



Kajian aspek keamanan nyamuk *Aedes aegypti* Linnaeus ber-*Wolbachia* di Yogyakarta, Indonesia

Assessing the safety of *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* Linnaeus mosquitoes in Yogyakarta, Indonesia

Utari Saraswati¹, Endah Supriyati¹, Ayu Rahayu^{1,2}, Anwar Rovik¹, Irianti Kurniasari^{1,3},
Rio Hermantara^{1,4}, Dian Aruni Kumalawati^{1,5}, Edwin Widyanto Daniwijaya^{1,2},
Iva Fitriana¹, Nida Budiwati Pramuko¹, Citra Indriani^{1,6},
Dwi Satria Wardana¹, Warsito Tantowijoyo¹, Riris Andono Ahmad^{1,6},
Adi Utarini^{1,7}, Eggi Arguni^{1,8*}

¹Pusat Kedokteran Tropis, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada. World Mosquito Program (WMP) Yogyakarta
Jalan Teknik Utara, Berek, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Keperawatan dan Kesehatan Masyarakat, Universitas Gadjah Mada, Jalan Farmako Utara, Sendowo, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia

³Departemen Bioteknologi, Politeknik Pembangunan Pertanian Malang
Jalan Dr. Cipto 144, Malang, Jawa Timur 65215, Indonesia

⁴Fakultas Biomedicine, Indonesia International Institute of Life Sciences
Jalan Pulomas Barat No.Kav. 88, Kayu Putih, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13210, Indonesia

⁵Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga
Jalan Laksda Adisucipto, Caturtunggal, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia

⁶Departemen Biostatistik, Epidemiologi, dan Kesehatan Populasi, Fakultas Kedokteran, Keperawatan dan Kesehatan Masyarakat, Universitas Gadjah Mada

Jalan Farmako Utara, Sendowo, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia

⁷Departemen Kebijakan dan Manajemen Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Keperawatan dan Kesehatan Masyarakat, Universitas Gadjah Mada

Jalan Farmako Utara, Sendowo, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia

⁸Departemen ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran, Keperawatan dan Kesehatan Masyarakat, Universitas Gadjah Mada

Jalan Farmako Utara, Sendowo, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia

(diterima Maret 2023, disetujui Juni 2023)

ABSTRAK

Upaya pengendalian vektor memerlukan alternatif baru yang berkelanjutan dan lebih ramah lingkungan. Aplikasi teknologi *Wolbachia* pada nyamuk *Aedes aegypti* Linnaeus telah terbukti efektif untuk mengendalikan dengue di Kota Yogyakarta. Namun, masih terdapat kekhawatiran masyarakat dan pemangku kepentingan terhadap aplikasi teknologi ini, salah satunya terhadap aspek keamanan, baik mengenai transmisi *Wolbachia* ke spesies lain, maupun kemungkinan manusia akan tertular *Wolbachia*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah terjadi transmisi horizontal *Wolbachia* dari nyamuk *A. aegypti* yang dilepaskan ke nyamuk spesies lainnya, dan apakah warga yang tinggal di wilayah pelepasan dapat terinfeksi oleh *Wolbachia*. Penelitian dilakukan di Dusun Nogotirto dan Dusun Kronggahan (Kabupaten Sleman), serta di Dusun Jomblangan dan Dusun Singosaren (Kabupaten Bantul), Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta. Skrining qPCR dengan menggunakan target gen

*Penulis korespondensi: Eggi Arguni. Pusat Kedokteran Tropis, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada. World Mosquito Program (WMP) Yogyakarta, Jalan Teknik Utara, Berek, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia, Tel (0274) 547147. Fax: (0274) 547147, Email: eggiarguni@ugm.ac.id

WD0513 dilakukan terhadap 922 nyamuk *Culex quinquefasciatus* Say dan 331 nyamuk *A. albopictus* (Skuse). Pemeriksaan ELISA dilakukan pada 190 pasang sampel plasma darah manusia, yaitu sampel sebelum frekuensi *Wolbachia established* (masih <80%) dan sampel setelah *established* ($\geq 80\%$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada bukti transmisi *Wolbachia* dari *A. aegypti* ke spesies nyamuk lain yang hidup berdampingan di habitat yang sama dan *Wolbachia* tidak menginfeksi manusia. Studi ini menguatkan bukti keamanan teknologi *A. aegypti* ber-*Wolbachia* sebagai alternatif pengendalian transmisi virus dengue.

Kata kunci: *Aedes aegypti*, aspek keamanan, dengue, Indonesia, *Wolbachia*

ABSTRACT

Dengue prevention efforts are limited to the control strategies of its vector and the management of breeding sites. New alternatives for dengue vector control that are sustainable and more environmentally friendly are needed to complement the government's current efforts. Research on *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* Linnaeus mosquitoes as an alternative biocontrol strategy has been performed in Yogyakarta City. However, one of the concerns of the community members and stakeholders about this technology is the safety aspect regarding the transmission of *Wolbachia* to other species and the possibility that humans will contract *Wolbachia*. This study aimed to address these concerns, namely to find out whether horizontal transmission of *Wolbachia* occurred from *A. aegypti* that were released to other species and whether residents living in the released areas were infected with *Wolbachia*. The research was conducted in Dusun Nogotirto and Dusun Kronggahan (Sleman Regency), as well as in Dusun Jomblangan and Dusun Singosaren (Bantul Regency), Yogyakarta Special Province. *Wolbachia* qPCR screening using the target gene WD0513 was performed on 922 *Culex quinquefasciatus* Say and 331 *Aedes albopictus* (Skuse). ELISA test was carried out on 190 pairs of plasma samples, namely the sample before the *Wolbachia* frequency was established (still <80%) and the sample after it was established ($\geq 80\%$). The results showed no evidence of *Wolbachia* transfer from *Wolbachia*-infected *A. aegypti* to other mosquito species coexisting in the same habitat or to humans. This study corroborates the safety evidence of *Wolbachia*-infected *A. aegypti* technology as an alternative to control dengue virus transmission.

Key words: *Aedes aegypti*, dengue, Indonesia, safety, *Wolbachia*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki kasus dengue tertinggi di Asia (Tsheten et al. 2021). Sejak ditemukan pada 1968, kejadian demam berdarah dengue (DBD) dilaporkan terus meningkat dalam beberapa dekade terakhir. Misalnya, pada tahun 1968, kejadian DBD sebanyak 0,05 per 100.000 penduduk menjadi 35–40 per 100.000 penduduk pada tahun 2013 (Karyanti et al. 2014; Harapan et al. 2019). Data terbaru sampai minggu ke-36 dari Januari 2022 menunjukkan angka kesakitan atau *incidence rate* (IR) kejadian DBD di dalam negeri tercatat sebesar 31,38 per 100.000 penduduk, dengan tingkat kematian atau *case fatality rate* (CFR) sebesar 0,93% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia 2022). Setengah dari populasi dunia tinggal di daerah yang memiliki lingkungan yang sesuai untuk terjadinya transmisi dengue, baik di

wilayah tropis dan di sebagian wilayah sub tropis (Bhatt et al. 2013).

Upaya pencegahan infeksi dengue masih terbatas pada strategi pengendalian vektor (Bhatt et al. 2013; Lambrechts et al. 2015; CDC 2021). Pengendalian vektor utama untuk infeksi dengue adalah dengan pemberantasan sarang nyamuk dan aplikasi insektisida untuk mengurangi populasi vektor (Ritchie et al. 2011; Gan et al. 2021). Namun, pengendalian vektor yang selama ini dilakukan belum cukup efektif untuk menekan transmisi infeksi dengue (Rather et al. 2017; Overgaard et al. 2018). Hal ini mendorong adanya pengembangan strategi baru untuk mengendalikan transmisi virus dengue, salah satunya dengan memanfaatkan bakteri endosimbiotik *Wolbachia*.

Wolbachia pertama kali ditemukan di jaringan reproduksi nyamuk *Culex pipiens* Linnaeus (Oliveira et al. 2015). Bakteri ini secara alami ditemukan dalam 66% spesies serangga (Zhou &

Li 2016) dan juga pada arthropoda lain, seperti tungau, laba-laba, kalajengking, dan isopoda, serta nematoda filaria (Werren et al. 2008). *Wolbachia* dapat menginduksi berbagai kelainan reproduksi, seperti ketidakcocokan sitoplasma (*cytoplasmic incompatibility*, CI), distorsi rasio jenis kelamin, partenogenesis, dan feminisasi genetika pada inang (Kraaijeveld et al. 2011; Chen et al. 2020), serta mengurangi masa hidup serangga inangnya (Nguyen et al. 2015; Ogunlade et al. 2020). Para ahli di Australia berhasil menginfeksi embrio *Aedes aegypti* Linnaeus dengan *Wolbachia* yang berasal dari lalat buah *Drosophila melanogaster* Meigen, yaitu *strain wMelPop* (McMeniman et al. 2009) dan *wMel* (Walker et al. 2011). *Strain* yang ditransfer tersebut sangat stabil dalam sel serangga dan diwariskan secara maternal dengan angka pewarisan yang sangat tinggi, terutama jika transfer dilakukan di dalam atau di antara spesies yang berkerabat dekat dalam satu famili atau genus (McMeniman et al. 2008). Selain itu, ditemukan bahwa *strain Wolbachia* tertentu dapat mengurangi lama hidup nyamuk dewasa, mempengaruhi reproduksi nyamuk, dan menghambat perkembangbiakan virus dengue dalam tubuh inangnya (Iturbe-Ormaetxe et al. 2011; Inácio da Silva et al. 2021). Hal ini menjadikan nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* sebagai pendekatan pengendalian infeksi dengue yang menjanjikan.

Uji coba pelepasan nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* telah dilakukan pertama kali oleh *World Mosquito Program* (WMP), suatu konsorsium penelitian beberapa negara yang bertujuan menguji teknologi *Wolbachia* sebagai metode pelengkap untuk pengendalian infeksi dengue, pada tahun 2011 di Cairns, Australia (World Mosquito Program 2022). WMP Yogyakarta memulai penelitian serupa sebagai proyek pelepasan skala terbatas pada tahun 2014 di dua dusun di Kabupaten Sleman dan tahun 2015 di dua dusun di Kabupaten Bantul, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta.

Sebagai suatu pendekatan baru, teknologi ini mengundang kekhawatiran masyarakat dan pemangku kepentingan, khususnya terkait aspek keamanan. Apakah *Wolbachia* yang berada dalam nyamuk *A. aegypti* yang dilepaskan dapat mengganggu lingkungan biologis di sekitarnya?

Apakah *Wolbachia* ini dapat ditularkan ke manusia saat nyamuk menggigit? Serangkaian kajian telah dilakukan untuk membuktikan aspek keamanan penerapan teknologi berbasis *Wolbachia* ini terhadap manusia dan lingkungan. Penelitian tersebut melaporkan bahwa *Wolbachia* tidak dapat berpindah ke lingkungan biotik dan abiotik di sekitarnya, dan *Wolbachia* tidak dapat menginfeksi manusia (Popovici et al. 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji aspek keamanan pelepasan nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* di Yogyakarta, dengan menguji potensi transmisi horizontal *Wolbachia* antar spesies nyamuk dan potensi infeksi/transmisi *Wolbachia* ke manusia dengan mendeteksi respons kekebalan tubuh spesifik terhadap *Wolbachia* di dalam sampel darah penduduk yang tinggal di wilayah pelepasan nyamuk.

BAHAN DAN METODE

Wilayah penelitian

Penelitian ini dilakukan di Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta yang terletak di selatan-tengah Pulau Jawa. Provinsi ini terbagi atas empat kabupaten, yaitu Kabupaten Sleman, Bantul, Gunung Kidul, Kulon Progo, dan satu Kota Yogyakarta. Pelepasan nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia strain wMel* dilakukan di Dusun Nogotirto dan Dusun Kronggahan yang berada di Kabupaten Sleman, serta di Dusun Jomblangan dan Dusun Singosaren yang terletak di Kabupaten Bantul, dengan luas daerah pelepasan adalah 0,26 km² dan 0,61 km² serta 0,29 km² dan 0,18 km², secara berurutan (Gambar 1). Keempat dusun tersebut termasuk dalam kategori urban dan semi urban, dengan populasi penduduk rata-rata 2.200 orang per dusun dan rata-rata jumlah rumah 712 per dusun (Tantowijoyo et al. 2020).

Transmisi horizontal

Pelepasan nyamuk dewasa *A. aegypti* ber-*Wolbachia* di Kronggahan dan Nogotirto, Sleman dilakukan mulai Januari hingga Mei 2014, sedangkan pelepasan dengan metode telur nyamuk di Jomblangan dan Singosaren, Bantul dilakukan mulai November 2014 hingga Mei 2015 (Tantowijoyo et al. 2020). Pemantauan keberadaan

transmisi horizontal pada spesies nyamuk selain *A. aegypti* dilakukan dua kali dalam setahun, setiap enam bulan dalam periode pelepasan di Sleman dan Bantul, yaitu pada Oktober 2014, serta April dan November 2015 di wilayah Kronggahan dan Nogotirto, Sleman, sementara wilayah Jomblangan dan Singosaren, Bantul pada April dan November 2015, serta April 2016.

Nyamuk dewasa *Culex quinquefasciatus* Say dan *Aedes albopictus* (Skuse) ditangkap dengan menggunakan *BioGent (BG) Sentinel traps* (Biogents AG, Regensburg, Germany) (Gambar 2). Nyamuk dalam kantong perangkap BG-Trap dikumpulkan dan dikirim ke Insektarium WMP Yogyakarta untuk dilakukan identifikasi spesies. Kantong BG-Trap disimpan dalam *freezer* selama minimal satu jam untuk membunuh serangga yang terperangkap sebelum diidentifikasi. Sampel nyamuk dipisahkan dari jenis serangga lain yang ikut tertangkap di dalam kantong, kemudian diletakkan pada cawan petri dengan bantuan pinset.

Identifikasi spesies nyamuk dilakukan berdasarkan buku acuan identifikasi oleh Ehlers & Alsemgeest (2011), dengan menggunakan mikroskop stereo. Pengamatan ciri fisik untuk Genus *Aedes*, meliputi corak putih pada toraks, abdomen, kaki, keadaan antena (*pilose* atau *plumose*), kenampakan sayap, dan kenampakan *clypeus* pada *caput*. Nyamuk dewasa *A. albopictus* memiliki warna tubuh hitam pekat, dengan sisik putih tunggal pada bagian atas toraks, corak putih pipih seperti segitiga di sepanjang abdomen, dan *clypeus* yang tidak bersisik. Sementara *C. quinquefasciatus* memiliki warna tubuh coklat dengan sisik keemasan tanpa corak khusus di bagian tubuhnya, sayap dan antena berwarna gelap, serta abdomen dengan garis-garis lengkung berwarna putih pucat. Nyamuk *C. quinquefasciatus* dan *A. albopictus* yang telah diidentifikasi kemudian dikemas dalam tabung ulir berukuran 2 ml yang telah diberi *barcode* dan difiksasi menggunakan larutan alkohol 80%. Tabung berisi sampel nyamuk tersebut kemudian



Gambar 1. Peta wilayah penelitian.

Figure 1. Map of study area.



Gambar 2. BioGent (BG) Sentinel traps (Biogents AG, Regensburg, Germany).

Figure 2. BioGent (BG) Sentinel traps (Biogents AG, Regensburg, Germany).

dikirim ke Laboratorium Diagnostik WMP Yogyakarta untuk pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR).

DNA nyamuk diekstraksi menggunakan 100 μ l campuran *squash buffer* dan proteinase-K dalam *plate 96-well*, kemudian dihaluskan dengan menggunakan mesin *bead beater*. Pelet diendapkan dengan metode sentrifugasi pada 3.000 rpm selama 2 menit. *Crude DNA* diekstraksi dengan menggunakan *thermal cycler* Bio-Rad C1000 dengan tiga tahapan reaksi, yaitu 56 °C selama 5 menit, 96 °C selama 5 menit, dan dilanjutkan dengan 12 °C selama 5 menit. Sampel kemudian dianalisis dengan metode *quantitative PCR* (qPCR) menggunakan LightCycler 480 Roche *Probe Master* dan sepasang primer – probe spesifik TM513 untuk mendeteksi untuk gen WD0513 dari *Wolbachia*, dengan urutan nukleotida TM513F (5'-CAAATTGCTCTTGTCCTGTGG-3'), TM513R (5'-GGGTGTTAAGCAGAGTTACGG-3'), dan probe TM513 (5'-LC640-TGAAATGG AAAAATTGGCGAGGTGTAGG-Iowablack-3'). Campuran DNA dan reagen PCR dianalisis menggunakan perangkat lunak LightCycler® 480 SW 1.5.1. dalam mesin LightCycler 480 System-Roche. Kontrol positif dan negatif disertakan untuk setiap pemeriksaan. Reaksi qPCR dilakukan dengan kondisi sebagai berikut, proses pre-denaturasi pada suhu 95 °C selama 5 menit, berikutnya tahap amplifikasi sebanyak 45 siklus pada suhu 95 °C selama 10 detik, dilanjutkan dengan 60 °C selama 15 detik dan 72 °C selama 1 detik, serta diakhiri dengan tahap *cooling* sebanyak 1 siklus pada suhu 40 °C selama 10 detik (Yeap et al. 2014).

Pemeriksaan serologi anti *Wolbachia*

Pengambilan darah vena sebanyak 3 ml dilakukan pada 190 partisipan yang terdiri atas 100 partisipan di Dusun Jomblangan dan 90 partisipan di Dusun Singosaren. Pengambilan darah dilakukan sebanyak dua kali, yaitu pada Februari 2015 saat nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* baru dilepaskan dalam beberapa siklus dan frekuensinya belum mencapai 80%; dan pada bulan Desember 2015, yaitu setelah frekuensi *Wolbachia* dalam populasi *A. aegypti* sudah mencapai >80%. Dalam Tantowijoyo et al. (2020), frekuensi *Wolbachia* pada populasi nyamuk *A. aegypti* di area pelepasan Bantul mencapai stabil pada enam bulan (24 minggu) setelah pelepasan *A. aegypti* ber-*Wolbachia* berakhir dan persentase *Wolbachia* pada populasi nyamuk *A. aegypti* mencapai rata-rata lebih dari 80% dalam tiga bulan berturut-turut. Persetujuan tertulis didapatkan dari setiap responden sebelum pengambilan darah dilakukan. Pengambilan darah untuk pemeriksaan serologi dilakukan oleh perawat peneliti yang telah dilatih terkait dengan prosedur penelitian dengan cara aseptik dan menggunakan jarum sekali pakai. Darah yang diambil disimpan dalam tabung EDTA yang diberi label kode unik partisipan penelitian dan dikirim ke Laboratorium Diagnostik Yayasan Tahija WMP di Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada. Dalam waktu kurang dari 24 jam, sampel darah kemudian disentrifugasi pada 1.800 rpm, 4 °C selama 15 menit, diberi label dan disimpan pada suhu -80 °C sampai pemeriksaan serologis dilakukan.

Keberadaan antibodi *Wolbachia* dalam sampel plasma responden ditentukan dengan metode ELISA dengan modifikasi (Garcia et al. 2006). Antigen yang digunakan diekstraksi dari *cell line A. aegypti* ber-*Wolbachia* (Aag2-wMel) dan *cell line A. aegypti* tanpa *Wolbachia* (Aag2). Protein tersebut digunakan untuk melapisi sumuran untuk proses ELISA. Pada uji ELISA dilakukan dua parameter dalam satu *plate*, sebagian *plate* sumuran dilapisi Aag2-Wmel dan sebagian *plate* sumuran lainnya dilapisi Aag2. Masing-masing sampel plasma diujikan dalam dua parameter tersebut dan diperiksa dalam *plate* yang sama. Protein hasil isolasi dari *cell line* Aag2 dan Aag2-wMel diencerkan pada konsentrasi 50 μ g/ml menggunakan *buffer carbonate* dan digunakan

sebagai antigen. *Plate* ELISA *flat-bottom* dilapisi dengan 100 µl antigen dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4 °C. *Plate* kemudian dicuci sebanyak tiga kali menggunakan 250 µl PBST. Selanjutnya, dilakukan *blocking plate* ELISA menggunakan larutan 5% BSA dalam PBST dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. *Plate* kemudian dicuci sebanyak tiga kali menggunakan 250 µl PBST lalu diinkubasi dengan 100 µl plasma manusia yang diencerkan sebanyak 200 kali dalam PBST. *Plate* diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam lalu dicuci sebanyak tiga kali menggunakan 250 µl PBST. Sebanyak 100 µl antibodi sekunder ditambahkan ke setiap sumuran lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. *Plate* kemudian dicuci sebanyak tiga kali menggunakan 250 µl PBST lalu ditambahkan 100 µl ELISA *detection substrate* (TMB) dan diinkubasi pada 37 °C terlindung dari cahaya selama 15 menit. Selanjutnya, sebanyak 50 µl 1N HCl ditambahkan ke masing-masing sumuran untuk menghentikan reaksi. Pembacaan absorbansi dilakukan pada gelombang 450 nm menggunakan iMark™ *Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad).

Anti-*Wolbachia* ditunjukkan dengan nilai *Anti-Wolbachia surface protein* (Anti-WSP) *Signal* (AS), yaitu nilai sinyal plasma setelah *Wolbachia* menetap (AR) dikurangi sinyal plasma sebelum *Wolbachia* menetap (BR). Standar deviasi dihitung dari sinyal plasma sebelum *Wolbachia* menetap, kemudian dikalikan tiga (STD3). Hasil positif ditunjukkan dengan nilai sinyal antibodi *Wolbachia* lebih besar dari nilai STD3.

HASIL

Transmisi horizontal

Jumlah sampel yang diperoleh dari seluruh area pengambilan sampel sebanyak 1.253 nyamuk, yang terdiri atas 922 nyamuk *C. quinquefasciatus*

dan 331 *A. albopictus*. Keberadaan bakteri *Wolbachia* (wMel) di semua sampel uji tidak terdeteksi dari hasil pemeriksaan PCR (Tabel 1). Hal ini menunjukkan tidak terjadi transmisi horizontal dari *Wolbachia* pada *A. aegypti* ke spesies nyamuk lain.

Serologi *Wolbachia*

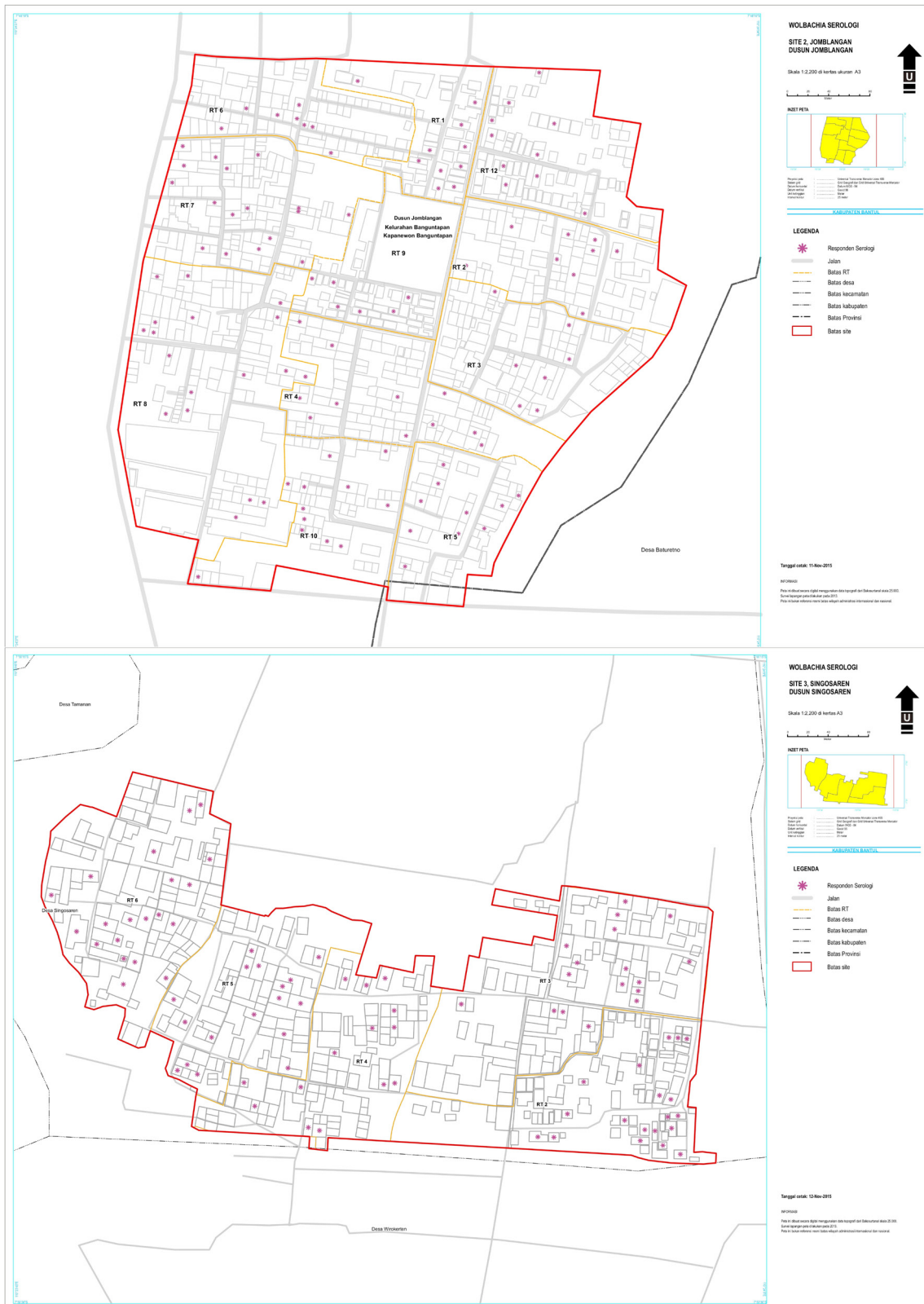
Responden untuk pemeriksaan serologi *Wolbachia* tersebar secara merata di Dusun Jomblangan dan Singosaren, Bantul, sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3. Rerata sinyal plasma sebelum *Wolbachia* menetap (BR) di Dusun Jomblangan adalah 0,113675 dan 0,134828 di Dusun Singosaren, dengan standar deviasi sebesar 0,211652. Sementara, rerata sinyal plasma setelah *Wolbachia* menetap (AR) di Dusun Jomblangan adalah 0,104000 dan 0,085689 di Dusun Singosaren. Rerata rentang sinyal anti-WSP (nilai AR – nilai BR) adalah –0,009675 untuk Dusun Jomblangan dan –0,049139 untuk Dusun Singosaren. Gambar 4 menunjukkan hasil uji serologi menggunakan ELISA, dengan hasil negatif anti-WSP (nilai sinyal mendekati 0) untuk seluruh sampel plasma dari kedua area uji.

PEMBAHASAN

Berdasarkan serangkaian uji transmisi horizontal dan serologi di area pelepasan nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* di wilayah Sleman dan Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta, tidak ada bukti transmisi bakteri *Wolbachia* dari *A. aegypti* ber-*Wolbachia* ke spesies nyamuk lain yang hidup berdampingan di habitat yang sama ataupun ke manusia yang tinggal di area tersebut. Pada penelitian ini, *Wolbachia* dianalisis menggunakan sepasang primer dan *probe* spesifik TM513 yang mendeteksi keberadaan gen WD0513 di *Wolbachia* (wMel). Gen WD0513 merupakan

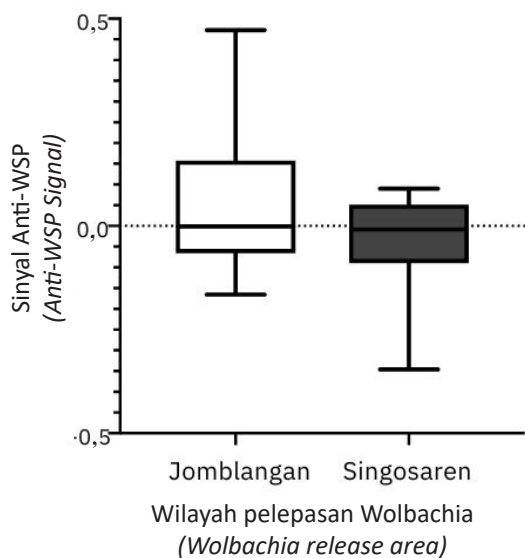
Tabel 1. Total sampel uji yang terinfeksi bakteri *Wolbachia* (wMel) dari keseluruhan nyamuk yang dikoleksi
Table 1. Number of *Wolbachia* (wMel)-infected mosquito per total amount of collected mosquitoes

Spesies nyamuk (<i>Mosquito species</i>)	Sleman (2014–2015)		Bantul (2015–2016)	
	Dusun Nogotirto	Dusun Kronggahan	Dusun Jomblangan	Dusun Singosaren
<i>Culex quinquefasciatus</i>	0/222	0/176	0/300	0/224
<i>Aedes albopictus</i>	0/111	0/59	0/83	0/78



Gambar 3. A: peta area Dusun Jomblangan; B: peta area Dusun Singosaren–Lokasi rumah responden uji serologi *Wolbachia* ditunjukkan dengan titik berwarna merah.

Figure 3. A: map of Jomblangan Site; B: map of Singosaren Site–The location of the *Wolbachia* serology respondent’s house is indicated by a red dot.



Gambar 4. Nilai serologi sinyal Anti-WSP dari Dusun Jomblangan dan Dusun Singosaren.

Figure 4. Anti-WSP signal at Jomblangan and Singosaren Site.

salah satu dari delapan gen *Wolbachia* yang disebut region *Octomom*, yang diketahui bertanggung jawab terhadap virulensi *Wolbachia* (Chrostek & Teixeira 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Yeap et al. (2014) menunjukkan bahwa gen WD0513 ditemukan dalam varian *wMel*, namun tidak terdeteksi pada varian *wMelPop*.

Tidak ada spesies nyamuk lain (*C. quinquefasciatus* dan *A. albopictus*) yang ditemukan positif ber-*Wolbachia* di wilayah pelepasan berdasarkan uji transmisi horizontal. Hasil ini menunjukkan bahwa *Wolbachia* yang diinfeksi pada nyamuk *A. aegypti* tidak dapat berpindah secara horizontal pada spesies nyamuk lain. Bukti adanya transmisi horizontal dapat juga dilihat dari filogeni molekuler dan adanya strain *Wolbachia* yang serupa atau identik pada dua spesies inang yang tidak berkerabat (Haine et al. 2005; White et al. 2017). *Wolbachia* tidak menular pada spesies lain dan hanya diturunkan dari generasi ke generasi secara vertikal melalui telur (Werren et al. 2008).

Baik spesies yang secara natural terinfeksi, maupun yang tidak terinfeksi *Wolbachia* dapat hidup berdampingan dalam habitat yang sama atau memangsa satu sama lain tanpa menjadi terinfeksi. Penelitian sebelumnya oleh Popovici et al. (2010) menggunakan dua spesies laba-laba yang berbeda (*Menemerus bivittatus* Dufour dan

Pholcus phalangioides Fussli) sebagai predator nyamuk, menunjukkan bahwa tidak ditemukan laba-laba predator yang positif *Wolbachia* pada akhir penelitian. Selain itu, tidak ada perpindahan *Wolbachia* secara alami pada *A. aegypti* yang hidup secara simpatrik dengan *A. albopictus* dan *Aedes notoscriptus* (Skuse) ber-*Wolbachia* (Sinkins et al. 1995; Kittayapong et al. 2000). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa transmisi horizontal dari *Wolbachia* tidak terjadi secara mudah dan sering. *Wolbachia* juga tidak mungkin hidup di lingkungan di luar tubuh nyamuk yang menjadi inangnya karena mereka tidak dapat bertahan hidup di luar sitoplasma sel inang. Ketika nyamuk mati, *Wolbachia* di dalam tubuhnya juga ikut mengalami degradasi (Popovici et al. 2010).

Hasil uji serologi menunjukkan bahwa warga yang tinggal di wilayah pelepasan tidak membentuk antibodi yang spesifik terhadap WSP meskipun telah terpapar nyamuk yang terinfeksi *Wolbachia* selama sekitar 12 bulan. Hal ini konsisten dengan hasil penelitian serupa pada warga Tri Nguyen Island (TNI), Vietnam, yang juga tidak membentuk respons antibodi terhadap WSP setelah pelepasan *A. aegypti* ber-*Wolbachia* di wilayah tinggal mereka (Lee et al. 2022). Penelitian serupa juga dilakukan pada *volunteer blood feeder* (orang yang memberi makan nyamuk secara langsung dengan cara membiarkan tangannya untuk dihisap nyamuk ber-*Wolbachia*) (Popovici et al., 2010; WMP Yogyakarta, penelitian tidak terpublikasi). Di dalam tubuh nyamuk, *Wolbachia* tersebar di seluruh jaringan, meliputi ovarium, *midgut*, pembuluh Malpighi, dan kelenjar ludah (Fraser et al. 2020). *Wolbachia* terdapat pada kelenjar ludah, tetapi tidak ditemukan dalam air liur. Bakteri ini juga memiliki ukuran yang lebih besar dari diameter saluran air liur nyamuk (Moreira et al. 2009). Hal ini menyebabkan *Wolbachia* tidak dapat masuk serta menginfeksi manusia melalui gigitan nyamuk, akibatnya tubuh tidak membentuk antibodi yang dapat dideteksi.

Upaya pencegahan infeksi dengue selama ini terbatas hanya mengandalkan upaya pengendalian vektor (Bowman et al. 2016; Reiner et al. 2016). Sejarah membuktikan bahwa penekanan populasi nyamuk *A. aegypti* relatif tidak efektif, khususnya karena tingginya kebiasaan antropofilik dan tingginya resistensi nyamuk terhadap insektisida

yang digunakan di masyarakat (Deming et al. 2016). Alternatif pengendalian dengue menggunakan teknologi nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* merupakan teknologi yang menjanjikan dan hingga saat ini paling maju dalam uji coba di beberapa negara (review dapat dilihat pada laman <https://www.worldmosquitoprogram.org/>). Uji coba ini tidak lepas dari aspek kehati-hatian terhadap lingkungan biologis dan non-biologis, terutama aspek keamanannya terhadap manusia. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menguji keamanan teknologi ini terhadap manusia, hewan, dan lingkungan (review dalam Popovici et al. 2010). *Wolbachia* secara alami menginfeksi sebagian besar spesies serangga, namun hanya 28% spesies nyamuk mengandung bakteri ini, termasuk *C quinquefasciatus* dan *A. albopictus*, tidak pada *A. aegypti* (Haine et al. 2005; Kumalawati et al. 2020). Upaya untuk mentransfer *Wolbachia* ke dalam tubuh nyamuk menggunakan mikroinjeksi membutuhkan uji coba bertahun-tahun dengan tingkat kesulitan yang tinggi. Saat ini, telah terdapat beberapa *strain Wolbachia* yang berhasil diinduksi ke dalam tubuh *A. aegypti* dan membentuk sistem infeksi yang secara stabil diwariskan pada keturunannya, yaitu wMel dan wMelPop-CLA dari *D melanogaster*, serta wAlbB dari *A. albopictus* (McMeniman et al. 2009; Walker et al. 2011; Amuzu et al. 2015).

Hasil penelitian ini menjawab kekhawatiran masyarakat tentang keamanan teknologi *Wolbachia* dalam dua aspek, yaitu penularan ke spesies lain dan penularan kepada manusia. Penilaian risiko tentang pelepasan *A. aegypti* ber-*Wolbachia* di Yogyakarta telah dilakukan pula dengan kesimpulan bahwa teknologi ini memiliki risiko yang sangat kecil (*negligible risk*) (Buchori et al. 2022). Teknologi ini telah dibuktikan dapat menurunkan infeksi dengue sebesar 77,1% dan mencegah hospitalisasi sebesar 83% di Kota Yogyakarta (Utarini et al. 2021) sehingga diharapkan dapat diimplementasikan juga di daerah lain di Indonesia. Walaupun demikian, konsekuensi jangka panjang teknologi ini terhadap manusia dan lingkungan tetap harus mendapat perhatian.

KESIMPULAN

Transmisi horizontal *Wolbachia* ke spesies nyamuk lain yang hidup berdampingan dengan *A. aegypti* ber-*Wolbachia* (wMel) dan transmisinya ke manusia tidak terbukti pada penelitian ini sehingga teknologi *Wolbachia* ini aman dan diharapkan dapat menjadi metode alternatif pengendalian dengue di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Yayasan Tahija atas dukungan dan pembiayaan dalam penelitian ini dan kepada seluruh tim WMP Yogyakarta serta seluruh warga di wilayah pelepasan yang telah mendukung penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amuzu HE, Simmons CP, McGraw EA. 2015. Effect of repeat human blood feeding on *Wolbachia* density and dengue virus infection in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. 8:246. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0853-y>.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 496:504–507. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12060>.
- Bowman LR, Donegan S, McCall PJ. 2016. Is dengue vector control deficient in effectiveness or evidence?: Systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 10:e0004551. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004551>.
- Buchori D, Mawan A, Nurhayati I, Aryati A, Kusnanto H, Hadi UK. 2022. Risk assessment on the release of *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* in Yogyakarta, Indonesia. *Insects*. 13:924. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13100924>.
- CDC. 2021. Dengue Vaccine | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <https://www.cdc.gov/dengue/vaccine/index.html>. [accessed 19 Januari 2023].
- Chen H, Zhang M, Hochstrasser M. 2020. The biochemistry of cytoplasmic incompatibility caused by endosymbiotic bacteria. *Genes*. 11:852. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11080852>.

- Chrostek E, Teixeira L. 2015. Mutualism breakdown by amplification of *Wolbachia* genes. *PLOS Biology*. 13:e1002065. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002065>.
- Deming R, Manrique-Saide P, Medina Barreiro A, Cardeña EUK, Che-Mendoza A, Jones B, Liebman K, Vizcaino L, Vazquez-Prokopec G, Lenhart A. 2016. Spatial variation of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* presents unique vector control challenges. *Parasites & Vectors*. 9:67. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1346-3>.
- Ehlers G, Aelsemgeest D. 2011. *Common Mosquitoes of North Queensland: Identification & Biology of Adult Mosquitoes*. Queensland: Mosquito Control Association of Australia Incorporated.
- Fraser JE, O'Donnell TB, Duyvestyn JM, O'Neill SL, Simmons CP, Flores HA. 2020. Novel phenotype of *Wolbachia* strain wPip in *Aedes aegypti* challenges assumptions on mechanisms of *Wolbachia*-mediated dengue virus inhibition. *PLOS Pathogens*. 16:e1008410. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008410>.
- Gan SJ, Leong YQ, Barhanuddin MFH bin, Wong ST, Wong SF, Mak JW, Ahmad RB. 2021. Dengue fever and insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes in Southeast Asia: A review. *Parasites & Vectors*. 14:315. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04785-4>.
- Garcia JL, Navarro IT, Vidotto O, Gennari SM, Machado RZ, Luz Pereira AB da, Sinhorini IL. 2006. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology*. 113:100–105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.12.011>.
- Haine ER, Pickup NJ, Cook JM. 2005. Horizontal transmission of *Wolbachia* in a *Drosophila* community. *Ecological Entomology* 30:464–472. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2005.00715.x>.
- Harapan H, Michie A, Yohan B, Shu P, Mudatsir M, Sasmono RT, Imrie A. 2019. Dengue viruses circulating in Indonesia: A systematic review and phylogenetic analysis of data from five decades. *Reviews in Medical Virology*. 29:e2037. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.2037>.
- Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*. 12:508–518. DOI: <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>.
- Inácio da Silva LM, Dezordi FZ, Paiva MHS, Wallau GL. 2021. Systematic review of *Wolbachia* symbiont detection in mosquitoes: An entangled topic about methodological power and true symbiosis. *Pathogens*. 10:39. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10010039>.
- Karyanti MR, Uiterwaal CSPM, Kusriastuti R, Hadinegoro SR, Rovers MM, Heesterbeek H, Hoes AW, Bruijning-Verhagen P. 2014. The changing incidence of dengue haemorrhagic fever in Indonesia: A 45-year registry-based analysis. *BMC Infectious Diseases*. 14:412. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-412>.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2022. Masuk Peralihan Musim, Kemenkes Minta Dinkes Waspadai Lonjakan DBD. Available at: <https://www.kemkes.go.id/article/view/22092300006/masuk-peralihan-musim-kemenkes-minta-dinkes-waspadai-lonjakan-dbd.html>. [access 19 Januari 2023].
- Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V, O'Neill SL. 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 37:340–345. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmedent/37.3.340>.
- Kraaijeveld K, Reumer BM, Mouton L, Kremer N, Vavre F, Alphen JJM van. 2011. Does a parthenogenesis-inducing *Wolbachia* induce vestigial cytoplasmic incompatibility? *Naturwissenschaften*. 98:175–180. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00114-010-0756-x>.
- Kumalawati DA, Supriyati E, Rachman MP, Oktriani R, Kurniasari I, Candrasari DS, Hidayati L, Handyaningsih AE, Probowati VC, Arianto B, Wardana DS, Pramuko NB, Utarini A, Tantowijoyo W, Arguni E. 2020. *Wolbachia* infection prevalence as common insects' endosymbiont in the rural area of Yogyakarta, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 21:5608-5614. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211216>.
- Lambrechts L, Ferguson NM, Harris E, Holmes EC, McGraw EA, O'Neill SL, Ooi EE, Ritchie SA, Ryan PA, Scott TW, Simmons CP, Weaver SC. 2015. Assessing the epidemiological effect of *Wolbachia* for dengue control. *The Lancet Infectious Diseases*. 15:862–866. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00091-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00091-2).
- Lee E, Hien Nguyen T, Yen Nguyen T, Nam Vu S, Duong Tran N, Trung Nghia L, Mai Vien Q, Dong Nguyen T, Kriiger Loterio R, Iturbe-Ormaetxe I, Flores HA, O'Neill SL, Anh Dang D, Simmons CP, Fraser JE. 2022. Transient introgression of *Wolbachia* into *Aedes aegypti*

- populations does not elicit an antibody response to *Wolbachia* surface protein in community members. *Pathogens*. 11:535. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11050535>.
- McMeniman CJ, Lane AM, Fong AWC, Voronin DA, Iturbe-Ormaetxe I, Yamada R, McGraw EA, O'Neill SL. 2008. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:6963–6969. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01038-08>.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang Y-F, O'Neill SL. 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* Infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*. 323:141–144. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1165326>.
- Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, Bhatt S, et al. 2014. Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history. *Trends in Microbiology*. 22:138–146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.011>.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 139:1268–1278. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>.
- Nguyen TH, Nguyen HL, Nguyen TY, Vu SN, Tran ND, Le TN, Vien QM, Bui TC, Le HT, Kutcher S, Hurst TP, Duong TT, Jeffery JA, Darbro JM, Kay BH, Iturbe-Ormaetxe I, Popovici J, Montgomery BL, Turley AP, Zigaretman F, Cook H, Cook PE, Johnson PH, Ryan PA, Paton CJ, Ritchie SA, Simmons CP, O'Neill SL, Hoffmann AA. 2015. Field evaluation of the establishment potential of wMelPop *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasit Vectors*. 8:563. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1174-x>.
- Ogunlade ST, Adekunle AI, Meehan MT, Rojas DP, McBryde ES. 2020. Modeling the potential of wAu-*Wolbachia* strain invasion in mosquitoes to control Aedes-borne arboviral infections. *Scientific Reports*. 10:16812. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73819-1>.
- Oliveira CD de, Gonçalves DS, Baton LA, Shimabukuro PHF, Carvalho FD, Moreira LA. 2015. Broader prevalence of *Wolbachia* in insects including potential human disease vectors. *Bulletin of Entomological Research*. 105:305–315. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007485315000085>.
- Overgaard HJ, Pientong C, Thaewngiew K, Bangs MJ, Ekalaksananan T, Aromseree S, Phanitchat T, Phanthanawiboon S, Fustec B, Corbel V, Cerqueira D, Alexander N. 2018. Assessing dengue transmission risk and a vector control intervention using entomological and immunological indices in Thailand: Study protocol for a cluster-randomized controlled trial. *Trials*. 19:122. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13063-018-2490-1>.
- Popovici J, Moreira LA, Poinsignon A, Iturbe-Ormaetxe I, McNaughton D, O'Neill SL. 2010. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 105:957–964. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800002>.
- Rather IA, Parray HA, Lone JB, Paek WK, Lim J, Bajpai VK, Park Y-H. 2017. Prevention and control strategies to counter dengue virus infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7:336. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00336>.
- Reiner RC, Achee N, Barrera R, Burkot TR, Chadee DD, Devine GJ, Endy T, Gubler D, Hombach J, Kleinschmidt I, Lenhart A, Lindsay SW, Longini I, Mondy M, Morrison AC, Perkins TA, Vazquez-Prokopec G, Reiter P, Ritchie SA, Smith DL, Strickman D, Scott TW. 2016. Quantifying the epidemiological impact of vector control on dengue. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 10:e0004588. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004588>.
- Ritchie SA, Johnson PH, Freeman AJ, Odell RG, Graham N, DeJong PA, Standfield GW, Sale RW, O'Neill SL. 2011. A secure semi-field system for the study of *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5:e988. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000988>.
- Sinkins SP, Braig HR, Oneill SL. 1995. *Wolbachia pipientis*: Bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus*. *Experimental Parasitology*. 81:284–291. DOI: <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1119>.
- Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, Hay SI, Bedi N, Bensenor IM, Castañeda-Orjuela CA, Chuang TW, Gibney KB, Memish ZA, Rafay A, Ukwaja KN, Yonemoto N, Murray CJL. 2016. The global burden of dengue: An analysis from the

- global burden of disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*. 16:712–723. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00026-8).
- Tantowijoyo W, Andari B, Arguni E, Budiwati N, Nurhayati I, Fitriana I, Ernesia I, Daniwijaya EW, Supriyati E, YUSDIANA DH, Victorius M, Wardana DS, Ardiansyah H, Ahmad RA, Ryan PA, Simmons CP, Hoffmann AA, Rancès E, Turley AP, Johnson P, Utarini A, O'Neill SL. 2020. Stable establishment of wMel *Wolbachia* in *Aedes aegypti* populations in Yogyakarta, Indonesia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 14:e0008157. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008157>.
- Tsheten T, Gray DJ, Clements ACA, Wangdi K. 2021. Epidemiology and challenges of dengue surveillance in the WHO South-East Asia Region. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 115:583–599. DOI: <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa158>.
- Utarini A, Indriani C, Ahmad RA, Tantowijoyo W, Arguni E, Ansari MR, Supriyati E, Wardana DS, Meitika Y, Ernesia I, Nurhayati I, Prabowo E, Andari B, Green BR, Hodgson L, Cutcher Z, Rancès E, Ryan PA, O'Neill SL, Dufault SM, Tanamas SK, Jewell NP, Anders KL, Simmons CP; AWED Study Group. 2021. Efficacy of *Wolbachia*-infected mosquito deployments for the control of dengue. *New England Journal of Medicine*. 384:2177–2186. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2030243>.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA. 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*. 476:450–453. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10355>.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*. 6:741–751. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>.
- White PM, Pietri JE, Debec A, Russell S, Patel B, Sullivan W. 2017. Mechanisms of horizontal cell-to-cell transfer of *Wolbachia* spp. in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*. 83:e03425-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03425-16>.
- World Mosquito Program. 2022. Indonesia | *World Mosquito Program*. Available at: <https://www.worldmosquitoprogram.org/en/global-progress/indonesia>. [accessed 11 Januari 2023].
- Yeap H, Axford JK, Popovici J, Endersby NM, Iturbe-Ormaetxe I, Ritchie SA, Hoffmann AA. 2014. Assessing quality of life-shortening *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes in the field based on capture rates and morphometric assessments. *Parasites & Vectors*. 7:58. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-58>.
- Zhou XF, Li ZX. 2016. Establishment of the cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* strain wMel in an important agricultural pest insect. *Scientific Reports*. 6:39200. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep39200>.