

ANALISA EVOLUSI VIRUS *DENGUE* YANG ENDEMIK DI INDONESIA

Erick Sidarta¹, Sari Mariyati Dewi², Arlends Chris³

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara

Email: ericksi@fk.untar.ac.id

²Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara

Email: sarid@fk.untar.ac.id

³Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara

Email: arlendsc@fk.untar.ac.id

Masuk: 23-01-2019, revisi: 30-07-2019, diterima untuk diterbitkan: 01-08-2019

ABSTRAK

Indonesia merupakan daerah dengan hiperendemisitas tinggi untuk infeksi virus dengue dan tempat bersirkulasinya keempat varian genotype virus dengue. Saat ini salah satu cara untuk pencegahan infeksi virus dengue adalah dengan vaksin dengue yang baru tersedia tahun 2016. Vaksin dengue ini menstimulasi terbentuknya antibodi yang akan mengenali membran dan selubung dari keempat genotype virus dengue. Efektivitas dari vaksin ini tergantung dari kesesuaian antara antibodi yang terbentuk dengan varian yang beredar di Indonesia. Mengingat virus dengue merupakan virus RNA yang umumnya memiliki laju mutasi yang tinggi, mutasi yang terjadi dapat mengakibatkan terbentuknya escape mutant yang mampu menghindari antibodi yang terbentuk oleh vaksin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui evolusi dan laju mutasi dari virus dengue yang beredar di Indonesia. Sebanyak 116 data genom lengkap dari virus dengue yang telah dilaporkan di Indonesia digunakan dalam penelitian ini. Genotype virus dengue dianalisa dengan menggunakan software MEGA-X. Evolusi dan laju mutasi dari gen penyandi selubung (E) dan membran (M) virus dengue dianalisa dengan menggunakan software BEAST versi 1.8.3. Hasil dari penelitian ini menunjukkan gen E dan M virus dengue telah berevolusi semenjak pertama kali dilaporkan pada tahun 1975 dan memiliki laju mutasi yang tinggi. Gen E mencapai 9.26×10^{-4} substitusi/basa/tahun (95% HPD $7.81 \times 10^{-4} - 1.07 \times 10^{-3}$) maupun gen M yang mencapai 8.5×10^{-4} substitusi/basa/tahun (95% HPD $6.03 \times 10^{-4} - 1.09 \times 10^{-3}$). Tingginya laju mutasi ini membutuhkan perhatian bagi pengembang vaksin untuk pengawasan dan evaluasi yang berkesinambungan.

Kata Kunci: dengue; evolusi; laju mutasi; selubung; membran

ABSTRACT

Indonesia is an area with high hyperendemicity for dengue virus infection and the circulation of the four variants of dengue virus genotype. Currently, one way to prevent dengue virus infection is with a new dengue vaccine available in 2016. This dengue vaccine stimulates the formation of antibodies that will recognize the membrane and envelope of the four dengue virus genotypes. The effectiveness of this vaccine depends on the suitability of the antibodies formed with variants circulating in Indonesia. Since dengue virus is an RNA virus that generally has a high mutation rate, the mutations that occur can result in the formation of escape mutants that are able to avoid the antibodies formed by the vaccine. This study aims to determine the evolution and mutation rate of dengue viruses circulating in Indonesia. A total of 116 complete genome data from dengue viruses that have been reported in Indonesia were used in this study. Dengue virus genotypes were analyzed using MEGA-X software. The evolution and mutation rate of the envelope (E) and membrane (M) gene of the dengue virus were analyzed using BEAST software version 1.8.3. The results of this study indicate that the E and M genes of the dengue virus have evolved since they were first reported in 1975 and have a high mutation rate. Gen E reaches 9.26×10^{-4} substitution / base / year (95% HPD $7.81 \times 10^{-4} - 1.07 \times 10^{-3}$) and M gene reaches 8.5×10^{-4} substitution / base / year (95% HPD $6.03 \times 10^{-4} - 1.09 \times 10^{-3}$). The high rate of this mutation requires attention for vaccine developers for ongoing monitoring and evaluation.

Keywords: dengue; evolution; mutation rate; sheath; membrane

1. PENDAHULUAN

Dengue merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi dari virus dengue yang merupakan keluarga *Flavivirus*. Penyakit ini merupakan salah satu masalah kesehatan utama yang disebarkan dengan bantuan nyamuk *Aedes Aegypti* dan *Aedes albopictus*. (World Health Organization, 2012) Infeksi dengue dilaporkan mencapai 390 juta kasus infeksi setiap tahunnya. (Bhatt et al., 2013) Hal ini merupakan masalah kesehatan yang besar bagi penduduk yang tinggal di daerah tropis dan subtropis, seperti Indonesia, mengingat daerah tersebut adalah daerah endemis infeksi virus dengue. Di Asia dan Amerika Latin, infeksi dengue yang parah merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi pada anak-anak. (World Health Organization, 2012)

Saat ini, satu-satunya vaksin yang telah disetujui untuk pencegahan infeksi dengue adalah vaksin rekombinan tetravalent yang terbuat dari gabungan antara virus dengue dengan demam kuning yang dikenal sebagai CYD-TDV (dikenal dengan nama dagang Dengvaxia®). Vaksin tersebut merupakan virus chimera antara demam kuning dengan dengue yang telah dilemahkan dan mengekspresikan gen struktural yang mengkodekan protein membran (M) dan selubung (E) dari empat serotipe dengue. (Agarwal, Wahid, Yausep, Angel, & Lokeswara, 2017) Di Indonesia sendiri, sekalipun penggunaannya belum meluas dan memiliki harga yang cukup tinggi, vaksin ini telah tersedia sejak bulan September tahun 2016 dan telah diakui oleh BPOM. (Fadhila, 2017)

Tingkat efektifitas dari suatu vaksin ditentukan oleh kemampuan vaksin tersebut dalam menginduksi respon imun dari tubuh manusia, yang disebut juga sebagai tingkat antigenisitas dan kemampuannya dalam menetralkan patogen yang spesifik. (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2014)

Kegagalan vaksinasi dapat terjadi apabila ada ketidakcocokan antara antibodi yang terbentuk oleh vaksin dengan antigen dari patogen. Salah satu hal yang dapat menyebabkan hal ini adalah mutasi antigen yang berperan dalam pengenalan oleh antibodi. Hal ini nampak pada vaksinasi influenza yang mengalami pergantian setiap tahunnya. Virus dengue sendiri merupakan virus RNA yang umumnya memiliki laju mutasi yang tinggi. Penelitian oleh Allicock et al menunjukkan bahwa laju mutasi virus dengue di Amerika mencapai $7.7 - 9.7 \times 10^{-4}$ substitusi/basa/tahun. (Allicock et al., 2012)

Varian dari keempat serotipe virus dengue telah banyak dilaporkan di Indonesia. Tetapi data varian tersebut hanya merujuk pada suatu daerah tertentu di Indonesia. (Fahri et al., 2013; Haryanto et al., 2016; Megawati et al., 2017; Nusa et al., 2014; Sasmono et al., 2015) Berdasarkan laporan tersebut, laju mutasi dari varian yang bersirkulasi di Indonesia secara keseluruhan belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk melihat evolusi dan laju mutasi dari virus dengue yang ada di Indonesia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan terhadap kebijakan vaksinasi dengue dan pengembangan vaksin dengue di Indonesia.

2. METODE PENELITIAN

Subjek Penelitian

Subjek penelitian merupakan data nukleotida sebanyak 116 virus dengue yang telah dilaporkan dan di Indonesia. Data tersebut diambil dari bank data NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) dengan kriteria inklusi; sampel berasal dari Indonesia, memiliki genom yang lengkap, merupakan data

populasi yang diambil dari manusia, memiliki data tahun dan sampel berasal dari tahun 1975 sampai tahun 2018.

Penentuan Genotipe Virus

Analisa genotipe virus dengue dilakukan dengan analisa filogenetik dengan menggunakan *software* MEGA-X. Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan metode *Maximum Likelihood* dengan *bootstrap* sebanyak 1000 perulangan. (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018)

Penentuan Parameter Evolusi

Parameter untuk evolusi ditentukan dengan menggunakan *software Jmodeltest* versi 2.1.10. Parameter hasil analisa digunakan untuk analisa evolusi. (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012)

Analisa Evolusi dan Laju Mutasi Gen E dan M Virus Dengue

Analisa evolusi dan laju mutasi dilakukan dengan menggunakan *software* BEAST versi 1.8. Model substitusi menggunakan model GTR (*General Time Reversible*) dengan *Invariant* dan *Gamma* sesuai dari perhitungan *Jmodeltest* versi 2.1.10. Perhitungan jam molekuler (*Molecular Clock*) menggunakan tipe *Uncorrelated Relaxed Clock*. Analisa dilakukan sebanyak 30 juta perulangan dengan *sampling* setiap 3000 perulangan. Hasil akhir dilakukan *burn-in* sebanyak 1000 sampel dan pembacaan laju mutasi dilakukan dengan *software* Tracer versi 1.6 dan visualisasi hasil analisis dengan menggunakan *software* FigTree versi 1.4.2. (Bouckaert, et.al., 2014)

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Indonesia merupakan daerah hiperendemik virus dengue dan keberadaan keempat genotipe virus dengue telah dilaporkan bersirkulasi disetiap daerah di Indonesia. Data virus yang digunakan untuk penelitian ini diketahui sebanyak 69% berasal dari Makassar, 12% berasal dari Jakarta, 8% berasal dari Sumatra dan sebanyak 11% tidak diketahui asal daerah pengambilannya. Keempat genotipe dari virus dengue dapat ditemukan dari data virus dengue yang digunakan untuk penelitian ini. Dari 116 data virus dengue yang digunakan, peneliti menemukan genotipe yang paling dominan adalah genotipe 2 diikuti dengan genotipe 1, 3, dan 4. Dominasi genotype 2 ini sesuai dengan yang telah dilaporkan oleh Roy Nusa et al. 2014 untuk penelitian yang dilakukan di Sukami, Jawa Barat. (Nusa et al., 2014) Distribusi keempat genotipe dilihat pada tabel 1.

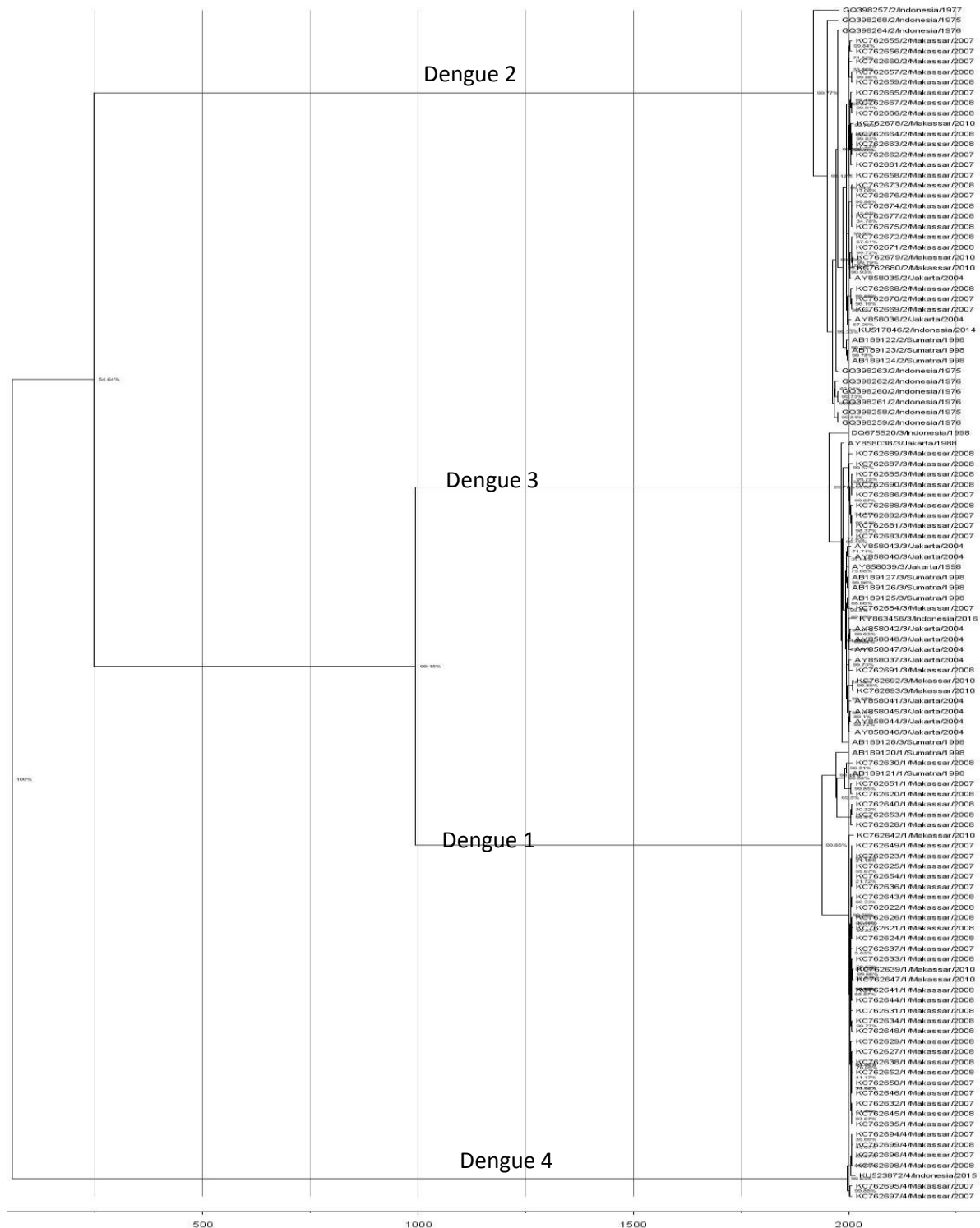
Tabel 1. Distribusi genotipe dari data virus dengue (n=116)

Genotipe	%
1	32
2	35.3
3	26.7
4	6

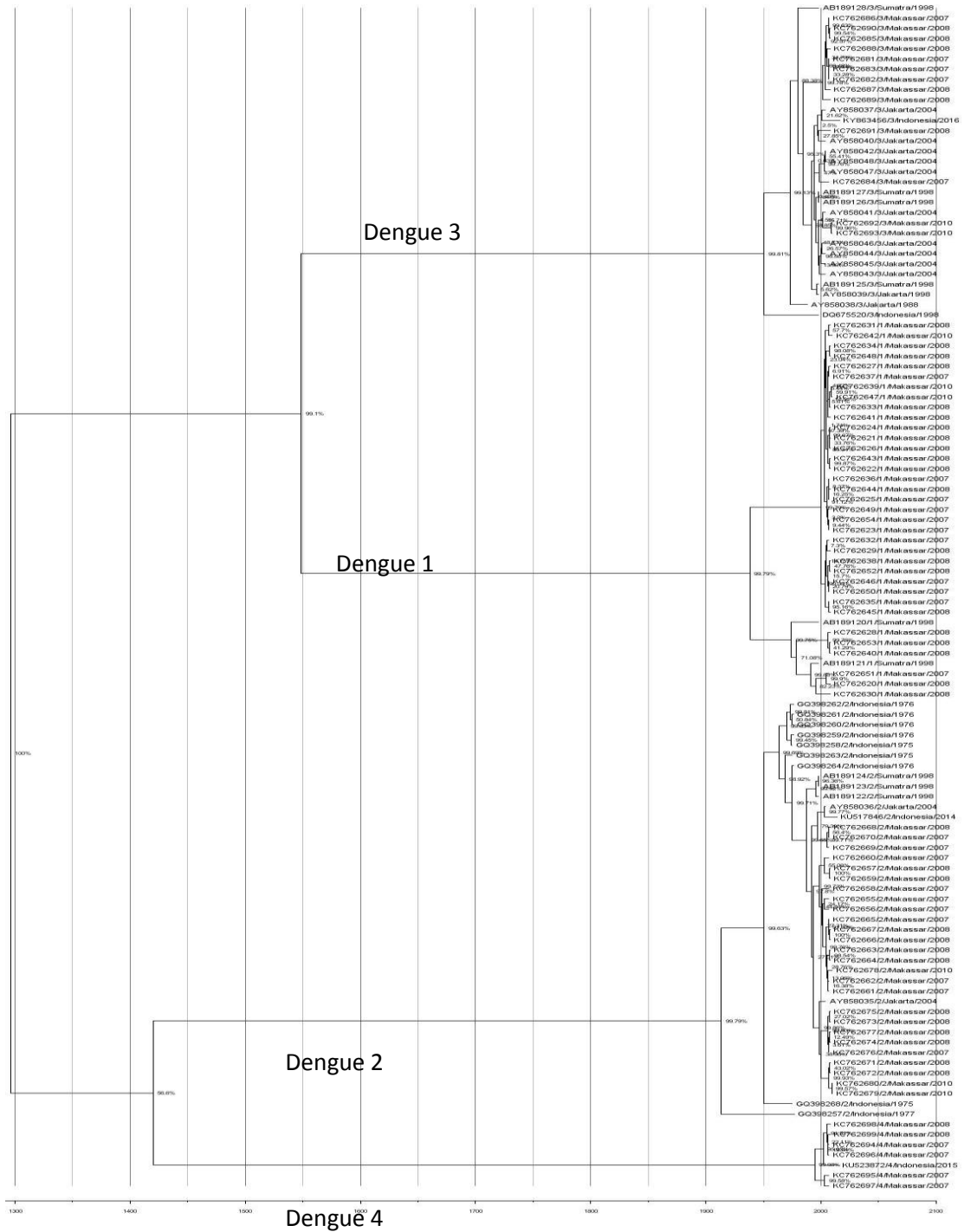
Laju mutasi merupakan parameter yang penting untuk dipahami karena memiliki implikasi dalam perkembangan pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit. Sebagai contoh, estimasi laju mutasi dari virus HIV yang dapat terjadi secara spontan sangat berperan dalam timbulnya resistensi obat sehingga pengobatan lanjutan dengan menggunakan beberapa variasi obat sekaligus sangat dibutuhkan. Contoh lainnya adalah pada manajemen vaksinasi influenza yang selalu diperbaharui setiap tahunnya. (Sanjuán, Nebot, Chirico, Mansky, & Belshaw, 2010).

Gen E dan gen M dari virus dengue memiliki laju mutasi yang berbeda sekalipun berasal dari genom virus yang sama (gambar 1 dan 2). Hal ini dapat disebabkan oleh lokasi kedua protein yang terbentuk dari gen tersebut berbeda. Gen E akan menyandikan protein selubung yang berada paling luar dari virus tersebut. Hal ini akan mengakibatkan protein tersebut akan lebih sering terekspos dengan antibodi yang bersirkulasi di dalam tubuh manusia dan dapat mengakibatkan proses seleksi virion tertentu. (Doud, Hensley, & Bloom, 2017) Proses seleksi ini terlihat dari gambar 2 dan 3 dimana tidak ditemukannya sub-genotipe virus dengue 2 yang dilaporkan pada tahun 1975 -1977 setelah tahun 1998.

Pada hasil penelitian ini ditemukan laju mutasi yang tinggi baik dari gen E yang mencapai 9.26×10^{-4} substitusi/basa/tahun (95% HPD $7.81 \times 10^{-4} - 1.07 \times 10^{-3}$) maupun gen M yang mencapai 8.5×10^{-4} substitusi/basa/tahun (95% HPD $6.03 \times 10^{-4} - 1.09 \times 10^{-3}$). Angka ini lebih rendah daripada laju mutasi virus influenza H1N1 yang mencapai 3.03×10^{-3} substitusi/basa/tahun, akan tapi masih harus menjadi perhatian bagi pengembangan vaksin. (Sanjuán et al., 2010) Salah satu yang perlu diperhatikan dalam laju mutasi virus dengue adalah pengenalan vaksin itu sendiri. Vaksin dapat menjadi pemicu perubahan laju mutasi virus. Seperti pada vaksin hepatitis B yang memicu terbentuknya *escape variant* yang dapat menghindari antibodi yang terbentuk oleh vaksin tersebut. (Ye, Shang, & Li, 2015)



Gambar 1. Filogeni evolusi gen E dari virus dengue dengan metode Bayesian inference



Gambar 2. Filogeni evolusi gen M dari virus dengue dengan metode Bayesian inference

KESIMPULAN

Pada penelitian ini ditemukan 4 genotype virus dengue yang beredar di Indonesia dengan predominasi adalah genotipe 2. Gen E dan M dari virus dengue yang berada di Indonesia telah berevolusi semenjak dilaporkan pertama kali tahun 1975 dan analisa menunjukkan memiliki laju mutasi yang tinggi dari gen E mencapai 9.26×10^{-4} substitusi/basa/tahun sementara gen M mencapai 8.5×10^{-4} substitusi/basa/tahun. Tingginya laju mutasi ini memberikan suatu masukan untuk pengawasan dan evaluasi yang berkesinambungan terhadap efektivitas vaksin dengue yang beredar di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access*. Elsevier Health Sciences.
- Agarwal, R., Wahid, M. H., Yausep, O. E., Angel, S. H., & Lokeswara, A. W. (2017). The Immunogenicity and Safety of CYD-Tetravalent Dengue Vaccine (CYD-TDV) in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Acta Medica Indonesiana*, 49(1), 24–33.
- Allcock, O. M., Lemey, P., Tatem, A. J., Pybus, O. G., Bennett, S. N., Mueller, B. A., ... Carrington, C. V. F. (2012). Phylogeography and Population Dynamics of Dengue Viruses in the Americas. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1533–1543. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/molbev/msr320>
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., ... Drummond, A.J. (2014). Beast 2: A Software for Bayesian Evolutionary Analysis. *Plos Computational Biology*, 10(4). Retrieved from <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods*, 9(8), 772. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Doud, M. B., Hensley, S. E., & Bloom, J. D. (2017). Complete mapping of viral escape from neutralizing antibodies. *PLoS Pathogens*, 13(3). Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006271>
- Fadhila, S. R. (2017). Sekilas tentang Vaksin Dengue. Retrieved from IDAI website <http://www.idai.or.id/artikel/klinik/imunisasi/sekilas-tentang-vaksin-dengue>
- Fahri, S., Yohan, B., Trimarsanto, H., Sayono, S., Hadisaputro, S., Dharmana, E., ... Sasmono, R. T. (2013). Molecular surveillance of dengue in Semarang, Indonesia revealed the circulation of an old genotype of dengue virus serotype-1. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8), e2354. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002354>
- Haryanto, S., Hayati, R. F., Yohan, B., Sijabat, L., Sihite, I. F., Fahri, S., ... Sasmono, R. T. (2016). The molecular and clinical features of dengue during outbreak in Jambi, Indonesia in 2015. *Pathogens and Global Health*, 110(3), 119–129. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1184864>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Megawati, D., Masyeni, S., Yohan, B., Lestarini, A., Hayati, R. F., Meutiawati, F., ... Sasmono, R. T. (2017). Dengue in Bali: Clinical characteristics and genetic diversity of circulating

- dengue viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5). Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005483>
- Nusa, R., Prasetyowati, H., Meutiawati, F., Yohan, B., Trimarsanto, H., Setianingsih, T. Y., & Sasmono, R. T. (2014). Molecular surveillance of Dengue in Sukabumi, West Java province, Indonesia. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(6), 733–741.
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733–9748. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Sasmono, R. T., Wahid, I., Trimarsanto, H., Yohan, B., Wahyuni, S., Hertanto, M., ... Schreiber, M. J. (2015). Genomic analysis and growth characteristic of dengue viruses from Makassar, Indonesia. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 165–177. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.006>
- World Health Organization. (2012). Global Strategy for dengue prevention and control, 2012–2020. Retrieved from WHO website: <http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>
- Ye, Q., Shang, S., & Li, W. (2015). A new vaccine escape mutant of hepatitis B virus causes occult infection. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(2), 407–410. Retrieved from <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.994461>