

TRANSMISI TRANSOVARIAL VIRUS DENGUE PADA NYAMUK AEADES SPP.

Angle M. H. Sorisi

Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado
Email: hestisorisi@yahoo.com

Abstract: Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) is one of the most serious health problems in Indonesia which often causes outbreaks with numerous deaths. The disease is transmitted by *Aedes sp.* females. Generally, dengue virus transmission occurs horizontally from human carriers, and the dengue viruses are passed on by their vectors through blood sucking activity. After propagation in the mosquito, the viruses are transmitted to human recipients. In addition, there is a vertical transmission (transovarial) of dengue viruses in the ova of *Aedes sp.* females. The viruses propagate in the ova that undergo metamorphosis to become larvae, pupae, and imagoes. The transovarial transmission of dengue viruses in its vectors in endemic areas could be a causative key which is responsible for the phenomenon of increasing cases of DHF. Any effort to prevent and control DHF requires a thorough understanding about virDen transmission, including this transovarial transmission in *Aedes sp.* females.

Keywords: DHF, transovarial transmission, *Aedes sp.*

Abstrak: Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu masalah kesehatan yang semakin serius di Indonesia dan sering menimbulkan suatu Kejadian Luar Biasa (KLB) dengan jumlah kematian tinggi. Penyakit ditularkan melalui *Aedes sp.* betina. Transmisi virus dengue umumnya terjadi secara horizontal, yaitu dari manusia pembawa virus dengue ke nyamuk vektor *Aedes sp.* melalui aktivitasnya mengisap darah. Setelah mengalami propagasi dalam tubuh nyamuk, virus dengue ditularkan ke manusia penerima. Selain itu, transmisi virus dapat terjadi secara vertikal (transovarial) yaitu virus dengue dalam tubuh nyamuk vektor *Aedes sp.* betina ke ovum, kemudian berpropagasi dalam ovum, larva, pupa, dan imago. Transmisi transovarial virus dengue ke vektornya di daerah endemik bisa menjadi kunci penyebab yang bertanggung jawab terhadap fenomena peningkatan kasus demam berdarah dengue. Upaya pencegahan dan penanggulangan DBD memerlukan pengetahuan yang matang tentang adanya infeksi transovarial virDen pada nyamuk *Aedes sp.*

Kata kunci : DBD, transmisi transovarial, *Aedes sp.*

Demam Berdarah Dengue merupakan salah satu penyakit menular yang sering mere-sahkan masyarakat karena kematian yang terjadi secara tiba-tiba. Penyakit ini ditular-kan melalui gigitan *Aedes sp.* betina yang mengandung virus dengue (virDen) dalam tubuhnya. Infeksi virDen telah menjadi hiperendemis di Asia Tenggara dengan manifestasi Demam Dengue (DD), Demam Berdarah Dengue (DBD), dan Sindroma Syok Dengue (SSD) yang biasanya bersifat fatal terutama pada anak-anak. Diperkira-

kan lebih kurang 100 juta DD dan 5000 kasus DBD terjadi tiap tahunnya di seluruh dunia. Sembilan puluh persen dari kasus-kasus tersebut menyerang anak-anak di ba-wah 15 tahun.¹

DBD merupakan salah satu masalah kesehatan yang semakin serius di Indonesia karena sering menimbulkan Kejadian Luar Biasa (KLB) dengan angka kematian yang tinggi. Penyakit ini bersifat musiman yaitu biasanya terjadi pada peralihan musim hujan ke musim kemarau yang memung-

kinkan vektor penular hidup di genangan air bersih. Penyakit ini juga menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia karena prevalensinya yang tinggi dan penyebarannya yang semakin luas. Serotipe virDen sangat penting ditentukan karena satu dari empat serotipe virDen tersebut dapat menjadi faktor resiko penting untuk berkembang menjadi DBD dan SSD bila terinfeksi. Penelitian surveilans epidemiologi di seluruh Indonesia untuk keempat serotipe virDen dengan penggunaan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pernah dilakukan oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal ini berguna sebagai *Early Warning Outbreak Recognition System* (EWORS) untuk mengantisipasi *outbreak* DBD yang akan terjadi nanti karena penanganan DBD sering terlambat apabila menitik beratkan pada kuratif sehingga sulit untuk menurunkan angka kematiannya.¹

VIRUS DENGUE

Demam Berdarah Dengue (DBD) disebabkan oleh virus Dengue (virDen) yang termasuk kelompok B Arthropod-Borne Virus (Arboviruses) yang sekarang dikenal sebagai genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, dan mempunyai empat jenis serotip, yaitu: DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4. VirDen menunjukkan banyak karakteristik yang sama dengan flavivirus lainnya, mempunyai genom RNA rantai tunggal yang dikelilingi oleh nukleokapsid ikosahedral dan terbungkus oleh selaput lipid. Virion mempunyai diameter kira-kira 50 nm. Genom virDen berukuran panjang sekitar 11.000 pasang basa dan terdiri dari tiga gen protein struktural yang mengodekan nukleokapsid atau protein inti (*core*, C), satu protein terikat membran (*membrane*, M), satu protein penyelubung (*envelope*, E), dan tujuh gen protein nonstruktural (*nonstructural*, NS).²

Gambaran ultrastruktur menunjukkan bahwa virus pertama kali mengalami replikasi di dalam usus tengah nyamuk vektor. Virus sampai di hemokel dan hemolimf, kemudian menyebar ke jaringan-jaringan,

antara lain sistem saraf, kelenjar ludah, usus depan, usus tengah, badan lemak, sel-sel epidermis, ovarium, dan bagian dalam dinding sel nyamuk. Virus tidak dijumpai di jaringan otot, usus belakang, dan tubuli Malphigi.³ Masa inkubasi virDen dalam tubuh nyamuk berlangsung 10-12 hari, kemudian virus siap ditularkan.⁴

Virus dengue biasanya dibawa oleh nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* sebagai vektor. Populasi nyamuk *Ae. aegypti* umumnya lebih dominan di perkotaan sedangkan *Ae. albopictus* di pedesaan. Nyamuk *Aedes sp* yang terdapat di seluruh dunia lebih dari 950 species. Di negara tropis termasuk Indonesia, nyamuk *Aedes aegypti* merupakan vektor utama DBD dan *Ae. albopictus* sebagai vektor potensial.⁵

Manifestasi klinis DBD yaitu demam tinggi, perdarahan (terutama perdarahan kulit), hepatomegali dan kegagalan peredaran darah. Demam timbul secara mendadak berlangsung 2-7 hari, disertai gejala klinis yang tidak spesifik seperti anoreksia, lemah, serta nyeri punggung, tulang, sendi, dan kepala.¹

EPIDEMIOLOGI PENYAKIT DEMAM BERDARAH

Penyakit DBD pertama kali ditemukan di Filipina pada tahun 1953, kemudian selama tiga dekade berikutnya ditemukan di Kamboja, Cina, India, Indonesia, Malaysia, Singapura, Srilanka, Vietnam, dan beberapa kelompok Kepulauan Pasifik. Selama tahun 1960-an dan 1970-an, DBD secara progresif meningkat sebagai masalah kesehatan dan menyebar dari lokasi primernya di kota-kota besar ke kota yang lebih kecil dan kota-kota di negara endemik. Penyakit ini mempunyai pola epidemik berdasarkan musiman dan siklus, dengan wabah besar terjadi pada interval 2-3 tahun. Selama periode ini, dilaporkan 1.070.207 kasus dan 42.808 kematian, yang sebagian besar anak-anak. Wabah yang sangat luar biasa besar terjadi di Vietnam sebanyak 354.517 kasus pada tahun 1987 dan di Thailand sebanyak 177.285 kasus pada tahun 1987.²

Di Indonesia penyakit DBD merupakan penyakit endemis, sejak pertama kali ditemukan pada tahun 1968 di Surabaya dan Jakarta, jumlah kasus terus meningkat baik dalam jumlah maupun luas wilayah yang terjangkit dan selalu terjadi KLB setiap tahun. Beberapa kali terjadi KLB besar pada tahun 1988, 1998, dan 2004, serta awal tahun 2005. Pada tahun 2004 KLB Nasional terjadi di 16 provinsi yaitu NAD, Riau, Lampung, seluruh provinsi di pulau Jawa, Bali, NTB, NTT, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur dan Sulawesi Selatan dengan total kasus mencapai 59.000 dan kematian 689 orang (IR 24 per 100.000 penduduk dan CFR 1.1%). Pada tahun 2005 bulan Januari-Mei di seluruh Indonesia terdapat 28.224 kasus dan 384 kematian (IR 12.8 dan CFR 1.36%).⁶ Sejak tahun 2004 kasus DBD terus meningkat dan meluas sampai lebih dari 350 kabupaten/kota. Kematian DBD tahun 2009 mencapai 1388 orang, ini berarti lebih dari sekitar 100 orang perbulan, sama dengan pesawat jatuh setiap bulan yang seluruh penumpangnya tewas.⁷

Di Provinsi Sulawesi Utara, penyakit DBD pertama kali ditemukan di Manado pada tahun 1973 kemudian menyebar ke berbagai daerah. Angka insidens (*Insidence Rate*, IR) DBD di Sulawesi Utara masih sangat tinggi dalam beberapa tahun terakhir ini dan perkembangannya sangat fluktuatif. Sejak tahun 2005 sampai dengan 2009, IR/100.000 penduduk/tahun cukup berfluktuatif, yaitu lebih dari 40/100.000 penduduk/tahun. Kasus DBD di Provinsi Sulawesi Utara dilaporkan tertinggi pada bulan Februari 2010 dengan jumlah 615 kasus.⁷

Penyebab adanya kasus, semakin meningkatnya jumlah kasus, dan bertambahnya wilayah terjangkit di Indonesia sangat kompleks dan multifaktorial dikarenakan semakin padatnya penduduk, transportasi lancar dari suatu daerah ke daerah lainnya, adanya pemukiman baru, faktor musim dan penyimpangan pola hujan, perilaku masyarakat menyimpan air secara tradisional, vektor nyamuk *Aedes* terdapat di seluruh pelosok tanah air khususnya di perkotaan, kurangnya partisipasi masyarakat dalam

pemberantasan sarang nyamuk (PSN), serta adanya empat serotipe virus DEN yang bersirkulasi sepanjang tahun.⁶

TRANSMISI TRANSOVARIAL VIRUS DENGUE

Transmisi virDen umumnya terjadi secara horizontal dari manusia pembawa virDen ke nyamuk vektor *Aedes sp.*, yang setelah mengalami propagasi dalam tubuh nyamuk akan ditularkan ke manusia penerima. Selain itu, transmisi virDen bisa terjadi secara vertikal (transovarial), yaitu dari nyamuk *Ae. aegypti* betina bunting yang terinfeksi virDen sebagai induk ke ova dalam uterus nyamuk itu, yang akhirnya berpropagasi dalam embrio. VirDen menggunakan larva sampai imagonya sebagai medium hidup untuk perbanyakannya. Manusia bisa terinfeksi virDen oleh nyamuk yang baru saja muncul dari pupanya dalam air melalui gigitan atau isapan darah. Transmisi transovarial virDen oleh vektornya di daerah endemik bisa menjadi kunci penyebab yang bertanggung jawab terhadap fenomena peningkatan kasus deman berdarah dengue.⁸

Terdapat tiga cara penularan transovarial arbovirus pada nyamuk, yaitu: (1) Nyamuk betina yang belum terinfeksi menghisap darah inang viremik, kemudian virus mengalami replikasi dalam nyamuk dan telur yang terinfeksi, menghasilkan larva yang infeksius; (2) Nyamuk betina yang belum terinfeksi kawin dengan nyamuk jantan yang terinfeksi secara transovarial. Selama nyamuk kawin, terjadi penularan secara seksual, yang berakibat ovarium nyamuk betina tersebut terinfeksi virus; (3) Nyamuk betina mengalami infeksi virus pada jaringan ovariumnya dan terpelihara sampai generasi berikutnya secara genetik.⁹ Mekanisme transmisi vertikal arbovirus dalam tubuh nyamuk dapat ditularkan oleh nyamuk betina pada telurnya (transovarial), yang nantinya akan menjadi nyamuk dengan tingkat infeksi melebihi 80%. Infeksi transovarial terjadi bila virus ditransfer masuk ke dalam telur saat fertilisasi melalui oviduk selama masa embriogenesis, yang

berakibat telur terinfeksi menghasilkan larva yang infeksius.¹⁰

Ae. aegypti dan *Ae. albopictus* mempunyai kemampuan untuk menularkan virus terhadap keturunannya secara transovarial atau melalui telurnya. Studi laboratorium menunjukkan bahwa virus DEN-3 secara persisten ditularkan secara transovarial. Frekuensi penularan meningkat sampai generasi ke-7, kemudian infeksiya menetap pada generasi berikutnya.^{11,12} Rohani et al.¹² (2005) menemukan larva terinfeksi virus DBD tersebut pada 16 lokasi penelitian di Malaysia dengan laju infeksi virus lebih tinggi pada *Ae. aegypti* (13,7%) dibandingkan pada *Ae. albopictus* (4,2%). Hasil penelitian ini memberikan indikasi bahwa transmisi transovarial berpotensi sebagai pendukung pemeliharaan endemisitas DBD dimana nyamuk *Aedes sp* berlaku sebagai reservoir virDen.^{11,12}

VirDen bisa ditularkan secara transovarial pada nyamuk *Ae. albopictus* dengan angka infeksi lebih tinggi pada nyamuk betina dari pada nyamuk jantan. Hal ini bisa terjadi karena nyamuk jantan bisa terinfeksi virus hanya dengan satu cara yaitu didapat dari induknya yang terinfeksi virus (*vertical transmission*), sedangkan nyamuk betina selain bisa terinfeksi virus dari induknya (vertikal) juga bisa terinfeksi dengan cara venereal, yaitu nyamuk betina terinfeksi virus pada saat *mating* dengan nyamuk jantan yang terinfeksi.¹³ Di Indonesia transmisi transovarial virDen di alam dibuktikan di Kelurahan Klitren Yogyakarta dengan metode imunositokimia pada sediaan pencet kepala (*head squash*), yang kemudian metode ini dibakukan oleh Umniyati.¹⁴ Penelitian selanjutnya dengan metode yang sama di kota Semarang, Kabupaten Kendal, Kabupaten Sukoharjo, dan Kota Salatiga ditemukan adanya transmisi transovarial virDen dengan persentasi angka infeksi transovarial (*transo-varial infection rate*) berkisar 0,66-8,77%.¹⁵ Hasil uji di beberapa kelurahan Kota Yogyakarta juga ditemukan telah terjadi transmisi transovarial dengan angka infeksi 38,5-70,2%.⁸ Penelitian lainnya mengenai transovarial virDen di Kalimantan Tengah

mengemukakan adanya infeksi transovarial dalam tubuh nyamuk dengan indeks transmisi transovarial (ITT) dalam tubuh nyamuk di daerah endemis DBD (19,4-25%) dan daerah sporadis DBD (2,8-8,3%).¹⁶

Tidak semua nyamuk mengandung virDen karena tidak semua *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* bisa menjadi vektor DBD. Hal ini berhubungan dengan kerentanan dari vektor itu sendiri. Oleh karena itu infeksi transovarial tiap daerah juga bervariasi. Nyamuk dikatakan rentan bila diinfeksi dengan dosis virus rendah sudah bisa terinfeksi, dan dikatakan mempunyai kerentanan rendah atau tidak rentan bila diinfeksi dengan dosis virus yang tinggi tetapi tetap tidak infeksi sehingga bukan termasuk vektor penyakit.¹⁰

Kerentanan dari nyamuk kemungkinan dikendalikan secara genetik oleh penyekat infeksi (*infection barrier*) di usus tengah.¹⁷ Terdapat beberapa jenis penyekat infeksi: 1) penyekat di usus tengah yang terdiri dari hemokel, membran basalis, epitel usus tengah, *brush border*, dan lumen usus; 2) penyekat di kelenjar ludah, yang terdiri dari duktus salivarius, permukaan sekretorik, sel sekretorik, membran basalis dan hemokel; dan 3) penyekat di ovarium yang terdiri dari folikel, permukaan sekretorik, epitel folikel, pembungkus ovarium, dan hemokel. Keberadaan penyekat infeksi akan mempengaruhi kepekaan vektor tersebut.¹⁰

DETEKSI VIRUS DENGUE

Beberapa metode baru untuk mendiagnosis virDen telah dikembangkan dan terbukti bermanfaat, antara lain *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan imunositokimia *Streptavidin Biotin peroxidase Complex* (SBPC). Dalam beberapa tahun terakhir ini, RT-PCR telah dikembangkan untuk sejumlah virus RNA dan berpotensi untuk mengubah secara drastis diagnosis laboratorium untuk Dengue. RT-PCR menyediakan suatu metode diagnostik serotipe virDen yang cepat. Metode ini cepat dan sensitif serta dapat digunakan untuk mendeteksi RNA virus pada sampel penderita suspek Dengue, jaringan autopsi,

maupun nyamuk.¹⁸

Imunositokimia dalam diagnostik patologik seperti streptavidin biotin, avidin biotin kompleks, alkalin fosfatase anti-alkalin fosfatase atau peroksidase anti-peroksidase telah tersedia secara komersial saat ini. Metode ISBPC menggunakan antibodi sekunder yang dilabel biotin sehingga dapat mengenal antibodi primer (antibodi monoklonal atau antibodi poliklonal) dan menggunakan konjugat streptavidin yang dilabel enzim *horseradish peroxidase* (HRP) serta campuran substrat kromogen untuk mendeteksi antigen pada sel atau jaringan dengan sensitifitas yang sangat tinggi. Antigen dengan kadar rendahpun bisa terdeteksi dengan adanya reaksi dua konjugat *prediluted biotinilated secondary antibody* dan *prediluted streptavidin peroxidase*. Dasar utama reaksi imunositokimia SBPC yaitu ikatan yang sangat kuat antara streptavidin dengan biotin. Oleh karena kadar antibodi sekunder yang dilabel biotin yang terikat lebih banyak, maka kesempatan untuk dapat mengikat konjugat streptavidin yang dilabel enzim horseradish peroksidase juga lebih banyak. Akibatnya enzim peroksidase akan mengkatalisis substrat hidrogen peroksidase dan mengubah kromogen diaminobenzidine (DAB) menjadi deposit warna coklat yang menandakan lokasi tersebut mengandung antigen. Sebaliknya, bila tidak ada antigen maka tidak ada ikatan antara antibodi primer dan antigen sehingga pada saat pencucian dengan *phosphate buffered saline* (PBS) antibodi primer hanyut atau terbuang. Antibodi sekunder yang dilabel biotin pada saat pencucian juga ikut terbuang. Akibatnya, ketika diinkubasikan dengan konjugat streptavidin yang dilabel enzim HRP, tidak terdapat ikatan dengan antibodi sekunder. Oleh karena tidak terjadi reaksi enzimatik antara enzim HRP dan substrat, maka tidak tampak perubahan warna menjadi coklat. Pada saat diinkubasikan selama tiga menit akan terjadi penyerapan oleh jaringan/sel sehingga menjadi warna biru atau ungu yang menunjukkan tidak adanya antigen atau negatif.¹⁹

Pemeriksaan imunositokimia SBPC dilakukan dengan mikroskop cahaya yang banyak tersedia di laboratorium, sedangkan *Indirect Fluorescence Antibody Test* (IFAT) harus diperiksa di bawah mikroskop fluoresen yang mahal dan jarang tersedia di laboratorium; selain itu, sediaan imuno-fluoresen mudah rusak bila tidak disimpan di *cryofreezer*. Hasil pemeriksaan virDen bersifat kualitatif tetapi sangat sensitif, spesifik, dan sah untuk keperluan diagnostik virDen. Sediaan pencet kepala nyamuk (*head squash*) dapat dilihat secara mikroskopik dengan pembesaran 400x dan 1000x.⁸

SIMPULAN

Transmisi virus Dengue umumnya terjadi secara horizontal dari manusia pembawa virus dengue ke nyamuk vektor *Aedes sp.* yang menularkannya ke manusia lainnya sebagai penerima virus. Selain itu, terdapat transmisi vertikal (transovarial) dari nyamuk *Aedes sp* betina bunting yang telah terinfeksi virus dengue sebagai induk ke telur dalam uterus nyamuk tersebut yang bermetamorfosis menjadi nyamuk dewasa keturunan selanjutnya. Pemahaman yang menyeluruh mengenai transmisi virus Dengue melalui vektornya perlu dicermati mengingat makin tingginya kejadian demam dengue dan demam berdarah dengue dan makin luasnya penyebaran di seluruh pelosok Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Depkes RI. Pencegahan dan Pemberantasan Demam Berdarah Dengue. Jakarta: Ditjen PPM & PLP Depkes RI, 2005.
2. World Health Organization. Demam Berdarah Dengue. Diagnosis, Pengobatan, Pencegahan, dan Pengendalian, alih bahasa Monica Ester. EGC: Jakarta, 1999.
3. Malavige GN, Fernando S, Seneviratne SL. Dengue viral infection. *Postgrad J Med.* 2004;80:588-601.
4. World Health Organization. Prevention and control of Dengue and Dengue

- Haemorrhagic Fever, Comprehensive Guidelines. EGC: Jakarta, 2001.
5. **Rozendaal JA.** Vector control. Geneva: WHO, 1997.
 6. **Kusriastuti R.** Epidemiologi Penyakit Demam Berdarah Dengue dan Kebijakan Penanggulangannya di Indonesia. Seminar Dengue Control Up-date. Yogyakarta: Pusat Kedokteran Universitas Gajah Mada, 2005; p.1-12.
 7. **Rondonuwu, MR.** Kebijakan Pengendalian DBD di Provinsi Sulawesi Utara. Seminar Penanggulangan Demam Berdarah Dengue. Manado: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sam Ratulangi, 2010.
 8. **Mardihusodo SJ, Satoto TBT, Mulyaningsih B, Umniyati SR, Ernaningsih.** Bukti adanya penularan virus Dengue secara transovarial pada nyamuk *Aedes aegypti* di Kota Yogyakarta. Simposium Nasional Aspek Biologi Molekuler, Patogenesis, Manajemen dan Pencegahan KLB. Yogyakarta: Pusat Studi Bioteknologi UGM, 2007.
 9. **Leake CJ.** Transovarial transmission of arbovirus by mosquito. In: Mayo MA, Harrap KA, editors. Vector in Virus Biology. Sydney: Society for General Microbiology Academic Press, 1984; p. 63-90.
 10. **Beaty BJ, Woodring JL, Higgs S.** Natural cycles of vector-borne pathogens. In: Beaty BJ, Marquardt WC, editors. The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado, 1996; p. 51-70.
 11. **Joshi V, Maurya DT, Sharma RC.** Persistence of Dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generation of *Aedes aegypti* mosquito. Am J Trop Med Hyg. 2002;67(2):158-61.
 12. **Rohani A, Yunus W, Zamree I, Lee HL.** Protein synthesized by Dengue infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Tropical Biomedicine. 2005; 22(2): 233-42.
 13. **Thenmozhi V, Hiriyan JG, Tewari SC, Samuel PP, Paramasivan R, Rajendran R, Mani TR, Tyagi BK.** Natural vertical transmission of Dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) in Kerala a Southern Indian State. Centre for Research in Medical Entomology. Madurai: Indian Council of Medical Research, 2007.
 14. **Umniyati SR.** Preliminary investigation on the transovarial transmission of Dengue virus in the population of *Aedes aegypti* in the well. Seminar Hari Nyamuk IV. Surabaya, 2004.
 15. **Widiarti, Boewono DT, Widyastuti U, Mujiono, Lasmiati.** Deteksi virus dengue pada induk dan progeny vektor demam berdarah *Aedes aegypti* di beberapa daerah endemis di Jawa Tengah. Seminar Sehari Strategi Pengendalian Vektor dan Reservoir Penyakit pada Kedaruratan Bencana Alam di Era Desentralisasi. Salatiga, 2006.
 16. **Gustiansyah M.** Bukti adanya transmisi transovarial virus Dengue pada nyamuk *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) di Sampit, Kabupaten Kotawaringin Timur Kalimantan Tengah [Tesis]. Yogyakarta: Bagian Ilmu Kedokteran Tropis UGM; 2008.
 17. **Gubler DJ, Rosen L.** Variation among geographic strain of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with Dengue viruses. Am J Trop Med Hyg. 1976;25(2):318-25.
 18. **Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical sample using Reverse Transcription Chain Reaction. J Clin Microbiol. 1976;30:545-51.
 19. **Umniyati SR.** Teknik imunositokimia dengan antibodi monoklonal DSSC7 untuk kajian patogenesis infeksi dan penularan transovarial virus Dengue serta surveilansi virologis vektor Dengue [Disertasi]. Yogyakarta: Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran UGM; 2009.