

Research Article

Serotipe virus dengue dan populasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* di Kota Bengkulu: implikasi bagi program pencegahan demam berdarah

Dengue virus serotype and the population of Aedes aegypti and Aedes albopictus in Bengkulu City: its implications for dengue prevention programs

Dessy Triana¹, Sitti Rahmah Umniyati², Budi Mulyaningsih², Munauwarus Sarirah³

Abstract**Dikirim:**

14 April 2018

Diterbitkan:

24 Mei 2018

Purpose: This study aimed to prevent the development of dengue virus by detecting dengue virus serotypes of *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) and *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) and to determine the population of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in dengue endemic area (Sidomulyo Village) and dengue sporadic area (Tanjung Jaya Village) in Bengkulu City, Indonesia. **Methods:** The design of study was observational-analytic. *Aedes sp* eggs were collected by ovitraps from Sidomulyo and Tanjung Jaya Villages. The eggs were reared to adult and identified to determine of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. Identification of species *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* uses the pictorial key for the identification of mosquitoes by Rueda. Detection of dengue virus serotypes were done by RT-PCR and *nested* PCR method using specific primers Lanciotti. **Results:** The Serotypes of dengue virus of *Ae. aegypti* in dengue endemic and sporadic areas were dengue-3 (DENV-3) and the serotypes of dengue virus of *Ae. albopictus* in dengue sporadic area was dengue-3 (DENV-3). The population ratio of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in dengue endemic area (61%:39%) and dengue sporadic areas (27%:73%), respectively. **Conclusions:** *Aedes aegypti* in dengue endemic and sporadic areas and *Ae. albopictus* in dengue sporadic area has potential as a dengue-3 vector. Health Agency of Bengkulu City could optimize the prevention program of dengue and activate the Jumantik cadres.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; prevention program of dengue; dengue virus serotype

¹ Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Bengkulu

² Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada

³ Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sumatera Utara

PENDAHULUAN

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) masih menjadi masalah kesehatan yang serius pada masyarakat karena penyebaran penyakit yang cepat dengan angka kematian yang masih relatif tinggi serta berpotensi menimbulkan Kejadian Luar Biasa (KLB) yang berdampak luas terhadap kualitas kehidupan dan ekonomi masyarakat (1). Estimasi infeksi dengue terjadi pada 390 juta orang per tahun dan 96 juta memiliki manifestasi klinis (1,2). Penyakit ini menginfeksi 50-100 juta orang dan sekitar 2.5 milyar orang tinggal di 128 negara endemis DBD (1).

Penyakit DBD disebabkan virus dengue (DENV) yang terdiri dari empat serotipe virus yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4 dan ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) sebagai vektor utama dan *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) sebagai vektor sekunder (1). *Aedes albopictus* telah dipertimbangkan menjadi vektor potensial dengue dan beberapa isolat virus dari *Ae. albopictus* telah dibuat di Asia Tenggara (3). Di Havelock Island India, perbandingan komposisi populasi *Ae. aegypti* (7,5%) dan *Ae. albopictus* (58,3%) (3,4), *Aedes albopictus* terlibat sebagai vektor penting penyebab penyakit DBD (5).

Penyakit DBD banyak ditemukan di daerah tropis dan sub-tropis. Asia menempati urutan pertama di dunia dalam jumlah penderita DBD setiap tahunnya. Terhitung sejak tahun 1968 hingga tahun 2009, WHO mencatat negara Indonesia sebagai negara dengan kasus DBD tertinggi di Asia Tenggara (1). Wabah penyakit DBD telah menjadi bencana nasional dan dikategorikan sebagai KLB dengan tingkat mortalitas dan morbiditas cukup tinggi. Direktorat pengendalian penyakit tular vektor dan zoonosis Kementerian Kesehatan RI melaporkan hingga akhir Januari 2016 terdapat KLB penyakit DBD di 12 Kabupaten dan 3 Kota dari 11 Provinsi di Indonesia diantaranya adalah Kota Bengkulu dengan total penderita DBD dari 11 provinsi tersebut sebanyak 8.487 orang dan jumlah kematian sebanyak 108 orang (6).

Serotipe virus dengue telah ditemukan di berbagai daerah di Indonesia (7) dan menunjukkan DENV-3 merupakan serotipe virus yang paling dominan menyebabkan kasus yang berat (8). Virus dengue-3 dilaporkan menyebabkan epidemi di Australia tahun 1997-1999 (9). Virus dengue yang diamati sejak tahun 1975 sampai tahun 1998 dari spesimen darah penderita DBD pada anak-anak menunjukkan bahwa DENV-3 selalu dominan, kemudian diikuti DENV-2, DENV-1 dan DENV-4. Pada saat terjadi KLB tahun 2004 menunjukkan bahwa DENV-3 tetap dominan (8).

Indonesia sebagai negara endemik DBD memiliki peluang infeksi konkuren (bersamaan dari serotipe virus dengue yang berbeda maupun infeksi sekunder dengan serotipe virus yang berbeda dari infeksi sebelumnya yang menimbulkan kasus DBD dengan manifestasi klinis berat).

Infeksi konkuren di Indonesia pertama kali dilaporkan di Semarang dengan jumlah kasus 11% selama tahun 1976-1978 yaitu serotipe DENV-2 dan DENV-3 (10).

Kasus infeksi konkuren pertama kali dilaporkan pada tahun 1982 di Puerto Rico, Brazil dengan serotipe DENV-1 dan DENV-4, tahun 1989 di New Caledonia dengan serotipe DENV-1 dan DENV-3, tahun 1990 di Thailand dengan serotipe DENV-1 dan DENV-2, tahun 1991-1995 di China dengan serotipe DENV-2 dan DENV-4 dan di Somalia pada tahun 1993 dengan serotipe DENV-2 dan DENV-3 (10-12).

Data tentang proporsi nyamuk yang mengandung virus dengue sangat penting karena dapat digunakan untuk identifikasi penularan penyakit DBD di daerah endemis dan informasi mengenai serotipe virus juga sangat diperlukan karena berkaitan dengan derajat manifestasi klinis DBD di daerah tersebut (13,14). Penelitian dapat membantu Dinas Kesehatan Kota Bengkulu dalam mencegah KLB DBD dengan mengetahui pola populasi *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* serta serotipe virus dengue yang berada pada nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*.

METODE

Penelitian ini telah disetujui Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Nomor KE/FK/0919/EC/2017. Populasi berupa nyamuk dewasa *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* asal telur generasi F0 dari lokasi penelitian Kelurahan Sidomulyo Kecamatan Gading Cempaka (daerah endemis) dan Kelurahan Tanjung Jaya Kecamatan Sungai Serut Kota Bengkulu.

Koleksi telur nyamuk. Ovitrap dipasang di Sidomulyo 120 buah dan Tanjung Jaya 110 buah. Ovitrap dibuat dari cawan plastik 250 ml dengan bagian luar diwarnai hitam serta diberi label sesuai lokasi endemis atau sporadis. Ovitrap diletakkan di dalam dan di luar rumah yang tidak terkena cahaya matahari langsung dan hujan dan tempat yang lembab. Ovitrap diisi dengan air jernih 2/3 bagian dan ovitrap dipasang melingkar penuh pada perbatasan air untuk ovoposisi nyamuk *Ae. aegypti*. Ovitrap dipasang selama 7 hari, kemudian ovitrap dikeringkan hati-hati, dilabel dan dimasukkan ke dalam plastik bening untuk disimpan.

Kolonisasi nyamuk. Telur nyamuk yang diperoleh dari lokasi penelitian ditetaskan di nampan plastik ukuran 24x36x6 cm yang berisi air dan dipelihara sampai stadium pupa. Pemeliharaan larva untuk bertahan hidup diberi pakan hati ayam kering dan air diganti 2-3 kali dalam 1 minggu. Pemeliharaan nyamuk dewasa dilakukan dengan suhu ruang $27 \pm 2^\circ\text{C}$, kelembaban udara $75 \pm 10\%$, diberi makan larutan gula 10% dan periode 12 jam cahaya dan 12 jam gelap. Nyamuk dewasa diidentifikasi untuk konfirmasi nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* sesuai pedoman *pictorial key for the identification of mosquitoes*

dari Rueda (15). Kolonisasi dilanjutkan ke generasi F1 di Lab Entomologi, Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada.

Ekstraksi RNA virus dengue. Ekstraksi RNA virus dilakukan pada sampel nyamuk dewasa menggunakan RNeasy® Mini Kit (Qiagen Corporation, USA) sesuai prosedur yang direkomendasikan. Sebanyak 1-20 nyamuk dimasukkan ke dalam tabung, kemudian direndam dalam 600 µl buffer (penyangga) RLT yang mengandung Guanidinium tiosianat untuk melisis sel dan partikel virus dan untuk mencegah aktivitas enzim RNase karena enzim ini merusak ekstrak RNA. Nyamuk selanjutnya digerus dengan menggunakan stick grinder dan ditambahkan 600 µl etanol 70%. Etanol ditambahkan untuk pengikatan yang sesuai, dan sampel sebanyak 700 µl kemudian dimasukkan ke kolom spin RNeasy Mini, dan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm sehingga total RNA berikatan dengan membran dan ditambah 700 µl penyangga RW1 kemudian disentrifus 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Penyangga RW1 mengandung garam guanidin, etanol yang digunakan sebagai pencuci yang secara efisien menghilangkan biomolekul karbohidrat, protein, asam lemak, dan yang tidak terikat secara khusus dengan membran silika, sehingga kontaminan secara efisien hanyut. Pada saat yang sama, molekul RNA yang lebih besar dari 200 basa tetap terikat pada kolom. Tahap berikutnya 500 µl penyangga RPE ditambahkan ke dalam tabung tersebut dan tabung disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Fungsi utama penyangga RPE adalah membuang jejak garam yang masih berada di kolom dari penyangga yang digunakan sebelumnya dalam protokol. Supernatan selanjutnya dipindahkan ke tabung sentrifus baru dan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan ditambah 50 µl RNase-free Water dan disentrifuse selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Hasil RNA virus disimpan di *cryofreezer* pada temperatur -80°C (15,16).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) dan nested PCR. Alat dan bahan untuk RT-PCR menggunakan QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (Cat. No. 210210) yang terdiri dari 50 µl QIAGEN OneStep Enzyme Mix (*Omniscript Reverse Transcriptase* dan *HotStarTaq® DNA Polymerase*), 350 µl RT-PCR buffer, 2 ml Q-solution, 50 µl dNTP mix, 1,9 ml RNase-free water.

Deteksi RNA virus dengue pada *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dilakukan dengan metode RT-PCR yang dapat mengubah RNA virus menjadi komplemen DNA (cDNA) dalam 1 tabung. Komposisi reagen RT-PCR terdiri dari: 1 µl dNTP, 1 µl enzim, 11 µl ddH₂O, 1 µl primer D1 universal (*forward*) dan 1 µl primer D2 universal (*reverse*) (17). Ditambahkan 5 µl RNA virus sehingga didapatkan volume total 25 µl. Tabung sampel diinkubasi dalam *thermal cycler* sesuai program: *reverse transcription* pada suhu 50°C

selama 30 menit, 94°C selama 2 menit (*predenaturasi*), 94°C selama 15 detik (*denaturasi*), 55°C selama 30 detik (*annealing*), 68°C selama 1 menit (*ekstensi*) dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit sebanyak 40 siklus (18). Nyamuk kontrol positif adalah *Ae. aegypti* yang diinfeksi virus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4). Hasil dari proses ini adalah cDNA virus dengue yang dapat disimpan pada suhu -20°C.

Nested PCR dilakukan pada produk RT-PCR yang dihasilkan tahap pertama dengan menggunakan QIAGEN *HotStarTaq® Master Mix Kit 250 U* (Cat. No. 203443) (19) sebagai berikut: Tabung mikro 0,2 ml diisi dengan 15 µl master mix, ditambahkan 1 µl primer D1 universal (*forward*) dan 1 µl primer TS1, TS2, TS3 dan TS4 (*reverse*). Ditambahkan 3 µl cDNA dan 7 µl ddH₂O sehingga didapatkan volume total 30 µl. Siklus reaksi *nested PCR* yaitu *predenaturasi* 1 siklus dengan suhu 94°C selama 2 menit, 94°C selama 15 detik (*denaturasi*), 55°C selama 30 detik (*annealing*), 68°C selama 1 menit (*ekstensi*) dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit sebanyak 40 siklus.

Hasil amplifikasi cDNA dianalisis dengan elektroforesis menggunakan 2% gel agarose dalam penyangga TBE 0,5x yang mengandung 0,5 µg/ml gel red untuk visualisasi. Tahapan elektroforesis diawali dengan menimbang 1 gr agarose 2%, dimasukkan dalam tabung erlemeyer dan ditambahkan 50 ml penyangga TBE 0,5x Larutan dipanaskan hingga menjadi bening dalam *microwave* selama ± 1 menit, lalu ditambahkan 5µl etidium bromida atau *gel red* untuk visualisasi Larutan dimasukkan dalam *gel plate* dan ditunggu hingga membentuk gel agak padat (±45 menit). Gel dimasukkan ke dalam elektroforesis dan ditambahkan 0,5x penyangga TBE sampai menutupi permukaan gel. Sampel dimasukkan dalam setiap sumuran. Elektroforesis diaktifkan selama 45 menit jika perlu ditambahkan waktu 10 menit.

Urutan primer dan oligonukleotida yang digunakan dalam RT-PCR dan *nested PCR* untuk mendeteksi keberadaan virus dengue dan serotipe virus dengue pada nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* ditunjukkan pada Tabel 1 (16). Penelitian ini mendeteksi serotipe virus

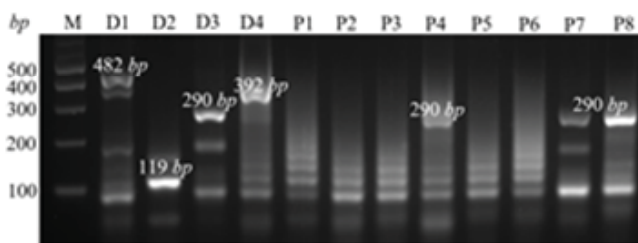
Tabel 1. Urutan primer dan oligonukleotida oleh Lanciotti *et al.* (1992).

Primer	Sekuens	Posisi Genom	Jumlah (bp)
D1	5'_TCAATATGCTGAAACGCGC GAGAAACCG_3'	134-161	511
D2	5'_TTGCACCAACAGTCAATGT CTTCAGGTTC_3'	616-644	511
TS1	5'_CGTCTCAGTGATCCGGGG G_3'	568-586	482
TS2	5'_CGCCACAAGGGCCATGAAC AG_3'	232-252	119
TS3	5'_TAACATCATCATGAGACAG AGC_3'	400-421	290
TS4	5'_CTCTGTTGTCTTAAACAAA GAGA_3'	506-527	392

dengue pada nyamuk *Ae. aegypti* berdasarkan besar produk yang dihasilkan yaitu DENV-1 482 bp, DENV-2 119 bp, DENV-3 290 bp dan DENV-4 392 bp menggunakan primer Lanciotti.

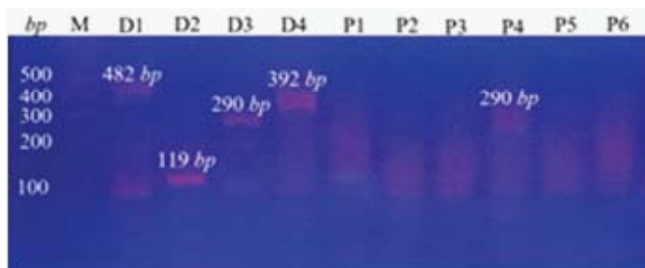
HASIL

Hasil elektroforesis produk RT-PCR dan *nested* PCR ditetapkan band yang dihasilkan dari virus nyamuk *Ae. aegypti* dari daerah endemis dan sporadis DBD di Kota Bengkulu. Gambar 1 memperlihatkan sampel nomor 1-4 yang berasal dari daerah endemis DBD diperoleh hasil DENV-3 dengan ukuran band 290 bp pada sampel ke-4 (RT 20 dan RT 23 Kelurahan Sidomulyo). Sampel nomor 5-8 yang berasal dari daerah sporadis diperoleh DENV-3 dengan ukuran band 290 bp pada sampel ke-7 dan ke-8 (RT5 Kelurahan Tanjung Jaya).



Gambar 1. Hasil elektroforesis serotipe virus dengue produk *nested* PCR nyamuk *Ae. aegypti* dari daerah endemis (nomor P1-P4) dan daerah sporadis DBD (nomor P5-P8), M (marker 100 bp DNA ladder), D1 (kontrol positif DENV-1), D2 (kontrol positif DENV-2), D3 (kontrol positif DENV-3), D4 (kontrol positif DENV-4).

Gambar 2 memperlihatkan bahwa sampel nomor 4 yang berasal dari daerah sporadis diperoleh hasil DENV-3 dengan ukuran band 290 bp.



Gambar 2. Hasil elektroforesis serotipe virus dengue daerah endemis (nomor P1-P3) dan daerah sporadis (nomor P4-P6), M (marker 100 bp DNA ladder), D1 (kontrol positif DENV-1), D2 (kontrol positif DENV-2), D3 (kontrol positif DENV-3), D4 (kontrol positif DENV-4).

Tabel 2 menunjukkan perbandingan populasi *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* di Sidomulyo dengan perbandingan 61%:39%, sedangkan Tanjung Jaya sebesar 27%:73%.

Tabel. 2 Perbandingan populasi *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* berdasarkan wilayah penelitian

Lokasi	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>
Sidomulyo		
SD 01	124	73
SD 02	134	100
SD 03	79	47
Total	337 (60.5%)	220 (39.5%)
Tanjung Jaya		
TJ 01	21	87
TJ 02	35	120
TJ 03	35	38
Total	91 (27.1%)	245 (72.9%)

BAHASAN

Hasil elektroforesis produk *nested* PCR dari pooling nyamuk *Ae. aegypti* dari daerah endemis dan sporadis DBD memperlihatkan band diagnostik 290 bp (positif DENV-3), sedangkan nyamuk *Ae. albopictus* DENV-3 hanya ditemukan di daerah sporadis DBD. DENV-3 merupakan serotipe virus paling dominan penyebab kasus berat di Indonesia (20,21). Penelitian di Bantul menunjukkan bahwa DENV-3 paling dominan (76,4%) diikuti DENV-2 dan DENV-4 (22). Penelitian di India menunjukkan DENV-3 lebih dari satu dekade menjadi penyebab KLB DBD (23). Virus dengue-3 menyebabkan epidemi di Australia tahun 1997-1999 (7).

Virus dengue yang diamati di Indonesia sejak 1975 sampai 1998 dari spesimen darah penderita DBD pada anak-anak menunjukkan bahwa DENV-3 selalu dominan, kemudian diikuti DENV-2, DENV-1 dan DENV-4. Saat KLB 2004 DENV-3 tetap dominan (7). Indonesia sebagai negara endemik DBD berpeluang terjadi infeksi konkuren yaitu infeksi yang bersamaan dari serotipe virus dengue yang berbeda maupun infeksi sekunder dengan serotipe virus dengue yang berbeda dari infeksi sebelum yang mengakibatkan kasus DBD manifestasi klinis berat. Infeksi konkuren di Indonesia pertama kali dilaporkan epidemik di Semarang dengan jumlah kasus sebesar 11,1% selama tahun 1976-1978 yaitu serotipe DENV-2 dan DENV-3 (9).

Kasus infeksi konkuren tahun 1989 di New Caledonia dengan serotipe DENV-1 dan DENV-3, tahun 1991-1995 di China dengan serotipe DENV-2 dan DENV-4 dan di Somalia tahun 1993 dengan serotipe DENV-2 dan DENV-3 (11,12,24). Penelitian di Venezuela melaporkan bahwa DENV-3 merupakan serotipe dengan insiden tinggi di daerah endemis dan sekitar dengan angka sebesar 3,2% dan 12% (25). Populasi nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dari Sidomulyo berbanding 61%:39%, sedangkan Tanjung Jaya 27%:73%. Penelitian serupa di India, komposisi *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* berbanding 7,5%:58,3% dari 27 titik pengumpulan sampel. Proporsi populasi *Ae. aegypti* lebih besar di Sidomulyo (endemis) yang menyebabkan KLB dibanding Tanjung Jaya yang satu-satunya daerah sporadis DBD di Kota Bengkulu 2016.

Abstrak

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk pencegahan perkembangan penyakit DBD dengan mendeteksi serotipe virus dengue pada nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dan menentukan rasio populasi nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* di daerah endemis dan sporadis DBD di Kota Bengkulu. **Metode:** Desain penelitian ini adalah observasional-analitik. Telur nyamuk *Aedes sp* dikumpulkan menggunakan ovitrap dari daerah endemis DBD (Kelurahan Sidomulyo) dan daerah sporadis DBD (Kelurahan Tanjung Jaya). Identifikasi spesies *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* menggunakan *pictorial key for the identification of mosquitoes Rueda*. Deteksi serotipe virus dengue dilakukan dengan metode RT-PCR dan *Nested PCR* menggunakan primer spesifik Lanciotti. **Hasil:** Serotipe virus dengue yang ditemukan pada *Ae. aegypti* adalah DENV-3 (daerah endemis dan sporadis DBD) dan DENV-3 pada *Ae. albopictus* (daerah sporadis DBD). Perbandingan populasi *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* pada daerah endemis dan sporadis DBD berturut-turut adalah (60,51%:39,49%) dan (27,08%:72,92%). **Simpulan:** *Aedes aegypti* di daerah endemis dan sporadis DBD serta *Ae. albopictus* di daerah sporadis DBD berpotensi sebagai vektor dengue-3. Dinas Kesehatan Kota Bengkulu dapat mengoptimalkan program pencegahan DBD dan mengaktifkan kader Jumantik.

Kata kunci: *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; program pencegahan dengue; serotipe virus dengue

Temuan ini penting bagi dinas kesehatan dalam mengantisipasi KLB DBD di daerah dengan pola *Aedes sp* dan memprediksi manifestasi klinis DBD di daerah berbasis serotipe virus dengue. Proporsi populasi *Ae. aegypti* yang lebih tinggi di daerah endemis Sidomulyo berpotensi KLB dibanding di Tanjung Jaya. Penduduk di daerah endemis dengan potensi KLB perlu mendapat edukasi agar mereka lebih siap dan bisa meng-antisipasi KLB di daerah tempat tinggal mereka.

SIMPULAN

Serotipe virus dengue pada nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* pada daerah endemis dan sporadis DBD di Kota Bengkulu adalah DENV-3. Populasi *Ae. aegypti* lebih banyak pada daerah endemis DBD (61%) sedangkan populasi *Ae. albopictus* lebih banyak di daerah sporadis DBD (73%). Dinas Kesehatan Kota Bengkulu dapat mengoptimalkan program pencegahan DBD melalui edukasi lingkungan perumahan sehat, pemberantasan sarang nyamuk, 3M plus dan segera mengaktifkan kader juru pemantau jentik di daerah endemis DBD berdasarkan pola populasi nyamuk *Ae. aegypti* dan mengandung DENV-3.

PUSTAKA

1. WHO. *Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020*. World Health Organization, 2012.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446): 504–507.
3. Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1988;12(1): 1–39.
4. Sivan A, Shriram AN, Sugunan AP, Anwesh M, Muruganandam N, Kartik C, et al. Natural transmission of dengue virus serotype 3 by *Aedes albopictus* (Skuse) during an outbreak in Havelock Island: Entomological characteristics. *Acta tropica*. 2016;156: 122–129.
5. Paupy C, Ollomo B, Kamgang B, Moutailler S, Rousset D, Demanou M, et al. Comparative Role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the Emergence of Dengue and Chikungunya in Central Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2010;10(3): 259–266.
6. Kemenkes. *INFODATIN (Situasi Demam Berdarah Dengue di Indonesia)*. Kementerian Kesehatan RI, 2016.
7. Wakano F, Lazuardi L, Arguni E, Kusnanto H. Pola sebaran tingkat infeksi bersama serotipe virus dengue di wilayah kajian RT-PCR Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Yogyakarta: analisis data 2013-2015. *Berita Kedokteran Masyarakat*. 2016;32(11): 401–408.
8. Kusriastuti. Epidemiologi Penyakit Demam Berdarah Dengue dan Kebijakan Penanggulangannya di Indonesia. *Simposium Dengue Control Up Date*. 2005;
9. Ritchie SA, N Hanna J, Hills SL, Piispanen JP, McBride H, John W, Pyke A, L Spark R. *Dengue control in north Queensland, Australia: case recognition and selective indoor residual spraying*. WHO Regional Office for South-East Asia, 2002.
10. Lardo S, Utami Y, Yohan B, Tarigan SM, Santoso WD, Nainggolan L, et al. Concurrent infections of dengue viruses serotype 2 and 3 in patient with severe dengue from Jakarta, Indonesia. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2016;9(2): 134–140.
11. Loroño-Pino MA, Cropp CB, Farfán JA, Vorndam AV, Rodríguez-Angulo EM, Rosado-Paredes EP, et al. Common occurrence of concurrent infections

- by multiple dengue virus serotypes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;61(5): 725–730.
12. Laille M, Deubel V, Sainte-Marie FF. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction. *Journal of medical virology*. 1991;34(1): 51–54.
 13. Mardihusodo SJ. Microplate Assay Analysis of Potential for Organophosphate Insectisida Resistance In *Aedes aegypti* In The Yogyakarta Municipality Indonesia. *Berkala ilmu kedokteran*. 1995;27: 71–79.
 14. Suroso. Dengue Haemorrhagic Fever in Indonesia: Epidemiological Trend and Development of Control Policy. *Dengue bulletin*. 1996;20: 35–40.
 15. Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*. 2004;589(1): 1.
 16. Qiagen. *RNeasy® Mini Handbook*. 2010.
 17. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3): 545–551.
 18. Qiagen. *QIAGEN One Step RT-PCR Handbook*. 2012.
 19. Qiagen. *HotStarTaq® PCR Handbook*. 2010.
 20. Kemenkes. *Pencegahan dan Pemberantasan Demam Berdarah Dengue di Indonesia*. Kementerian Kesehatan RI, 2005.
 21. Ito M, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Yuwono D, Rimal HS, et al. Molecular and virological analyses of dengue virus responsible for dengue outbreak in East Timor in 2005. *Japanese journal of infectious diseases*. 2010;63(3): 181–184.
 22. Satoto TBT, Umniyati SR, Astuti FD, Wijayanti N, Gavotte L, Devaux C, et al. Assessment of vertical dengue virus transmission in *Aedes aegypti* and serotype prevalence in Bantul, Indonesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4: S563–S568.
 23. Kukreti H, Mittal V, Chaudhary A, Rautela RS, Kumar M, Chauhan S, et al. Continued Persistence of a Single Genotype of Dengue Virus Type-3 (DENV-3) in Delhi, India Since its Re-emergence Over the Last Decade. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2010;43(1): 53–61.
 24. Araújo FM de C, de Carvalho Araújo FM, Nogueira RMR, de Araújo JMG, Ramalho ILC, de Sá Roriz MLF, et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101(8): 925–928.
 25. Urdaneta L, Herrera F, Pernaete M, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Barrios R, Rivero J, Comach G, Jiménez M, Salcedo M. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2005;5(2): 177–184.