

## Eliminasi Endosimbion *Wolbachia* sp. pada Nyamuk *Aedes albopictus* dengan Antibiotik Tetrasiklin

### *Elimination of Endosymbiont Wolbachia sp. on Aedes albopictus with Tetracycline Antibiotics*

Endang Srimurni Kusmintarsih\*, Darsono, Edy Riwidiharso, Rokhmani, Trisnowati Budi  
Ambarningrum, Endang Ariyani S  
Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman  
Jalan Suparno Nomor 63 Grendeng Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia  
\*E\_mail: endangsk2402@gmail.com; endang.kusmintarsih@unsoed.ac.id

*Received date: 08-01-2021, Revised date: 03-12-2021, Accepted date: 03-12-2021*

#### ABSTRAK

Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) ialah penyakit yang disebabkan oleh virus Dengue yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes*. *Aedes aegypti* dikenal sebagai vektor primer virus Dengue secara alami tidak terinfeksi oleh endosimbion *Wolbachia* sp., sedangkan *Ae. albopictus* yang menjadi vektor sekunder yang secara alami terinfeksi *Wolbachia* sp. *Wolbachia* sp. diketahui dapat menghambat penularan virus Dengue, untuk mempelajari mekanisme tersebut perlu dilakukan eliminasi *Wolbachia* sp. dari *Ae. albopictus*, kemudian menginfeksi *Ae. albopictus* tersebut dengan virus Dengue. Tujuan penelitian untuk mengetahui kemampuan antibiotik tetrasiklin dalam mengeliminasi *Wolbachia* sp. dari nyamuk *Ae. albopictus*. Sampel telur *Ae. albopictus* diperoleh di daerah Ciamis dengan metode survei menggunakan *ovitrap* yang dipasang di luar rumah. Telur *Ae. albopictus* kemudian telur ditetaskan di laboratorium dan dipelihara hingga menjadi nyamuk dewasa. Nyamuk diperlakukan dengan pemberian makan gula yang telah diberi tetrasiklin 0,25mg/ml setiap dua hari sekali berseling dengan pakan darah. Deteksi keberadaan *Wolbachia* sp. pada nyamuk dilakukan pada generasi satu sampai tiga dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik *Wsp*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nyamuk generasi satu sampai tiga masih terinfeksi *Wolbachia* sp. Hal tersebut menunjukkan bahwa dosis antibiotik tetrasiklin yang dipakai belum dapat mengeliminasi *Wolbachia* sp. dari nyamuk *Ae. albopictus*

**Kata kunci:** *Aedes albopictus*, *Wolbachia*, virus Dengue, tetrasiklin

#### ABSTRACT

*Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) is a disease caused by the dengue virus which is transmitted through the bite of the Aedes mosquito. Aedes aegypti, which is known as the primary vector of dengue virus, is naturally not infected by Wolbachia sp. endosymbiont, while Ae. albopictus which is a secondary vector naturally infected with Wolbachia sp. The Wolbachia sp. known to inhibit the transmission of Dengue virus, to study the mechanism, it is necessary to eliminate Wolbachia sp. from Ae. albopictus, then infects the Ae. albopictus with the Dengue virus. The aim of the study was to determine the ability of tetracycline antibiotics to eliminate Wolbachia sp. from the Ae. albopictus mosquito. Ae. albopictus eggs was obtained in the Ciamis area by survey method using ovitrap which was installed outside the house. The Ae. albopictus eggs are then incubated in the laboratory and reared until they become adult mosquitoes. Mosquitoes were treated with sugar feeding which had been given tetracycline 0.25mg/ml every two days alternated with blood feed. Detection of the presence of Wolbachia sp. on mosquitoes carried out in first to third generations by the polymerase chain reaction (PCR) method using Wsp-specific primers. The results showed that the first to third generation mosquitoes were still infected with Wolbachia sp. This shows that the dose of tetracycline antibiotics used has not been able to eliminate Wolbachia sp. from the Ae. albopictus mosquito.*

**Keywords:** *Aedes albopictus*, *Wolbachia*, *Dengue virus*, *tetracycline*

## PENDAHULUAN

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) atau *dengue hemorrhagic fever* (DHF) ialah penyakit yang disebabkan oleh virus Dengue.<sup>1</sup> Demam berdarah dengue bersifat endemis di semua provinsi di Indonesia dan timbul sepanjang tahun. Kasus DBD di Indonesia tahun 2020 mencapai 95.893 orang dengan kematian mencapai 661 orang. Jumlah kasus terbanyak terdapat di Buleleng sebanyak 3.313 orang, Badung 2.547 orang, Kota Bandung 2.363, Sikka 1.786 orang, dan Gianyar 1.717 orang.<sup>2</sup> Faktor yang dianggap menyebabkan terjadinya lonjakan kasus dan meluasnya persebaran penyakit tersebut ialah adanya tempat perkembangbiakan nyamuk yang selalu tersedia dan faktor cuaca.<sup>2</sup>

Nyamuk *Ae. albopictus* secara alami terinfeksi endosimbion *Wolbachia* sp., sedangkan *Ae. aegypti* tidak.<sup>3,4,5,6,7,8</sup> Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Ae. aegypti* yang tidak terinfeksi oleh *Wolbachia* berperan sebagai vektor primer, sedangkan *Ae. albopictus* yang secara alami terinfeksi oleh *Wolbachia* hanya menjadi vektor sekunder bagi penularan penyakit DBD. *Wolbachia* sp. diketahui berperan dalam menghambat penularan virus Dengue.<sup>9,10,11,12,13</sup> *Wolbachia* sp. adalah *intracellular bacteria* (bakteri intraseluler) yang menginfeksi organ reproduksi dari berbagai macam arthropoda serta dapat ditularkan secara vertikal (*vertical transmission*) melalui induk kepada keturunannya. Bakteri ini pertama kali ditemukan pada tahun 1924 oleh Hertig dan Wolbach di dalam ovarium nyamuk *Culex pipiens*, kemudian di tahun 1936 Hertig menamai bakteri tersebut dengan nama *Wolbachia pipientis* sebagai penghargaan atas kerjasamanya dengan Wolbach.<sup>3</sup> Penelitian-penelitian berikutnya diketahui bahwa bakteri ini tidak hanya menginfeksi nyamuk *Culex*, tetapi juga menginfeksi insekta dan arthropoda lainnya. Sampai saat ini diketahui bahwa kurang lebih ada 20-60% dari seluruh insekta terinfeksi oleh *Wolbachia*<sup>14,15,16</sup>, diantaranya menginfeksi *Aedes albopictus*.<sup>4,6,7,16</sup> *Aedes albopictus* diidentifikasi dan dikenalkan

pertama oleh Skuse tahun 1894,<sup>17,18</sup> termasuk sub genus *Stegomyia* dan merupakan spesies penting selain *Ae. aegypti* diantara 16 spesies lainnya yang ada dalam sub genus tersebut.<sup>9</sup> Morfologi *Ae. albopictus* mirip dengan *Ae. aegypti*, namun dapat dibedakan dengan adanya *strip* putih di bagian scutum.<sup>18,19,20</sup> Scutum *Ae. aegypti* berwarna hitam dengan dua garis putih sejajar di bagian dorsal tengah yang diapit oleh dua garis lengkung berwarna putih, sedangkan scutum *Ae. albopictus* hanya berisi satu garis putih tebal di bagian dorsalnya. *Aedes albopictus* ditemui di semua pulau di Indonesia, seperti Sumatera, Jawa, Kalimantan, Nusa Tenggara, Sulawesi, Maluku, dan Irian Jaya.<sup>21,22,23,24</sup> *Wolbachia* diketahui sensitif terhadap antibiotik, diantaranya tetrasiklin.<sup>25,26,27,28</sup> Selanjutnya, De-Lima et al<sup>29</sup> menyatakan bahwa virus dengue dapat diturunkan secara vertical dari induk ke generasi berikutnya baik dari *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Penelitian dilakukan untuk mengeliminasi *Wolbachia* pada *Ae. albopictus* menggunakan antibiotik tetrasiklin. *Aedes albopictus* bebas *Wolbachia* selanjutnya dapat digunakan untuk riset lanjutan dengan cara diinfeksi dengan virus Dengue, kemudian dibandingkan dengan *Ae. aegypti* apakah *Ae. albopictus* masih sebagai vektor sekunder atau berubah menjadi *susceptible*.

## METODE

Metode penelitian yang digunakan adalah metode survei dengan teknik pengambilan sampel secara *random* di daerah Ciamis. Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai Juni 2016. Telur *Ae. albopictus* diperoleh dengan memasang perangkap telur (ovitrap) yang diletakkan di luar rumah pada 25 rumah, masing-masing rumah sebanyak 2 buah ovitrap. Telur yang diperoleh kemudian ditetaskan di laboratorium dalam baki/tray yang berisi air, diberi pakan pelet, dan dilakukan penggantian air setiap tiga hari. Telur yang menetas menjadi larva dan tumbuh menjadi pupa, kemudian dimasukkan dalam gelas plastik yang diberi air dan dipindahkan

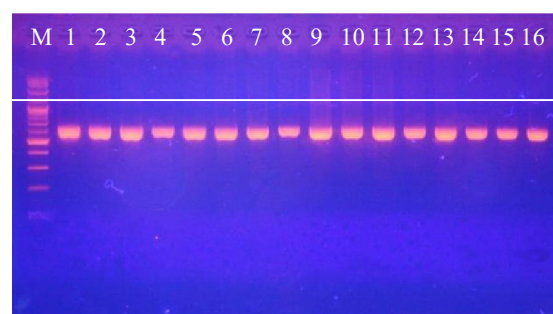
ke dalam kandang nyamuk hingga menjadi nyamuk dewasa. Nyamuk dewasa sejumlah 50 ekor diberi makan gula yang telah ditambahkan tetrasiklin 0,25 mg/ml setiap dua hari sekali berseling dengan pemberian pakan darah menggunakan umpan mencit (*Mus musculus*) empat hari sekali untuk pematangan telur nyamuk.

Deteksi keberadaan endosimbion *Wolbachia* dilakukan dengan teknik molekular yaitu *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik. Metode PCR dimulai dari ekstraksi DNA, PCR, gel elektroforesis, dan visualisasi. Ekstraksi DNA *Wolbachia* dilakukan dengan menggunakan protokol *DNeasy tissue kit* (Qiagen). PCR DNA *Wolbachia* dilakukan dengan menggunakan primer spesifik *Wsp forward primer* w81F: 5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC-3' dan *reverse primer* w691R: 5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3' dengan panjang 610bp. Siklus temperatur pada mesin PCR dimulai dengan denaturasi menggunakan temperatur 95°C selama 5 menit dilanjutkan 35 siklus dengan temperatur 95°C selama 1 menit, 55°C selama 1 menit, dan 72°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 72°C selama 10 menit dan temperatur akhir 4°C. Elektroforesis di *running* dalam 1% agarose gel dengan tegangan 130V selama 1 jam pada temperatur ruang. Visualisasi gel elektroforesis dilakukan di bawah sinar ultraviolet untuk melihat pita yang sesuai dengan panjang primer yang digunakan kemudian didokumentasikan (difoto).

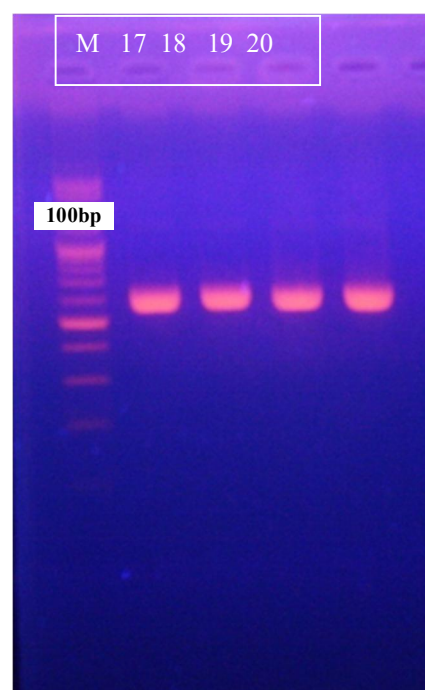
## HASIL

Hasil pengamatan yang dilakukan pada awal *rearing* menunjukkan bahwa *Ae. albopictus* tidak menghasilkan banyak keturunan dan hanya puluhan telur yang dihasilkan. *Wolbachia* dapat menginfeksi pada berbagai spesies arthropoda tetapi tidak 100% sehingga perlu dilakukan uji sebelum diberikan antibiotik untuk membuktikan bahwa nyamuk yang digunakan dalam riset terinfeksi *Wolbachia*.

Hasil uji PCR terhadap endosimbion *Wolbachia* dari nyamuk sebelum diberi antibiotik tetrasiklin menunjukkan semua sampel (20 sampel) yang diuji positif *Wolbachia* yang ditunjukkan adanya *band* pada setiap sampel (Gambar 1).



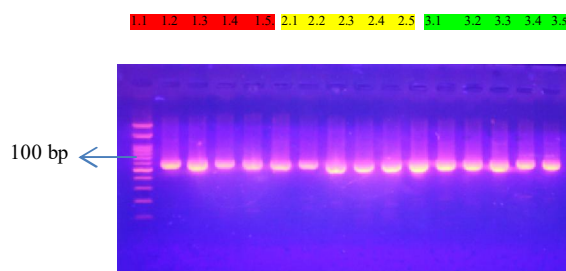
(a)



(b)

Gambar 1. Gel Elektroforesis *Wolbachia* dari Nyamuk *Ae. albopictus* yang tidak diberi tetrasiklin (a) Sampel Nomor 1-16; (b) Sampel Nomor 17-20

Hasil uji PCR dari generasi pertama sampai ketiga setelah diberi antibiotik tetrasiklin dosis 0.25mg/ml dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil menunjukkan bahwa *Ae. albopictus* dari generasi pertama sampai ketiga (F1-F3) masih terinfeksi oleh *Wolbachia* yang ditandai dengan adanya *band/pita* pada gel agarose.



Keterangan Gambar:

Line 1.1 – 1.5 adalah hasil uji PCR dari generasi 1 (F1)

Line 2.1 – 2.5 adalah hasil uji PCR dari generasi 2 (F2)

Line 3.1 – 3.5 adalah hasil uji PCR dari generasi 3 (F3)

Gambar 2. Gel Elektroforesis Gen *Wolbachia* dari Nyamuk Generasi F1-F3 Setelah Pemberian Tetrasiklin dengan Dosis 0,25mg/ml

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nyamuk *Ae. albopictus* lambat bertelur yaitu lebih dari 5 hari setelah kawin atau 7 hari setelah pemberian darah, jumlah telur yang dikeluarkan juga hanya sedikit yaitu kurang lebih 10-15 butir. Hal ini karena pemberian darah frekuensinya hanya 4 hari sekali, kemungkinan tidak cukup untuk segera mematangkan dan menghasilkan telur. Hasil penelitian sesuai dengan penelitian sebelumnya<sup>30,31,32,33</sup> yang menyatakan bahwa frekuensi penghisapan darah berpengaruh terhadap fertilitas telur. Nyamuk dewasa yang sudah bertelur pada generasi F1, F2, dan F3 dianalisis dengan uji PCR untuk mengetahui tereliminasi endosimbion *Wolbachia*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Ae. albopictus* yang diambil dari Ciamis positif *Wolbachia*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa endosimbion *Wolbachia* tersebar luas di dunia, termasuk di Jawa Barat. Adanya infeksi *Wolbachia* menyebabkan *Ae. albopictus* hanya berperan sebagai *secondary vector* untuk virus Dengue sedangkan *Ae. aegypti* yang tidak terinfeksi *Wolbachia* menjadi *primary vector* untuk virus Dengue.<sup>34</sup> Sesuai dengan pernyataan O'neill yang menyatakan bahwa *Wolbachia* dapat menghambat penularan virus Dengue.<sup>35</sup> Demikian pula hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa *Ae. albopictus* secara alami terinfeksi oleh *Wolbachia* sedangkan *Ae. aegypti* secara alami tidak

terinfeksi oleh *Wolbachia*.<sup>35</sup> Riset selanjutnya, bila *Ae. albopictus* telah negatif *Wolbachia*, akan diinfeksi oleh virus Dengue untuk dibandingkan dengan *Ae. aegypti*, apakah *Ae. albopictus* menjadi *susceptible* seperti *Ae. aegypti* terhadap oleh virus Dengue.

Hasil uji PCR dari generasi pertama sampai ketiga setelah diberi antibiotik tetrasiklin dosis 0,25 mg/ml untuk mengeliminasi *Wolbachia* pada *Ae. albopictus* menunjukkan bahwa generasi F1-F3 masih terinfeksi oleh *Wolbachia*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis yang digunakan belum dapat mengeliminasi *Wolbachia* yang menginfeksi *Ae. albopictus* sehingga diperlukan dosis yang lebih tinggi. Hasil penelitian berbeda dengan penelitian sebelumnya terhadap lalat *Drosophila melanogaster* dimana dengan dosis yang sama telah mampu menghilangkan endosimbion yang ada di dalam tubuhnya.<sup>4</sup> Perbedaan ini karena lalat *D. melanogaster* dalam *rearing* tidak diberi makanan lainnya selain media agar yang telah diberi antibiotik, sehingga setiap makan pasti memakan makanan yang mengandung antibiotik tersebut, sedangkan untuk nyamuk, selain makanan gula yang dicampur dengan antibiotik juga diberi pakan darah menggunakan *M. musculus* supaya nyamuk betina dapat bertelur. Berdasarkan variasi makanan untuk nyamuk maka dosis tetrasiklin yang diberikan perlu ditingkatkan dan lebih lama pemberian antibiotiknya. Apabila dosis antibiotik yang digunakan mampu mengeliminasi *Wolbachia* maka dapat digunakan untuk riset selanjutnya seperti membandingkan suseptibilitas antara *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* terhadap virus Dengue.

## KESIMPULAN

Dosis yang digunakan (0,25mg/ml) belum mampu mengeliminasi *Wolbachia* dalam nyamuk *Ae. albopictus* sampai generasi ketiga (F3).

## SARAN

Pemberian pakan darah dilakukan lebih pendek dari empat hari dan perlu dilakukan penelitian lanjut dengan dosis antibiotik lebih tinggi.

## KONTRIBUSI PENULIS

Endang Srimurni K sebagai penanggung jawab riset dan laporan serta penulisan artikel. Sedangkan lainnya sebagai anggota peneliti.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada LPPM Universitas Jenderal Soedirman yang telah membiayai penelitian dan Loka Litbangkes Pengendalian yang telah membantu koleksi dan *rearing* *Ae. albopictus* serta semua pihak yang telah membantu.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Hussain M, Munir S, Rahim K, Bashir NH, Basit A, Khattak B. Characterization of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* spp. of mosquitoes: a study in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Mol Biol Res Commun.* 2018;7(2):77–82. doi: 10.22099/mbrc.2018.29073.1315.
2. Biro Komunikasi dan Pelayanan Masyarakat, Kementerian Kesehatan RI. Data kasus terbaru DBD di Indonesia. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2021. Diunduh dari: <https://sehatnegeriku.kemkes.go.id/baca/umum/20201203/2335899/data-kasus-terbaru-dbd-indonesia/>.
3. Ahantarig A, Kittayapong P. Endosymbiotic *Wolbachia* bacteria as biological control tools of disease vectors and pests. *J Appl Entomol.* 2011;135(7):479–86. doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01641.x.
4. Kusmintarsih ES. Effects of tetracycline and temperature on *Drosophila melanogaster* infected with *Wolbachia* inducing the popcorn-effect. *Microbiol Indones.* 2012;6(3):130–4.
5. Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* 2010;6(4): e1000833. doi: 10.1371/journal.ppat.1000833.
6. de Albuquerque AL, Magalhães T, Ayres CFJ. High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipiensis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(6):773–6.
7. Dobson SL, Rattanadechakul W, Marsland EJ. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity (Edinb).* 2004;93(2):135–42. doi: 10.1038/sj.hdy.6800458.
8. Kambhampati S, Rai KS, Burgun SJ. Unidirectional cytoplasmic incompatibility in the mosquito, *Aedes albopictus*. *Evolution (N Y).* 1993;47(2):673. doi: 10.1111/j.1558-5646.1993.tb02121.x.
9. Ye YH, Carrasco AM, Frentiu FD, Chenoweth SF, Beebe NW, van den Hurk AF, et al. *Wolbachia* reduces the transmission potential of dengue-infected *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):1–19. doi: 10.1371/journal.pntd.0003894.
10. Silva JBL, Alves DM, Bottino-Rojas V, Pereira TN, Sorgine MHF, Caragata EP, et al. *Wolbachia* and dengue virus infection in the mosquito *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *PLoS One.* 2017;12(7): e0181678. doi: 10.1371/journal.pone.0181678.
11. Zhang H, Lui R. Releasing *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* to prevent the spread of dengue virus: a mathematical study. *Infect Dis Model [Internet].* 2020;5:142–60. doi: 10.1016/j.idm.2019.12.004.
12. Ndi MZ, Allingham D, Hickson RI, Glass K. The effect of *Wolbachia* on dengue outbreaks when dengue is repeatedly introduced. *Theor Popul Biol.* 2016;111:9–15. doi: 10.1016/j.tpb.2016.05.003.
13. Koh C, Audsley MD, Di Giallonardo F, Kerton EJ, Young PR, Holmes EC, et al. Sustained *Wolbachia*-mediated blocking of dengue virus isolates following serial sepassage in *Aedes aegypti* cell culture. *Virus Evol.* 2019;5(1):1–9.
14. Popovici J, Moreira LA, Poinsignon A, Iturbe-Ormaetxe I, McNaughton D, O'Neill SL. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2010;105(8):957–64. doi: 10.1590/S0074-02762010000800002.

15. Johnson KN. The impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes. *Viruses*. 2015;7(11):5705–17. doi: 10.3390/v7112903.
16. Carvajal TM, Hashimoto K, Harnandika RK, Amalin DM, Watanabe K. Detection of *Wolbachia* in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes in metropolitan Manila, Philippines. *Parasit Vectors* [Internet]. 2019;12(1):361. doi: 10.1186/s13071-019-3629-y.
17. Gillott C. *Entomology 3<sup>rd</sup> edition*. Springer Science & Business Media; 2005.
18. Boesri H. Biologi dan peranan *Aedes albopictus* (Skuse) 1894 sebagai penular penyakit. *Aspirator*. 2011;3(2):117–25.
19. Ramadhan BI, Achmadi UF. Keberadaan jentik *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* berdasarkan karakteristik kontainer di Sekolah Dasar, Kelurahan Duren Sawit, Jakarta Timur, tahun 2018. *J Nas Kesehat Lingkung Glob*. 2020;1(1):27–35.
20. WRBU. Vector hazard report: pictorial guide to conus zika virus vectors. Available from: <http://vectormap.si.edu/downloads/VHazardReports/VHR%20Pic%20Guide%20Zika%20Virus%20Vectors%20CONUS.pdf>.
21. Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. *PLoS One*. 2018;13(12): e0210122. doi: 10.1371/journal.pone.0210122.
22. Wu F, Liu Q, Lu L, Wang J, Song X, Ren D. Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in northwestern China. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(8):1181–6. doi: 10.1089/vbz.2010.0032.
23. Lizuain AA, Leporace M, Santini MS, Utgés ME, Schweigmann N. Update on the distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Misiones, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61:e64. doi: 10.1590/S1678-9946201961046.
24. Hestningsih R, Kurniawan MI, Martini M, Kusariana N, Widjanarko B, Rahayu A. Daya saing kawin jantan mandul *Aedes albopictus*: uji semi lapang untuk pengendalian vektor demam berdarah dengue (DBD). *Balaba*. 2019;69–74. doi: 10.22435/blb.v15i1.1410.
25. Endersby-Harshman NM, Axford JK, Hoffmann AA. Environmental concentrations of antibiotics may diminish *Wolbachia* infections in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* [Internet]. 2019;56(4):1078–86. Available from: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz023>.
26. Wang XX, Qi L Da, Jiang R, Du YZ, Li YX. Incomplete removal of *Wolbachia* with tetracycline has two-edged reproductive effects in the thelytokous wasp *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(August 2016):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44014>.
27. Li YY, Fields PG, Pang BP, Floate KD. Effects of tetracycline and rifampicin treatments on the fecundity of the *Wolbachia*-infected host, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Econ Entomol*. 2016;109(3):1458–64. doi: 10.1093/jee/tow067.
28. Endersby-Harshman NM, Axford JK, Hoffmann AA. Environmental concentrations of antibiotics may diminish *Wolbachia* infections in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2019;56(4):1078–86. doi: 10.1093/jme/tjz023.
29. Ferreira-De-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–8. doi: 10.1186/s13071-018-2643-9.
30. O'Donnell AJ, Rund SSC, Reece SE. Time-of-day of blood-feeding: Effects on mosquito life history and malaria transmission. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2019;12(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3513-9>.
31. Brugman VA, Hernández-Triana LM, England ME, Medlock JM, Mertens PPC, Logan JG, et al. Blood-feeding patterns of native mosquitoes and insights into their potential role as pathogen vectors in the Thames estuary region of the United Kingdom. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–12. doi: 10.1186/s13071-017-2098-4.
32. Gunathilaka N, Ranathunge T, Udayanga L, Abeyewickreme W. Efficacy of blood sources and artificial blood feeding methods in rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for sterile insect technique and incompatible

- insect technique approaches in Sri Lanka. *Biomed Res Int.* 2017; (2):1-7. doi: 10.1155/2017/3196924.
33. Kusmintarsih ES, Syaadah MFL, Riwidiharso E, Sasmono RT. Infeksi virus Dengue pada nyamuk *Aedes aegypti* menggunakan *artificial blood feeding* dan deteksi virus dengue menggunakan teknik molekular. *Aspirator*, 2019;11(2):91-8. doi: 10.22435/asp.v11i2.460.
34. Ross PA, Callahan AG, Yang Q, Jasper M, Arif MAK, Afizah AN, Nazni WA, Hoffmann AA. An elusive endosymbiont: Does *Wolbachia* occur naturally in *Aedes aegypti*?. *Ecology and Evolution.* 2020;10:1581–91. doi: 10.1002/ece3.6012.
35. Scott L. O'Neill. The Use of *Wolbachia* by the world mosquitoes program to interrupt transmission of *Aedes aegypti* transmitted viruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2018;1062:355-60. doi: 10.1007/978-981-10-8727-1\_24.

