

**Identifikasi Molekuler *Wolbachia* sp. Pada Serangga
Menggunakan Primer Gen *wsp* (*Wolbachia Surface Protein*)**

SKRIPSI



**Harold William Bonar Manihuruk
31170117**

**Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana
Yogyakarta
2023**

Identifikasi Molekular *Wolbachia* sp. Pada Serangga
Menggunakan Primer Gen *wsp* (*Wolbachia Surface Protein*)

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana



Harold William Bonar Manihuruk
31170117

DUTA WACANA

Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana
Yogyakarta
2023

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
SKRIPSI/TESIS/DISERTASI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Kristen Duta Wacana, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Harold William Bonar Manihuruk
NIM : 31170117
Program studi : Biologi
Fakultas : Bioteknologi
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Kristen Duta Wacana **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*None-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

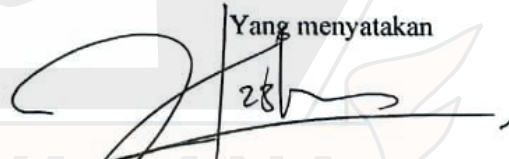
“Identifikasi Molekuler *Wolbachia* sp. pada Serangga Menggunakan Primer *wsp* (*Wolbachia Surface Protein*)”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti/Noneksklusif ini Universitas Kristen Duta Wacana berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama kami sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Yogyakarta
Pada Tanggal : 13 Agustus 2024

Yang menyatakan



(Harold William Bonar Manihuruk)

NIM 31170117

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi dengan judul :

IDENTIFIKASI MOLEKULER *WOLBACHIA SP.* PADA SERANGGA
MENGUNAKAN PRIMER WSP (*WOLBACHIA SURFACE PROTEIN*)

Telah diajukan dan dipertahankan oleh :

HAROLD WILLIAM BONAR MANIHURUK

31170117

Dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana
Sains pada tanggal 06 Desember 2023

Nama Dosen

Tanda Tangan

1. Drs. Djoko Rahardjo, M.Kes.
(Ketua Tim Penguji)



2. Dr. Dhira Satwika, M.Sc
(Dosen Pembimbing I/Dosen Penguji)



3. Dr. Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, S.Si
(Dosen Pembimbing II/Dosen Penguji)



Yogyakarta, 16 Agustus 2024

DU TA WA CA NA

Disahkan oleh :

Dekan,

Ketua Program Studi Biologi,



Dr. Charis Amarantini, M.Si

NIK. 914 E 155



Dwi Adityarini S.Si, M.Biotech, M.Sc

NIK. 214 E 556

LEMBAR PERSETUJUAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Identifikasi Molekular *Wolbachia* sp. Pada Serangga
Menggunakan Primer Gen *wsp* (*Wolbachia* Surface
Protein)
Nama : Harold William Bonar Manihuruk
NIM : 31170117
Pembimbing I : Dr. Dhira Satwika, M.Sc.
Pembimbing II : Dr. Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, S.Si
Hari/tgl ujian : Rabu, 06 Desember 2023

Disetujui oleh:

Dosen Pembimbing I,

Dosen Pembimbing II,


Dr. Dhira Satwika, M.Sc.

NIK. 904 E 146


Dr. Laurentia Henrieta Permita S P, S.Si

NIK.224 E 591

Ketua Program Studi,


DUTA WAGANA

Dwi Adityarini, S.Si, M.Biotech, M.Sc.

NIK. 214 E 556

LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Harold William Bonar Manihuruk
NIM : 31170117

dengan ini menyatakan bahwa skripsi dengan judul:

“Identifikasi Molekuler *Wolbachia* sp. Pada Serangga Menggunakan Primer Gen *wsp*
(*Wolbachia Surface Protein*)”

adalah hasil karya saya sendiri dan bukan hasil duplikasi sebagian/keseluruhan karya orang lain, yang pernah digunakan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis/diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu didalam naskah ini dan disebutkan didalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar serta bertanggung jawab dan saya bersedia bertanggung jawab dan menerima sanksi pembatalan skripsi apabila saya terbukti melakukan duplikasi terhadap karya orang lain yang sudah ada.



Harold William Bonar Manihuruk
a, 01 Desember 2023

Harold William Bonar Manihuruk

DUTA WACANA

DUTA WACANA

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas terselesaikannya skripsi berjudul “Identifikasi Molekular *Wolbachia* sp. Pada Nyamuk di wilayah Kotabaru, Kota Yogyakarta Dengan PCR Menggunakan Primer Gen *wsp* (*Wolbachia Surface Protein*)”. Dalam pengerjaan hingga penulisan skripsi ini, penulis menyadari adanya kontribusi dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Dhira Satwika, M.Sc., selaku dosen pembimbing utama yang telah membagikan ilmu dan memberikan nasihat, serta dukungan kepada penulis selama proses skripsi hingga selesai.
2. Dr. Laurentia Henrieta Permita S.P., S.Si., selaku dosen pembimbing pendamping yang memberi arahan, masukan, serta bersabar dalam membimbing penulis menyelesaikan skripsi ini.
3. Seluruh dosen, laboran, asisten dosen, serta staff dan teman-teman akademisi di Fakultas Bioteknologi yang memberi dukungan dan perhatian selama proses perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini.
4. Kedua orang tua, Pangondian Manihuruk dan Emelia Simanjuntak serta kedua adik yakni Hans Bagas Raya Manihuruk dan Hallie Putri Manihuruk dan anggota keluarga lain yang selalu memberikan dukungan dan bantuan selama masa kuliah dan skripsi.
5. Heralius Dwiki Anggoro, Arimatea Aruaini, Livia Teja Laksana, Alexander Mahadarta, Lucky Oktavian Prakoso, Jesika Ilham yang sudah menemani masa perkuliahan dan dukungan selama skripsi.
6. Andika Abdas Saili, Muhammad Ihsanudin, Mas Pino dan Byan yang menjadi penghibur bagi penulis selama masa penulisan skripsi.
7. Andrea Nurrosa Khalis dan Dewa Narendra yang selalu memberikan waktu untuk menemani dan memberikan dorongan kepada penulis.
8. Pihak-pihak lain yang tidak disebutkan yang selalu memberi semangat, dukungan, dan doa untuk kelancaran skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki kekurangan dan belum sempurna. Oleh sebab itu, kritik dan saran yang membangun sangat diperlukan. Akhir kata, penulis berharap tulisan ini dapat bermanfaat bagi banyak pihak.

Yogyakarta, 01 Desember 2023

Harold William Bonar Manihuruk

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERSETUJUAN NASKAH SKRIPSI	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Wolbachia sp.	6
2.2 Wolbachia Surface Protein (wsp)	9
BAB III METODOLOGI	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	12
3.2 Cara Kerja.....	12
3.2.1 Pengumpulan Sampel.....	12
3.2.2 Identifikasi Sampel secara Morfologi	12
3.2.3 Identifikasi Molekular	13
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Identifikasi Morfologi Serangga	16
4.1.1 Famili Drosophilidae.....	16
4.1.2 Famili Culicidae	18
4.2 Analisis Molekular	20

BAB V KESIMPULAN.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	35



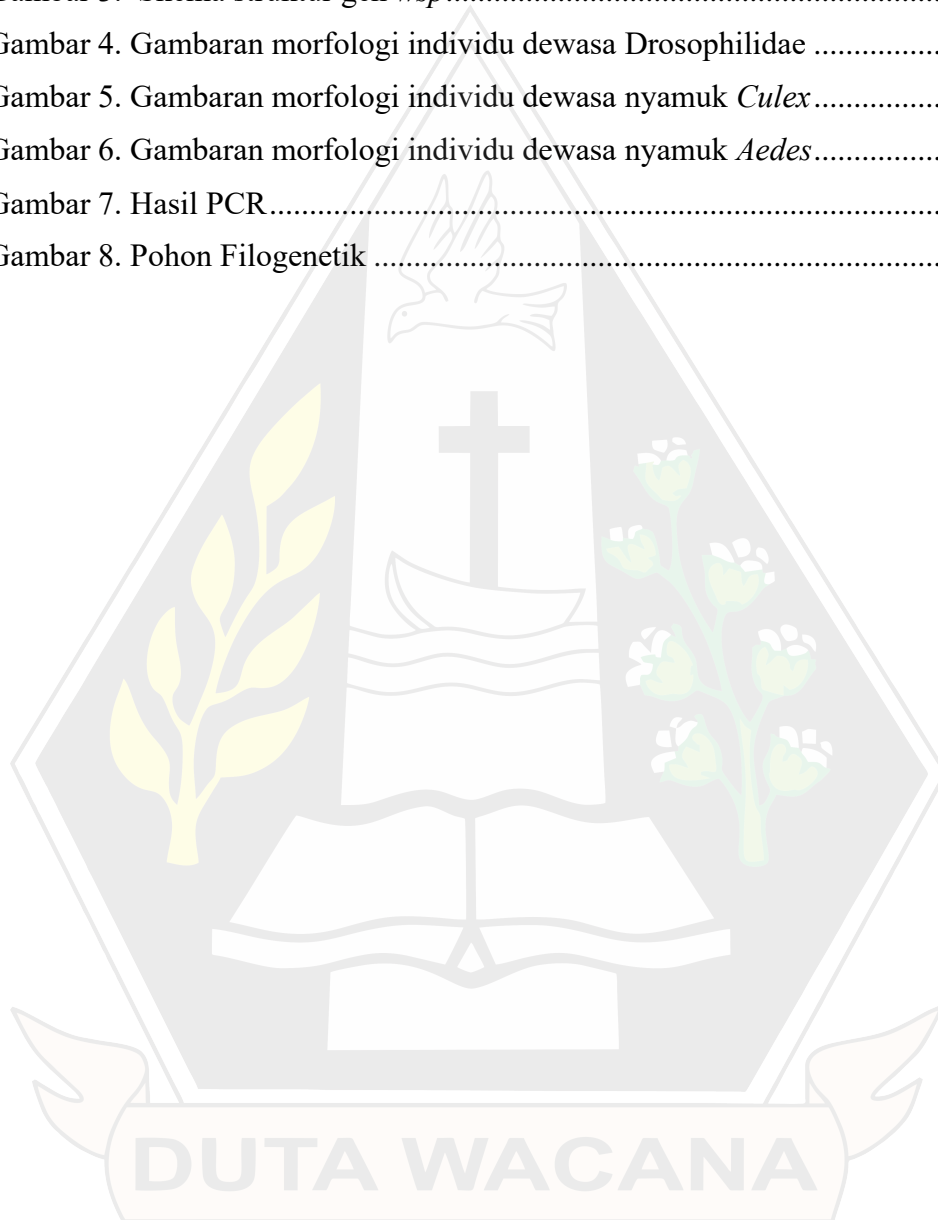
DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil sequencing pada sampel SA2 dan SA3.....	35
Tabel 2. Sekuen alignment	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme <i>cytoplasmic incompatibility</i> (CI)	7
Gambar 2. Peta kromosom <i>wPip</i>	9
Gambar 3. Skema struktur gen <i>wsp</i>	10
Gambar 4. Gambaran morfologi individu dewasa <i>Drosophilidae</i>	16
Gambar 5. Gambaran morfologi individu dewasa nyamuk <i>Culex</i>	18
Gambar 6. Gambaran morfologi individu dewasa nyamuk <i>Aedes</i>	18
Gambar 7. Hasil PCR	21
Gambar 8. Pohon Filogenetik	25



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Sekuensing	35
Lampiran 2. Hasil BLASTN Sampel SA2	36
Lampiran 3. Perbandingan Alignment <i>contig</i> Sampel SA2 dengan 20 BLAST <i>hits</i> (<i>Multiple Sequence Alignment</i>)	41



**Identifikasi Molekuler *Wolbachia* sp. pada Serangga Menggunakan Primer
wsp (*Wolbachia Surface Protein*)**

**Harold William Bonar Manihuruk
31170117**

**Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta
Wacana**

ABSTRAK

Dalam upaya berkelanjutan *untuk* melawan penyakit yang ditularkan nyamuk, *World Mosquito Program* (WMP) telah mengembangkan strategi baru yang melibatkan pelepasan nyamuk yang terinfeksi bakteri *Wolbachia*. Studi ini bertujuan untuk menentukan spesifitas primer *wsp* dalam mendeteksi *Wolbachia* pada serangga yang dikumpulkan di Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia. Dalam penelitian ditunjukkan bahwa primer *wsp* mampu mendeteksi keberadaan *Wolbachia* di berbagai inang serangga tetapi juga menunjukkan spesifitas genus untuk *wolbachia*, secara efektif membedakannya dari bakteri yang berkerabat dekat. Spesifitas primer *wsp* menjadikannya alat yang tak ternilai harganya untuk memantau dan mengevaluasi efektivitas intervensi WMP, memastikan keberlanjutan keberhasilan mereka dalam memerangi penyakit yang ditularkan nyamuk.

Kata kunci: *wolbachia*, *wsp* primers, *Aedes aegypti*, Yogyakarta, Indonesia

**Molecular Identification of *Wolbachia* sp. in Insects Using Primer *Wolbachia*
Surface Protein (*WSP*) Gene Primer**

**Harold William Bonar Manihuruk
31170117**

**Dept. of Biology, Faculty of Biotechnology,
Duta Wacana Christian University, Yogyakarta**

ABSTRACT

To combat the transmission of mosquito-borne diseases, the World Mosquito Program (WMP) has devised a novel strategy that entails the release of mosquitoes infected with *Wolbachia* bacteria, one of this program are ongoing in the Special Region of Yogyakarta. The objective of this study was to ascertain the specificity of *wsp* primers in the detection of *Wolbachia* in insects collected at Duta Wacana Christian University, Yogyakarta, Indonesia. The study demonstrated that the *Wolbachia*-specific *wsp* primers were capable of detecting the presence of *Wolbachia* in a range of insect hosts, while also exhibiting genus-specificity for *Wolbachia*, effectively distinguishing it from closely related bacteria. This remarkable specificity of the *wsp* primers makes them an invaluable tool for monitoring and evaluating the effectiveness of WMP interventions, ensuring their continued success in combating mosquito-borne diseases.

Keywords: *wolbachia*, *wsp* primers, *Aedes aegypti*, Yogyakarta, Indonesia



DUTA WACANA

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Upaya pengendalian demam berdarah dengue (DBD) seperti penyemprotan, larvisida massal, dan pendidikan pengendalian penyakit telah dilakukan, namun penyakit demam berdarah masih menjadi masalah kesehatan masyarakat yang serius di Indonesia. Tujuh provinsi di Indonesia diketahui memiliki tingkat prevalensi demam berdarah yang tinggi, yaitu Bali, Kalimantan Timur, DKI Jakarta, DI Yogyakarta, Kalimantan Utara, Sulawesi Tenggara, dan Kalimantan Selatan (Harapan *et al.*, 2019; Haryanto, 2018). Berdasarkan data laporan profil kesehatan yang diterbitkan oleh Pemerintahan Daerah D.I Yogyakarta tahun 2016 melaporkan angka penderita kasus DBD dari tahun 2004 – 2015 sebanyak 8618 kasus dan pada tahun 2018 melaporkan 649 kasus kejadian DBD dengan kasus tertinggi berada di daerah Bantul. Tingginya kasus kejadian DBD di daerah Provinsi D.I Yogyakarta menjadikan pencegahan dan pengendalian DBD sangat penting untuk dilakukan.

Salah satu pencegahan dan pengendalian DBD secara biologis yang dapat dilakukan yakni dengan menggunakan nyamuk yang sudah diinfeksi bakteri intraseluler dari genus *Wolbachia* yang dapat ditularkan secara vertikal (Buchori *et al.*, 2022). Bakteri ini memiliki kemampuan menekan replikasi arbovirus pada nyamuk serta mampu berkembang biak secara baik di dalam populasi nyamuk yang dinilai menjanjikan untuk daerah endemis penularan demam berdarah (Dorigatti *et al.*, 2018; O'Neill, 2018). Metode penggunaan bakteri *Wolbachia* pada tahun 2014 – 2015 pernah dilakukan dalam skala kecil di daerah Sleman dan Bantul yang berada di provinsi Yogyakarta yang menunjukkan keberhasilan penggunaannya dan persistensi keberadaan *Wolbachia* di dalam populasi nyamuk yang mendorong penggunaan metode ini (Indriani *et al.*, 2020).

Penggunaan nyamuk yang diinfeksi oleh bakteri *Wolbachia* diprakarsai dan dikampanyekan oleh *World Mosquito Program* (WMP), yang dikenal juga sebagai program *Eliminate Dengue*, yang merupakan asosiasi riset nirlaba yang beroperasi di beberapa negara. WMP memiliki tujuan untuk melakukan penanganan pengendalian penyakit menular yang disebabkan oleh vektor nyamuk. Program tersebut dilakukan dengan cara melepaskan nyamuk yang terinfeksi *Wolbachia* secara vertikal pada area target yang kemudian menularkan *Wolbachia* ke dalam populasi nyamuk *Aedes* sp. secara *in-situ* (O'Neill, 2018). Pelaksanaan program ini juga dilakukan di Indonesia yang tepatnya dilaksanakan di provinsi Yogyakarta, termasuk percobaan skala kecil yang dilakukan pada tahun 2014 – 2015 yang berada di provinsi sama, yang merupakan salah satu dari 10 daerah dengan kasus *dengue* yang prevalen (Indriani *et al.*, 2020; Kumalawati *et al.*, 2020).

Pengenalan bakteri *Wolbachia* (strain wMel) yang dilakukan pada skala laboratorium ke dalam *Aedes aegypti* juga menunjukkan hasil yang stabil dan dapat berpotensi digunakan dalam penurunan penularan arbovirus pada *Aedes* sp. seperti dengue, chikungunya, zika, demam kuning, dan virus mayaro (Pinto *et al.*, 2021). Hasil pengamatan pada laboratorium serta percobaan skala kecil yang dilakukan pada tahun 2014 – 2015 ini meyakinkan untuk dilakukannya penyebaran nyamuk yang diinfeksi *wolbachia* pada kota Yogyakarta. Pelaksanaan penyebaran nyamuk dengan *Wolbachia* ini menunjukkan bahwa *Wolbachia* mampu menurunkan angka kasus DBD hingga 73% dalam kurun waktu 2 tahun setelah penyebaran nyamuk dengan *Wolbachia* dilakukan (Indriani *et al.*, 2020). Penyebaran nyamuk dengan *Wolbachia* ini juga menunjukkan penurunan angka rawat inap pada kasus terkonfirmasi dengue sebesar 86% (Utarini *et al.*, 2021).

Penurunan kasus DBD yang dilaporkan oleh Indriani *et al.*, (2020) dan Utarini *et al.*, (2021) menunjukkan keberhasilan penyebaran nyamuk dengan *Wolbachia* yang dilakukan di Kota Yogyakarta, keberhasilan ini membuka tantangan baru dalam memastikan terjaganya efektivitas

program. Keberhasilan ini terbukti perlu diperhatikan dan diamati kemampuan efektivitas keberadaan Wolbachia di nyamuk, hal ini karena karena terjadinya peningkatan angka kejadian DBD dari tahun 2021 ke 2022 setelah penurunan kasus yang signifikan berdasarkan laporan dalam Profile Kesehatan Kota Yogyakarta pada tahun 2022 dan 2023 yang dirilis oleh Dinas Kesehatan Pemerintah Kota Yogyakarta. Penurunan efektivitas ini menurut Edenborough *et al.*, (2021) dapat terjadi karena genom *wMel* (*Wolbachia melanogaster*), *Aedes aegypti*, dan/atau DENV itu sendiri yang berevolusi.

Di Indonesia, keberadaan Wolbachia juga belum cukup memberikan informasi yang menyeluruh. Penelitian dari Rovik *et al.*, (2022) menunjukkan adanya keberadaan Wolbachia pada serangga di daerah Yogyakarta dan tidak ada perbedaan secara molekular pada Wolbachia yang digunakan oleh WMP dengan Wolbachia yang berada natural pada serangga lain di Yogyakarta. Di daerah Makassar, Saputra *et al.*, (2020) pada penelitiannya mendeteksi keberadaan Wolbachia di daerah kota Makassar yang menunjukkan adanya hasil positif pada nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* yang terdapat secara alami. Namun, kedua penelitian ini dirasa belum memberikan gambaran yang rinci dari keberadaan Wolbachia di Indonesia yang memiliki bentuk kepulauan dan memiliki garis Wallace-Weber. Dikarenakan hal tersebut penting dilakukan pengawasan ekologis nyamuk dan juga pemberian informasi yang lebih memadai mengenai keberadaan Wolbachia juga perlu dilakukan sebagai bagian dari pelaksanaan program nyamuk ber-Wolbachia ini di daerah lain (Buchori *et al.*, 2022).

Penurunan efektivitas yang dapat terjadi dan kurangnya informasi keberadaan Wolbachia di Indonesia, menjadi perlu untuk diperhatikan pemilihan primer sebagai alat identifikasi molekuler. Salah satu primer yang sering digunakan dalam deteksi dan identifikasi Wolbachia adalah primer dari gen *wsp* (*wolbachia surface protein*). Gen *wsp* adalah gen yang mengkode protein membran permukaan utama bakteri wolbachia (Baldo *et*

al., 2005). Gen *wsp* diketahui memiliki daerah konservasi sekaligus variasi yang cukup tinggi dan mampu menunjukkan perbedaan genetik yang signifikan antara galur (Baldo *et al.*, 2005; Rovik *et al.*, 2022). Menurut Zhou *et al.*, (1998) keragaman pada gen *wsp* menjadikannya memungkinkan untuk membuat perancangan primer PCR yang spesifik terhadap bakteri dengan genus *Wolbachia* ini. Penelitian Lau *et al.* (2021) juga berpendapat bahwa primer *wsp* dapat digunakan sebagai primer universal yang juga menargetkan amplifikasi pada gen protein permukaan luar *Wolbachia*.

Primer *wsp* pada amplifikasi PCR menarget pada gen *wsp* (*wolbachia surface protein*) yang dapat dilihat dengan visualisasi elektroforesis pada panjang basa antara 590–632 bp (Baldo *et al.*, 2006; Rovik *et al.*, 2022). Informasi genetik dari gen *wsp* bukan menjadi satu-satunya yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi keberadaan bakteri *wolbachia*, selain gen *wsp* terdapat juga gen *ftsZ*, *groE*, 16s rRNA dan 23s rDNA yang digunakan untuk deteksi dan identifikasi dari *Wolbachia* pada serangga (Cordaux *et al.*, 2001; Malloch & Fenton, 2005).

Gen *wsp* dipilih karena kapasitasnya untuk memberikan dukungan filogenetik bahkan pada transmisi horizontal di berbagai tingkatan, memiliki variabilitas nukleotidanya yang memungkinkan penetapan yang cepat untuk strain dalam reaksi berantai polimerase (PCR), dan memiliki gen konservasi yang memastikan hasil yang spesifik (Cordaux *et al.*, 2001; Vivero *et al.*, 2017). Analisis spesifitas pada primer *wsp* dalam deteksi *Wolbachia* dan keberadaan *Wolbachia* pada wilayah penyebaran nyamuk dengan *Wolbachia* dirasa perlu dilakukan. Kota Yogyakarta menjadi salah satu wilayah penyebaran nyamuk dengan *Wolbachia* yang dilakukan pada program nyamuk *wolbachia* (Indriani *et al.*, 2020).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diangkat pada penelitian ini berdasarkan latar belakang adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana status keberadaan Wolbachia di Kota Yogyakarta yang menjadi salah satu lokasi penyebaran nyamuk dengan wolbachia?
2. Bagaimana spesifitas daripada primer gen *wsp* dalam mendeteksi Wolbachia pada serangga?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, tujuan dari pelaksanaan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melakukan deteksi keberadaan Wolbachia di Kota Yogyakarta melalui pendekatan molekular menggunakan primer *wsp*.
2. Analisis spesifitas dari primer gen *wsp* pada Wolbachia untuk serangga.

1.4 Manfaat Penelitian

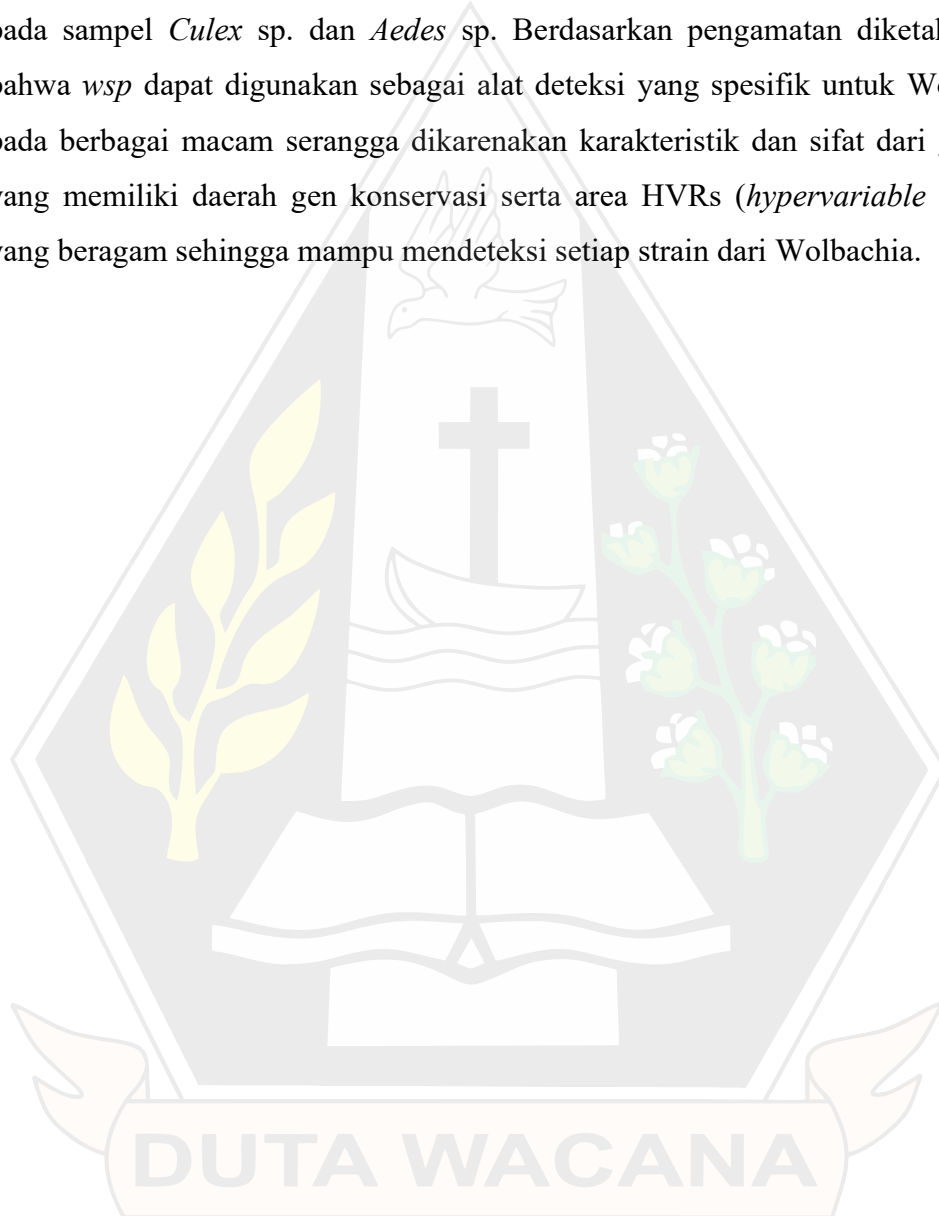
Melalui penelitian ini, adapun manfaat yang dapat diperoleh bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta masyarakat adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi mengenai keberadaan Wolbachia natural yang terdapat pada serangga di Kota Yogyakarta.
2. Informasi mengenai data molekuler ini diharapkan dapat memberikan bantuan informasi molekuler mengenai kemampuan primer universal *wsp* pada deteksi Wolbachia di serangga.

BAB V

KESIMPULAN

Keberadaan *Wolbachia* di Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta yang berada didalam administratif Kotabaru, Kota Yogyakarta terkonfirmasi positif pada sampel *Culex* sp. dan *Aedes* sp. Berdasarkan pengamatan diketahui juga bahwa *wsp* dapat digunakan sebagai alat deteksi yang spesifik untuk *Wolbachia* pada berbagai macam serangga dikarenakan karakteristik dan sifat dari gen *wsp* yang memiliki daerah gen konservasi serta area HVRs (*hypervariable regions*) yang beragam sehingga mampu mendeteksi setiap strain dari *Wolbachia*.



DAFTAR PUSTAKA

- Anders, K. L., Indriani, C., Ahmad, R. A., Tantowijoyo, W., Arguni, E., Andari, B., Jewell, N. P., Rances, E., O'Neill, S. L., Simmons, C. P., & Utarini, A. (2018). The AWED trial (Applying Wolbachia to Eliminate Dengue) to assess the efficacy of Wolbachia-infected mosquito deployments to reduce dengue incidence in Yogyakarta, Indonesia: Study protocol for a cluster randomised controlled trial. *Trials*, *19*(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s13063-018-2670-z>
- Atyame, C. M., Delsuc, F., Pasteur, N., Weill, M., & Duron, O. (2011). Diversification of Wolbachia Endosymbiont in the *Culex pipiens* Mosquito. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(10), 2761–2772. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr083>
- Baldo, L., Desjardins, C. A., Russell, J. A., Stahlhut, J. K., & Werren, J. H. (2010). Accelerated microevolution in an outer membrane protein (OMP) of the intracellular bacteria Wolbachia. *BMC Evolutionary Biology*, *10*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-48>
- Baldo, L., Dunning Hotopp, J. C., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., & Werren, J. H. (2006). Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(11), 7098–7110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00731-06>
- Baldo, L., Lo, N., & Werren, J. H. (2005). Mosaic Nature of the Wolbachia Surface Protein. *Journal of Bacteriology*, *187*(15), 5406–5418. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5406-5418.2005>
- Bandi, C., Anderson, T. J. C., Genchi, C., & Blaxter, M. L. (1998). Phylogeny of Wolbachia in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *265*(1413), 2407–2413. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0591>
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., & Xi, Z. (2010). The Endosymbiotic Bacterium Wolbachia Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, *6*(4), e1000833. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>
- Braig, H. R., Zhou, W., Dobson, S. L., & O'Neill, S. L. (1998). Cloning and Characterization of a Gene Encoding the Major Surface Protein of the Bacterial Endosymbiont *Wolbachia Pipientis*. *Journal of Bacteriology*, *180*(9), 2373–2378. <https://doi.org/10.1128/JB.180.9.2373-2378.1998>
- Buchori, D., Mawan, A., Nurhayati, I., Aryati, A., Kusnanto, H., & Hadi, U. K. (2022). Risk Assessment on the Release of Wolbachia-Infected *Aedes aegypti* in Yogyakarta, Indonesia. *Insects*, *13*(10), 924. <https://doi.org/10.3390/insects13100924>
- Burkardt, H.-J. (2000). Standardization and Quality Control of PCR Analyses. *Cclm*, *38*(2), 87–91. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2000.014>
- Chen, G., Mosier, S., Gocke, C. D., Lin, M.-T., & Eshleman, J. R. (2014). Cytosine Deamination Is a Major Cause of Baseline Noise in Next-Generation Sequencing. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *18*(5), 587–593. <https://doi.org/10.1007/s40291-014-0115-2>

- Cordaux, R., Michel-Salzat, A., & Bouchon, D. (2001). *Wolbachia* infection in crustaceans: Novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology*, *14*(2), 237–243. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00279.x>
- Correa, C. C., & Ballard, J. W. O. (2016). *Wolbachia* Associations with Insects: Winning or Losing Against a Master Manipulator. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00153>
- Ding, H., Yeo, H., & Puniamoorthy, N. (2020). *Wolbachia* infection in wild mosquitoes (Diptera: Culicidae): implications for transmission modes and host-endosymbiont associations in Singapore. *Parasites & Vectors*, *13*(1), 612. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04466-8>
- Dorigatti, I., McCormack, C., Nedjati-Gilani, G., & Ferguson, N. M. (2018). Using *Wolbachia* for Dengue Control: Insights from Modelling. *Trends in Parasitology*, *34*(2), 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.11.002>
- Edenborough, K. M., Flores, H. A., Simmons, C. P., & Fraser, J. E. (2021). Using *Wolbachia* to Eliminate Dengue: Will the Virus Fight Back? *Journal of Virology*, *95*(13), e02203-20.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution*, *39*(4), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Glaser, R. L., & Meola, M. A. (2010). The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. *PLoS ONE*, *5*(8), e11977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011977>
- Harapan, H., Michie, A., Mudatsir, M., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2019). Epidemiology of dengue hemorrhagic fever in Indonesia: Analysis of five decades data from the National Disease Surveillance. *BMC Research Notes*, *12*(1), 350. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4379-9>
- Harbach, R. E., & Kitching, I. J. (1998). Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology*, *23*(4), 327–370. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x>
- Haryanto, B. (2018). Indonesia Dengue Fever: Status, Vulnerability, and Challenges. In A. J. Rodriguez-Morales (Ed.), *Current Topics in Tropical Emerging Diseases and Travel Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82290>
- Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, *42*(2), 182–192. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>
- Hillis, D. M., & Huelsenbeck, J. P. (1992). Signal, Noise, and Reliability in Molecular Phylogenetic Analyses. *Journal of Heredity*, *83*(3), 189–195. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111190>
- Hoerauf, A., & Rao, R. U. (Eds.). (2007). *Wolbachia: A Bug's Life in Another Bug*. Karger.
- Hoffmann, A. A., Hercus, M., & Dagher, H. (1998). Population Dynamics of the *Wolbachia* Infection Causing Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila*

- melanogaster. *Genetics*, 148(1), 221–231.
<https://doi.org/10.1093/genetics/148.1.221>
- Indriani, C., Tantowijoyo, W., Rancès, E., Andari, B., Prabowo, E., Yusdi, D., Ansari, M. R., Wardana, D. S., Supriyati, E., Nurhayati, I., Ernesia, I., Setyawan, S., Fitriana, I., Arguni, E., Amelia, Y., Ahmad, R. A., Jewell, N. P., Dufault, S. M., Ryan, P. A., Utarini, A. (2020). Reduced Dengue Incidence Following Deployments of Wolbachia-Infected *Aedes aegypti* in Yogyakarta, Indonesia: A Quasi-Experimental Trial Using Controlled Interrupted Time Series Analysis. *Gates Open Research*, 4, 50.
<https://doi.org/10.12688/gatesopenres.13122.1>
- Jeyaprakash, A., & Hoy, M. A. (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *Wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9(4), 393–405.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00203.x>
- Kirk-Spriggs, A. H., & Sinclair, B. J. (Eds.). (2017). *Manual of Afrotropical diptera. 1: Introductory chapters and keys to Diptera families*. South African National Biodiversity Institute.
- Kittayapong, P., Baisley, K. J., Baimai, V., & O'Neill, S. L. (2000). Distribution and Diversity of *Wolbachia* Infections in Southeast Asian Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37(3), 340–345.
<https://doi.org/10.1093/jmedent/37.3.340>
- Klasson, L., Walker, T., Sebahia, M., Sanders, M. J., Quail, M. A., Lord, A., Sanders, S., Earl, J., O'Neill, S. L., Thomson, N., Sinkins, S. P., & Parkhill, J. (2008). Genome Evolution of *Wolbachia* Strain wPip from the *Culex pipiens* Group. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1877–1887.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn133>
- Kraaijeveld, K., Reumer, B. M., Mouton, L., Kremer, N., Vavre, F., & Van Alphen, J. J. M. (2011). Does a parthenogenesis-inducing *Wolbachia* induce vestigial cytoplasmic incompatibility? *Naturwissenschaften*, 98(3), 175–180.
<https://doi.org/10.1007/s00114-010-0756-x>
- Kumalawati, D. A., Supriyati, E., Rachman, M. P., Oktriani, R., Kurniasari, I., Candrasari, D. S., Hidayati, L., Handayaningsih, A. E., Probowati, V. C., Arianto, B., Wardana, D. S., Pramuko, N. B., 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(12).
- Lu, P., Sun, Q., Fu, P., Li, K., Liang, X., & Xi, Z. (2020). *Wolbachia* Inhibits Binding of Dengue and Zika Viruses to Mosquito Cells. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1750. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01750>
- Malloch, G., & Fenton, B. (2005). Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. *Molecular Ecology*, 14(2), 627–637.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02432.x>
- Moldovan, E., & Moldovan, V. (2020). *Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques*. <https://doi.org/10.2478/amma-2020-0025>

- Mustafa, M. S., Rastogi, V., Gupta, R. K., Jain, S., Singh, P. M. P., & Gupta, A. (2016). Wolbachia: The selfish Trojan Horse in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 72(4), 373–376. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2015.07.002>
- O’Neill, S. L. (2018). The Use of Wolbachia by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses. In R. Hilgenfeld & S. G. Vasudevan (Eds.), *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies* (Vol. 1062, pp. 355–360). Springer Singapore.
- Pfarr, K., Foster, J., Slatko, B., Hoerauf, A., & Eisen, J. A. (2007). On the taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*: Should this species name include the intracellular bacteria of filarial nematodes? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1677–1678. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65248-0>
- Pietri, J. E., DeBruhl, H., & Sullivan, W. (2016). The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiology Open*, 5(6), 923–936. <https://doi.org/10.1002/mbo3.390>
- Pinto, S. B., Riback, T. I. S., Sylvestre, G., Costa, G., Peixoto, J., Dias, F. B. S., Tanamas, S. K., Simmons, C. P., Dufault, S. M., Ryan, P. A., O’Neill, S. L., Muzzi, F. C., Kutcher, S., Montgomery, J., Green, B. R., Smithyman, R., Eppinghaus, A., Saraceni, V., Durovni, B., Moreira, L. A. (2021). Effectiveness of Wolbachia-infected mosquito deployments in reducing the incidence of dengue and other Aedes-borne diseases in Niterói, Brazil: A quasi-experimental study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(7), e0009556. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009556>
- Rovik, A., Daniwijaya, E. W., Supriyati, E., Rahayu, A., Kumalawati, D. A., Saraswati, U., Handayaningsih, A. E., Rachman, M. P., Oktriani, R., Kurniasari, I., Candrasari, D. S., Nurhayati, I., Sholeh, R., Arianto, B., Tantowijoyo, W., Ahmad, R. A., Utarini, A., & Arguni, E. (2022). Wolbachia genetic similarity in different insect host species: *Drosophila melanogaster* and Yogyakarta’s (Indonesia) *Aedes aegypti* as a novel host. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(5). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230510>
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J., & Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 12(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
- Saputra, F. R., Wahid, I., Sjahril, R., Syafruddin, D., Rani, S., & Bahar, B. (2020). Bukti Baru Infeksi Natural Wolbachia sp. Pada *Aedes aegypti* dengan *Aedes albopictus* dari Makassar. *Jurnal Vektor Penyakit*, 14(2), 113–118. <https://doi.org/10.22435/vektor.v14i2.2424>
- Schulenburg, J. H. G. V. D., Hurst, G. D. D., Huigens, T. M. E., Van Meer†, M. M. M., Jiggins, F. M., & Majerus, M. E. N. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetic Utility of Wolbachia ftsZ and wsp Gene Sequences with Special Reference to the Origin of Male-Killing. *Molecular Biology and*

- Evolution*, 17(4), 584–600.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026338>
- Soni, M., Bhattacharya, C., Sharma, J., Khan, S. A., & Dutta, P. (2017). Molecular typing and phylogeny of Wolbachia: A study from Assam, North-Eastern part of India. *Acta Tropica*, 176, 421–426.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.005>
- The Wolbachia wsp database. [<http://pubmlst.org/wolbachia/wsp/>]
- Utarini, A., Indriani, C., Ahmad, R. A., Tantowijoyo, W., Arguni, E., Ansari, M. R., Supriyati, E., Wardana, D. S., Meitika, Y., Ernesia, I., Nurhayati, I., Prabowo, E., Andari, B., Green, B. R., Hodgson, L., Cutcher, Z., Rancès, E., Ryan, P. A., O'Neill, S. L., ... Simmons, C. P. (2021). Efficacy of Wolbachia-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue. *New England Journal of Medicine*, 384(23), 2177–2186.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2030243>
- Vivero, R. J., Cadavid-Restrepo, G., Herrera, C. X. M., & Soto, S. I. U. (2017). Molecular detection and identification of Wolbachia in three species of the genus *Lutzomyia* on the Colombian Caribbean coast. *Parasites & Vectors*, 10(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2031-x>
- Wang, X., Xiong, X., Cao, W., Zhang, C., Werren, J. H., & Wang, X. (2020). Phylogenomic Analysis of *Wolbachia* Strains Reveals Patterns of Genome Evolution and Recombination. *Genome Biology and Evolution*, 12(12), 2508–2520. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa219>
- Weeks, A. R., & Breeuwer, J. A. J. (2001). *Wolbachia* –induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1482), 2245–2251.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1797>
- Werren, J. H. (1997). Biology of Wolbachia. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 587–609. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.587>
- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). Wolbachia: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741–751.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Werren, J. H., & Bartos, J. D. (2001). Recombination in Wolbachia. *Current Biology*, 11(6), 431–435. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00101-4)
- Xie, B.-B., Rong, J.-C., Tang, B.-L., Wang, S., Liu, G., Qin, Q.-L., Zhang, X.-Y., Zhang, W., She, Q., Chen, Y., Li, F., Li, S., Chen, X.-L., Luo, H., & Zhang, Y.-Z. (2021). Evolutionary Trajectory of the Replication Mode of Bacterial Replicons. *mBio*, 12(1), e02745-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02745-20>
- Yuzuki, K., & Tidon, R. (2020). Identification key for drosophilid species (Diptera, Drosophilidae) exotic to the Neotropical Region and occurring in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 64(1), e2019100.
<https://doi.org/10.1590/1806-9665-rbent-2019-100>
- Zhou, W., Rousset, F., & O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-Based Classification of Wolbachia Strains Using wsp Gene Sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1395), 509–515. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>