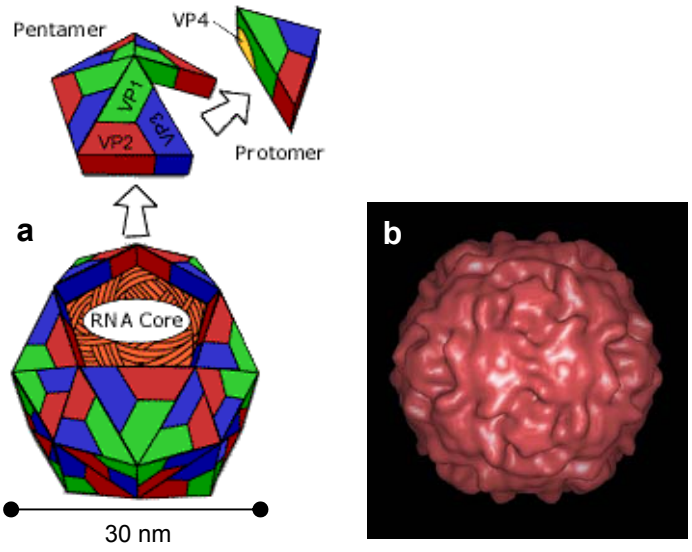
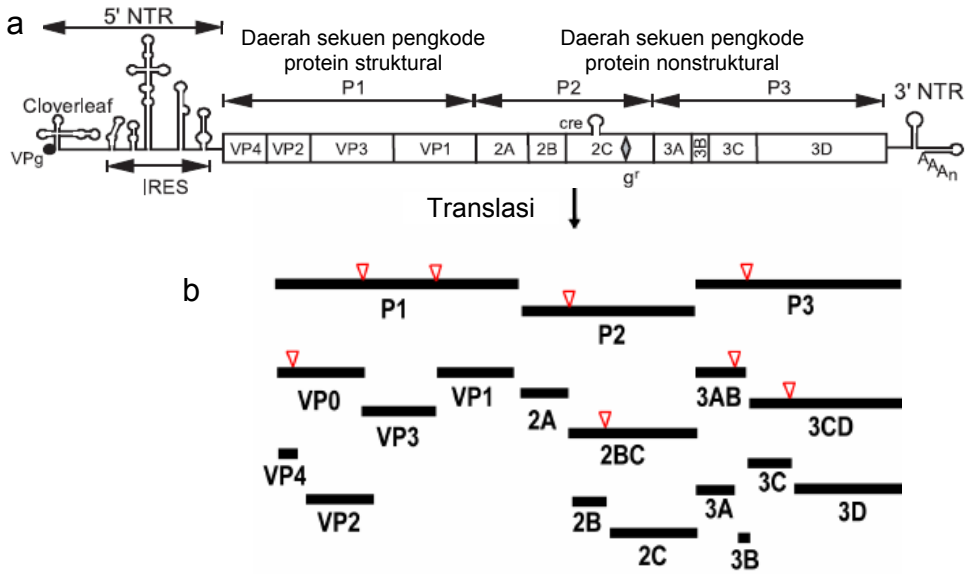
LAMPIRAN



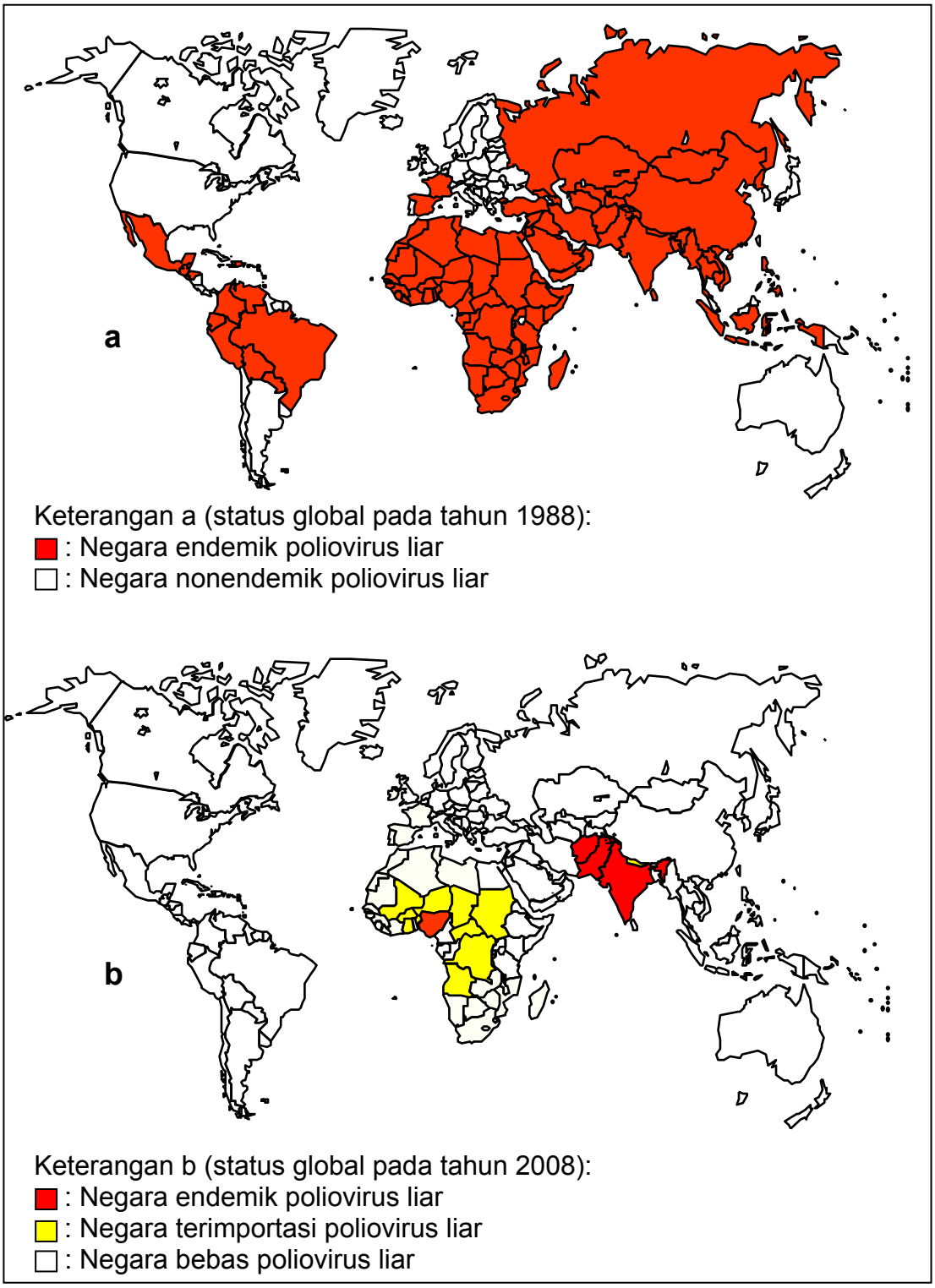
Keterangan:
a. Skema struktur kapsid enterovirus
b. Struktur tiga dimensi poliovirus sebagai model genus *Enterovirus*

Gambar 1. Representasi struktur enterovirus
[Sumber: Airaksinen 2000: 11; Belnap *dkk*. 2000: 75.]

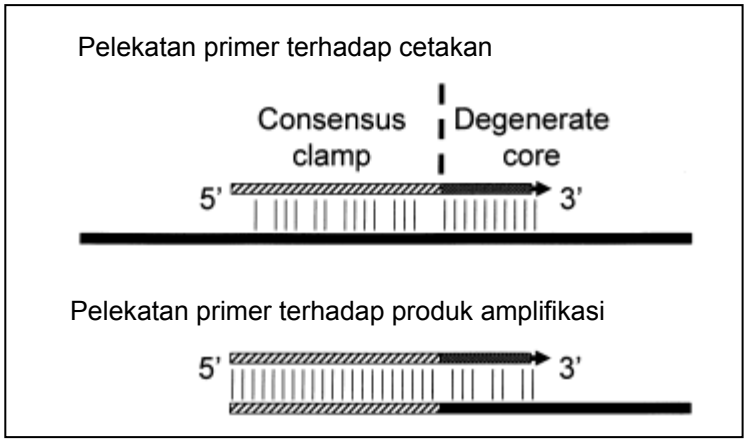


Keterangan:
a. Organisasi genom enterovirus
b. Pemrosesan poliprotein dengan situs pemotongan oleh protease virus (segitiga)

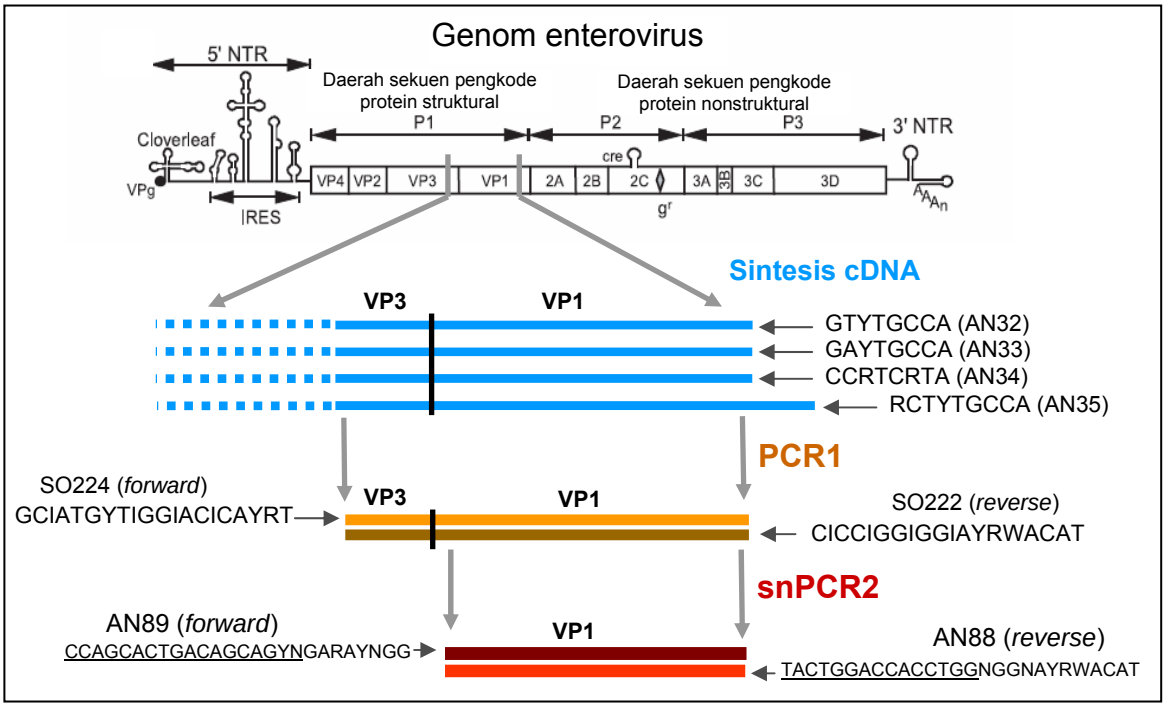
Gambar 2. Genom enterovirus [Sumber: Vogt 2007: 6.]



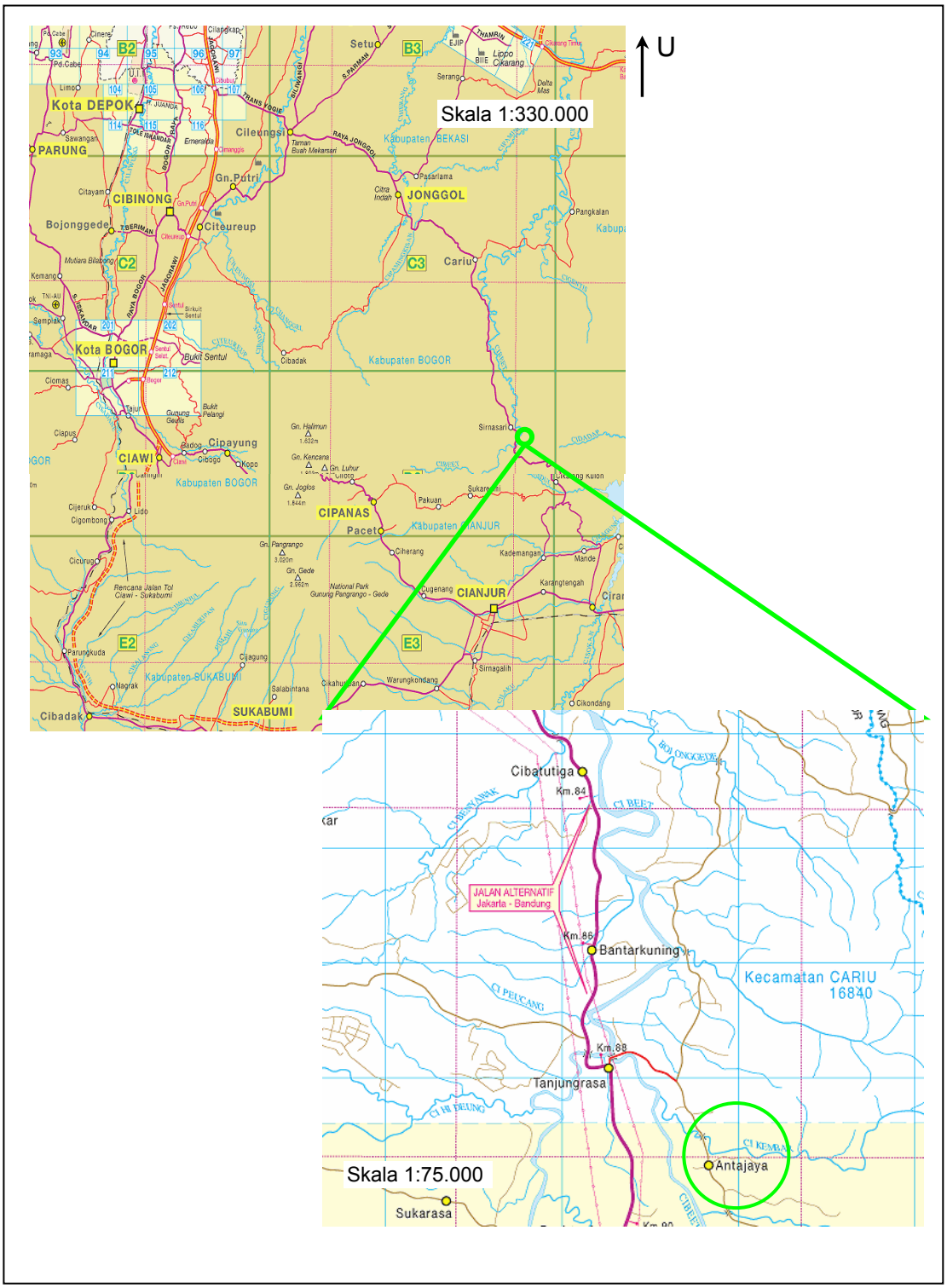
Gambar 3. Negara-negara dengan transmisi poliovirus liar
[Sumber: WHO 2008c: 1.]



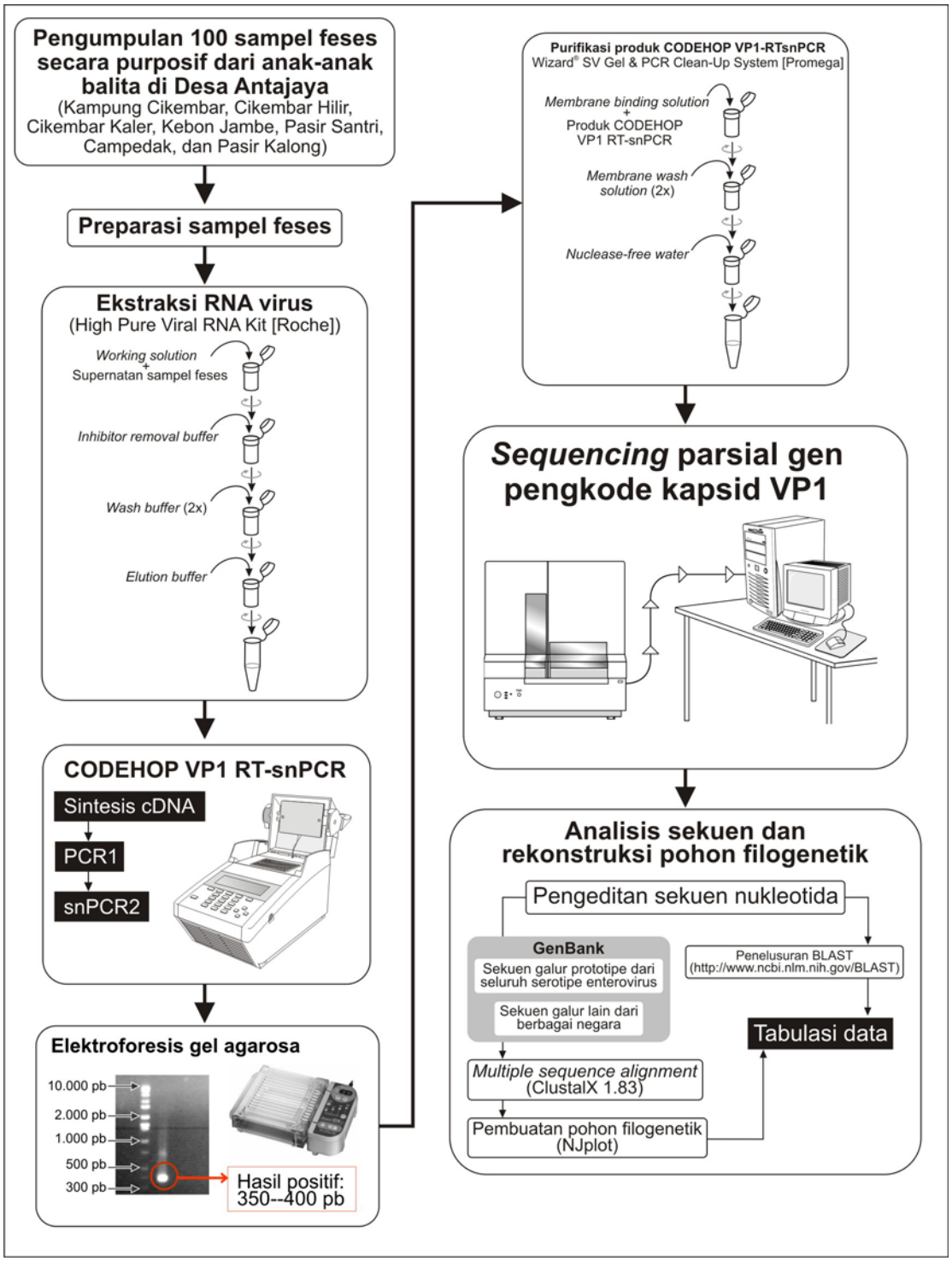
Gambar 4. Pelekatan primer CODEHOP
[Sumber: Rose *dkk*. 2003: 3764.]



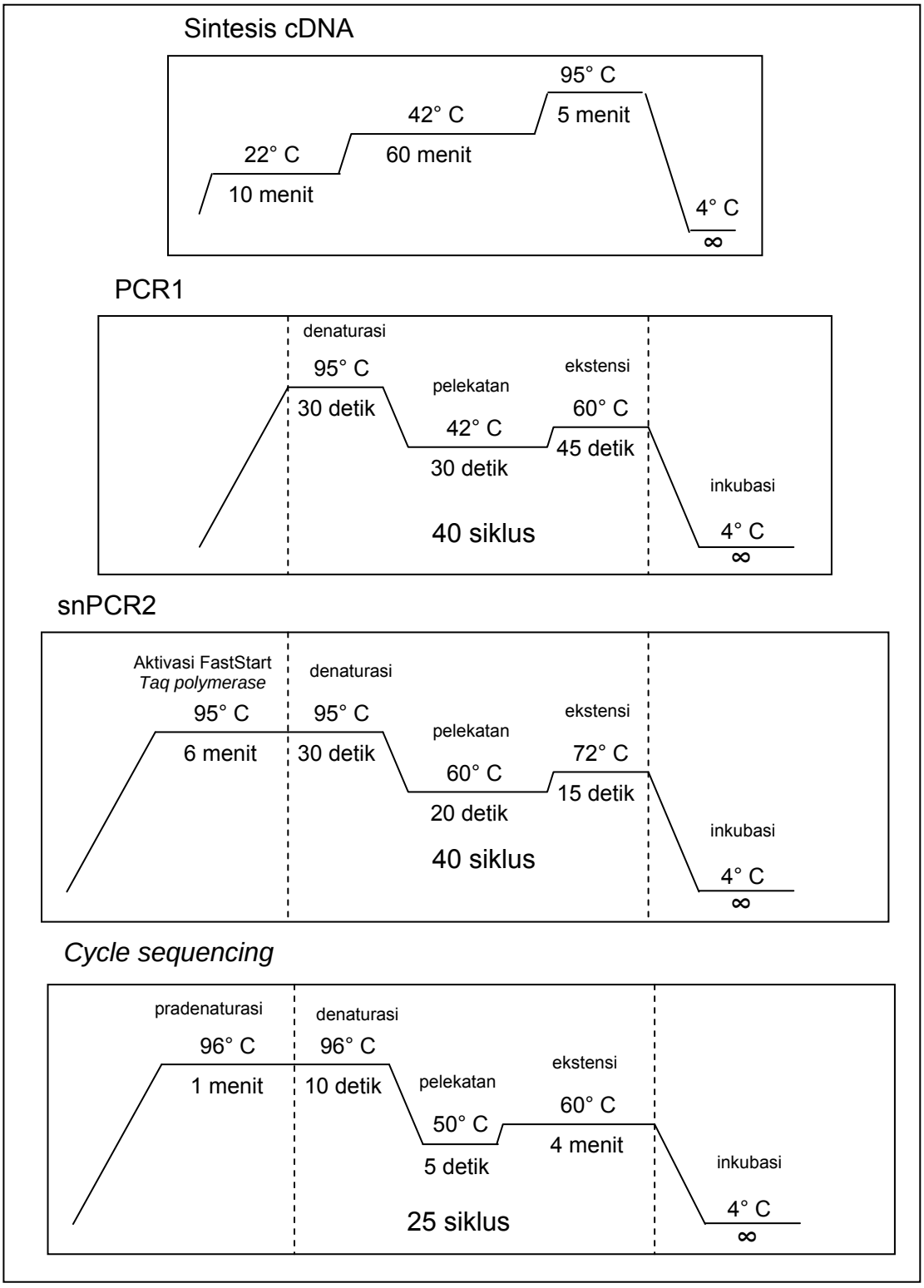
Gambar 5. Representasi skematik lokasi primer-primer yang digunakan dalam CODEHOP VP1 RT-snPCR [Sumber: Nix *dkk*. 2006: 2701.]



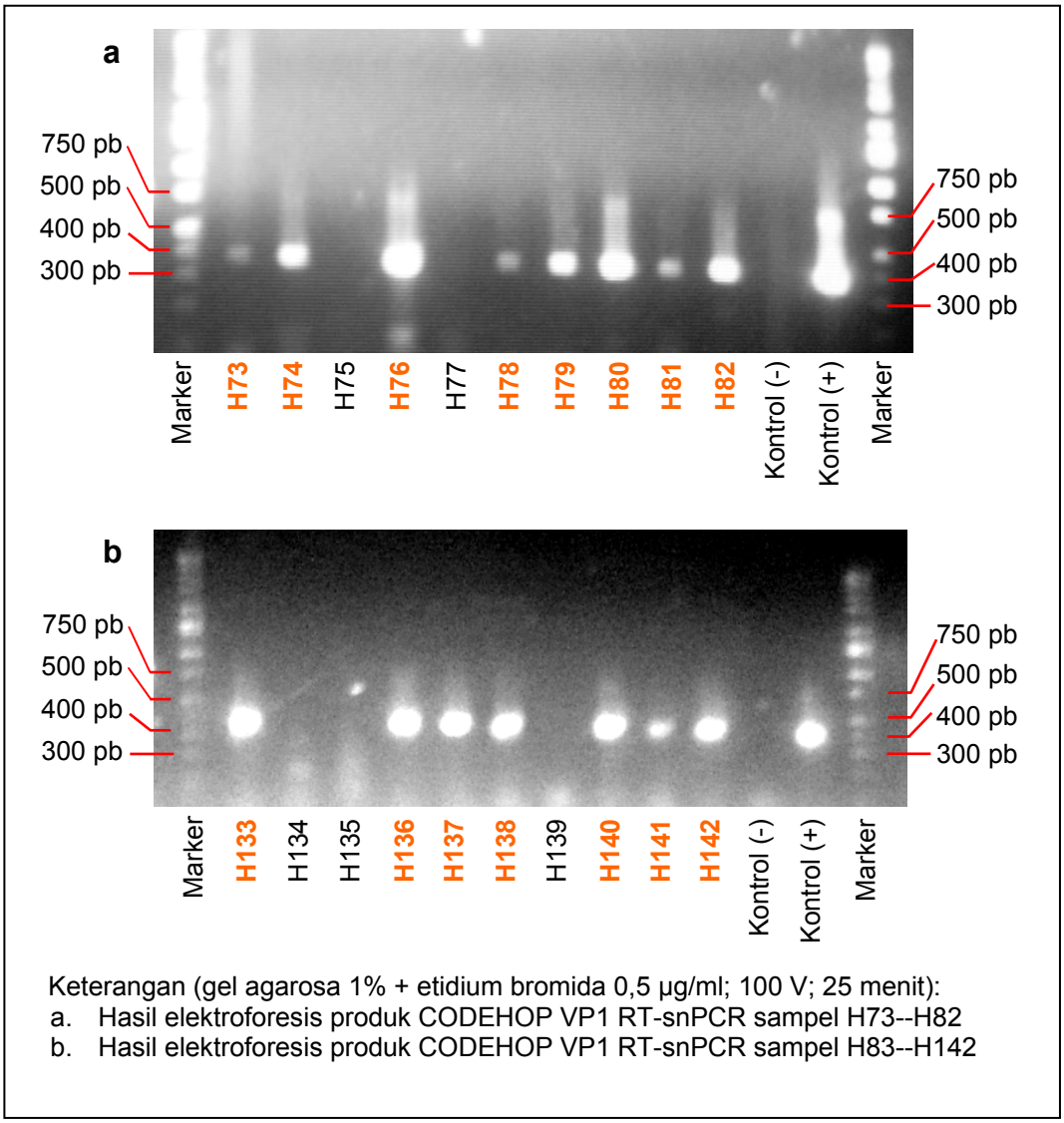
Gambar 6. Peta lokasi Desa Antajaya, Kecamatan Tanjungsari, Kabupaten Bogor, Provinsi Jawa Barat [Holtrof 2005: D3.]



Gambar 7. Skema cara kerja penelitian

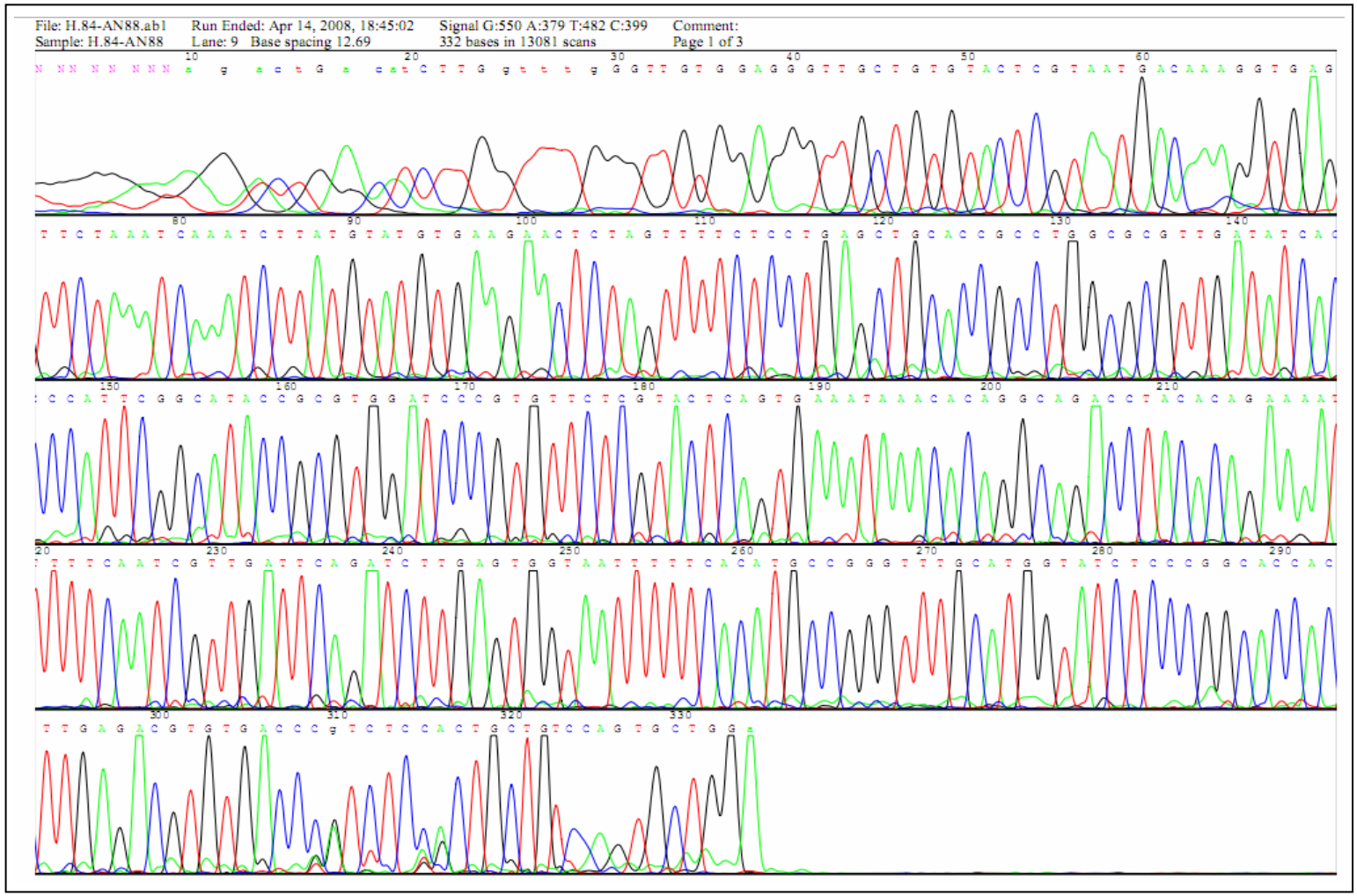


Gambar 8. Kondisi masing-masing tahapan pada CODEHOP VP1 RT-snPCR dan *cycle sequencing* [Sumber: Nix *dkk*. 2006: 2699.]

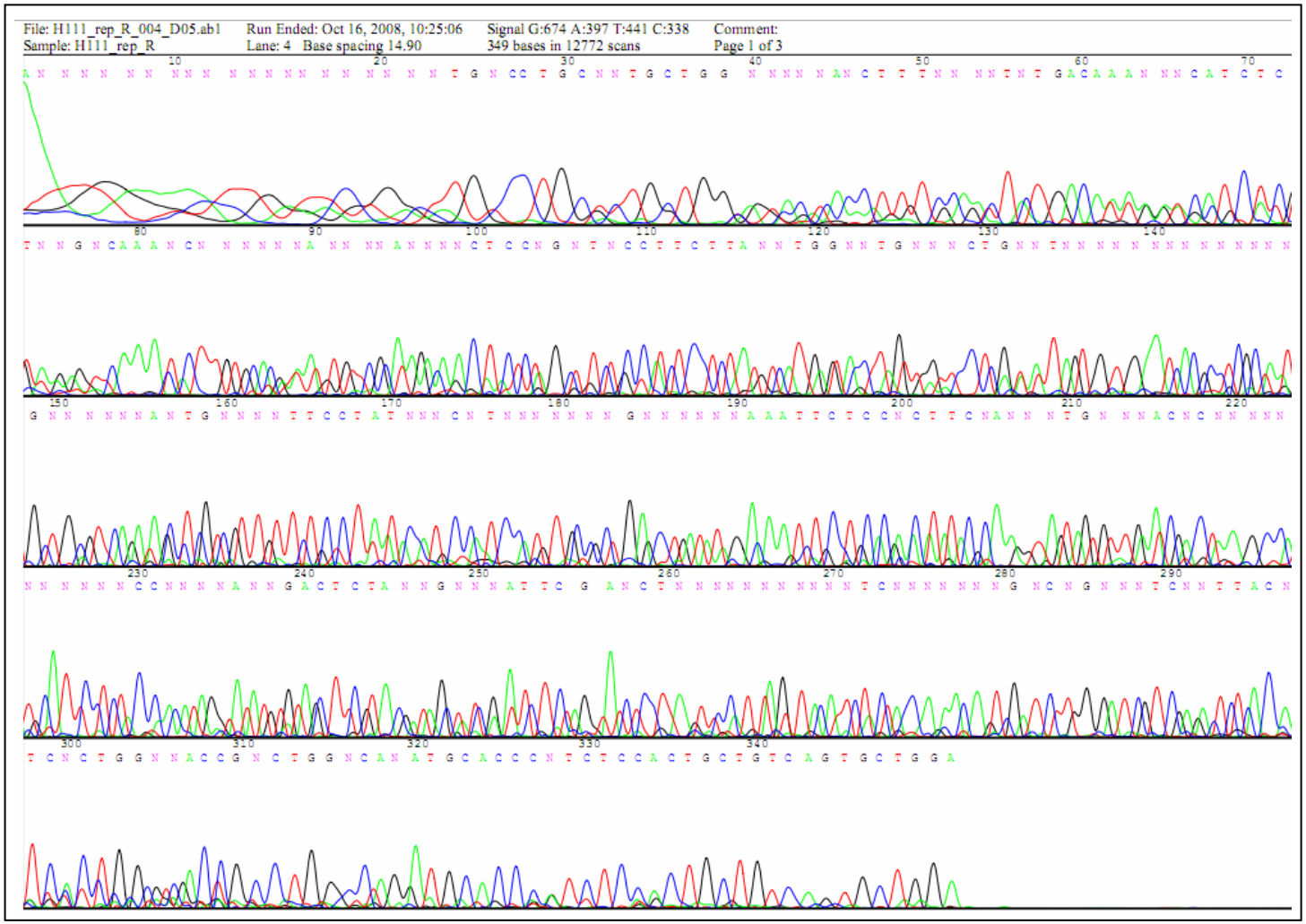


Keterangan (gel agarosa 1% + etidium bromida 0,5 µg/ml; 100 V; 25 menit):
a. Hasil elektroforesis produk CODEHOP VP1 RT-snPCR sampel H73--H82
b. Hasil elektroforesis produk CODEHOP VP1 RT-snPCR sampel H83--H142

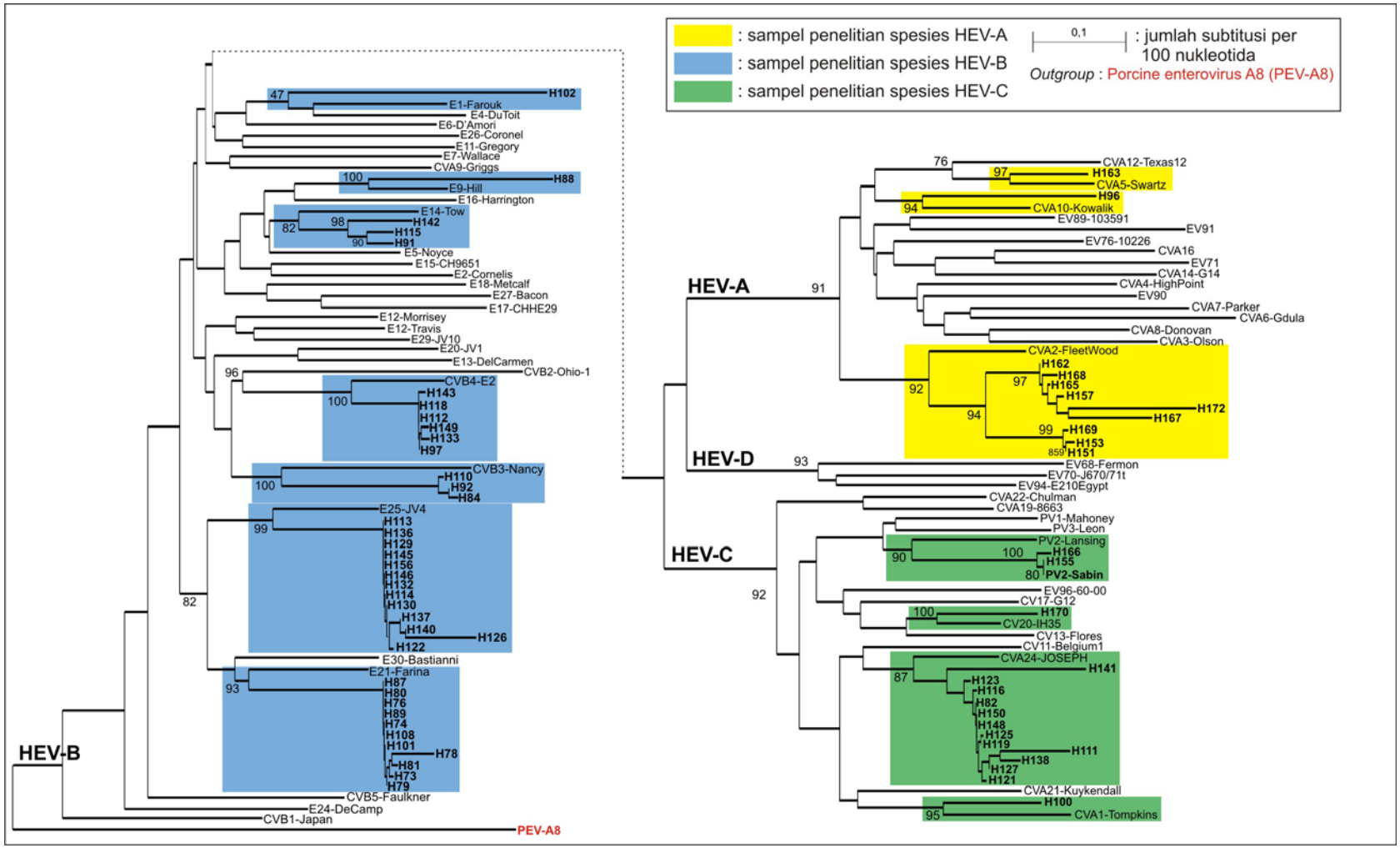
Gambar 9. Representasi hasil elektroforesis gel agarosa dari produk CODEHOP VP1 RT-snPCR



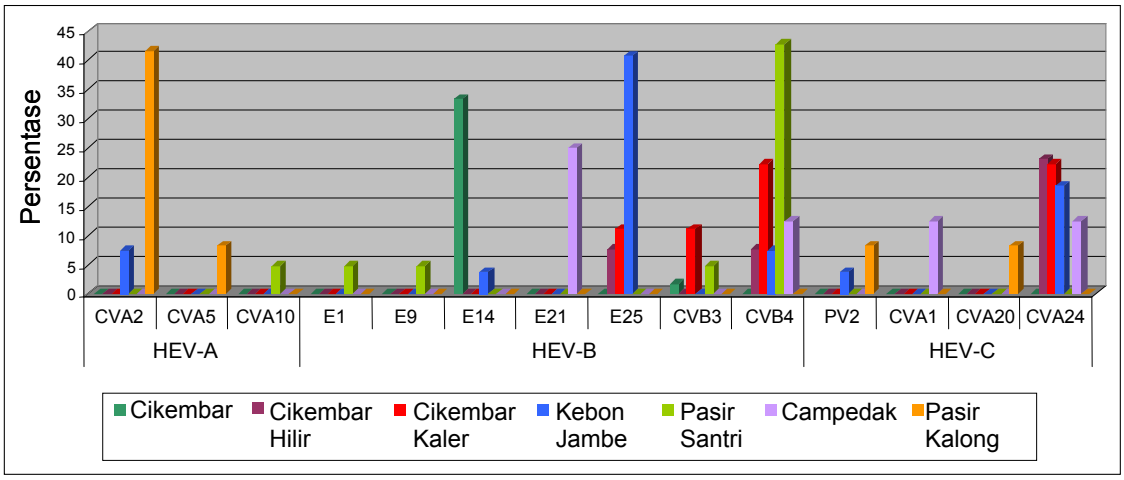
Gambar 10. Elektroferogram hasil *sequencing* sampel H84 dengan primer *reverse* AN88



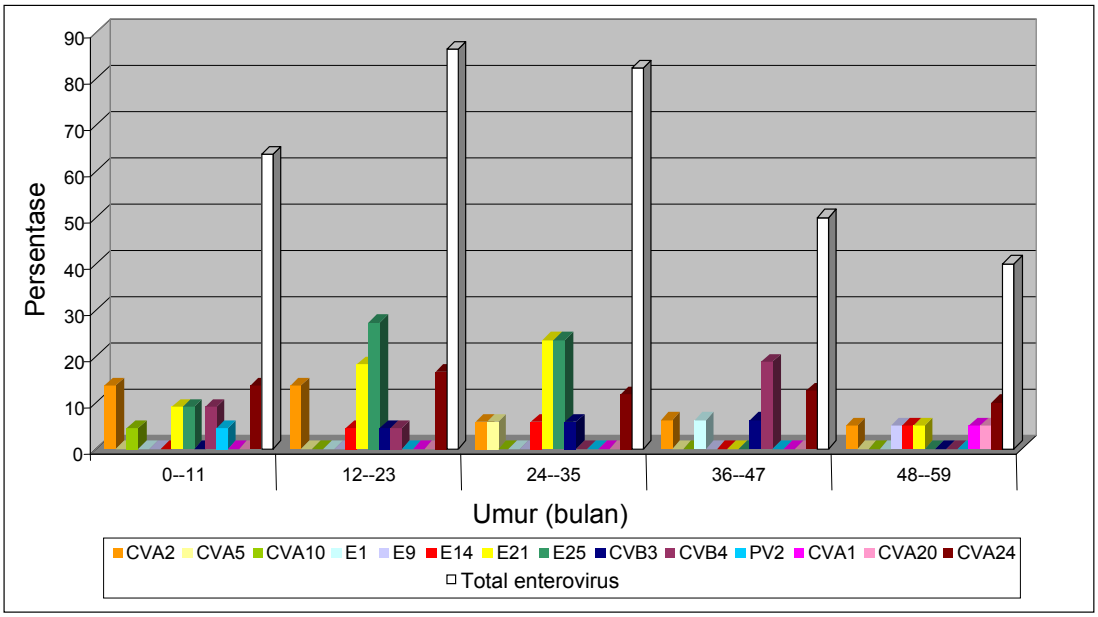
Gambar 11. Elektroferogram hasil *sequencing* sampel H111 dengan primer *reverse* AN88



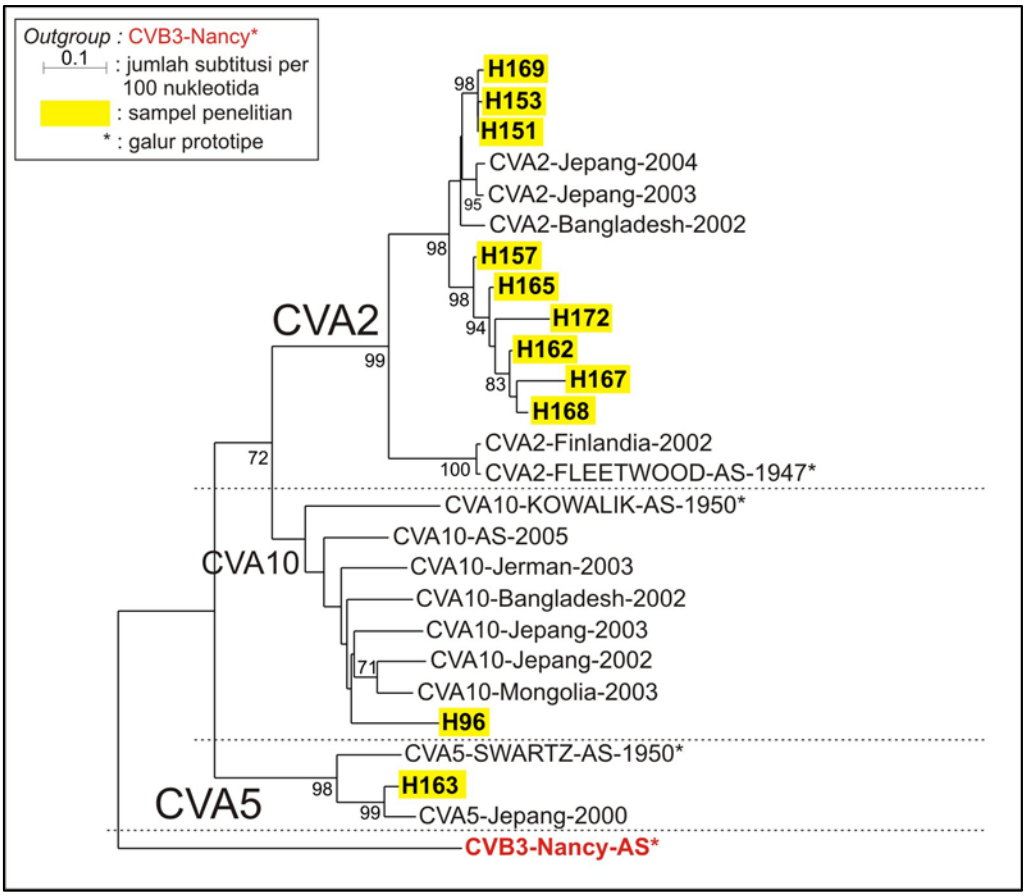
Gambar 12. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen parsial VP1 dari sampel penelitian dan semua galur prototipe dari 85 serotipe enterovirus dengan metode *neighbor-joining* (NJ), parameter Kimura-2, dan uji *bootstrap* 1.000 kali



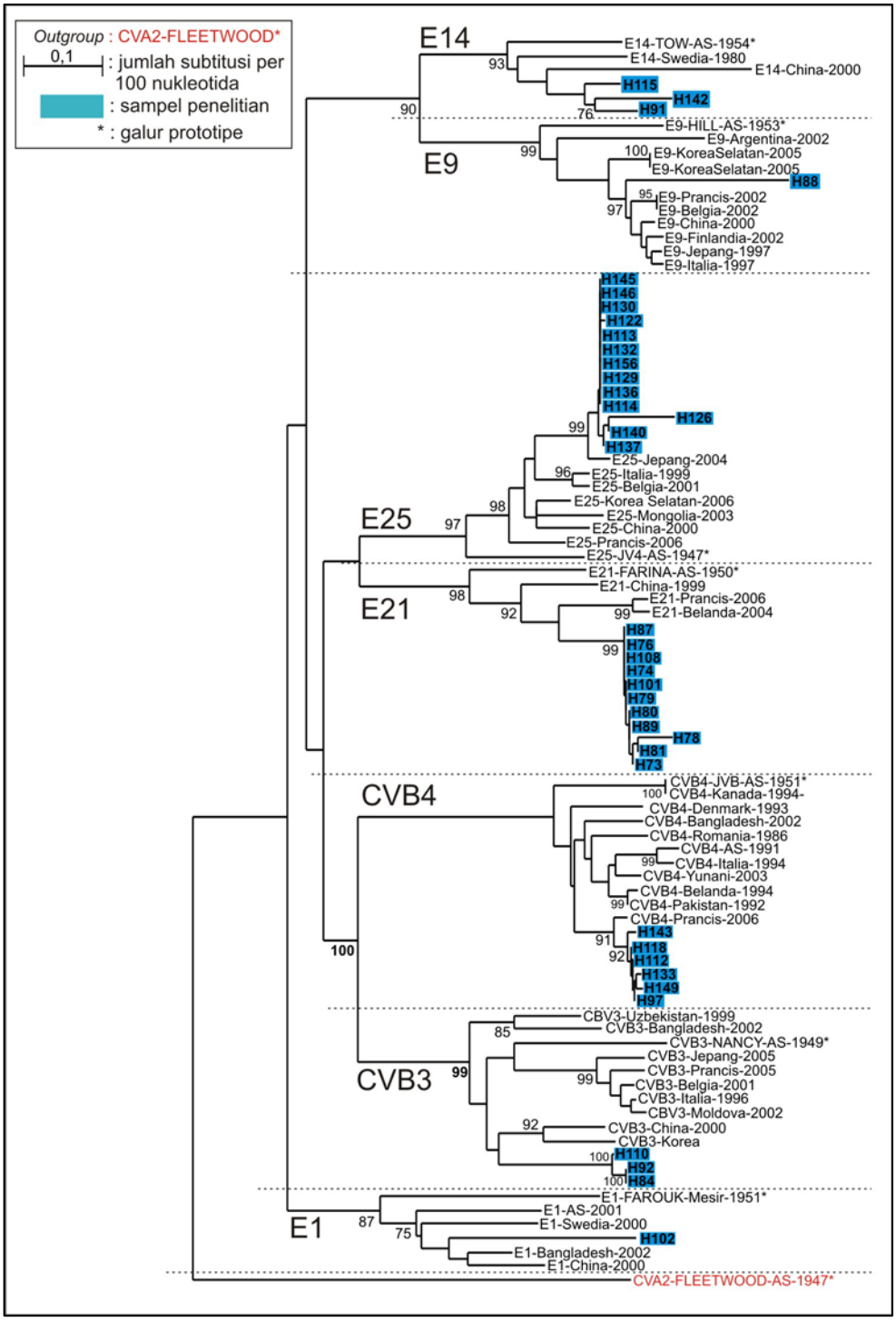
Gambar 13. Prevalensi serotipe enterovirus dari anak-anak balita di Desa Antajaya berdasarkan lokasi pengumpulan sampel



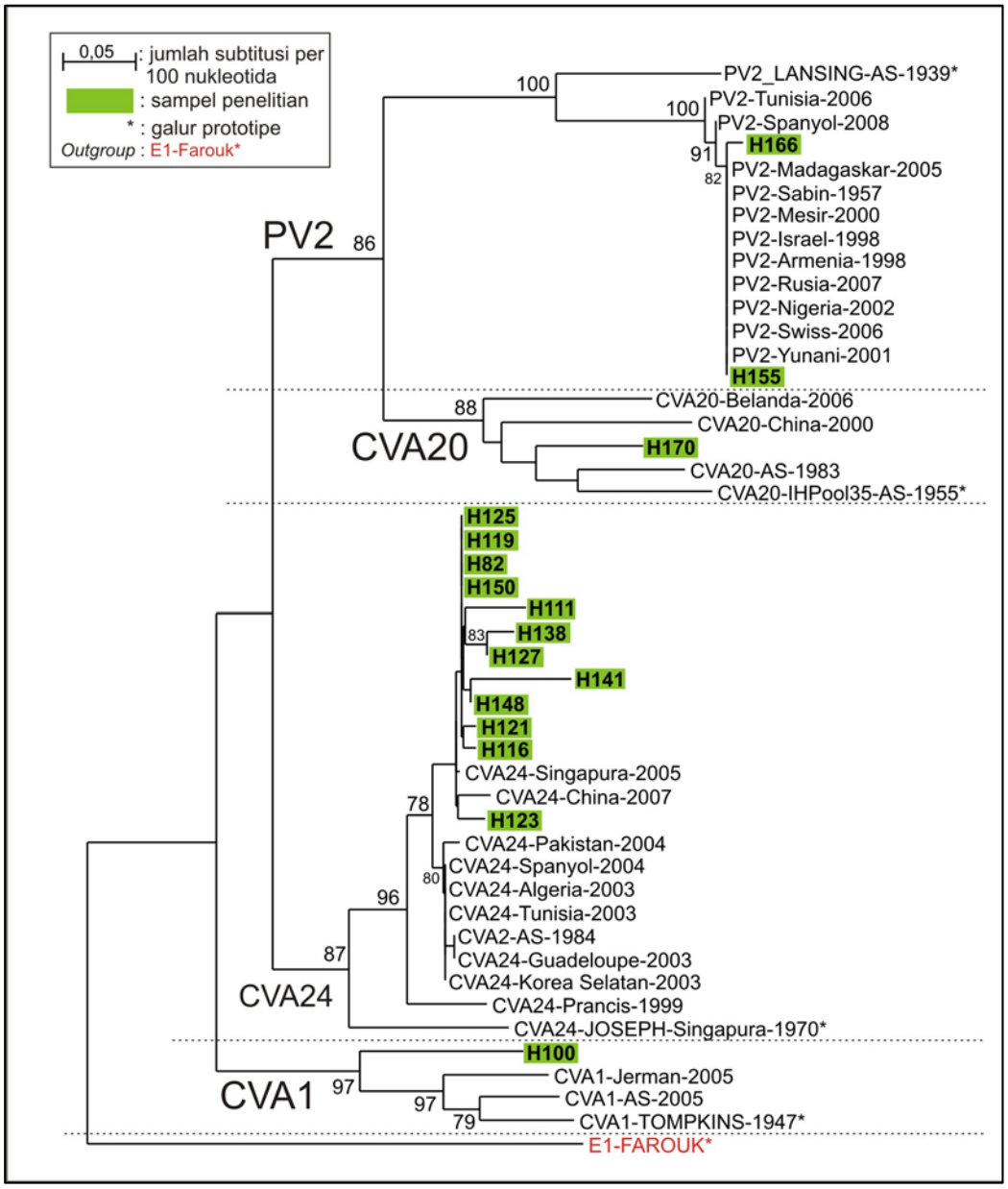
Gambar 14. Prevalensi serotipe enterovirus dari anak-anak balita di Desa Antajaya berdasarkan kelompok umur



Gambar 15. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen parsial VP1 spesies HEV-A sampel penelitian dan sekuen referensi dari beberapa negara yang diperoleh melalui GenBank. Pohon filogenetik direkonstruksi dengan metode *neighbor-joining* (NJ), parameter Kimura-2, dan uji *bootstrap* 1.000 kali



Gambar 16. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen parsial VP1 spesies HEV-B sampel penelitian dan sekuen referensi dari beberapa negara yang diperoleh melalui GenBank. Pohon filogenetik direkonstruksi dengan metode *neighbor-joining* (NJ), parameter Kimura-2, dan uji *bootstrap* 1.000 kali



Gambar 17. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen parsial VP1 spesies HEV-C sampel penelitian dan sekuen referensi dari beberapa negara yang diperoleh melalui GenBank. Pohon filogenetik direkonstruksi dengan metode *neighbor-joining* (NJ), parameter Kimura-2, dan uji *bootstrap* 1.000 kali

TABEL

Tabel 1

Karakteristik demografi anak-anak balita partisipan di tujuh kampung di Desa Antajaya

Kampung	Jumlah anak-anak balita	Jenis Kelamin		Umur (bulan)					
		Perempuan	Laki-laki	0--11	12--23	24--35	36--47	48--59	Tanpa data
Cikembar	6	4	2	0	1	2	1	2	0
Cikembar Hilir	13	3	10	3	1	3	2	4	0
Cikembar Kaler	9	3	6	2	3	2	0	2	0
Kebon Jambe	27	13	14	5	7	5	4	3	3
Pasir Santri	21	10	11	3	3	3	6	5	0
Campedak	8	6	2	0	4	1	2	1	0
Pasir Kalong	12	7	5	1	5	1	1	4	0
Tanpa data	4	2	2	1	2	1	0	0	0
Total	100	48	52	16	26	18	16	21	3

Tabel 2

Prevalensi serotipe enterovirus yang terdeteksi dan teridentifikasi dari anak-anak balita di Desa Antajaya

Spesies	**Serotipe**	∑	**Prevalensi serotipe dari jumlah sampel positif**	**Prevalensi spesies dari jumlah sampel positif**
HEV-A	CVA2	9	13,84%	16,92%
	CVA5	1	1,54%	
	CVA10	1	1,54%	
HEV-B	E1	1	1,54%	58,46%
	E9	1	1,54%	
	E14	3	4,62%	
	E21	11	16,92%	
	E25	13	20,00%	
	CVB3	3	4,62%	
	CVB4	6	9,23%	
HEV-C	PV2	2	3,08%	24,62%
	CVA1	1	1,54%	
	CVA20	1	1,54%	
	CVA24	12	18,46%	
Total		65	100%	65

Tabel 3

Prevalensi serotipe enterovirus dari anak-anak balita di Desa Antajaya berdasarkan lokasi pengumpulan sampel

Spesies	Serotipe	Kampung																	
		Cikembar (6 sampel)		Cikembar Hilir (13 sampel)		Cikembar Kaler (9 sampel)		Kebon Jambe (27 sampel)		Pasir Santri (21 sampel)		Campedak (8 sampel)		Pasir Kalong (12 sampel)		Tanpa data (4 sampel)		Total (100 sampel)	
		∑	(%)	∑	(%)	∑	(%)	∑	(%)	∑	(%)	∑	(%)	∑	(%)	∑	(%)	∑	(%)
HEV-A	CVA2	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2	(7,41)	0	(0)	0	(0)	5	(41,67)	2	(50)	9	(9)
	CVA5	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(8,3)	0	(0)	1	(1)
	CVA10	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(4,76)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1)
HEV-B	E1	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(4,76)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1)
	E9	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(4,76)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1)
	E14	2	(33,33)	0	(0)	0	(0)	1	(3,7)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	3	(3)
	E21	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	9	(42,86)	2	(25)	0	(0)	0	(0)	11	(11)
	E25	0	(0)	1	(7,69)	1	(11,11)	11	(40,74)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	13	(13)
HEV-C	CVB3	1	(1,67)	0	(0)	1	(11,11)	0	(0)	1	(4,76)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	3	(3)
	CVB4	0	(0)	1	(7,69)	2	(22,22)	2	(7,41)	0	(0)	1	(12,5)	0	(0)	0	(0)	6	(7)
	PV2	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(3,7)	0	(0)	0	(0)	1	(8,3)	0	(0)	2	(2)
	CVA1	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(12,5)	0	(0)	0	(0)	1	(1)
	CVA20	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(8,3)	0	(0)	1	(1)
	CVA24	0	(0)	3	(23,08)	2	(22,22)	5	(18,51)	0	(0)	1	(12,5)	0	(0)	1	(25)	12	(11)
Total anak-anak balita terinfeksi		3	(50)	5	(38,46)	6	(66,67)	22	(81,48)	13	(61,9)	5	(62,5)	8	(66,67)	3	(75)	65	(65)

Tabel 4

Prevalensi serotipe enterovirus dari anak-anak balita di Desa Antajaya berdasarkan kelompok umur

Spesies	Serotipe	Umur (bulan)													
		0--11 (22 sampel)		12--23 (22 sampel)		24--35 (17 sampel)		36--47 (16 sampel)		48--59 (20 sampel)		Tanpa data (3 sampel)		Total (100 sampel)	
		∑	%	∑	%	∑	%	∑	%	∑	%	∑	%	∑	%
HEV-A	CVA2	3	(13,63)	3	(13,63)	1	(5,88)	1	(6,25)	1	(5)	0	(0)	9	(9)
	CVA5	0	(0)	0	(0)	1	(5,88)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1)
	CVA10	1	(4,54)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1)
HEV-B	E1	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(6,25)	0	(0)	0	(0)	1	(1)
	E9	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(5)	0	(0)	1	(1)
	E14	0	(0)	1	(4,54)	1	(5,88)	0	(0)	1	(5)	0	(0)	3	(3)
	E21	2	(9,09)	4	(18,18)	4	(23,52)	0	(0)	1	(5)	0	(0)	11	(11)
	E25	2	(9,09)	6	(27,27)	4	(23,52)	0	(0)	0	(0)	1	(33,3)	13	(13)
	CVB3	0	(0)	1	(4,54)	1	(5,88)	1	(6,25)	0	(0)	0	(0)	3	(3)
	CVB4	2	(9,09)	1	(4,54)	0	(0)	3	(18,75)	0	(0)	0	(0)	6	(6)
HEV-C	PV2	1	(4,54)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(33,3)	2	(2)
	CVA1	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(5)	0	(0)	1	(1)
	CVA20	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(5)	0	(0)	1	(1)
	CVA24	3	(13,63)	3	(16,63)	2	(11,76)	2	(12,5)	2	(10)	0	(0)	12	(12)
Total anak-anak balita terinfeksi		14	(63,63)	19	(86,36)	14	(82,35)	8	(50)	8	(40)	2	(66,7)	65	(65)

Tabel 5

Prevalensi serotipe enterovirus dari anak-anak balita di Desa Antajaya berdasarkan jenis kelamin

Spesies	Serotipe	Jenis kelamin					
		Perempuan (48 sampel)		Laki-laki (52 sampel)		Total (100 sampel)	
		∑	%	∑	%	∑	%
HEV-A	CVA2	4	(8,33)	5	(9,62)	9	(9)
	CVA5	1	(2,08)	0	(0)	1	(1)
	CVA10	0	(0)	1	(1,92)	1	(1)
HEV-B	E1	1	(2,08)	0	(0)	1	(1)
	E9	0	(0)	1	(1,92)	1	(1)
	E14	2	(4,17)	1	(1,92)	3	(3)
	E21	6	(12,5)	5	(9,62)	11	(11)
	E25	7	(14,58)	6	(11,54)	13	(13)
	CVB3	2	(4,17)	1	(1,92)	3	(3)
	CVB4	4	(6,25)	2	(3,85)	6	(7)
HEV-C	PV2	0	(0)	2	(3,85)	2	(2)
	CVA1	1	(2,08)	0	(0)	1	(1)
	CVA20	1	(2,08)	0	(0)	1	(1)
	CVA24	4	(6,25)	8	(15,38)	12	(11)
Total anak-anak balita terinfeksi		33	(68,75)	32	(61,54)	65	(65)

Tabel 6

Hasil identifikasi sampel positif berdasarkan penelusuran BLAST dan analisis pohon

	BLAST	Analisis pohon	
	S[illegible]	Se	Pe
	E	E	9
	E	E	9
	E	E	9
	E	E	9
	E	E	9
	E	E	9
	E	E	9
	C	C	8
	C	C	1
	E	E	9
	E	E	1
	E	E	9
	E	E	8
	C	C	1
	C	C	9
	C	C	1
	C	C	9
	E	E	9
	E	E	4
	E	E	9
	C	C	1
	C	C	8
	C	C	1
	E	E	9
	E	E	9
	E	E	8

Tabel 6 (lanjutan)

| | | |

			filogenetik	
	CVA24		CVA24	87
	CVB4		CVB4	100

		CVA24		CVA24	87
		CVA24		CVA24	87
		E25		E25	99

		CVA24	CVA24	87
	CVA24		CVA24	87
		E25	E25	99

		CVA24		CVA24	87
		E25		E25	99
		E25		E25	99

		E25		E25	99
		CVB4		CVE4	100
		E2		E2	99

		5		5	
		E25		E25	99
		CVA24		CVA24	87
		E		E	9

		25		25	9
		CVA24		CVA24	87
		E14		E14	82

	CVB4		CVB4	100
	E25		E25	99
	E25		E25	99

	CVA24	CVA24	87
	CVB4	CVB4	100
	CVA24	CVA24	87

	CVA2	CVA2	92
	CVA2	CVA2	92
	PV2	PV2	90

			E25			E25	99	

Tabel 6 (lanjutan)

No	No sampel	Panjang Sekuen (pb)	BLAST				Analisis pohon filogenetik	
			Serotipe hasil BLAST	Skor	*E-value*	Persentase identitas	Serotipe hasil analisis pohon filogenetik	Persentase *bootstrap* (%)
56	H157	354	CVA2	491	7×10^{-136}	(309/331) 93	CVA2	92
57	H162	346	CVA2	419	4×10^{-114}	(281/311) 90	CVA2	92
58	H163	352	CVA5	426	2×10^{-116}	(280/308) 90	CVA5	94
59	H165	354	CVA2	444	9×10^{-122}	(299/332) 90	CVA2	92
60	H166	368	PV2	580	2×10^{-162}	(340/353) 96	PV2	90
61	H167	359	CVA2	288	2×10^{-74}	(237/282) 84	CVA2	92
62	H168	347	CVA2	394	1×10^{-106}	(286/326) 87	CVA2	92
63	H169	353	CVA2	466	3×10^{-128}	(302/330) 91	CVA2	92
64	H170	380	CVA20	324	2×10^{-85}	(300/380) 78	CVA20	100

65	H172	353	CVA2	370	2×10^{-99}	(278/324) 85	CVA2	92

LAMPIRAN

Lampiran 1

Klasifikasi enterovirus (genus *Enterovirus*, famili *Picornaviridae*)

Spesies[a]	Serotipe[a]
Human enterovirus A (HEV-A)	coxsackievirus A (CVA) 2--8, CVA10, CVA12, CVA14, CVA16, enterovirus (EV) 71, EV76, dan EV89--91
Human enterovirus B (HEV-B)	coxsackievirus B (CVB) 1--6, echovirus (E) 1--9, E11--21, E24--27, E29--33, CVA9, EV69, EV73--75, EV77--88, EV97, EV100 dan EV101
Human enterovirus C (HEV-C)	EV96, CVA1, CVA11, CVA13, CVA15, CVA17, CVA19, CVA20--22, CVA24, dan poliovirus (PV) 1--3
Human enterovirus D (HEV-D)	EV68 dan EV70
Bovine enterovirus (BEV)	BEV1 dan BEV2
Porcine enterovirus A (PEV-A)	PEV-A8
Porcine enterovirus B (PEV-B)	PEV-B9 dan PEV-B10
Simian enterovirus A (SEV-A)	SEV-A1

[a]Nama takson enterovirus (famili, genus, dan spesies) jika digunakan secara formal ditulis dengan huruf miring dan huruf awal pada nama dengan huruf kapital. Nama tentatif, nama alternatif (sinonim), isolat, galur, serotipe, dan subspesies tidak ditulis dengan huruf miring. Nama takson jika mengalami penyingkatan ditulis dengan huruf kapital dan tidak ditulis dengan huruf miring.
[Sumber: Pallansch & Roos 2006: 840, 864--866; ICTVdB Management 2006: 1.]

Lampiran 2

Beberapa penyakit dan gejala klinis pada infeksi enterovirus

Penyakit	Serotipe yang berimplikasi	Gejala klinis
Nonspecific febrile illness	Semua serotipe	*Febrile illness* dengan gejala nonspesifik pada saluran pernapasan atas dan saluran gastrointestinal
Meningitis aseptik	PV, CBV, CAV, ECV	Sakit kepala, anoreksia, batuk, muntah, faringitis, diare, dan fotopobia
Herpangina	CAV, CBV, ECV	Demam; vesikula pada oral atau tonsil, dan posterior faring
Penyakit tangan-kaki-mulut	CAV16	Demam; vesikula pada mukosa oral, lidah, dan permukaan jari tangan dan kaki
Eksantem	CAV, CBV	Ruam-ruam dengan atau tanpa demam
Pleurodinia	CBV3 dan CBV5	Demam; rasa sakit pada otot dada dan perut
Infeksi kardiak	CBV	Perikarditis yang dapat mengakibatkan gagal jantung atau disritmia
Pendarahan konjungtivitis	EV70 dan CVA24	Pembengkakan kelopak mata dan rasa sakit pada mata tanpa gejala sistemik
Poliomielitis	PV1--3, EV70--71, CAV7	Radang tenggorokan, demam, mual, muntah, sakit perut, konstipasi, dan lumpuh layu

[Sumber: Muir *dkk*. 1998: 203; Zaoutis & Klein 1998: 185.]

Lampiran 3

Komponen dan komposisi kit yang digunakan dalam penelitian

Nama kit	Komponen kit	Komposisi
High Pure Viral RNA kit [Roche]	*Binding buffer*	Guanidin -HCl 4,5 M; Tris-HCl 50 mM; 30% Triton® X-100; dengan pH 6,6 (25° C)
	Poli(A)	*Poly*(A)-*carrier* RNA 2 mg
	Inhibitor removal buffer	Guanidin-HCl 5 M; Tris-HCl 2 mM; dengan pH 6,6 (25° C) pada konsentrasi final setelah penambahan etanol 95%
	Wash buffer	NaCl 20 mM; 2 mM Tris-HCl; dengan pH 7,5.
	Elution buffer	*Nuclease-free water* steril.
	Tabung filter	-
	Tabung koleksi	-
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System [Promega]	*Membrane binding solution*	Guanidin isotiosianat 4,5 M; potasium asetat 0,5 M; dengan pH 5,0
	Membrane wash solution	potasium asetat 10 M (pH 5.0); etanol 80%; 16,7 µM EDTA; dengan pH 8,0
	Wizard® SV *minicolumn*	-
	Tabung koleksi	-

[Sumber: Roche 2003: 3; Promega 2005: 11.]

Lampiran 4

Primer yang digunakan dalam CODEHOP VP1 RT-snPCR dan *sequencing*

Primer	Sekuen (5'→3')[a]	Motif asam amino	Lokasi pelekatan[c]
AN32	GTYTGCCA	WQT	3009--3002
AN33	GAYTGCCA	WQS	3009--3002
AN34	CCRTCRTA	YDG	3111--3104
AN35	RCTYTGCCA	WQS	3009--3002
SO224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	AMLGTH(I/L/M)	1977--1996
SO222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	M(F/Y)(I/V)PPG(A/G)	2969--2951
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG[b]	PALTA(A/V)E(I/T)G	2602--2627
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT[b]	M(F/Y)(I/V)PPGGPV	2977--2951

[a]Abreviasi berdasarkan Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB): G= guanin; A= adenin; C= *cytosine*; T= timin; R= purin (A/G); Y= pirimidin (T/C); W= A/T; N= G/A/T/C; I= inosin.
[b]Daerah *nondegenerate clamp* pada primer AN89 dan AN88 ditandai dengan garis bawah
[c]Semua lokasi pelekatan primer mengacu pada genom poliovirus 1 galur Mahoney [J02281]
[Sumber: Nix *dkk*. 2006: 2699.]

Lampiran 5

Komposisi larutan dan *buffer* yang digunakan dalam penelitian serta cara pembuatan dan penyimpanannya

Larutan/*buffer*	Komposisi	Cara pembuatan	Penyimpanan
TBE 1× (1000 ml)	Satu bungkus bubuk TBE dan satu liter akuades	Kedua bahan dicampur dalam botol gelas ukuran 1000 ml, lalu diaduk dengan *stirring-hot plate*	Disimpan pada suhu ± 27° C (suhu ruang)
Agarosa 1% (200 ml)	Dua gram bubuk agarosa dan 200 ml larutan TBE 1×	Kedua bahan dicampur dalam botol gelas ukuran 500 ml, lalu dipanaskan dalam *oven microwave* selama ±3 menit hingga seluruh agarosa larut	Disimpan pada suhu ± 27° C (suhu ruang)
Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7,4 (100 ml)	Satu butir tablet PBS dan 100 ml akuades	Tablet PBS dimasukkan ke dalam akuades dan dibiarkan larut. Nilai pH larutan diatur menjadi 7,4 dengan penambahan HCl atau NaOH. Larutan kemudian disterilisasi pada suhu 121° C, 2 atm, selama 15 menit	Disimpan pada suhu 4° C (refrigerator)
Working solution (400 µl/sampel)	Empat ratus mikroliter *binding buffer* dan empat mikroliter *poly*(A)-*carrier* RNA	Kedua bahan dicampur dalam *tube* 1,5 ml, lalu segera digunakan untuk ekstraksi RNA virus	-

[Sumber: Sambrook & Russell 2001: 5.10--5.11; Roche 2003: 6.]

Lampiran 6

Komposisi kit yang digunakan dalam CODEHOP VP1 RT-snPCR

Kit	Komposisi	Volume
cDNA (RT) kit	5× *first-strand buffer*	110,0 µl
	20 mM dNTP	27,5 µl
	Primer AN32, AN33, AN34, AN35 *cocktail*	27,5 µl
PCR1 kit	10× PCR *reaction buffer* + Mg^{2+} *buffer*	137,5 µl
	10 µM Primer SO224	137,5 µl
	10 µM Primer SO222	137,5 µl
	20 mM dNTP	13,75 µl
	Nuclease-free water	646,25 µl
snPCR2 kit	10× PCR *reaction buffer* + Mg^{2+} *buffer*	137,5 µl
	10 µM Primer AN88	110,0 µl
	10 µM Primer AN89	110,0 µl
	20 mM dNTP	13,75 µl
	Nuclease-free water	701,25 µl

[Sumber: Nix *dkk*. 2006: 2699.]

Lampiran 7

Komposisi master *mix* yang digunakan dalam CODEHOP VP1 RT-snPCR

Master *mix*	Komposisi	Volume
Master *mix* cDNA (RT) PCR	cDNA (RT) PCR kit	3 µl
	DTT (0,1 M)	1 µl
	RNasin (RNase *inhibitor*)	0,5 µl
	SuperScript™ II *reverse transcriptase*	0,5 µl
Master *mix* PCR1	PCR1 kit	30 µl
	Nuclease-free water	9,5 µl
	Taq DNA *polymerase*	0,5 µl
Master *mix* snPCR2	snPCR2 kit	39 µl
	Nuclease-free water	9,5 µl
	FastStart *Taq* DNA *polymerase*	0,5 µl

[Sumber: Nix *dkk*. 2006: 2699.]

Lampiran 8

Komposisi master *mix* yang digunakan dalam *cycle sequencing*

Master *mix*	Komposisi	Volume
Master *mix* 1	BigDye Terminator v1.1	2 µl
	5× BigDye Terminator v1.1/v3.1 *sequencing buffer*	1 µl
	Nuclease-free water	7,5 µl
	Primer AN89 (*forward*)	0,5 µl
Master *mix* 2	BigDye Terminator v1.1	2 µl
	5× BigDye Terminator v1.1/v3.1 *sequencing buffer*	1 µl
	Nuclease-free water	7,5 µl
	Primer AN88 (*reverse*)	0,5 µl

[Sumber: Nix *dkk*. 2006: 2699.]