

ANALISIS *IN SILICO* VARIASI SEKUENS GEN NON-STRUKTURAL 3 (NS3) VIRUS DENGUE SEROTIPE 2 DI INDONESIA

Pangerapan Meiranty Cikita¹⁾, Feky R. Mantiri¹⁾, Beivy J. Kolondam¹⁾

¹⁾Program Studi Biologi, FMIPA UNSRAT

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is the causal agent of dengue fever that is transmitted by Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes. DENV has four serotypes that have been widely recognized in the world: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. DENV has RNA as the genome, and its length is almost 11 kilo bases. DENV RNA composed of 5'- and 3'-UTR; 3 structural genes; 7 non-structural genes (NS). Among the seven non-structural genes exist, NS3 plays an important role in viral replication as protease, helicase and NTPase. This study aimed to compare the variation of NS3 gene and amino acid sequences of DENV-2 in Indonesia with DENV-2 from several other countries. This research is an in silico study by using softwares to analyze the data retrieved from GenBank. The result of the multiple alignment of 100 sequences showed that NS3 gene from Indonesia samples had variations at 10 amino acid sites, which were occurred at sites number 14, 119, 122, 171, 248, 289, 308, 392, 453 and 535, while the remaining global samples had 69 amino acid sites that were found to be variated.

Key words: *Dengue Virus, DENV-2, NS3, in silico, sequence variation*

ABSTRAK

Virus Dengue (DENV) merupakan penyebab penyakit demam berdarah yang ditransmisikan melalui nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. DENV memiliki empat serotipe yang telah dikenal secara luas oleh dunia, yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. DENV merupakan virus dengan materi genetik berupa rantai RNA yang panjangnya hampir 11 kilo basa. RNA DENV tersusun atas 5'- dan 3'-UTR; 3 gen struktural; 7 gen non-struktural (NS). Di antara ketujuh gen non-struktural yang ada, NS3 merupakan gen yang berperan penting dalam replikasi virus, yaitu sebagai protease, helikase dan NTPase. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan variasi sekuens dan asam amino gen NS3 DENV-2 yang ada di Indonesia dengan DENV-2 dari beberapa negara lain. Penelitian ini merupakan studi *in silico* dengan menggunakan *software* yang menganalisis data yang diperoleh dari GenBank. Hasil penjabaran 100 sekuens menunjukkan bahwa gen NS3 sampel Indonesia memiliki variasi yang terjadi pada 10 situs asam amino, yaitu pada nomor 14, 119, 122, 171, 248, 289, 308, 392, 453 dan 535, sedangkan sampel global memiliki 69 situs asam amino yang mengalami variasi.

Kata kunci : *Virus Dengue, DENV-2, NS3, in silico, variasi sekuens*

PENDAHULUAN

Virus Dengue (DENV) merupakan virus yang paling diwaspadai secara global. Virus ini disebarkan oleh nyamuk sebagai vektornya. DENV merupakan ancaman serius bagi sekitar 2,5 miliar orang yang tinggal di 128 daerah endemik dengue di seluruh dunia. Setiap tahun terjadi 390 juta kasus infeksi dengue, dengan jumlah insidensi yang menunjukkan gejala klinis mencapai 96 juta (WHO, 2015).

Di Indonesia, jumlah kasus demam berdarah (DBD) berfluktuasi dari tahun ke tahun. Berdasarkan data Kemenkes (2012), angka kesakitan atau incidence rate (IR) DBD per 100.000 penduduk selama kurun waktu 2007-2012 yaitu: 71,78 (2007); 59,02 (2008); 68,22 (2009); 65,70 (2010); 27,67 (2011); 37,11 (2012). Jumlah penderita DBD yang dilaporkan pada tahun 2012 mencapai 90.245 kasus dengan jumlah kematian 816 orang (IR=37,11). Terjadi peningkatan jumlah kasus pada tahun 2012 dibandingkan pada tahun 2011 (65.725 kasus dengan IR=27,67). Dari tulisan lain yang diterbitkan oleh Kemenkes (2014), diketahui bahwa pada tahun 2014, dari bulan Januari sampai pertengahan bulan Desember penderita DBD di 34 provinsi berjumlah 71.668 orang, 641 diantaranya meninggal dunia. Angka tersebut sedikit lebih rendah dibandingkan pada tahun 2013, dengan jumlah penderita sebanyak 112.511 orang dan jumlah kasus meninggal sebanyak 871.

Penyakit DBD disebabkan oleh DENV yang ditransmisikan melalui nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Virus ini termasuk ke dalam genus *Flavivirus* dengan nama famili *Flaviviridae* (Cardozo *et al.*, 2014; Anoop *et al.*, 2010). Ada empat serotipe DENV yang telah dikenal, yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Semua serotipe dapat menimbulkan penyakit demam berdarah yang disebut Demam Dengue (DD), Demam Berdarah Dengue (DBD) dan

Sindrom Syok Dengue (SSD) (CDC, 2014; WHO, 2009). Pada umumnya istilah demam berdarah yang sering digunakan masyarakat mengacu pada ketiga jenis penyakit tersebut.

DENV merupakan virus dengan materi genetik berupa rantai RNA yang panjangnya hampir 11 kilo basa. Dalam RNA DENV terdapat 3 gen struktural (gen C, gen M dan gen E) dan 7 gen non-struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5). Semua gen berperan penting dalam patologi virus. Sebagai gen non-struktural, gen NS3 menghasilkan protein NS3 yang memiliki fungsi enzimatik yang diperlukan dalam replikasi virus (Pangerapan dan Kolondam, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Ayub *et al.* (2013) dan Li *et al.* (1999) memperlihatkan bahwa protein NS3 berperan sebagai helikase dan nucleoside triphosphatase (NTPase), serta merupakan komponen dari NS2B-NS3pro yang memiliki fungsi protease. Kerusakan atau kecacatan pada protein NS3 dapat mengganggu proses replikasi virus, sehingga laju perkembangan virus Dengue dalam sel menjadi terhambat. Peran penting protein NS3 bagi virus menjadikan protein NS3 sebagai target potensial untuk obat-obatan antivirus (Ayub *et al.*, 2013).

Meskipun DENV merupakan virus RNA yang memiliki laju mutasi yang tinggi, namun sebagian sekuens dari gen NS3 yang menghasilkan residu asam amino untuk replikasi virus ini terus dikonservasi (Ayub *et al.*, 2013; Luring *et al.*, 2013). Penelitian semacam ini sebelumnya telah dilakukan oleh Ayub *et al.* (2013), namun sekuens yang digunakan adalah konsensus semua serotipe Virus Dengue. Penelitian tersebut tidak berfokus pada variasi yang terjadi pada situs-situs yang tidak terkonservasi.

Hingga akhir Juni 2015, terdapat 40 sekuens genom DENV-2 yang berasal dari Indonesia yang tersedia di GenBank.

Berdasarkan penelusuran yang dilakukan, belum pernah ada penelitian yang memanfaatkan data tersebut. DENV-2 merupakan serotipe yang berkembang dengan pesat dalam dekade terakhir dan memiliki laju pertumbuhan populasi tertinggi secara global dibandingkan ketiga serotipe lainnya (Costa *et al.*, 2012). Dengan dasar tersebut, maka DENV-2 dipilih sebagai objek penelitian ini. Dalam penelitian ini dikaji variasi sekuens gen NS3 yang ada di Indonesia dengan DENV-2 dari berbagai negara di dunia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2015 sampai bulan Januari 2016. Pengumpulan dan pengolahan data dilakukan di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi, Manado.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berupa laptop dan beberapa *software* untuk pengumpulan dan pengolahan data, yaitu Geneious versi 5.6 (Drummond *et al.*, 2012), Paint, PAUP versi 4.0b10 (Swofford, 2000) dan TreeView versi 1.6.6 (Page, 1996). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah data sekuens gen NS3 Virus Dengue Serotipe 2 (DENV-2) dan Virus Dengue Serotipe 4 (DENV-4) yang bersumber dari GenBank (Benson *et al.*, 2005).

Pencarian Database dan Ekstraksi Gen NS3

Database genom DENV-2 beserta virus outgroup diperoleh dari GenBank dan diproses menggunakan Geneious. Alamat situs yang diakses yaitu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Dari sekitar 300 hasil pencarian, dipilih data sekuens yang mewakili setiap negara yang ada. Khusus data sekuens yang berasal dari Indonesia, diambil sebanyak mungkin sekuens yang memiliki kelengkapan informasi

penunjang yang diperlukan (nama sekuens, accession number, tahun pengambilan sampel dan sumber isolat). Setiap data sekuens genom virus utuh disalin dalam bentuk FASTA dan disimpan sebagai *new sequence* dalam piranti Geneious. Dari data sekuens genom virus utuh yang diperoleh kemudian dilakukan ekstraksi yang menghasilkan sekuens gen NS3 utuh untuk dilakukan analisis.

Penjajaran Nukleotida

Penjajaran nukleotida dikerjakan dengan menggunakan piranti lunak Geneious. Sebanyak 100 data sekuens yang telah disimpan ditambah tujuh sekuens *outgroup* dipilih dan kemudian dijajarkan (*alignment*) menggunakan algoritma ClustalW.

Translasi Sekuens Nukleotida menjadi Asam Amino

Translasi dikerjakan dengan menggunakan opsi *translate* pada *software* Geneious. Translasi dilakukan berdasarkan kode genetik standar yang tersedia pada pilihan *genetic code*.

Analisis Data

Penelitian ini merupakan penelitian *in silico* yang mengolah sekuens RNA DENV-2 yang terdata dalam GenBank. Semua sekuens RNA virus Dengue dijajarkan dan dibandingkan urutan asam aminonya. Berdasarkan urutan RNA dan asam amino, ditentukan region RNA yang menjadi *hotspot* variasi genetik beserta perubahan molekul asam amino penyusun protein NS3.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Database Genom dan Gen NS3 Virus Dengue Serotipe 2

Dari pencarian *database* yang dilakukan di GenBank, diperoleh 100 sekuens RNA DENV-2 dan 7 sekuens RNA Virus Dengue Serotipe 4 (DENV-4) yang digunakan sebagai *outgroup*. Dari 100 sekuens DENV-2 yang diambil, 30 sekuens berasal dari Indonesia yang dikoleksi dari Jakarta, Makassar dan Sumatera, sedangkan 70 sekuens lainnya merupakan sekuens yang berasal dari berbagai negara lainnya. Sebanyak 70 sekuens tersebut berasal dari negara-negara Amerika, Asia, Australia, Kepulauan Karibia dan Oceania. Semua sekuens DENV-2 tersebut berasal dari sampel yang dikoleksi antara tahun 1944-2014.

Data gen NS3 yang diperoleh berasal dari sekuens genom virus utuh yang diekstrak dengan bantuan *software* Geneious. Ekstraksi genom pada akhirnya menghasilkan 107 sekuens gen NS3 yang terdiri dari 100 sekuens gen NS3 DENV-2 dan 7 sekuens gen NS3 DENV-4. Pemilihan DENV-4 sebagai virus *outgroup* didasarkan pada hubungan filogeninya dengan DENV-2. Penelitian yang dilakukan oleh Costa *et al.* (2012) dan Huhtamo *et al.* (2014) menunjukkan bahwa DENV-4 merupakan leluhur dari DENV-1, DENV-2 dan DENV-3. DENV-2 merupakan serotipe yang pertama kali berevolusi dari DENV-4.

Variasi Sekuens Gen NS3 dan Asam Amino Virus Dengue Serotipe 2

Multiple alignment 107 sekuens virus Dengue yang dikerjakan dengan bantuan *software* Geneious menunjukkan adanya variasi genetik antar sampel yang berasal dari negara-negara yang berbeda. Variasi basa nukleotida terdapat pada banyak titik gen NS3. Namun jika hanya dilihat dari hasil penjumlahan

nukleotida saja, tidak dapat ditentukan *hotspot* tempat terjadinya variasi yang berarti. Maksud dari variasi nukleotida yang berarti yaitu variasi yang mengakibatkan terjadinya perubahan pada asam amino yang dikodekan. Titik-titik variasi gen yang berarti dapat ditentukan dengan melihat variasi yang terjadi pada penjumlahan asam amino.

Gen NS3 DENV-2 mengodekan 618 asam amino. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada 618 asam amino tersebut terdapat 69 situs yang memiliki variasi. Dari 69 situs tersebut, untuk setiap posisi asam amino terdapat dua atau tiga variasi asam amino. Variasi asam amino banyak ditemukan pada ujung N gen NS3. Variasi pada ujung N teridentifikasi pada asam amino nomor 5, 6, 8, 10, 13, 14, 15, 20, 22, 28, 31 dan 38. Pada posisi 39-60 tidak terdapat variasi dan nampaknya merupakan posisi yang terkonservasi. Asam amino nomor 39-60 dikodekan oleh nukleotida nomor 115-180. Variasi juga ditemukan antara asam amino nomor 61-83, 115-142, 158-176, 186-190, 208-213, 248-251, 273, 289-294, 308, 318, 333-345, 367, 381, 392, 395-399, 418, 435, 451-466, 499, 508, 535, 548-549, 561-568, 577 dan 600. Variasi asam amino yang terjadi pada situs-situs tersebut disebabkan karena adanya variasi pada nukleotida pengode. Variasi terjadi karena adanya substitusi basa nukleotida. Perubahan basa nukleotida yang terjadi berupa transisi maupun transversi, tetapi tidak ditemukan pola khusus. Transisi dan transversi terjadi secara acak di sepanjang gen.

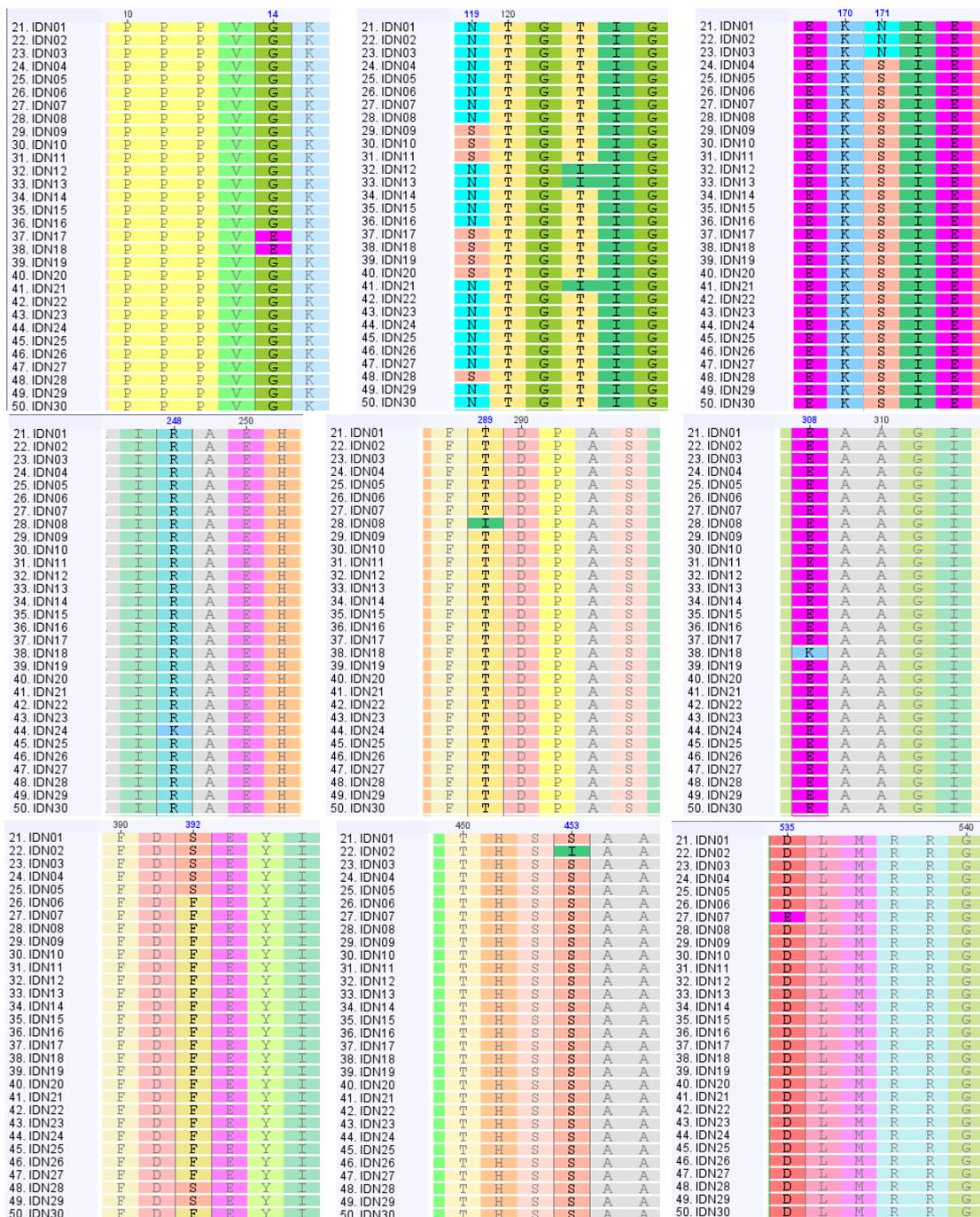
Variasi nukleotida juga ditemukan pada posisi asam amino lain yang tidak disebutkan, namun variasi tersebut tidak menyebabkan perubahan asam amino yang dikodekan. Walaupun terdapat variasi pada titik-titik tertentu pada nukleotida, tetapi kodon yang

dihasilkan masih mengodekan asam amino yang sama.

Berdasarkan hasil penjajaran nukleotida dan asam amino yang dilakukan, terlihat bahwa DENV-2 memiliki sekuens gen NS3 yang bervariasi antar negara yang ada. Variasi tersebut berdampak pada variasi asam amino yang dikodekan. Variasi asam amino juga ditemukan pada sampel-sampel yang berasal dari satu negara yang sama. Penjelasan untuk hal ini adalah karena DENV merupakan virus RNA. Virus RNA memiliki laju mutasi yang tinggi sehingga sekalipun sampel memiliki serotipe yang sama dan berasal dari negara yang sama tetap saja akan terdapat variasi pada sekuens gennya. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Luring *et al.* (2013) bahwa laju mutasi virus RNA jauh lebih tinggi dibandingkan laju mutasi virus DNA.

Pada 30 sampel yang berasal dari Indonesia ditemukan 10 titik variasi triplet nukleotida yang mempunyai arti (Gambar 1). Yang dimaksudkan dengan variasi nukleotida yang mempunyai arti adalah variasi yang

terjadi pada nukleotida tersebut mengakibatkan variasi pada asam amino yang dikodekan. Posisi nukleotida tersebut adalah 40-42, 355-357, 364-366, 511-513, 742-744, 865-867, 922-924, 1174-1176, 1357-1359 dan 1603-1605. Sepuluh triplet nukleotida tersebut secara berturut-turut mengodekan asam amino nomor 14, 119, 122, 171, 248, 289, 308, 392, 453 dan 535. Perubahan nukleotida yang terjadi pada kesepuluh kodon tersebut adalah pada posisi pertama (asam amino nomor 308), kedua (asam amino nomor 14, 119, 122, 171, 248, 289, 392, 453) dan posisi ketiga (asam amino nomor 535). Asam amino yang ditemukan yaitu: pada posisi 14 dapat berupa E atau G; pada posisi 119 dapat berupa N atau S; pada posisi 122 dapat berupa T atau I; pada posisi 171 dapat berupa N atau S; pada posisi 248 dapat berupa K atau R; pada posisi 289 dapat berupa T atau I; pada posisi 308 dapat berupa E atau K; pada posisi 392 dapat berupa F atau S; pada posisi 453 dapat berupa S atau I; pada posisi 535 dapat berupa D atau E.



Gambar 1. Variasi Asam Amino Gen NS3 DENV-2

Meskipun terdapat variasi di beberapa titik asam amino, namun perubahan pada situs-situs pengode tersebut secara keseluruhan tidak berdampak pada fungsi protein NS3 yang dihasilkan. Koleksi sampel yang digunakan dalam penelitian ini semuanya diisolasi dari pasien yang terdeteksi penyakit demam berdarah. Jadi jika variasi

yang ditemukan berdampak pada fungsi protein NS3 yang dikodekan maka seharusnya virus tersebut tidak menimbulkan gejala sakit pada pasien hingga titik pasien dibawa ke rumah sakit dan sampelnya diambil. Virus yang memiliki protein NS3 yang cacat tidak dapat bereplikasi. Jika tidak dapat bereplikasi maka virus tidak dapat

berproliferasi. Virus yang gagal berproliferasi tidak akan bertahan dalam tubuh inang sampai titik yang dapat menimbulkan gejala sakit. Gejala sakit akan timbul dalam kisaran 4-7 hari setelah gigitan nyamuk (CDC, 2014).

Variasi asam amino yang ditemukan bukan terjadi pada situs yang terkonservasi. Situs asam amino yang terkonservasi menandakan vitalnya peran situs tersebut terhadap fungsi protein yang dihasilkan. Apabila terjadi mutasi atau perubahan pada situs tersebut maka berdampak pada tidak optimalnya kerja protein, kecacatan bahkan tidak berfungsinya suatu protein (Chua *et al*, 2004; Kolondam *et al.*, 2015).

Gen NS3 mengodekan beberapa domain yang memiliki peran spesifik terhadap fungsi protein NS3. Beberapa domain yang diketahui terdapat pada protein NS3 yaitu peptidase S1, peptidase S7, *helicase superfamily*, *ATP binding domain*, *DEAD-Box*, *P-loop NTPase* dan *helicase C-terminal*. Menurut Mitchell *et al.* (2015), posisi domain tersebut secara keseluruhan adalah pada asam amino nomor 17-182 (peptidase S7 dan peptidase S1) dan 180-513 (*helicase superfamily*, *ATP binding domain*, *DEAD-box*, *P-loop NTPase* dan *helicase C-terminal*). Pada masing-masing domain terdapat situs-situs tertentu yang terkonservasi karena memiliki peran vital bagi fungsi domain tersebut. Situs-situs asam amino NS3 yang terkonservasi pada DENV-2 ditemukan pada nomor 46-57, 148-156, 216-235, 256-271, 295-304, 356-366, 405-417, 436-446, 486-498 dan 536-546. Dalam penelitiannya Ayub *et al.* (2013) menemukan situs-situs lain yang juga terkonservasi, yaitu nomor 128-139, 306-320, 339-347 dan 456-464.

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan bahwa situs nomor 128-139, 306-320, 339-347 dan 456-464 tidak terkonservasi pada DENV-2. Hal ini dapat berarti bahwa situs-situs tersebut sebenarnya tidak memegang peran vital bagi fungsi domain yang dikodekan. Menurut Ayub *et al.* (2013), situs-situs tersebut juga terkonservasi pada gen NS3 DENV-1, DENV-3 dan DENV-4. Selain situs-situs yang telah disebutkan, terdapat juga tiga situs lain yang terkonservasi pada DENV-2, yaitu H51, D75 dan S135. Ketiga asam amino tersebut merupakan triad katalitik yang diduga terlibat dalam aktivitas katalitik NS2B-NS3pro (Chua *et al.*, 2004).

KESIMPULAN

Virus Dengue Serotipe 2 (DENV-2) dari Indonesia memiliki 10 situs asam amino pada gen NS3 yang cenderung mengalami variasi. Variasi ditemukan pada kodon nomor 14, 119, 122, 171, 248, 289, 308, 392, 453 dan 535, sedangkan pada DENV-2 global ditemukan sebanyak 69 situs.

SARAN

Ada beberapa temuan dari hasil penelitian ini yang belum dapat dijelaskan. Temuan yang ada dapat menjadi permasalahan yang menarik untuk dilakukan penelitian lanjutan.

DAFTAR PUSTAKA

Anoop, M., Issac, A., Mathew, T., Philip, S., Kareem, N.A., Unnikrishnan, R. dan Sreekumar, E. 2010. Genetic Characterization of Dengue Virus Serotypes Causing Concurrent

- Infection in an Outbreak in Ernakulam, Kerala, South India. *Indian Journal of Experimental Biology* 48:849-857.
- Ayub, A., Ashfaq, U.A., Idrees, S. dan Haque, A. 2013. Global Consensus Sequence Development and Analysis of Dengue NS3 Conserved Domains. *BioResearch* 2(5):392-396.
- Benson, D.A. Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. dan Wheeler, D.L. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Research* 33:D34-D38.
- Cardozo, D.M., Moliterno, R.A., Sell, A.M., Guelsing, S.G.A., Beltrame, L.M., Clementon, S.L., Reis, P.G., Alves, H.V., Mazini, P.S. dan Visentainer, L.J.E. 2014. Evidence of HLA-DQB1 Contribution to Susceptibility of Dengue Serotype 3 in Dengue Patients in Southern Brazil. *Journal of Tropical Medicine* 2014:2.
- Centers for Disease Control (CDC). 2014. *Epidemiology of Dengue Fever*. <http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/> [26 September 2015].
- Chua, J.J.E., Ng, M.M.L. dan Chow, V.T.K. 2004. The Non-Structural 3 (NS3) Protein of Dengue Virus Type 2 Interacts with Human Nuclear Receptor Binding Protein and is Associated with Alterations in Membrane Structure. *Virus Research* 102:151-153.
- Costa, R.L, Voloch, C.M. dan Schrago, C.G. 2012. Comparative Evolutionary Epidemiology of Dengue Virus Serotypes. *Infection, Genetics and Evolution* 12:309-314.
- Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T. dan Wilson A. 2012. Geneious v5.6. <http://www.geneious.com>
- Huhtamo, E., Cook, S., Moureau, G., Uzcátegui, N.Y., Sironen, T., Kuivanen, S., Putkuri, N., Kurkela, S., Harbach, R.E., Firth, A.E., Vapalahti, O., Gould, E.A. dan Lamballerie, X. de. 2014. Novel Flaviviruses from Mosquitoes: Mosquito-Specific Evolutionary Lineages within the Phylogenetic Group of Mosquito-Borne Flaviviruses. *Virology* 464-465:320-329.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes). 2012. Profil Kesehatan Indonesia 2012. <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan-indonesia/profil-kesehatan-indonesia-2012.pdf>. [17 April 2015].
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes). 2014. Waspada DBD di Musim Pancaroba. <http://www.depkes.go.id/article/print/15010200002/waspada-dbd-di-musim-pancaroba.html>. [30 April 2015].
- Kolondam, B., Rao, P., Sztuba-Solinska, J., Weber, P.H., Dzianott, A., Johns,

- M.A., dan Bujarski, J.J. 2015. Co-infection with Two Strains of Brome Mosaic Bromovirus Reveals Common RNA Recombination Sites in Different Hosts. *Virus Evolution* 1(1):vev021.
- Lauring, A.S., Frydman, J. dan Andino, R. 2013. Box 1: Mutation Rates of RNA Viruses and Quasispecies Theory. *Nature Reviews Microbiology* 11:327-336.
- Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K.E. dan Padmanabhan, R., 1999. The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids. *J. Virol.* 73:3108-3116.
- Mitchell, A., Chang, H.Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenemy, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S.Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T.K., Sigrist, C.J.A., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D.A., Wu, C.H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P.D. dan Finn, R.D. 2015. The InterPro Protein Families Database: The Classification Resource after 15 Years. *Nucl. Acids Res.* 43(D1):D213-D221.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An Application to Display Phylogenetic Trees on Personal Computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12(4):357-358.
- Pangerapan, M.C. dan Kolondam, B.J. 2015. Peran Gen Struktural, Gen Non-struktural, dan Untranslated Region dalam Perakitan Virus Dengue. *Jurnal Biomedik* 7(2):71-78.
- Swofford, D.L. 2000. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates. Massachusetts. Sunderland.
- World Health Organization (WHO). 2009. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva. Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2015. Dengue and Severe Dengue. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. [26 Januari 2016].