

BAB II. PENGENDALIAN VEKTOR NYAMUK DEMAM BERDARAH MELALUI REKAYASA GENETIKA SERTA PERSPEKTIF BIOETIKA

Suharyo^{1,2}, Bagoes Widjanarko¹

¹Program Studi Doktor Kesehatan Masyarakat FKM,
Universitas Diponegoro

²Fakultas Kesehatan, Universitas Dian Nuswantoro
suharyodkm@students.undip.ac.id; bagoes62@gmail.com
DOI: <https://doi.org/10.15294/km.v1i3.99>

Abstrak

Kasus demam berdarah telah meningkat secara tajam di seluruh dunia, meningkat lebih dari 8 kali lipat selama dua dekade terakhir. Salah satu teknik dalam pengendalian nyamuk adalah dengan rekayasa atau modifikasi genetik nyamuk. Artikel ini hasil studi literatur yang terkait dengan perkembangan teknik rekayasa genetika, aplikasi modifikasi genetika pada nyamuk, serta diskusi dari aspek bioetikanya. Teknik rekayasa genetika yang telah berkembang, antara lain manipulasi gen, teknologi rekombinan DNA, kloning gen, dan modifikasi gen. Sedangkan aplikasi rekayasa genetika pada nyamuk meliputi teknik pejantan mandul atau Teknik Serangga Mandul (TSM), intervensi nyamuk dengan gen dominan mematikan atau *release of insects with dominant lethality* (RIDL), serta intervensi gen penyandi (Gen Drives) guna mendapatkan nyamuk yang inkompeten dalam penularan agent penyakit demam berdarah. Secara laboratoris dan beberapa uji lapangan menunjukkan teknik tersebut dapat menurunkan populasi nyamuk *Aedes aegypti*. Namun permasalahan keberlanjutan dan biaya yang besar serta isu etik membayangi perkembangan teknik tersebut. Isu bioetik, etik kesehatan, dan lingkungan merupakan isu yang lekat dengan rekayasa genetika. Perubahan perilaku dan sifat nyamuk, serta dampak tak terduga pada masyarakat dan lingkungan yang mungkin ditimbulkan merupakan isu yang perlu mendapat perhatian dan penelitian lebih lanjut.

Kata kunci: Demam Berdarah, Rekayasa Genetika, TSM, RIDL, Gen Drives, Bioetika.

PENDAHULUAN

Beberapa dekade terakhir, kasus demam berdarah telah meningkat secara tajam di seluruh dunia (World Health Organization, 2021). Sebagian besar kasus tidak menunjukkan gejala atau ringan dan diobati sendiri, oleh karena itu sebenarnya jumlah kasus demam berdarah seperti fenomena gunung es, banyak tidak dilaporkan. Sebagian kasus juga kemungkinan salah didiagnosis sebagai penyakit demam lainnya (Waggoner, J.J., et al., 2016). Sebuah pemodelan menunjukkan perkiraan ada 390 juta infeksi virus dengue per tahun (95% CI, 284-528 juta), di mana 96 juta (67-136 juta) bermanifestasi secara klinis (dengan tingkat keparahan penyakit apa pun) (Bhatt, S., et al., 2013). Studi lain tentang prevalensi DBD memperkirakan 3,9 miliar orang berisiko terinfeksi virus dengue. Beban risiko infeksi ada di 129 negara (Brady, O.J., et al., 2012), 70%nya ada di Asia (Bhatt, S., et al., 2013). Jumlah kasus demam berdarah yang dilaporkan ke WHO meningkat lebih dari 8 kali lipat selama dua dekade terakhir, dari 505.430 kasus pada tahun 2000, menjadi lebih dari 2,4 juta pada tahun 2010, dan 5,2 juta pada tahun 2019. Kematian yang dilaporkan antara tahun 2000 dan 2015 meningkat dari 960 menjadi 4032, sebagian besar kejadian demam berdarah menyerang kelompok usia yang lebih muda. Jumlah total kasus insiden maupun kematian menurun selama tahun 2020 dan 2021. Namun, datanya tersebut belum lengkap dan karena situasi pandemi COVID-19, hal tersebut mungkin juga menghambat pelaporan kasus di beberapa negara (World Health Organization. 2021).

Peningkatan jumlah kasus yang mengkhawatirkan secara keseluruhan selama dua dekade terakhir merupakan dampak dari pengawasan dan pencatatan yang telah dilakukan secara sistematis dalam program surveilans yang dilakukan oleh masing-masing wilayah dan melaporkan kasus demam berdarah ke Kementerian

Kesehatan dan dilanjutkan ke WHO. Laporan tersebut menggambarkan beban penyakit demam berdarah dari masing-masing negara. Hal ini selaras dengan program surveilans dalam pemantauan perkembangan kejadian demam berdarah yang terjadi secara global (World Health Organization. 2021).

Sebelum tahun 1970, hanya 9 negara yang pernah mengalami wabah infeksi dengue. Penyakit demam berdarah, sekarang WHO mencatat lebih dari 100 negara menjadi endemik, antara lain di wilayah Afrika, Amerika, Mediterania Timur, Asia Tenggara dan Pasifik Barat. Wilayah Amerika, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat adalah kawasan yang paling parah terkena dampak, dengan Asia mewakili 70% beban penyakit secara global. Tidak hanya jumlah kasus yang meningkat, penyakit demam berdarah menyebar ke wilayah baru termasuk Eropa, dan wabah secara mendadak juga kemungkinan terjadi. Ancaman kemungkinan terjadinya wabah demam berdarah sekarang ada di Eropa. Penularan lokal dilaporkan pertama kali di Prancis dan Kroasia pada 2010 dan kasus impor terdeteksi di 3 negara Eropa lainnya. Pada tahun 2012, wabah demam berdarah di pulau Madeira Portugal prevalensinya lebih dari 2000 kasus dan kasus impor terdeteksi di daratan Portugal dan 10 negara lain di Eropa. Fokus kasus sekarang dimonitoring setiap tahun di beberapa negara Eropa (World Health Organization. 2021).

Jumlah kasus demam berdarah terbesar yang pernah dilaporkan secara global terjadi pada tahun 2019. Semua wilayah terkena dampaknya, dan untuk pertama kalinya penularan demam berdarah tercatat di Afghanistan. Wilayah Amerika telah melaporkan 3,1 juta kasus, dengan lebih dari 25.000 diklasifikasikan sebagai parah. Meskipun jumlah kasus meningkat, kematian sebagai dampak dari demam berdarah kejadiannya lebih kecil dibandingkan tahun sebelumnya. Jumlah kasus yang tinggi dilaporkan di Bangladesh (101.000), Malaysia (131.000) Filipina (420.000), dan Vietnam (320.000) di Asia (World Health Organization. 2021).

Pada tahun 2020, demam berdarah menyerang beberapa negara, dengan laporan peningkatan jumlah kasus di Bangladesh, Brasil, Kepulauan Cook, Ekuador, India, Indonesia, Maladewa, Mauritania, Mayotte (Fr), Nepal, Singapura, Sri Lanka, Sudan, Thailand, Timor-Leste dan Yaman. Demam berdarah terus terjadi di Brasil, India, Vietnam, Filipina, Kepulauan Cook, Kolombia, Fiji, Kenya, Paraguay, Peru dan, pulau Reunion, pada tahun 2021. Pandemi COVID-19 menyebabkan tekanan besar pada pembangunan kesehatan dan sistem manajemen di seluruh dunia. WHO telah menekankan pentingnya mempertahankan upaya untuk mencegah, mendeteksi dan mengobati penyakit yang ditularkan melalui vektor selama pandemi seperti demam berdarah dan penyakit arboviral lainnya, karena jumlah kasus meningkat di beberapa negara dan menempatkan populasi perkotaan pada risiko tertinggi untuk kedua penyakit tersebut. Dampak gabungan dari epidemi COVID-19 dan demam berdarah dapat memiliki konsekuensi meningkatkan populasi yang berisiko (World Health Organization. 2021). Virus dengue ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk betina yang terinfeksi, vektor utamanya adalah nyamuk *Aedes aegypti*. Spesies lain dalam genus *Aedes* juga dapat bertindak sebagai vektor yaitu *Aedes albopictus*, tetapi menjadi vektor sekunder dalam penularan penyakit demam berdarah (World Health Organization, 2011).

Setelah menghisap orang yang terinfeksi DENV, virus bereplikasi di usus tengah nyamuk, sebelum menyebar ke jaringan sekunder, termasuk kelenjar ludah. Waktu yang diperlukan dari menelan virus hingga transmisi sebenarnya ke inang baru disebut periode inkubasi ekstrinsik (EIP). EIP membutuhkan waktu sekitar 8-12 hari ketika suhu lingkungan antara 25-28°C (Tjaden, N.B., et al., 2013). Variasi masa inkubasi ekstrinsik tidak hanya dipengaruhi oleh suhu lingkungan; sejumlah faktor seperti besarnya fluktuasi suhu harian (Carrington, L.B., et al., 2013), genotipe virus (Anderson, J.R. and R. Rico-Hesse, 2006), dan konsentrasi virus

awal juga dapat mengubah waktu yang dibutuhkan nyamuk untuk menularkan virus (Ye, Y.X.H., et al., 2015).

Tidak ada pengobatan spesifik untuk demam berdarah. Pasien harus beristirahat, dapat terhidrasi dan secepatnya mencari pertolongan medis. Tergantung pada manifestasi klinis dan keadaan lain, pasien dapat dirawat di rumah, dirujuk rawat inap di rumah sakit, atau memerlukan perawatan kedaruratan. Perawatan suportif seperti penurun demam dan penghilang rasa sakit dapat dilakukan untuk mengendalikan gejala nyeri, nyeri otot, serta demam (World Health Organization. 2011).

Vaksin demam berdarah pertama, Dengvaxia® (CYD-TDV) yang dikembangkan oleh Sanofi Pasteur dilisensikan pada bulan Desember 2015 dan kini telah disetujui oleh pihak berwenang di 20 negara. Pada bulan November 2017, hasil analisis evaluasi penggunaan vaksin secara retrospektif menunjukkan bahwa subset peserta uji coba yang memiliki seronegatif pada saat vaksinasi pertama memiliki risiko lebih tinggi terkena demam berdarah yang lebih parah dan diperlukan rawat inap akibat demam berdarah dibandingkan dengan peserta yang tidak divaksinasi. Dengan demikian, penggunaan vaksin CYD-TDV disarankan ditujukan untuk orang yang tinggal di daerah endemik, berusia 9-45 tahun, yang pernah mengalami setidaknya 1 episode infeksi virus dengue di masa lalu. Beberapa kandidat vaksin dengue yang baru sedang dievaluasi. Jika sedang menderita demam berdarah, hindari gigitan nyamuk lebih lanjut selama minggu pertama sakit. Virus mungkin beredar dalam darah pada fase tersebut, oleh karena itu penderita dapat menularkan virus ke nyamuk baru yang tidak terinfeksi, selanjutnya dapat menginfeksi orang lain (World Health Organization. 2021).

Keberadaan tempat perkembangbiakan vektor nyamuk di sekitar tempat tinggal manusia merupakan faktor risiko yang signifikan untuk terjadinya demam berdarah. Saat ini, cara utama untuk mengendalikan atau mencegah penularan virus dengue adalah dengan mengintervensi vektor nyamuk. Hal tersebut dapat dilakukan melalui (World Health Organization. 2011):

1. Pencegahan perkembangbiakan nyamuk:

- a. Mencegah nyamuk bertelur di habitatnya melalui pengelolaan dan modifikasi lingkungan;
- b. Membuang barang bekas dengan benar dan menghilangkan habitat buatan yang dapat menampung air;
- c. Menutup dan membersihkan wadah penyimpanan air dalam rumah setiap minggu;
- d. Menggunakan insektisida yang sesuai pada wadah penyimpanan air di luar ruangan.

2. Perlindungan dari gigitan nyamuk:

- a. Menggunakan alat bantu perlindungan, seperti tirai jendela, repellents, coils dan vaporizers. Upaya ini harus dilakukan utamanya pada siang hari baik di dalam maupun di luar rumah (misalnya: di tempat kerja/sekolah) karena vektor nyamuk utamanya menggigit pada siang hari;
- b. Disarankan mengenakan pakaian yang meminimalkan paparan kulit terhadap nyamuk (misalkan lengan baju atau celana yang panjang);

3. Pemberdayaan Masyarakat:

- a. Mengedukasi masyarakat terkait risiko penyakit yang dibawa oleh nyamuk;
- b. Pelibatan masyarakat untuk meningkatkan partisipasi dan mobilisasi dalam pengendalian vektor yang berkelanjutan;

4. Pemantauan nyamuk dan virus aktif:

- a. Pemantauan aktif dan surveilans kepadatan vektor dan komposisi spesies harus dilakukan untuk menentukan efektivitas intervensi pengendalian;
- b. Surveilans keberadaan virus dalam populasi nyamuk, dengan skrining aktif terhadap koleksi nyamuk;
- c. Surveilans vektor dapat dikombinasikan dengan surveilans klinis dan lingkungan.

Selain itu, ada penelitian yang sedang berlangsung di antara kelompok-kelompok kolaborator internasional untuk mencari alat baru dan strategi inovatif yang akan berkontribusi dalam upaya

global untuk menghentikan penularan demam berdarah. Pendekatan manajemen vektor secara terintegrasi didorong oleh WHO untuk mencapai intervensi pengendalian vektor secara lokal yang efektif dan berkelanjutan (World Health Organization, 2021). Salah satu pengembangan dalam upaya pengendalian vektor nyamuk demam berdarah adalah melalui rekayasa genetika. Khusus untuk nyamuk *Aedes aegypti* rekayasa genetika yang dilakukan adalah dengan teknik sterilisasi serangga klasik yang dikenal dengan *Release of Insect Carrying Dominant Lethal* (RIDL). Selain itu dikembangkan pula gen lethal yang dikembangkan dari induk jantan yang nantinya berakibat keturunannya mati. Teknologi tersebut dikenal dengan *Genetically Modified Mosquito* (GMM). Kedua teknik tersebut menyusul setelah dikembangkan pejection mandul melalui intervensi sinar radiasi (World Health Organization, 2011). Perkembangan teknologi tersebut di satu sisi memberi harapan dapat bermanfaat dalam pengendalian infeksi penyakit demam berdarah. Namun di sisi lain dampak yang terjadi baik secara individu spesies maupun komunitas dan lingkungannya mungkin perlu dilakukan kajian dan perhatian kita bersama.

REKAYASA GENETIKA

Rekayasa genetika merupakan teknologi manipulasi molekul DNA atau disebut juga teknologi DNA rekombinan. Beberapa terminologi seringkali digunakan untuk menyatakan teknik rekayasa genetika yang telah berkembang, antara lain manipulasi gen, teknologi rekombinan DNA, kloning gen, dan modifikasi gen. teknologi rekayasa genetika ini dimanfaatkan dalam berbagai bidang, antara lain industri bioteknologi (utamanya pangan dan kesehatan), modifikasi gen biantang untuk tujuan tertentu, pemetaan genom, diagnosis dan pengobatan medis, forensik kasus kriminal, dan pembuktian garis keturunan. Bidang kajian dalam rekayasa atau manipulasi genetika antara lain meliputi penelitian pada struktur gen dan fungsinya, produksi protein dengan teknik mutakhir, memproduksi tanaman dan hewan transgenik untuk

keunggulan secara kuantitas dan kualitas, serta bidang diagnosis medis, pengobatan, dan pengendalian penyakit infeksi.

Perkembangan teknik rekayasa genetika telah berjalan dengan pesat, kurang lebih selama 70 tahun terakhir sejak Crick dan Watson mengawalinya pada tahun 1953 melalui penemuan proses rekayasa genetik pada saat itu. Proses tersebut terlihat canggih, namun sebenarnya melalui prinsip yang sederhana, yaitu dengan pengambilan gen atau sekelompok gen dari sebuah sel, kemudian mencangkokkannya pada gen atau sekelompok gen pada sel lain, dimana gen atau sekelompok gen tersebut mengikatkan diri dengan gen yang baru. Dan bersama-sama berproses menerima dampak dari proses biokimia dari sel penerima (Muthiadin, 2014). Terminologi lainnya adalah modifikasi genetika, merupakan perubahan pada DNA dengan cara mentransfer gen di antara makhluk hidup lain yang berbeda. Ini telah lama dilakukan secara luas di masyarakat, misalnya di bidang pertanian dengan menyilangkan antar spesies dalam satu jenis tanaman, guna mendapatkan hasil yang maksimal, misalnya yang lebih banyak, lebih besar, lebih kuat, atau lebih tahan terhadap penyakit.

Keunggulan rekayasa genetika antara lain mampu mendislokasi materi genetika dari berbagai macam sumber yang beragam tetapi dengan presisi yang tinggi dan terkendali dalam waktu yang relatif singkat. Teknologi rekayasa genetika ini, telah berhasil mengembangkan tanaman yang tahan terhadap hama pengganggu seperti serangga, penyakit dan gulma yang sangat merugikan manusia. Rekayasa genetika berfokus pada tingkat molekuler sebuah sel, khususnya DNA.

Metode dasar dalam rekayasa genetika meliputi isolasi DNA, PCR (*Polimerase Chain Reaction*), RT-PCR (*Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*), Metoda Deteksi Produk PCR, Skuensing DNA, teknik hibridisasi, dan analisis RFLP. Penjelasan singkat dari masing-masing tahapan metode dalam rekayasa genetika adalah sebagai berikut (Muthiadin, 2014):

1. Isolasi DNA

Merupakan teknik rekayasa genetik dengan cara memisahkan DNA pada kromosom atau DNA genom dari komponen sel. Penambahan detergen digunakan untuk menghancurkan membran sel, setelah itu ditambahkan protease untuk mendegradasi protein, serta penambahan RNase untuk mendegradasi RNA sehingga yang tinggal adalah DNA. Pemanasan pada ekstrak DNA dengan suhu 90 °C digunakan untuk menginaktifkan enzim yang mendegradasi DNA. Larutan DNA selanjutnya dipresipitasi dengan etanol dan dapat dilarutkan lagi dengan air.

2. PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

PCR merupakan teknik perbanyakan potongan DNA pada daerah tertentu yang antara dua buah primer oligonukleotida secara *in vitro*. Proses ini hampir sama dengan replikasi DNA secara *in vivo*. Bahan-bahan yang dibutuhkan pada proses ini antara lain DNA untai ganda yang berfungsi sebagai cetakan yang mengandung DNA yang akan diperbanyak untuk pembentukan molekul baru, deoksiribonukleosida trifosfat (dNTP), enzim DNA polimerase, dan sepasang primer oligonukleotida. Proses PCR terdiri dari tiga tahap secara berurutan, yaitu denaturasi (pemisahan) template rantai DNA, annealing (penempelan) pasangan primer di DNA target serta extension (pemanjangan) primer atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polimerase.

3. RT-PCR (*Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*)

RT-PCR merupakan bagian dari proses PCR. Perbedaannya dengan PCR biasa, pada RT-PCR ada satu siklus tambahan yaitu adanya perubahan RNA menjadi *complementary* DNA (cDNA) dengan cara menambahkan enzim Reverse Transkriptase. Enzim tersebut dapat membentuk molekul DNA secara *in vitro* dengan memakai template RNA. Bahan yang diperlukan antara lain DNA Polimerase, primer, buffer, dan dNTP, tetapi template yang digunakan adalah RNA murni.

4. Metode Deteksi Produk PCR

Hasil dari PCR adalah ampikon atau segmen DNA yang berjumlah jutaan copy, namun tidak terlihat dengan mata telanjang. Oleh sebab itu, perlu prosedur untuk dapat melihat secara visual produk

PCR agar dapat diketahui hasilnya dan apakah sudah sesuai yang diinginkan. Salah satu teknik prosedur tersebut yaitu elektroforesis gen agarosa. Media yang biasanya dipakai adalah gel agarosa atau poliakrilamid. Prosedur ini berdasar pada pergerakan molekul dalam larutan penyangga dengan pengaruh medan listrik. Elektroforesis gen agarosa ini menghasilkan pemisahan antara fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 pb, sedangkan Elektroforesis poliakrilamid dapat memisahkan yang berukuran 1 pb, dan ini biasanya digunakan dalam prosedur penentuan urutan DNA (sekuensing). Larutan DNA dalam gel agarosa apabila dialiri arus listrik, maka bergerak ke arah kutub positif, fragmen DNA yang berukuran lebih kecil akan bergerak lebih dulu, jadi mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukurannya. Agar terlihat maka ditambahkan etidium bromide, sehingga pita fragmen DNA akan terlihat jika disinari UV. Panjang aplikasi dapat diperkirakan dengan cara membandingkan dengan pita DNA standar.

5. Sekuensing DNA

Urutan asam amino protein dapat diketahui dari urutan nukleotida suatu gen. hal tersebut dapat diketahui dari metode sekuensing DNA. Saat ini sekuensing DNA lebih banyak digunakan dibanding sekuensing protein karena lebih murah. Metode sekuensing DNA yang sering digunakan yaitu dengan metode dideoksi Sanger. Tiga tahapannya antara lain pembentukan fragmen DNA untai tunggal, pemisahan fragmen dengan elektroforesis, dan pembacaan hasil.

6. Teknik Hibridisasi

Teknik ini digunakan untuk mengidentifikasi dan memisahkan fragmen DNA dari fragmen lain. Teknik ini juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi klon yang mengandung DNA sisipan. Salah satu manfaat teknik hibridisasi adalah dalam menjawab bagaimana regulasi ekspresi gen. Misalnya bagaimana sel merespon perubahan atau paparan dari lingkungan. Sel kulit yang terpapar, misalnya panas secara terus menerus, akan menghasilkan enzim (mRNA) yang akan merepair sel yang rusak karena paparan panas tadi. Pada kondisi normal, tanpa paparan, sel tidak akan

memproduksi enzim (mRNA) tadi. Melalui hibridisasi, kita dapat mendeteksi ekspresi gen yang diinduksi (misal panas). Sel kulit diambil, kemudian dikultur di laboratorium. Isolasi mRNA dari sel kulit tersebut kemudian dipisahkan dengan gel elektroforesis, kemudian ditransfer ke membrane nitroselulose, probenya dirancang (probe merupakan oligonukleotida untai tunggal yang komplemen dengan urutan DNA yang ingin dicari), selanjutnya dihibridisasi dengan probe. Dengan autoradiografi, akan terlihat ketebalan pita yang menunjukkan jumlah mRNA tertentu dalam sel.

7. Analisis RFLP

Analisis *Restriction Fragment Length polymorphism* (RFLP) merupakan marker genetik untuk membuat peta gen. Sebagian besar DNA eukariot tidak mengkode protein. Pada daerah noncoding lebih banyak terjadi mutasi dibandingkan di dalam gen, namun mutasi ini tidak berpengaruh terhadap sel, jaringan, organ dan organisme. Karena mutasi di daerah noncoding tidak berdampak pada perubahan fenotip, sehingga tidak menunjukkan perbedaan diantara individu. Dengan teknik ini banyak penemuan mutasi gen yang berhubungan dengan penyakit manusia.

Di bidang kesehatan, rekayasa genetik melalui DNA rekombinan, telah dihasilkan produk-produk biologis seperti hormone, dihasilkan dari prosedur rekayasa tersebut. Contoh produk farmasi hasil teknologi rekayasa genetika (DNA rekombinan) adalah produk insulin, hormone adenocorticotropic (untuk pengobatan rematik), alfa dan gamma interferon (untuk terapi kanker dan infeksi), Sel beta faktor pertumbuhan (untuk pengobatan kelainan imun), Erythropoietin (untuk Pengobatan anemia), Hormon pertumbuhan manusia, Lymptoxin (untuk antitumor), Vaksin hepatitis B, Interleukin-2 (untuk pengobatan kanker), Antibodi monoklonal (terapi kanker dan rejeksi transplantasi), Nerve growth factor (untuk memperbaiki syaraf yang rusak), Praurokinase (sebagai antikoagulan, dan untuk terapi serangan jantung), serta *Platelet-derived growth factor* (untuk mengobati

atherosclerosis). Selain itu teknologi rekayasa genetika juga bermanfaat untuk diagnosis penyakit infeksi dan penyakit genetik. Di bidang bioteknologi lainnya, reproduksi merupakan bidang yang terus berkembang. Inseminasi buatan dan seksing sperma, transfer embrio, bayi tabung, kriopreservasi embrio, hewan transgenik, kloning, kloning terapeutik, adalah contoh penerapan rekayasa genetika di bidang bioteknologi. Rekayasa genetika bidang bioteknologi juga dikembangkan untuk pengendalian penularan penyakit yang ditularkan oleh vektor nyamuk. Pada konteks pengendalian vektor, sebagian besar sampai saat ini berfokus pada konstruksi rekayasa untuk menekan kepadatan populasi nyamuk.

REKAYASA GENETIKA NYAMUK

1. Teknik Pejantan Mandul

Teknik serangga steril/*sterile insect technique* (SIT) didasarkan pada pelepasan serangga jantan yang disterilkan, biasanya dengan cara penyinaran radiasi, untuk menekan populasi nyamuk vektor. SIT dilakukan dengan cara menginduksi agar terjadi mutasi dan mematikan secara acak pada sel germinal, yang bekerja pada telur pada wanita untuk mencegah pembuahan. Konsepnya adalah jantan mandul akan kawin dengan betina liar tanpa menghasilkan keturunan. Tantangan utama aplikasi di lapangan adalah ketersediaan infrastruktur di daerah endemik untuk mendukung pemeliharaan vektor target dalam jumlah besar. Teknologi baru untuk pembiakan nyamuk, terutama *Aedes*, saat ini tersedia di berbagai negara; namun, prosedur dalam proses sterilisasi masih diperlukan pengembangan untuk menghindari kerusakan somatik, yang mengakibatkan umurnya menjadi lebih pendek, masalah dengan seksual, dan aktivitas nyamuk jantan pada umumnya. Meskipun hasil SIT yang menggembirakan telah diperoleh pada *A. albopictus*, namun besarnya biaya operasional masih merupakan hambatan yang signifikan untuk fasilitas pemeliharaan skala besar di negara-negara endemik (Achee et al., 2019).

Teknologi SIT sudah lama diujicobakan pada strain nyamuk *Aedes sp.* Setelah dilakukan uji coba di lapangan, faktanya teknologi ini menunjukkan hasil yang kurang memuaskan. Hal ini disebabkan karena populasi nyamuk yang subur dapat bertahan secara stabil meskipun terjadi penurunan beberapa kali lipat potensinya untuk reproduksi dari nyamuk betina. Sehingga metode SIT tidak memiliki dampak yang signifikan pada populasi target. Berdasarkan teori yang menyatakan bahwa populasi nyamuk dapat diatur terutama oleh *density-dependent effects*, di mana populasi yang sangat subur dapat dipertahankan pada tingkat yang stabil dengan keterbatasan sumber daya, misalnya ketersediaan tempat oviposisi atau nutrisi bagi larva, maka dikembangkan suatu hipotesis untuk melakukan eliminasi pada tahap selanjutnya pada siklus reproduksi nyamuk. Berdasarkan siklus hidup nyamuk, para peneliti mulai memfokuskan pada stadium larva nyamuk yang mungkin menjadi alternatif untuk upaya eliminasi populasi target (Phuc, Kim H. et al. 2007). Di Indonesia penelitian tentang teknik pejantan mandul pernah diujicobakan di Kota Semarang pada tahun 2015. Hasilnya terdapat penurunan populasi nyamuk setelah pelepasan nyamuk pejantan mandul. Keterbatasan dari teknik ini adalah keberlanjutan dan biaya yang besar. (Setiyaningsih et al., 2015)

2. Penyebaran Nyamuk dengan Gen yang Dominan Mematikan.

Strategi pelepasan serangga dengan gen dominan mematikan/*release of insects with dominant lethality* (RIDL) bertujuan mengurangi populasi vektor (pendekatan self-limiting) melalui individu yang membawa gen transgenik, yang menyasar pada stadium larva akhir dan kepompong untuk mencegah kelangsungan hidup imago. Berbeda dengan penekanan populasi berbasis SIT dan Wolbachia, untuk teknologi RIDL, telur harus dibuahi terlebih dahulu untuk mendapatkan dampak yang diinginkan (Phuc, Kim H. et al. 2007).

Teknologi rekayasa genetika yang digunakan pada RIDL adalah rekombinasi DNA. Penelitian mengenai RIDL dikembangkan Oxitec

Ltd., yang mampu menghasilkan strain transgenik pertama yang direkayasa untuk membawa gen lethal dominan. Strain ini membawa gen yang dapat mencegah siklus metamorfosis nyamuk *Aedes aegypti* dari stadium larva menuju pupa dan diperoleh hasil tingkat eliminasi populasi yang lebih besar. Strain yang pernah dikembangkan, yaitu strain *Aedes aegypti* OX3604C membawa informasi genetik yang mengakibatkan nyamuk betina yang tidak dapat terbang. Kondisi tersebut secara efektif mematikan karena nyamuk betina yang tidak dapat terbang jelas tidak mampu bereproduksi, mencari makan, atau menghindari predator alaminya pada akhirnya nyamuk ini tidak dapat berfungsi menjadi vektor dengue. Penelitian efektivitas metode RIDL dengan strain OX3604C, menunjukkan hasil dimana hampir seluruh telur hasil reproduksi nyamuk jantan *Aedes aegypti* OX3604C dengan nyamuk betina normal dalam 8 minggu membawa gen letal dominan yang diharapkan. Hal itu menunjukkan bukti bahwa metode RIDL efektif dalam mengendalikan vektor dan juga lebih ramah lingkungan bila dibandingkan dengan penggunaan insektisida. Namun tetap, aplikasinya di lapangan banyak gangguan karena persaingan perkawinan dan biaya yang masih dirasakan sangat besar.

Meskipun strategi RIDL telah maju, kekhawatirannya adalah bahwa penurunan populasi *A. aegypti* tidak disertai penurunan vektor sekundernya yaitu oleh *A. albopictus*. Sebagai catatan bahwa pengendalian populasi dengan teknik apa pun terdapat peluang adanya serangan dan penggantian oleh pesaing. Di Panama, enam bulan setelah pelepasan OX513A *A. aegypti* berhenti, tidak ada bukti penurunan kepadatan *A. Albopictus* (Achee et al., 2019).

3. Gen Penyandi (Gen drives)

Gen penyandi adalah konstruksi transgenik yang memiliki sifat untuk menyerang populasi spesies target. Penerapan konsep untuk pengendalian nyamuk dipelopori oleh Austin Burt pada awal 2003 dan sejak itu banyak dikembangkan penelitian untuk mengkonstruksi dan memodifikasi sifat yang diinginkan pada

spesies nyamuk. Desain penyandi atau gen penentu saat ini didasarkan pada Palindromic Repeats—sistem CRISPR-associated protein 9 (CRISPR-Cas9). Prinsipnya elemen transgenik harus disisipkan secara tepat dalam urutan yang disiapkan untuk dipisahkan. Untuk mencapai hal tersebut, sebuah “kaset” diintegrasikan dengan “gen knock-in”. Konsep ini dirancang untuk memasukkan dan menonaktifkan gen kesuburan spesifik jenis kelamin, menekan populasi yang menghasilkan “alel sterilitas”. Pendekatan ini dijelaskan pada sebuah studi laboratorium untuk membuktikan prinsip aplikasi pada vektor malaria Afrika *Anopheles gambiae* dan dapat dengan cepat diadaptasikan ke *A. aegypti* dan *A. albopictus*. Gen drive terbukti kurang berfungsi secara efisien di lapangan dibanding di laboratorium. Jika gen penyandi berfungsi dengan efisien di lapangan seperti dalam teori, pendekatan pengendalian ini berpotensi untuk memberantas spesies target meskipun tidak sampai mendepopulasi secara total (Achee et al., 2019).

Desain gen penyandi untuk pengendalian vektor belum optimal untuk dirilis di lapangan; sebuah gen penyandi yang menyebabkan kemandulan betina hanya akan berfungsi secara optimal jika betina benar-benar subur. Pada aplikasi konsep ini, evaluasi terhadap dampak ekologis dari pemusnahan spesies harus dipertimbangkan secara baik. Hewan dengan gen penyandi menjadi organisme baru hasil rekayasa genetika, keamanannya perlu dievaluasi menurut kriteria tertentu (National Academies of Sciences. Committee on Gene Drive Research in Non-Human Organisms. 2016).

Gen penyandi juga dapat diterapkan dalam strategi penggantian populasi yaitu dengan menggunakan kendali penggerak struktur gen untuk memberikan resistensi nyamuk terhadap patogen tertentu yang menghasilkan populasi yang menjadi resisten dari patogen. Prinsip ini telah dibuktikan di laboratorium menggunakan vektor malaria Asia *Anopheles stephensi* (Gantz VM, et al. 2015). Pada *Aedes*, konstruksi antivirus dapat dirancang dengan teknik tersebut, menargetkan satu atau beberapa virus. Peningkatan

resistensi terhadap virus tertentu tidak membuat nyamuk lebih rentan terhadap virus lainnya (Achee et al., 2019).

BIOETIKA DALAM REKAYASA GENETIKA NYAMUK

Bioetika merupakan bagian dari etika yang digunakan untuk menjelaskan dimensi etis dari semua aspek teknologi dan makhluk hidup termasuk penerapannya dalam kehidupan. Perkembangan keilmuan khususnya biologi, kesehatan, dan kedokteran yang pesat dapat menimbulkan masalah etik. Oleh karena itu diperlukan rumusan panduan dalam pengembangan dan aplikasi ilmu pengetahuan dan teknologi berupa rumusan etika ilmu pengetahuan dan etika penelitian (Murti et al., 2021).

Salah satu strategi penanggulangan penyakit demam berdarah adalah pengendalian vektor nyamuk penular. Pengembangan teknologi pengendalian vektor tidak terlepas dari penelitian uji coba baik di laboratorium maupun aplikasi di lapangan yang melibatkan nyamuk dan manusia baik langsung maupun tidak langsung. Apalagi dalam rekayasa genetika, diperlukan obyek khususnya nyamuk yang diintervensi sesuai dengan yang diinginkan dengan berbagai teknik rekayasa genetika. Eksploitasi hewan coba dalam pengujiannya telah menimbulkan berbagai macam reaksi oleh masyarakat khususnya kelompok penyayang binatang. Alasannya, dapat menimbulkan rasa sakit dan tidak nyaman bagi hewan. Oleh karena itu paling tidak mengurangi jumlah jumlah yang hewan yang digunakan jika tidak dapat digantikan dengan obyek lain. Penelitian dengan menggunakan nyamuk dalam rekayasa genetika memiliki beberapa tujuan, antara lain untuk meramalkan efek yang mungkin timbul dalam percobaan, seperti efek letal, resistensi, maupun infertilisasi. Sedangkan alasan mengapa penelitian pada nyamuk coba tetap dibutuhkan karena keragaman dari subyek penelitian dapat dikendalikan, variabel penelitian lebih mudah dikendalikan, pemilihan jenis nyamuk dapat disesuaikan dengan tujuan, dan

dapat mendapatkan informasi yang lebih mendalam dari materi yang diteliti (Jumrodah, 2017).

Penelitian yang terkait dengan hewan coba tetap harus mengacu pada norma etis, yaitu yang akan membawa pada perkembangan ilmu pengetahuan dan mafaat bagi kehidupan manusia, sebaliknya jangan sampai membawa dampak yang buruk bagi kehidupan sampai dengan kehancuran, atas dasar tersebut maka, seorang pengembang teknologi rekayasa gentika, semestinya memperhatikan prinsip-prinsip dlam memahami sisi pemanfaatan teknologi tersebut, antara lain mempunyai tanggungjawab sosial dan moral, dalam pengembangan rekayasa genetika pada nyamuk, hasilnya mampu memberi manfaat dalam penurunan angka penyakit yang ditularkan oleh nyamuk. Kemudian pada proses rekayasa dapat menunjukkan penjelasan tentang hasil dan mampu memprediksi dampaknya (Jumrodah, 2017).

Pada tahap ujicoba rekayasa, tetap memperhatikan prinsip-prinsip etika ujicoba pada hewan, antara lain tiga pilar prinsip etik penelitian yaitu 1. *Respect for animal* dimana harus ada aspek menghormati hewan tersebut; 2. *Beneficence*, yaitu tetap bermnafaat bagi manusia dan makhluk lain; 3. *Justice*, yaitu bersikap adil dalam memanfaatkan hewan percobaan. Khusus penggunaan hewan coba ada tiga prinsip yang perlu diperhatikan bagi seorang peneliti atau ilmuwan, antara lain; 1. *Reduction*, yaitu penggunaan hewan dalam jumlah sedikit mungkin tetapi tetap dapat membuktikan hasil yang sah; 2. *Replacement*, yaitu sedapat mungkin mengganti hewan coba dengan obyek lain seperti organ atau jaringan atau dapat pula dengan simulasi pada komputer; 3. *Refinement*, mengurangi rasa stress atau dengan melakukan prosedur secara benar oleh tenaga ahli teknisi yang terlatih. Selain prinsip-prinsip tersebut, hewan coba juga harus dipastikan terbebas dari: 1. Kelaparan dan kurang air; 2. Rasa nyeri, trauma, dan penyakit; 3 Ketidaknyamanan pada lingkungan atau kondisi kandang; 4. Ketakutan dan kesusahan; serta 5. Bebas mengekspresikan tingkah laku alaminya (Jumrodah, 2017).

Secara ringkas, ada dua pendekatan untuk menghasilkan nyamuk berbasis modifikasi genetik yang paling banyak mendapat perhatian yaitu; 1) memodifikasi nyamuk jantan sehingga tidak dapat menghasilkan keturunan yang infertil atau pejantan madul, dan 2) memodifikasi nyamuk jantan dan betina agar inkompeten sehingga tidak mampu menularkan penyakit tertentu (World Health Organisasi. 2014, Servick. 2016).

Pada konteks rekayasa genetika nyamuk, ada beberapa hal yang menjadi catatan. Terkait kemanfaatan, teknologi rakayasa genita tersebut secara teoritis dan laboratoris, mampu menghasilkan spesies nyamuk yang secara umum mampu menurunkan angka kepadatan populasi nyamuk baik melalui rekayasa gen penyandi, lethal gen, maupun pejantan infertil. Kepadatan nyamuk jika dikendalikan pada titik tertentu akan meminimalkan transmisi agent penyakit, khususnya virus dengue pada penyakit demam berdarah. Sehingga diharapkan angka kasusnya juga turun. Uji coba lapangan nyamuk Oxitec berhasil menurunkan populasi nyamuk *Aedes aegypti* 80-95% dan kasus demam berdarah sebanyak 91%. Oxitec telah menguji pendekatan ini di beberapa bagian Brasil, Kepulauan Cayman, dan Malaysia (Carvalho, et al. 2015, Oxitec. 2016).

Kedua pendekatan modifikasi genetik pada nyamuk tersebut dapat memberikan manfaat dan risiko yang berbeda bagi masyarakat dan lingkungan. Manfaat dari pendekatan pertama bagi masyarakat adalah dapat mengurangi prevalensi penyakit yang ditularkan nyamuk. Karena nyamuk jantan tidak menggigit, pendekatan ini tidak menimbulkan risiko infeksi dari gigitan nyamuk yang telah dimodifikasi secara genetik. Risiko lingkungan yang kemungkinan timbul dari pendekatan ini adalah dapat mengganggu rantai makanan secara drastis dimana terjadi pengurangan atau menghilangkan populasi nyamuk *Aedes aegypti*, yang merupakan sumber makanan penting bagi amfibi, kelelawar, burung, ikan, serangga, dan reptil. Namun, ada kemungkinan bahwa hewan-hewan tersebut masih dapat menyesuaikan diri dengan hilangnya

sumber makanan dari spesies nyamuk (Macer. 2005, Organisasi Kesehatan Dunia. 2014).

Manfaat pendekatan kedua bagi masyarakat adalah dapat mengurangi prevalensi penyakit yang dibawa nyamuk dengan membuat nyamuk inkompeten dalam menularkan penyakit. Risiko yang mungkin ditimbulkan ke masyarakat adalah modifikasi genetik tidak berfungsi sebagaimana mestinya dan secara teoritis dapat meningkatkan prevalensi beberapa jenis penyakit yang dibawa nyamuk. Misalnya, modifikasi genetik dapat meningkatkan resistensi malaria tetapi meningkatkan kerentanan demam kuning. Risiko lain yang mungkin berdampak ke adalah mekanisme gen-gen penyandi yang digunakan untuk meningkatkan prevalensi gen sasaran dalam populasi dapat ditularkan ke spesies lain oleh virus, dengan efek yang tidak dapat diduga pada kesehatan manusia dan lingkungan (Organisasi Kesehatan Dunia, 2014, National Academy of Sciences, 2016).

Terdapat isu etika terkait modifikasi genetik pada nyamuk untuk pengendalian penyakit baik di tingkat individu, komunitas, maupun lingkungan, antara lain (Macer 2005, Resnik 2012, Forthcoming, World Health Organization 2014): Persetujuan individu dan masyarakat: Apakah individu dan masyarakat yang berada pada lokasi sasaran intervensi memiliki hak untuk memutuskan apakah mereka bersedia atau menolak terpapar nyamuk transgenik? Bagaimana seharusnya hak tersebut diakomodasi demi kepentingan masyarakat dalam rangka peningkatan kesehatan masyarakat? Apakah persetujuan individu hanya diperlukan untuk orang-orang yang akan menjadi subjek penelitian yang terkait dengan uji coba lapangan?. Bagaimana seharusnya peneliti atau pimpinan wilayah melibatkan masyarakat setempat? Pelibatan organisasi sosial dan lembaga swadaya masyarakat perlu dilakukan dalam mempersiapkan aplikasi intervensi modifikasi genetik nyamuk di lapangan. Risiko lingkungan: Apa dampak lingkungan yang mungkin muncul dari percobaan lapangan nyamuk yang dimodifikasi genetiknya? Bagaimana evaluasi dari dampak tersebut? Haruskah peningkatan

derajat kesehatan masyarakat dilakukan dengan mengorbankan lingkungan? Apakah memasukkan nyamuk dengan modifikasi genetik ke alam liar dapat menjadi preseden berbahaya bagi lingkungan?. Dari pertanyaan-pertanyaan tersebut, masalah yang mungkin dapat ditimbulkan pada uji lapangan nyamuk yang termodifikasi genetik di tingkat individu, komunitas, dan lingkungan, tidak dapat diatasi dengan kebijakan yang hanya berfokus pada etika klinis, penelitian, atau lingkungan. Untuk mengatasi masalah ini, perlu menggunakan kerangka kerja yang lebih komprehensif, seperti etika kesehatan masyarakat dan atau etika kesehatan lingkungan. Mengapa demikian, karena cara berpikir yang berbeda antara bioetika, etika kesehatan, dan lingkungan.

SIMPULAN

Teknik modifikasi atau rekayasa genetika pada nyamuk dalam pengendalian penyakit demam berdarah dapat memberikan manfaat dengan menurunkan populasi nyamuk. Namun demikian, teknik tersebut masih perlu mendapatkan jawaban tentang isu etik terkait bioetika, etika kesehatan dan lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Achee, N.L., Grieco, J.P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-Ng, L., Martins, A.J., Juntarajumnong, W., Corbel, V., Gouagna, C., David, J.P., Logan, J.G., Orsborne, J., Marois, E., Devine, G.J., & Vontas, J., 2019. Alternative Strategies for Mosquito-Borne Arbovirus Control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), pp.1–22.
- Anderson, J.R., & R. Rico-Hesse., 2006. *Aedes aegypti* Vectorial Capacity is Determined by The Infecting Genotype of Dengue Virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5), pp.886-892.
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R.W., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J., & Hay, S.I., 2013. The

- Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature*, 496(7446), pp.504–507.
- Brady, O.J., Gething, P.W., Bhatt, S., Messina, J.P., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Moyes, C.L., Farlow, A.W., Scott, T.W., & Hay, S.I., 2012. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), pp.e1760.
- Carvalho, D.O., McKemey, A.R., Garziera, L., Lacroix, R., Donnelly, C.A., Alphey, L., Malavasi, A., & Capurro, M.L., 2015. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), pp.e0003864.
- Carrington, L.B., Armijos, M.V., Lambrenshs, L., & Scott, T.W., 2013. Fluctuations at Low Mean Temperatures Accelerate Dengue Virus Transmission by *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), pp. e2190.
- Gantz, V.M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V.M., Bier, E., et al. 2015. Highly Efficient Cas9- Mediated Gene Drive for Population Modification of the Malaria Vector Mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(49), pp.6736.
- Jumrodah., 2017. Pandangan Aksiologi Memanfaatkan Hewan Coba (Animal Research) Di Laboratorium. *Academia*, 1(2), pp.20–30.
- Macer, D., 2005. Ethical, Legal and Social Issues of Genetically Modifying Insect Vectors for Public Health. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(7), pp.649–660.
- Murti, A.B., Alvionita, D., & Gani, A.R.F., 2021. Prinsip Etika dalam Penelitian Biologi. *Jurnal Pendidikan Biologi Undiksha*, 8(3), pp.95–101.
- Muthiadin, C., 2014. Pengantar Rekayasa Genetika. *Penganta Rekayasa Genetika*. Aiauddin University Press.
- National Academy of Sciences., 2016. *Gene Drives on the Horizon: Advancing Science. Navigating Uncertainty, and Aligning Research with Public Values*. Washington, DC: National Academies Press.
- Oxitec., 2016. *Press Release, 14 July 2016: Dengue Fever Cases Drop 91% in Neighbourhood of Piracicaba, Brazil, where Oxitec's Friendly™ Aedes were Released.*

- Phuc, H.K., Andreasen, M.H., Burton, R.S., Vass, C., Epton, M.J., Pape, G., Fu, G., Condon, K.C., Scaife, S., Donnelly, C.A., Coleman, P.G., White-Cooper, H., & Alphey, L., 2007. Late-acting Dominant Lethal Genetic Systems and Mosquito Control. *BioMed Central*, 5(11), pp.1-11
- Resnik, D.B., 2012. *Environmental Health Ethics*. Cambridge. UK: Cambridge University Press.
- Servick, K., 2016. Winged Warriors. *Science*, 354(6309), pp.164-167.
- Setiyaningsih, R., Agustini, M., & Rahayu, A., 2015. Pengaruh Pelepasan Nyamuk Jantan Mandul Terhadap Fertilitas dan Perubahan Morfologi Telur *Aedes aegypti*. *Vektora : Jurnal Vektor Dan Reservoir Penyakit*, 7(2), pp.71-78.
- Tjaden, N.B., Thomas, S.M., Fischer, D., & Beierkuhnlein, C., 2013. Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 7(6), pp.5.
- World-Health-Organization., 2011. Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. *WHO Regional Publication SEARO* (Issue 1).
- World-Health-Organization., 2014. *Guidance Framework for Testing of Genetically Modified Mosquitoes*. Geneva. Switzerland: World Health Organization.
- World-Health-Organization., 2021. Dengue and Severe Dengue Key Facts. *World Health Organization, January*, pp. 1-13.
- Waggoner, J.J., Gresh, L., Vargas, M.J., Ballesteros, G., Tellez, Y., Soda, K.J., Sahoo, M.K., Nunez, A., Balmaseda, A., Harris, E., & Pinsky, B.A., 2016. *Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected with Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus*. *Clin Infect Dis*, 63(2), pp. 1584-1590.
- Ye, Y.X.H., Carrasco, A.M., Frentiu, F.D., Chenoweth, S.F., Beebe, N.W., Hurk, A.F.-v.-d., Simmons, C.P., O'Neill, S.L., & McGraw, E.A., 2015. Wolbachia Reduces the Transmission Potential of Dengue- Infected *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), pp.e0003894.