

Original Article

Deteksi coronavirus pada kelelawar di Kabupaten Lamongan

Muhammad Badrut Tamam, Aisyah Hadi Ramadani, M. Ainul Mahbubillah*

Program Studi S1 Biologi, Fakultas Sains, Teknologi dan Pendidikan, Universitas Muhammadiyah Lamongan, 62218

*Correspondence: ainul.mahbubillah@hotmail.com

Received: November 11th, 2021; Accepted: March 14th, 2022; Published online: March 24th, 2022

Abstrak

Tujuan: Memperoleh informasi keberadaan coronavirus pada kelelawar untuk mencari kemungkinan munculnya reservoir penyakit baru maupun reservoir penyakit yang belum dilaporkan di Kabupaten Lamongan. Penelitian ini dapat digunakan oleh pemangku kebijakan sebagai dasar perencanaan dan evaluasi program pengendalian penyakit serta bagi peneliti dapat digunakan untuk desain vaksin dan obat, filogenetika virus, analisis sebaran virus, dan *database* virus.

Metode: Pengambilan sampel dilakukan di 3 titik yang mewakili tipe habitat berbeda. Titik pertama di Gua Pucakwangi Babat lamongan, yang kedua adalah di daerah pantai Paciran Lamongan, dan yang terakhir adalah di Hutan Mantup Lamongan. Pengambilan sampel dilakukan menggunakan *mist net* dengan bantuan tenaga lokal. Kelelawar yang terjaring ditangkap dan dimasukkan pada kantong kain blacu. Parameter yang diamati meliputi jenis kelamin, morfometri, spesies, dan deteksi keberadaan coronavirus. Deteksi virus menggunakan metode swab orofaring yang kemudian RNA sampel diuji RT-PCR dan sekuensing. Adapun *primer* yang digunakan untuk mendeteksi coronavirus yakni *primer forward* 5'-CACGCAACTTGTGTAATGCGTCAGAGA-3' dan *primer reverse* 5'-CACGTGCTTTTGCAGGCACTATACGAC-3'.

Hasil: Lima spesies kelelawar didapatkan dari 3 titik sampling yaitu *Taphozous melanopogon*, *Chaerophon* sp., *Hipposideros* sp., *Cynopterus* sp., dan *Macroglossus* sp. Pengujian RT-PCR pada sampel G1, G6, G8, P1, P2, P3, H1, H3, dan H6, menunjukkan bahwa tidak ada fragmen DNA Coronavirus yang teramplifikasi.

Kesimpulan: Hasil negatif pada deteksi Coronavirus dengan uji molekuler bukan merupakan indikator bahwa tidak ada potensi spesies *Taphozous melanopogon*, *Chaerophon* sp., *Hipposideros* sp., *Cynopterus* sp., *Macroglossus* sp. sebagai reservoir Coronavirus. Penambahan jumlah sampel dan perluasan wilayah studi masih diperlukan untuk memperoleh data yang lebih lengkap.

Kata Kunci: Coronavirus; Genom; Kelelawar; Lamongan

Abstract

Objective: To obtain information about the presence of coronavirus in bats to find potential of new disease reservoir as well as not yet reported disease reservoir in Lamongan District. This research can be used by the government as a basis for planning and evaluating disease control programs and for researchers it can be used for vaccine and drug design, viral phylogenetic, analysis of viral distribution, and viral databases.

Methods: Sampling was carried out at 3 points representing different habitat types. The first point is at Pucakwangi Cave Babat Lamongan, the second is at Paciran Lamongan beach area, and the last is

at the Mantup Forest Lamongan. Sampling was carried out using a mist net with the help of local workers. The netted bats were caught and put in a bag. Parameters observed included gender, morphometry, species, and detection of the presence of coronavirus. Detection of the virus using the oropharyngeal swab method, then the RNA samples were tested by RT-PCR and sequencing. The primer used to detect the coronavirus is primer forward 5'-CACGCAACTTGTGTAATGCGT CAGAGA-3' and primer reverse 5'-CACGTGCTTTTGCAGGCACTATACGAC-3'.

Results: Five species of bats obtained from 3 sampling locations namely *Taphozous melanopogon*, *Chaerophon* sp., *Hipposideros* sp., *Cynopterus* sp., *Macroglossus* sp. RT-PCR test of sample G1, G6, G8, P1, P2, P3, H1, H3, and H6, shows that no coronavirus from DNA sample amplified.

Conclusions: Negative result of Coronavirus detection by molecular analysis is not an indicator of no potential of species *Taphozous melanopogon*, *Chaerophon* sp., *Hipposideros* sp., *Cynopterus* sp., and *Macroglossus* sp. as a Coronavirus reservoir. Increasing the number of samples and expansion of study area still needed to obtain more comprehensive data.

Keywords: Bat; Coronavirus; Genome; Lamongan

PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara megabiodiversitas memiliki keanekaragaman berbagai fauna. Salah satu fauna mamalia yang mampu terbang yakni kelompok kelelawar (Chiroptera). Jumlah kelelawar di Indonesia setidaknya terdapat 238 jenis [1]. Keberadaan kelelawar tersebut secara ekosistem memiliki peranan penting di wilayah tropis seperti penyerbuk bunga, penyebar biji dan mengendalikan populasi serangga. Berdasarkan evolusinya, kemampuan terbang kelelawar membantu proses aktivasi sistem imun kelelawar yang mampu merespon infeksi virus [2]. Kelelawar merupakan reservoir alami dari berbagai macam virus mulai dari virus tidak berbahaya hingga virus mematikan seperti ebola. Studi menunjukkan bahwa lebih dari 60 jenis virus ditemukan di kelelawar dan memiliki potensi zoonosis ke manusia [3,4]. Salah satu kelompok virus yang ditemukan di kelelawar yakni Rabies [5], campak, gondongan, parainfluenza, hepatitis C [6,7], dan coronavirus. Dalam kurun dua dekade sejak 2002, muncul beberapa wabah yang disebabkan oleh coronavirus yakni SARS-CoV, MERS-CoV, dan SARS-CoV-2 yang semuanya diduga berasal dari virus di kelelawar.

Permasalahan kesehatan di dunia selain disebabkan oleh penyakit tidak menular juga penyakit menular. Penyakit menular yang muncul memiliki efek besar pada kesehatan manusia dan dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang luar biasa. Sebagian besar penyakit menular disebabkan oleh zoonosis

dimana 70% berasal dari hewan liar [8]. Kelelawar merupakan hewan liar yang memiliki potensi untuk menyebabkan munculnya sejumlah penyakit meliputi rabies, Hendra virus, Ebola, Nipah, Marburg, severe acute respiratory syndrome (SARS), Middle East respiratory syndrome (MERS) coronaviruses (CoVs) dan SARS-CoV [3], [9–12]. Data penelitian mengenai coronavirus pada kelelawar di Indonesia masih sangat minim sehingga diperlukan pemutakhiran data terkait coronavirus pada mamalia terbang tersebut. Keberadaan coronavirus pada kelelawar dapat dideteksi dengan menggunakan teknologi *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) [13]. Coronavirus mudah dideteksi dengan teknologi tersebut berkaitan dengan karakter virus yang tergolong RNA-virus dengan ukuran genom 16-31 kb, dari ordo Nidovirales, famili Coronaviridae [11]. Penelitian sebelumnya dilakukan di Provinsi Gorontalo ditemukan coronavirus pada kelelawar jenis *Dobsonia mollucensis* dan *Pteropus alecto* [13,14].

Kabupaten Lamongan secara geografi terletak di Pantai Utara, Jawa Timur. Kabupaten ini memiliki bentang ekosistem yang kompleks mulai dari ekosistem pantai, ekosistem hutan, ekosistem lahan basah dan ekosistem karst. Keberadaan karst di Kabupaten Lamongan juga mendukung adanya topografi gua yang umumnya dihuni oleh berbagai koloni kelelawar. Kombinasi beragamnya tipe ekosistem di kabupaten ini serta kemampuan jelajah kelelawar yang cukup jauh diharapkan dapat memberikan

sumbasih data keberadaan coronavirus dari satwa liar tersebut.

Penelitian ini bertujuan memperoleh informasi keberadaan coronavirus yang ada di kelelawar untuk mencari kemungkinan munculnya reservoir penyakit baru maupun reservoir penyakit yang belum dilaporkan. Pada penelitian ini juga diharapkan memperoleh manfaat antara lain data dapat digunakan oleh pemangku kebijakan sebagai dasar perencanaan dan evaluasi program pengendalian penyakit. Serta bagi peneliti dapat digunakan untuk desain vaksin dan obat, filogenetika virus, analisis sebaran virus dan *database* virus.

MATERI DAN METODE

Lokasi penelitian

Pengambilan sampel kelelawar dilakukan di tiga tipe habitat di Kabupaten Lamongan antara lain gua, pantai, dan hutan (Gambar 1). Lokasi gua berada di Gua Kelelawar Desa Pucakwangi Kecamatan Babat Kabupaten Lamongan dengan koordinat GPS -7.130570, 112.171601. Lokasi pantai berada di desa Paciran Kecamatan Paciran Kabupaten Lamongan dengan koordinat GPS -6.867858, 112.359360. Sedangkan lokasi hutan dilakukan di desa Mantup Kecamatan

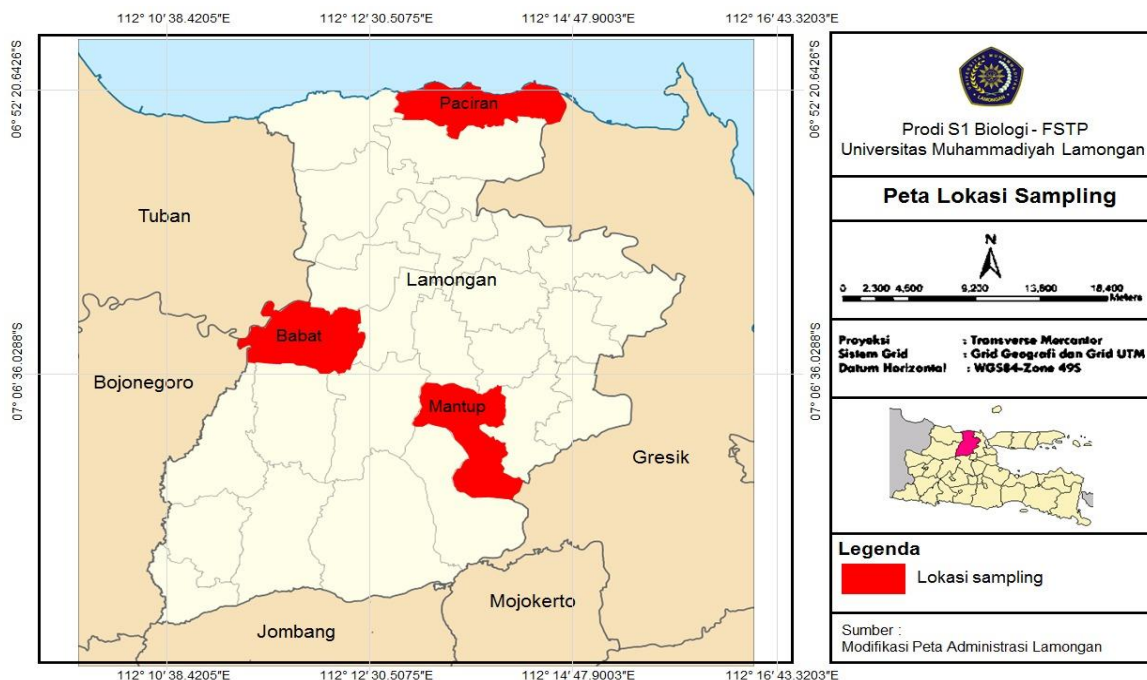
Mantup Kabupaten Lamongan dengan koordinat GPS -7.270802, 112.358078.

Penangkapan kelelawar

Penangkapan kelelawar menggunakan dua metode yaitu aktif dan pasif. Penangkapan secara aktif dilakukan pada sampel gua dengan mengambil kelelawar secara langsung di habitat gua. Sedangkan penangkapan secara tidak langsung atau pasif dilakukan pada sampel di habitat pantai dan hutan dengan menggunakan jaring kabut (*mist net*). Jaring kabut dipasang di lintasan atau jalur terbang kelelawar dengan ketinggian 1-6 meter dengan menggunakan bambu atau diikatkan pada pohon. Pemasangan jaring dilakukan pada sore hari sebelum malam. Selanjutnya pemanenan kelelawar dilakukan antara pukul 19.00 - 22.00 WIB. Setiap individu kelelawar yang tertangkap dimasukkan ke kantong kain blacu dan diberi kode [15].

Pengambilan sampel virus

Sebelum dilakukan pengambilan sampel, kelelawar diperlakukan dibius secara inhalasi. Bahan pembiusan menggunakan isoflurane 0,5 cc yang diteteskan ke kapas dan ditutup dengan *tea ball*. Kelelawar dalam kantong blacu diambil satu per satu kemudian dimasukkan



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel di Kabupaten Lamongan (Gua, Pantai, dan Hutan).

ke dalam kotak plastik bersamaan dengan bahan pembiusan selama 2-3 menit. Apabila kelelawar tidak ada respon, maka telah terbius. Ketika kelelawar dalam kondisi terbius, maka pengambilan sampel virus dilakukan secara swab di tenggorokan bagian belakang (*oropharynx*). Ujung stik swab steril dimasukkan dengan gerakan memutar dengan menyentuh langit-langit *oropharynx*. Selanjutnya memasukkan hasil ujung swab stick ke dalam viral transport medium (VTM) dari Shijiazhuang Kangweishiji Medical Equipment dengan Nomor Izin Kemenkes 10302120916. Kelelawar yang sudah sadar selanjutnya dilepasliarkan kembali [12].

Uji molekuler

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan QIAamp Viral RNA Mini Kit. Mekanisme isolasi sesuai dengan instruksi yang tercantum di kemasan. Alikuot 140 μ L VTM diberi 560 μ L campuran buffer AVL dan carrier RNA ke dalam tube 1,5 ml. Selanjutnya, dilakukan homogenisasi dengan vortex selama 15 detik dan dilanjutkan inkubasi suhu ruang selama 10 menit. Tahapan berikutnya dilakukan *spin down* singkat kemudian diberi 560 μ L etanol 96% dan dilanjutkan vortex selama 15 detik. Larutan selanjutnya dipindahkan ke beberapa QIAamp Mini column sehingga diperoleh hasil ekstraksi RNA yang disimpan di suhu -80°C.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan sembilan sampel hasil ekstraksi RNA dari kelelawar. Komponen reaksi transkripsi balik dan amplifikasi terdiri dari 5 μ L template RNA, 8 μ L reagen RT-PCR PreMix Kit (iNtRON Biotechnology, Inc.), 5 μ L *Rnase-free water*, dan primer untuk target gen *RdRp* dan

gen helikase yang merupakan region lestari (*conserve*) pada Coronavirus yang terdiri dari 1 μ L primer *forward* 5'-CACGCAACTTGTTGTAATGCGTCAGAGA-3' dan 1 μ L primer *reverse* 5'-CACGTGCTTTTGCAGGCACTATACGAC-3' [13]. Proses transkripsi balik RNA dan amplifikasi dilakukan secara konvensional menggunakan PCR Thermal Cycler Dice TP600 dengan tahapan awal dimulai dengan reaksi transkripsi balik pada suhu 45°C selama 30 menit untuk pembentukan cDNA. Selanjutnya dilakukan denaturasi hibrid RNA:cDNA pada suhu 94°C selama 5 menit. Tahapan berikutnya proses amplifikasi sebanyak 40 siklus yang terdiri dari denaturasi (94°C selama 30 detik), penempelan primer (55°C selama 30 detik), elongasi (72°C selama 1 menit) dan pasca elongasi (72°C selama 5 menit) [16]. Elektroforesis hasil PCR menggunakan gel agarose 1,5% dan pewarna GelRed® Nucleic Acid Stain 10000X Water (Merck). Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 volt selama 30 menit. Hasil visualisasi pada gel menggunakan UV illuminator kemudian difoto menggunakan kamera digital.

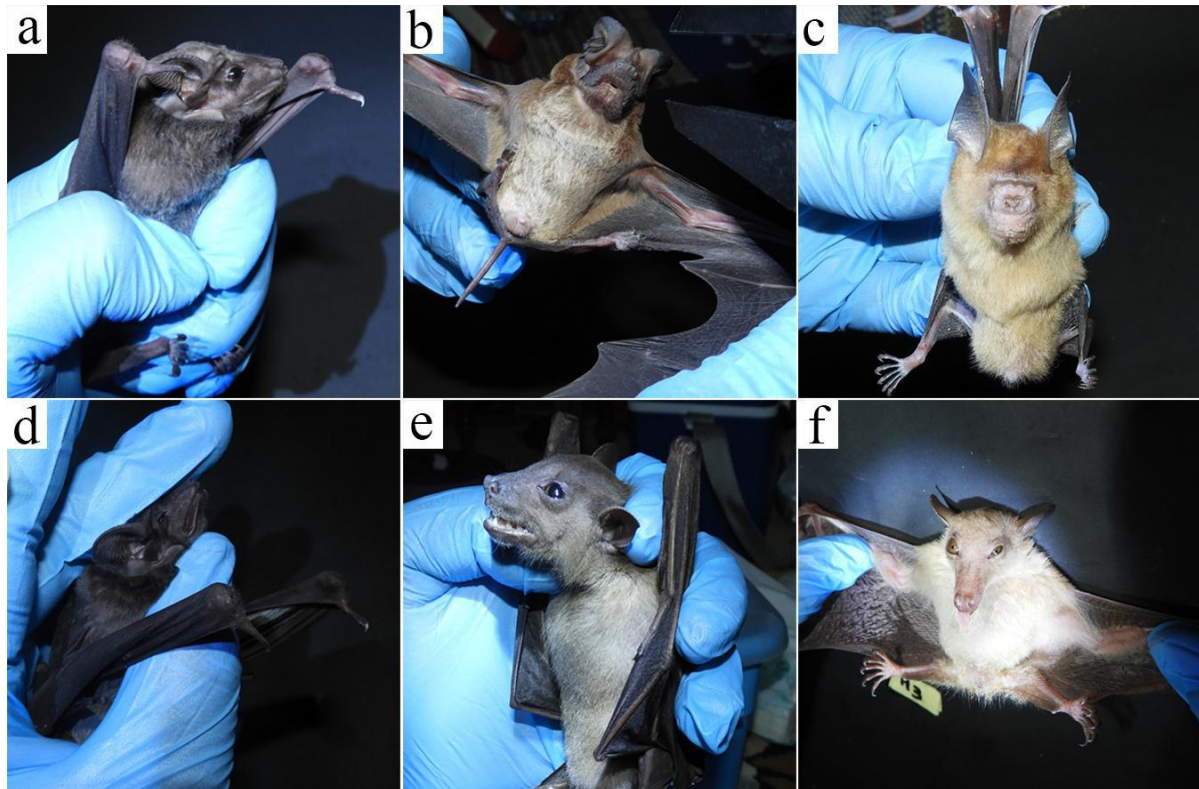
HASIL

Jenis-jenis kelelawar yang terdata dalam penelitian ini antara lain pada ekosistem gua didapatkan *Taphozous melanopogon*, *Chaerophon* sp. dan *Hipposideros* sp. Ekosistem pantai didapatkan *Taphozous* sp., sedangkan pada ekosistem hutan didapatkan *Cynopterus* sp. dan *Macroglossus* sp. Data jumlah disajikan di Tabel 1 dan gambar kelelawar tiap jenisnya disajikan di Gambar 2.

Pengujian sampel PCR dilakukan pada perwakilan genus kelelawar yang diperoleh di

Tabel 1. Data pengambilan sampel kelelawar di 3 lokasi

Spesies	Jumlah	Lokasi	Jumlah sampel yang diuji
<i>Taphozous melanopogon</i>	4	Gua	1
<i>Chaerophon</i> sp.	3	Gua	1
<i>Hipposideros</i> sp.	2	Gua	1
<i>Taphozous</i> sp.	13	Pantai	3
<i>Cynopterus</i> sp.	3	Hutan	1
<i>Macroglossus</i> sp.	4	Hutan	2



Gambar 2. Jenis-jenis kelelawar di Kabupaten Lamongan. (a) *Taphozous melanopogon*, (b) *Chaerophon* sp., (c) *Hipposideros* sp, (d) *Taphozous* sp., (e) *Cynopterus* sp., (f) *Macroglossus* sp.

setiap habitatnya. Sampel cuplikan dari habitat gua (G1, G6, G8), pantai (P1, P2, P3) dan hutan (H1, H3, H6) menunjukkan bahwa tidak ada fragmen cDNA dari gen pada Coronavirus yang teramplifikasi selama proses PCR (Gambar 3).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua spesies kelelawar yang diperiksa dengan menggunakan uji molekuler hasilnya negatif terhadap coronavirus. Hasil ini juga sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Anindita *et al.*, [13] pada sampel kelelawar pemakan buah di Surabaya yang dekat dengan Kabupaten Lamongan.

Potensi adanya coronavirus pada kelelawar di lokasi penelitian tetap ada karena beberapa spesies kelelawar memiliki potensi sebagai reservoir virus tersebut. Sebagai contoh, *Cynopterus brachyotis* pernah ditemukan jenis coronavirus baru di Singapura [17]. Kelelawar *Hipposideros* sp. di Laos dan *Macroglossus* sp. di Kamboja juga pernah terdeteksi coronavirus [18]. Adapun

penelitian yang dilakukan oleh Maryanto *et al.*, [1] juga ditemukan coronavirus pada kelelawar *Cynopterus brachyotis* di Jawa Tengah dan Yogyakarta. Spesies-spesies yang pernah dilaporkan terdeteksi oleh coronavirus tersebut juga ditemukan di Kabupaten Lamongan.

Metode PCR dilakukan oleh Nziza *et al.*, [19] berhasil mengidentifikasi keberadaan RNA coronavirus pada kelelawar yang terdistribusi di Kenya, Afrika. Penelitian tersebut menemukan kelelawar yang berhabitat di lahan pertanian paling banyak membawa coronavirus. Valitutto *et al.*, [20] menambahkan bahwa dengan PCR dari swab oral, rectal, dan guano efektif mendeteksi coronavirus jenis baru di Myanmar yang dibawa oleh vektor kelelawar. Penelitian ini menggunakan metode PCR untuk mendeteksi coronavirus dengan menggunakan metode RT-PCR (*reverse transcription PCR*) dimana mampu mendeteksi keberadaan coronavirus pada kelelawar.

Keterbatasan penelitian ini adalah jumlah sampel yang sangat terbatas (sembilan sampel) serta hanya menggunakan satu jenis



Gambar 3. Visualisasi hasil PCR melalui elektroforesis. DNA Ladder promega 100 bp (1) G1 (2), G6 (3), G8 (4), P1 (5), P2 (6), P3 (7), H1 (8), H3 (9), H6 (10).

primer. Tidak hanya dua faktor tersebut, jenis swab yang digunakan (*rectal swab* atau *oral swab*), jumlah titik sampling, variasi habitat, dan cuaca saat sampling juga menentukan potensi keberhasilan mendeteksi keberadaan virus lebih tinggi [21].

KESIMPULAN

Deteksi coronavirus pada sampel kelelawar yang diperoleh dari tiga tipe habitat di Kabupaten Lamongan menggunakan uji molekuler tidak berhasil memperoleh keberadaan RNA coronavirus. Hasil negatif bukan indikator bahwa tidak ada potensi spesies *Taphozous melanopogon*, *Chaerophon* sp., *Hipposideros* sp., *Cynopterus* sp., *Macroglossus* sp. sebagai reservoir Coronavirus, masih diperlukan penambahan jumlah sampel dan perluasan wilayah studi untuk memperoleh data yang lebih lengkap. Deteksi Coronavirus dengan uji molekuler sebagai upaya peringatan dini untuk mengantisipasi kejadian zoonosis.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan apapun pada penulisan paper ini.

UCAPAN TERIMAKASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, Dan Teknologi Direktorat Jenderal

Pendidikan Tinggi, Riset, Dan Teknologi atas pendanaan yang diberikan dengan Skema PDP perjanjian kontrak nomor 068/E4.1/AK.04.PT/2021, Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga, dan Laboratorium Universitas Muhammadiyah Lamongan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Maryanto, I., A. A. S. Maharadatunkamsi, S. Wiantoro, E. Sulityadi, M. Yoneda, A. Suyanto, and J. Sugardjito. 2019. Checklist of the mammals of Indonesia: Scientific, English, Indonesian name, and distribution area table in indonesia including CITES, IUCN and Indonesian category for conservation. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor.
2. Zhang, G., C. Cowled, Z. Shi, Z. Huang, K. A. Bishop-Lilly, X. Fang, J. W. Wynne, Z. Xiong, M. L. Baker, W. Zhao, and Tachedjian, M. 2013. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science*. 339:456–460. Doi: 10.1126/science.1230835
3. Calisher, C. H., J. E. Childs, H. E. Field, K. v Holmes, and T. Schountz. 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical microbiology reviews*. 19:531–545. Doi: 10.1128/CMR.00017-06
4. Luis, A. D., D. T. S. Hayman, T. J. O'Shea, P. M. Cryan, A. T. Gilbert, J. R. C. Pulliam, J. N. Mills, M. E. Timonin, C. K. R. Willis, A. A. Cunningham, and Fooks, A. R. 2013. A comparison of bats and rodents as

- reservoirs of zoonotic viruses: are bats special?. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 280:20122753. Doi: 10.1098/rspb.2012.2753.
5. Pawan, J. L. 1936. Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and the latency of infection. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* 30(4):401-422. Doi: 10.1080/00034983.1936.1684948
 6. Drexler, J. F., V. M. Corman, M. A. Müller, G. D. Maganga, P. Vallo, T. Binger, F. Gloza-Rausch, V. M. Cottontail, A. Rasche, S. Yordanov, and A. Seebens. 2012. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nature communications.* 3(1):1-13. Doi: 10.1038/ncomms1796
 7. Quan, P. L., C. Firth, J. M. Conte, S. H. Williams, C. M. Zambrana-Torrel, S. J. Anthony, J. A. Ellison, A. T. Gilbert, I. V. Kuzmin, M. Niezgod, and M. O. Osinubi. 2013. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 110 (20):8194-8199. Doi: 10.1073/pnas.1303037110
 8. Cutler, S. J., A. R. Fooks, and W. H. M. der Poel. 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging infectious diseases.* 16:1. Doi: 10.3201/eid1601.081467
 9. Field, H. E., P. C. Barratt, R. J. Hughes, J. Shield, and N. D. Sullivan. 2000. Fatal case of Hendra virus infection in a horse in north Queensland: clinical and epidemiological features. *Australian veterinary journal.*
 10. Memish, Z. A., N. Mishra, K. J. Olival, S. F. Fagb, V. Kapoor, J. H. Epstein, R. AlHakeem, A. Durosinsoun, M. Al Asmari, A. Islam, and A. Kapoor. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerging infectious diseases.* 19(11):1819. Doi: 10.3201/eid1911.131172
 11. Leroy, E. M., B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Délicat, J. T. Paweska, J. P. Gonzalez, and R. Swanepoel. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature.* 438(7068):575-576. Doi: 10.1038/438575a
 12. Zuckerkandl, E. and L. Pauling. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving genes and proteins.* Academic Press. p. 97-166. Doi: 10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6
 13. Anindita, P. D., M. Sasaki, A. Setiyono, E. Handharyani, Y. Orba, S. Kobayashi, I. Rahmadani, S. Taha, S. Adiani, M. Subangkit, and Nakamura, I. 2015. Detection of oronavirus genomes in Moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. *Archives of virology.* 160:1113-1118. Doi: 10.1007/s00705-015-2342-1
 14. Febriani, W. D., U. Saepuloh, E. D. Ayu ningsih, R. S. Saputra, A. Purbatrapila, M. J. Nangoy, T. A. Ransaleh, I. Wahyuni, S. Dako, R. Noviana, and D. Iskandriati. 2018. Bat Coronavirus of Pteropus alecto from Gorontalo Province, Indonesia. *The International Journal of Tropical Veterinary and Biomedical Research.* 3:36-42. Doi: 10.21157/ijtvbr.v3i2.12359
 15. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. 2017. *Pedoman Pengumpulan Data Reservoir (Kelelawar) di Lapangan, Riset Khusus Vektor dan Reservoir Penyakit.* Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
 16. de Souza Luna, L. K., V. Heiser, N. Regamey, M. Panning, J. F. Drexler, S. Mulangu, L. Poon, S. Baumgarte, B. J. Haijema, L. Kaiser, and Drosten, C. 2007. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *Journal of clinical microbiology.* 45:1049-1052. Doi: 10.1128/JCM.02426-06
 17. Lim, X. F., C. B. Lee, S. M. Pascoe, C. B. How, S. Chan, J. H. Tan, X. Yang, P. Zhou, Z. Shi, O. M. Sessions, and L. F. Wang. 2019. Detection and characterization of a novel bat-borne coronavirus in Singapore using multiple molecular approaches. *The Journal of general virology.* 100:1363. Doi: 10.1099/jgv.0.001307
 18. Lacroix, A., V. Duong, V. Hul, S. San, H. Davun, K. Omaliss, S. Chea, A. Hassanin, W. Theppangna, S. Silithammavong, and Khammavong, K. 2017. Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia. *Infection, Genetics and Evolution.* 48:10-18. Doi: 10.1016/j.meegid.2016.11.029

19. Nziza, J., T. Goldstein, M. Cranfield, P. Webala, O. Nsengimana, T. Nyatanyi, A. Mudakikwa, A. Tremeau-Bravard, D. Byarugaba, J. C. Tumushime, I. E. Mwikarago, I. Gafarasi, J. Mazet, K. Gilardi. 2020. Coronaviruses Detected in Bats in Close Contact with Humans in Rwanda. *EcoHealth*. 17:152–159. Doi: 10.1007/s10393-019-01458-8
20. Valitutto, M. T., O. Aung, K. Y. Naing Tun, M. E. Vodzak, D. Zimmerman, J. H. Yu, Y. T. Win, M. T. Maw, W. Z. Thein, H. H. Win, J. Dhanota, V. Ontiveros, B. Smith, A. Tremeau- Brevard, T. Goldstein, C. K. Johnson, S. Murray, J. Mazet. 2020. Detection of novel coronaviruses in bats in Myanmar. *Plos One*. 15(4): e0230802. Doi: 10.1371/journal.pone.0230802
21. Balboni, A. L. Gallina, A. Palladini, S. Prospero, M. Battilani. 2012. A Real-Time PCR Assay for Bat SARS-Like Coronavirus Detection and Its Application to Italian Greater Horseshoe Bat Faecal Sample Surveys. *The Scientific World Journal* 2012(989514): 1-8. Doi:10.1100/2012/989514