

Deteksi Molekuler Virus Dengue dan Chikungunya pada Nyamuk *Aedes* spp. di Kecamatan Cilongok

Dwi Iva Fitriana*, Endang Srimurni Kusmintarsih, Trisnowati Budi Ambarningrum

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman
Jalan dr Suparno 63 Purwokerto 53122
Email: dwiivafitriana@gmail.com

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 29/08/2019
Disetujui : 29/05/2020

Abstract

Cilongok sub-district is one of the dengue and chikungunya endemic area in Banyumas regency. Virus detection in mosquitoes before infecting humans is an early warning to prevent outbreaks in endemic areas. The purposes of this study were to determine dengue and chikungunya virus infections in *Aedes* spp from Cilongok sub-district. This study was conducted in four villages (Cilongok, Pernasidi, Kalisari, and Jatisaba) in Cilongok sub-district. The research design was purposive random sampling study. Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique was carried out to detect dengue and chikungunya viruses in mosquitoes. The positive result analyzed descriptively to estimate potential of virus transmissions. The result showed that *Aedes* spp. mosquitoes in this study was negative in both dengue and chikungunya virus.

Keywords : *Aedes* spp., *chikungunya virus*, *dengue virus*, *RT-PCR technique*

Abstrak

Kecamatan Cilongok merupakan salah kecamatan endemis DBD dan pernah mengalami KLB chikungunya. Deteksi virus pada nyamuk sebelum menginfeksi manusia penting sebagai peringatan dini dalam upaya pencegahan wabah di daerah endemis. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui infeksi virus Dengue dan Chikungunya pada nyamuk *Aedes* spp. asal kecamatan Cilongok. Penelitian ini dilakukan di empat desa di Kecamatan Cilongok yang meliputi Desa Cilongok, Pernasidi, Kalisari, dan Jatisaba. Desain penelitian ini adalah studi *purposive random sampling*. Deteksi virus Dengue dan Chikungunya pada nyamuk dilakukan menggunakan teknik *Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Hasil positif virus dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan potensi transmisi virus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nyamuk *Aedes* spp. yang tertangkap tidak mengandung virus Dengue dan Chikungunya.

Kata kunci: *Aedes* spp., *chikungunya virus*, *dengue virus*, teknik *RT-PCR*

PENDAHULUAN

Demam berdarah dengue (DBD) merupakan penyakit tropik yang disebabkan oleh virus Dengue (DENV). Virus ini terdiri dari empat serotipe, yaitu DENV1, DENV2, DENV3 dan DENV4. Penyakit DBD ini ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) dan *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) (Pusat Data Surveilans dan Epidemiologi Kementerian Kesehatan RI, 2010). Kedua nyamuk ini juga menjadi vektor penyakit menular chikungunya yang disebabkan virus Chikungunya (CHIKV). CHIKV termasuk *re-emerging virus disease* dan sering menyebabkan kejadian luar biasa (KLB) di berbagai negara di kawasan Asia, termasuk Indonesia (Maha & Subangkit, 2014). Kecamatan Cilongok merupakan salah satu kecamatan yang dilaporkan endemis DBD di Kabupaten Banyumas (Widiati & Lasmiati, 2015). Pada tahun 2009 terjadi KLB chikungunya dengan jumlah penderita rata-rata 50 orang setiap desa (BNC, 2009). Kecamatan Cilongok memiliki cuaca tidak stabil dan curah hujan yang cukup tinggi pada musim penghujan, sehingga berpotensi untuk perkembangbiakan

nyamuk *Aedes* spp. (Dinas Kesehatan Kabupaten Banyumas, 2015).

Belum adanya vaksin DBD dan pengobatan spesifik demam chikungunya menyebabkan pengendalian vektor nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* merupakan cara yang tepat untuk mencegah persebaran kedua wabah penyakit tersebut (Suriptiastuti, 2016; Mahmud *et al.*, 2018). Informasi keberadaan virus DENV dan CHIKV pada vektor juga diperlukan sebagai upaya dini pencegahan wabah. Informasi ini dapat memberi gambaran risiko penularan virus pada nyamuk sebelum menginfeksi manusia. Keberadaan virus DENV dan CHIKV pada vektor dapat dideteksi dengan teknik *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Macedo *et al.*, 2013). Teknik RT-PCR juga dapat digunakan untuk mendeteksi serotipe virus DENV dan CHIKV yang sedang bersirkulasi di suatu wilayah. Informasi ini dibutuhkan dalam mengontrol dan mencegah DBD serta Sindrom Syok Dengue (SSD) yang terjadi akibat infeksi oleh salah satu serotipe yang kemudian diinfeksi oleh serotipe lain (Nurfadly, 2009). Dengan demikian, penelitian ini bertujuan

untuk mengetahui infeksi DENV dan CHIKV pada vektor nyamuk *Aedes spp.* yang ditangkap.

MATERI DAN METODE

Desain penelitian ini merupakan studi *purposive random sampling*. Sampel nyamuk *Aedes spp.* yang digunakan dalam penelitian ini diambil secara *purposive* di empat desa endemis DBD di Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas yang meliputi Desa Pernasidi, Kalisari, Jatisaba, dan Cilongok. Deteksi virus Dengue (DENV) dan virus Chikungunya (CHIKV) dilakukan di Laboratorium Genetika dan Molekuler Fakultas Biologi dan Laboratorium Riset Unsoed. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juli 2019.

Isolasi genom RNA virus

RNA virus diisolasi dari nyamuk *Aedes spp.* menggunakan PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Cat. No.12280050) sesuai dengan protokol kit (Mboera *et al.*, 2016). Prosedur isolasi diawali dengan pembuatan larutan sampel, yaitu nyamuk *Aedes spp.* dimasukkan ke dalam *microtube* (Eppendorf) 1,5 mL, kemudian ditambahkan 200 µL DEPC water dan digerus menggunakan *grinder*. Selanjutnya, pembuatan *lysate* nyamuk dibuat dengan 20 µL proteinase K, 200 µL sampel, dan 200 µL *lysis buffer* (mengandung 5,6 µg *carrier RNA*) dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL dan divortex 15 detik. Setelah homogen, larutan diinkubasi selama 15 menit pada temperatur 56 °C dan disentrifugasi dengan kecepatan rendah. *Lysate* ditambahkan dengan 250 µL etanol absolut dan di-vortex selama 15 detik. *Lysate* tersebut kemudian diinkubasi selama 5 menit pada temperatur ruang (25 °C) dan disentrifugasi dengan kecepatan rendah. *Lysate* dimasukkan ke dalam *viral spin column* bersama *collection tube* dan disentrifugasi dengan kecepatan 6.800 ×g selama satu menit pada temperature ruang. Tahapan selanjutnya adalah pencucian I dilakukan dengan cara *collection tube* dilepas dan *viral spin column* dipasangkan pada *wash tube* baru, kemudian 500 µL *wash buffer* ditambahkan ke dalam *viral spin column* bersama *wash tube* baru tersebut dan disentrifugasi dengan kecepatan 6.800 ×g selama 1 menit pada temperatur ruang. Larutan dalam *wash tube* dibuang. Tahap pencucian I diulang sekali dan larutan dalam *wash tube* dibuang dan *viral spin column* dipasang pada *wash tube* baru dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 ×g selama 1 menit pada temperatur ruang. Larutan sisa *wash buffer* pada *wash tube* dibuang, kemudian *viral spin column* dipasangkan pada *recovery tube* 1,5 mL dan 50 µL RNase *free-water* ditambahkan pada *viral spin column* bersama *recovery tube* tersebut dan diinkubasi selama 1 menit pada temperatur ruang. Setelah inkubasi, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 ×g selama

1 menit pada temperatur ruang. Kemudian sebanyak 25 µL RNase *free-water* ditambahkan pada *recovery tube*, *viral spin column* dibuang dan diperoleh larutan RNA viral pada *recovery tube* 1,5 mL. Larutan RNA yang diperoleh disimpan pada suhu -20 °C jangka waktu satu minggu atau -80 °C untuk waktu lama.

Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan menggunakan Superscript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) sesuai dengan protokol kit (Sriprapun *et al.*, 2015). Tahapan sintesis cDNA yaitu 10 µL *mix* sampel dibuat dengan komposisi yang terdiri dari 1 µL primer oligo(dT), 1 µL 10 mM dNTP *mix*, dan 8 µL sampel RNA. *Mix* sampel tersebut diinkubasi pada temperatur 65 °C selama 5 menit dan langsung didinginkan dalam es (0°C) selama 1 menit. Tahapan berikutnya adalah *mix* sintesis cDNA dibuat dengan komposisi yang terdiri dari 2 µL 10× RT buffer, 4 µL 25 mM MgCl₂, 2 µL 0,1 M DTT, 1 µL RNaseOUT™ (40 U/µL), dan 1 µL Superscript® III RT (200 U/µL). Sebanyak 10 µL *mix* sintesis cDNA ditambahkan ke dalam *mix* sampel dan diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 50 menit. Reaksi dihentikan dengan melanjutkan inkubasi pada temperatur 85 °C selama 5 menit, kemudian didinginkan dalam es. Sebanyak 1 µL RNase H ditambahkan ke dalam *tube mix* dan kemudian diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 20 menit. Sebanyak 20 µL larutan cDNA yang diperoleh disimpan pada temperatur -20 °C.

Deteksi DENV (1-4) dengan teknik Nested RT-PCR

Nested PCR cDNA DENV menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (Bioline, Cat. No.BIO-25047) sesuai dengan protokol kit. Primer yang digunakan yaitu primer universal Dengue: D1 (5'-TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG-3') dan D2 (5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3') yang akan menghasilkan amplicon cDNA berukuran 511 bp (Sari *et al.*, 2012). Komposisi PCR dibuat dengan volume 25 µL yang terdiri dari : 12,5 µL 2X MyTaq HS Red Mix, 1 µL primer *forward* D1 [0,4 µM/µL], 1 µL primer *reverse* D2 1 [0,4 µM/µL], 9,5 µL ddH₂O, dan 1 µL template cDNA [sampel 1: 48,72 ng/µL; sampel 2: 48 ng/µL]. PCR dijalankan pada kondisi : (i) predenaturasi (95° C; 1 menit), (ii) amplifikasi 35 siklus yang terdiri dari denaturasi (95° C; 15 detik), *annealing* (65°C; 15 detik), dan ekstensi (72° C; 10 detik), (iv) post ekstensi (72° C; 5 menit); dan (v) *hold* (4° C). Deteksi serotipe DENV menggunakan primer *forward* D1 dengan primer *reverse* spesifik serotipe virus Dengue yang terdiri dari TS1 untuk serotipe DEN-1 (5'-CGTCTCAGTGATCCGGGG-3') menghasilkan amplicon cDNA berukuran 482 bp, TS2 untuk serotipe DEN-2 (5'-CGCCACAAGGGCCATGA

ACAG-3') menghasilkan amplicon DNA berukuran 119 bp, TS3 untuk serotipe DEN-3 (5'-TAA CATCATCATGAGACAGAGC-3') menghasilkan amplicon DNA berukuran 290 bp, dan TS4 untuk serotipe DEN-4 (5'-CTCTGTTGTCTTAAACAA GAGA-3') menghasilkan amplicon DNA berukuran 392 bp. PCR *mix* dibuat sesuai jumlah sampel yang akan diperiksa. Komposisi *mix* PCR dibuat dengan volume 25 μ L yang terdiri dari : 12,5 μ L 2 \times MyTaq HS Red Mix, 1 μ L primer *forward* D1 [0,4 μ M/ μ L], primer *reverse* (masing-masing dari TS1-TS4) 1 μ L [0,4 μ M/ μ L], ddH₂O 9,5 μ L, dan 1 μ L [sampel 1: 48,72 ng/ μ L; sampel 2: 48 ng/ μ L] *template* dari amplicon cDNA tahap 1. PCR dijalankan pada kondisi yaitu (i) predenaturasi (95° C; 1 menit; (ii) amplifikasi 35 siklus yang terdiri dari denaturasi (95° C; 15 detik), *annealing* (D1/TS1-TS4 55° C; 15 detik), dan ekstensi (72° C; 10 detik); (iv) post ekstensi (72° C; 5 menit); dan (v) *hold* (4° C). Sebanyak 10 μ L produk *nested* RT-PCR dielektrofresis pada gel agarose 1,5% dengan tegangan 80 V, 200 mA selama 47 menit.

Deteksi CHIKV dengan RT-PCR

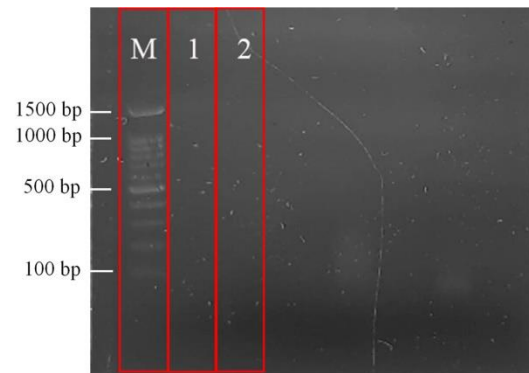
PCR cDNA virus Chikungunya menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (Bioline, Cat. No.BIO-25047) sesuai dengan protokol. Primer yang digunakan yaitu primer CHICK-1 (5'-ACCGGCGTCTACCCATTCATG T-3') dan CHIK-2(5'GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA-3') menghasilkan amplicon DNA berukuran 330 bp (Sari *et al.*, 2012). Komposisi PCR dibuat dengan volume 25 μ L yang terdiri dari 12,5 μ L 2X MyTaq HS Red Mix, 1 μ L primer *forward* (CHIK1) [0,4 μ M/ μ L], 1 μ L primer *reverse* (CHIK2) [0,4 μ M/ μ L], 9,5 μ L ddH₂O, dan 1 μ L *template* cDNA [sampel 1: 48,72 ng/ μ L; sampel 2: 48 ng/ μ L]. PCR dijalankan pada kondisi yaitu (i) predenaturasi (95° C; 1 menit; (ii) amplifikasi 35 siklus yang terdiri dari denaturasi (95° C; 15 detik), *annealing* (60° C; 15 detik), dan ekstensi (72° C; 10 detik); (iv) post ekstensi (72° C; 5 menit); dan (v) *hold* (4° C). Sebanyak 10 μ L produk RT-PCR dielektrofresis pada gel agarose 1,5% dengan tegangan 80 V, 200 mA selama 47 menit.

Analisis Data

Data hasil deteksi virus Chikungunya (CHIKV) dan serotipe virus Dengue (DENV) dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui persentase jumlah positif serta jenis serotipe virus yang ditemukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil deteksi serotipe DENV baik dari nyamuk dewasa hasil tangkapan maupun nyamuk yang di-*rearing* untuk mengetahui adanya transmisi *transovarial* dari Kecamatan Cilongok dapat dilihat pada Gambar 1. Deteksi serotipe DENV dengan metode *nested* PCR negatif.

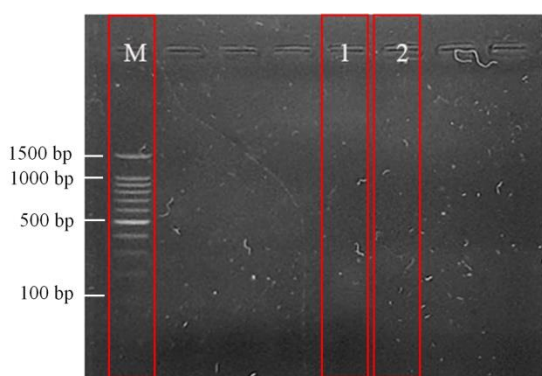


Gambar 1. Hasil deteksi serotipe Dengue pada nyamuk *Aedes* spp. dengan metode *nested two step* RT-PCR. Sumuran (M) Marker DNA 100-bp; (1) Sampel nyamuk Kecamatan Cilongok 1; (2) Sampel nyamuk Kecamatan Cilongok 2.

Virus Dengue (DENV) pada nyamuk tidak terdeteksi, karena virus tidak berada di dalam tubuh nyamuk. Disamping itu, konsentrasi RNA virus dalam tubuh nyamuk terlalu kecil, sehingga tidak terdeteksi saat uji PCR (Ansori *et al.*, 2015). Hasil negatif juga dapat diakibatkan RNA virus terdegradasi selama proses penyimpanan. Degradasi menyebabkan RNA DENV pada nyamuk *Aedes* tidak terdeteksi. Ketahanan virus ini dalam tubuh nyamuk dipengaruhi beberapa faktor dan salah satu yang penting adalah rendah atau tingginya temperatur yang dapat mengganggu ketahanan virus dalam tubuh nyamuk. Degradasi RNA menyebabkan amplifikasi cDNA tidak terjadi, sehingga serotipe virus tidak dapat dideteksi. Degradasi RNA menyebabkan amplifikasi tidak terjadi sehingga serotipe virus tidak dapat dideteksi. Selain degradasi RNA, waktu penangkapan nyamuk juga dapat mempengaruhi keberhasilan deteksi virus. Penangkapan nyamuk yang baru mengalami eklosi dari pupa (belum menghisap darah) memungkinkan diperolehnya nyamuk yang tidak mengandung virus (Fadilla *et al.*, 2015). Penangkapan nyamuk ketika tidak terjadi wabah juga dapat menyebabkan hasil deteksi virus Dengue negatif (Ansori *et al.*, 2015). Faktor lain yang dapat menyebabkan hasil negatif deteksi virus Dengue adalah metode yang digunakan. Penelitian transmisi *transovarial* virus Dengue di Banyumas yang dilakukan oleh Wijayanti *et al.* (2017) menggunakan dua metode yang berbeda, yaitu *immunohistochemistry assay* (IHC) dan *one step* RT-PCR menunjukkan hasil yang berbeda. Hasil sampel *Ae. aegypti* yang dilakukan dengan deteksi IHC positif namun setelah diuji Kembali dengan RT-PCR karena RT-PCR hasilnya negatif.

Deteksi virus pada nyamuk dapat digunakan untuk mengetahui adanya transmisi *transovarial* virus (Purnama *et al.*, 2017), digunakan sebagai peringatan dini pencegahan wabah DBD dan

chikungunya di suatu daerah (Macedo *et al.*, 2013; Morrison, 2014). Deteksi virus pada nyamuk juga dapat menduga potensi penularan virus tersebut pada manusia (Rohani *et al.*, 2005), serta deteksi serotipe DENV secara rutin di suatu wilayah dapat digunakan untuk memprediksi kemungkinan adanya persebaran wabah (Agustiningtyas & Lusiyana, 2017). Deteksi serotipe virus penting karena dapat terjadi infeksi sekunder yang disebabkan oleh serotipe berbeda dan dapat menimbulkan SSD. Demikian pula infeksi yang disebabkan oleh dua serotipe atau lebih pada satu individu (infeksi ganda) dan dapat menyebabkan infeksi yang semakin parah (Ansori *et al.*, 2015). Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, serotipe yang paling dominan yang sering menjadi penyebab DBD di Provinsi Jawa Tengah adalah DENV-3 (Prasetyowati & Nusa, 2012; Kusmintarsih *et al.*, 2018).



Gambar 2. Hasil deteksi CHIKV pada nyamuk *Aedes* spp. dengan metode *two step* RT-PCR pada gel agarose 1,5%. Sumuran (M) Marker DNA100-bp; (1) Sampel nyamuk Kecamatan Cilongok 1; (2) Sampel nyamuk Kecamatan Cilongok 2.

Hasil deteksi virus Chikungunya (CHIKV) pada 2 lungkang (*pool*) nyamuk dari empat desa negatif (Gambar 2). Berdasarkan hasil PCR tersebut, CHIKV diduga tidak ditemukan di dalam tubuh nyamuk dari lokasi penelitian (Ansori *et al.*, 2015). Hasil yang berbeda diperoleh oleh Farraudière *et al.* (2017), deteksi CHIKV dengan metode qRT-PCR pada nyamuk *Ae. aegypti* betina di Martinique selama terjadi wabah 2013-2014 menunjukkan hasil positif serta hasil negatif pada nyamuk betina yang di-*rearing* dari pupa. Hasil positif CHIKV pada nyamuk *Ae. aegypti* juga diperoleh oleh Zayed *et al.* (2012) pada masa wabah di Al Hodaya Yemen tahun 2011. Deteksi CHIKV dari nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* jantan di Thailand ketika wabah tahun 2008-2009 juga positif (Thavara *et al.*, 2009). Hasil yang berbeda dapat disebabkan oleh pengambilan sampel nyamuk pada waktu yang berbeda, hasil positif CHIKV pada penelitian Thavara *et al.* (2009), Zayed *et al.* (2012), dan Farraudière *et al.*

(2017) diperoleh ketika sampel nyamuk diambil pada waktu terjadinya wabah, sementara pengambilan sampel nyamuk dalam penelitian ini tidak pada waktu terjadinya wabah. Selain itu RNA CHIKV diduga tidak ditemukan dalam tubuh nyamuk (Ansori *et al.*, 2015). Untuk memberikan gambaran yang lebih komprehensif perlu ditambahkan sampel nyamuk yang lebih banyak dari kecamatan Cilongok, sehingga potensi nyamuk terdeteksi DENV dan CHIKV semakin tinggi serta perlu dilakukan deteksi virus dengan metode yang lebih sensitif seperti *realtime* RT-PCR.

SIMPULAN

Berdasarkan deteksi molekuler menggunakan metode RT-PCR, nyamuk *Aedes* spp. yang ditangkap di Kecamatan Cilongok tidak mengandung virus Dengue dan Chikungunya.

DAFTAR REFERENSI

- Agustiningtyas, I. & Lusiyana, N. 2017. Ovitrap Survey and Serotype Identification of Dengue Virus on *Aedes* sp Mosquito in Potorono, Banguntapan, Bantul, Indonesia. *International Journal of Mosquito Research*, 4(5), pp. 32-37.
- Ansori, A., Sucipto, T., Deka, P., Ahwanah, N., Churrotin, S., Kotaki, T. and Soegijanto, S. 2015. Differences of Universal and Multiplex Primer for Detection of Dengue Virus from Patients Suspected Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) in Surabaya. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 5(6), pp.147-151.
- Banyumas News.Com (BNC). 2009. Ribuan Warga Cilongok Terjangkit Chikungunya, Satu Meninggal. [online] Available at: <https://banyumasnews.com/7972/ribuan-warga-cilongok-terjangkit-chikungunya-satu-meninggal/> [Accessed 10 August 2019].
- Dinas Kesehatan Kabupaten Banyumas. 2015. *Profil kesehatan kabupaten Banyumas*. Banyumas: Dinas Kesehatan Kabupaten Banyumas.
- Fadilla, Z., Hadi, U.K. & Setiyaningsih, S. 2015. Bioekologi Vektor Demam Berdarah Dengue (DBD) Serta Deteksi Virus Dengue pada *Aedes aegypti* (Linnaeus) dan *Ae. albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) di Kelurahan Endemik DBD Bantarjati, Kota Bogor. *Jurnal Entomologi Indonesia*, 12(1), p. 31.
- Farraudière, L., Sonor, F., Crico, S., Étienne, M., Mousson, L., Hamel, R., Missé, D., Failloux, A.B., Simard, F. & Yébakima, A. 2017. First Detection of Dengue and Chikungunya viruses in Natural Populations of *Aedes aegypti* in Martinique during the

- 2013–2015 Concomitant Outbreak. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 41, p. 63.
- Kusmintarsih, E.S., Hayati, R.F., Turnip, O.N., Yohan, B., Suryaningsih, S., Pratiknyo, H., Denis, D. & Sasmono, R.T. 2018. Molecular Characterization of Dengue Viruses Isolated from Patients in Central Java, Indonesia. *Journal of Infection and Public Health*, 11(5), pp. 617-625.
- Macedo, G.A., de Araújo, J.M.G., Schatzmayr, H.G., Costa, F.A.C., de Filippis, A.M.B., Santos, F.B.D. & Nogueira, R.M.R. 2013. Virological Surveillance for Early Warning of Dengue Epidemics in The State of Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(3), pp. 141-146.
- Maha, M.S. & Subangkit. 2014. Manifestasi Klinis Infeksi Virus Chikungunya pada Kejadian Luar Biasa di Indonesia. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 3(1), pp. 11-16.
- Mahmud, M.A.F., Mutalip, M.H., Lodz, N.A. & Shahar, H. 2018. Study on key *Aedes* spp Breeding Containers in Dengue Outbreak Localities in Cheras District, Kuala Lumpur. *International Journal of Mosquito Research*, 5(2), pp. 23-30.
- Mboera, L.E., Mweya, C.N., Rumisha, S.F., Tungu, P.K., Makange, M.R., Misinzo, G., De Nardo, P., Vairo, F. & Oriyo, N.M. 2016. The Risk of Dengue Virus Transmission in Dar Es Salaam, Tanzania during An Epidemic Period of 2014. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), p.e0004313.
- Morrison, T.E. 2014. Re-emergence of Chikungunya Virus. *Journal of virology*, 88(20), pp. 11644-11647.
- Nurfadly, 2009. Deteksi dan Penentuan Serotipe Virus Dengue Tipe 1 dari Nyamuk *Aedes aegypti* dengan Menggunakan Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) di Kota Medan. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Prasetyowati, P. & Nusa, R. 2012. DHF Cases dominated by DEN-3 Serotype in The West Java Province. *Health Science Journal of Indonesia*, 3(1 Jun), pp. 23-26.
- Purnama, S.G., Kardiwinata, P. & Baskoro, T. 2017. USDI (Unit Sumber Daya Informasi). [Online] Available at: https://simdos.unud.ac.id/uploads/file_penelitian_1_dir/b3ef1c0e0703aa249103eeec774c07f3.pdf [Accessed 10 Januari 2019].
- Pusat Data Surveilans dan Epidemiologi Kementerian Kesehatan RI. 2010. Demam Berdarah Dengue di Indonesia Tahun 1968-2009. *Buletin Jendela Epidemiologi*, 2, pp. 1-14.
- Rohani, A., Zamree, I., Lee, H.L. and Mustafakamal, I., Norjaiza, M.J., Kamila, D. 2005. Detection of Transovarian Dengue Virus for Field Caught *Aedes aegypti* And *Aedes albopictus* Mosquito Using C6/36 Cell Line and RT-PCR. *Trop Biomed*, 22, pp. 149-54.
- Sari, T. F., Joharina, A. S. & Anggraeni, Y. M. 2012. *Identifikasi Serotipe Virus Dengue Pada Nyamuk Aedes aegypti Dan Aedes albopictus Di Kota Salatiga Dengan Metode RT-PCR*. Salatiga: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga.
- Sriprapun, M., Laosakul, C., Krajiw, S., Arunyingmongkol, K., Siriyasatien, P. & Kulwichit, W. 2015. Time Course of Concurrent Infection with Dengue Virus Serotypes 2 and 4 Detected in Urine. *Asian Biomedicine*, 9(2), pp. 197-202.
- Suriptiastuti, 2016. Re-emergensi Chikungunya: Epidemiologi dan Peran Vektor pada Penyebaran Penyakit. *Universa Medicina*, 26(2), pp. 101-110.
- Thavara, U., Tawatsin, A., Pongsakul, T., Bhakdeenuan, P., Chanama, S., Anantapreecha, S., Molito, C., Chompoonsri, J., Thammapalo, S., Sawanpanyalert, P. & Siriyasatien, P. 2009. Outbreak of Chikungunya Fever In Thailand and Virus Detection In Field Population of Vector Mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian JTrop Med Public Health*, 40(5), pp. 951-962.
- Widiati & Lasmia. 2015. Beberapa Aspek Entomologi Pendukung Meningkatnya Kasus. *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 14(4), pp. 309-317.
- Wijayanti, S.P.M., Anandari, D. & Maqhfiroch, F.A. 2017. Vertical Transmission of Dengue Virus on Field Mosquitoes in Banyumas Regency, Central Java, Indonesia. *International Journal of Public Health and Clinical Sciences*, 4(3), pp. 109-119.
- Zayed, A., Awash, A.A., Esmail, M.A., Al-Mohamad, H.A., Al-Salwa, M, Al-Jasari, A., Medhat, I., Morales-Betoulle, M. dan Mnzava, A. 2012. Detection of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti* during 2011 Outbreak in Al Hodayda, Yemen. *Acta Tropica*, 123, pp. 62– 66.