

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. HASIL**

Penelitian dilakukan dengan menganalisis 100 sampel feses yang diperoleh dari anak-anak balita partisipan di tujuh kampung di Desa Antajaya, yaitu Kampung Cikembar, Cikembar Hilir, Cikembar Kaler, Kebon Jambe, Pasir Santri, Campedak, dan Pasir Kalong. Jumlah sampel tersebut ditentukan berdasarkan kriteria Gay (1976 *lihat Sevilla dkk.* 1993: 163) untuk penelitian deskriptif dari suatu populasi kecil, yaitu mencakup lebih dari 20% jumlah anak-anak balita di Desa Antajaya (456 balita) pada bulan Februari 2008. Walaupun pengumpulan sampel tersebut tidak dapat mewakili keseluruhan jumlah anak-anak balita di masing-masing kampung maupun masing-masing kelompok umur, sampel tersebut diharapkan dapat menggambarkan secara umum kondisi anak-anak balita di Desa Antajaya.

Anak-anak balita yang diikutsertakan dalam penelitian terdiri atas 48% perempuan dan 52% laki-laki, serta terbagi ke dalam lima kelompok umur, yaitu 0--11 bulan (16 sampel), 12--23 bulan (26 sampel), 24--35 bulan (18 sampel), 36--47 bulan (16 sampel), dan 48--59 bulan (21 sampel), serta 3 sampel tanpa data akibat minimnya kepedulian beberapa orang tua anak untuk mengingat tanggal kelahiran (Tabel 1). Informasi mengenai tanggal imunisasi OPV juga sulit diperoleh karena hampir semua orang tua anak-

anak balita partisipan tidak menyimpan data imunisasi anaknya. Jumlah sampel dari masing-masing Kampung Cikembar, Cikembar Hilir, Cikembar Kaler, Kebon Jambe, Pasir Santri, Campedak, dan Pasir Kalong, adalah 6, 13, 9, 27, 21, 8, dan 12 serta 4 sampel yang tidak tercatat lokasi pengumpulannya. Perbedaan jumlah sampel pada masing-masing kampung tersebut disebabkan pengumpulan sampel yang bersifat purposif agar mencakup lokasi-lokasi rumah tangga dengan fasilitas sanitasi buruk walaupun terdapat beberapa sampel yang diperoleh dari rumah tangga dengan fasilitas sanitasi yang memadai. Rumah tangga dengan fasilitas sanitasi buruk pada penelitian didefinisikan sebagai rumah tangga yang belum memiliki fasilitas jamban leher angsa dengan saluran pembuangan tangki septik (DepKes RI 2007: 12).

Jumlah anak-anak balita partisipan yang terdeteksi positif terinfeksi enterovirus adalah sebesar 65% (Tabel 2), dengan prevalensi tertinggi terdapat di Kampung Kebon Jambe (81,48%) (Tabel 3) dan pada kelompok umur 12--23 bulan (86,36%) (Tabel 4). Prevalensi di Kampung Cikembar, Cikembar Hilir, Cikembar Kaler, Pasir Santri, Campedak, Pasir Kalong, masing-masing adalah sebesar 50% (3/6), 38,46% (5/13), 66,67% (6/9), 61,9% (13/21), 62,5% (5/8), dan 66,67% (8/12). Prevalensi berdasarkan kelompok umur lainnya, yaitu kelompok umur 0--11, 24--35, 36--47, dan 48--59 bulan masing-masing adalah sebesar 63,63% (14/2), 82,35% (14/17), 50% (8/26), dan 40% (8/20) (Tabel 3 dan 4). Perbandingan prevalensi infeksi enterovirus berdasarkan jenis kelamin menunjukkan bahwa 68,75% anak-

anak balita perempuan dan 61,54% laki-laki terinfeksi enterovirus dengan rasio kedua jenis kelamin pada penelitian adalah 1:1,08. Prevalensi pada anak balita perempuan lebih tinggi dibandingkan pada anak balita laki-laki, walaupun prevalensi di antara kedua jenis kelamin cenderung tidak berbeda (Tabel 5).

Hasil elektroforesis gel agarosa dari produk CODEHOP VP1 RT-snPCR menunjukkan pita tunggal pada posisi 350--400 pb pada 65 sampel positif (Gambar 9). Menurut Oberste *dkk.* (1998: 1942), sekuen pengkode kapsid VP1 keseluruhan memiliki panjang berkisar 834--951 nukleotida. Namun, menurut Nix *dkk.* (2006: 2699) metode CODEHOP VP1 RT-snPCR hanya akan menghasilkan produk amplifikasi sebesar 350--400 pb. Seluruh sampel yang terdeteksi positif telah berhasil di-*sequencing* dan ditentukan sekuen parsial gen pengkode kapsid VP1-nya dengan panjang sekuen berkisar 267--389 nukleotida (Tabel 6). Hampir seluruh sampel positif menghasilkan elektroferogram dengan hanya beberapa nukleotida ambigu (N) pada arah *forward* (primer AN89) maupun *reverse* (primer AN88) (Gambar 10). Namun, beberapa sampel positif seperti H96, H101, H111, H121, H126, dan H141 menghasilkan banyak nukleotida ambigu pada elektroferogram hasil *sequencing* walaupun telah dilakukan amplifikasi dan *sequencing* ulang (Gambar 11).

Keberadaan nukleotida-nukleotida ambigu pada elektroferogram dapat diakibatkan rendahnya kualitas cetakan DNA yang umumnya dipengaruhi oleh keberadaan residu garam serta senyawa organik yang terbawa saat

tahapan purifikasi hasil *cycle sequencing*, degradasi DNA cetakan saat penyimpanan, atau keberadaan lebih dari satu cetakan pada *cycle sequencing* (Applied Biosystems 2000: 7-16). Menurut Smith (2003: 53), nukleotida-nukleotida ambigu yang memiliki karakteristik dua puncak atau lebih pada posisi basa yang sama dapat disebabkan keberadaan lebih dari satu cetakan akibat adanya infeksi campuran (*mixed infection*) oleh lebih dari satu serotipe. Keberadaan infeksi campuran pada penelitian kemungkinan terabaikan karena primer-primer pada CODEHOP VP1 RT-snPCR tidak didesain untuk membedakan serotipe-serotipe yang berbeda terutama dengan titer yang sama pada infeksi campuran. Walau demikian, pengeditan elektroferogram secara manual terhadap nukleotida-nukleotida ambigu tersebut dapat menghasilkan sekuen konsensus tunggal yang teridentifikasi melalui penelusuran BLAST.

Identifikasi sekuen konsensus dari 65 sampel positif melalui penelusuran BLAST memperlihatkan bahwa terdapat 14 serotipe berbeda yang tercakup dalam tiga spesies enterovirus dalam penelitian. Tiga serotipe merupakan spesies HEV-A (coxsackievirus A2 [CVA2], CVA5, dan CVA10) yang mencakup 11 sampel positif. Tujuh serotipe merupakan spesies HEV-B (echovirus 1 [E1], E9, E14, E21, E25, coxsackievirus B3 [CVB3], dan CVB4) yang mencakup 38 sampel positif. Empat serotipe merupakan spesies HEV-C (poliovirus 2 [PV2], CVA1, CVA20, dan CVA24) yang mencakup 16 sampel positif (Tabel 2).

Seluruh sekuen hasil penelusuran BLAST dengan skor tertinggi dari masing-masing sampel positif dapat memenuhi kriteria yang ditentukan oleh Smith (2003: 42) dan Oberste *dkk.* (1999: 1288) yaitu memiliki skor BLAST di atas 165, *e-value* di bawah  $10^{-40}$ , dan persentase identitas di atas 75% (Tabel 6). Skor hasil penelusuran BLAST dikomputasi berdasarkan panjang *alignment*, jumlah kecocokan basa, dan jumlah gap yang disisipkan, sehingga semakin tinggi skor hasil BLAST suatu sekuen dengan sekuen hasil penelitian akan mengindikasikan kedekatan hubungan antara kedua sekuen tersebut (Hall 2001: 13). *Expectation-value (e-value)* mewakili signifikansi secara statistik dari hasil penelusuran BLAST. Oleh karena itu, *e-value* yang semakin mendekati nol menunjukkan tingkat kepercayaan yang mendekati 100% (Hall 2001: 13). Kisaran skor BLAST, *e-value*, dan persentase identitas dari seluruh sampel positif adalah 217--612,  $2 \times 10^{-53}$ --  $3 \times 10^{-172}$ , dan 78--98%.

Perbedaan persentase identitas dari masing-masing sampel dalam serotipe yang sama dipengaruhi oleh similaritas nukleotida sekuen hasil penelitian dengan sekuen referensi enterovirus yang terdapat di GenBank. Thoelen *dkk.* (2004: 969--970) melaporkan tingginya variasi nukleotida di antara berbagai galur enterovirus dari serotipe yang sama melalui hasil analisis sekuen VP1. Namun, variasi nukleotida intraserotipe tersebut umumnya hanya menghasilkan sedikit perubahan asam amino dan perubahan asam amino yang terjadi dari variasi nukleotida umumnya juga tidak mengubah fenotipe suatu serotipe enterovirus (Thoelen *dkk.* 2004: 970).

Analisis pohon filogenetik dari seluruh sekuen parsial VP1 sampel positif dengan seluruh serotipe enterovirus galur prototipe dilakukan terutama untuk mengkonfirmasi hasil penelusuran BLAST. Sampel positif yang ditentukan sebagai serotipe yang sama berada pada satu *cluster* dan membentuk kelompok monofiletik dengan galur prototipenya sesuai dengan hasil penelusuran BLAST. Seluruh sampel positif juga memiliki persentase *bootstrap* lebih dari 82% bersama galur prototipenya, dengan pengecualian terhadap sampel H102 yang hanya memiliki persentase *bootstrap* 47% dengan galur prototipe serotipe E1 (galur Farouk [AF081314]).

Persentase *bootstrap* yang rendah tersebut mengindikasikan bahwa sampel H102 memiliki reliabilitas yang rendah untuk membentuk *cluster* dengan galur prototipenya. Menurut Thoelen *dkk.* (2004: 970), analisis pohon filogenetik pada umumnya dipengaruhi oleh tingkat kelestarian sekuen dan panjang sekuen. Oleh karena itu, sampel H102 perlu dikonfirmasi identitasnya dengan memperpanjang daerah sekuen VP1. Secara keseluruhan, hasil analisis pohon filogenetik berdasarkan sekuen parsial VP1 melalui metode *neighbor-joining* dan parameter Kimura-2 dapat mendukung seluruh hasil penelusuran BLAST dengan terbentuknya 14 *cluster* berbeda dari 14 serotipe hasil penelusuran BLAST. Tabulasi hasil penelusuran BLAST dan hasil analisis pohon filogenetik dapat dilihat pada Tabel 6 dan Gambar 12.

## B. PEMBAHASAN

1. Prevalensi infeksi serotipe enterovirus di Desa Antajaya
  - a. Prevalensi infeksi serotipe enterovirus berdasarkan lokasi pengumpulan sampel

Analisis sampel positif berdasarkan lokasi pengumpulan sampel menunjukkan kisaran prevalensi enterovirus sebesar 38,46% hingga 81,48% dari tujuh kampung di Desa Antajaya. Walaupun tidak terdapat data mengenai fasilitas sanitasi dari masing-masing kampung, prevalensi enterovirus tersebut dapat mencerminkan minimnya fasilitas sanitasi yang tersedia bagi penduduk Desa Antajaya, yaitu hanya 16% rumah tangga yang memiliki fasilitas sanitasi memadai (jamban dengan tangki septik) dari 914 rumah tangga (data Tim Penggerak PKK, Kecamatan Tanjungsari 2007). Kuramitsu *dkk.* (2005: 1140) mengungkapkan bahwa selain minimnya fasilitas sanitasi dasar, rendahnya akses individu terhadap sumber air bersih dapat menjadi penyebab tingginya prevalensi infeksi enterovirus.

Beberapa serotipe seperti CVA5, CVA10, E1, E9, CVA1, dan CVA 20 hanya dapat ditemukan di salah satu kampung. Namun, beberapa serotipe seperti E25, CVB3, CVB4, CVA2, dan CVA24 dapat ditemukan di lebih dari satu kampung yang berbeda (Tabel 3) (Gambar 13). Menurut Pallansch & Roos (2006: 859), transmisi enterovirus di antara rumah tangga maupun komunitas dapat terjadi terutama di saat banyak individu berkumpul. Perilaku

penduduk desa untuk selalu berkumpul bersama di saat waktu luangnya kemungkinan dapat menjadi salah satu faktor yang meningkatkan transmisibilitas enterovirus di antara kampung-kampung yang berbeda di Desa Antajaya. Menurut McKinney *dkk.* (1987 lihat Pallansch & Roos 2006: 860), tanah dan tanaman pertanian yang tercemar limbah manusia juga dapat menjadi sumber transmisi enterovirus. Lahan pertanian (sawah) di Desa Antajaya yang mencakup 15% dari luas wilayah Desa Antajaya umumnya menggunakan saluran irigasi dari aliran Sungai Cibeet yang kemungkinan masih tercemar limbah manusia (Pemerintah Kecamatan Cariu & BPS 2000: 3), sehingga hal tersebut dapat menjadi salah satu faktor lain yang meningkatkan transmisibilitas enterovirus.

Transmisi enterovirus di antara anggota keluarga juga dapat menjadi salah satu faktor yang meningkatkan transmisibilitas enterovirus dari satu kampung ke kampung lainnya. Menurut Kogon *dkk.* (1969 lihat Pallansch & Roos 2006: 859), transmisi enterovirus di antara anggota keluarga umumnya berkisar lebih dari 90%. Individu dewasa yang terinfeksi secara asimtomatik oleh enterovirus di dalam suatu keluarga dapat menjadi agen penyebar enterovirus dari satu kampung ke kampung lainnya karena mobilitas yang lebih tinggi pada individu dewasa.

b. Prevalensi infeksi serotipe enterovirus berdasarkan kelompok umur

Prevalensi infeksi enterovirus tertinggi ditemukan pada kelompok umur 12--23 bulan (86,36%), dengan penurunan prevalensi pada kelompok umur

yang semakin besar, yaitu 82,35%, 50%, dan 40% dari masing-masing kelompok umur 24--35, 36--47, dan 48--59 bulan (Tabel 4) (Gambar 14). Hal tersebut sesuai dengan penelitian oleh Gamble (1962: 17) maupun Witsø *dkk.* (2006: 4099) yang melaporkan prevalensi tinggi pada kelompok umur tahun kedua dibandingkan kelompok umur yang lebih besar maupun kelompok umur tahun pertama.

Prevalensi infeksi enterovirus yang lebih rendah pada kelompok umur 0--11 bulan dibandingkan dengan kelompok umur 12--23 bulan kemungkinan disebabkan aktivitas fisik yang rendah serta tersedianya imunitas bawaan pasif yang diperoleh secara maternal pada kelompok umur 0--11 bulan (Gamble 1962: 18). Aktivitas fisik yang rendah pada individu berumur 0--11 bulan secara tidak langsung mengurangi pajanan terhadap enterovirus, sedangkan imunitas bawaan pasif berupa antibodi dapat menyediakan perlindungan terhadap infeksi enterovirus. Menurut Thomas *dkk.* (2006: 416), imunitas bawaan pasif umumnya diperoleh sejak individu berada dalam kandungan ibu melalui plasenta ataupun diperoleh dari kolostrum (air susu ibu= ASI).

Prevalensi enterovirus yang cenderung menurun pada kelompok umur yang semakin besar diduga karena anak-anak pada kelompok umur tersebut mulai mengembangkan imunitas daptan adaptif (*acquired adaptive immunity*) terhadap suatu serotipe enterovirus. Menurut Thomas *dkk.* (2006: 4--5), imunitas daptan adaptif menghasilkan antibodi dengan spesifisitas tinggi ketika suatu individu terinfeksi pertama kali oleh suatu serotipe

enterovirus. Imunitas adaptif dapatan yang diperoleh dari infeksi pertama tersebut akan menghasilkan respons memori, sehingga infeksi sekunder dari serotipe enterovirus yang sama akan menginduksi sistem imun bereaksi lebih cepat, kuat, dan efektif untuk menetralkan infeksi enterovirus.

Pallansch & Roos (2006: 862) menyatakan bahwa infeksi oleh salah satu serotipe enterovirus dapat meningkatkan titer antibodi terhadap serotipe enterovirus lainnya, walaupun pola respons tersebut dapat bervariasi menurut serotipe dan di antara individu-individu yang berbeda. Hal tersebut dibuktikan oleh Samuelson *dkk.* (1994: 336), yang telah mengidentifikasi salah satu daerah antigenik utama pada kapsid VP1 enterovirus yang dapat menginduksi kemunculan antibodi dengan reaktivitas silang (*cross-reactivity*) terhadap berbagai serotipe enterovirus. Antibodi dengan reaktivitas silang tersebut dapat menetralkan berbagai infeksi enterovirus dari serotipe yang berbeda sehingga memungkinkan penurunan prevalensi enterovirus pada kelompok umur yang semakin besar.

## 2. Keragaman serotipe enterovirus dari anak-anak balita di Desa Antajaya

Seluruh 65 sampel positif yang telah terdeteksi dan teridentifikasi dalam penelitian terdiri atas representatif tiga spesies enterovirus manusia dari empat enterovirus manusia, yaitu HEV-A, B, dan C tanpa spesies HEV-D yang terdeteksi dan teridentifikasi. Hasil deteksi dan identifikasi keseluruhan sebesar 65% merupakan hasil terbesar dibandingkan penelitian serupa lainnya, walaupun hasil penelitian tidak sepenuhnya dapat dibandingkan

dengan penelitian lain karena beberapa faktor seperti jenis spesimen yang dianalisis, frekuensi pengumpulan sampel, waktu dan lokasi geografis pengumpulan sampel, serta metode deteksi, isolasi, dan identifikasi enterovirus dari masing-masing penelitian. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Witsø *dkk.* (2006: 4095) melaporkan prevalensi enterovirus sebesar 51,3% dari 113 anak-anak balita sehat di Norwegia. Penelitian lainnya oleh Kuramitsu *dkk.* (2005: 1135) melaporkan prevalensi enterovirus sebesar 64% dari 53 anak-anak sehat berusia  $\leq 10$  tahun di Mongolia. Pada tahun 1971 hingga 1972, Tan & Lam (*lihat Witsø dkk.* 2006: 4098) melaporkan prevalensi enterovirus pada anak-anak berusia  $\leq 7$  tahun di Malaysia sebesar 8,7%.

Ketiadaan spesimen seperti usapan tenggorokan dan usapan konjungtiva (selaput lendir mata) pada penelitian kemungkinan mengurangi frekuensi enterovirus yang dapat terdeteksi. Menurut Muir *dkk.* (1998: 205), sampel feses merupakan spesimen yang paling sensitif untuk mendeteksi infeksi enterovirus dibandingkan spesimen lain seperti usapan tenggorokan atau cairan serebrospinal karena hampir seluruh serotipe enterovirus dapat menyebar melalui rute fekal-oral. Namun menurut Kuramitsu *dkk.* (2005: 1139), beberapa serotipe CVA menyebar lebih banyak melalui rute respiratori dibandingkan melalui rute fekal-oral. Beberapa serotipe enterovirus juga lebih mudah diisolasi dari spesimen usapan konjungtiva, seperti CVA24 dan EV70 karena kedua serotipe tersebut merupakan penyebab utama infeksi pada mata (Pallansch & Roos 2006: 860).

Rentang waktu pengumpulan sampel dalam penelitian (Februari--Juni 2008) diabaikan karena sirkulasi enterovirus diasumsikan cenderung tidak berbeda sepanjang tahun. Menurut Pallansch & Roos (2006: 862), sirkulasi enterovirus pada daerah beriklim tropis seperti Indonesia dapat terjadi sepanjang tahun. Hal tersebut kemungkinan menyebabkan perbedaan hasil penelitian di negara lain dan tingginya prevalensi enterovirus yang terdeteksi pada penelitian.

Penelitian dilakukan dengan menganalisis langsung dari sampel feses. Hal tersebut kemungkinan mengurangi frekuensi enterovirus yang dapat terdeteksi karena titer enterovirus lebih rendah pada sampel orisinal. Menurut Pallansch & Roos (2006: 876), metode deteksi dan identifikasi dari beberapa penelitian enterovirus umumnya melibatkan inokulasi spesimen ke dalam beberapa tipe sel kultur agar enterovirus yang terdeteksi dapat mencapai titer tinggi untuk dapat diidentifikasi melalui uji netralisasi ataupun identifikasi molekular. Walaupun demikian, metode CODEHOP VP1 RT-snPCR yang digunakan dalam penelitian memiliki sensitivitas yang sangat tinggi karena menurut Nix *dkk.* 2006: 2698, metode tersebut dapat mendeteksi paling sedikit sepuluh cetakan RNA dalam suatu reaksi.

Spesies HEV-B merupakan spesies enterovirus yang paling banyak terdeteksi dan teridentifikasi, yaitu mencakup 58,46% atau 38 dari 65 sampel positif. Spesies HEV-A dan HEV-C masing-masing memiliki prevalensi sebesar 16,92% (11/65) dan 24,62% (16/65). Hal tersebut sesuai dengan beberapa penelitian yang melaporkan prevalensi tinggi dari HEV-B pada

infeksi simtomatik atau individu sehat, seperti yang telah dilaporkan di Tunisia (Bahri *dkk.* 2005: 63), Arab Saudi (Al-Hajjar *dkk.* 1997: 18), Spanyol (Trallero *dkk.* 2000: 497), Amerika Serikat (CDC 2006: 1), Mongolia (Kuramitsu *dkk.* 2005: 1131), Korea (Lee *dkk.* 2007: 963), dan Nigeria (Soji *dkk.* 2007: 25). Tingginya prevalensi HEV-B tersebut kemungkinan disebabkan spesies HEV-B mencakup lebih banyak serotipe (54 serotipe) dibandingkan dengan spesies enterovirus manusia lainnya. Beberapa serotipe dari HEV-B seperti CVB dapat bereplikasi di berbagai jenis jaringan dan organ seperti sistem saraf pusat, liver, pankreas, lemak, dan otot lurik sehingga memungkinkan tingginya prevalensi dari serotipe tersebut dibandingkan dengan serotipe lainnya (Hyypiä *dkk.* 1997: 2).

Tiga serotipe yang paling banyak terdeteksi dan teridentifikasi adalah E25 (20%; 13/65), CVA24 (18,46%; 12/65), dan E21 (16,92%; 11/65). Hal tersebut berbeda dengan beberapa penelitian lainnya yang melaporkan keragaman enterovirus dari anak-anak sehat di berbagai negara. Kuramitsu *dkk.* (2005: 1135) melaporkan dominasi E30 dan E33 dengan prevalensi sebesar 21% dan 24% dari 122 individu sehat di Mongolia, sedangkan Witsø *dkk.* (2006: 4095) melaporkan dominasi E18 dan CVB3 dengan prevalensi masing-masing sebesar 8,9% dan 7,3% dari 124 anak-anak balita sehat di Norwegia. Penelitian-penelitian tersebut hanya melaporkan prevalensi E25, CVA24, dan E21 dalam jumlah kecil atau bahkan tidak ada. Perbedaan hasil penelitian tersebut kemungkinan juga berkaitan dengan berbagai faktor yang telah diuraikan. Menurut Pallansch & Roos (2006: 861), karakteristik

epidemiologi dari enterovirus adalah variasi berdasarkan serotipe, waktu, lokasi geografis, dan manifestasi penyakit.

a. Keragaman spesies *Human enterovirus A* (HEV-A)

Serotipe dari spesies HEV-A yang terdeteksi dan teridentifikasi adalah CVA2, CVA5, dan CVA10 dengan prevalensi keseluruhan HEV-A dari jumlah sampel positif adalah 16,92% (11/65). Serotipe CVA2 merupakan serotipe HEV-A yang paling banyak ditemukan dengan prevalensi sebesar 13,8% (9/65), sedangkan CVA5 dan CVA10 masing-masing memiliki prevalensi sebesar 1,54% (1/65). Beberapa penelitian mengenai enterovirus pada anak-anak balita sehat di berbagai negara mengungkapkan perbedaan prevalensi HEV-A dengan berbagai kombinasi serotipe. Witsø *dkk.* (2006: 4097) melaporkan prevalensi HEV-A di Norwegia pada anak-anak sehat berumur 3--28 bulan sebesar 57% dari 124 sampel positif dengan serotipe yang teridentifikasi adalah CVA2, CVA4, CVA5, CVA6, CVA10, CVA14, CVA16, dan EV71. Kuramitsu *dkk.* (2005: 1134) melaporkan prevalensi HEV-A pada anak-anak balita sehat di Mongolia sebesar 16% dari 62 sampel positif dengan kombinasi serotipe CVA2, CVA4, dan CVA10. Penelitian yang dilakukan oleh Gamble (1962: 17) melaporkan prevalensi HEV-A pada anak-anak balita sehat di London, Inggris sebesar 81% dari 135 sampel positif dengan kombinasi serotipe CVA2, CVA3, CVA4, CVA8, dan CVA10.

Sekuen masing-masing serotipe spesies HEV-A dari hasil penelitian dibandingkan melalui analisis filogenetik dengan sekuen lain di berbagai

negara yang diperoleh dari pangkalan data GenBank untuk melihat hubungan kekerabatan antara sekuen-sekuen tersebut. Berdasarkan analisis pohon filogenetik spesies HEV-A (Gambar 15), sampel penelitian yang diidentifikasi sebagai serotipe CVA2 terpisahkan menjadi dua *cluster* yang berbeda. Tiga sampel CVA2 (H151, H153, dan H169) membentuk *cluster* dengan sekuen CVA2 dari Jepang (isolat tahun 2003 dan 2004) dan Bangladesh (isolat tahun 2002), sedangkan enam sampel lainnya (H157, H162, H165, H167, H168) membentuk *cluster* tersendiri. Hal tersebut dapat mengindikasikan keberadaan dua galur berbeda yang bersirkulasi dalam populasi anak-anak balita di Desa Antajaya. Menurut Witsø *dkk.* (2006: 4097), keberadaan lebih dari satu *cluster* yang berbeda dari serotipe yang sama merupakan indikasi adanya introduksi lebih dari satu galur ke dalam suatu populasi. Evolusi genetik secara berkelanjutan dari serotipe enterovirus yang endemik di suatu populasi juga dapat menyebabkan keberadaan beberapa galur serotipe yang berbeda di populasi tersebut (Mirand *dkk.* 2007: 172).

Sampel H96 yang diidentifikasi sebagai CVA10 berkerabat dekat dengan sekuen CVA10 dari Mongolia (isolat tahun 2003) dan membentuk *cluster* dengan sekuen CVA10 lainnya, walaupun pengelompokan tersebut menunjukkan persentase *bootstrap* yang rendah (Gambar 16). Lukashev *dkk.* (2003: 10425) menyatakan bahwa rendahnya persentase *bootstrap* dapat disebabkan oleh pendeknya ukuran sekuen yang dianalisis, yaitu 267--389 nukleotida. Pemanjangan daerah sekuen pengkode VP1 untuk menganalisis kekerabatan antar sekuen tersebut kemungkinan dapat

menghasilkan persentase *bootstrap* yang lebih tinggi. Sampel H163 yang diidentifikasi sebagai serotipe CVA5 hanya dapat dibandingkan dengan salah satu sekuen referensi dari Jepang karena minimnya sekuen referensi serotipe CVA5 dari negara lain di pangkalan data GenBank. Walaupun demikian, sampel H163 tersebut terlihat berkerabat lebih dekat dengan sekuen CVA5 dari Jepang (isolat tahun 2000) dibandingkan dengan sekuen CVA5 galur prototipe yang diisolasi pertama kali pada tahun 1950.

b. Keragaman spesies *Human enterovirus B* (HEV-B)

Serotipe dari spesies HEV-B yang terdeteksi dan teridentifikasi adalah E1, E9, E14, E21, E25, CVB3, dan CVB4 masing-masing dengan prevalensi dari jumlah sampel positif adalah sebesar 1,54% (1/65), 1,54% (1/65), 4,62% (3/65), 16,92% (11/65), 20% (13/65), 4,62% (3/65), dan 9,23% (6/65).

Prevalensi keseluruhan HEV-B dari jumlah sampel positif adalah sebesar 58,46% (38/65). Echovirus 21 dan 25 adalah serotipe dari HEV-B maupun dari keseluruhan enterovirus yang paling sering ditemukan pada penelitian. Penelitian lain dari anak-anak balita sehat di berbagai negara umumnya mengungkapkan kombinasi serotipe HEV-B yang berbeda-beda. Kuramitsu *dkk.* (2005: 1134) melaporkan kombinasi serotipe E30, E33, E12, dan E25 dari spesies HEV-B di Mongolia. Witsø *dkk.* (2006: 4097) melaporkan kombinasi serotipe dominan E18, CVB1, CVB3, CVA9, CVB5, dan CVB4 di Norwegia, sedangkan Rakoto-Andrianarivelo *dkk.* (2007: 1954) melaporkan kombinasi serotipe E14, E19, dan E25 di Madagaskar. Pendataan serotipe

dari spesies HEV-B dapat menjadi informasi berharga untuk mengetahui sumber keragaman gen enterovirus serta hubungannya dengan manifestasi suatu penyakit (Simmonds & Welch 2006: 492).

Sekuen hasil penelitian dari masing-masing serotipe yang berasal dari spesies HEV-B juga dibandingkan melalui analisis filogenetik dengan sekuen referensi lain dari berbagai galur di beberapa negara. Berdasarkan analisis pohon filogenetik spesies HEV-B (Gambar 16), sekuen dari masing-masing serotipe membentuk satu *cluster* dengan sekuen referensi dari beberapa negara dan dengan sekuen prototipenya. Sampel penelitian yang diidentifikasi sebagai serotipe dominan E25 (H113, H114, H122, H126, H129, H130, H132, H136, H137, H140, H145, H146, dan H156) menunjukkan kekerabatan yang lebih dekat dengan serotipe E25 dari Jepang (isolat tahun 2004) (persentase *bootstrap* 99%) dibandingkan dengan sekuen lain dari negara-negara Eropa (Prancis, Belgia, dan Italia) maupun negara Asia lainnya (China, Korea Selatan, dan Mongolia). Hal tersebut juga teramati pada sampel yang diidentifikasi sebagai E1 (H102), E14 (H91, H115, H142), dan CVB3 (H84, H92, H110) yang masing-masing berkerabat dekat dengan galur-galur dari negara Asia, yaitu Bangladesh (isolat tahun 2002), China (isolat tahun 2000), dan Korea Selatan (isolat tahun 2005) walaupun pengelompokan sekuen-sekuen tersebut masih bersifat ambigu karena persentase *bootstrap* yang rendah (< 70%).

Sampel penelitian lainnya yang diidentifikasi sebagai E9, E21, dan CVB4 masing-masing membentuk *cluster* dengan galur serotipe negara

Eropa. Menurut Kottaridi *dkk.* (2007: 407), keberadaan galur enterovirus yang secara genetik mirip pada lokasi geografis yang berjauhan dapat mengindikasikan penyebaran epidemik maupun persistensi global dari suatu galur tertentu. Walaupun hasil analisis pohon filogenetik tidak secara langsung dapat menunjukkan sumber transmisi suatu serotipe enterovirus, analisis pohon filogenetik dapat membantu penentuan pola penyebaran suatu serotipe enterovirus.

c. Keragaman spesies *Human enterovirus C* (HEV-C)

Serotipe dari spesies HEV-C yang terdeteksi dan teridentifikasi adalah PV2, CVA1, CVA20, dan CVA24 dengan masing-masing prevalensi dari jumlah sampel positif adalah 3,08%% (2/65), 1,54% (1/65), 1,54% (1/65), dan 18,46% (12/65), serta prevalensi keseluruhan dari HEV-C sebesar 24,62% (12/65). Serotipe CVA24 merupakan serotipe yang paling dominan di antara serotipe lain dari spesies HEV-C, sekaligus merupakan serotipe kedua terbanyak yang ditemukan dalam penelitian.

Serotipe PV2 yang ditemukan dalam penelitian kemungkinan merupakan PV2 dari OPV (*OPV-like* poliovirus), yaitu kategori isolat poliovirus yang mempunyai divergensi sekuen pengkode VP1 sebesar < 1% dari poliovirus galur OPV (Sabin) (WHO 2004: 8). Hal tersebut dapat terlihat dari analisis pohon filogenetik yang menunjukkan panjang cabang kurang dari 1% antara sampel H155 dengan H166 dan poliovirus galur Sabin [X00595] (Gambar 12 dan 17). Namun, perlu dilakukan identifikasi lebih

lanjut untuk menentukan identitas poliovirus pada kedua sampel tersebut dengan protokol diferensiasi intratipe (*intratypic differentiation*) yang direkomendasikan oleh WHO (2004: 101), yaitu melalui *polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism* (PCR-RFLP), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), dan dengan *sequencing* seluruh daerah pengkode kapsid VP1.

Sampel H155 dan H166 yang diidentifikasi sebagai *OPV-like poliovirus* tersebut kemungkinan diekresikan oleh individu yang menerima imunisasi OPV dalam jangka waktu kurang dari 4 minggu, walaupun informasi mengenai tanggal imunisasi OPV terakhir dari subjek dengan nomor sampel H155 dan H166 tidak tersedia. Menurut Kawamura *dkk.* (1989: 1302), galur OPV dari poliovirus memiliki neurovirulensi (virulensi terhadap sel neuron) yang rendah dibandingkan poliovirus galur liar maupun galur parentalnya karena adanya mutasi pada daerah IRES 5'NTR yang menjadi faktor penentu neurovirulensi pada poliovirus. Mutasi tersebut mengurangi stabilitas struktur sekunder RNA untuk berikatan dengan komponen-komponen sel inang, seperti ribosom sehingga menghambat inisiasi translasi yang mengakibatkan penurunan kemampuan replikasi virus.

Serotipe poliovirus galur OPV yang ditemukan dalam penelitian hanya serotipe PV2. Menurut Fine & Carneiro (1999: 1012), OPV yang diberikan pada saat imunisasi mengandung tiga serotipe poliovirus dengan rasio titer PV1, PV2, dan PV3 galur Sabin adalah 10:1:6. Titer serotipe PV2 pada OPV relatif lebih rendah dibandingkan PV1 dan PV3. Namun, pada umumnya

individu penerima OPV lebih banyak mengekskresikan PV2 dibandingkan PV1 dan PV3. Hal tersebut kemungkinan disebabkan PV2 merupakan serotipe yang paling stabil dibandingkan dengan kedua serotipe lainnya berkaitan dengan divergensi nukleotida yang relatif lebih sedikit pada PV2 galur Sabin dari PV2 galur parentalnya. Eksperimen kompetisi secara *in vitro* di antara ketiga serotipe tersebut juga menunjukkan perlambatan multiplikasi PV1 dan PV3 dengan kehadiran PV2 (Fine & Carneiro 1999: 1012).

Berdasarkan hasil analisis pohon filogenetik, sampel-sampel dari serotipe yang sama membentuk satu *cluster* bersama-sama dengan sekuen referensi lainnya maupun sekuen serotipenya (Gambar 17). Sampel H155 dan H166 yang teridentifikasi sebagai PV2 terpisah satu sama lain walaupun masih berada dalam *cluster* yang sama dengan sekuen referensi lainnya. Sampel H166 berkerabat dekat dengan sekuen PV2 galur Madagaskar (isolat tahun 2005), sedangkan sampel H155 berkerabat dekat dengan sekuen PV2 dari Yunani (isolat tahun 2001). Perbedaan posisi pohon filogenetik pada kedua sampel tersebut tersebut kemungkinan disebabkan perbedaan pola mutasi nukleotida dari poliovirus parental OPV.

Sampel yang diidentifikasi sebagai CVA1 dan CVA20 masing-masing berkerabat relatif dekat dengan CVA1 galur Jerman (isolat tahun 2005) (persentase *bootstrap* 97%) dan CVA20 galur Amerika Serikat (isolat tahun 1983) (persentase *bootstrap* < 70%). Sampel-sampel yang diidentifikasi sebagai serotipe CVA24 juga membentuk satu *cluster* tersendiri, walaupun sampel H123 terpisah dari keenam sampel CVA24 lainnya (H82, H111,

H116, H119, H121, H125, H127, H138, H141, H148, dan H150) yang berkerabat dekat dengan sekuen CVA24 dari Singapura (isolat tahun 2005). Sekuen CVA24 dari Singapura tersebut berasal dari galur CVA24 yang menyebabkan wabah nasional pendarahan konjungtivitis di Singapura dengan 10.000 individu terinfeksi pada tahun 2005 (Yeo *dkk.* 2007: 2006). Penelitian mengenai infeksi dan manifestasi penyakit dari CVA24 belum pernah dilaporkan di Indonesia. Walaupun, hal tersebut kemungkinan disebabkan tidak tersedianya pemeriksaan dan penelitian mendalam terhadap kasus pendarahan konjungtivitis maupun kasus-kasus penyakit lain yang terkait dengan enterovirus di Indonesia, khususnya di Desa Antajaya.

Keberadaan serotipe enterovirus dari spesies HEV-C di Desa Antajaya tersebut dapat menciptakan peluang rekombinasi dengan poliovirus galur OPV sehingga menghasilkan VDPV yang berpotensi menimbulkan wabah poliomielitis. Penelitian mengenai wabah poliomielitis akibat VDPV di berbagai negara telah menunjukkan adanya rekombinasi antara poliovirus galur OPV dan poliovirus galur liar maupun enterovirus dari HEV-C. Rakoto-Andrianarivelo *dkk.* (2005: 242) melaporkan sirkulasi enterovirus dari spesies HEV-C (CVA13, CVA15, CVA17, CVA18, CVA20, CVA21, dan CVA24) dalam frekuensi tinggi sejak tahun 1994 hingga 2002 di Madagaskar yang merupakan salah satu negara dimana wabah VDPV pernah dilaporkan pada tahun 2002. Pemeriksaan terhadap anak-anak balita sehat di daerah sekitar wabah VDPV di Madagaskar pada tahun 2002 mengungkapkan prevalensi enterovirus dari spesies HEV-C sebesar 79,68% (51 dari 64 isolat positif)

dengan serotipe yang terdeteksi dan teridentifikasi adalah CVA11, CVA13, CVA17, CVA20, dan CVA24 (Rakoto-Andrianarivelo *dkk.* 2007: 1954). Penelitian lebih lanjut mengenai wabah poliomielitis akibat VDPV di Pulau Madura pada tahun 2005 melaporkan keberadaan rekombinasi antara poliovirus dan enterovirus dari spesies HEV-C dari semua isolat VDPV yang terkait dengan wabah tersebut. Arita *dkk.* (2005: 12656) menyimpulkan bahwa prevalensi tinggi dari HEV-C dapat menjadi faktor penting terhadap kemunculan dan evolusi dari VDPV, selain juga kondisi iklim tropis dan sanitasi buruk yang mendukung terjadinya rekombinasi di antara serotipe enterovirus (Rakoto-Andrianarivelo *dkk.* 2007: 1958).

Menurut Brown *dkk.* (2003: 8974), genom serotipe poliovirus memiliki perbedaan tinggi dengan serotipe spesies HEV-C lainnya hanya pada daerah sekuen pengkode kapsid. Hal tersebut memungkinkan terjadinya rekombinasi antara poliovirus dan serotipe spesies HEV-C lainnya pada daerah sekuen pengkode nonkapsid. Salah satu serotipe yang ditemukan dalam penelitian, yaitu CVA20 merupakan serotipe dari spesies HEV-C yang berkerabat dekat dengan poliovirus (Brown *dkk.* 2003: 8973). Pohon filogenetik yang direkonstruksi berdasarkan sekuen parsial VP1 dari sampel penelitian dan galur referensi dari spesies HEV-C juga memperlihatkan kekerabatan yang dekat antara poliovirus dan CVA20 dibandingkan dengan serotipe CVA24 dan CVA1 dalam penelitian (Gambar 17). Jiang *dkk.* (2007: 9457) bahkan telah membuktikan bahwa rekombinasi antara poliovirus dan CVA20 secara *in vitro* maupun *in vivo* menghasilkan virus rekombinan yang

memiliki fenotipe seperti cVDPV. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, Jiang *dkk.* (2007: 9462) juga menyatakan bahwa enterovirus nonpolio dari spesies HEV-C dapat menjadi reservoir bagi kemunculan agen etiologi baru penyebab poliomielitis melalui mutasi dan rekombinasi.

### 3. Eradikasi poliomielitis

Imunisasi OPV secara massal dan rutin sejak tahun 1988 telah mencegah kemunculan kasus poliomielitis di seluruh dunia. Upaya eradikasi poliomielitis di Indonesia dilakukan dengan menggunakan OPV sebagai vaksin utama dalam berbagai program imunisasi. Melalui strategi imunisasi dengan OPV tersebut, poliovirus liar endemik di Indonesia belum pernah dilaporkan lagi sejak tahun 1996 (Dirjen PP & PL 2005: 5--6).

*Oral poliovirus vaccine* (OPV) menjadi pilihan bagi Indonesia karena cakupan yang luas, berkaitan dengan kemudahan penggunaannya serta biaya produksi yang jauh lebih murah dibandingkan dengan IPV. Namun, perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut untuk tetap menggunakan OPV karena OPV dapat menjadi sumber utama kemunculan berbagai turunan poliovirus setelah poliovirus liar dieradikasi di Indonesia (Minor 2004: 478). Wabah poliomielitis akibat VDPV di Pulau Madura, serta prevalensi HEV-C yang relatif tinggi dalam penelitian dapat menjadi salah satu dasar pertimbangan untuk menggunakan IPV di Indonesia.