

Optimasi Analisis *Melting Curve* untuk Skrining Cepat dan Sensitif Mutasi V1016G pada *Aedes aegypti* Resisten Sintetik Piretroid dengan Reaksi Rantai Polimerase Spesifik Alel

Optimization of Melting Curve Analysis for Rapid and Sensitive Screening of V1016G Mutation in Synthetic Pyrethroid Resistant *Aedes aegypti* by Allele Specific Polymerase Chain Reaction

Dyah Widiastuti^{1*}, Agustiningih², Ihda Zuyina Ratna Sari¹, Tri Ramadhani¹

¹Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Banjarnegara

Jalan Selamanik Nomor 16 A Banjarnegara, Jawa Tengah, Indonesia

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Jalan Percetakan Negara Nomor 23 Jakarta Pusat, Indonesia

*E_mail: umi.azki@gmail.com

Received date: 21-08-2021, Revised date: 17-11-2021, Accepted date: 23-11-2021

ABSTRAK

Deteksi mutasi V1016G penting dilakukan untuk mengetahui mekanisme resistensi piretroid sintetik pada populasi *Aedes aegypti*. Metode deteksi mutasi sebelumnya yang digunakan yaitu reaksi rantai polimerase spesifik alel atau *allele specific polymerase chain reaction* (AS-PCR) menggunakan PCR konvensional. Meskipun metode tersebut memiliki daya pembeda dan reproduktivitas yang tinggi, metode genotipe yang lebih cepat dan lebih sensitif sangat penting untuk mendeteksi mutasi secara akurat. Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi penggunaan SYBR® Green real-time PCR dan analisis *melting curve* untuk mengidentifikasi mutasi V1016G. Ekstraksi DNA genom nyamuk homozigot 1016G, heterozigot, dan *wild type* (1016 V) menggunakan *genomic DNA mini kit*. SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix digunakan untuk mengidentifikasi alel dengan real-time PCR mengikuti analisis *melting curve* dari ampikon. Analisis *melting curve* diperoleh hasil yang dapat direproduksi untuk lokus yang diuji. Temperatur leleh mencapai 78,5 °C untuk nyamuk homozigot 1016G dan 86 °C untuk nyamuk *wild type*, sedangkan nyamuk heterozigot menunjukkan dua puncak temperatur leleh pada 78,5 °C dan 86 °C. Hasil *melting curve* yang mudah ditafsirkan dan dibedakan ini konsisten dengan hasil AS-PCR yang diperoleh untuk alel yang sama. Aplikasi analisis *melting curve* untuk skrining mutasi V1016G cepat dan dapat diakses secara luas, serta dapat diterapkan dalam kondisi lapangan.

Kata kunci: V1016G, *Aedes aegypti*, *melting curve*, rantai polimerase spesifik alel

ABSTRACT

*Detection of V1016G mutation is important for identifying the mechanism of synthetic pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* population. The previous method has described an allele specific polymerase chain reaction (AS-PCR) using conventional PCR to detect the mutation. Although the method has great differentiating power and reproducibility, faster and more sensitive genotyping method is essential to accurately detect the mutation. This study evaluate the used of SYBR® Green real-time PCR and melting curve analysis (MCA) to identify the V1016G mutation. The collection of homozygous 1016G, heterozygous, and wild type (1016 V) mosquitoes DNA genome was extracted using genomic DNA mini kit. The SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix was used to identify alleles by real-time PCR followed melting curve analysis of the amplicons. Melting curve analysis produced reproducible results for the loci tested. The melting temperature was reached at 78.5 °C for homozygous 1016G mosquito and at 86 °C for wild type mosquito. Meanwhile, the heterozygous mosquito revealed two peaks of melting temperature at both 78.5 °C and 86 °C. These easily interpretable and distinguishable melting curve results were consistent with AS-PCR results obtained for the same alleles. The described MCA application for screening V1016G mutation is fast and widely accessible also could be implemented under field conditions.*

Keywords: V1016G, *Aedes aegypti*, *melting curve*, *allele specific polymerase chain*

PENDAHULUAN

Pengendalian penyakit tular vektor seperti demam berdarah dengue (DBD) di Indonesia masih fokus pada pengendalian populasi vektor yaitu nyamuk *Aedes aegypti*.¹ *Aedes aegypti* selain sebagai vektor virus Dengue juga dapat berperan sebagai vektor arbovirus lainnya seperti virus Zika, virus Chikungunya, dan virus demam kuning (*yellow fever virus*).^{2,3} Pengendalian *Ae. aegypti* secara ekstensif banyak dilakukan dengan menggunakan insektisida kimia karena memiliki efikasi tinggi dan relatif cepat untuk mengendalikan populasi nyamuk tersebut.² Belum tersedianya obat anti-dengue dan vaksin untuk menekan angka kejadian DBD juga mendorong penggunaan insektisida kimia. Hingga saat ini, penggunaan insektisida tetap dianggap sebagai upaya paling efektif untuk mengendalikan vektor dengue. Penggunaan insektisida kimia diharapkan dapat menjaga agar populasi vektor dengue di bawah ambang batas dalam menyebabkan penularan penyakit terutama ketika terjadi wabah.⁴ Beberapa kelas insektisida kimia sintetis telah banyak digunakan dalam strategi pengendalian vektor dengue di Indonesia terutama insektisida berbasis piretroid seperti deltamethrin.^{2,4} Piretroid banyak digunakan dalam pengendalian vektor karena memiliki aktivitas insektisida yang tinggi dan aksi yang cepat, serta memiliki toksisitas yang rendah terhadap mamalia.⁵ Insektisida berbasis piretroid juga mudah diperoleh dan sudah umum digunakan oleh masyarakat untuk perlindungan pribadi atau pengendalian nyamuk di lingkungan sekitar rumah.⁶

Pengendalian vektor menggunakan insektisida kimia yang dilakukan secara terus menerus pada waktu yang lama dapat menyebabkan terjadinya resistensi vektor target.⁷ Resistensi *Ae. aegypti* terhadap insektisida khususnya dari golongan piretroid sudah banyak dilaporkan dan tersebar luas di Indonesia.⁴ Sifat resisten dari *Ae. aegypti* tersebut dapat diturunkan ke generasi selanjutnya, sehingga dapat meningkatkan proporsi vektor resisten dalam populasi dan

menjadi penghambat keberhasilan dari program pengendalian vektor.¹

Berkurangnya kerentanan *Ae. aegypti* terhadap insektisida sudah sering dilaporkan, terutama terkait dengan dua mekanisme utama resistensi insektisida yaitu detoksifikasi metabolik dan mutasi pada lokasi target. Ekspresi berlebih pada gen yang termasuk dalam keluarga enzim detoksifikasi seperti esterase, glutathione-s-transferase (GST), dan sitokrom P450 oksidase juga telah dilaporkan pada *Ae. aegypti* yang resisten terhadap insektisida dari berbagai lokasi geografis. Resistensi enzimatik dicapai melalui peningkatan regulasi atau produksi berlebihan konstitutif enzim detoksifikasi. Enzim tersebut akan dengan cepat memetabolisme dan mendetoksifikasi insektisida atau dengan sekuestrasi, sehingga dapat menghambat atau mencegah insektisida mengikat situs targetnya.^{8,9}

Mekanisme resistensi *Ae. aegypti* yang kedua yaitu melalui mekanisme *knockdown resistance* atau *kdr* yaitu resistensi akibat seleksi insektisida yang tidak dapat diatasi oleh inhibitor metabolik, seperti piperonil butoksida (PBO). Mekanisme tersebut umumnya disebabkan adanya mutasi titik tunggal pada gen yang mengkode protein yang menjadi target senyawa insektisida.¹⁰ Insektisida piretroid merupakan neurotoksin yang bekerja dengan cara mentarget dan mengikat gerbang dari *voltage-gated sodium channels* (VGSC) yang terletak pada membran neuron.^{6,11} Adanya ikatan tersebut menyebabkan saluran VGSC tetap dalam keadaan terbuka dan aktif sehingga potensial aksi terjadi secara terus menerus.¹¹ Hal tersebut mengakibatkan serangga target mengalami kelumpuhan dengan cepat dan kematian atau yang dikenal dengan *knockdown*.^{6,11} Mutasi pada beberapa titik telah diidentifikasi pada gen *voltage-gated sodium channels* (*Vgsc*) dari populasi *Ae. aegypti* yang resisten piretroid di seluruh dunia.^{8,12} Salah satu jenis mutasi yang sering terlibat dalam resistensi piretroid pada *Ae. aegypti* yaitu mutasi pada dua kodon V1016G atau V1016I dan F1534C yang dapat bertindak

secara multiplikasi, terutama dalam kombinasi dengan mutasi tambahan S989P.⁸ Jika terdapat mutasi titik tertentu pada gen VGSC, transversi asam amino yang dihasilkan dapat menurunkan sensitivitas saluran natrium terhadap pengikatan piretroid. Hal tersebut juga dapat mengubah konformasi saluran natrium dan dapat menyebabkan saluran tetap tertutup dan tidak aktif.^{8,10}

Deteksi mutasi V1016G penting dilakukan untuk mengidentifikasi mekanisme resistensi piretroid sintetik pada populasi *Ae. aegypti*. Metode sebelumnya yang dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi yaitu dengan *allele specific polymerase chain reaction* (AS-PCR) menggunakan PCR konvensional.^{10,13} Meskipun metode tersebut memiliki daya pembeda dan reproduktivitas yang besar, metode genotyping yang lebih cepat dan lebih sensitif sangat penting untuk mendeteksi mutasi secara akurat. Kerugian menggunakan PCR konvensional adalah sulitnya proses interpretasi ketika pita tampak tipis. *Melting curve analysis* (MCA) yang dikombinasikan dengan *real-time* PCR mulai dikembangkan pada Tahun 1997. Dalam *high resolution DNA melting analysis* (HRM atau HRMA), *melting curve* dapat terjadi dari pendaran *dye* yang muncul ketika terbentuk untai ganda DNA. Analisis ini dapat digunakan untuk mendeteksi *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) serta adanya insersi atau delesi pada fragmen DNA yang teramplifikasi. Analisis *high resolution melting* (HRM) membentuk profil *melt curve* DNA yang spesifik and sensitif untuk membedakan variasi asam nukleat sehingga bisa digunakan untuk mendeteksi mutasi ataupun mengidentifikasi variasi genetik yang lain. Beberapa pemanfaatan analisis *melting curve* menggunakan HRM diantaranya adalah untuk identifikasi kapang, diferensiasi spesies mikobakterium, identifikasi spesies atau strain bakteri, penelitian genetika tumbuhan, dan analisis bahan pangan.¹⁴ Dengan menggunakan teknik ini, deteksi adanya perbedaan susunan asam nukleat dapat dilakukan tanpa melalui proses sekuensing yang memerlukan biaya sangat besar untuk dilakukan di negara

berkembang. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi penggunaan *SYBR® Green real-time* PCR dan MCA untuk mengidentifikasi mutasi V1016G dengan melihat perbedaan *melting curve* yang diharapkan interpretasi mutasi dapat dilakukan dengan lebih mudah dan cepat.

METODE

Sebanyak 10 nyamuk *Ae. aegypti* (5 nyamuk rentan dan 5 nyamuk resisten) yang diperoleh dari bahan biologi tersimpan (BBT) di Laboratorium Entomologi Balai Litbangkes Banjarnegara dilakukan proses genotyping. Nyamuk rentan adalah nyamuk yang mati setelah dipaparkan dengan insektisida golongan sintetik piretroid, adapun nyamuk resisten adalah nyamuk yang tetap hidup setelah dipaparkan dengan insektisida golongan sintetik piretroid. DNA genom setiap nyamuk diekstraksi menggunakan protokol *genomic DNA mini kit* (Geneaid).¹⁵

Genotyping Menggunakan V1016G AS-PCR

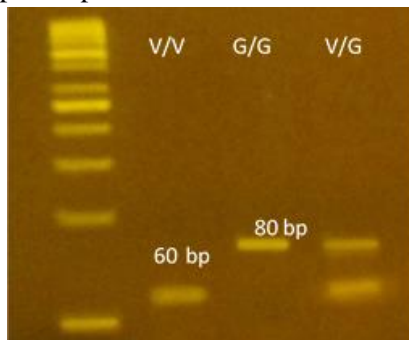
Setiap reaksi PCR dilakukan dalam volume 25 µl yang terdiri dari 2x *buffer* PCR (Promega), primer *forward* 0,25 µM (5'-ACCGACAAATTGTTTCCC-3'), 0,125 µM setiap primer *reverse* spesifik untuk Gly (5'-GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCC AGCAAGGCTAAGAAAAGGTTAACTC-3') atau Val (5'-GCGGGCAGCAAGGCTAAGAAAAGGTTA ATTA-3'), dan 25 ng DNA genom. Kondisi siklus termal dimulai dengan langkah denaturasi DNA awal selama dua menit pada 94°C, diikuti oleh 35 siklus PCR 30 detik pada 94°C, 30 detik pada 55°C, dan 30 detik pada 72°C diikuti dua menit pada 72°C untuk ekstensi akhir. Produk amplifikasi PCR dimasukkan ke dalam gel agarosa 4% dan dijalankan selama 50 menit pada 100 V dalam *buffer* TBE. Produk amplifikasi PCR dapat dibedakan berdasarkan ukurannya (60 bp untuk Val dan 80 bp untuk Gly).¹⁰

Analisis *Melting Curve* Menggunakan *Realtime PCR*

SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix digunakan untuk mengidentifikasi alel dengan *real-time PCR* mengikuti MCA dari amplicon membentuk sampel mutan homozigot (80 bp), sampel mutan heterozigot (80 bp dan 60 bp), dan sampel *wild type* (60 bp). Setiap reaksi PCR dilakukan dalam volume 25 µl yang terdiri dari 2x *buffer PCR* (Promega), primer *forward* 0,25 µM (5'-ACCGACAAATTGTTTCCC-3'), 0,125 µM setiap primer *reverse* spesifik untuk Gly (5'-GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCAGCAAGGCTAAGAAAAGGTAACTC-3') atau Val (5'-GCGGGCAGCAAGGCTAAGAAAAGGTAACTA-3'), dan 25 ng DNA genom. Kondisi siklus termal dimulai dengan langkah awal denaturasi DNA selama dua menit pada 94 °C, diikuti oleh 35 siklus PCR 30 detik pada 94 °C, dan 30 detik pada 55 °C. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

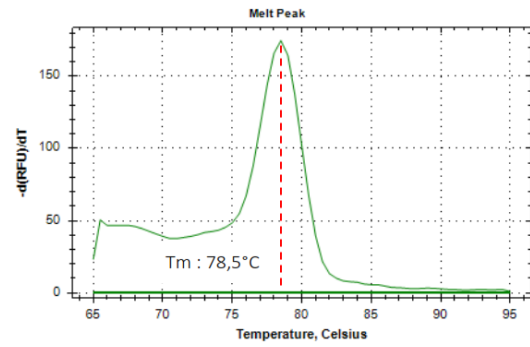
HASIL

Hasil deteksi mutasi V1016G menggunakan AS-PCR konvensional ditampilkan pada Gambar 1.

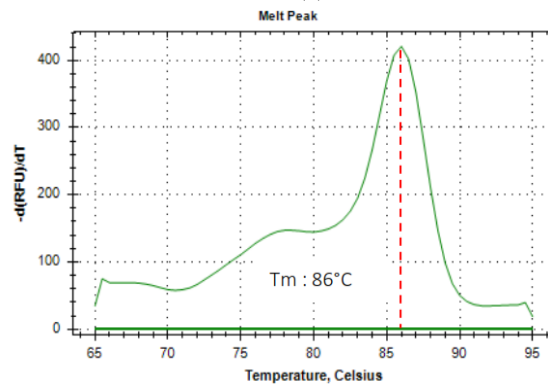


Gambar 1. Gel Elektroforesis Hasil Deteksi V1016G

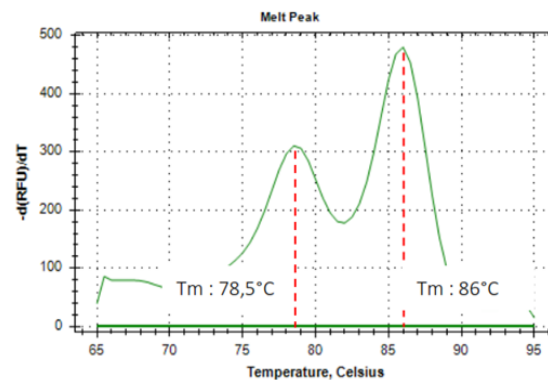
Gambar 1 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan panjang basa pada alel 1016 antara nyamuk yang mengalami mutasi dan nyamuk *wild type*. Hasil deteksi mutasi V1016G dengan analisis *melting curve* menggunakan *real-time PCR* ditampilkan pada Gambar 2.



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. *Melting curve* pada *wild type* (a), mutan homozigot (b) dan pada mutan heterozigot (c)

Gambar 2 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan temperatur leleh pada alel 1016 antara nyamuk yang mengalami mutasi dan nyamuk *wild type*. Temperatur leleh mencapai 78,5 °C untuk nyamuk yang tidak mengalami mutasi (*wild type*) dan pada 86 °C untuk nyamuk yang mengalami mutasi homozigot 1016G. Adanya perbedaan temperatur leleh ini

menghasilkan *melting curve* yang memiliki puncak yang berbeda. Adapun temperatur leleh untuk nyamuk yang mengalami mutasi heterozigot akan menghasilkan kurva yang memiliki dua puncak yaitu pada posisi 78,5 °C dan 86 °C. Terbentuknya kurva yang memiliki puncak yang berbeda ini menggambarkan bahwa terjadinya mutasi V1016G dapat diinterpretasi dengan mudah menggunakan uji *real-time* PCR.

Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa temperatur leleh yang dicapai pada deteksi mutasi V1016G dengan analisis *melting curve* menggunakan *real-time* PCR selaras dengan hasil deteksi dengan AS-PCR konvensional. Nyamuk yang mengalami mutasi menghasilkan produk PCR yang lebih panjang (80 bp) dibanding nyamuk *wild type* (60 bp). Adapun nyamuk yang mengalami mutasi heterozigot menunjukkan kurva yang memiliki dua pita yaitu pada posisi 80 bp dan 60 bp. Demikian pula hasil deteksi mutasi V1016G dengan analisis *melting curve* menggunakan *real-time* PCR menunjukkan bahwa nyamuk yang mengalami mutasi menghasilkan *melting curve* dengan puncak kurva yang lebih tinggi (86 °C) dibanding nyamuk *wild type* (78,5 °C), sedangkan nyamuk yang mengalami mutasi heterozigot menunjukkan kurva yang memiliki dua puncak yaitu pada posisi 86 °C dan 78,5 °C.

PEMBAHASAN

Terjadinya resistensi terhadap piretroid sekarang ini menjadi kendala utama dalam pengendalian nyamuk vektor penyakit.⁵ Sebanyak 12 mutasi titik pada VGSC terkait dengan *knockdown resistance* (*kdr*) terhadap piretroid telah teridentifikasi pada *Ae. aegypti*, tetapi hanya lima mutasi yang secara fungsional telah dikonfirmasi mengurangi kepekaan VGSC nyamuk terhadap piretroid, salah satunya V1016G/I.^{3,9} Mutasi V1016G merupakan salah satu dari tiga jenis mutasi *kdr* (V1016G, F1534C, dan S989P) yang terdistribusi luas dan terdeteksi pada populasi *Ae. aegypti* resisten piretroid di Asia Tenggara, termasuk Indonesia.⁹

Analisis *melting curve* saat ini telah digunakan untuk genotiping dan skrining mutasi dalam beberapa penelitian dan aplikasi klinis lainnya.^{16,17} Prinsip metode ini ketika untai ganda DNA mengalami disosiasi pada saat proses denaturasi, maka pendaran fluoresens akan menurun. Kecepatan fragmen DNA mengalami *melting* dipengaruhi oleh susunan basa sekuen yang dianalisis. Perbedaan *melting curve* yang muncul mencerminkan adanya variasi genetik diantara produk PCR. Kemampuan analisis HRM untuk genotiping dan deteksi mutasi telah banyak diuji dalam berbagai penelitian.¹⁴ Koleksi sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang digunakan dalam optimasi ini sebelumnya telah dianalisis dengan AS-PCR menggunakan gel agarosa konvensional. Kelemahan deteksi menggunakan gel agarosa konvensional adalah sensitivitasnya yang rendah. Jika pita DNA yang terbentuk terlalu tipis maka interpretasi menjadi sulit dilakukan.

Pendekatan eksperimental ini diterapkan pada ketiga sampel nyamuk dengan mutasi homozigous V1016G, mutasi heterozigous V1016G, dan *wild type*. Pendekatan ini akhirnya menghasilkan *melting curve* yang mudah dibedakan. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan *melting curve* antara nyamuk yang tidak mengalami mutasi dengan nyamuk yang mengalami mutasi baik homozigot maupun yang heterozigot. Nyamuk yang mengalami mutasi homozigot memiliki temperatur leleh yang lebih tinggi dibanding dengan nyamuk yang tidak mengalami mutasi. Perbedaan temperatur leleh dapat terjadi karena adanya perbedaan *GC content* dalam suatu sekuen. Semakin tinggi kandungan *GC content* dalam suatu sekuen, maka temperatur lelehnya pun akan semakin tinggi. Hal ini pun selaras dengan hasil deteksi mutasi V1016G menggunakan AS-PCR konvensional, yang menunjukkan bahwa nyamuk yang mengalami mutasi homozigot memiliki jumlah basa yang lebih banyak dibanding dengan nyamuk yang tidak mengalami mutasi. Karena jumlah basanya lebih banyak, maka kemungkinan kandungan *GC content* pada sekuen produk

PCR nyamuk yang mengalami mutasi lebih tinggi dibanding nyamuk yang tidak mengalami mutasi. Hal inilah yang menyebabkan temperatur leleh nyamuk yang mengalami mutasi menjadi lebih tinggi dibanding nyamuk yang tidak mengalami mutasi.

Perbedaan temperatur leleh antara sampel mutan V1016G dan *wild type* cukup besar sehingga dapat dilakukan pengamatan dengan mudah. *Melting curve* yang dihasilkan dapat dijadikan penanda untuk membedakan nyamuk yang mengalami mutasi V1016G baik yang bersifat homozigot maupun heterozigot, sehingga deteksi mutasi V1016G pada nyamuk *Ae. aegypti* dapat dilakukan hanya dengan mengamati *melting curve* yang terbentuk tanpa harus melakukan sekuensing atau analisis molekuler yang lain.

Mutasi yang melibatkan transversi valin ke glisin di domain II (V1016G) dikaitkan dengan resistensi terhadap piretroid tipe II¹⁰ saat ini tampaknya terbatas di Asia Tenggara, termasuk Thailand,^{10,18} Indonesia,¹⁹ Vietnam,²⁰ dan Taiwan.²¹ Frekuensi alel 1016G ditemukan 0,23 pada penelitian sebelumnya di Thailand¹⁸, sedangkan di Indonesia meningkat dari 45% menjadi 80% atau lebih dalam 10 tahun terakhir.¹⁹ Hasil pengurutan menunjukkan adanya transversi valin ke glisin pada posisi 1016 dalam domain II (V1016G).¹⁰

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan puncak *melting curve* hasil aplikasi MCA pada deteksi mutasi V1016G antara nyamuk yang mengalami mutasi homozigot, mutasi heterozigot, dan *wild type*. Hal ini menunjukkan bahwa deteksi mutasi V1016G menggunakan aplikasi MCA mudah untuk diamati.

SARAN

Hasil optimasi *melting curve* untuk deteksi mutasi V1016G ini dapat digunakan dalam deteksi dini terjadinya resistensi *Ae. aegypti* di suatu lokasi terhadap insektisida golongan sintetik piretroid. Selanjutnya, perlu dilakukan optimasi untuk jenis mutasi kdr yang lain agar

dapat digunakan untuk melakukan deteksi mutasi kdr secara lebih lengkap.

KONTRIBUSI PENULIS

Kontribusi setiap penulis dalam artikel ini adalah DW sebagai kontributor utama bertanggung jawab dalam konsep penulisan artikel secara menyeluruh. A, IZRS, dan TR sebagai kontributor anggota bertanggung jawab dalam analisis dan penyajian data.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Litbang Kesehatan Banjarnegara yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sunaryo S, Widiastuti D. Resistensi *Aedes aegypti* terhadap insektisida kelompok organopospat dan sintetik piretroid di Provinsi Sumatera Utara dan Provinsi Jambi. BALABA. 2018; 14(1):95-106. doi:10.22435/blb.v14i1.304.
2. Amelia-Yap ZH, Chen CD, Sofian-Azirun M, Low VL. Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. Parasit Vectors. 2018;11(1):1-17. doi:10.1186/s13071-018-2899-0.
3. Badolo A, Sombié A, Pignatelli PM, Sanon A, Yaméogo F, Wangrawa DW, et al. Insecticide resistance levels and mechanisms in *Aedes aegypti* populations in and around Ouagadougou, Burkina Faso. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(5):1-17. doi:10.1371/journal.pntd.0007439.
4. Amelia-Yap ZH, Sofian-Azirun M, Chen CD, Lau KW, Suana IW, Syahputra E, et al. V1016G point mutation: the key mutation in the voltage-gated sodium channel (V_{GSC}) gene of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Indonesia. J Med Entomol. 2019;56(4):953-8. doi:10.1093/jme/tjz035.
5. Chen M, Du Y, Wu S, Nomura Y, Zhu G, Zhorov BS, et al. Molecular evidence of sequential evolution of DDT-and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(6):1-21. doi:10.1371/journal.pntd.0007432.

6. Fernando SD, Hapugoda M, Perera R, Saavedra-Rodriguez K, Black WC, De Silva NK. First report of V1016G and S989P knockdown resistant (kdr) mutations in pyrethroid-resistant Sri Lankan *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites Vectors*. 2018;11:1-6. doi:10.1186/s13071-018-3113-0.
7. Ariati J, Perwitasari D, Marina R, Shinta S, Lasut D, Nusa R, et al. Status kerentanan *Aedes aegypti* terhadap insektisida golongan organofosfat dan piretroid di Indonesia. *J Ekol Kesehat*. 2019;17(3):135-45. doi:10.22435/jek.17.3.847.135-145.
8. Seixas G, Grigoraki L, Weetman D, Vicente JL, Silva AC, Pinto J, et al. Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1-16. doi:10.1371/journal.pntd.0005799.
9. Wuliandari JR, Hoffmann AA, Tantowijoyo W, Endersby-Harshman NM. Frequency of kdr mutations in the voltage-sensitive sodium channel (V_{SSC}) gene in *Aedes aegypti* from Yogyakarta and implications for *Wolbachia*-infected mosquito trials. *Parasites & Vectors*. 2020;13:1-15. doi:10.1186/s13071-020-04304-x.
10. Stenhouse SA, Plernsub S, Yanola J, Lumjuan N, Dantrakool A, Choochote W, et al. 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. *Parasites & Vectors*. 2013;6:1-10. doi:10.1186/1756-3305-6-253.
11. Bowman NM, Akialis K, Cave G, Barrera R, Apperson CS, Meshnick SR. Pyrethroid insecticides maintain repellent effect on knockdown resistant populations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS One*. 2018;13(5):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0196410.
12. Pichler V, Mancini E, Micocci M, Calzetta M, Arnoldi D, Rizzoli A, et al. A novel allele specific polymerase chain reaction (AS-PCR) assay to detect the V1016G knockdown resistance mutation confirms its widespread presence in *Aedes albopictus* populations from Italy. *Insects*. 2021;12(1):1-12. doi:10.3390/insects12010079.
13. Geneaid. Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell). 2020:1-2. Available from: <https://www.geneaid.com/data/download/attached/16027431248%0A08219869.pdf%0A>.
14. Galuszynski NC, Potts AJ. Application of high resolution melt analysis (HRM) for screening haplotype variation in a non-model plant genus: *Cyclopia* (honeybush). *PeerJ*. 2020;8:1-26. doi:10.7717/peerj.9187.
15. Widiastuti D, Agustiniingsih. V1016G and F1534C mutation in the VGSC gene of cypermethrin resistant *Aedes aegypti* from Central Java. *Adv Sci Lett*. 2017;23(4):3309-12. doi:10.1166/asl.2017.9178.
16. Heydari N, Alikhani MY, Tahmasebi H, Asghari B, Arabestani MR. Design of melting curve analysis (MCA) by real-time polymerase chain reaction assay for rapid distinction of staphylococci and antibiotic resistance. *Arch Clin Infect Dis*. 2019;14(2):1-7. doi:10.5812/archcid.81604.
17. Ahmed FE, Gouda MM, Hussein LA, Ahmed NC, Vos PW, Mohammad MA. Role of melt curve analysis in interpretation of nutrigenomics' microRNA expression data. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017;14(6):469-81. doi:10.21873/cgp.20057.
18. Rajatileka S, Black 4th WC, Saavedra-Rodriguez K, Trongtokit Y, Apiwathnasorn C, McCall PJ, et al. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Trop*. 2008;108(1):54-7. doi:10.1016/j.actatropica.2008.08.004.
19. Sayono S, Hidayati APN, Fahri S, Sumanto D, Dharmana E, Hadisaputro S, et al. Distribution of voltage-gated sodium channel (Nav) alleles among the *Aedes aegypti* populations in Central Java Province and its association with resistance to pyrethroid insecticides. *PLoS One*. 2016;11(3):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0150577.
20. Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Yen NT, et al. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(10):1-7. doi:10.1371/journal.pntd.0000527.

21. Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2009;39(4):272-8.
doi:10.1016/j.ibmb.2009.01.001.