil dan Pembahasan

Kabupaten OKUS merupakan wilayah dataran tinggi yang berbukit-bukit dengan ketinggian antara 45 sampai 1.643 mdpl. Kabupaten OKUS yang terbentuk pada tahun 2004, memiliki wilayah administrasi yang terbagi 19 kecamatan.¹² Sebagian besar wilayah kecamatan merupakan dataran tinggi. Hanya 6 kecamatan saja yang relatif datar, yaitu Kecamatan Muaradua, Buay Rawan, Buay Sandang Aji, Tiga Dihaji, Buay Runjung, dan Runjung Agung. Wilayah tertinggi di Kabupaten Ogan Komering Ulu Selatan adalah Gunung Seminung di Kecamatan Banding Agung, dengan ketinggian 1.888 meter dari permukaan laut. Secara administratif yaitu Kecamatan Muaradua sebagai ibu kota Kabupaten OKUS terdiri dari 9 (sembilan) desa, dan 5 (lima) kelurahan dengan luas wilayah 26.195 Ha atau 261,95 km².¹



Gambar 1. Titik Lokasi Pengambilan Sample Larva *Aedes aegypti* di Kecamatan Muara Dua Kabupaten OKUS

Penelitian dilakukan di 100 rumah penduduk di RT 05 dan RT 06 Kelurahan Pancur Pungah Kecamatan Muara Dua Kabupaten OKUS Provinsi Sumatera Selatan yang dapat dilihat pada Gambar 1. Dari 100 rumah yang didatangi, semuanya memiliki Tempat Penampungan Air (TPA) yang dapat dijangkau dan sebanyak 35 rumah ditemukan jentik nyamuk berupa larva dan atau pupa.

Dari 100 buah rumah yang diteliti, didapatkan hasil uji *susceptibility* dengan jumlah kematian nyamuk setelah dilakukan uji

susceptibility selama 24 jam adalah 10,5% (Tabel 1.) . Sesuai dengan kriteria WHO (2016) sebagai berikut:

- Konfirmasi resisten jika kematian < 90%.
- Kemungkinan resisten/toleran jika jumlah kematian 90-97%
- Dikatakan rentan terhadap insektisida jika jumlah kematian 98-100%. dapat diketahui bahwa nyamuk pada lokasi penelitian ini telah mengalami resisten terhadap permethrin 0,75%.

¹⁹

Tabel 1. Hasil Uji Nyamuk *Ae. aegypti* Betina Terhadap Permethrin 0,75%

Perlakuan	Jumlah nyamuk	Jumlah nyamuk yang mati setelah 24 jam
1	23	2
2	25	1
3	25	3
4	24	3
5	25	9
Kontrol I	25	0
Kontrol II	24	0
Total	171	18

Hasil penelitian ini sesuai dengan temuan sebelumnya bahwa nyamuk *Ae. aegypti* menunjukkan hasil bahwa telah *Ae. aegypti* di Semarang, Banyumas, Tegal, Blora, Surakarta, Magelang, Yogyakarta, Sleman, Bantul dan Salatiga telah resisten terhadap permethrin 0,75% dengan prosentase kematian nyamuk 15% – 65%.²¹ Penelitian lain menyatakan bahkan status resisten juga ditemukan di Provinsi Jawa Tengah terhadap insektisida golongan piretroid dengan bahan aktif permethrin 0,75% dan deltamethrin 0,05%, namun masih sensitif terhadap golongan organofosfat dengan bahan aktif malathion 5%. Angka kematian atau mortalitas untuk golongan piretroid kurang dari 80%, yaitu 17% dan 67%,

sedangkan untuk golongan organofosfat mencapai 100%.¹⁸

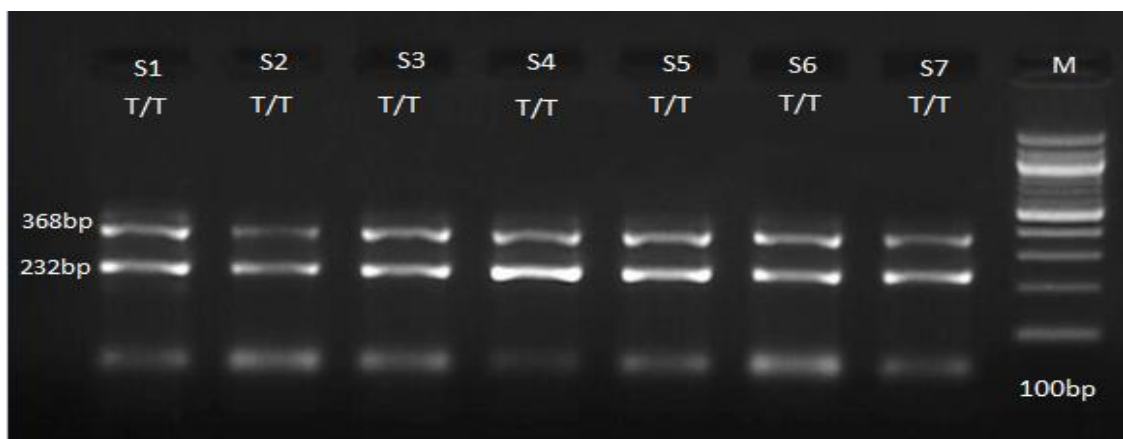
Ada 3 faktor yang mempengaruhi status kerentanan beberapa serangga termasuk nyamuk, yaitu: faktor genetik yaitu berupa gen yang menyandi pembentukan enzim esterase, yang dapat menyebabkan resistensi serangga terhadap insektisida baik organofosfat atau piretroid. Faktor genetik lainnya seperti adanya gen *knockdown resistance* (*kdr*) sehingga serangga resisten terhadap DDT. Selanjutnya faktor biologis, meliputi biotik karena pergantian generasi melalui perkawinan monogami atau poligami. Terakhir faktor operasional, meliputi bahan kimia yang digunakan dalam pengendalian

vektor baik golongan insektisida yang memiliki kesamaan target dan sifat insektisida yang pernah digunakan, serta aplikasi insektisida tersebut di lapangan meliputi cara aplikasi, frekuensi dan lama penggunaan.¹⁵

Berdasarkan kenyataan tersebut kemungkinan resistensi terjadi karena penggunaan insektisida dari golongan yang sama secara berkelanjutan terutama dari insektisida rumah tangga yang penggunaannya hampir setiap hari. Kematian nyamuk pada tiap uji pada tiap daerah berbeda menunjukkan hasil berbeda. Selain penggunaan insektisida baik dari program maupun rumah tangga untuk penanggulangan nyamuk dewasa, keberadaan jentik nyamuk di

lingkungan masyarakat juga turut mempengaruhi peningkatan kasus DBD ataupun status resistensi di kabupaten/kota tersebut.¹⁶

Kemudian berdasarkan hasil elektroforesis untuk gen VGSC mutasi titik F1534C terdapat 2 pita yang terbentuk pada pada titik F1534C yaitu dengan panjang 232 bp dan 368 bp. Panjang pita 368 bp menggambarkan kontrol pita yang harus ada di titik tersebut sedangkan panjang pita 232 bp menggambarkan titik F1534C tanpa terjadinya mutasi yang dapat dilihat pada Gambar 2. Hal ini menunjukkan bahwa nyamuk *Ae. aegypti* di tempat penelitian belum mengalami mutasi pada titik F1534C.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis Gen VGSC Titik F1534C pada Nyamuk *Aedes aegypti* di Kelurahan Pancur Pungah

Mutasi adalah kejadian berubahnya asam nukleat yang berpengaruh pada ekspresi protein sebagai pembentuk sel. Dalam pemeriksaan laboratorium mutasi dapat dilihat dengan menemukan perubahan asam amino. Secara invitro, mutasi dapat dipicu dengan pemberian insektisida dosis non letal. Untuk mengetahui adanya mutasi yang menimbulkan resistensi insektisida, maka digunakan primer dengan susunan dan panjang basa yang spesifik. Perubahan fenilalanin menjadi sistein pada kodon

1534 ditunjukkan dengan berubahnya susunan TTC menjadi TGC yaitu pada domain III subunit 6.^{11,6} Pada penelitian ini tidak dilakukan sequencing untuk melihat urutan basa.

Pada penelitian di Australia diatas memperlihatkan bahwa terjadi mutasi, baik yang homozigot maupun heterozigot yaitu berupa mutasi pada kodon 1534 mengubah fenilalanin menjadi sistein.⁴ Sedangkan pada penelitian yang dilakukan di Kota Chiang Mai, Thailand menunjukkan sering terjadi mutasi homozigot

C1534. Sehingga tidak terekspresinya gen mutasi pada penelitian sekarang karena titik mutasi bukan berada pada titik tersebut.¹¹ Pada penelitian lain memperlihatkan tidak menunjukkan adanya perubahan mutasi pada hasil PCR dan sequencing di kodon 1534.⁶

Tidak terjadinya mutasi pada kodon 1534 di Kota Jiayang juga dialami oleh peneliti lain dan mencoba menilai hubungan antara mutasi kdr pada kodon 1534 dan resistensi pada alel F1534S dan F1534L dianalisis secara terpisah. Mutasi F1534S secara bermakna dikaitkan dengan resistensi deltamethrin, tetapi mutasi F1534L tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok R dan S.⁹ Hal inilah menjadi dasar bahwa tidak terjadinya mutasi pada titik F1534C tetapi ada kemungkinan bisa terjadi pada titik lainnya.

Kesimpulan

Adapun kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini yaitu telah terjadinya resistensi pada uji susceptibility dengan jumlah kematian 10,5%, namun tidak adanya titik mutasi yang terjadi pada gen VGSC mutasi titik F1534C pada *Aedes aegypti* di Kelurahan Pancur Pungah, Kecamatan Muara Dua, Kabupaten Ogan Komering Ulu Selatan. Memerlukan penelitian lebih lanjut menggunakan primer lain yang bekerja pada titik mutasi yang diketahui berhubungan dengan kejadian resistensi sintetik piretroid. Penelitian lanjutan untuk mengetahui apakah telah terjadi mutasi pada tingkat enzim.

DAFTAR PUSTAKA

1. BPS OKUS. 2019. *Statistik Daerah Kabupaten Ogan Komering Ulu Selatan Tahun 2019*. Katalog BPS : 1101002.1608
2. Ghiffari, A. dan H. Fatimi. 2012. Deteksi Mutasi Gen Voltage Gated Sodium Channel *Aedes aegypti* Sebagai Penanda Resistensi Insektisida Sintetik Piretroid. Fokus Utama Vol 1(1): 12-24.
3. Ghiffari, A., H. Fatimi, dan C. Anwar. 2013. Deteksi Resistensi Insektisida Sintetik Piretroid pada *Aedes aegypti* (L.) Strain Palembang Menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Aspirator* Vol.5 (2): 37-44.
4. Harris, A.F., S. Rajatileka and H. Ranson. 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83(2): 277-284.
5. Jamil, A. I. 2019. Kemenkes: Per 1 Februari 2019, Ada 15.132 Kasus DBD di Indonesia. (<https://www.inews.id/news/nasional/kemenkes-per-1-februari-2019-ada-15-132-kasus-dbd-di-indonesia>, diakses pada tanggal 20 Maret 2020 pk. 19.30 WIB).
6. Kamgang, B., T. A. W. Bahun, A. P. Yougang, A. Lenga and C. S. Wondji. 2020. Constrasting Resistance Patterns To Type I and II Pyrethroids In Two Major Arbovirus Vectors *Aedes aegypti* and *Aedes Albopictus* in the Republic of the Congo, Central Africa. *Infectious Diseases of Poverty* Vol. 9 (23): 1-10.
7. Kemenkes RI. 2010. Demam Berdarah Dengue. *Buletin Jendela Epidemiologi* Vol.2 (1) : 1-48.
8. Kurniawan W. 2019. Dinkes Sumsel Catat 486 Kasus dan Empat Warga Meninggal Dunia Akibat DBD. (<http://palembang.tribunnews.com/2019/02/06/dinkes-sumsel-catat-486-kasus-dan-empat-warga-meninggal-dunia-akibat-dbd-berikut-data-lengkapnya>, diakses pada tanggal 19 Agustus 2019 pk. 20.00 WIB).
9. Liu, H., L. Liu, P.Cheng, L. Yang, J. Chen, Y. Lu. H Wang, X. Chen, and M. Gong. 2020. Bionomics and Insecticide Resistance of *Aedes albopictus* in Shandong, a High Latitude and High-Risk Dengue Transmission Area in China. *Parasites & Vectors* Vol. 13(11): 1-9.
10. Martins, A.J., R.M.M.A. Lins, J.G.B. Linss, A.A. Peixoto, and D. Valle. 2009. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid -Resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am. J. Trop. Hyg* Vol. 81 (1): 105-115.
11. Plernsub, S., J. Saingamsock, J. Yanola, N. Lumjuan, P.Tippawangkosol, K. Sukantason, C. Walton and P. Somboon. 2016. Additive Effect of Knockdown Resistance Mutations S989P, V1016G and F1534C, in A Heterozygous Genotype Conferring Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Plernsub et al. Parasite & Vectors* Vol.9 (1): 417-424.
12. Portal OKUS. 2019. Portal Resmi Ogan Komering Ulu Selatan Serasan Seandaan. (<https://okuselatankab.go.id/letak-geografis/> , diakses pada tanggal 5 Januari 2020 pk.10.00 WIB).

13. Prasetyaningsih, Sari, Prasetya H, and Wulandari. 2018. "Potensi Etnomedicine Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas*) sebagai Obat Demam Berdarah." *Prosiding Seminar Nasional Vokasi Indonesia* 6 (November): 6–11.
14. Purwaningsih, S.R. Umniyati, dan B. Mulyaningsih. 2019. Combined Target Site Vgsc Mutations Play A Primary Role In Pyrethroid Resistant Phenotypes Of *Aedes aegypti* As Dengue Vector From Palu City, Central Sulawesi. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease* Vol. 7 (5): 93–98.
15. Pradani, F.Y., M. Ipa, R. Marina, dan Y. Yuliasih. 2011. Status Resistensi *Aedes aegypti* dengan Metode Susceptibility di Kota Cimahi Terhadap Cypermethrin. *Aspirator* Vol.3 (1): 18-24.
16. Rahayu, N., S. Sulasmi, dan Y. Suryatinah. 2017. Status Kerentanan *Aedes aegypti* Terhadap Beberapa Golongan Insektisida di Provinsi Kalimantan Selatan. *JHECDs* Vol. 3 (1): 56–62.
17. Rahmawati, E., U.K. Hadi, dan S. Soviana. 2014. Keanekaragaman Jenis dan Perilaku Menggigit Vektor Malaria (*Anophles spp.*) di Desa Lifuleo Kecamatan Kupang Barat, Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur. *Jurnal Entomologi Indonesia* Vol.11 (2): 53-64.
18. Sayono dan U. Nurullita. 2016. Situasi Terkini Vektor *Dengue (Aedes aegypti)* di Jawa Tengah. *KEMAS* Vol. 11 (2): 96-105.
19. WHO. 2016. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. (<http://www.who.int/malaria>, diakses pada tanggal 15 Maret 2020 pk. 20.00 WIB).
20. WHO. 2019. Dengue and Severe Dengue. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>, diakses pada tanggal 20 Maret 2020 pk. 18.00 WIB).
21. Widiarti, B. Heriyanto, D.T. Boewono, U.W. Mujiono, Lasmia, dan Yuliadi. 2011. Peta Resistensi Vektor Demam Berdarah *Dengue Aedes aegypti* Terhadap Insektisida Kelompok Organofosfat, Karbamat, Pyrethroid di Propinsi Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta. *Bul. Penelit. Kesehat.* Vol. 39 (4): 176-189.
22. Windy, S. 2019. Awas! DBD Mulai Serang Warga OKU Selatan. (<https://sumeks.co/awas-dbd-mulai-serang-warga-oku-selatan/>, diakses pada tanggal 19 Agustus 2019 pk. 18.00 WIB).