

ANALISIS SEKUEN NUKLEOTIDA *E/NS1 GENE JUNCTION* VIRUS DENGUE SEROTIPE 2 ASAL DKI JAKARTA, INDONESIA

Nurhaida Widiani¹, Tri Wibawa², Nastiti Wijayanti³

Abstrak

Demam dengue atau demam berdarah dengue merupakan salah satu masalah kesehatan di daerah tropis dan subtropis. Penyakit ini disebabkan oleh virus dengue (genus *flavivirus*, famili *flaviviridae*). Vektor pembawa virus dengue adalah nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Genom virus dengue tersusun atas tiga protein struktural (protein nukleokapsid, protein *envelope*, dan protein *pre-membran*) dan tujuh protein nonstruktural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5). Usaha untuk mengontrol penyakit ini tergantung pada pemahaman patogenesis virus dengue. Tetapi pengetahuan mengenai patogenesis virus dengue masih belum banyak diketahui karena belum adanya model yang cocok baik *in vitro* maupun *in vivo*. Sehingga dilakukan analisis sekuen nukleotida *E/NS1 gene junction* virus dengue tipe 2 asal DKI Jakarta, Indonesia untuk mengetahui hubungan filogeni virus dengue yang beredar saat ini. Sekuen nukleotida (240 bp) dari *E/NS1 gene junction* merupakan segmen yang biasa digunakan untuk analisis perbandingan sekuen. Hasil analisis menunjukkan strain virus yang diteliti berkerabat dengan virus DEN-2 asal Asia yaitu Myanmar, Pakistan, Sri Lanka, Brunei, dan Malaysia. Tetapi kelima virus ini berada dalam kelompok yang berbeda dengan virus asal Amerika latin (Brazil). Virus Dengue dari Asia diduga lebih virulen dibandingkan virus dengue dari daerah lain. Sehingga kemungkinan terjadi peningkatan kasus DBD di Indonesia.

Kata kunci: Virus Dengue, *E/NS1 gene junction*, serotype, filogeni, DEN-2

Pendahuluan

Virus dengue merupakan agen penyebab demam dengue. Virus ini merupakan anggota genus *Flavivirus* dan famili *Flaviviridae*. Oleh karena itu demam dengue masuk dalam kelompok *arthropod borne diseases* (Satari dan Meiliasari, 2004). Penularan virus ini dari penderita ke orang yang sehat melalui nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Lanciotti *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 2005).

Dengue termasuk virus RNA untai tunggal dan mempunyai empat serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4 (Miagostovich *et al.*, 2000; Parida *et al.*, 2005). Panjang genom virus dengue kira-kira 11 kb yang tersusun atas tiga protein struktural (protein *core* atau nukleokapsid, protein *envelope*, dan protein *pre-membran*) dan tujuh protein non struktural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5) (Shu *et al.*, 2003).

Demam dengue masih menjadi masalah kesehatan di wilayah tropis dan subtropis, lebih dari 100 juta kasus terjadi tiap tahunnya. Kurang lebih 2,5 miliar orang hidup di daerah tropis dan subtropis endemik demam dengue yaitu di Asia, Afrika, dan Amerika bagian Selatan dan tengah (Lindegren *et al.*, 2005).

Salah satu hambatan pengembangan vaksin dengue adalah virus dengue mempunyai empat serotipe. Keempat serotipe virus dengue mempunyai struktur yang mirip satu sama lain, tetapi antibodi terhadap masing-masing serotipe tidak dapat memberikan perlindungan silang (Henchal dan Putnak, 1990). Sehingga seseorang yang pernah terserang demam dengue, masih memungkinkan untuk terserang lagi oleh dengue dari serotipe yang lainnya. Berdasarkan hipotesis *antibody-dependent enhancement (ADE)*, infeksi sekunder virus dengue dari

-
1. Jurusan Biologi, Fakultas Tarbiyah IAIN Raden Intan Lampung
 2. Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
 3. Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

serotipe yang berbeda dapat meningkatkan resiko demam dengue (Burke *et al.*, 1988; Watts *et al.*, 1999; Koraka, 2007).

Strategi untuk pengontrolan virus dengue adalah dengan memahami keanekaragaman genetik dan distribusi virus tersebut. Hubungan evolusi dan epidemiologi antara berbagai isolat virus dengue dapat terlihat dengan membandingkan sekuen nukleotida gen virus tersebut. Untuk mempelajari variasi genetik virus dengue serotipe 2 digunakan segmen gen spesifik E/NS1 *gene junction*. Segmen ini telah digunakan secara luas untuk analisis sekuens nukleotida (Rico-Hesse, 1990, Rico-Hesse *et al.*, 1997; 1998; Neto *et al.*, 2005; Osman *et al.*, 2008).

Menurut Rico-Hesse *et al.* (1997), Asia Tenggara diduga menjadi sumber varian virus dengue yang virulen. Sehingga dilakukan penelitian untuk mempelajari hubungan evolusi dan asal geografis virus DEN-2 dari DKI Jakarta, Indonesia. Informasi sekuen yang diperoleh dapat melengkapi informasi terkait virus dengue pada tingkat molekuler. Selanjutnya diharapkan informasi tersebut dapat digunakan untuk mengetahui penyebaran dan mobilitas virus dengue di Indonesia.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui urutan nukleotida E/NS1 *gene junction* virus DEN-2 asal DKI Jakarta, Indonesia dan apakah terdapat

variasi diantara virus-virus tersebut, serta untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara virus DEN-2 asal DKI Jakarta, Indonesia dengan virus DEN-2 lainnya.

Bahan dan Cara Kerja

Virus

Virus dengue yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari sampel darah penderita yang secara klinis terdiagnosis menderita demam berdarah, mulai dari awal demam sampai panas hari kedelapan. Sampel berasal dari DKI Jakarta, Indonesia.

Ekstraksi RNA

RNA diekstraksi dari 200 µl darah. Ekstraksi RNA menggunakan High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). RNA virus yang diperoleh selanjutnya disimpan pada suhu -80°C.

One step Multiplex RT-PCR

Onestep-multiplex RT-PCR dikerjakan untuk mengetahui serotipe Virus Dengue pada sample klinik. RT-PCR ini dikerjakan dengan menggunakan kit Superscript™ III one-step RT-PCR system with Platinum (Invitrogen). Primer spesifik yang digunakan untuk mengetahui serotipe virus dengue seperti yang didesain oleh Yong *et al.* (2007).

Tabel 1. Sekuen primer, posisi pada genom dengue dan ukuran produk RT-PCR, serta kombinasi primer (Yong *et al.*, 2007)

Virus Serotype	Primer	Primer sekuens	Posisi Primer	Ukuran amplicon dan kombinasi pimer
	Dcon	5'-AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACA	1 - 25	
DEN1	D1	5'-CCCCGTAACACTTTGATCGCTCCATT	317 - 342	342 bp (Dcon dan D1)
DEN2	D2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG	231 - 251	251 bp (Dcon dan D2)
DEN3	D3	5'-GCACATGTTGATTCCAGAGGCTGTC	514 - 538	538 bp (Dcon dan D3)
DEN4	D4	5'-GTTTCCAATCCCATTCTGAATGTGGTGT	726 - 754	754 bp (Dcon dan D4)

Dcon: dengue conserved region

Campuran satu reaksi (25 µl) terdiri dari 5 µl *template* RNA, 12,5 µl 2x reaction mix, 2 µl MgSO₄, 0,5 µl superscript, 1 µl primer Dcon [10 pmol/µl], dan masing-masing 1 µl primer D1, D2, D3, dan D4. RT-PCR dilakukan pada *thermocycle*. Reaksi

diawali dengan sintesis cDNA 60°C, 30 menit, pre-denaturasi 94°C, 2 menit, dan dilanjutkan dengan 40 siklus denaturasi 94°C, 45 detik, *annealing* 50°C, 1 menit, ekstensi 68°C, 1 menit. Ekstensi akhir dilakukan pada 68°C selama 7 menit. Selanjutnya produk

Onestep-multiplex RT-PCR disimpan pada suhu -20°C . Analisis produk amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis pada 1,5% gel agarose dalam TBE 1x.

One-Step RT-PCR

Amplifikasi *E/NS1 gene junction* virus DEN-2 dikerjakan dengan metode *One-Step* RT-PCR. Sampel yang terkonfirmasi DEN-2 yang di PCR. *One-Step* RT-PCR dilakukan dengan kit Superscript™ III *one-step* RT-PCR (Invitrogen) menggunakan pasangan primer Rico-Hesse *et al.* (1997) yang dimodifikasi. Modifikasi primer terletak pada posisi ke enam dari ujung 3' primer *forward* dan *reverse*.

F: D2/2170V 5'-

ATGCCATTTTAGGTGACACAGCITGGGA-3

R: D2/2578 5'-

TTACTGAGCGGATTCCACAATGCC-3'

Campuran satu reaksi (25 μl) terdiri dari 5 μl *template* RNA, 12,5 μl 2x reaction mix, 3 μl *Rnase-free water*, 2 μl

MgSO_4 , 0,5 μl superscript, dan primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1 μl [10 pmol/ μl]. RT-PCR dilakukan pada *thermocycler*. Reaksi diawali dengan sintesis cDNA 60°C , 30 menit, pre-denaturasi 94°C , 2 menit, dan dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C , 45 detik, *annealing* 55°C , 1 menit, ekstensi 68°C , 1 menit. Ekstensi akhir dilakukan pada 68°C selama 7 menit. Analisis produk amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis pada 1,5% gel agarose dalam 1x TBE.

Sekuensing

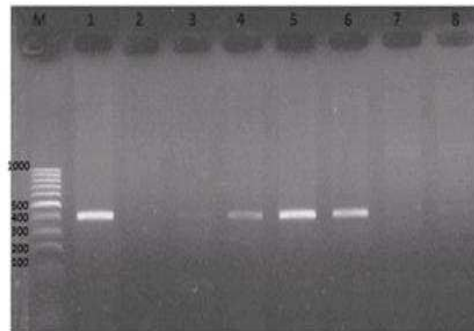
Sekuensing dikerjakan untuk mengetahui urutan nukleotida *E/NS1 gene junction*. Sekuensing dikerjakan menggunakan DNA Sekuenser. Analisis data hasil sekuensing dengan menggunakan BioEdit 7.0. Analisis filogenetik dilakukan dengan *software* MEGA4. Lima strain virus penelitian dibandingkan dengan sekuens nukleotida *E/NS1 gene junction* dari 33 strain dari daerah lain (Tabel 2)

Tabel 2. Strain pembanding virus DEN-2 untuk pembuatan pohon filogenetik

No	Strain	Asal strain	Tahun	Sumber/ GenBank accession
1	8720/Indonesia/73	Indonesia	1973	M32951
2	BA05i	Indonesia	2004	AY858035
3	TB16i	Indonesia	2004	AY858036
4	98900666 DSS DV-2	Indonesia	1998	AB189124
5	57S/Vietnam/87	Vietnam	1987	M32948
6	JAH/Jamaica/82	Jamaica	1982	M32960
7	D82-137/THA/182	Thailand	1982	U87341
8	D28/Philippines/88	Filipina	1988	M32932
9	766635/Taiwan/87	Taiwan	1987	M32949
10	1334/Srilanka/81	Srilanka	1981	M32938
11	ArD20761/Senegal/74	Senegal	1974	M32957
12	PR159S1/Puerto Rico/69	Peuerto Rico	1969	M32968
13	AS/BRU/3	Brunei	2006	EF434391
14	DS17/130606	Malaysia	2006	EU031576
15	Isolat Pakistan	Pakistan	1996	DVU49189
16	MM-3(1009/87)	Myanmar	2006	DENENSC
17	92265/BR-PE	Brazil	2002	EU259604
18	BRA/Moto Grosso/97	Brazil	1997	AY159276
19	BRA/Parnambuco/97	Brazil	1997	AY159278
20	BRA/Maranhao/98	Brazil	1998	AY159275
21	BRA/Maranhao/96	Brazil	1996	AY159274
22	BRA/Paraiba/99	Brazil	1999	AY159277
23	BRA/Bahia/99	Brazil	1999	AY159273
24	BRA/Sergipe/99	Brazil	1999	AY159279
25	BRA/Para/98.1	Brazil	1998	AY277245
26	BRA/Para/98.2	Brazil	1998	AY277245
27	173072	Brazil	2003	AY306107
28	164883	Brazil	2003	AY306113
29	183966	Brazil	2003	AY306109
30	194786	Brazil	2003	AY306117
31	194791	Brazil	2003	AY306118
32	195228	Brazil	2004	AY306119
33	195232	Brazil	2003	AY306120

Hasil dan Diskusi

E/NS1 gene junction merupakan segmen spesifik yang digunakan untuk analisis perbandingan sekuens nukleotida. Segmen ini digunakan karena segmen ini paling menunjukkan variasi genetik pada tempat-tempat yang seragam (Rico-Hesse, 1990). Gambar 1 menunjukkan hasil amplifikasi *E/NS1 gene junction*.



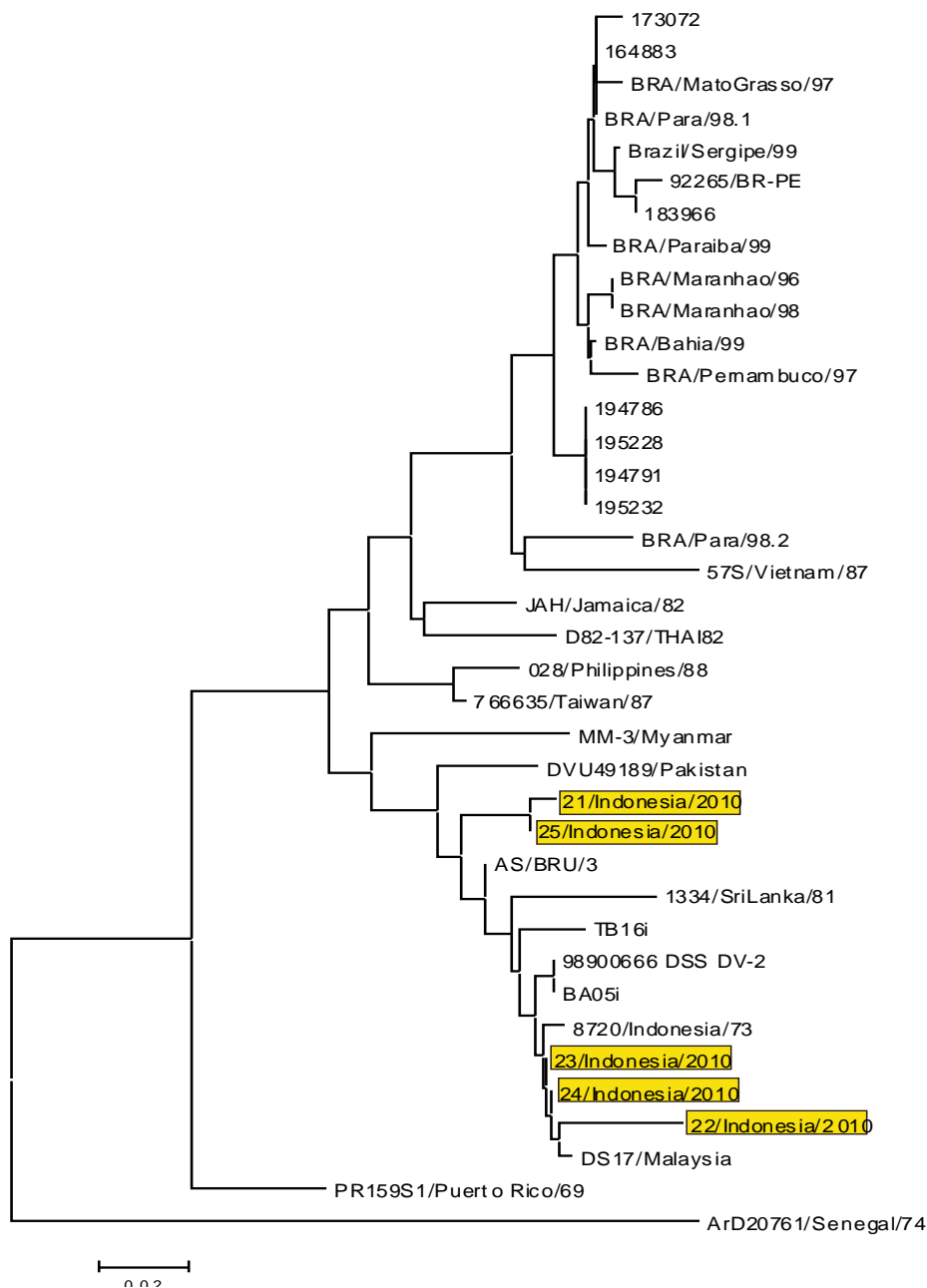
Gambar 1. Elektroforesis produk amplifikasi segmen *E/NS1 gene junction* virus DEN- 2. *lane M*: DNA marker, *lane 1-8*: sampel DEN-2, *lane 1*: 21/Indonesia/2010, *lane 4*: 22/Indonesia/2010, *lane 5*: 23/Indonesia/2010, dan *lane 6*: 24/Indonesia/2010.

Untuk mempelajari evolusi molekuler virus dengue asal Indonesia, dilakukan analisis terhadap sekuens nukleotida segmen *E/NS1 gene junction*. Rico-Hesse (1990) menyatakan *E/NS1 gene junction* merupakan segmen genomik terbaik yang paling sering digunakan untuk mempelajari epidemiologi molekuler dan filogenetik virus dengue, karena segmen ini merupakan daerah yang tidak terpapar langsung dengan sistem imun sehingga mengalami mutasi acak pada tempat-tempat yang seragam (Rico-Hesse 1990). Hubungan genetik ditunjukkan dengan membandingkan 240 nukleotida dari *E/NS1 gene junction*, karena nukleotida dari daerah ini mengkode asam amino yang kemungkinan tidak berhubungan dengan respon imun. Filogeni hanya merefleksikan hubungan genetik, tidak merefleksikan perbedaan patogenesis (Rico-Hesse, *et al.*, 1998). Analisis filogenetik dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dan mengetahui distribusi geografis masing-masing strain. Sehingga dari studi genetik ini dapat memberikan gambaran asal virus yang menjadi penyebab

terjadinya kasus demam berdarah (DD) dan demam berdarah dengue (DBD) pada suatu daerah.

Virus DEN-2 dari DKI Jakarta, Indonesia (21/Indonesia/2010, 22/Indonesia/2010, 23/Indonesia/2010, 24/Indonesia/2010 dan 25/Indonesia/2010) berada dalam satu kelompok dengan strain dari Asia yaitu Myanmar, Pakistan, Brunei, Sri Lanka, dan Malaysia. Kelima strain penelitian juga berkerabat dekat dengan strain Indonesia yang telah ada sebelumnya yaitu strain 8720/Indonesia/73, BA05i, TB16i, dan 98900666 DSS DV-2, tetapi berada dalam kelompok yang berbeda dengan strain Amerika Latin (Brazil).

Strain virus DEN-2 yang diteliti berpotensi menyebabkan DHF/DSS karena strain yang diteliti tersebut mempunyai kekerabatan yang dekat dengan strain asal Asia Tenggara. Menurut Rico-Hesse *et al.* (1997), Asia Tenggara diduga menjadi sumber varian virus dengue yang lebih virulen. Kasus DHF yang terjadi di Amerika disebabkan oleh masuknya virus DEN-2 asal Asia Tenggara.



Gambar 2. Kladoqram yang dikonstruksi berdasarkan algoritma Neighbour-joining yang menunjukkan hubungan kekerabatan antara strain penelitian dengan strain pembandingan Virus DEN-2. Skala mengindikasikan substitusi 2 per 200 nukleotida pada sekuense *E/NS1 gene junction*

Daftar Pustaka

- Burke D.S., Nisalak, A., Johnson, D.E., dan Scott, R.M. 1988. A Prospective Study of Dengue Infections in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 172-180.
- Callahan, J.D., Wu, S-J.L., Dion-Schultz, A., Mangold, B.E., Peruski, L.F., Watts, D.M., Porter, K.R., Murphy, G.R., Suharyono, W., King, C-C., Hayes, C.G., and Temenak, J.J. 2001. Developmental and Evaluation of Serotype- and Group-Specific Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan) Assays for Dengue Virus. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 4119-4124.
- Henchal, E.A. and Putnak, J.R. 1990. The dengue viruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 376-396.
- Johnson, B.W., Russell, B.J., dan Lanciotti, R.S. 2005. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse

- Transcriptase PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 43(10): 4977-4983.
- Koraka, P. 2007. Dengue Virus Specific Immune Response: Implications for laboratory diagnosis and vaccine development. Erasmus University Rotterdam.
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., dan Vorndamt, A.V. 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J.Clin.Microbiol.* 30(3): 545-551.
- Lindegren, G., Vene, S., Lundkvist, A., and Falk, K.I. 2005. Optimized Diagnosis of Acute Dengue Fever in Swedish Travelers by a Combination of Reverse Transcription-PCR and Immunoglobulin M Detection. *J.Clin.Microbiol.*, 43(6), 2850-2855.
- Miagostovich, M.P., dos Santos, F.B., Gutierrez, C.M., Riley, L.W., and Harris, E. 2000. Rapid Subtyping of Dengue Virus Serotypes 1 and 4 by Restriction Site-Specific PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 38(3), 1286-1289.
- Neto, R.J.P., Lima, D.M., de Paula, S.O., Lima, C.M., Rocco, I.M., and Fonseca, B.A.L. 2005. Molecular Epidemiology of Type 1 and 2 Dengue Virus in Brazil from 1988 to 2001. *Brazil. J. Med. Biol. Research.*, 38, 843-852.
- Osman. O., Fong, M.Y., and Devi, S. 2008. Sequence Analysis of E/NS1 Gene Junction of Dengue Virus Type 2 Isolated in Brunei. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.*, 39(1), 62-78.
- Parida, M., Horioka, K., Ishida, H., Dash, P.K, Saxena, P., Jana, A.M., Islam, M.A., Inoue, S., Hosaka, N., dan Morita, K. 2005. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* 43(6): 2895-2903.
- Rico-Hesse, R. 1990. Molecular Evolution and Distribution of Dengue Viruses Type 1 and 2 in Nature. *Virology.*, 174, 479-493.
- Rico-Hesse, R., Harisson, L.M., Salas, R.A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., Boshell, J., de Mesa, M.T.R., Nogueira, R., and da Rosa, A.T. 1997. Origin of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the American. *Virology.*, 230, 244-251.
- Rico-Hesse, R., Harrison, L.M., Nisalak, A., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Green, S., Rothman, A.L., and Ennis, F.A. 1998. Molecular Evolution of Dengue Type 2 Virus in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58 (1), 96-101.
- Satari, I.H. dan M. Meiliasari. 2004. *Demam Berdarah Perawatan di Rumah dan Rumah Sakit*. Puspa Sehat. Jakarta. hal 73.
- Shu, P.Y., Chang, S.F., Kuo, Y.C., Yueh, Y.Y., Chien, L.J., Sue, C.L, Lin, T.H., and Huang, J.H. 2003. Development of Group and Serotype Specific One-Step SYBR Green I-Based Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Dengue Virus. *J. Clin. Microbiol.*, 41(6), 2408-2416.
- Watts, D.M., Porter, K.M., Putvatana, P., Vasquez, B., Calampa, C., Hayes, C.G., dan Halstead, S.B. 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever. *Lancet.* 354: 1431-1434.
- Yong, Y.K., Thayan, R., Chong, H.T., Tan, C.T., dan Sekaran, S.D. 2007. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore. Med. J.* 48(7): 662-668.