

Vol. 18, No. 2 Maret 2012

ISSN 0854-4263

INDONESIAN JOURNAL OF
**Clinical Pathology and
Medical Laboratory**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

| | | | | | |
|---|---------|-------|-------------|------------------------|-------------------|
| IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.) | Vol. 18 | No. 2 | Hal. 77-146 | Surabaya Maret 2012 | ISSN 0854-4263 |
|---|---------|-------|-------------|------------------------|-------------------|

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terakreditasi No: 66b/DIKTI/KEP/2011, Tanggal 9 September 2011

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

- Korelasi Kadar Crp, TNF- α dan Bone Mineral Density dengan Carboxyterminal Crosslinked Telopeptide Type I of Collagen di Penderita Arthritis Reumatoid
 (Correlation Between CRP, TNF- α and Bone Mineral Density with Carboxyterminal crosslinked Telopeptide Type I of Collagen in Rheumatoid Arthritis Patients)
Kusworini Handono, BP Putra Suryana, Sulistyorini 77-82
- Korelasi antara Kadar Interferon- γ Plasma dengan Jumlah Viral Load di Penderita HIV
 (Correlation of Plasma Interferon- γ and Viral Load in HIV Patients)
Hermi Indita, Endang Retnowati, Erwin Astha Triyono 83-86
- Keterkaitan Antigen NS1 Infeksi Virus Dengue dengan Serotipe Virus Dengue
 (NS1 Antigen Dengue Virus Infection Associated with Serotypes of Dengue Virus)
Roudhotul Ismaillya Noor, Aryati, Puspa Wardhani 87-91
- Nilai Rujukan Free Light Chain Serum dengan Imunoturbidimetri
 (The Reference Value of Serum Free Light Chain with Immunoturbidimetry)
Lidya Utami, Riadi Wirawan, Alida R Harahap, Abdul Muthalib, Harny Edward 92-96
- Acetosal, Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia L.*) dan Waktu Perdarahan
 (Acetosal, Noni Fruits Extract (*Morinda citrifolia L.*) and Bleeding Time)
I Wayan Putu Sutirta Yasa, Ketut Widayani Astuti, I Gusti Made Aman 97-104
- Analisis Pola Human Leukocyte Antigen (HLA) Kelas I pada Penderita Demam Berdarah Dengue Populasi Indonesia di Jawa Timur
 (Analysis of HLA Class I on Dengue Haemorrhagic Fever Indonesian Population in East Java)
EM. Judajana, Paulus Budiono, Indah Nuraini 105-110
- Analisis Filogenetik Dengue di Indonesia
 (Phylogenetic Analysis of Dengue Virus in Indonesia)
Aryati 111-116
- Diagnostic of C-reactive Protein in Febrile Children
 (Nilai Diagnostik C-Reactive Protein pada Anak Demam)
Johanis, Aryati, Dominicus Husada, Djoko Marsudi, M. Y. Probohoesodo 117-123
- Uji Diagnostik Metode Imunositokimia NS1 Virus Dengue, untuk Diagnosis Infeksi
 (Diagnostic Test Method for Immunocytochemical NS1 of Dengue Virus, for Infection Diagnosis)
Nafiandi, Ellyza Nasrul, Rismawati Yaswir 124-128
- Eksresi Koreseptor Human Immunodeficiency Virus CCR5 dan CXCR4 pada Subset Sel Limfosit T Serta Monosit
 (Human Immunodeficiency Virus Coreceptor CCR5 and CXCR4 Expression on Lymphocyte T Subset and Monocyte)
Agnes Rengga Indrati, Hinta Meijerink, Herry Garna, Bacht Alisjahbana, Ida Parwati, Reinout van Crevel, Andre van der Venn 129-133

TELAAH PUSTAKA

- Sindrom Hormon Antidiuretik Berlebih
 (Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone (SIADH))
Arleen N. Suryatenggara, Dalima A. W. Astrawinata 134-140

LAPORAN KASUS

Penderita Dengan Hemokromatosis Primer
(*Patient with Primary Hemochromatosis*)

Kadek Mulyantari, A.A.Wiradewi Lestari, A.A.N. Subawa, Tjokorda Gede Oka, Sudewa Djelantik..... 141-144

INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU **145-146**

ANALISIS FILOGENETIK DENGUE DI INDONESIA

(Phylogenetic Analysis of Dengue Virus in Indonesia)

Aryati¹

ABSTRACT

Molecular epidemiology is needed to solve the problem for endemic Dengue Hemorrhagic Fever in Indonesia. This research has been carried out consisting of 525 Dengue Hemorrhagic Fever sera, according to the WHO criteria. These sera were collected from 19 cities in Indonesia comprising the islands of Sumatera, Batam, Kalimantan, Sulawesi, Papua, Java, Bali and Lombok from 2003 until 2005. The immune response profile was as follows 57.14% (300/525) secondary infection, 12.57% (66/525) primary infection, 4.20% (22/525) equivocal and 26.09% (137/525) negative. From 192 PCR samples, 100 (52%) sera were positive, consisting of 65% DEN-2, 15% DEN-3, 12% DEN-4 and 8% DEN-1. Homology analysis showed nucleotide differences in capsid region DEN-2 serotypes, while DEN-3 serotypes were relatively consistent. Phylogenetic analysis using envelope (E) gene revealed that the Cosmopolitan genotype from Gorontalo in 2005, is currently circulating locally, with the potential to cause a severe hemorrhagic disease. Members of this genotype were closely related to viruses from Malaysia, Singapore, Thailand, Philippines and Australia. The isolate from Jakarta, 2003 showed DEN-3 with I genotype. This genotype was similar to the isolate from Indonesia 1978, 1985, and also from Thailand 1992, Philippines 1997, and Fiji 1992. These results showed Cosmopolitan genotype from DEN-2 was similar to Southeast Asia countries. It was also revealed that genotype-I from DEN-3 showed no change over the years since 1978.

Key words: Phylogenetic analysis, dengue, Indonesia

ABSTRAK

Epidemiologi molekuler diperlukan untuk memecahkan masalah Demam Berdarah Dengue (DBD) yang endemik di Indonesia. Penelitian ini dilakukan terhadap 525 sera penderita DBD yang memenuhi patokan WHO. Sera dikumpulkan dari penderita asal 19 kota di Indonesia yang terdiri dari berbagai kepulauan di Indonesia yaitu: Sumatera, Batam, Kalimantan, Sulawesi, Papua, Jawa, Bali dan Lombok mulai tahun 2003 sampai dengan 2005. Profil respons imun didapatkan infeksi dengue sekunder sebanyak 57,14% (300/525), infeksi primer sebanyak 12,57% (66/525), ekuivokal sebanyak 4,2% (22/525) serta dinyatakan negatif 26,09% (137/525). Dari 192 sampel PCR, didapatkan 52% (100/192) PCRNya positif yang terdiri dari 65% DEN-2, 15% DEN-3, 12% DEN-4 dan 8% DEN-1. Analisis homologik menunjukkan perbedaan nukleotida di region jenis serum penyalut (capsid serotype) DEN-2, sedangkan untuk serotipe DEN-3 relatif menetap. Analisis filogenetik menggunakan gen E didapatkan bahwa sampel dari Gorontalo pada tahun 2005 memiliki serotipe DEN-2 genotipe Cosmopolitan, yang bersirkulasi lokal dengan kuat menyebabkan penyakit perdarahan yang berat. Kelompok genotipe ini erat hubungannya dengan virus yang berasal dari Malaysia, Singapura, Thailand, Filipina dan Australia. Isolat yang berasal dari Jakarta, tahun 2003 menunjukkan DEN-3 genotipe I. Genotipe ini serupa dengan isolat dari Indonesia pada tahun 1978, 1985 dan juga dari Thailand pada tahun 1992, Filipina pada tahun 1997, serta Fiji pada tahun 1992. Hasil ini menunjukkan bahwa genotipe Cosmopolitan yang berasal dari serotipe DEN-2 serupa dengan yang ada di negara Asia Tenggara. Penelitian ini juga mengungkapkan bahwa genotipe I DEN-3 menunjukkan tidak ada perbedaan sepanjang tahun sejak tahun 1978.

Kata kunci: Analisis filogenetik, dengue, Indonesia

PENDAHULUAN

Merebak penyakit infeksi virus dengue kembali ini ditentukan oleh banyak faktor antara lain: inang, zat (*agent*) dan lingkungan. Hal ini tidak terlepas dari transport virus patogen atau terjadi evolusi atau ekologis dari penyebab penyakit murni (*native pathogen*) yang pada awalnya hanya menyebabkan kasus ringan atau bahkan tidak memberikan gejala bagi manusia.¹

Epidemiologi molekuler banyak dikembangkan untuk mempelajari berbagai faktor yang diperkirakan menjadi penyebab. Karena jumlah penderita penyakit infeksi virus dengue di seluruh belahan dunia masih

terus meningkat. Runtunan (sekuensing) dari berbagai region di dalam rakitan kelompok (genom) virus dengue tersebut ditujukan untuk menentukan ragam genetik dan untuk mencirikan subtipe (genotipe) di dalam setiap serotipenya. Pencirian subtipe (genotipe) berguna di dalam epidemiologi molekuler, sehingga dapat memantau sebaran genotipe yang bersirkulasi di daerah keberadaan penyakit.¹ Menurut Messer,¹ dalam dua dasawarsa terakhir di Srilanka, Afrika Timur dan Amerika Latin wabah DBD terjadi disebabkan oleh serotipe DEN-3, subtipe III. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa evolusi dan transport virus dengue yang menyebabkan wabah ini, berasal dari

¹ Bag. Patologi Klinik FK-UNAIR/RSUD. Dr. Soetomo. E-mail: dr_aryati@yahoo.com

daratan India. Wabah di Srilanka pada tahun 1989 ini bernasab dengan ragam baru yang timbul dari DEN-3 sub tipe III yang menyebar ke Afrika dan dari Afrika ke Amerika Latin pada pertengahan tahun 1990. Awalnya DEN-3 sub tipe III menyebabkan penyakit yang ringan, tetapi di keadaan wabah, secara genetik virus terjadi perubahan yang menunjukkan peranan pembentukannya di DBD. Igarashi² melaporkan bahwa di Thailand, terdapat tiga (3) sub tipe DEN-2 yang didasarkan kepada perbedaan asam amino dari prM, NS1, NS2A, NS3, NS5. Infeksi sekunder sub tipe I dapat mengakibatkan gejala/Sindroma Syok Dengue (SSD), sedangkan infeksi sekunder sub tipe II menyebabkan DBD. Namun, infeksi sekunder sub tipe II menyebabkan Demam Dengue (DD) saja, sedangkan infeksi sub tipe III mengakibatkan DD. Watts,³ menemukan kenyataan bahwa infeksi sekunder oleh sub tipe *American* DEN-2 tidak akan menyebabkan DBD dan SSD. Sebaliknya untuk sub tipe *Southeast Asian* DEN-2 akan menyebabkan manifestasi infeksi virus dengue yang berat seperti wabah di Peru pada tahun 1995.³ Hal ini menunjukkan bahwa serotipe dan sub tipe virus dengue dapat menentukan virulensi virus dengue.² Laporan peneliti lain, Mota⁴ di Mexico meneliti DEN-4; Santos⁵ meneliti DEN-1 dan DEN-2 di Brazil; Armstrong⁶ meneliti DEN-2 di Texas Amerika maupun Holmes⁷ di Oxford Inggris, menggunakan *regio envelope* baik untuk penentuan sub tipe maupun dilanjutkan dengan analisis filogenetik. *Regio envelope* banyak dipakai, karena merupakan salah satu *regio* yang memiliki *higher potential of sequence heterogeneity*, di samping *regio C-prM*.⁸ *Envelope* juga memiliki penerima tempat ikatan dengan epitop virus dengue dan merupakan tempat terbaik untuk mengungkap ragam genetik dalam tingkat global.⁹ Pemahaman timbul dan perjalanan penyakit karena virus dengue ini masih sangat kurang, sebab percontohan lingkup buatan dan hidup tidak ada yang dapat digunakan untuk membuktikan penyakit dengue ini. Leitmeyer¹⁰ membentangkan sekuens genom virus dengue yang dikaitkan dengan kejadian demam dengue maupun demam berdarah dengue. Ia mendapatkan perbedaan penentu DBD yang terletak dalam protein E, bagian 5'UTR, 3'UTR, NS4b dan NS5.¹⁰

Penelitian epidemiologis molekuler ini difokuskan kepada zat virus dengue berdasarkan berbagai penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa perubahan susunan genetik virus dengue memiliki sumbangan terhadap pergeseran (*shift*) peluang penyebaran penyakit maupun patogenisitas serotipe virus dengue.¹¹ Penggunaan analisis homologis dan analisis filogenetik diharapkan dapat menentukan kekerabatan berdasarkan serotipe dan sub tipe yang tersebar dan bersirkulasi di berbagai daerah di Indonesia.

METODE

Penelitian dilakukan di 19 kota di Indonesia yang terdapat di kepulauan: Sumatera, Batam, Kalimantan, Sulawesi, Papua, Jawa, Bali dan Lombok mulai tahun 2003–2005. Pengambilan sampel DBD dilakukan di Unit Pelaksana Fungsional (UPF) Ilmu Kesehatan Anak dan UPF Ilmu Penyakit Dalam di berbagai rumah sakit. Diagnosis DBD ditetapkan berdasarkan patokan diagnosis WHO 1997.¹²

Pelaksanaan pemeriksaan serologik dan PCR dikerjakan di laboratorium Dengue dan laboratorium *Hepatitis Tropical Disease Center* Universitas Airlangga. Pengerjaan isolasi virus dengue, sekuensing DNA dan analisis filogenetik dikerjakan di Laboratorium Virologi, *Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University*, Jepang. Pemeriksaan IgM dan IgG antidengue dilakukan di 525 serum penderita DBD dengan patokan WHO, 1977. Pemeriksaan untuk penentuan analisis filogenetik didahului dengan pemeriksaan dan pemurnian PCR. Setelah pemurnian PCR, dilakukan sekuensing nukleotida, menggunakan primer *regio capsid*.

Sekuensing nukleotida *regio capsid*

Hasil memurnikan cDNA dengan menggunakan *low melting agarose* dan penamaan cDNA dengan menggunakan *primer sense*, dilanjutkan memakai PCR dan sekuensing untuk mendapatkan susunan nukleotida. Susunan nukleotida tersebut, ditentukan dengan menggunakan *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)* dan alat sekuensing otomatis *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer*. Analisis hasil sekuensing dilakukan bertahap. Penjajaran berganda (*multiple alignment*) digunakan program *Clustal X*, dilanjutkan dengan analisis *sequence homology data* yaitu menggunakan program komputer *BioEdit Sequence Alignment Editor* versi 7.0.4.1. Hasil sekuensing penelitian ini dibandingkan dengan data acuan berbagai isolat dengue negara lain di dunia. Analisis homologis dipotong di *regio capsid*, dengan panjang nukleotida yang sebanding di antara kedua primer. Analisis filogenetik dilakukan selanjutnya dengan menggunakan program komputer *PAUP* versi 4.0 dan dibandingkan dengan acuan *international DNA data banks* (GenBank, WMBL, DDBJ) serta juga menggunakan susunan nukleotida hasil sekuensing dengan panjang yang sama di antara kedua primer: *indra (sense)* dan *anti indra (antisense)*. Kekerabatan intraserotipe dan juga terhadap acuan, dapat ditentukan dengan analisis filogenetik di antara sesama sampel serotipe yang sama dibandingkan dengan acuan.

Penentuan genotipe/subtipe

Lebih lanjut di perwakilan sampel serum DBD yang berasal dari 19 kota tersebut di atas, kultur virus dengue diisolasi, dan sekuensing DNA. Analisis filogenetik dikerjakan di Laboratorium Virologi, *Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University*, Jepang.

Virus yang tumbuh melalui 2–3 kali pelaluan (pasase), mengalami pemeriksaan ELISA dengan menggunakan *C6/36 Aedes albopictus cell monolayers* dalam *Eagle's minimal essential medium (E-MEM)* yang telah diperkaya dengan 2% fetal calf serum (FCS) untuk menentukan tinggi kadar antigen virus dengue sampai kadarnya lebih dari 400 IU/mL. Setelah dilakukan *multiplex PCR* menggunakan primer khusus untuk *regio envelope* untuk kepastian serotipe virus dengue yang tumbuh, dilakukan sekuensing DNA. Penentuan subtipe/genotipe ini dengan menggunakan *regio envelope*. Dua pasang primer *sense* dan *antisense regio envelope* yang digunakan menempati posisi 1261–2626 (1365 bp) dan 348–1451 (1103 bp).

Reaksi sekuensing DNA dilakukan dengan *Big Dye Dideoxy Terminator sequencing kit (Applied Biosystems)* dan hasil dianalisis menggunakan alat otomatisasi *DNA sequencer ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*. Berbeda dengan penentuan sekuensing *regio capsid*, yang memakai alat *DNA sequencer ABI Prism 310*, jika dengan memakai *DNA sequencer ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* maka dapat ditentukan urutan nukleotida daerah sampul (*sequens nucleotide regio envelope*) yang dapat mencapai panjang nukleotida hingga 1400 basa nukleotida. Penentuan *sequens nucleotide regio envelope* ini menggunakan dua (2) pasang primer *sense* dan *antisense*.

Pembentangan sekuens untuk melihat susunan basa nukleotida menggunakan program DNASIS. Hasil sekuens dilakukan dengan penjajaran berganda terhadap berbagai sekuens acuan DEN-2 untuk serotipe DEN-2, demikian pula untuk DEN-3. Semua data sekuens yang dilakukan pada penelitian ini dijangkau melalui GenBank.

Sekuens yang telah diujarkan berganda dengan program *Clustal X*, kemudian dianalisis filogenetik. *PAUP software* versi 4.0 dapat dipakai untuk menentukan *phylogenetic tree*-nya. Berdasarkan *phylogenetic tree* tersebut, kemudian didapat pola genotipe setiap serotipe.

HASIL DAN PEMBAHASAN

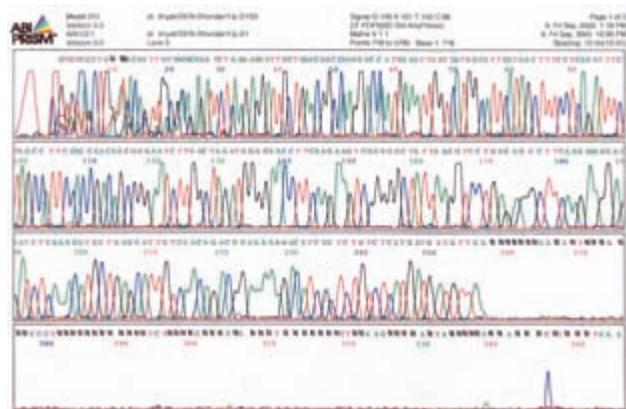
Hasil Analisis Homologi Susunan Nukleotida Berbagai Serotipe di Berbagai Daerah Indonesia

DNA hasil menguatkan PCR, DNA dimurnikan dan dilabel, selanjutnya dilakukan sekuensing untuk

melihat susunan nukleotida dengan menggunakan *Big Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit*. Kemudian dibaca dengan menggunakan mesin *sequencer ABI Prism-310*. Pada penelitian ini difokuskan kepada analisis nukleotida *regio capsid* DEN-2 dan DEN-3 karena merupakan serotipe yang paling menonjol dalam penelitian ini.

Sekuensing juga dilakukan di semua perwakilan serum yang diambil dari contoh yang hasil PCR-nya positif, yaitu dari daerah Aceh, atau kota Medan, Batam, Sampit, Balikpapan, Manado, Gorontalo, Makassar, Kendari, Jakarta, Pacitan, Surabaya, Malang, Jember, Denpasar, Mataram, dan Jayapura terdapat dua (2) kota yang semua contoh hasil PCR-nya negatif, yaitu yang diambil di Yogyakarta dan Pontianak. Terdapat 17 kota lain yang PCR-nya positif, tetapi tidak semua hasil ini mewakili untuk diperiksa homologik.

Dari elektroforegram yang dapat dianalisis, untuk serotipe DEN-2 terdapat 15 isolat yang mewakili percontohan yang diambil dari daerah Surabaya, Malang, Jember, Pacitan, Jakarta, Mataram, Batam, dan Gorontalo, serta daerah Aceh. Dibandingkan dengan *regio capsid* isolat acuan seperti: Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand yang contoh yang diambil juga memiliki serotipe DEN-2. Untuk serotipe DEN-3 terdapat tiga (3) sampel yang elektroforegramnya bermutu bagus yaitu Medan, Kendari dan Jayapura, dibandingkan dengan *regio capsid* dari Martinique (Amerika Tengah).

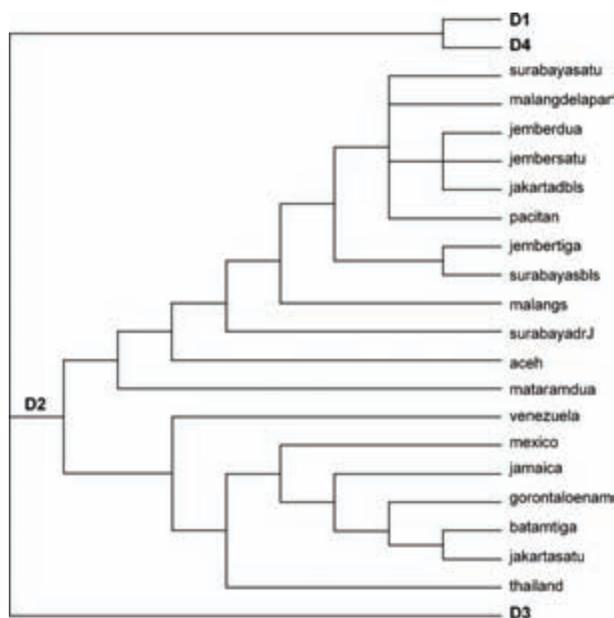


Gambar 1. Contoh elektroforegram hasil sekuensing sampel dari kota Kendari

Elektroforegram yang tercantum di Gambar 1. yang hasil PCR positif dinyatakan DEN-3 dan hasil sekuensingnya pun juga sesuai dengan primer untuk DEN-3. Didasari hasil sekuensing DNA di beberapa hasil sampel DEN-2 yang dianalisis homologis, dapat dilihat bahwa isolat contoh yang berasal dari perkotaan di Jawa Timur, yaitu Surabaya, Malang, Pacitan dan Jember terdapat homologian yang berkisar antara 77,4–97,5%, tetapi dibandingkan dengan contoh yang berasal dari Jakarta ternyata terdapat perbedaan

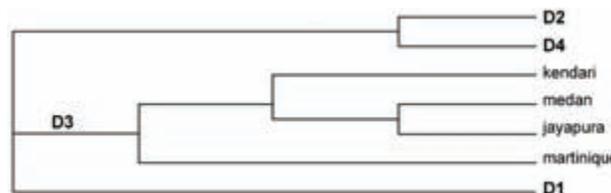
yang cukup bermakna yaitu Jakarta_satu dan Jakarta_duabelas. Homologian untuk sampel Jakarta_duabelas cukup bagus dibandingkan dengan contoh yang berasal dari perkotaan di Jawa Timur, yaitu di atas 73%. Namun, terhadap Jakarta_satu, dan sampel di luar Jawa (Aceh, Mataram, Batam, Gorontalo) terdapat homologian di bawah 50%. Secara kasar, bila dilihat dari tampilan penjajaran berganda, homologian antarsampel ini terbagi dalam dua (2) kelompok, yaitu: kelompok yang pertama homologian di atas 50% yaitu yang berkisar antara 55,1–97,5%, dan untuk kelompok kedua homologian di bawah 50% yang berkisar antara 21,6–43,2%. Perbedaan homologian ini akan tampak jelas, dalam pohon filogenetik di gambar 2. Bila dilihat dari analisis filogenetik, terdapat perbedaan bermakna di antara kelompok perkotaan di Jawa Timur, Jakarta_duabelas dan kelompok Jakarta_satu, Batam dan Gorontalo. Di perkotaan daerah Aceh dan kota Mataram walau memiliki homologian yang tidak tinggi, tetapi dalam pohon masih termasuk dalam *clade* yang sama dengan perkotaan daerah Jawa Timur dan kota Jakarta.

Clade yang pertama menunjukkan sampel yang diambil dari Surabaya (Surabaya_satu, Surabayasbls, SurabayadrJ, Malang_delapan, Malangs, Jember_satu, Jember_dua, Jember_tiga, Pacitan, Mataram dan daerah perkotaan di Aceh) menunjukkan dalam satu gugusan.



Gambar 2. Analisis filogenetik serotipe DEN-2 *regio capsid* sampel perkotaan di Jawa Timur (Surabaya, Malang, Jember, Pacitan), Jakarta, Mataram, Batam, Gorontalo dan daerah perkotaan di Aceh, serta acuan (Jamaica, Venezuela, Mexico, Thailand), sedangkan D1, D3, D4 sebagai kelompok luar.

Clade berikutnya terdiri dari sampel Gorontalo, Batam dan Jakarta_satu dalam gugusan yang sama. Bahkan yang menarik adalah di *clade* kedua ini, Batam, Gorontalo dan Jakarta_satu bersama di dalam *clade* yang sama dengan acuan yang dipakai pada penelitian ini yaitu Jamaica, Venezuela, Mexico dan Thailand.



Gambar 3. Analisis filogenetik serotipe DEN-3 *regio capsid* sampel Medan, Kendari, Jayapura dan acuan (Martinique) sedangkan D1, D2, D4 sebagai kelompok luar

Untuk pohon filogenetik serotipe DEN-3 dengan sampel yang diambil di Medan, Kendari dan Jayapura, tampak tidak banyak perbedaan dan tetap di dalam *clade* yang sama (lihat Gambar 3).

Hal ini menunjukkan walau sesama serotipe DEN-2, tetapi di dalam genomnya terdapat perbedaan nukleotida. Hasil ini tentu akan mempengaruhi berbagai segi termasuk pengkajian kembali teori *Antibody Dependent Enhancement* yang menekankan kepada infeksi dengan serotipe berbeda, maka akan menimbulkan gejala yang lebih berat. Padahal didasari temuan dalam penelitian ini didapatkan serotipe DEN-2 yang sama, dan telah terjadi perbedaan susunan nukleotida di dalam *regio capsid* yang seharusnya terawetkan (*conserved*). Hal ini juga akan berdampak dalam penentuan untuk membuat bahan diagnostik ataupun vaksin. Penentuan homologian ini sebaiknya diulangi kembali dengan memakai *regio envelope* yang lebih mencerminkan ragam genetik di antara berbagai isolat di dunia, dengan jumlah kawasan nukleotida yang lebih luas, sehingga dapat lebih mencerminkan kemungkinan ada penghilangan (delesi), penyisipan (insersi) ataupun perpindahan (mutasi).

Untuk serotipe DEN-3 terdapat tiga (3) sampel yang elektroforegram dari *regio capsid* bermutu bagus, yaitu: Medan, Kendari dan Jayapura, dibandingkan dengan Martinique (Amerika Tengah). Dalam kajian ini, sampel yang diambil dari ketiga kota di Indonesia ini memiliki homologian senada yaitu 88,24–90,87%. Dalam analisis filogenetik akan tampak walau homologian yang diambil dari ketiga kota ini dekat dengan acuan (Martinique, Amerika Tengah), tetapi berbeda *clade*-nya. Hal ini menunjukkan bahwa sampel serotipe DEN-3 di Indonesia memiliki susunan nukleotida yang mirip satu dengan yang lain.

Hasil Analisis Filogenetik Susunan Nukleotida Berbagai Serotipe di Berbagai Daerah di Indonesia

Analisis filogenetik sangat diperlukan untuk menentukan hubungan kekerabatan isolat virus dengue baik di dalam-daerah/pulau, antar-daerah/pulau, lintas negara. Dalam analisis filogenetik berasaskan dapat mencerminkan pertalian lintas geografis, yang sangat diperlukan untuk negara Indonesia yang terdiri dari beribu-ribu kepulauan.

Analisis filogenetik di dalam epidemiologi molekular sangat berguna untuk memantau sebaran serotipe dan sub tipe/genotipe yang beredar di daerah endemis.¹ Menurut Messer,¹ dalam dua dasawarsa di Srilanka, Afrika Timur dan Amerika Latin wabah DBD terjadi disebabkan oleh serotipe DEN-3, sub tipe III. Analisis filogenetik, menunjukkan bahwa terjadinya evolusi dan transpor virus dengue yang menyebabkan wabah ini berasal dari daratan India. Wabah di Srilanka pada tahun 1989 ini bernasab dengan timbulnya varian baru dari DEN-3 sub tipe III yang menyebar ke Afrika dan dari Afrika ke Amerika Latin pada pertengahan tahun 1990. Mula-mula DEN-3 sub tipe III menyebabkan penyakit yang ringan, tetapi keadaan wabah, secara genetik terjadi perubahan yang menunjukkan adanya peran genetik virus DBD. Di Thailand, terdapat tiga (3) sub tipe DEN-2 yang didasarkan atas perbedaan asam amino di prM, NS1, NS2A, NS3, NS5. Infeksi sekunder sub tipe I dapat mengakibatkan sindrom syok dengue, sedangkan infeksi sekunder sub tipe II menyebabkan DBD. Namun, infeksi primernya menyebabkan demam dengue saja. Sebaliknya infeksi sub tipe III mengakibatkan demam dengue. Hal ini menunjukkan bahwa serotipe dan sub tipe virus dengue dapat menentukan virulensi virus dengue dan perwujudan klinisnya.² Leitmeyer¹⁰ menemukan, dengan analisis filogenetik di Amerika, terdapat perbedaan genotipe DEN-2 yang berbeda. Yaitu genotipe “penduduk asli (*native*)” *American* bertalian dengan demam dengue yang terjadi, sedangkan genotipe Asia Tenggara terjadi di DBD empat (4) negara yang berbeda di dunia.¹⁰

Para peneliti lain, misalnya Mota⁴ di Mexico meneliti DEN-4; Santos⁵ meneliti DEN-1 dan DEN-2 di Brazil; Armstrong⁶ meneliti DEN-2 di Texas Amerika maupun Holmes⁷ di Oxford Inggris, menggunakan *regio envelope* untuk menentukan sub tipe yang dilanjutkan dengan analisis filogenetik. Penggunaan analisis filogenetik dapat dilakukan dengan menggunakan *regio capsid-preMembran* (C-prM), *Envelope* (E) maupun *Nonstructural-3* (NS-3) dan NS-5. Berdasarkan urutan *sequence heterogeneity*-nya, dikatakan NS-3 maupun NS-5 memiliki *sequence heterogeneity* lebih rendah dibandingkan dengan C-prM dan E.⁸ Daerah *Envelope* memiliki *the higher potential of sequence heterogeneity*,

sehingga para peneliti lebih menyarankan penggunaan *regio E* untuk analisis filogenetik, sekaligus untuk menentukan sub tipe/genotipe dari serotipe masing-masing virus tersebut.

Hasil telitian yang dilakukan, terdapat dua (2) macam analisis filogenetik. Analisis filogenetik yang pertama, yaitu terhadap sampel klinik yang menonjol dalam penelitian ini yaitu DEN-2 dan DEN-3. Yaitu yang memiliki hasil elektroforegram yang baik dan dapat dinilai. Di serotipe DEN-2 pada penelitian ini, terdapat dua (2) *clade*. *Clade* yang pertama menunjukkan sampel yang diambil dari Surabaya (Sby_satu, Sby_sbls, Sby_drJ, Malang_delapan, Malang_sembilanbelas, Jember_satu, Jember_dua, Jember_tiga, Pacitan, Mataram dan dari daerah perkotaan Aceh terletak di dalam satu gugusan, sedangkan *clade* yang berikutnya terdiri dari sampel: Gorontalo, Batam dan Jakarta_satu dalam gugusan yang sama. Bahkan yang menarik adalah di *clade* kedua ini, Batam, Gorontalo dan Jakarta_satu terdapat bersama di dalam *clade* yang sama dengan acuan yang dipakai pada penelitian ini, yaitu: Jamaica, Venezuela, Mexico dan Thailand. Untuk sampel Jawa Timur, memiliki kekerabatan DEN-2 yang sama, juga terhadap salah satu sampel di Jakarta (Jkt_duabelas). Keadaan ini berbeda jauh dengan DEN-2 Jakarta_satu. DEN-2 Jakarta_satu Batam dan Gorontalo yang terletak dalam *clade* yang sama, menunjukkan kedekatan dengan acuan yang berasal dari Amerika (Jamaica, Venezuela, Mexico) dan Thailand. Tampaknya ada dugaan kuat bahwa terdapat mobilitas yang berbeda dari penderita dan pembawa (vektor) nyamuk yang berasal dari Jakarta_satu, Batam dan Gorontalo yang berhubungan dengan pemindahan dan transportasi virus dengue dibandingkan dengan yang berasal dari sampel dari perkotaan di Jawa Timur. Perkotaan di daerah Aceh dan kota Mataram terdapat di dalam *clade* yang sama dengan perkotaan di Jawa Timur, tetapi memiliki nilai homologian yang rendah di bawah 50%. Hal ini menunjukkan terdapat ragam perbedaan nukleotida yang tetap di dalam genomnya, dengan kekerabatan yang lebih jauh walau di dalam *clade* yang sama dengan contoh dari perkotaan di Jawa Timur.

Analisis filogenetik yang kedua, yaitu yang diambil berdasarkan isolat virus yang tumbuh. Hasil analisis filogenetik yang didasarkan isolat virus yang tumbuh. Penelitian ini hanya mendapatkan dua (2) isolat virus yang dapat tumbuh dan mencapai kadar antigen virus >400 *Elisa Unit*, yaitu yang berasal dari isolat Gorontalo yang dikumpulkan pada tahun 2005 dan isolat Jakarta yang dikumpulkan pada tahun 2003. Isolat Gorontalo-2005 dengan hasil PCR serotipe DEN-2 menunjukkan posisi isolat yang terdapat bersama-sama dengan isolat dari negara lain seperti Fiji dan Malaysia yang memiliki genotipe *Cosmopolitan* yang sama. Hasil yang sama

terjadi juga untuk isolat Jakarta dengan serotipe DEN-3 dan terdapat bersama-sama dengan isolat Thailand, Fiji dan Filipina di dalam genotipe I yang sama.

SIMPULAN DAN SARAN

Didasari hasil analisis homologian dan analisis filogenetik, didapatkan dua (2) *clade* yang berbeda di dalam serotipe DEN-2. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun serotipe berhal sama, ternyata dijumpai ragam nukleotida yang berbeda di dalam *regio capsid* yang seharusnya terawatkan. Hal ini menunjukkan perlu pengkajian ulang teori ADE (*Antibody Dependent Enhancement*), bahwa bila seseorang mengidap penyakit terinfeksi yang berikutnya dengan serotipe yang sama, apakah akan tetap terdapat kekebalan sepanjang hidup. Mengingat dalam penelitian ini terdapat serotipe yang sama (DEN-2). Perbedaan susunan nukleotida yang terdapat tentu akan mempengaruhi pembentukan respons antibodi, sedangkan untuk serotipe DEN-3 memiliki susunan nukleotida yang mirip satu dengan yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

1. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM, 2003. Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. *Emerg Infect Dis* (serial online). <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no7/03-0038.htm> 3 November 2004.
2. Igarashi A. Current Problems and Future Challenge of Dengue Virus Infection with special reference to the pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *International Seminar of Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever*. October. TDC. Surabaya, Airlangga University, 1999; 6–9.
3. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 1999; 354: 1431–1434.
4. Mota J, Ramos-Castaneda J, Rico-Hesse R, Ramos C. Phylogenetic analysis of the envelope protein (domain III) of dengue 4 viruses. *Salud Publica Mex*; 2002; 44: 228–236.
5. dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RMR, Edgil D, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E. Complete Nucleotide Sequence Analysis of a Brazilian Dengue Virus type 2 Strain. *Rio de Janeiro, Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002; 97(7): 991–5.
6. Armstrong Philip M, Rico-Hesse R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(5): 539–544.
7. Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. Phylogenetic Evidence for Recombination in Dengue Virus. *Mol. Bio. Evol.* 1999; 16(3): 405–409.
8. Chao Dy, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu HL, Chang GJ. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra (research). *Virology Journal*, 2005; 2(72): 1–10.
9. Twiddy SS, Woelk CH, Holmes EC. Phylogenetic Evidence for Adaptive Evolution of Dengue Viruses in Nature. *Journal of General Virology*, 2002; 83: 1679–1689.
10. Leitmeyer KC. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology*, 1999; 73(6): 4738–4747.
11. Salda LTD, Parquet MDC, Matias RR, Natividad FF, Kobayashi N, Morita K. Molecular Epidemiology of Dengue 2 Viruses in the Philippines: Genotype Shift and Local Evolution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73(4): 796–802.
12. WHO. *Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd edition., Geneva, 1997; 1–84.