

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. ENTEROVIRUS

1. Klasifikasi

Enterovirus merupakan virus dengan genom *ribonucleic acid* (RNA) untai tunggal positif, dari genus *Enterovirus*, dan famili *Picornaviridae*. Genus *Enterovirus* terdiri atas delapan spesies yang empat di antaranya adalah patogen pada manusia. Enterovirus awalnya dikelompokkan menjadi berbagai serotipe, yaitu pengelompokan berdasarkan antigenesitas yang ditentukan melalui uji netralisasi dengan antisera hewan. Namun, perkembangan metode molekular telah membagi seluruh anggota genus *Enterovirus* ke dalam spesies dan serotipe berdasarkan organisasi genom dan similaritas sekuen (Pallansch & Roos 2006: 842).

Anggota dari masing-masing spesies enterovirus memiliki kriteria sebagai berikut, yaitu memiliki similaritas asam amino masing-masing lebih dari 70% pada poliprotein struktural P1 dan nonstruktural 2C+3CD; memiliki cakupan reseptor sel inang dan inang yang terbatas; memiliki variasi komposisi basa guanin dan sitosin (G+C) tidak lebih dari 2,5%; dan memiliki kompatibilitas dalam pemrosesan proteolitik replikasi, enkapsidasi, dan rekombinasi genetik (Fauquet *dkk.* 2005 *lihat* Pallansch & Roos 2006: 842).

Genus *Enterovirus* terdiri atas empat spesies enterovirus manusia, yaitu *Human enterovirus A* (HEV-A), HEV-B, HEV-C, dan HEV-D (Lampiran 1). Spesies HEV-A terdiri atas 16 serotipe, yaitu coxsackievirus A (CVA) 2--8, CVA10, CVA12, CVA14, CVA16, enterovirus (EV) 71, EV76, dan EV89--91. Spesies HEV-B terdiri atas 54 serotipe, yaitu coxsackievirus (CVB) 1--6, echovirus (E) 1--9, E11--21, E24--27, E29--33, CVA9, EV69, EV73--75, EV77--88, EV97, EV100 dan EV101. Spesies HEV-C terdiri atas 13 serotipe, yaitu EV96, CVA1, CVA11, CVA13, CVA15, CVA17, CVA19, CVA20--22, CVA24, dan poliovirus (PV) 1--3. Spesies HEV-D terdiri atas dua serotipe, yaitu EV68 dan EV70. Genus *Enterovirus* juga mencakup empat spesies enterovirus pada mamalia, yaitu *Bovine enterovirus* (BEV); *Simian enterovirus A* (SEV-A); *Porcine enterovirus A* (PEV-A); dan *Porcine enterovirus B* (PEV-B) (Pallansch & Roos 2006: 840, 864--866).

2. Karakteristik fisik dan kimia, struktur, serta organisasi genom enterovirus

Virion enterovirus berbentuk bulat (*spherical*) dengan diameter berkisar 30 nm. Partikel enterovirus hanya terdiri atas protein kapsid berbentuk ikosahedron yang membungkus genom RNA. Kapsid enterovirus tersusun atas 12 pentamer dari 5 protomer yang masing-masing protomer terdiri atas 4 protein struktural, yaitu VP1, VP2, VP3, dan VP4 (Gambar 1a dan 1b). Protein VP1, VP2, dan VP3 membentuk permukaan luar virion, sedangkan protein VP4 terletak pada bagian dalam virion. Daerah sekuen protein kapsid tersebut memiliki keragaman yang sangat tinggi dibandingkan

daerah lainnya pada genom enterovirus. Hal tersebut mengakibatkan tingginya keragaman enterovirus karena antigenesitas protein kapsid tersebut menentukan serotipe dari enterovirus (Pallansch & Roos 2006: 841).

Partikel enterovirus tidak mempunyai selubung (*envelope*) lipid sehingga enterovirus tidak sensitif terhadap pelarut lipid seperti eter, deterjen, dan kloroform. Enterovirus juga relatif resistan terhadap berbagai disinfektan seperti etanol, isopropanol, lisol, dan senyawa amonium, namun beberapa senyawa seperti formaldehid, gluteraldehid, sodium hipoklorit, dan klorin dapat menginaktivasi enterovirus (Pallansch & Roos 2006: 841). Enterovirus dapat bertahan pada pH di bawah 3,0 sehingga enterovirus dapat hidup dan bereplikasi pada saluran gastrointestinal mamalia. Enterovirus juga bersifat relatif termostabil walaupun enterovirus dapat diinaktivasi pada suhu di atas 42° C (Racaniello 2001: 685--687).

Enterovirus memiliki untai tunggal RNA positif sepanjang ± 7.500 nukleotida dengan daerah sekuen yang tidak ditranslasikan (*non-translated region*= NTR) pada ujung 5' dan 3'. Bagian 5'NTR sepanjang ± 750 nukleotida berperan dalam inisiasi translasi dengan mengarahkan ribosom ke dalam *internal ribosome entry site* (IRES) (Airaksinen 2000: 14--15). Bagian 3'NTR lebih pendek dibandingkan bagian 5'NTR, yaitu sepanjang 70 hingga 100 nukleotida dan diikuti dengan ekor poli(A). Bagian 3'NTR berfungsi menginisiasi sintesis untai negatif RNA, namun sekuen spesifik pada bagian 3'NTR yang berperan dalam pengikatan polimerase belum teridentifikasi hingga saat ini (Muir *dkk.* 1998: 207).

Menurut Muir *dkk.* (1998: 207), daerah sekuen *open reading frame* (ORF) enterovirus mengkode poliprotein tunggal yang secara proteolitik diproses menjadi protein prekursor P1, P2, dan P3, yang selanjutnya diproses kembali menjadi protein struktural VP0, VP3, VP1 (P1) dan protein nonstruktural 2A^{pro}, 2BC, 3AB, dan 3CD (P2 dan P3). Protein nonstruktural 2A merupakan salah satu protease yang memotong poliprotein di antara protein VP1 dan 2A, serta melepaskan prekursor protein kapsid dari protein lainnya. Protein 2BC merupakan prekursor protein 2B yang fungsi spesifiknya belum diketahui dan protein 2C yang mempunyai aktivitas helikase. Protein nonstruktural 3AB merupakan prekursor protein 3B^{VPg} yang akan membentuk VPg (*virion protein, genome linked*), yaitu polipeptida kecil yang terhubung secara kovalen pada ujung 5'NTR genom RNA virus. Protein nonstruktural 3CD merupakan prekursor protein viral protease kedua (3C^{pro}) dan RNA-*dependent* RNA polimerase (3D^{pol}) (Gambar 2).

3. Epidemiologi dan patogenesis

Enterovirus dapat menyebabkan berbagai penyakit pada manusia yang melibatkan berbagai sistem organ, seperti poliomielitis, meningitis aseptik, pendarahan konjungtivitis, lumpuh layu akut, herpangina, penyakit tangan-kaki-mulut, miokarditis, pleurodinia, dan eksantem, walaupun 50% infeksi enterovirus bersifat asimtomatik (Lampiran 2) (Pallansch & Roos 2006: 840). Menurut Zaoutis & Klein (1998: 184), enterovirus memasuki tubuh manusia melalui rongga mulut atau saluran pernapasan, lalu menginfeksi dan

bereplikasi di dalam jaringan saluran pernapasan atas atau usus halus. Virus kemudian memasuki aliran darah yang akan menghasilkan viremia primer dan menyebar ke berbagai organ target, yaitu sistem saraf pusat, jantung, hati, pankreas, kelenjar adrenal, kulit, dan membran mukus. Replikasi virus pada berbagai organ tersebut akan menyebabkan kemunculan viremia sekunder yang dapat menyebabkan infeksi viremia pada sistem saraf pusat (Zaoutis & Klein 1998: 184). Enterovirus bereplikasi secara efisien pada saluran pencernaan dan dikeluarkan dalam konsentrasi tinggi bersamaan dengan feses selama 2--4 minggu hingga beberapa minggu lebih lama. Durasi pengeluaran enterovirus tersebut bergantung pada kompetensi imunitas masing-masing individu (WHO 2004: 6).

Menurut WHO (2004: 6--7), faktor-faktor yang mempengaruhi transmisi enterovirus dalam suatu populasi adalah tingkat kebersihan, kepadatan penduduk, kualitas air, dan fasilitas sanitasi. Zaoutis & Klein (1998: 183--184) menyatakan bahwa transmisi enterovirus umumnya melalui jalur fekal-oral, walaupun jalur oral-oral, respiratori, dan darah juga memungkinkan transmisi virus dari satu individu ke individu lain. Menurut Pallansch & Roos (2006: 860), walaupun enterovirus dapat diisolasi dari berbagai sumber lingkungan seperti sumber air permukaan (situ, danau, saluran air, dan sungai) serta sumber air tanah (sumur), manusia merupakan satu-satunya reservoir alami bagi enterovirus. Anak-anak di bawah umur lima tahun merupakan individu yang paling mudah terinfeksi enterovirus karena masih

rendahnya imunitas dan perilaku higienis yang buruk pada kelompok umur tersebut (Zaoutis & Klein 1998: 184).

Prevalensi infeksi enterovirus lebih besar pada individu dengan status sosio-ekonomi rendah dan individu yang hidup di area urban (Hall *dkk.* 1970: 1457). Honig *dkk.* (1956 *lihat* Pallancsh & Roos 2006: 857) telah membuktikan bahwa infeksi enterovirus pada anak-anak dengan status sosio-ekonomi rendah lebih tinggi 2 hingga 7 kali lipat dibandingkan pada anak-anak dengan status sosio-ekonomi tinggi di Amerika Serikat. Otatume & Addy (1975 *lihat* Pallancsh & Roos 2006: 857) telah melakukan penelitian di Ghana dan membuktikan bahwa infeksi enterovirus lebih tinggi pada anak-anak di area urban dengan fasilitas sanitasi yang buruk.

Enterovirus mempunyai distribusi yang luas di seluruh dunia. Beberapa serotipe bersifat endemik dengan sedikit perubahan pada kisaran serotipe yang muncul dari tahun ke tahun dalam suatu lokasi geografis tertentu. Infeksi enterovirus umumnya terjadi pada musim panas dan awal musim gugur di daerah beriklim sedang (*temperate*). Namun, pada daerah beriklim tropis, infeksi enterovirus terjadi sepanjang tahun tanpa adanya variasi infeksi akibat perubahan musim (Pallansch & Roos 2006: 862).

Penelitian enterovirus telah lama terfokus pada poliovirus yang merupakan penyebab utama wabah poliomielitis di seluruh dunia. Program eradikasi poliomielitis global melalui imunisasi yang dipromotori oleh WHO sejak tahun 1988 telah berhasil menurunkan kasus poliomielitis secara drastis hingga tahun 2008. Jumlah kasus poliomielitis yang disebabkan oleh

poliovirus liar pada tahun 2008 adalah 1.119 kasus di 15 negara di dunia, dengan tingkat kejadian tertinggi di negara endemik Nigeria, India, Pakistan, dan Afganistan (Gambar 3). Kasus poliomielititis terakhir di Indonesia yang tercatat dan disebabkan oleh importasi poliovirus liar terjadi pada tahun 2006 di Kabupaten Sukabumi, Jawa Barat (WHO 2008a: 1).

4. Evolusi enterovirus

Evolusi virus dengan genom RNA seperti enterovirus dikendalikan oleh dua mekanisme, yaitu mutasi dan rekombinasi. Mutasi dapat terjadi karena kesalahan dalam proses replikasi oleh RNA polimerase virus. Perubahan pada genom virus RNA seperti enterovirus sering terjadi karena RNA polimerase enterovirus tidak mempunyai aktivitas pembacaan kesalahan (Agol 2001: 217).

Rekombinasi pada enterovirus melibatkan perpindahan sekuen di antara dua atau lebih genom enterovirus yang berbeda serta terjadi pada saat proses sintesis untai negatif genom RNA virus (Agol 2001: 217). Rekombinasi dapat terjadi akibat adanya infeksi campuran dari beberapa enterovirus yang berbeda pada individu yang terinfeksi. Enterovirus telah diketahui dapat berekombinasi dalam serotipe yang sama (intraserotipe) atau dalam serotipe yang berbeda (interserotipe), walaupun rekombinasi hanya terjadi pada spesies-spesies yang sama (Santti *dkk.* 1999: 8741).

Poliovirus galur vaksin merupakan salah satu enterovirus yang mudah bermutasi dan berekombinasi. Rekombinasi di antara poliovirus galur vaksin

dan tipe liar telah banyak ditemukan, walaupun virus rekombinan tersebut tidak ditransmisikan ke lingkungan dalam jangka waktu yang lama.

Penelitian mengenai konstruksi virus rekombinan oleh Utama & Shimizu (2005: 15; 2006: 77; 2008: 129) telah membuktikan bahwa poliovirus dapat berekombinasi dengan enterovirus nonpolio dari spesies HEV-C, yaitu CVA11, CVA17, dan CVA18. Virus hasil rekombinasi tersebut memiliki karakteristik yang mirip dengan poliovirus liar, walaupun neurovirulensi dari virus rekombinan tersebut tidak lebih tinggi dibandingkan dengan poliovirus parentalnya. Penelitian serupa oleh Jiang *dkk.* (2007: 9457) telah membuktikan rekombinasi antara poliovirus dan CVA20 atau CVA21 dapat menghasilkan virus rekombinan dengan fenotipe seperti poliovirus liar.

B. VAKSIN POLIO DAN VACCINE-DERIVED POLIOVIRUS (VDPV)

Vaksin yang dapat mencegah infeksi terhadap enterovirus hingga saat ini hanya tersedia bagi poliovirus, yaitu vaksin polio inaktif (*inactivated poliovirus vaccine*= IPV) dan vaksin polio oral (OPV). Vaksin polio inaktif (IPV) pertama kali dikembangkan oleh Salk dan Younger pada tahun 1954 dengan menumbuhkan ketiga serotipe poliovirus pada kultur sel ginjal monyet dan menginaktivasiannya menggunakan formaldehid. Vaksin polio oral (OPV) yang dikembangkan oleh Sabin pada tahun 1962 merupakan vaksin dari poliovirus hidup yang dilemahkan dengan menumbuhkannya pada kultur sel monyet, tikus, dan ayam (Dowdle *dkk.* 2003: 278).

Penggunaan OPV di seluruh dunia melalui program pekan imunisasi nasional yang disponsori WHO telah mengeliminasi poliomielititis di banyak negara berkembang (WHO 2004: 4). Vaksin tersebut menjadi pilihan bagi banyak negara berkembang karena biaya produksi yang relatif murah, menghasilkan imunitas mukosal dan sistemik, serta tidak membutuhkan keterampilan serta peralatan khusus untuk menggunakannya (Pallansch & Roos 2006: 879). Walaupun OPV memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan IPV, poliovirus hidup pada OPV dapat mengalami perubahan menjadi lebih virulen sehingga menimbulkan *vaccine-associated paralytic poliomyelitis* (VAPP). Kasus VAPP yang diakibatkan infeksi poliovirus turunan galur vaksin diestimasikan berjumlah 250--500 kasus tiap tahunnya dari seluruh penerima OPV di dunia (WHO 2004: 4).

Penggunaan OPV juga memiliki resiko kemunculan wabah poliomielititis oleh *vaccine-derived poliovirus* (VDPV). *Vaccine-derived poliovirus* (VDPV) berasal dari OPV tetapi berbeda dari galur OPV maupun isolat PV lainnya karena memiliki perbedaan sekuen pengkode VP1 lebih dari 1%. Mayoritas isolat poliovirus dari penerima OPV dan isolat dari pasien penderita VAPP memiliki similaritas sekuen sebesar lebih dari 99% dengan poliovirus galur vaksin sehingga tidak digolongkan sebagai VDPV (WHO 2004: 8). Isolat VDPV terbagi ke dalam tiga kategori, yaitu *immunodeficient* VDPV (iVDPV), *circulating* VDPV (cVDPV), dan *ambiguous* VDPV (aVDPV). *Immunodeficient* VDPV (iVDPV) merupakan virus turunan vaksin yang berasal dari pasien dengan imunodefisiensi sel B, cVDPV merupakan virus turunan OPV yang

terbukti bersirkulasi dalam suatu populasi, sedangkan aVDPV merupakan VDPV yang tidak diketahui sumber asalnya (Pallansch & Roos 2006: 882).

Wabah poliomielitis yang disebabkan oleh cVDPV telah dilaporkan terjadi di Republik Dominika dan Haiti (Kepulauan Hispaniola) (Kew *dkk.* 2002: 356), Filipina (Shimizu *dkk.* 2004: 13512), Mesir (Yang *dkk.* 2003: 8366), dan Madagaskar (Rousset *dkk.* 2003: 885). Semua isolat cVDPV yang terkait dengan wabah poliomielitis tersebut telah diketahui merupakan virus rekombinan antara poliovirus galur vaksin dan enterovirus nonpolio lainnya. Hingga tahun 2008, kasus cVDPV dilaporkan terjadi di negara Myanmar dan Nigeria (WHO 2008b: 1), sedangkan di Indonesia, penemuan cVDPV yang menyebabkan poliomielitis dilaporkan pada tahun 2005 di Pulau Madura, Jawa Timur. Rendahnya cakupan imunisasi dengan OPV serta keadaan fasilitas sanitasi yang kurang memadai diduga menjadi penyebab utama wabah poliomielitis akibat VDPV tersebut (Estívariz *dkk.* 2008: 347).

C. DESA ANTAJAYA

Desa Antajaya merupakan salah satu desa di Kecamatan Tanjungsari, yang termasuk ke dalam wilayah pembangunan timur Kabupaten Bogor (Gambar 6). Desa Antajaya yang pada awalnya merupakan bagian dari Kecamatan Cariu dilewati sekaligus dibatasi oleh aliran Sungai Cibeet pada bagian baratnya. Bagian utara, timur, dan selatan desa tersebut berbatasan langsung dengan Desa Tanjung Rasa, Kabupaten Purwakarta, dan Desa Buana Jaya. Luas wilayah Desa Antajaya yang merupakan desa

swasembada adalah 16,55 km² dan terletak pada ketinggian 300 m dpl. Enam puluh enam persen wilayah Desa Antajaya masih merupakan areal hutan negara sedangkan 34%-nya merupakan areal rumah penduduk, sawah, kebun, kolam ikan, dan hutan rakyat (Pemerintah Kecamatan Cariu & BPS 2000: 1--6).

Persentase rumah tangga di Desa Antajaya yang memiliki fasilitas sanitasi memadai (jamban leher angsa dengan tangki septik) adalah 16% (151 dari 914 rumah tangga), sedangkan 84% rumah tangga di desa tersebut hanya memiliki fasilitas sanitasi yang tidak sehat (jamban dengan tempat penampungan terbuka atau dialirkan ke sungai) dan bahkan belum memiliki fasilitas sanitasi. Lima puluh tujuh persen penduduk Desa Antajaya telah menggunakan air sumur sebagai sumber air bersih. Namun, 15% penduduk desa tersebut masih menggunakan air sungai yang kemungkinan telah tercemar limbah manusia (data Tim Penggerak PKK, Kecamatan Tanjungsari 2007).

D. DETEKSI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULAR ENTEROVIRUS

1. Sekuen pengkode kapsid VP1

Metode molekular untuk mendeteksi enterovirus manusia seringkali memanfaatkan primer yang dapat melekat pada situs lestari (*conserved*) di daerah 5'NTR. Primer yang dirancang untuk melekat pada daerah 5'NTR tersebut dapat mendeteksi sebagian besar serotipe enterovirus. Namun,

karena ketiadaan variasi pada ampikon, penggunaan primer di daerah 5'NTR tersebut hanya terbatas pada pendeteksian enterovirus (Oberste *dkk.* 1998: 35).

Penggunaan primer yang dirancang untuk melekat pada daerah sekuen pengkode kapsid telah banyak dikembangkan untuk dapat menentukan serotipe suatu enterovirus. Daerah sekuen pengkode kapsid VP2 maupun VP4 telah dilaporkan tidak sepenuhnya berkorelasi dengan seluruh serotipe enterovirus walaupun beberapa serotipe dari enterovirus dapat ditentukan melalui daerah sekuen tersebut (Oberste *dkk.* 1998: 35; Ishiko *dkk.* 2002: 744). Pada tahun 1995, Mateu (*lihat* Oberste *dkk.* 1999: 1288) melaporkan bahwa kapsid VP1 memiliki sejumlah besar situs netralisasi spesifik serotipe. Oberste *dkk.* (1999: 1292) menyatakan bahwa sekuen lengkap kapsid VP1 dari semua prototipe enterovirus manusia menunjukkan bahwa sekuen VP1 berkorelasi dengan serotipe sehingga sekuen VP1 dapat digunakan dalam mengidentifikasi serotipe enterovirus.

Berbagai penelitian menggunakan sekuen VP1 untuk mendeteksi, mengidentifikasi dan mengkarakterisasi isolat-isolat klinis enterovirus. Iturriza-Gómara *dkk.* (2006: 243) menyatakan telah berhasil mendeteksi dan mengkarakterisasi enterovirus manusia dari sampel klinis melalui *sequencing* daerah sekuen VP1. Lima serotipe enterovirus baru bahkan telah berhasil diidentifikasi melalui karakterisasi sekuen pengkode VP1, yaitu EV73 (Oberste *dkk.* 2001: 409); EV74 dan EV75 (Oberste *dkk.* 2004: 3205); serta EV77 dan EV78 (Norder *dkk.* 2003: 827).

2. Teknik-teknik biologi molekular dalam penelitian

a. Ekstraksi RNA virus

Salah satu langkah penting untuk mendeteksi dan mengidentifikasi enterovirus dari spesimen klinis adalah mendapatkan molekul RNA dengan kemurnian serta kuantitas yang cukup untuk diamplifikasi melalui *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) (Guarino *dkk.* 1997: 320). Spesimen klinis seperti feses mengandung banyak substansi yang dapat menghambat reaksi amplifikasi pada RT-PCR, seperti garam empedu, produk degradasi hemoglobin, dan polisakarida kompleks. Keberadaan mikroorganisme kompleks, konsistensi yang bervariasi, dan sisa hasil pencernaan makanan yang beragam pada spesimen feses mengakibatkan ekstraksi RNA dari feses sulit dilakukan. Kemurnian RNA yang diekstraksi dari material heterogen tersebut sangat penting terhadap sensitivitas reaksi RT-PCR (Paula *dkk.* 2003: 135--136).

Berbagai kit komersial untuk mengekstraksi RNA virus dari spesimen klinis (antara lain dari darah, cairan serebrospinal, feses, kultur sel, dan urin) telah banyak tersedia secara komersial, salah satunya adalah High Pure Viral RNA Kit [Roche]. High Pure Viral RNA Kit merupakan kit komersial yang dikembangkan berdasarkan metode ekstraksi asam nukleat oleh Boom *dkk.* (1990: 495), yaitu dengan memanfaatkan daya ikat membran gelas silika terhadap molekul RNA pada keberadaan garam *chaotropic*. High Pure Viral RNA Kit menggunakan guanidin hidroklorida sebagai garam *chaotropic* untuk

melisiskan virus dan mendenaturasi makromolekul; *carrier* RNA poli(A) untuk membantu mengikat RNA; *wash buffer* dengan konsentrasi garam tinggi sebagai pembersih kontaminan; serta *elution buffer* dengan konsentrasi garam rendah sebagai pengelusi RNA dari membran gelas silika. Kit tersebut dapat digunakan untuk menangani sejumlah besar sampel dalam waktu singkat serta dapat mengekstraksi RNA virus dengan tingkat kemurnian yang tinggi (Roche 2003: 4).

b. *Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer VP1 reverse transcription-semi-nested PCR (CODEHOP VP1 RT-snPCR)*

Metode CODEHOP VP1 RT-snPCR merupakan pengembangan dari RT-PCR konvensional yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen tertentu dari genom RNA. Langkah awal dari RT-PCR adalah transkripsi balik untai RNA menjadi cetakan untai tunggal *complementary-deoxyribonucleic acid* (cDNA). Oligodeoksinukleotida sebagai primer akan terhibridisasi pada untai RNA yang selanjutnya diperpanjang oleh enzim *reverse transcriptase* (RTase) untuk menghasilkan cetakan cDNA. Sekuen target dalam cDNA kemudian diamplifikasi melalui beberapa siklus reaksi PCR selanjutnya yang terdiri atas tahap denaturasi, pelekatan (*annealing*), dan ekstensi (Sambrook & Russell 2001: 8.46). Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan prosedur RT-PCR antara lain, yaitu enzim RTase, primer, cetakan RNA, dan penggunaan inhibitor RNase (Roche 2006: 128--129).

Penggunaan metode RT-*nested* PCR atau RT-*seminested* PCR (snPCR) telah banyak dikembangkan untuk mengatasi terjadinya amplifikasi nonspesifik. Namun, metode tersebut umumnya hanya dapat mengamplifikasi sebagian serotipe enterovirus dan mengandalkan primer yang mengandung inosin. Penggunaan primer yang mengandung inosin dengan degenerasi tinggi bertujuan memperluas spesifisitas agar dapat mengamplifikasi semua serotipe enterovirus, namun primer tersebut seringkali menghasilkan amplifikasi nonspesifik (Nix *dkk.* 2006: 2698).

Pendekatan desain primer CODEHOP (*consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer*) merupakan strategi untuk mendesain sekuen primer yang diturunkan dari sekuen asam amino lestari (*conserved*) melalui *multiple alignment* protein dari famili gen target. Setiap primer CODEHOP terdiri atas kumpulan primer berbeda yang masing-masing memiliki salah satu sekuen dari motif asam amino pada ujung 3'-nya (*degenerate core*). Setiap primer juga memiliki sekuen konsensus pada ujung 5' dari sekuen *degenerate core* (*nondegenerate/consensus clamp*) sehingga setiap primer memiliki sekuen dari motif asam amino yang berbeda pada ujung 3' dan sekuen konsensus yang sama pada ujung 5' (Rose 2005: 2). Menurut Rose *dkk.* (2003: 3763), semua primer CODEHOP dapat menginisiasi sintesis DNA pada awal siklus PCR dengan penempelan sekuen *degenerate core* pada cetakan DNA yang juga distabilisasi oleh penempelan beberapa basa pada sekuen *consensus clamp*. Primer-primer tersebut akan menjadi cetakan pada siklus amplifikasi selanjutnya sehingga semua molekul yang baru tersintesis memiliki sekuen

consensus clamp dan memungkinkan semua molekul primer berpartisipasi dalam amplifikasi selanjutnya (Gambar 4).

Nix *dkk.* (2006: 2698) telah mengadaptasi pendekatan CODEHOP untuk mendesain primer yang mempunyai sensitivitas tinggi dan dapat mengamplifikasi semua serotipe enterovirus manusia yang telah diketahui sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi enterovirus manusia langsung dari spesimen klinis. Metode CODEHOP VP1 RT-snPCR yang dikembangkan oleh Nix *dkk.* (2006: 2698) tersebut terdiri atas tiga langkah, yaitu sintesis cDNA, PCR1, dan snPCR2 yang masing-masing menggunakan primer-primer yang berbeda (Gambar 5). Semua galur referensi serotipe dari enterovirus telah berhasil diamplifikasi dan di-*sequencing* melalui metode CODEHOP VP1 RT-snPCR dan menunjukkan sekuen yang identik dengan sekuen VP1 yang diamplifikasi melalui metode PCR konvensional lainnya (Nix *dkk.* 2006 : 2698).

c. Elektroforesis gel

Elektroforesis gel merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan molekul seperti DNA, RNA atau protein berdasarkan ukuran, muatan elektrik, dan sifat fisik lainnya. Teknik elektroforesis gel dilakukan dengan menarik suatu molekul untuk melewati massa gel yang diberikan arus listrik oleh katoda (kutub positif) menuju anoda (kutub negatif) sehingga molekul DNA yang mempunyai muatan negatif akan bermigrasi menuju kutub positif (anoda) pada ujung akhir massa gel dalam elektroforesis (Sambrook &

Russell 2001: 5.4). Kecepatan migrasi molekul DNA ditentukan oleh besar fragmen DNA. Fragmen DNA berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan fragmen DNA berukuran besar. Fragmen DNA dalam gel dapat divisualisasi dengan pewarna pengikat DNA seperti etidium bromida yang dapat berpendar di bawah sinar ultraviolet (UV) (Weaver 2004: 92). Teknik elektroforesis gel telah banyak digunakan untuk mendeteksi fragmen DNA hasil amplifikasi dengan membandingkan pita produk amplifikasi dengan pita DNA *molecular weight marker* (penanda berat molekul DNA) (Sambrook & Russell 2001: 5.10).

d. Purifikasi DNA

Produk RT-PCR umumnya masih mengandung kontaminan seperti primer, nukleotida, enzim, dan komponen *buffer* yang dapat mengganggu tahapan kerja *sequencing*. Oleh karena itu, produk RT-PCR harus dipurifikasi terlebih dahulu untuk mendapatkan fragmen DNA yang murni. Purifikasi DNA dapat dilakukan menggunakan berbagai kit komersial seperti Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System [Promega]. Kit tersebut dirancang untuk mengekstraksi dan mempurifikasi fragmen DNA berukuran 100 pb hingga 10 kb dari gel agarosa atau untuk mempurifikasi DNA langsung dari produk amplifikasi (Promega 2005: 1).

Kit komersial Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System merupakan kit yang juga mengimplementasikan metode purifikasi asam nukleat oleh Boom *dkk.* (1990: 495), yaitu dengan memanfaatkan kemampuan membran

gelas silika untuk berikatan dengan DNA dalam campuran garam *chaotropic*. Purifikasi dapat dilakukan dari gel hasil elektroforesis yang menunjukkan fragmen DNA (pita) tertentu atau dari alikuot produk amplifikasi yang kemudian dilarutkan dalam garam *chaotropic* guanidin isotiosianat (*membrane binding solution*). Fragmen DNA kemudian diisolasi melalui sentrifugasi untuk memaksa potongan gel terlarut atau sisa reaksi RT-PCR melewati membran gelas silika dan secara bersamaan mengikat DNA pada permukaan membran gelas silika. Fragmen DNA yang terisolasi kemudian dielusi dalam *nuclease-free water* setelah dibersihkan dengan *membrane wash solution* yang mengandung garam dalam konsentrasi tinggi (Promega 2005: 1--2).

e. *Sequencing* DNA

Sequencing adalah pembacaan urutan basa nukleotida DNA. Teknik *sequencing* yang pertama kali dikembangkan adalah metode dideoksi yang dikembangkan oleh Frederik Sanger yang menggunakan dideoksinukleotida (ddNTP) untuk mengakhiri sintesis DNA sehingga menghasilkan fragmen DNA yang ukurannya dapat diketahui melalui elektroforesis. Basa terakhir dari setiap fragmen DNA dapat diketahui dari ddNTP yang digunakan untuk mengakhiri setiap reaksi sintesis DNA sehingga pengaturan fragmen DNA berdasarkan ukurannya dapat menghasilkan urutan sekuen basa dari fragmen DNA secara keseluruhan (Weaver 2004: 107).

Automated DNA sequencing yang dikembangkan oleh Applied Biosystems menggunakan prinsip dasar metode dideoksi Sanger dengan menggunakan ddNTP yang memiliki label pewarna fluoresensi (*dye terminator*). *Automated DNA sequencing* mencakup tahapan *cycle sequencing*, purifikasi produk *cycle sequencing*, dan pembacaan sekuen. *Cycle sequencing* adalah metode yang menggunakan siklus denaturasi, pelekatan, dan ekstensi pada mesin *thermal cycler* yang menghasilkan amplifikasi linier dari produk ekstensi fragmen DNA sehingga masing-masing fragmen DNA memiliki label pewarna fluoresensi pada ddNTP di ujung 3' (Applied Biosystems 2000: 1-2, 1-3, & 1,4).

Produk hasil *cycle sequencing* masih memiliki pewarna fluoresensi berlebih yang tidak terpakai pada tahap *cycle sequencing* dan dapat mengganggu pembacaan sekuen sehingga pewarna fluoresensi tersebut harus dipisahkan dari fragmen DNA melalui purifikasi. Purifikasi produk *cycle sequencing* dapat dilakukan dengan menggunakan presipitasi isopropanol, presipitasi etanol/EDTA, presipitasi etanol/EDTA/sodium asetat, atau filtrasi gel (Applied Biosystems 2002: 4-1 & 4-2).

Pembacaan sekuen dapat dilakukan melalui elektroforesis gel (ABI™ 373 DNA Sequencer) atau elektroforesis kapiler (ABI PRISM® 310, 3100, 3130, atau 3170 Genetic Analyzer) (Applied Biosystems 2000: 1-7 & 1-10). Mesin *sequencing* tersebut akan mendeteksi fluoresensi dari empat label pewarna berbeda yang digunakan untuk mendeteksi reaksi ekstensi A, C, G, dan T yang kemudian diinterpretasikan oleh perangkat keras dan perangkat

lunak komputer dalam bentuk grafik elektroferogram (Applied Biosystems 2000: 1-2, 1-3 & 1-4).

3. Analisis sekuen pengkode kapsid VP1

a. *Basic local alignment search tool* (BLAST)

Basic local alignment search tool (BLAST) merupakan suatu pendekatan algoritma yang digunakan untuk melakukan perbandingan data sekuen asam amino atau nukleotida secara cepat, dengan memperkirakan *alignment* yang mengoptimalkan ukuran similaritas lokal (Altschul *dkk.* 1990: 403). Salah satu implementasi BLAST adalah aplikasi penelusuran data sekuen yang dapat digunakan pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Aplikasi penelusuran BLAST antara lain dapat digunakan untuk mengkalkulasi similaritas dan mengetahui identitas suatu sekuen terhadap pangkalan data sekuen internasional GenBank (Madden 2003: 16-1 & 16-2).

Smith (2003: 56--57) dan Blomqvist *dkk.* (2008: 2411) telah mengevaluasi penggunaan BLAST untuk mengidentifikasi suatu isolat enterovirus serta melaporkan bahwa penelusuran BLAST memiliki keakuratan dan efisiensi yang tinggi dalam menentukan serotipe enterovirus. Menurut Oberste *dkk.* (1999: 1288), isolat enterovirus dapat ditetapkan serotipenya jika memiliki persentase identitas sekuen VP1 (lengkap atau sebagian) sebesar $\geq 75\%$ ($> 85\%$ untuk sekuen asam amino) dengan suatu galur serotipe enterovirus. Isolat enterovirus yang mempunyai persentase

identitas sebesar $< 70\%$ mengindikasikan bahwa isolat tersebut merupakan serotipe baru, sedangkan isolat yang memiliki persentase identitas di antara 70 hingga 75% mengindikasikan identitas tentatif yang memerlukan konfirmasi lebih lanjut, seperti pemanjangan daerah sekuen, uji netralisasi dengan antisera monospesifik (Oberste *dkk.* 2003: 376), ataupun dengan rekonstruksi pohon filogenetik (Palacios *dkk.* 2002: 191).

b. Rekonstruksi pohon filogenetik

Hubungan kekerabatan evolusioner antara serotipe enterovirus dapat diilustrasikan melalui pohon filogenetik, yaitu suatu diagram evolusioner yang terdiri atas nodus eksternal (unit taksonomi yang merepresentasikan tipe taksa yang dapat dibandingkan), nodus internal (unit taksonomi hipotetikal yang mewakili progenitor hipotetikal dari nodus eksternal), dan cabang (garis yang menghubungkan dua nodus dan mendefinisikan hubungan kekerabatan antar *operational taxonomic unit* [OTU] dalam hubungan turunan-leluhur) (Vandamme 2003: 15). Penelitian oleh Palacios *dkk.* (2002: 191) yang membandingkan berbagai metode analisis sekuen, yaitu *pairwise sequence alignment*, *multiple sequence alignment*, dan rekonstruksi pohon filogenetik, telah membuktikan bahwa rekonstruksi pohon filogenetik merupakan metode terbaik untuk menyimpulkan identitas suatu isolat enterovirus. Rekonstruksi pohon filogenetik melalui data molekular mencakup beberapa tahapan, yaitu identifikasi sekuen nukleotida *interest* dan sekuen referensi melalui penelusuran BLAST, penyejajaran sekuen-sekuen melalui *multiple sequence*

alignment (MSA), dan rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan hasil MSA (Hall 2001: 8).

Proses MSA dapat dilakukan dengan menggunakan program ClustalX yang melakukan MSA dari kumpulan sekuen nukleotida ataupun asam amino. Program ClustalX melakukan MSA dengan menyejajarkan basa-basa homolog dan menyisipkan gap pada bagian yang tidak homolog untuk mengelompokkan sekuen-sekuen (Thompson *dkk.* 2003: 2.3.19). Proses penyejajaran dilakukan dengan pendekatan algoritma progresif, yaitu pembuatan MSA dengan menggabungkan *subalignment-subalignment* secara bertahap. Urutan penggabungan *subalignment* yang dikomputasi melalui *pairwise-alignment* antara semua sekuen akan menghasilkan dendogram temporer sebagai acuan pengelompokan sekuen (Diamantis & Anna 2006: 5--6).

Metode rekonstruksi pohon filogenetik dari data molekular dapat dikelompokkan ke dalam metode berdasarkan karakter atau berdasarkan jarak. Metode berdasarkan karakter dilakukan dengan menghitung tingkat substitusi yang terjadi pada setiap nukleotida untuk merekonstruksi pohon filogenetik, sedangkan metode berdasarkan jarak dilakukan dengan menghitung dissimilaritas dari setiap pasangan OTU untuk menghasilkan matriks jarak pasangan (Vandamme 2003: 17--19). Palacios *dkk.* (2002: 191) telah melakukan evaluasi terhadap kedua metode rekonstruksi pohon filogenetik tersebut untuk mengidentifikasi enterovirus dan hasil evaluasi menunjukkan bahwa kedua metode tersebut menghasilkan topologi pohon

yang relatif sama walaupun metode berdasarkan jarak menunjukkan hasil yang lebih baik (nilai *bootstrap* yang lebih tinggi).

Salah satu metode rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak adalah *neighbor-joining* (NJ). Metode NJ adalah metode rekonstruksi pohon filogenetik dengan cara menemukan pasangan-pasangan OTU yang dapat meminimalkan panjang cabang total pada setiap tahap pengelompokan OTU sehingga pengelompokan OTU ditentukan berdasarkan panjang cabang atau jarak evolusioner terpendek. Metode NJ hanya membutuhkan waktu yang singkat untuk mengevaluasi hubungan kekerabatan OTU dengan tingkat similaritas yang tinggi (Saitou & Nei 1987: 406). Pada tahun 2002, Domingo *dkk.* (*lihat* Smith 2003: 33) menyatakan bahwa metode NJ lebih sesuai digunakan untuk menganalisis virus RNA karena kecepatan evolusi virus RNA seperti enterovirus tidak konstan dan berbeda pada tiap daerah genom.

Tingkat kepercayaan pohon filogenetik dilakukan dengan uji *bootstrap*. Uji *bootstrap* dilakukan dengan mengacak ulang karakter-karakter pada hasil MSA menjadi suatu set data baru atau data replika. Topologi di antara pohon-pohon yang dihasilkan dari pengacakan kemudian dibandingkan dengan topologi pohon awal. Probabilitas *bootstrap* dari suatu cabang merupakan jumlah pohon yang menghasilkan cabang tersebut dibagi dengan jumlah total pengacakan ulang yang dilakukan (Saitou 1995: 130). Semakin tinggi nilai *bootstrap* (mendekati 100%), maka suatu topologi pohon dianggap semakin dapat dipercaya (Nei & Kumar 2000: 172 & 175).