

ANALISIS GEN HAEMAGGLUTININ PADA VIRUS CAMPAK LIAR

ANALYSIS OF HAEMAGGLUTININ GENE FROM WILD TYPE MEASLES VIRUS

Subangkit^{1*}, Mursinah¹, Budiman Bela², Fera Ibrahim²

¹Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI, Jl. Percetakan Negara no.23 Jakarta, Indonesia

²Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

*Korespondensi Penulis: subangkit@litbang.depkes.go.id

Submitted: 03-09-2014, Revised: 25-02-2015 Accepted: 03-03-2015

Abstrak

Penyakit Campak disebabkan oleh virus campak yang termasuk genus Morbillivirus dan Family Paramyxoviridae. Penyakit campak masih menjadi masalah kesehatan karena masih ditemukan Kejadian Luar Biasa (KLB) di Indonesia. Salah satu penyebab terjadinya KLB tersebut diduga sebagai akibat perbedaan antigenesitas antara strain vaksin yang digunakan dengan strain virus campak liar yang beredar di Indonesia. Penelitian ini bertujuan mendapatkan gambaran tentang karakteristik genetik gen Haemagglutinin virus campak liar yang ada di Indonesia. Spesimen yang digunakan sebanyak 27 isolat virus penyebab KLB dari 17 propinsi selama periode tahun 2003-2010. Isolat virus dilakukan pemeriksaan secara RT-PCR dan sekuensing dengan metode Sanger. Hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0 dan MEGA 4.0. Hasil penelitian didapatkan perbedaan 10 asam amino antara virus campak strain vaksin CAM-70 dan virus campak liar pada posisi D416N; K424T; V451M; N455T; V466I; I473T; F476L; Y481S atau Y481N; H495N; G505D. Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat perbedaan karakteristik genetik antara virus campak liar di Indonesia berbeda dengan strain virus vaksin CAM-70.

Kata kunci : Campak, Analisis Molekuler, Hemagglutinin, CD46

Abstract

Measles is caused by virus belonging to the genus Morbillivirus and Family Paramyxoviridae. Measles is still a public health problem because outbreak of measles still found in Indonesia. Outbreak is suspected as a result of differences in antigenicity between vaccine strains used with wild-type measles virus strains circulating in Indonesia. This study aims to get genetic characteristics of wild-type measles virus haemagglutinin gene in Indonesia. The specimens were used 27 viral isolates from 17 provinces period 2003-2010. Viral isolates examined by RT-PCR and sequencing with Sanger method. Sequencing analysis were conducted using Bioedit 7.0 and MEGA 4.0 software. The results showed 10 amino acid differences between the vaccine strain measles virus CAM-70 and wild-type measles virus in position D416N; K424T; V451M; N455T; V466I; I473T; F476L; Y481S or Y481N; H495N; G505D. Conclusion: There is a difference between the genetic characteristics of wild-type measles virus in Indonesia and vaccine strain CAM-70.

Keywords : Measles, Molecular Analysis, Haemagglutinin, CD46

Pendahuluan

Penyakit Campak disebabkan oleh virus campak yang termasuk genus *Morbillivirus* dan family *Paramyxoviridae*. Penyakit ini sangat menular dan akut. Penyakit campak adalah penyakit yang dapat sembuh dengan

sendirinya namun virus campak bila menginfeksi balita terutama anak-anak dengan gizi buruk dapat mengakibatkan komplikasi, seperti *bronchopneumonia*, *gastroenteritis*, dan otitis media. Ensefalitis jarang terjadi tetapi dapat berakibat fatal, yaitu kematian.¹

Di negara berkembang hampir semua ibu pernah terinfeksi penyakit campak pada masa kecil sehingga bayi yang dilahirkan akan mempunyai antibody dari ibunya (*maternal antibody*) terhadap penyakit campak, tetapi titer antibody tersebut berangsur-angsur menurun sehingga perlindungan yang dapat diberikan hanya 6-9 bulan pertama kelahiran. Oleh karena itu, untuk menurunkan jumlah kasus penyakit campak, vaksin diberikan setelah berumur 9 bulan.²

Keberhasilan pencegahan penyakit campak dengan cara imunisasi sudah banyak terbukti dengan menurunnya angka kesakitan dan angka kematian yang disebabkan oleh penyakit ini. Cakupan imunisasi campak pada tingkat nasional sudah cukup tinggi, tetapi masih ditemukan Kejadian Luar Biasa (KLB) campak di Indonesia. Dilaporkan selama tahun 2009 terdapat 80 KLB campak yang terjadi di Indonesia.³

Salah satu penyebab terjadinya KLB tersebut diduga sebagai akibat perbedaan antigenesitas antara *strain* vaksin yang digunakan dengan *strain* virus campak liar yang beredar di Indonesia, sehingga antibody yang terbentuk pada anak yang mendapat imunisasi kurang spesifik terhadap antigen yang dimiliki virus campak liar yang beredar di Indonesia. Antigenesitas virus campak sangat dipengaruhi oleh gen *Haemagglutinin* yang terdapat di virus campak.^{1,2} Protein H berperan sebagai bagian dari virus yang berikatan dengan reseptor sel (CD46, CD150 atau sel Epitel).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan gambaran tentang karakteristik genetik gen *Haemagglutinin* virus campak liar yang ada di Indonesia, sehingga dapat digunakan sebagai data dasar untuk pengembangan vaksin di masa depan. Virus campak liar didefinisikan sebagai virus yang dapat menyebabkan penyakit campak dan bukan termasuk virus golongan vaksin dan biasanya menyebabkan KLB

Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi dan Unit Sekuensing, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, selama tahun 2010. Spesimen yang digunakan sebanyak 27 isolat

virus dan merupakan koleksi virus campak liar yang berhasil diisolasi sejak tahun 2003 sampai tahun 2010. Spesimen berasal dari 17 propinsi yang berbeda (Bangka Belitung, Banten, DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Kalimantan Timur, Lampung, Maluku Utara, NAD, Riau, Sulawesi Selatan, Sulawesi Utara, Sumatera Selatan, Sumatera Barat dan Sumatera Utara).

Isolat virus yang tersimpan dalam liquid nitrogen diperbanyak kembali dengan menggunakan teknik kultur jaringan dengan menggunakan sel Vero/hSLAM. Hasil perbanyak virus tersebut kemudian dilakukan isolasi RNA dengan menggunakan *Qiagen Viral RNA mini kit* (Qiagen Cat.52904) sesuai petunjuk pabrikan. Hasil ekstraksi RNA kemudian diamplifikasi dengan menggunakan metode *One Step Qiagen RT-PCR kit* (Qiagen Cat.210210 atau 210212).⁴ Primer didesain dengan menggunakan perangkat lunak Primer 3, dengan menggunakan sekuens rujukan dari WHO. Primer berada pada posisi antara 1217bp sampai dengan 1688bp yang mencakup posisi asam amino 407 sampai 562 gen *Haemagglutinin*. Susunan primer yang digunakan *Forward primer* 5'-GGATTCCTTCATACGGGGTCT-3' dan *reverse primer* 5'-GGACCCCTTTTATAGGCAAC-3'. Konsentrasi primer yang digunakan adalah 20µM.

Proses *transcriptase* dilakukan pada suhu 50°C selama 30 menit dilanjutkan dengan 95°C selama 15 menit, sedangkan siklus PCR dilakukan sebanyak 40 kali dengan tahapan denaturasi DNA dilakukan pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik dan *elongation* pada suhu 72°C selama 30 detik serta 72°C selama 10 menit. Produk PCR di *elektro foresis* dengan menggunakan gel agarose 2%. Hasil PCR kemudian dilakukan proses sekuensing (metode *sanger*) dengan menggunakan alat *genetic analyzer* ABI 3310 xl. Hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan software Bioedit Ver. 7.0 dan MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) Ver. 4.0 dengan menggunakan metode *Estimates of evolutionary divergence between sequences*.^{5,6}

Hasil

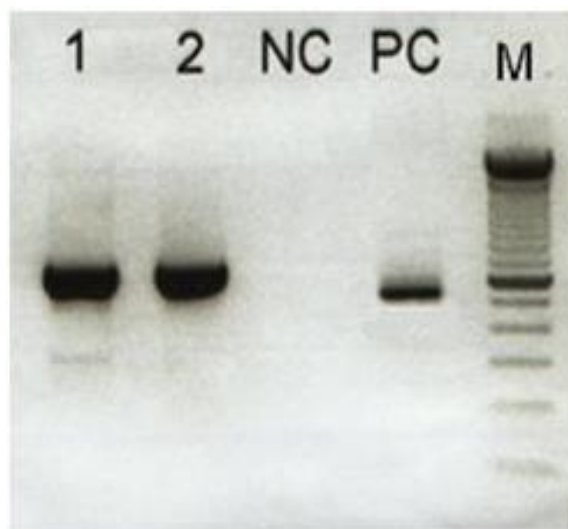
Hasil pengamatan 27 spesimen dengan menggunakan metode RT-PCR, semua memberikan gambaran yang positif seperti terlihat pada Gambar 1 yang menunjukkan pita DNA pada posisi 417bp secara jelas. Gambar 1 menandakan bahwa terjadi amplifikasi DNA secara spesifik terhadap gen *Haemagglutinin*. Pita DNA yang terbentuk pada virus campak liar dan vaksin lebih tebal dibandingkan dengan pita control positif dikarenakan dalam penelitian ini digunakan isolat virus campak dengan konsentrasi RNA virus yang lebih banyak.

Hasil analisis genetik dengan menggunakan Bioedit Ver. 7.0 dan MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) Ver. 4.0 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nukleotida antara *strain* vaksin CAM-70 dan virus campak liar yakni berkisar dari 17 sampai 20 nukleotida (Tabel 1). Tabel 1 memperlihatkan bahwa perbedaan asam amino antara *strain* vaksin CAM-70 dan virus campak liar sebanyak 5 sampai 7 asam amino.

Pada Tabel 1 juga memperlihatkan beberapa *strain* virus campak liar menunjukkan tidak ada perbedaan asam amino seperti yang ditunjukkan pada virus yang berasal dari Banjarnegara (2003); Wonosobo (2003); Katingan (2004); Bondowoso (2005); Barru (2006); Kutai Kartanegara (2007) dan Rokan Hilir (2010). Hal yang sama juga diperlihatkan pada virus yang berasal dari Muara Enim (2004); Lebak (2004); Lampung Tengah (2004); Jakarta Selatan (2004); Rokan Hulu (2004); Minahasa (2004); Bandung (2004); Lampung Selatan (2005); Halmahera Utara (2005); Kebumen (2005); Aceh Utara (2007); Semarang (2006); Tuban (2006); Pidie (2008); Halmahera Selatan (2006). Hasil analisis juga menunjukkan terdapat perbedaan asam amino diantara virus campak liar sebanyak 1 sampai 8 asam amino.

Hasil analisis ditemukan bahwa perbedaan nukleotida tidak selalu menyebabkan perbedaan asam amino yang mungkin menandakan adanya proses silent mutation. Mutasi ini disebabkan karena keterbasan enzim DNA Polymerase virus yang tidak memiliki mekanisme proof-reading.^{1,7}

Hasil sekuensing menunjukkan adanya perbedaan asam amino sebanyak 10 Asam amino bila dibandingkan dengan sekuens Vaksin CAM-70 (U03669) yaitu posisi D416N (*Asam Aspartat – Asparagin*); K424T (*Lisin - Threonin*); V451M (*Valin – Metionin*); N455T (*Asparagin – Threonin*); V466I (*Valin – Isoleusin*); I473T (*Isoleusin – Threonin*); F476L (*Fenil alanin – Leusin*); Y481S (*Tirosin - Serin*) atau Y481N (*Tirosin – Asparagin*); H495N (*Histidin – Asparagin*); G505D (*Glisin – Asam Aspartat*) seperti yang terlihat pada Gambar 2.



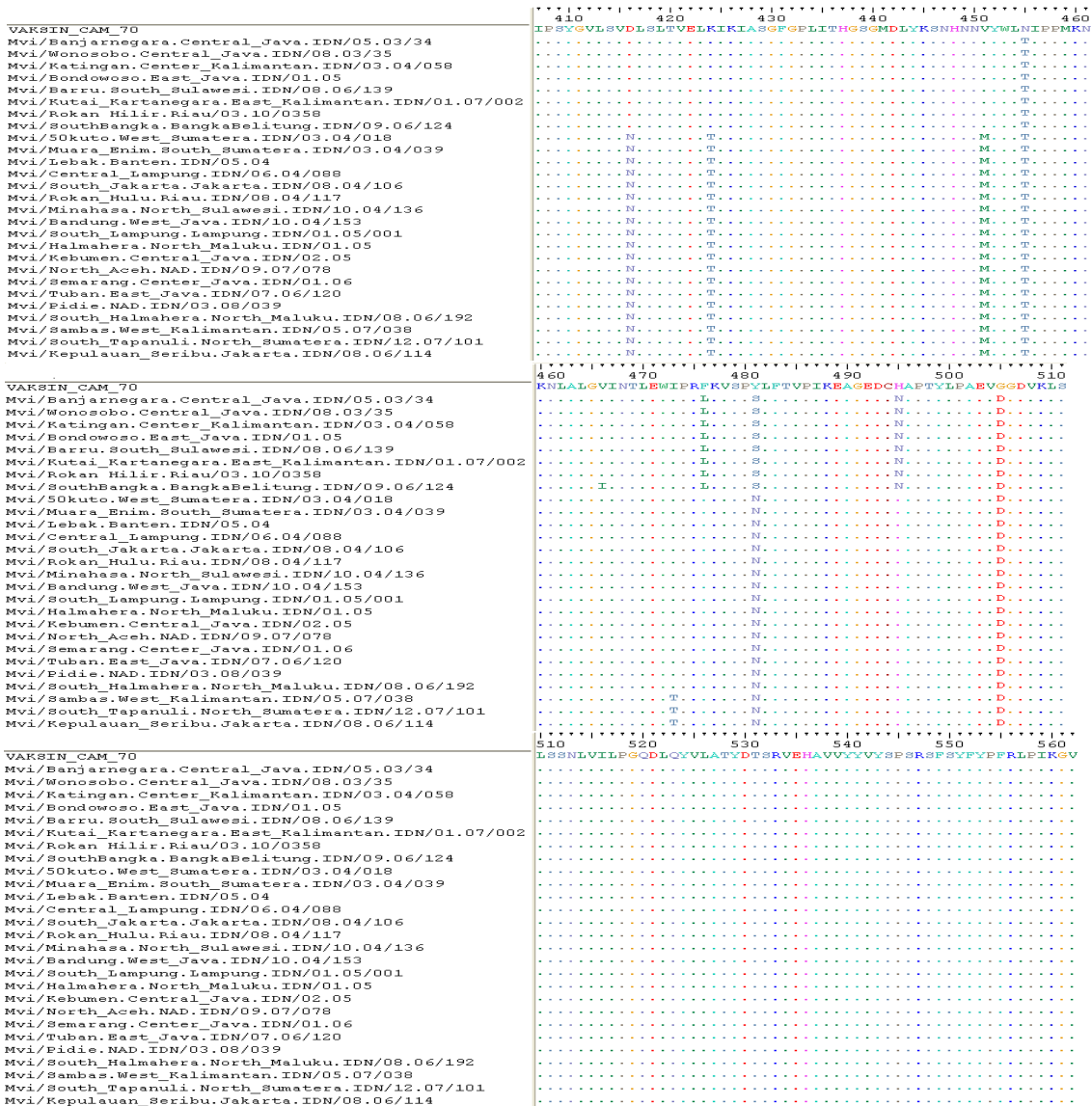
Gambar 1. Hasil Elektroforesis Rt-Pcr Terhadap Gen H- Ket. 1. Virus Campak Liar; 2. Vaksin Cam-70; Nc.negatif Control; Pc. Positif Kontrol; M.penanda Dna 100Bp

Hasil analisis sekuens menunjukkan perubahan pada posisi 481 tidak hanya *Asparagin* (N) tetapi ditemukan juga *Serin* (S). Hal ini berbeda dengan Setiawan, dkk⁸ yang menyebutkan bahwa perubahan pada posisi 481 hanya disebabkan oleh *Asparagin*. Adapun isolat yang berasal dari Banjarnegara, Wonosobo, Katingan, Bondowoso, Barru, Kutai Kartanegara, Rokan Hilir dan Bangka Selatan terjadi perubahan Y481S. Sedangkan isolat lainnya menjadi Y481N.

Perubahan *Tirosin* (Y) menjadi *Asparagin* (N) pada posisi 481 diikuti juga perubahan pada posisi V451M (*Valin-Metionin*); K424T (*Lisin-Threonin*) dan D416N (*Asam Aspartat -Asparagin*), sedangkan perubahan *Tirosin* (Y)

Tabel 1. Perbedaan Susunan Asam Amino Gen H Virus Campak

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1 VAKSIN_CAM_70																											
2 Mvi/Banjarnegara.Central_Java.IDN/05.03/34	5																										
3 Mvi/Wonosobo.Central_Java.IDN/08.03/35	5	0																									
4 Mvi/Katingan.Center_Kalimantan.IDN/03.04/058	5	0	0																								
5 Mvi/Bondowoso.East_Java.IDN/01.05	5	0	0	0																							
6 Mvi/Barru.South_Sulawesi.IDN/08.06/139	5	0	0	0	0																						
7 Mvi/Kutai_Kartanegara.East_Kalimantan.IDN/01.07/002	5	0	0	0	0	0																					
8 Mvi/Rokan_Hilir.Riau/03.10/0358	5	0	0	0	0	0	0																				
9 Mvi/SouthBangka.BangkaBelitung.IDN/09.06/124	6	1	1	1	1	1	1	1																			
10 Mvi/50kuto.West_Sumatera.IDN/03.04/018	6	6	6	6	6	6	6	6	7																		
11 Mvi/Muara_Enim.South_Sumatera.IDN/03.04/039	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0																	
12 Mvi/Lebak.Banten.IDN/05.04	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0																
13 Mvi/Central_Lampung.IDN/06.04/088	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0															
14 Mvi/South_Jakarta.Jakarta.IDN/08.04/106	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0														
15 Mvi/Rokan_Hulu.Riau.IDN/08.04/117	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0													
16 Mvi/Minahasa.North_Sulawesi.IDN/10.04/136	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0												
17 Mvi/Bandung.West_Java.IDN/10.04/153	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0												
18 Mvi/South_Lampung.Lampung.IDN/01.05/001	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0											
19 Mvi/Halmahera.North_Maluku.IDN/01.05	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0	0										
20 Mvi/Kebumen.Central_Java.IDN/02.05	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
21 Mvi/North_Aceh.NAD.IDN/09.07/078	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
22 Mvi/Semarang.Center_Java.IDN/01.06	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
23 Mvi/Tuban.East_Java.IDN/07.06/120	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
24 Mvi/Pidie.NAD.IDN/03.08/039	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
25 Mvi/South_Halmahera.North_Maluku.IDN/08.06/192	6	6	6	6	6	6	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
26 Mvi/Sambas.West_Kalimantan.IDN/05.07/038	7	7	7	7	7	7	7	7	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27 Mvi/South_Tapanuli.North_Sumatera.IDN/12.07/101	7	7	7	7	7	7	7	7	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28 Mvi/Kepulauan_Seribu.Jakarta.IDN/08.06/114	7	7	7	7	7	7	7	7	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0



Gambar 2. Urutan Asam Amino Gen H Virus Campak

menjadi *Serin* (S) pada posisi 481 diikuti juga perubahan pada posisi F476L (*Fenil alanin-Leusin*); H495N (*Histidin-Asparagin*).

Pembahasan

Sampai saat ini telah diketahui ada beberapa reseptor seluler untuk virus measles, yaitu CD46, CD150 atau biasa disebut *signaling lymphocyte activation molecule* (SLAM) dan reseptor sel epitel. Tetapi baru CD46 dan CD150 yang telah diketahui jelas mekanismenya sebagai protein seluler reseptor dari measles virus.⁹ Reseptor CD46 atau CD150 ini merupakan tempat berikatannya protein Haemagglutinin dan Fusion pada virus campak sehingga virus campak dapat menginfeksi inang.⁹ Virus campak liar menggunakan reseptor CD150 dan bukan CD46 sebagai reseptor sedangkan virus strain CAM-70 (strain vaksin yang digunakan sampai saat ini) menggunakan reseptor CD46 maupun CD150 sebagai reseptornya.^{9,10}

Bagian terminal karboksi protein H virus campak pada asam amino 451-617 terlibat dalam interaksi langsung dengan CD46 terutama pada posisi 418.¹⁰ Dalam penelitian ini ditemukan perubahan Y (Tirosin) menjadi N (Asparagin) atau S (Serin). Perubahan Y481N pada asam amino ini memungkinkan virus campak liar menggunakan CD46 sebagai reseptor masuk virus untuk menginfeksi inang, sedangkan perubahan Y481S menandakan bahwa virus tersebut menggunakan reseptor CD150 atau reseptor lainnya.

Dalam penelitian ini juga didapatkan gambaran pola struktur susunan Asam amino seperti yang terlihat pada Gambar 2. Nukleotida pada posisi 416-424-451-455-481-505 diduga mempunyai peranan membentuk situs glikosilasi struktur protein untuk virus yang menggunakan CD46 sebagai reseptornya. Sedangkan untuk virus yang menggunakan reseptor selain CD46 sebagai reseptornya, posisi 455-476-481-495 diduga mempunyai peranan penting untuk membentuk struktur *Haemagglutinin*.

Gambar 2 menunjukkan semua virus campak liar mempunyai perbedaan pada posisi N455T (*Asparagin – Threonin*) dan G505D (*Glisin – Asam Aspartat*) bila dibandingkan dengan *strain* vaksin. Hanya virus campak liar yang berasal dari Bangka Selatan (2006) mengalami perubahan pada V466I (*Valin-Isoleusin*), tetapi perubahan

ini tidak akan menyebabkan perubahan struktur protein *Haemagglutinin* dikarenakan *Valin* dan *Isoleusin* mempunyai sifat sama yakni nonpolar dan bermuatan netral.

Virus yang berasal dari Kepulauan Seribu (2006); Sambas (2007) dan Tapanuli Selatan (2007) memiliki perbedaan pada posisi I473T (*Isoleusin-Threonin*). Walaupun pola keseluruhan ketiga virus tersebut hampir sama dengan virus campak liar dengan posisi *Asparagin* (N) pada posisi 481. Berdasarkan persamaan pada posisi I473T (*Isoleusin-Threonin*) kemungkinan virus campak liar dari Kepulauan Seribu (2006); Sambas (2007) dan Tapanuli Selatan (2007) berasal dari satu virus yang sama.

Kesimpulan

Hasil analisis sekuens gen *Haemagglutinin* virus campak liar dapat disimpulkan terdapat perbedaan karakteristik genetik pada sekuens virus campak liar dan *strain* vaksin. Adapun perbedaan tersebut terletak pada 10 asam amino pada posisi D416N; K424T; V451M; N455T; V466I; I473T; F476L; Y481S atau Y481N; H495N dan G505D.

Saran

Adanya perbedaan karakteristik genetik virus campak liar dan strain vaksin menunjukkan masih terjadi sirkulasi virus campak liar di Indonesia. Untuk itu disarankan dilakukan monitoring/surveillans virus campak liar terutama pada Kejadian Luar Biasa.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt selaku Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah membantu dalam penelitian ini. Terima kasih juga diucapkan kepada WHO Indonesia dan Jejaring Laboratorium Campak Nasional.

Daftar Pustaka

1. Griffin DE. Measles Virus in: Knipe DM and Howley PM (eds). Fields Virology, 5th Ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
2. Oxman MN. Measles Virus in: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. (Eds) Clinical Virology

- 2nd Ed. USA : ASM Press. 2007.
3. Departemen Kesehatan RI. Laporan Tahunan KLB (Kejadian Luar Biasa). Jakarta: Depkes. 2007.
4. World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2nd edition. 2007.
5. Hall BG. Phylogenetic Trees Made Easy (A How-To Manual) 3rd ed. USA: Sinauer Ass, Inc. Sunderland. 2007.
6. Kumar S, Nei M, Tamura K. MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007;24(8):1596–9.
7. Nathanson N. *Viral Pathogenesis and Immunity*. 2nd edition. Singapore : Elsevier. 2007.
8. Setiawan IM, Sjahruracman A, Ibrahim F, Suwandono A. Perbedaan Sekuens Asam Amino pada Protein Hemagglutinin Virus Campak Liar dan Virus Vaksin di Indonesia. *Maj.Kedokt. Indon.* 2009;59(2):39-45.
9. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, and Hashiguchi T. Measles Virus Receptor in D.E. Griffin and M.B.A. Oldstone (eds.) *Measles :History and Basic Biology.; Current Topics in Microbiology and Immunology*. Singapore : Springer. 2009.
10. Navaratnarajah CK, Leonard VHJ, Cattaneo R. Measles Virus Glycoprotein Complex Assembly, Receptor Attachment, and Cell Entry in D.E. Griffin and M.B.A. Oldstone (eds.) *Measles – History and Basic Biology.; Current Topics in Microbiology and Immunology*. Singapore : Springer. 2009.