

Analisis *cross reactivity* protein *precursor membrane* (prM) virus dengue endemik Indonesia dengan pendekatan imunoinformatik

Rizqy Lazuardy Hasan¹, Erick Sidarta^{2,*}

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

² Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

*korespondensi email: ericksi@gmail.com

ABSTRAK

Infeksi demam berdarah dianggap sebagai salah satu masalah kesehatan utama di Indonesia dan disebabkan oleh virus dengue. Kemampuan reaksi silang pada virus dengue dapat memperparah jika terjadi infeksi lainnya. Protein *precursor membrane* (prM) pada virus dengue merupakan bagian yang rentan akan terjadinya *antibody dependant enhancement* dan evolusi gen prM berubah setiap tahunnya. Studi ini bertujuan untuk menganalisa reaksi silang gen prM dari virus dengue yang endemis di Indonesia. Sebanyak 96 data sampel dari *National Center for Biotechnology Information* digunakan pada studi ini. Prediksi antigenisitas dengan metode *B-cell epitope prediction* lalu di lanjutkan proses analisis reaksi silang menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dengan perbagian 20 protein prM pada setiap *genotype* virus yang memiliki antigenisitas yang spesifitasnya 0,8. Hasil dari studi ini didapatkan 4 prediksi antigenisitas dan beberapa hasil reaksi silang terhadap protein lain seperti *anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin heavy chain*, *human immunodeficiency virus type I enhancer-binding protein 2*, *insulin receptor substrate like protein partial*, *cerebellar-degeneration-related antigen*. Pada studi ini ditemukan adanya perubahan prediksi antigenisitas dari gen prM virus dengue yang muncul setiap tahun dan adanya reaksi silang dengan protein lain.

Kata kunci: virus dengue; cross reactivity; prM

PENDAHULUAN

Demam berdarah adalah penyakit yang disebabkan oleh virus dengue (DENV) yang ditularkan melalui nyamuk *Aedes aegypti*. Infeksi DENV memiliki gambaran klinis yang luas, mulai dari subklinis sampai yang berbahaya, mulai dari *Dengue Fever* (DF) hingga Demam Berdarah Dengue (DBD) dan *Dengue Syok Sindrom* (DSS) yang berpotensi mengancam jiwa.¹ Virus dengue memiliki 4 macam serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Secara

genetik keempat serotipe virus dengue memiliki kesamaan 65%, namun masing-masing memiliki perbedaan antigen sehingga menimbulkan respon antibodi yang berbeda. Keempat serotipe DENV di temukan di berbagai daerah Indonesia dan yang terbanyak adalah DENV-2 dan DENV-3. Virus dengue 3 (DENV-3) merupakan serotipe virus yang paling dominan yang menyebabkan kasus berat. Dengan penanganan yang tidak tepat dapat menyebabkan kematian, Kemenkes

RI menyatakan jumlah kematian yang disebabkan oleh virus demam berdarah di seluruh Indonesia mencapai 459 pada bulan juli 2020.² Saat ini terdapat beberapa vaksin dengue yang sudah ditemukan namun patologi penyakit yang kompleks sulit untuk mengendalikan empat serotipe virus secara bersamaan sehingga kerja vaksin kurang efisien.

Protein *precursor membrane* (prM) pada DENV memiliki *cross-reactive* (reaksi silang) pada keempat serotype DENV. Hal tersebut berbahaya dikarenakan dapat menjadi masalah yang serius seperti dapat menyebabkan kejadian *Antibody-Dependent Enhancement* (ADE).⁵ Ketika seseorang sebelumnya pernah terinfeksi virus dengue, adanya prM akan menyebabkan keparahan perjalanan penyakit dan dapat menjadi *Dengue Haemorrhagic Fever* (DHF). Saat ini identifikasi prediksi epitop sel B pada protein prM/E dan prediksi epitop sel B dilakukan dengan *software online* IEDB.^{3,4} Prediksi antigen bertujuan untuk mengetahui apakah ada kesamaan antigen lain pada tubuh manusia. Bila terjadi kesamaan atau reaksi silang protein antigen virus dengue dengan protein lain di dalam tubuh manusia akan menyebabkan meningkatnya keparahan penyakit tersebut.

Berdasarkan uraian di atas, maka studi ini dilakukan untuk menganalisa reaksi

silang gen prM dari virus dengue yang endemis di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Sampel ini menggunakan seluruh data sampel sekuen virus dengue yang bersirkulasi di Indonesia dan didapatkan sebanyak 96 sampel. Sampel data didapatkan dari bank data *GenBank National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Analisis prediksi antigenisitas

Analisis prediksi antigenisitas dilakukan pada sel B di protein prM yang bermutasi untuk melihat protein mana yang merupakan antigen di setiap *genotype* dengan menggunakan aplikasi web BCPred. Studi ini menggunakan 20 asam amino pada sampel prediksi antigenisitas. Data prediksi yang spesifitasnya di atas 0,8 yang artinya protein tersebut antigen akan diberi warna. Tujuan data tersebut untuk dilanjutkan pada proses pembuatan data perubahan protein pada 96 sampel *dengue virus* dan data protein yang antigen tersebut akan dilihat *cross-reactivity* antigen pada manusia menggunakan aplikasi *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Analisis reaksi silang

Prediksi analisis reaksi silang antigenisitas menggunakan proses BLAST di *website* NCBI dengan

perbagian 20 protein prM pada setiap *genotype* virus yang memiliki antigenisitas yang spesifitasnya 0,8.

HASIL PENELITIAN

Sebanyak 148 sampel virus dengue yang terdapat di *GenBank* kemudian dilakukan skrining menjadi hanya 96 sampel karena alasan waktu koleksi sampel data dan tempat pengambilan sampel tersebut bukan berasal dari negara Indonesia. Data sampel yang digunakan merupakan virus dengue *complete genome* dan rata-rata panjang nukleotida pada sampel virus dengue tersebut $\pm 10.000\text{bp}$. Dari 96 data *sequence* yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan analisa filogenetik untuk melihat kekerabatan antar sampel virus dengue yang berasal dari Indonesia. Analisa filogenetik dilakukan dengan menggunakan software MEGA-X versi 10.1.8 dengan parameter

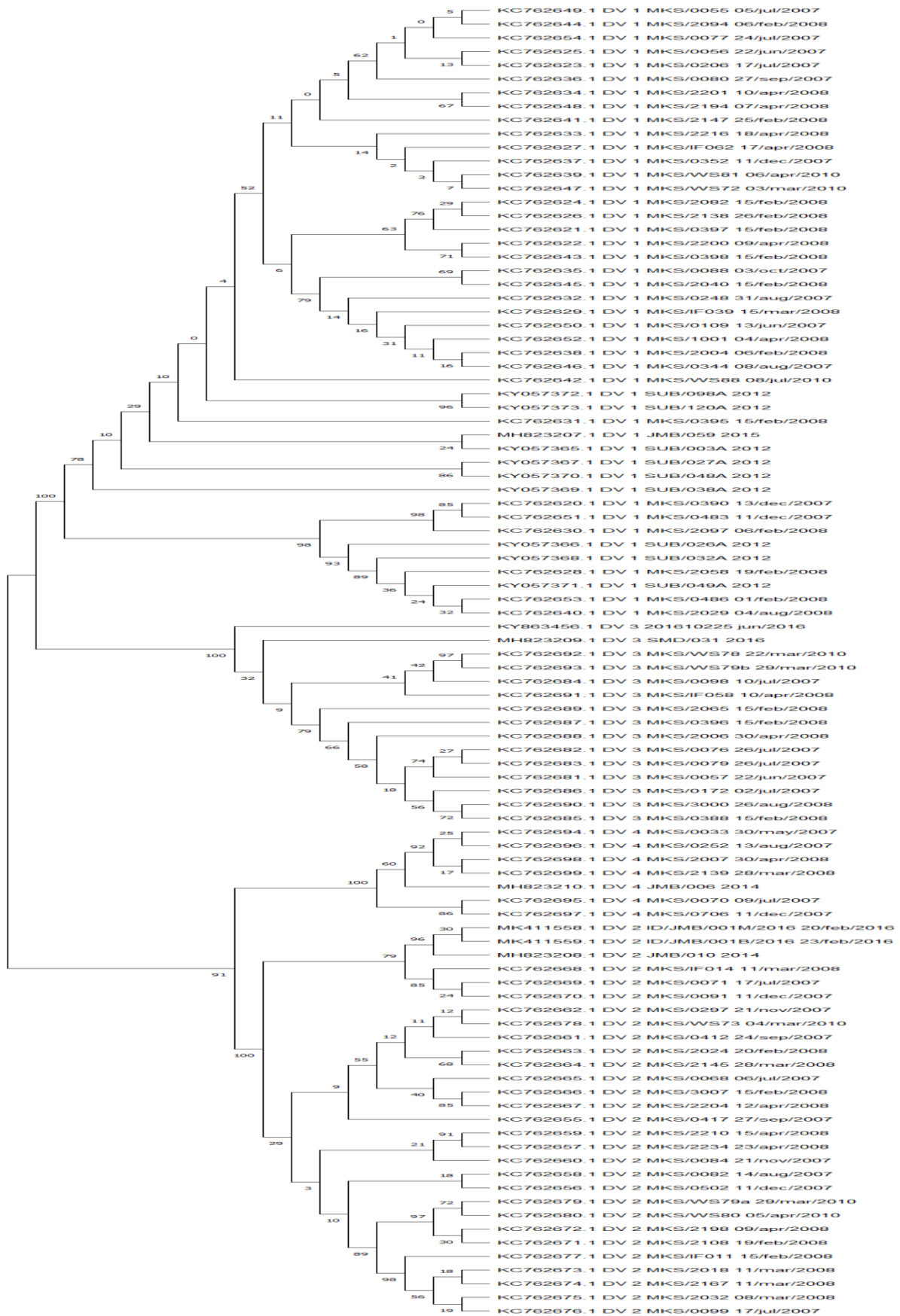
neighbor joining dengan *bootstrap* 1000. Hasil uji filogenetik menunjukkan serotipe 1 (DENV-1) sebesar 45%, DENV-2 sebesar 29%, DENV-3 sebesar 15%, dan DENV- 4 sebesar 7%. (Gambar 1) Kemudian dilakukan perhitungan jarak kekerabatan setiap serotipe dan didapatkan nilai rata-rata *distance* kekerabatan pada sampel protein prM *dengue virus*. Variasi tertinggi pada virus dengue gen prM terdapat pada serotipe prM virus dengue 1 sebesar 3,9%. untuk variasi terendah terdapat pada gen prM virus dengue 4 sebesar 1,8%. (Tabel 1)

Daftar perubahan protein prM

Hasil prediksi antigenisitas pada sel B di protein prM yang bermutasi untuk melihat protein mana yang merupakan antigen di setiap *genotype* dengan menggunakan aplikasi BCPred ditunjukkan pada Tabel 2 (<http://ailab-projects1.ist.psu.edu:8080/bcpred/>).

Tabel 1. Nilai rata-Rata *Within Genetics Distance Phylogeny* Dengue Virus (1-4)

Spesies	Rerata	Standard error
prM DV 1	3,90%	0,48%
prM DV 2	2%	0,36%
prM DV 3	2,20%	0,43%
prM DV 4	1,80%	0,40%



Gambar 1. Phylogeny DENV-1 hingga DENV-4

Pada Tabel 2 terlihat beberapa perubahan atau mutasi protein prM di setiap tahun pada *genotype dengue virus* (1-4). *Ancestor* pada setiap *genotype* sudah ditentukan sebagai pembanding agar dapat menemukan perubahan protein pada prM di setiap sampel *genotype*

dengue virus. Tujuan dari pembuatan data tabel ini adalah untuk melihat perubahan protein atau asam amino pada protein prM virus *Dengue* dari tahun ke tahun. Perubahan protein terbanyak adalah pada *dengue virus genotype 1 (DENV-1)*

Tabel 2. Daftar perubahan protein prM setiap data sequences

Genotype	Prediksi Ancestor	Variasi
Dengue Virus 1	CEDTLTYKCPRITEAEPDDV	CEDTMTYKCPRITETEPDDV CEDTMTYKCPRITEAEPDDV CEDTQTYKCPRITEAEPDDV
	CWCNATDTWVTYGTCSQTGE	CWCNATETWVTYGTCTYQTGE CWCNATETWVTYGTCSQTGE
	GLGLETRTETWMSSEGAWRQ	GLGLETRTETWMSSEGAWKH GLGLETRTETWMSSEGAWKQ
Dengue Virus 2	CWCNSTSTWVTYGTCTATGE	CWCNSTSTWVTYGTCTAPGE
	GLETRTETWMSSEGAWKHAQ	GLETRTETWMSSEGAGKHAQ GLETRAETWMSSEGAGKHAQ
Dengue virus 3	TRTQTWMSAEGAWRQVEKVE	TRAQTWMSAEGAWRQIEKVE TRAQTWMSAEGAWRQVEKVE
Dengue Virus 4	YKCPLLVNTEPEDIDCWCNL	YKCPLLVNTEPEDIDSWCNL YKCPLLVNTEPEDIVCWCNL

Prediksi cross-reactive pada DENV

Data Tabel 3 merupakan hasil BLAST pada table prediksi antigenisitas. Proses BLAST dilakukan di website NCBI (<https://ncbi.nih.gov>) dengan perbagian 20 protein prM pada setiap genotype virus yang memiliki antigenisitas yang spesifitasnya 0,8. Tabel 3 memperlihatkan virus dengue dapat mengalami reaktivitas silang dengan beberapa epitop yang diantaranya adalah *anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin heavy chain*, *Human immunodeficiency virus (HIV) type 1*

enhancer-binding protein 2, *insulin receptor substrate like protein partial*, *cerebellar-degeneration-related antigen*.

PEMBAHASAN

Virus Dengue di Indonesia

Indonesia merupakan daerah endemis DENV dan telah mengalami peningkatan kejadian 700 kali lipat selama 45 tahun terakhir.⁶ Kasus DBD di 34 provinsi Indonesia telah dilaporkan beredarnya keempat serotipe DENV (DENV-1, -2, -3, dan-4).⁷ Pemahaman yang jelas

tentang epidemiologi DENV saat ini di Indonesia sangat penting untuk merancang tindakan kesehatan masyarakat yang tepat.

Phylogenetics

Hasil dari pembuatan pohon phylogenetics menunjukkan bahwa ada 4 serotipe dengue virus di Indonesia. Serotipe yang banyak ditemukan adalah serotipe 1 dan 2 disusul dengan serotipe 3 dan 4. Hal ini sesuai dengan studi dari Harapan, et al dan beberapa studi lainnya yang mengungkapkan bahwa DENV-3 tidak lagi menjadi serotipe yang dominan dan telah digantikan oleh DENV-2 dan DENV-1.⁶⁻¹⁰ Pengetahuan serotipe ini penting dalam penyebaran virus dengue di Indonesia. Studi Harapan, et al menunjukkan tidak ada pola penyebaran serotipe dengue yang homogen di Indonesia selama awal tahun 2000-an.⁶

Distance

Distance adalah memperkirakan jumlah substitusi nukleotida atau asam amino yang diperlukan untuk menghitung jarak evolusioner dan menilai keragaman urutan asam amino di dalam (*within*) dan di antara kelompok (*between*).¹¹ Dalam tabel *Distance complete genome Denv (within)* menunjukkan persentase hasil dari pembagian dari satu serotype DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4. Hasil dari persentase dalam satu serotipe

tersebut dapat diartikan sebagai jarak evolusioner dan keberagaman asam amino dalam satu serotipe, di mana asam amino dari virus dengue ini dapat berubah setiap tahunnya dan akan mengakibatkan perubahan prediksi antigen antara satu serotype dengan yang lainnya. Pada tabel *Genetic distance (within/between) complete genome* maupun gen prM, menunjukkan hasil presentasinya tidak jauh berbeda. Menurut Jenkins, et al perubahan urutan asam amino virus dengue ini relatif lambat di bandingkan dengan virus lainnya¹².

Prediksi antigenisitas gen prM

Dengan adanya data tabel prediksi antigenisitas gen prM dapat dilihat adanya perubahan antigenisitas dari masing-masing serotipe pada lokasi yang berbeda. Pada dengue 1 terjadi perubahan 15 variasi, dengue 2 terjadi perubahan 5 variasi, dengue 3 terjadi perubahan 2, dengue 4 terjadi perubahan 2 variasi. Dalam prediksi tersebut, studi ini menggunakan *bioinformatic tools* BCPREDS dimana sekuens asam amino yang mendapat lebih dari skor 0,8 dianggap sebagai antigen¹³. Perubahan suatu prediksi antigen akan dapat mengalami kejadian aktivasi dari poliklonal sel B yang menginduksi antigen virus menyebabkan potensi *immune-escape*¹⁴, parameter *immune-*

escape ini adalah untuk melihat derajat keparahan penyakit dengue dan dapat mempengaruhi resistensi vaksin dan obat antivirus^{14,15}.

Dalam studi ini, data gen prM merupakan bagian antigenik dan ada banyak perubahan asam amino spesifik pada bagian genom, dapat dibuktikan dalam tabel perubahan asam amino terhadap setiap data sekuens data (Tabel 2). Hal yang serupa juga pernah dilaporkan dalam studi Pollett, et al.¹⁶ Menurut Katzelnick, et al bagian virus dengue yang berperan dalam evolusi adalah pada gen E (*envelope*) dan prM¹⁷. Guzman, et al menyatakan bahwa gen prM virus dengue berperan penting dalam perjalanan penyakit *antibody-dependent enhancement* (ADE). Dalam penjelasan tersebut, gen prM membuat infeksi virus dengue menjadi lebih sulit untuk dinetralisasi oleh antibodi¹⁸.

Prediksi *cross-reactive* pada gen prM virus dengue

Dalam tabel prediksi gen prM *cross-reactive* pada virus dengue (Tabel 3), diperlihatkan virus dengue dapat mengalami reaktivitas silang dengan beberapa epitop yang diantaranya adalah *anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin heavy chain*. Beberapa kasus reaktivitas silang antara DENV dan SARS-CoV-2 telah dilaporkan. Masyeni, et al melaporkan adanya temuan dengue rapid tes antigen

NS1 dan anti-IgM positif serta anti-IgG negatif pada dengue, sedangkan hasil rapid tes pada COVID-19 IgG adalah reaktif. Temuan ini mengarah pada serologi COVID-19 *false positive* pada pasien demam berdarah¹⁹. Temuan pada studi ini perlu dibuktikan lebih lanjut karena hanya merupakan prediksi.

Pada studi ini ditemukan reaksi silang HIV dengan DENV. Hubungan antara HIV dengan DENV sudah pernah di laporkan oleh Watt, et al yang menggambarkan presentasi klinis infeksi dengue pada pasien yang terinfeksi HIV-1²⁰. Pasien dengan DENV dan HIV koinfeksi menunjukkan perdarahan yang tidak terlalu parah, manifestasi hemoragik, dan kebocoran plasma. Infeksi DENV pada pasien HIV dikaitkan dengan penurunan *viral load*. Laporan ini menunjukkan bahwa koinfeksi HIV dengan DENV menghasilkan perkembangan klinis penyakit dengue yang lebih ringan, serta penekanan HIV-1 replikasi selama fase akut infeksi dengue²⁰.

Reaksi silang antara antibody yang mengenali DENV dengan *cerebellar-degeneration-related antigen* juga ditemukan pada studi ini. Ramos, et al menemukan adanya antibodi IgM terhadap virus dengue di cairan serebrospinal (CSF) pada kasus DBD yang melibatkan gejala sistem saraf pusat

(SSP) yang parah, seperti penurunan kesadaran, kejang, dan ensefalitis²¹. Namun studi mengenai hubungan langsung reaksi silang terhadap antibody tersebut harus di kaji lebih lanjut di laboratorium.

Studi ini hanya data prediksi sehingga data yang didapatkan belum tentu benar. Perlu dibuktikan lagi dengan studi lebih lanjut di laboratorium dengan data yang lebih lengkap. Akan tetapi penelitian bioinformatika ini dapat mempermudah peneliti dalam mengakses data virus dan analisis virus.

KESIMPULAN

Pada studi ini didapatkan 4 serotipe virus dengue yang bersirkulasi di seluruh Indonesia dari tahun 2004-2020. Selain itu, ditemukan adanya perubahan prediksi antigenisitas pada gen prM virus dengue yang muncul setiap tahun dan hasil dari BLAST menunjukkan kemungkinan reaksi silang anatara antibody prM virus dengue dengan *anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin heavy chain, human immunodeficiency virus type I enhancer-binding protein 2, insulin receptor substrate like protein partial, cerebellar-degeneration-related antigen*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Raveendran S. Dengue Syok Sindrom. Ilmu Anestesi Reanimasi FK UNUD. 2016.
2. Direktorat Jenderal Pencegahan dan Penegndalian Penyakit Kementerian Kesehatan RI. Hingga Juli, Kasus DBD di Indonesia Capai 71 Ribu. Kemenkes RI. 2020. Available from: <http://p2p.kemkes.go.id/hingga-juli-kasus-dbd-di-indonesia-capai-71-ribu/>
3. Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, et al. The immune epitope database 2.0. Nucleic Acids Res. 2010;38(Database issue):D854-62.
4. Salimi N, Fleri W, Sette A. The immune epitope database : a historical retrospective of the first decade. Immunology.2012;117-23.
5. Wang S, He R, Anderson R. PrM- and Cell-Binding Domains of the Dengue Virus E Protein. J Virol. 1999;73(3):2547-51.
6. Harapan H, Michie A, Yohan B, Shu P-Y, Mudatsir M, Sasmono RT, et al. Dengue viruses circulating in Indonesia: A systematic review and phylogenetic analysis of data from five decades. Rev Med Virol. 2019;29(4):e2037.
7. Karyanti MR, Uiterwaal CSPM, Kusriastuti R, Hadinegoro SR, Rovers MM, Heesterbeek H, et al. The changing incidence of Dengue Haemorrhagic Fever in Indonesia: A 45-year registry-based analysis. BMC Infect Dis. 2014;14(1):[7p.].
8. Porter KR, Beckett CG, Kosasih H, Tan RI, Alisjahbana B, Rudiman PIF, et al. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever in a cohort of adults living in Bandung, West Java, Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 2005;72(1):60-6.
9. Aryati A, Trimarsanto H, Yohan B, Wardhani P, Fahri S, Sasmono RT. Performance of commercial dengue NS1 ELISA and molecular analysis of NS1 gene of dengue viruses obtained during surveillance in Indonesia. BMC Infect Dis. 2013;13:611.
10. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al. Fever screening at airports and imported dengue. Emerg Infect Dis. 2005;11(3):460-2.

11. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004;5(2):150–63.
12. Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC. Rates of molecular evolution in RNA viruses: A quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol.* 2002;54(2):156–65.
13. Ali M, Pandey RK, Khatoon N, Narula A, Mishra A, Prajapati VK. Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13.
14. Correa ARV, Berbel ACER, Papa MP, De Moraes ATS, Peçanha LMT, De Arruda LB. Dengue virus directly stimulates Polyclonal B cell activation. *PLoS One.* 2015;10(12):1–20.
15. Torres MC, Martins Karl AL, Müller Pereira da Silva M, Dardenne LE, Bispo de Filippis AM. In Silico Analysis of Dengue Virus Serotype 2 Mutations Detected at the Intrahost Level in Patients with Different Clinical Outcomes. *Microbiol Spectr.* 2021;9(2):e00256-21.
16. Pollett S, Melendrez MC, Maljkovic Berry I, Duchêne S, Salje H, Cummings DAT, et al. Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. *Infect Genet Evol.* 2018;62:279–95.
17. Katzelnick LC, Coello Escoto A, Huang AT, Garcia-Carreras B, Chowdhury N, Maljkovic Berry I, et al. Antigenic evolution of dengue viruses over 20 years. *Science.* 2021;374(6570):999–1004.
18. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses.* 2010;2(12):2649–62.
19. Masyeni S, Santoso MS, Widyaningsih PD, Asmara DW, Nainu F, Harapan H, et al. Serological cross-reaction and coinfection of dengue and COVID-19 in Asia: Experience from Indonesia. *Int J Infect Dis.* 2021;102:152–4.
20. Watt G, Kantipong P, Jongsakul K. Decrease in human immunodeficiency virus type 1 load during acute dengue fever. *Clin Infect Dis.* 2003;36(8):1067–9.
21. Ramos C, Sánchez G, Hernández Pando R, Baquera J, Hernández D, Mota J, et al. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol.* 1998;4(4):465–8.