

**DETEKSI VIRUS DENGUE SEROTIPE-3 DAN PERAN SPERMATEKA  
DALAM PENULARAN SECARA TRANSVENEREAL PADA NYAMUK  
*Aedes aegypti* BETINA**

**DETECTION OF DENGUE VIRUS SEROTYPE-3 AND THE ROLE OF  
SPERMATHECA ON TRANSVENEREAL TRANSMISSION IN ADULT  
FEMALE *Aedes aegypti* MOSQUITO**

**Devita Febriani Putri\* Tusy Triwahyuni**

*Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Malahayati Lampung  
Jln. Pramuka no. 27, Kemiling, Bandar Lampung*

**ABSTRAK**

Penularan transvenereal berpotensi menyebarkan virus dengue melalui perilaku kawin. Pengendalian vektor Demam Berdarah Dengue (DBD) dengan strategi perilaku kawin nyamuk secara alami telah diterapkan untuk menurunkan perluasan daerah endemis DBD. Dengan dasar tersebut, pemahaman perilaku kawin nyamuk *Ae. aegypti* penting untuk diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi virus dengue serotipe 3 (DENV-3) pada organ spermateka nyamuk *Ae. aegypti* betina yang telah terinfeksi DENV-3 secara transvenereal di laboratorium. Pembedahan organ spermateka pada nyamuk betina dilakukan setelah nyamuk *Ae. aegypti* betina kawin dengan nyamuk *Ae. aegypti* jantan yang positif DENV-3. Keberadaan DENV-3 pada organ spermateka nyamuk betina dilakukan dengan melakukan pengujian *pooling* sampel menggunakan metode *One-Step* RT-PCR untuk screening virus dengue (profil pita DNA spesifik 511 bp). Sampel yang hasil pengujiannya positif virus dengue, dilanjutkan dengan metode Semi-Nested PCR untuk serotyping DENV-3 (profil pita DNA spesifik 290 bp). Hasil penelitian dari 7 sampel *pooling* organ spermateka dari nyamuk betina positif DENV-3 hasil penularan transvenereal nyamuk jantan positif DENV-3 secara intratorakal menunjukkan tidak ada satupun sampel yang terdeteksi adanya DENV-3. Tidak ditemukan virus DENV-3 pada organ spermateka nyamuk *Ae. aegypti* betina yang telah terinfeksi DENV-3 secara transvenereal pada 7 sampel yang digunakan. Perlu pengujian lebih lanjut pada organ ovarium nyamuk betina untuk memastikan mekanisme terjadinya penularan transvenereal virus dengue pada *Ae. aegypti* dalam upaya mencari strategi baru dalam pengendalian vektor DBD.

**Kata kunci : nyamuk *Aedes aegypti*, penularan transvenereal, perilaku kawin, spermateka, virus dengue serotipe 3**

**ABSTRACT**

Transvenereal transmission have the potential to spread dengue virus through mating behavior. Vector control of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) with a strategy of mosquito mating behavior naturally has been applied to reduce the expansion of dengue endemic areas. Therefore understanding the behavior of mating *Ae. aegypti* mosquitoes is important to know. This study aims to detect dengue virus serotype 3 (DENV-3) in the spermatheca organs of female *Ae. aegypti* mosquitoes infectious DENV-3 transvenereal male *Ae. aegypti* mosquitoes positive for DENV-3. Surgical spermal organs on female mosquitoes are carried out after tracing the mating female mosquitoes with male *Ae. aegypti* mosquitoes positive for DENV-3. The presence of DENV-3 in spermatheca organs of female mosquitoes was proven by testing pooling samples using the One-Step RT-PCR method for screening dengue virus (511 bp specific DNA band profile). Samples that tested positive for dengue virus, followed by the Semi-Nested PCR method for DENV-3 serotyping (specific DNA band profile 290 bp). The results of 7 samples of spermatheca organ pooling from DENV-3 positive female mosquitoes resulting from intrathoracal transvenereal transmission of male positive DENV-3 mosquitoes showed that none of the samples detected DENV-3. There was no DENV-3 detected in spermatheca organs of female mosquitoes from 7 samples. Further testing of the ovarian organs of a female mosquito is needed to ensure the mechanism of transvenereal transmission dengue virus to *Ae. aegypti* in an effort to find new strategies in DHF vector control.

**Keywords:** *Aedes aegypti* mosquito, dengue virus serotype 3, mating behavior, spermateca, transvenereal transmission

---

***Penulis korespondensi:***

Devita Febriani Putri

Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Malahayati

Jln. Pramuka n0 27 Kemiling Bandar Lampung

Email: [devita@malahayati.ac.id](mailto:devita@malahayati.ac.id)

## PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit tular vektor pada manusia yang terdistribusi luas di negara tropis maupun subtropis di dunia. Infeksi DBD disebabkan virus dengue dari genus *Flavivirus* dengan 4 serotipe, yaitu virus dengue serotipe-1 (DENV-1), DENV-2, DENV-3, DENV-4. *Aedes aegypti* merupakan jenis nyamuk yang berperan sebagai vektor utama virus dengue secara horizontal (Kreamer *et al.*, 2015). Sampai saat ini belum ada vaksin yang efektif mencegah penyakit ini untuk segala usia, sehingga pengendalian vektor nyamuk *Ae. aegypti* merupakan salah satu jalan untuk pencegahan kasus DBD agar tidak meluas (WHO, 2019).

Penyebaran virus dengue antar nyamuk *Ae. aegypti* atau yang dikenal dengan penularan vertikal telah lama dibuktikan baik secara laboratorium maupun di alam. Virus dengue terbukti dapat ditransmisikan secara transovarial dari nyamuk betina yang infeksius pada keturunannya. (Angel dan Joshi, 2008; Arunachalam *et al.*, 2008; Seran, 2010; Thongrungruiat *et al.*, 2011; Goff *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012; Espinosa *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014). Penularan vertikal virus dengue merupakan cara pertahanan ketika kondisi lingkungan dan iklim tidak kondusif untuk perkembangbiakan virus (Angel & Joshi, 2008; Arunachalam *et al.*, 2008). Fenomena penularan virus dengue secara transvenereal dari nyamuk jantan infeksius ke nyamuk betina non infeksius juga telah dibuktikan (Putri, 2018). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa nyamuk jantan yang terinfeksi virus dengue dari penularan vertikal berpotensi menyebarkan virus dengue pada saat kawin dengan nyamuk betina. Namun mekanisme terjadinya penularan transvenereal virus dengue pada *Ae. aegypti* belum diketahui secara pasti.

Spermateka pada nyamuk betina merupakan salah satu organ vital untuk kopulasi nyamuk yang berfungsi menampung cairan sperma dari nyamuk jantan setelah perkawinan terjadi. Nyamuk jantan hanya perlu mengawini nyamuk betina satu kali, kemudian cairan sperma akan disimpan di spermateka dan selanjutnya dapat membuahi telur seumur hidupnya (Pascini *et al.*, 2012; Degner dan Harrington, 2016). Selama proses perkawinan berlangsung, kelenjar aksesori nyamuk jantan mengeluarkan *seminal fluid* (cairan seminal) yang berfungsi sebagai media spermatozoa untuk berenang ke organ spermateka nyamuk betina (Arthur, 2014). *Seminal fluid* memungkinkan pembawa virus dengue melalui penularan transvenereal pada nyamuk karena virus dengue tidak terdeteksi pada spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa (Tu *et al.*, 1998). Deteksi virus dengue pada organ spermateka nyamuk *Ae. aegypti* betina yang positif virus dengue hasil perkawinan dengan nyamuk *Ae. aegypti* jantan infeksius akan memberikan pemahaman dan memperkuat bukti tentang mekanisme penularan transvenereal virus dengue pada nyamuk vektor DBD *Ae. aegypti*. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi virus dengue serotipe 3 (DENV-3) pada organ spermateka nyamuk *Ae. aegypti* betina yang telah terinfeksi DENV-3 secara transvenereal di laboratorium.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *Post test only control group design*. Lokasi penelitian dilakukan di Insektarium dan Laboratorium Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta serta Laboratorium Biologi Molekuler B2P2VRP Salatiga. Populasi penelitian merupakan hasil kolonisasi nyamuk *Ae. aegypti* di Insektarium Departemen Parasitologi FKMK UGM, yang terbebas dari infeksi DENV sejak tahun 1986. Pengambilan sampel dengan cara *purposive sampling*.

## Alat dan Bahan

Alat yang diperlukan meliputi berbagai peralatan untuk deteksi molekuler dan *dissecting microscope*. Bahan yang diperlukan meliputi nyamuk *Ae. aegypti* jantan hasil suntik intratorakal DENV-3 dengan masa inkubasi 5 dan 14 hari, dan nyamuk *Ae. aegypti* betina berumur 1 hari. Virus dengue didapatkan dari supernatan kultur sel C6/36 yang diinfeksi DENV-3, dan merupakan prototipe DENV-3 strain H87 yang berasal dari laboratorium Namru-2 di Jakarta. Selain itu, beberapa kit reagen juga digunakan dalam penelitian ini, meliputi kit isolasi RNA, amplifikasi RNA dan bahan untuk elektroforesis.

## Jalannya penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi beberapa tahapan yaitu penyediaan nyamuk *Ae. aegypti* betina yang infeksius DENV-3 melalui penularan transvenereal, pembedahan organ spermateka, dan deteksi DENV-3 pada organ spermateka dan keseluruhan tubuh tanpa organ spermateka (*whole body*) *Ae. aegypti* betina.

### 1. Penyediaan nyamuk *Ae. aegypti* betina infeksius DENV-3 melalui penularan transvenereal.

Nyamuk *Ae. aegypti* jantan infeksius (nyamuk jantan yang terinfeksi DENV 3 secara intratorakal) dimasukkan ke kandang dengan nyamuk *Ae. aegypti* betina non-infeksius (nyamuk betina yang tidak terinfeksi DENV-3) berumur 1 hari dan dipelihara dalam satu kandang selama 7 hari dengan tujuan agar terjadi perkawinan semi alami. Nyamuk diberikan larutan gula 10 %, sebagai pakannya yang diganti setiap hari. Pada hari ke 7, nyamuk jantan kemudian dikoleksi dan disimpan di freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , sedangkan nyamuk betina diberikan pakan darah dengan menggunakan darah mencit. Nyamuk betina dipelihara selama 7 hari untuk bertelur dan selanjutnya telurnya diberi label, kemudian dikoleksi dan disimpan di freezer  $80^{\circ}\text{C}$ . Semua perlakuan dilakukan di insektarium dengan kondisi suhu  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; kelembaban  $88 \pm 6\%$  dan 12 jam cahaya, 12 jam gelap (Umniyati *et al.*, 2008). Nyamuk jantan yang telah dikoleksi, kemudian dideteksi keberadaan virus dengunya dengan menggunakan metode PCR. Nyamuk jantan yang terdeteksi positif DENV-3 ditelusuri nyamuk betinanya, lalu nyamuk betina dibedah, lalu dideteksi organ spermateka dan *whole body* menggunakan metode PCR (Lanciotti *et al.*, 1992).

### 2. Pembedahan organ Spermateka Nyamuk *Ae. aegypti* Betina

*Ice pack* dipersiapkan diatas *dissecting microscope*. Nyamuk betina yang telah dikoleksi (berumur 14 hari) hasil kawin dengan nyamuk jantan infeksius yang terdeteksi positif DENV-3 dibersihkan dengan melepaskan kaki dan sayapnya di atas cawan petri. Tubuh nyamuk betina diletakkan di kaca benda tepat di garam fisiologis, dengan posisi perut nyamuk (abdomen) berada disebelah kanan. Jarum ditangan kiri ditusukkan ke bagian torak nyamuk, jarum ditangan kanan merobek segmen ke 7 dari abdomen nyamuk. Setelah segmen 7 dan ke 8 terpisah, tarik ujung abdomen (segmen ke 8) perlahan sampai spermateka keluar. Spermateka dan *whole body* (seluruh tubuh nyamuk tanpa organ spermateka) kemudian diletakkan secara terpisah di tabung mikro 1,5 ml yang telah berisi garam fisiologis. Sampel kemudian disimpan untuk dideteksi dengan metode PCR.

### 3. Deteksi DENV-3

Sampel yang dideteksi organ spermatekanya adalah sampel yang berasal dari nyamuk betina yang positif virus setelah dideteksi menggunakan PCR. Ekstraksi RNA pada nyamuk dilakukan menggunakan QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen). Hasil isolasi RNA kemudian disimpan di *deepfreezer*  $-80^{\circ}\text{C}$  sampai tahapan RT-PCR siap dikerjakan. Amplifikasi RNA dilakukan dengan Master mix *One-Step* RT-PCR kit (Qiagen) yang terdiri dari  $1\mu\text{l}$  *One-Step*

RT-PCR Enzyme mix, 1µl dNTP mix, 5 µl Q -solution, 6 µl *RNAse-free water*, 5 µl Buffer, dan 5 µl RNA serta 1µl primer D1(5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3') dan 1µl primer D2 (5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3') sehingga masing - masing tabung PCR berisi volume total reaksi 25µl. Tahapan *One-Step* RT-PCR dilakukan sebagai berikut: *Reverse Transcription* (RT) untuk merubah RNA menjadi cDNA dilakukan pada suhu 50°C selama 30 minutes, selanjutnya amplifikasi cDNA dengue dilakukan dengan metode PCR dengan 40 siklus tahapan sebagai berikut: predenaturasi dilakukan pada 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 15 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, *elongation* pada 68°C selama 1 menit, dan yang terakhir *post-elongation* 72°C selama 5 menit. Hasil yang diperoleh dari tahapan ini adalah cDNA dengue.

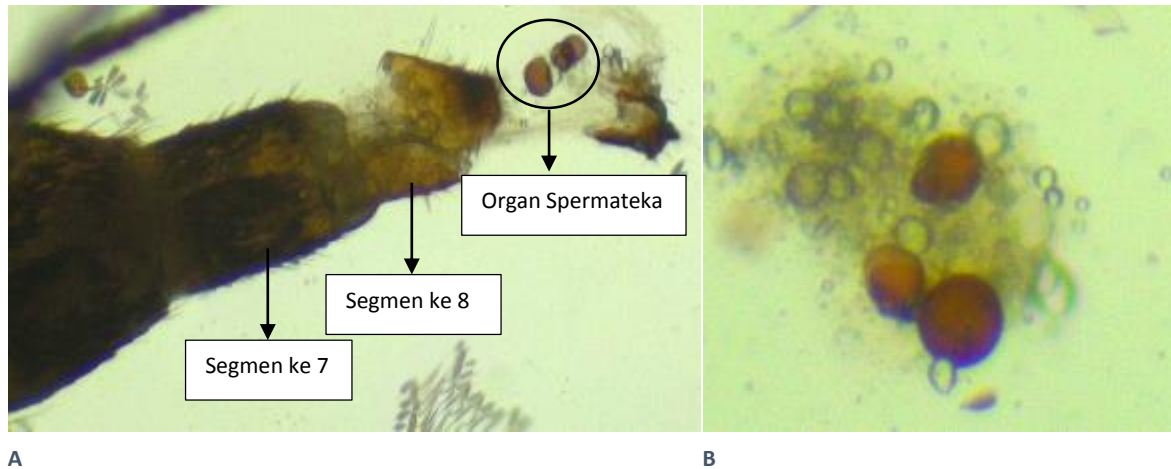
*Semi-nested* PCR selanjutnya dilakukan dengan mempersiapkan reagen sebagai berikut: 15 µl Master Mix reagen Promega Gotaq (green), 3 µl cDNA, 1 µl Primer D1, 4 µl (masing-masing 1 µl) dari Primer TS1(5'-CGTCTCAGTGATCCGGGG-3'), Primer TS2 (5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'), Primer TS3 (5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'), dan Primer TS4 (5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'), 7 µl ddH<sub>2</sub>O sehingga masing -masing tabung PCR berisi volume total reaksi 30µl. Selanjutnya PCR dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: predenaturasi pada 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 15 detik sebanyak 40 siklus, *annealing* 55°C selama 30 detik, elongasi 68°C selama 1 menit, dan yang terakhir post- elongasi 72°C selama 5 menit. Elektroforesis dilakukan terhadap semua produk PCR (*One-Step* RT-PCR dan *semi nested* PCR) pada tegangan 120 V selama 1 jam. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan menggunakan gel eletrophoresis 1,5% dan didokumentasikan menggunakan Geldoc Biorad®.

### Analisis Data

Hasil analisis dari deteksi DENV-3 pada organ spemateka dengan metode *One-Step* RT-PCR ditunjukkan dengan adanya profil pita DNA spesifik pada ukuran 511 bp. Hasil analisis dari serotyping DENV-3 dengan metode *semi-nested* PCR ditunjukkan dengan adanya profil pita DNA spesifik pada ukuran 290 bp.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Nyamuk *Ae. aegypti* jantan yang telah disuntik DENV-3 secara intratorakal dengan masa inkubasi selama 5 dan 14 hari terdeteksi positif mengandung DENV-3 dengan metode PCR. Hal ini membuktikan bahwa DENV-3 yang disuntikkan berkembang selama masa inkubasi yang ditentukan, sehingga berpotensi untuk menularkan DENV-3 ke nyamuk betina non-infeksius melalui perilaku seksual (penularan transvenereal). Pembedahan organ spermateka pada nyamuk betina dilakukan setelah ditelusuri nyamuk betina hasil perkawinan dengan nyamuk *Ae. aegypti* jantan yang positif DENV-3. Gambar 1 memperlihatkan hasil pembedahan organ spermateka yang dilihat dari *dissecting microscope*. Total nyamuk betina yang dibedah adalah 7 ekor. Organ spermateka dan *whole body* nyamuk betina disimpan di dalam box sampel dan dimasukkan di freezer - 80°C, untuk dideteksi *One-Step* RT-PCR.



**Gambar 1.** Organ spermateka nyamuk *Ae. aegypti* betina

- A. Pembedahan organ spermateka pada segmen 8 dengan perbesaran 10x  
 B. Organ spermateka dengan perbesaran 40x

Pada tahap berikutnya, *whole body* nyamuk betina diuji keberadaan virus dengue dengan menggunakan PCR. Hasil yang positif kemudian diuji organ spermatekanya. Hasil uji *One-Step* RT-PCR pada *whole body* dan organ spermateka nyamuk betina *Ae. aegypti* positif DENV-3 secara pooling perkandang dapat dilihat pada Tabel I. Sampel pooling organ spermateka dari nyamuk betina positif DENV-3 hasil penularan transvenereal nyamuk jantan positif DENV-3 secara intratorakal menunjukkan tidak ada satupun sampel yang terdeteksi DENV-3.

Table I. Hasil uji *One-Step* RT-PCR pada *whole body* dan organ spermateka nyamuk betina *Ae. aegypti* positif DENV 3 secara pooling perkandang

Masa Inkubasi Nyamuk Jantan	Total <i>Whole Body</i> Nyamuk Betina yang diuji	Hasil Uji PCR (pooling)	Total Organ Spermateka yang diuji	Hasil Uji PCR (pooling)
5	5	positif	5	negatif
14	2	positif	2	negatif

Pada perkawinan nyamuk *Ae. aegypti*, organ kantung aksesori nyamuk jantan akan mensekresikan cairan dalam bentuk semen (*seminal fluid*), yang berfungsi sebagai media sperma berenang menuju organ spermateka nyamuk betina (Arthur *et al.*, 2014). Selama kopulasi, cairan sperma yang terdapat *seminal fluid* dan spermatozoa dari nyamuk jantan akan masuk melalui *vagina* ditransfer ke *bursa seminalis* nyamuk betina. Gerakan peristaltik menyebabkan cairan sperma masuk ke kelenjar spermateka. Kelenjar spermateka akan memberikan nutrisi dan energi serta perlindungan dari stress oksidatif untuk mempertahankan sperma selama disimpan di spermateka. Ketika telur matang yang disimpan di bursa kopulatriks siap dibuahi, telur akan melewati lubang (*spermatecha vestibulum*) pada kelenjar spermateka, untuk merangsang kelenjar spermateka melepaskan sedikit sperma. Sperma memasuki mikrofil (yang terdapat pada permukaan kulit telur) dan masuk ke dalam telur. Fertilisasi (pembuahan) terjadi di *oviduct* ketika

satu sperma berfusi dengan nukleus telur. Oviposition (peletakan telur) terjadi setelah proses pembuahan telur selesai dan telur siap untuk perkembangan embrio (Degner dan Harrington, 2016).

Tu *et al.* (1998), meneliti tentang ultrastruktur sistem reproduksi nyamuk *Ae. aegypti* jantan infeksius DENV-2, dengan menggunakan IFAT dan mikroskop elektron dan menemukan bahwa DENV-2 terdapat pada matrik, sel epitelium, sel kolumnar pada kantung aksesoris, dan sel epitelium dan sel otot dari *vesikula seminalis*, tetapi tidak terdapat pada *spermatogonia*, *spermatisit*, *spermatid*, dan *spermatozoa*. Virus dengue yang ditularkan nyamuk jantan infeksius ke nyamuk betina melalui cairan sperma karena nyamuk jantan dan betina dikawinkan secara semi alami di kandang. Cairan sperma terdiri dari sperma matang (spermatozoa), dan *seminal fluid*, yang artinya penularan transvenereal virus dengue pada nyamuk jantan infeksius ke nyamuk betina melalui *seminal fluid* (Choochote *et al.*, 2001).

Organ spermateka akan terisi cairan sperma (*seminal fluid* dan spermatozoa) setelah perkawinan terjadi. Hasil penelitian menyatakan bahwa tidak satupun organ spermateka yang berasal dari nyamuk betina positif DENV-3 secara transvenereal, terdeteksi positif dengan metode PCR. Kemungkinan *seminal fluid* yang mengandung DENV-3 sudah tidak lagi berada di organ spermateka, tetapi mulai menuju oviduct beserta spermatozoa, yang kemudian akan membuahi telur (Clement, 1999). Hal ini menyebabkan DENV-3 tidak terdeteksi di organ spermateka, tetapi terdeteksi *whole body* nyamuk betina.

Chen *et al.* (1993) yang melakukan studi pewarnaan organ dengan tehnik imunoflouresen pada *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yang infeksius DENV-1. DENV-1 ditemukan pada organ ovariola, *oviduct*, dan kantung aksesoris pada nyamuk betina, membuktikan bahwa DENV terdapat pada saluran reproduksi nyamuk betina. Linthicum *et al.* (1996) juga membuktikan bahwa DENV 3 terdeteksi pada *calyx* (yang terdapat pada organ nyamuk betina) setelah 16 sampai 22 hari diinfeksi pada nyamuk betina *Ae. aegypti*. Hal ini memungkinkan DENV-3 dapat terdeteksi di ovarium nyamuk betina yang dapat menguatkan pembuktian penularan transvenereal. Tetapi keterbatasan sampel, sehingga pemeriksaan organ ovarium tidak dilakukan pada penelitian ini.

Penularan virus dengue melalui perilaku kawin nyamuk *Ae. aegypti* (penularan transvenereal) merupakan bagian dari penularan vertikal nyamuk yang masih jarang diteliti. Penelitian terbaru skala laboratorium oleh Putri (2018) juga telah membuktikan bahwa nyamuk *Ae. aegypti* jantan yang infeksius DENV-3 secara intratorakal dengan masa inkubasi 5 hari dan 14 hari, dapat menularkan DENV-3 ke nyamuk *Ae. aegypti* betina yang non infeksius. Putri *et al.* (2018) menyebutkan bahwa perilaku poligami alami nyamuk jantan juga berperan penting pada penyebaran virus dengue secara venereal ke nyamuk betina. Fakta ini menyebabkan jika satu nyamuk jantan infeksius DENV-3 dapat mengawini nyamuk betina yang non infeksius dengan jumlah tertentu, sebagai akibatnya nyamuk betina infeksius akan menghasilkan telur fertil yang infeksius. Tidak ditemukannya virus dengue pada pemeriksaan organ spermateka nyamuk betina, memerlukan pemahaman lebih lanjut tentang mekanisme pertahanan virus dengue secara transvenereal pada nyamuk vektor DBD. Pengetahuan tentang perilaku kawin nyamuk terkait faktor yang berhubungan seperti fisik optimal dari nyamuk, mekanisme fisiologi yang mengatur perkawinan nyamuk, serta kondisi lingkungan yang sesuai dan faktor lainnya, perlu dikaji lebih lanjut. Kajian ini memberikan informasi penting dalam pengembangan strategi pengendalian DBD yang lebih efektif dari segi mekanisme kawin vektor.

## KESIMPULAN

Virus DENV-3 tidak terdeteksi di organ spermateka betina. Virus DENV-3 terdeteksi pada *whole body* nyamuk betina. Perlu pengujian lebih lanjut pada organ ovarium nyamuk betina untuk memastikan mekanisme terjadinya penularan transvenereal virus dengue pada *Ae. aegypti* dalam upaya mencari strategi baru dalam pengendalian vektor DBD.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Purwono, Ibu Kuswati, Ibu Atin, dan Ibu Rumbi, selaku staf laboratorium Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada atas dukungan dan kerjasamanya selama berjalannya proses penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada para staf Laboratorium Biologi Molekuler, B2P2VRP Salatiga, Kementerian Kesehatan atas bantuan dan asistensinya dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arthur, B. J., Emr, K.S., Wytenbach R.A., Hoy, R.R. 2014. Mosquito (*Aedes aegypti*) flight tones: frequency, harmonicity, spherical spreading, and phase relationships. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 135(2): 933–41.
- Arunachalam, N., Tewari, S.C., Thenmozhi, V., Rajendran, R., Paramasivan, R., Ayanar, K., Tyagi, B.K. 2008. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil, India. *Indian. J. Med. Res.* 127: 395-7.
- Chen, W., I. H., Wei, E. Hsu, Chen, E. 1993. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to dengue I virus on Taiwan: development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 30: 524–30.
- Choochote, W., Tippawangkosol, P., Jitpakdi, A., Sukontason, K.L., Pitasawat, B., Sukantonson, K., Jariyapan, N. 2001. Polygamy: the possibly significant behavior of *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* in relation to efficient transmission of dengue virus. *Research Note Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 32 (4): 745-48.
- Clement, A., N. 1999. *The Biology of mosquitoes*. Sensory Reception and Behaviour Volume 2. CABI Publishing. London School of Hygiene and Tropical Medicine. 333 – 88.
- Degner, E.C. and Harrington, L.C. 2016. A mosquito sperm's journey from male ejaculate to egg: Mechanisms, molecules, and methods for exploration. *Molecular reproduction and development.* 83(10): 897-911.
- Espinosa, M., Giamperetti, S., Abril, M., Seijo, A. 2014. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Puerto Iguazu, Misiones, Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 56: 165–67.
- Goff, L. G., Revollo, J., Guerra, M., Cruz, M., Simon, B.Z., Roca, Y., Flores, V.J., Herve, J.P. 2011. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. *Parasite.* 18: 277–80.



- Kraemer, M.U.G, Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A.Q.N., Shearer, F.M., *et al.* 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*. 4:1–18.
- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(3): 545–551.
- Linthicum, K.J., Platt, K., Myint, K.S., Lerdthusnee, K., INNI, B.L. and GHN, D.W.V. 1996. Dengue 3 virus distribution in the mosquito *Aedes aegypti*: an immunocytochemical study. *Medical and veterinary entomology*. 10(1): 87-92.
- Martinez, N. E., Dzul-manzanilla, F., Gutierrez, C., Ibarralopez, J., Bibiano-marín, W., Lopez-damian, L., Martinijames, A., Huerta, H., Che Mendoza, A., Ayora, G., *et al.* 2014. Natural vertical transmission of dengue-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 30: 143–146.
- Martins, V.E.P., Alencar, C.H., Kamimura, M.T., De Carvalho Araujo, F.M., De Simone, S.G., Dutra, R.F., Guedes, M.I.F. 2012. Occurrence of natural vertical transmission of Dengue-2 and Dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceara, Brazil. *PLoS ONE*. 7: e41386.
- Pascini, T.V., Ramalho-Ortigão, M. and Martins, G.F., 2012. Morphological and morphometrical assessment of spermathecae of *Aedes aegypti* females. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107(6): 705-712.
- Putri, D.F., Widya, A., Sugeng, M.J. and Sitti, U.R., 2018. The potency of polygamy behavior in *Aedes aegypti* mosquitoes by venereal transmission dengue virus. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 13(3): 382-388.
- Putri, D.F. 2018. Kajian penularan transvenereal virus dengue serotipe-3 dan perilaku poligami nyamuk *Aedes Aegypti* L. serta dampak pada progeninya dalam kondisi insektarium. *Disertasi*. Universitas Gadjah Mada.
- Seran, M.D. 2010. Uji laboratorium penularan tran-stadial virus dengue pada stadium telur, larva, pupa dan imago dari nyamuk *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Tesis*. Ilmu Kedokteran Tropis. Fakultas Kedokteran. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Thongrungrat, S., Maneekean, P., Waspiyamongkol, L., Prumongkol, S. 2011. Prospective field study of transovarial dengue virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *Jur. of Vec. Ecology*. 36:147-52.
- Tu, W.C., Chenn, C.C., Hou, R. F. 1998. Ultrastructural studies on the reproductive system of male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with dengue 2 virus. *J. Med. Entomol.* 35: 71–6.
- Umniyati, S. R., Sutaryo, Wahyono, D., Artama, W. T., Mardihusodo, S. J., Soeyoko, Utoro, T. 2008. Application of monoclonal antibody DSSC7 for detecting dengue infection in *Aedes*

*aegypti* based on immunocytochemical streptavidin biotin peroxidase complex assay (ISBPC). *Dengue Bulletin*, 32: 83–98.

WHO. 2019. Immunization, Vaccine and Biologicals: Vaccine and Diseases Dengue. World Health Organization. Geneva. Available at: [https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/revised\\_SAGE\\_recommendations\\_dengue\\_vaccines\\_apr2018/en/](https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/revised_SAGE_recommendations_dengue_vaccines_apr2018/en/).