

Mosquito-specific viruses (family Flaviviridae, genus Flavivirus) Diisolasi pada Nyamuk Anopheles vagus di Bali

(MOSQUITO-SPECIFIC FLAVIRUSES (FAMILY FLAVIVIRIDAE, GENUS FLAVIVIRUS) ISOLATED ON ANOPHELES VAGUS IN BALI)

**Putu Ayu Asri Damayanti^{1*}, I Nyoman Mantik Astawa²,
Anak Agung Ayu Mirah Adi³, I Made Sudarmaja¹,
I Kadek Swastika¹, Dewa Ayu Agus Sri Laksemi¹,
Ni Luh Putu Eka Diarthini¹**

¹Departemen Parasitologi,
Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana.

²Laboratorium Virologi Veteriner,

³Laboratorium Patologi Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jln Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesi 80234
Telepon 0361 222510, *email: asri_damayanti@unud.ac.id

ABSTRAK

Mosquito-specific viruses (MSVs) adalah virus yang hanya dapat bereplikasi pada sel nyamuk. Virus ini terdiri dari berbagai genus, salah satunya yang paling banyak ditemukan adalah dari famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. Namun, data keberadaan dan karakteristik MSVs dan vektornya di Bali saat ini sangat terbatas. Oleh karena itu, pengamatan untuk memperluas penemuan keragaman vektor dan filogenetik MSVs famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* di Bali dilakukan pada tahun 2016-2018. Nyamuk-nyamuk dewasa ditangkap menggunakan *light trap* dan dikelompokkan berdasarkan spesies. Isolasi dan propagasi virus dilakukan pada galur sel C6/36 dan *baby hamster kidney*-21 (BHK-21). Identifikasi virus dilakukan dengan menggunakan *one step reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Terdapat dua *pool* yang berasal dari nyamuk *Anopheles vagus* menampakan *cythopathic effect* (CPE) hanya pada galur sel C6/36 dari total 158 *pool*. Virus yang diisolasi memiliki persentase *identity* sekuen nukleotida tertinggi 97% dan sekuen asam amino 96% dengan virus *Culex theileri Flavivirus* isolat JKT-8650 yang diisolasi pada tahun 1981. Selanjutnya, virus dinamakan *Mosquito Flavivirus Isolate Bali* (MFB) dengan *accession numbers* KY995166 dan KY290258. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa MFB berada satu kluster dengan *Culex theileri Flavivirus* (CTFV) dari Indonesia, *Culex Flaviviruses*-Myanmar, *Culex theileri Flavivirus*-Portugal, dan *Mosquito Flavivirus*-Turki. Terdapat delapan nukleotida dan enam asam amino yang berbeda antara MFB dan CTFV Indonesia. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa MSVs dari famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* berhasil diisolasi dari nyamuk *An. vagus* di Bali.

Kata-kata kunci: *mosquito-specific viruses*; isolasi; *Anopheles vagus*; *flavivirus*

ABSTRACT

Mosquito-specific viruses (MSVs) are viruses that can only replicate on mosquito cells. MSVs of the family *flaviviridae*, genus *Flavivirus* are the most studied to date. However data on the existence and characteristics of MSVs and their vectors in Bali are currently very limited Therefore, survey to expand the vector and phylogenetic diversity of MSVs on the island of Bali was carried out in 2016-2018. Adult mosquitoes were captured by light traps, grouping into *pool* based on the species. The virus was isolated and propagated using C6/36 and BHK-21 cell lines. One-step RT-PCR reaction to amplified *Flavivirus* partial NS5 gene was performed. There were 2 *pools* from *Anopheles vagus* mosquitoes demonstrated cytopathic effect (CPE) only in C6/36 cell line from a total of 158 *pools*. Isolated virus had the highest percentage of nucleotide *identity* 97% and amino acid 96% with the *Culex theileri Flavivirus* JKT-8650 isolated in 1981. The virus was named *Mosquito Flavivirus isolate Bali* (MFB) with *accession numbers*

KY995166 and KY290258. Phylogenetic analyses indicated that CTFV from Bali formed a cluster with CTFV from Indonesia, *Culex Flaviviruses*-Myanmar, *Culex theileri Flavivirus*-Portugal, and *Mosquito Flaviviruses*-Turkey. There were 8 nucleotides and 6 different amino acids between MFB and CTFV Indonesia. From the results of this study it can be concluded that the MSVs family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* has been successfully isolated from the mosquito *An. vagus* in Bali.

Keywords: mosquito-specific viruses; isolate; *Anopheles vagus*; *flavivirus*

PENDAHULUAN

Mosquito-specific Viruses (MSVs) adalah virus yang secara alami menginfeksi dan bereplikasi pada sel nyamuk. Dahulu MSVs jarang diteliti karena ketidakmampuannya untuk menginfeksi vertebrata dan tidak menyebabkan penyakit pada manusia. Namun, sejak dua dekade terakhir terjadi peningkatan drastis jumlah penelitian terutama terfokus pada penemuan virus baru, interaksinya dengan virus patogen *Arthropod borne virus* (Arbovirus), potensi MSVs dalam pengendalian populasi nyamuk, dan sebagai kandidat vaksin yang aman. *Mosquito-specific Viruses* yang ditemukan berasal dari beberapa famili virus di antaranya *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, dan *Mesoniviridae*. Virus MSVs dari Famili *Flaviviridae* yang dikenal dengan nama *Insect-specific Flaviviruses* yang sampai saat ini paling banyak ditemukan (Bolling *et al.*, 2015 ; Agboli *et al.*, 2019).

Flavivirus adalah virus yang memiliki *envelope*, RNA untai tunggal, positif *sense*, *open reading frame* (ORF) tunggal, protein struktural (*capsid*, *membrane*, *envelope*) dan protein non struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5) (Simmonds *et al.*, 2017). Secara filogenetik, kelompok *Flavivirus* pada nyamuk dibagi menjadi dua kelompok yaitu *dual-host affiliated Insect-specific Flaviviruses* (dISFs) dan *classical ISFs* (cISFs). Kelompok cISFs terbagi menjadi dua klade yaitu *Culex-associated viruses* dan *Aedes-associated viruses* (Blitvich dan Firth, 2015).

Di Indonesia penelitian tentang penemuan virus MSVs masih sangat terbatas sehingga karakteristik virus dan keragaman vektor belum banyak dipahami (Hoshino *et al.*, 2007; Sadeghi *et al.*, 2017, Supriyono *et al.*, 2020). Dalam analisis filogenetik dari survei yang dilakukan pada tahun 2016-2018 berhasil diisolasi dan diidentifikasi MSVs (famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*), yang berasal dari nyamuk *An. vagus*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan dan karakteristik MSVs dan vektornya di Bali.

METODE PENELITIAN

Pengumpulan Nyamuk

Lokasi penangkapan nyamuk adalah di rumah penduduk yang memiliki kandang ternak dan jaraknya dekat dengan sawah di wilayah Kabupaten Badung (Desa Canggus), Kabupaten Buleleng (Desa Pangkung Paruk), dan Kabupaten Jembrana (Desa Baler Bale Agung dan Yeh Embang) dari tahun 2016-2018.

Nyamuk ditangkap menggunakan 50 perangkap lampu (*light trap*) yang diletakkan di sekitar kandang, genangan air, sawah, dan sumber air pada pukul 18.00-06.00 di 150 titik tangkap. Nyamuk yang ditangkap kemudian disimpan dalam kontainer berisi *dry ice* sebelum dibawa ke laboratorium untuk identifikasi spesies. Nyamuk betina dikumpulkan berdasarkan spesies dan dikelompokkan masing-masing dengan jumlah 25-50 nyamuk dalam satu 1,5 mL *cryotube*, dan disimpan pada suhu -80°C. Nyamuk betina yang kenyang darah dan nyamuk jantan tidak digunakan dalam penelitian ini.

Isolasi dan Propagasi Virus

Isolasi dan propagasi virus dilakukan di Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. Dalam penelitian ini digunakan dua jenis galur sel untuk isolasi dan propagasi yaitu galur sel C6/36 (sel *Aedes albopictus*) dan *baby hamster kidney* (BHK-21). Isolasi dan propagasi pada galur sel C6/36 dan BHK menggunakan metode seperti yang dilakukan oleh Huanyu *et al.* (2012) yang telah dimodifikasi. Media galur sel C6/36 adalah *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640), sedangkan untuk untuk sel BHK-21 menggunakan *Minimum Essential Media* (MEM). Pada media juga ditambahkan 10% *fetal bovine serum* (FBS), 1% *L-Glutamine* (200 mM), 1% *Penicillin-streptomycin* (10,000 U/mL), dan 1% MEM *Non-Essential Amino Acids Solution* (100x). Semua media berasal dari *Gibco-Life Technologies*, USA. Galur sel diinkubasi dalam CO₂ 5% pada suhu 28°C (sel C6/36) dan 36°C (sel BHK-21).

Nyamuk dihomogenisasi dalam 1 mL RPMI 1640 yang ditambahkan dengan 2% FBS. Homogenat nyamuk disentrifugasi pada 1.500 rpm (216 x g) selama lima menit pada suhu 4°C. Supernatan difiltrasi menggunakan 0,02 µm syringe filters SFCA (Corning, USA), dan aliquot disimpan pada suhu -80°C jika tidak diinokulasi langsung.

Sejumlah 200 µL supernatan diinokulasi ke sel *monolayer* C6/36 maupun BHK-21 pada *plate tissue culture* 12 well kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama 90 menit. Sebanyak 1 mL media pemeliharaan ditambahkan ke dalam sumuran *plate* dan diinkubasi kembali dalam inkubator. Setiap hari sel diobservasi di bawah mikroskop *inverted* untuk melihat terbentuknya *cytopathic effects* (CPE). Supernatan yang berasal dari *well* yang menampilkan CPE disentrifugasi dengan kecepatan 12,000 rpm pada suhu 4°C selama lima menit dan disimpan pada -80°C, sampai saatnya dilakukan ekstraksi RNA virus.

Ekstraksi RNA, RT-PCR, dan Sekuensing

Ekstraksi RNA dilakukan di Laboratorium Biomedik terpadu FK Unud, dengan menggunakan *QIAamp Viral RNA Kit* dan RT-PCR untuk amplifikasi parsial genom NS5 *Flavivirus* (*OneStep Ahead* RT-PCR, Qiagen®). Primer yang digunakan adalah primer *oligonucleotide* PF1S 52 -TG YRTBTAYAACAT GATGGG-32 dan PF2R 52 -GTGTCCCADCCD GCDGTRTC-32 (Cook *et al.*, 2006).

Reaksi *one step* RT-PCR dengan *template* RNA virus yang diekstraksi sebelumnya dikerjakan dalam volume total 50 µL. Ke dalam setiap tabung PCR 200 µL, ditambahkan RNA (5 µL); *OneStep Ahead RT-PCR Master Mix* 2.5x (10 µL); *OneStep Ahead RT-Mix* 25x (1 µL); *primer forward* (1,25 µL); *primer Reverse* (1,25 µL); dan *RNase free water* (1,5 µL). Tabung PCR kemudian ditempatkan ke dalam mesin Veriti™ 96-Well Thermal Cycler dari Applied Biosystem dengan kondisi siklus PCR sebagai berikut: *reverse transcription* dilakukan pada suhu 50°C selama 10 menit, *initial PCR activation* 95°C selama 5 menit, amplifikasi (siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, *annealing* 55°C selama 10 detik, *extension* 72°C selama 10 detik) sebanyak 40 siklus, dan *final extension* 72°C selama 2 menit. Produk amplifikasi PCR dikirim ke Macrogen, Korea Selatan untuk dilakukan sekuensing dengan menggunakan metode Sanger. Hasil sekuensing yang diperoleh didaftarkan ke GenBank.

Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik dilakukan pada program MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Penyajaran (*alignment*) sekuen dilakukan dengan ClustalW dan pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *Neighbor-Joining* (Saitou dan Nei, 1987) dengan menggunakan *bootstrap test* (100 replikat), model *Maximum Composite Likelihood* (Tamura *et al.*, 2004) dan jarak genetik dianalisis dengan *pairwise distances*.

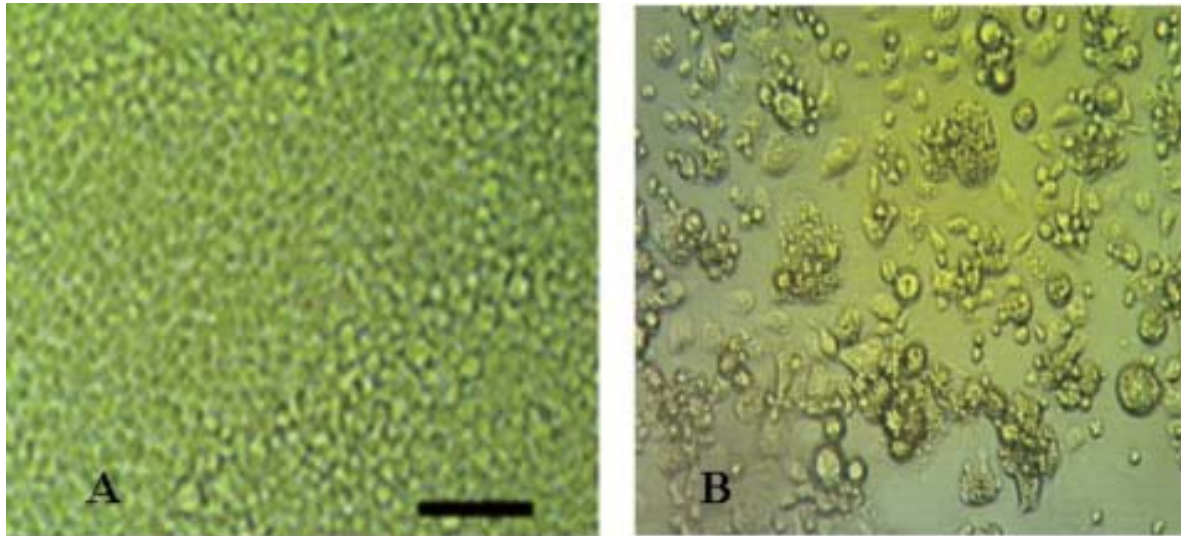
HASIL DAN PEMBAHASAN

Total nyamuk yang memenuhi syarat untuk diproses berjumlah 5.085 nyamuk betina yang terdiri dari spesies *Culex tritaeniorhynchus* 1.520 (30%), *Cx. fuscocephala* 925 (18%), *An. vagus* 885 (17%), *Cx. quinquefasciatus* 720 (14%), *Cx. vishnui* 300 (6%), *An. annularis* 290 (6%), *Cx. annulus* 150 (3%), *Cx. bitaeniorhynchus* 150 (3%), *An. tessellatus* 80 (2%), dan *Aedes spp.* 65 (1%). Beberapa nyamuk seperti *Mansonia uniformis* dan *Armigeres subalbatus* tidak dianalisis dalam penelitian karena jumlah yang terbatas.

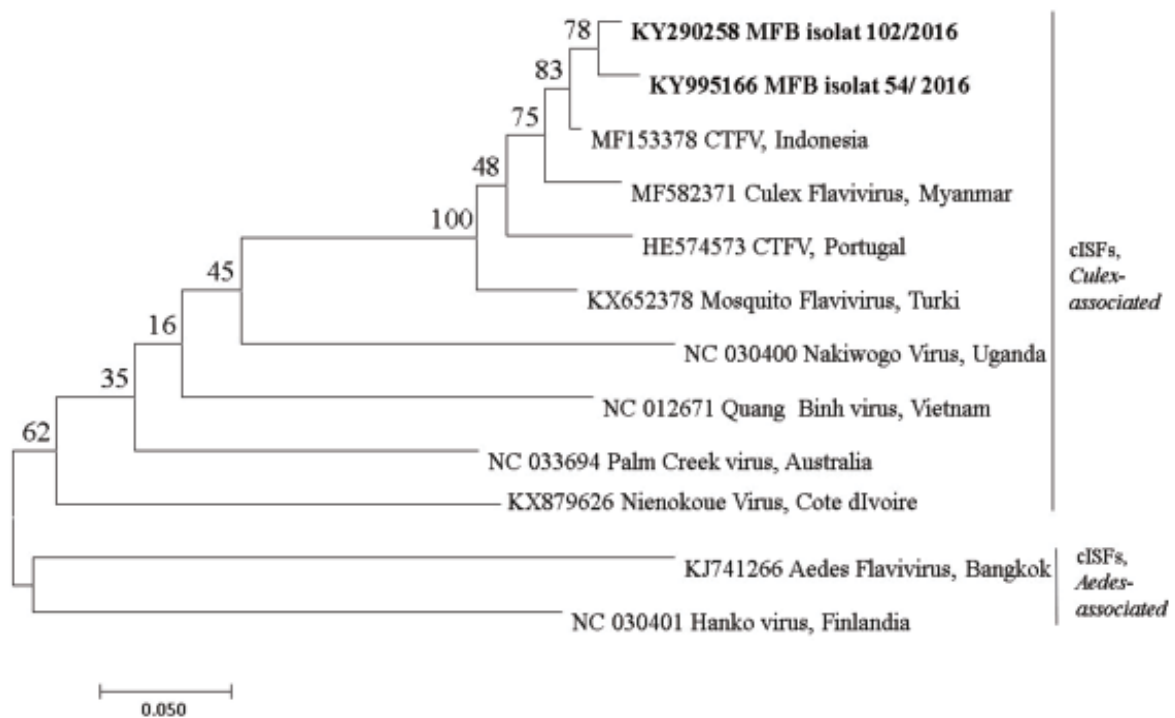
Nyamuk yang berhasil ditangkap dalam studi ini merupakan nyamuk yang sering ditemukan dalam survei vektor di Indonesia. Nyamuk *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. fuscocephala*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. vishnui*, *Cx. bitaeniorhynchus*, *An. vagus*, dan *An. annularis* merupakan vektor penyakit *Japanese encephalitis* (Garjito *et al.*, 2018). Nyamuk *An. vagus* dan *An. annularis* juga terkonfirmasi sebagai vektor malaria (Maksud, 2016).

Sebanyak dua *pool* dari total 158 *pool* yang berasal dari spesies *An. vagus* menampilkan CPE pada galur sel C6/36 pada hari kelima setelah inokulasi. *Pool* tersebut berasal dari Desa Canggung, Kabupaten Badung. Karakteristik CPE pada galur sel C6/36 yaitu terjadi perubahan morfologi berupa sel membesar, pembentukan *syncytia*, dan sel yang berdekatan mengalami fusi (Gambar 1). *Cytopathic effect* (CPE) tidak timbul pada galur sel BHK-21. Hal ini menunjukkan bahwa isolat virus yang ditemukan merupakan kelompok MSVs.

Gambaran CPE bervariasi namun karakteristik CPE yang umum terjadi pada virus MSVs yang masuk dalam anggota ISFs adalah sel yang mengalami fusi (Bolling *et al.*, 2015). Gambaran CPE atau derajat kerusakan sel pada galur sel bervariasi tergantung dari strain ISFs yang menginfeksi (Blitvich dan



Gambar 1. Penampakan *cythopathic effect* (CPE) pada galur sel C6/36; A. Kontrol, sel C6/36 B. *cythopathic effect* (CPE) pada sel C6/36 pada hari ke-5 pascainokulasi, tampak fusi sel dan *syncytia* (pembesaran 200 kali; skala bar 50 µm).



Gambar 2. *Mosquito Flavivirus Isolat Bali* (MFB) berada dalam satu kluster dengan *classical Insect-specific Flaviviruses* (cISF)–*Culex associated* yang berasal dari Indonesia, Myanmar, Portugal dan Turki. Analisis filogenetik dilakukan menggunakan *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) 7 (Kumar *et al.*, 2016). Pohon filogenetik menggunakan metode Neighbor-Joining pada 12 sekuen nukleotida parsial NS5 *Flavivirus*, total 203 posisi pada dataset final (Saitou dan Nei, 1987). Pohon filogenetik dengan *Sum of branch length* = 1.45743768, *bootstrap test* (100 replikat) (Felsenstein, 1985). Jarak genetik dianalisis menggunakan metode *Maximum Composite Likelihood*.

Firth, 2015). Pada beberapa penelitian CTFV yang merupakan anggota ISFs yang dilakukan di Portugal, gambaran CPE berupa retardasi pertumbuhan sel dan agregasi sel (Parreira *et al.*, 2012), sementara itu di Turki, gambaran CPE yang ditemukan berupa perubahan bentuk sel menjadi bulat dan terlepas lebih awal pada hari ke-5 sampai ke-7 setelah inokulasi (Ergünay *et al.*, 2016). Timbulnya CPE menunjukkan terjadinya replikasi virus dan proses adaptasi virus terhadap inangnya. Penampakan CPE dapat bervariasi pada galur sel baik dari segi bentuk, derajat kerusakan sel, maupun onset timbulnya CPE. Bahkan pada beberapa kasus terjadi replikasi avirulen ISFs secara *in vivo* pada sel serangga sehingga keberadaan virus sering tidak terdeteksi. Variasi CPE ini diasumsikan terjadi karena adanya perbedaan *cellular machinery* antara inang alaminya (*natural host*) dan sel C6/36. Asumsi ini masih perlu dieksplorasi dengan melakukan penelitian lebih lanjut menggunakan galur sel yang berasal dari inang asal (Hoshino *et al.*, 2007).

Hasil sekuensing isolat didaftarkan di GenBank dengan nama *Mosquito Flavivirus Isolate Bali-54/2016* yang terdiri dari 203 nukleotida dengan *accession numbers* KY995166 dan *Mosquito Flavivirus isolate Bali-102/2016* yang terdiri dari 224 nukleotida dengan *accession numbers* KY290258. Analisis filogenetik dilakukan dengan membandingkan MFB hasil studi ini dengan MSVs lain yang terdata pada GenBank (Gambar 2). Setelah melakukan proses penyajaran (*alignment*) dengan ClustalW dan manual, maka total jumlah MSVs yang digunakan pada analisis adalah 12 sekuen nukleotida MSVs yaitu meliputi dua sekuen nukleotida MFB (*Mosquito Flavivirus Isolate Bali*) hasil studi ini, delapan sekuen nukleotida cISFs *Culex-associated Flavivirus* (*Culex theileri Flavivirus*-Indonesia, *Culex Flavivirus*-Myanmar, *Culex theileri Flavivirus*-Portugal, *Mosquito Flavivirus*-Turki, *Nakiwogo Virus*-Uganda, *Quang Binh Virus*-Vietnam, *Palm Creek Virus*-Australia, *Nienokoue Virus*-Cote d'Ivoire), dan dua sekuen dari cISFs *Aedes-associated Flaviviruses* sebagai *out group* yaitu *Aedes Flavivirus*-Bangkok dan *Hanko Virus*-Finlandia (Cook *et al.*, 2009; Crabtree *et al.*, 2009; Junglen *et al.*, 2009; Parreira *et al.*, 2012; Hobson-Peters *et al.*, 2013; Bolling *et al.*, 2015; Ergünay *et al.*, 2016; Sadeghi *et al.*, 2017; Kyaw *et al.*, 2018).

Berdasarkan gen parsial NS5 *Flavivirus* ditemukan bahwa MFB pada penelitian ini

berada dalam satu kluster dengan CTFV dari Indonesia, *Culex Flaviviruses*-Myanmar, CTFV-Portugal, *Mosquito Flaviviruses*-Turki, dan memiliki *sister group* *Nakiwogo Virus*-Uganda. Semua *Flavivirus* tersebut bersama dengan *Nakiwogo Virus*, *Quang Binh Virus*, dan *Nienokoue Virus* merupakan anggota dari cISFs *Culex-associated* (Gambar 2). Virus cISFs adalah salah satu anggota ISFs yang merupakan kelompok virus yang pertama ditemukan dan bersifat monofiletik, berbeda dengan anggota *Flaviviridae* yang lain. Virus cISF dibagi menjadi dua yaitu cISF-*Culex associated* dan cISFs-*Aedes associated* (Blitvich dan Firth, 2015).

Kedua sekuen MFB dengan CTFV Indonesia memiliki persentase *identity* sekuen nukleotida 97% dan asam amino 96%. Kedua sekuen ini juga memiliki persentase *identity* sekuen nukleotida yang tinggi yaitu berkisar 90-94% dengan *Culex Flavivirus*-Myanmar, CTFV-Portugal, dan *Mosquito Flavivirus*-Turki (Tabel 1). Menurut Kuno *et al.* (1998), bahwa jika persentase *identity* sekuen nukleotida antar spesies mencapai kesamaan melebihi 84% maka virus tersebut dikategorikan ke dalam spesies yang sama. Berdasarkan klasifikasi tersebut kedua isolat MFB pada studi ini yaitu *Mosquito Flavivirus isolate Bali-54/2016* dan *Mosquito Flavivirus isolate Bali-102/2016* termasuk ke dalam spesies *Culex theileri Flavivirus* namun dengan strain yang berbeda.

Kedua isolat MFB pada studi ini memiliki persentase *identity* yang tertinggi dengan CTFV yang ditemukan pada tahun 1981 pada *pool* nyamuk isolat JKT-8650 yang diisolasi dari nyamuk *An. vagus* di Banjar Tag Tag, Peguyangan, Denpasar, Bali. Adapun persentase *identity* mencapai 97% (nukleotida) dan 94% (asam amino) (Sadeghi *et al.*, 2017). Hal ini menggambarkan bahwa gen parsial NS5 *Flavivirus* CTFV sangat stabil. Selama ini gen NS5 berperan sangat penting dalam identifikasi *Flavivirus* karena merupakan protein yang paling stabil di antara protein lainnya (Lindenbach dan Rice 2007; Parreira *et al.*, 2012). Namun demikian, terdapat perbedaan susunan nukleotida di delapan posisi dan enam asam amino antara CTFV Bali dengan MFB (Tabel 2-3).

Virus CTFV tidak hanya diisolasi dari nyamuk *Cx. theileri* saja. Di negara lain, virus CTFV mayoritas ditemukan pada nyamuk genus *Culex*, seperti *Cx. tritaeniorhynchus* (Thailand dan Myanmar), *Cx. quinquefasciatus*

Tabel 1. Persentase *identity* nukleotida dan asam amino dua sekuen *Mosquito Flavivirus Isolate* Bali (MFB) dengan 10 sekuen *Mosquito-specific viruses* (MSVs).

Isolat	Persentase <i>identity</i> (%)			
	KY290258_MFB		KY995166_MFB	
	nt	Aa	nt	aa
MF153378 CTFV, Indonesia	97	96	97	96
MF582371 <i>Culex Flavivirus</i> , Myanmar	94	89	93	85
HE574573 CTFV, Portugal	91	78	91	82
KX652378 <i>Mosquito Flavivirus</i> , Turki	90	80	91	84
NC_012671 <i>Quang Binh virus</i> , Vietnam	68	38	67	38
NC_030400 <i>Nakiwogo Virus</i> , Uganda	69	49	68	47
NC_033694 <i>Palm Creek Virus</i> , Australia	68	42	66	42
KX879626 <i>Nienokoue Virus</i> , Cote d' Ivoire	59	40	59	42
NC_030401 <i>Hanko Virus</i> , Finlandia	53	31	52	42
KJ741266 <i>Aedes Flavivirus</i> , Bangkok	48	24	48	27

Keterangan: nt= nukleotida; aa= asam amino; CTFV= *Culex theileri Flavivirus*

Tabel 2. Persentase *identity* dan perbedaan susunan nukleotida sekuen *Mosquito Flavivirus Isolate* Bali (MFB) dengan *Culex theileri Flavivirus* Indonesia.

Isolat	% <i>Identity</i>	Posisi nukleotida							
		17475	17505	17514	17541	17608	17609	17613	17615
		MF153378 CTFV Indonesia. 1981		G	G	T	T	G	T
KY290258 MFB 102/2016	97	C	A	T	C	A	C	T	G
KY995166 MFB 54/ 2016	97	C	G	C	T	A	C	C	C

Tabel 3. Persentase *identity* dan perbedaan susunan nukleotida sekuen *Mosquito Flavivirus Isolate* Bali (MFB) dengan *Culex theileri Flavivirus* (CTFV) Indonesia.

Isolat	% <i>Identity</i>	Posisi asam amino					
		5826	5826	5826	5826	5826	5826
		MF153378 CTFV Indonesia. 1981		W	R	I	V
KY290258 MFB 102/2016	96	S	Q	I	A	P	L
KY995166 MFB 54/ 2016	96	S	R	T	V	P	P

(Thailand), *Cx. fuscocephala* (Thailand dan Myanmar), *Cx. pipiens* (Portugal) dan *Cx. vishnui* (Myanmar) (Parreira *et al.*, 2012; Ergünay *et al.*, 2016; Kyaw *et al.*, 2018). Hanya CTFV dari Bali dan MFB dari hasil studi ini yang diisolasi dari nyamuk genus *Anopheles* yaitu *An. vagus* (Sadeghi *et al.*, 2017). Kurang lebih 30 tahun sejak virus CTFV ditemukan

pertama kali pada nyamuk *An. vagus* menunjukkan virus ini bersirkulasi di Bali pada inang yang sama. Nyamuk *An. vagus* seperti halnya nyamuk spesies lain pada studi ini memiliki habitat pada genangan air alami maupun buatan seperti tepi sungai, rawa-rawa, saluran irigasi sawah, dan kolam. Nyamuk ini mayoritas bersifat zoofilik sehingga mudah

ditemukan di sekitar kandang ternak, namun demikian nyamuk ini dapat juga bersifat antropofilik yaitu menghisap darah manusia (Maksud, 2016). Pada studi ini perangkap nyamuk diletakan di sekitar kandang ternak, sawah, dan genangan air di luar rumah sesuai dengan habitat nyamuk *An. vagus*.

Inang dari berbagai spesies MSVs sangat bervariasi tidak hanya terbatas pada genus atau spesies tertentu saja. Hal ini menunjukkan telah terjadi *multiple host switching* pada berbagai spesies MSVs seluruh dunia. Terdapat berbagai faktor yang diasumsikan memengaruhi besarnya variasi inang. Salah satunya yang diyakini oleh beberapa peneliti adalah karena adanya pengaruh *selective pressure* berupa perbedaan lingkungan iklim dan geografis yang memberi tekanan pada kehidupan vektor sehingga virus dan nyamuk lokal beradaptasi satu sama lain (Cella *et al.*, 2019). Adanya pergantian inang juga kemungkinan menyebabkan terjadinya mutasi atau perubahan struktur gen pada virus. Penelitian lebih lanjut masih perlu dilakukan untuk mencari faktor penyebab terjadinya *multiple host switching* dan akibatnya terhadap susunan gen virus.

Culex theileri Flavivirus (CTFV) selain memiliki variasi inang, juga berdistribusi luas ke berbagai negara yaitu Portugal, Spanyol, Turki, Thailand, Myanmar, dan Indonesia. Menurut Cella (2019), CTFV menyebar dari Spanyol ke Portugal karena negara tersebut secara geografis berdekatan, sedangkan penyebaran CTFV dari Turki ke Myanmar diasumsikan karena adanya kerja sama dagang antara kedua negara tersebut sekitar kurun waktu 2014-2016 (Cella *et al.*, 2019). Nyamuk sangat mudah menyebar melalui alat transportasi (pesawat, mobil, kereta api, kapal laut), kontainer, maupun barang dagangan (Cella *et al.*, 2019), di samping itu faktor penularan virus pada nyamuk bisa secara vertikal maupun horizontal juga mempermudah distribusi virus secara cepat. Terdapat beberapa hipotesis penularan virus pada nyamuk yaitu dapat ditularkan secara horizontal dengan cara nyamuk memakan nektar tanaman, larva yang memakan material tanaman di air, parasitik *mermithid*, dan perkawinan dengan nyamuk jantan. Penularan secara vertikal berupa penularan langsung ke keturunannya melalui telur (*transovarial*) atau secara tidak langsung melalui permukaan telur yang terkontaminasi (*transovum*) atau air tempat telur diletakan (Agboli *et al.*, 2019).

SIMPULAN

Mosquito-specific viruses (MSVs) dari genus *Flavivirus* yang diberi nama MFB berhasil diisolasi pada nyamuk *An. vagus* di Bali.

SARAN

Pada *pool* yang belum ditemukan CPE pada inokulasi pertama dapat dilakukan pasase dan identifikasi virus, mengingat infeksi MSVs dapat bersifat avirulen. *Mosquito-specific viruses* (MSVs) sangat beragam tidak hanya berasal dari genus *Flavivirus* sehingga dapat dilakukan deteksi virus menggunakan primer virus selain *Flavivirus* atau melakukan teknik *next generation sequencing* (NGS) untuk mencari bukti adanya koinfeksi. Penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan genom komplet dari MFB, distribusi virus MSVs, dan keragaman vektor juga harus dilakukan untuk meningkatkan pemahaman yang komprehensif tentang MSVs di Indonesia. Penelitian mengenai efek MSVs terhadap replikasi *Flavivirus* patogen pada nyamuk (*coinfection*) memiliki peluang untuk membantu mengendalikan kasus penyakit yang ditularkan melalui nyamuk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada berbagai pihak yang membantu terlaksananya studi ini yaitu Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Laboratorium Virologi FKH Unud, Laboratorium Biomedik Terpadu FK Unud, dan Rektor Unud yang memberikan hibah penelitian Nomor 641-28/UN14.2/PNL.01.03.00/2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Agboli E, Leggewie M, Altinli M, Schnettler E. 2019. Mosquito-Specific Viruses Transmission and Interaction. *Viruses* 11(873): 1–26.
- Blitvich BJ, Firth AE. 2015. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses* 7(4): 1927–1959.

- Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. 2015. Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. *Viruses* 7(9): 4911–4928.
- Cella E, Benvenuto D, Donati D, Garilli F, Angeletti S, Pascarella S, Ciccozzi M. 2019. Phylogeny of *Culex theileri* virus flavivirus in Spain, Myanmar, Portugal, and Turkey. *Asian Pac J Trop Biomed* 12(5): 216–223.
- Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, de Lamballerie X. 2006. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 87(4): 735–748.
- Cook S, Moureau G, Harbach RE, Mukwaya L, Goodger K, Ssenfuka F, Gould E, Holmes EC, de Lamballerie X. 2009. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *J Gen Virol* 90: 2669–2678.
- Crabtree M, Nga P, Miller B. 2009. Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Arch Virol* 154(5): 857–60.
- Ergünay K, Litzba N, Brinkmann A, Günay F, Kar S, Öter K, Örsten S, Sarykaya Y, Alten B, Nitsche A, Linton YM. 2016. Isolation and genomic characterization of *Culex theileri* flaviviruses in field-collected mosquitoes from Turkey. *Infect Genet Evol* 46: 138–147.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783–791.
- Garjito TA, Widiarti, Anggraeni YM, Alfiah S, Satoto TBT, Farchanny A, Samaan G, Afelt A, Manguin S, Frutos R, Aditama TY. 2018. Japanese Encephalitis in Indonesia: An Update on Epidemiology and Transmission Ecology. *Acta Trop* 187: 240–247.
- Hobson-Peters J, Yam AWY, Lu JWF, Setoh YX, May FJ, Kurucz N, Walsh S, Prow NA, Davis SS, Weir R, Melville L, Hunt N, Webb RI, Blitvich BJ, Whelan P, Hall RA. 2013. A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. *PLoS One* 8(2): 1–12.
- Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K. 2007. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359(2): 405–414.
- Junglen S, Kopp A, Kurth A, Pauli G, Ellerbrok H, Leendertz FH. 2009. A new flavivirus and a new vector: characterization of a novel flavivirus isolated from *uranotaenia* mosquitoes from a tropical rain forest. *J Virol* 83(9): 4462–8.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Brief communication. *Mol Biol Evol* 33(7): 1870–1874.
- Kyaw AK, Tun MMN, Buerano CC, Nabeshima T, Sakaguchi M, Ando T, Inoue S, Mya YY, Hayasaka D, Myat Thu H, Thant KZ, Moritaa K. 2018. Isolation and genomic characterization of *Culex flaviviruses* from mosquitoes in Myanmar. *Virus Res* 247: 120–124.
- Lindenbach BD, Rice CM. 2007. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication, in: Knipe DM, Howley PM (Eds.). *Fields Virology*. Philadelphia. Lippincott-Raven Publishers. Hlm. 1101–1152.
- Maksud M. 2016. Aspek Perilaku Penting *Anopheles vagus* dan Potensinya sebagai Vektor Malaria di Sulawesi Tengah: Suatu Telaah Kepustakaan. *J Vektor Penyakit* 10(2): 33–38.
- Parreira R, Cook S, Lopes Â, Matos AP, de Almeida APG, de Piedade J, Esteves A. 2012. Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from *Culex theileri* mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Res* 167(2): 152–161.
- Sadeghi M, Popov V, Guzman H, Phan TG, Vasikalis N, Tesh R, Delwart E. 2017. Genomes of viral isolates derived from different mosquitoes species. *Virus Res* 15(142): 49–57.
- Saitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 4(4): 406–425.

- Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Rico-hesse R, Smith DB, Stapleton JT, Consortium IR, 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile : Flaviviridae. *J Gen Virol* 98: 2–3.
- Supriyono, Kuwata R, Torii S, Shimoda H, Ishijima K, Yonemitsu K, Minami S, Kuroda Y, Tatemoto K, Tran NTB, Takano A, Omatsu T, TetsuyaMizutani, Itokawa K, Isawa H, Sawabe K, Takasaki T, Yuliani DM, Abiyoga D, Hadi UK, Setiyono A, Hondo E, Agungpriyono S, Maeda K. 2020. Mosquito-borne viruses, insect-specific flaviviruses (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*), Banna virus (family *Reoviridae*, genus *Seadornavirus*), Bogor virus (unassigned member of family *Permutotetraviridae*), and alphame-sonivirus 2 and 3 (family *Mesoniviridae*, genus *Mesonivirus*) isolated from Indonesian mosquitoes. *J Vet Med Sci* 82: 1030–1041.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci* 101(30): 11030–11035.