

## **BAB III**

### **BAHAN DAN CARA KERJA**

#### **A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi Molekular, Pusat Penelitian (Puslit) Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor. Pengkoleksian sampel feses dilakukan di Desa Antajaya, Kecamatan Tanjungsari, Kabupaten Bogor, Provinsi Jawa Barat (Gambar 6). Penelitian berlangsung dari bulan Januari hingga bulan Oktober 2008.

#### **B. BAHAN**

##### **1. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sampel feses dari 100 anak-anak balita (bawah lima tahun) yang merupakan penduduk Desa Antajaya serta mencakup Kampung Campedak, Cikembar, Cikembar Hilir, Cikembar Kaler, Kebon Jambe, Pasir Kalong, dan Pasir Santri. Anak-anak balita yang diikutsertakan dalam penelitian bukan merupakan penderita suatu penyakit terkait enterovirus walaupun tidak dilakukan pemeriksaan kesehatan terhadap anak-anak balita tersebut. Pengikutsertaan balita dalam penelitian diupayakan secara purposif (*purposive sampling*), yaitu penentuan sampel dengan mempertimbangkan kriteria-kriteria tertentu yang telah dibuat sesuai

dengan tujuan penelitian agar mencakup seluruh kampung di Desa Antajaya dengan fasilitas sanitasi buruk (Mack *dkk.* 2005: 5).

Sampel feses tunggal dari masing-masing anak-anak balita dikumpulkan dari bulan Februari hingga Juni 2008. Informasi nama, tanggal pengkoleksian, tanggal lahir, jenis kelamin, dan tanggal imunisasi OPV yang diperoleh dari orang tua anak juga disertakan dalam pengkoleksian sampel jika memungkinkan. Sampel dikoleksi menggunakan sendok plastik kecil sekali pakai dan dimasukkan ke dalam tabung konikal propilen steril ukuran 50 ml. Tabung yang telah berisi sampel feses dimasukkan ke dalam plastik *sealed* yang terpisah satu sama lain, dan dimasukkan ke dalam kotak pendingin berisi *gel ice pack*. Sampel segera dibawa ke laboratorium dan diproses secepatnya, atau disimpan di dalam *freezer* bersuhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Bahan

Bahan-bahan untuk preparasi sampel feses adalah *phosphate-buffered saline* (PBS) dalam bentuk tablet [Bio Basic, Inc.], kloroform [Merck], serta tabung propilen konikal ukuran 10, 15, dan 50 ml [Falcon Becton Dickinson, Sarstedt AG & Co]. Bahan untuk ekstraksi RNA virus adalah kit komersial High Pure Viral RNA Kit [Roche]. Komponen dan komposisi kit dapat dilihat pada Lampiran 3.

Bahan-bahan yang digunakan untuk CODEHOP VP1 RT-snPCR adalah *nuclease-free water* [Promega],  $5\times$  *first-strand buffer* (375 mM KCL, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , dan 250 mM Tris-HCl dengan pH 8,3) [Invitrogen], 0,1 M

dithiothreitol (DTT) [Invitrogen], dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP yang masing-masing dengan konsentrasi awal 100 mM) [GE Healthcare], RNase inhibitor (40 U/μl) [Promega], SuperScript™ II *reverse transcriptase* (200 U/μl) [Invitrogen], 10× PCR *reaction buffer* + Mg<sup>2+</sup> (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, dan 500 mM KCL dengan pH 8,3) [Roche], *Taq DNA polymerase* (5 U/μl) [Roche], FastStart™ *Taq DNA polymerase* (5 U/μl) [Roche], primer cDNA (AN32, AN33, AN34, dan AN35), primer PCR1 (SO224 dan SO222), serta primer snPCR2 (AN88 dan AN89) [SIGMA Genosys]. Sekuen masing-masing primer tercantum pada Lampiran 4.

Bahan-bahan yang digunakan untuk elektroforesis gel agarosa adalah bubuk Tris-borate-EDTA (TBE) [Takara Bio, Inc.], bubuk agarosa [Iwai Chemicals Co.], 6× *loading buffer* (0,05% *xylene cyanol*, 36% gliserol, 30 mM EDTA, dan 0,05% bromofenol biru) [Takara Bio, Inc.], All-Purpose Hi-Lo™ DNA Marker [Bionexus, Inc.], dan larutan etidium bromida dengan konsentrasi 10 mg/ml (EtBr) [Amersham Biosciences]. Bahan untuk purifikasi produk CODEHOP VP1 RT-snPCR adalah kit komersial Wizard® SV Gel & PCR Clean-Up System [Promega]. Komponen dan komposisi kit dapat dilihat pada Lampiran 3.

Bahan-bahan untuk *sequencing* DNA meliputi MicroAmp Optical 96-*well reaction plate* [Applied Biosystems]; kolom filter dan tabung koleksi [Princeton Separations]; BigDye Terminator v3.1 & BigDye Terminator v1.1/v3.1 5× *sequencing buffer* [Applied Biosystems], Sephadex™ G-50 Fine

[GE Healthcare], *nuclease-free water* [Promega], primer AN88 (*reverse*), dan primer AN89 (*forward*) (Lampiran 4) [SIGMA Genosys].

Bahan-bahan lain yang digunakan dalam penelitian adalah aluminium foil [Reynolds Wrap], tisu gulung, tisu *towel*, plastik tahan panas, plastik *sealed*; *gel ice pack* [Thermorite, Thermasafe, Inoac, atau Snowpack]; sarung tangan karet [Sensi gloves], masker [Acurate], *polyethylene butadiene rubber parafilm* [Iwaki Clinical Test Ware], sendok plastik sekali pakai, *tips* mikropipet [Quality Scientific Plastic], tabung mikro ukuran 0,2 dan 1,5 ml [Axygen, Applied Biosystems], *aerosol resistant tips* (p20, p200, dan p1000) [Molecular BioProducts], etanol absolut [Merck], dan alkohol 95% [Evita Pharmaceutical Laboratories].

### C. PERALATAN

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah *cryobox*; rak tabung ukuran 0,2 dan 1,5 ml (MicroAmp Base) [Applied Biosystems]; *cap installing tool* [Applied Biosystems]; mikropipet (p20, p200, dan p1000) [Gilson]; *electronic pump* [Express Becton Dickinson]; pipet hisap ukuran 10 ml [Iwaki Pyrex]; vorteks [Barnsted Thermolyne Maxi<sup>®</sup> Mix II 37600 mixer]; *capsulefuge* [Tomy-PMC-060]; timbangan digital [Precisa XT 120A]; timbangan analitik; pH meter [Thermo Orion 410 A+]; perangkat elektroforesis [Mupid<sup>®</sup>-exU]; perangkat dokumentasi gel elektroforesis [Bio Rad]; *stirring-hot plate* [Barnsted Thermolyne Cimarec<sup>®</sup>]; *table-top centrifuge* [Hermle Z300K dan rotor 220.88.V01]; *floor centrifuge* [Sorvall<sup>®</sup> RC-26 dan rotor SA-600];

*thermal cycler* [Applied Biosystems 2720]; ABI Prism<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer [Applied biosystems]; *oven microwave* [National]; *ice maker* [Scotsman]; *portable cooler* [Dyna Chill]; kotak pendingin *portable* [Lion Star]; autoklaf [All-American]; oven [Jouan & Heraeus]; *water distillator* [GFL 2012]; *freezer* -20° C [GEA dan Sansio]; *refrigerator* [Yupiter dan Sharp]; *stopwatch* [Hoseki]; dan berbagai peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Biologi Molekular.

#### **D. PERANGKAT LUNAK**

Perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian untuk analisis data sekuen dan rekonstruksi pohon filogenetika adalah program *online* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Chromas Lite versi 2.01 [Technelysium Pty Ltd] (<http://www.technelysium.com.au>), BioEdit versi 5.0.6 (Hall 1999: 95) (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>), ClustalX versi 1.83 (Thompson *dkk.* 1997: 4876) (<http://www.clustal.org/download/current/clustalx>), NJPlot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>), dan CorelDraw<sup>®</sup> X4 [Corel Corporation].

#### **E. CARA KERJA**

Cara kerja deteksi enterovirus pada sampel feses meliputi preparasi sampel feses, ekstraksi RNA virus, amplifikasi gen pengkode VP1 dengan metode CODEHOP VP1 RT-snPCR, dan elektroforesis gel agarosa hasil CODEHOP VP1 RT-snPCR. Cara kerja identifikasi enterovirus dari sampel

positif meliputi purifikasi produk CODEHOP VP1 RT-snPCR, *sequencing* parsial gen pengkode VP1 enterovirus, serta analisis sekuen dan pohon filogenetik. Skema cara kerja dapat dilihat pada Gambar 7.

## 1. Preparasi sampel feses

Preparasi sampel feses dilakukan berdasarkan prosedur WHO (2004: 83) dengan beberapa modifikasi. Sampel feses sebanyak 1 g dipindahkan ke dalam tabung propilen konikal steril berukuran 10 ml yang telah berisi 1 ml kloroform dan 5 ml larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) (Lampiran 5). Campuran kemudian dihomogenkan dengan vorteks selama 10 menit. Selanjutnya, campuran disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan  $1.500 \times g$  pada suhu  $4^{\circ} C$ . Pelet hasil sentrifugasi dipisahkan dari supernatan untuk disterilisasi menggunakan autoklaf (suhu  $121^{\circ} C$ , 2 atm, dan 15 menit) sebelum dibuang, sedangkan supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam tabung propilen konikal baru berukuran 15 ml, diberi label dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ} C$  hingga proses selanjutnya.

## 2. Ekstraksi RNA virus

RNA virus diekstraksi langsung dari suspensi feses menggunakan High Pure Viral RNA kit [Roche]. Prosedur ekstraksi disesuaikan dengan instruksi manual pada kit (Roche 2003: 6--9). Seluruh tahapan ekstraksi dilakukan pada suhu ruang dan kondisi steril.

Tabung koleksi (4 buah/sampel), tabung mikro 1,5 ml (2 buah/sampel), dan tabung filter (1 buah/sampel) disiapkan pada rak tabung. Tabung filter untuk masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung koleksi. Empat ratus mikroliter *working solution* (Lampiran 5) disiapkan di dalam tabung mikro 1,5 ml. Masing-masing sampel (supernatan feses hasil sentrifugasi) sebanyak 200  $\mu$ l kemudian dicampurkan dengan *working solution* di dalam tabung mikro 1,5 ml.

Campuran sampel dan *working solution* kemudian dipindahkan ke dalam tabung filter yang telah disiapkan, lalu disentrifugasi pada kecepatan  $10.000 \times g$  selama 15 detik. Filtrat beserta tabung koleksi dibuang, sedangkan tabung filter dimasukkan ke dalam tabung koleksi baru. Tabung filter lalu ditambahkan *inhibitor removal buffer* (500  $\mu$ l/sampel) dan disentrifugasi pada kecepatan  $8.000 \times g$  selama 1 menit. Filtrat beserta tabung koleksi dibuang, sedangkan Tabung filter dimasukkan ke dalam tabung koleksi baru. Tabung filter lalu ditambahkan *wash buffer* (450  $\mu$ l/sampel) dan disentrifugasi pada kecepatan  $8.000 \times g$  selama 1 menit. Filtrat beserta tabung koleksi dibuang, sedangkan Tabung filter dimasukkan ke dalam tabung koleksi baru. Tabung filter ditambahkan kembali dengan *wash buffer* (450  $\mu$ l/sampel) dan disentrifugasi pada kecepatan  $8.000 \times g$  selama 1 menit dan  $12.000 \times g$  selama 10 detik. Filtrat beserta tabung koleksi dibuang, sedangkan tabung filter dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml baru. Tabung filter ditambahkan *elution buffer* (50  $\mu$ l/sampel), diinkubasi selama 1 menit, dan disentrifugasi pada kecepatan  $10.000 \times g$

selama 1 menit, sehingga isolat RNA virus terelusi dalam 50  $\mu$ l *elution buffer*. Isolat RNA virus dalam *elution buffer* selanjutnya digunakan dalam VP1 RT-snPCR atau disimpan pada suhu  $-70^{\circ}$  C.

### 3. CODEHOP VP1 RT-snPCR

Metode CODEHOP VP1 RT-sn PCR dilakukan berdasarkan Nix *dkk.* (2006: 2699) dan terdiri atas tiga langkah, yaitu sintesis cDNA, PCR1, dan snPCR2. Komposisi master *mix* untuk masing-masing tahapan tertulis pada Lampiran 6 dan 7. Kontrol positif (stok RNA poliovirus galur Sabin) dan kontrol negatif (*nuclease-free water*) disertakan dalam tiap tahapan.

Sintesis cDNA dilakukan dengan mencampur isolat RNA virus sebanyak 5  $\mu$ l dengan master *mix* cDNA (5  $\mu$ l/sampel) di dalam tabung reaksi MicroAmp. Reaksi sintesis cDNA dalam mesin *thermal cycler* terdiri atas inkubasi  $22^{\circ}$  C selama 10 menit,  $42^{\circ}$  C selama 60 menit, dan denaturasi pada  $95^{\circ}$  C selama 5 menit (Gambar 8). Seluruh produk hasil sintesis cDNA kemudian digunakan dalam tahap PCR1. Master *mix* PCR1 (40  $\mu$ l/sampel) dicampur dengan produk hasil sintesis cDNA di dalam tabung reaksi MicroAmp, sehingga total volume reaksi PCR1 adalah 50  $\mu$ l. Reaksi PCR1 dalam mesin *thermal cycler* terdiri atas denaturasi pada  $95^{\circ}$  C selama 30 detik, pelekatan pada  $42^{\circ}$  C selama 30 detik, dan ekstensi pada  $60^{\circ}$  C selama 45 detik yang diulang sebanyak 40 kali (Gambar 8). Produk dari tahap PCR1 sebanyak 1  $\mu$ l/sampel ditransfer ke dalam tabung reaksi MicroAmp baru yang telah berisi master *mix* snPCR2 (49  $\mu$ l/sampel),



sehingga total volume reaksi snPCR2 adalah 50  $\mu$ l. Reaksi snPCR2 dalam mesin *thermal cycler* diawali dengan aktivasi FastStart *Taq* DNA *polymerase* pada 95° C selama 6 menit dan diikuti 40 siklus amplifikasi yang terdiri atas denaturasi pada 95° C selama 30 detik, pelekatan pada 60° C selama 20 detik, dan ekstensi pada 72° C selama 15 detik (Gambar 8). Produk PCR1 dan snPCR2 disimpan pada suhu 4° C sebelum dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa.

#### 4. Elektroforesis gel agarosa

Elektroforesis gel agarosa dilakukan berdasarkan Sambrook & Russell (2001: 5.10--5.11). Agarosa cair 1% (Lampiran 5) sebanyak 50 ml ditambahkan 5  $\mu$ l EtBr dalam gelas piala, lalu campuran tersebut segera dituang ke dalam cetakan gel. *Comb* sebagai cetakan sumur dimasukkan ke dalam cetakan gel, kemudian gel agarosa didiamkan selama 25--30 menit hingga mengeras. Setelah gel mengeras, *comb* kemudian dicabut perlahan dari gel. Gel kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* perangkat elektroforesis yang berisi *buffer* TBE 1 $\times$ .

Sebanyak 8  $\mu$ l sampel dari masing-masing hasil PCR1 dan snPCR2 dicampur dengan 2  $\mu$ l 6 $\times$  *loading buffer* di atas kertas *polyethylene butadiene rubber parafilm*. Sampel yang telah dicampur 6 $\times$  *loading buffer* kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing sumur pada gel agarosa. Marker (All-Purpose Hi-Lo™ DNA *marker*) sebanyak 2  $\mu$ l juga dimasukkan ke dalam sumur yang berbeda. Perangkat elektroforesis kemudian dinyalakan dan

dijalankan pada tegangan 100 V selama 25 menit. Gel hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan dengan sinar UV dan didokumentasikan melalui perangkat dokumentasi gel elektroforesis. Keberadaan pita tunggal pada posisi 350--400 pb ditentukan sebagai hasil sampel positif enterovirus untuk kemudian dipurifikasi.

#### 5. Purifikasi produk CODEHOP VP1-RTsnPCR

Purifikasi produk CODEHOP VP1-RTsnPCR dilakukan dengan menggunakan kit komersial Wizard<sup>®</sup> SV Gel & PCR Clean-Up System [Promega]. Prosedur purifikasi disesuaikan dengan instruksi manual pada kit (Promega 2005: 4--7). Seluruh tahapan purifikasi dilakukan pada suhu ruang dan kondisi steril. Seluruh tabung yang digunakan dalam proses purifikasi hanya digunakan sekali serta berada dalam kondisi steril.

Tabung koleksi (3 buah/sampel), Wizard<sup>®</sup> SV *minicolumn* (1 buah/sampel), dan tabung mikro 1,5 ml (1 buah/sampel) disiapkan pada rak tabung. *Membrane binding solution* (50 µl/sampel) ditambahkan ke dalam masing-masing sampel, yaitu seluruh produk snPCR2 yang tersisa setelah tahapan elektroforesis gel. Campuran lalu ditransfer ke dalam *minicolumn* yang telah dimasukkan ke dalam tabung koleksi dan diinkubasi selama 1 menit. *Minicolumn* beserta tabung koleksi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 × *g* selama 1 menit. *Minicolumn* ditambahkan *membrane wash solution* (700 µl/sampel) dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 × *g* selama 1 menit. Filtrat beserta tabung koleksi dibuang,

sedangkan *minicolumn* dimasukkan ke dalam tabung koleksi baru.

*Minicolumn* ditambahkan kembali *membrane wash solution* (500 µl/sampel) dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 × *g* selama 5 menit. Filtrat beserta tabung koleksi dibuang, sedangkan *minicolumn* dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml baru. *Minicolumn* ditambahkan *nuclease-free water* (50 µl/sampel), lalu diinkubasi selama 1 menit, dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 × *g* selama 1 menit. *Minicolumn* lalu dibuang, sedangkan hasil purifikasi pada tabung mikro 1,5 ml disimpan pada suhu 4° C.

#### 6. *Sequencing* parsial gen pengkode kapsid VP1

Proses *sequencing* mencakup tahapan *cycle sequencing*, purifikasi produk *cycle sequencing*, dan pembacaan sekuen melalui elektroforesis kapiler. Sebanyak 2 × 4 µl sampel hasil purifikasi produk snPCR2 dimasukkan ke dalam 2 *tube* ukuran 0,2 ml dan dicampur dengan *master mix* 1 dan 2 (Lampiran 8). Reaksi *cycle sequencing* dilakukan berdasarkan Nix *dkk.* (2006: 2699) yang terdiri atas pradenaturasi pada 96° C selama 1 menit dan diikuti 25 siklus berikutnya yang terdiri atas denaturasi pada 96° C selama 10 detik, pelekatan pada 50° C selama 5 detik, serta ekstensi pada 60° C selama 4 menit dengan menggunakan mesin *thermal cycler* [Applied Biosystems 2720] (Gambar 8).

Purifikasi produk *cycle sequencing* dilakukan berdasarkan metode Margraf *dkk.* (2004: 1757) dengan menggunakan gel filtrasi Sephadex™ G-50 Fine. Sebanyak 2,5 g Sephadex™ G-50 Fine dilarutkan ke dalam 45 ml

air terdestilasi dalam tabung propilen konikal ukuran 50 ml. Kolom filter (2 buah/sampel) disiapkan dan dimasukkan ke dalam tabung koleksi ukuran 2 ml. Suspensi Sephadex™ G-50 Fine sebanyak 900 µl kemudian dimasukkan ke dalam kolom filter beserta tabung koleksi untuk kemudian disentrifugasi pada kecepatan  $3.000 \times g$  selama 1 detik. Filtrat pada tabung koleksi dibuang, kemudian kolom filter beserta tabung koleksi disentrifugasi kembali pada kecepatan  $3.000 \times g$  selama 2 menit. Kolom filter kemudian dipindahkan ke tabung mikro 1,5 ml baru. Seluruh produk *cycle sequencing* (15 µl) yang sebelumnya ditambahkan 25 µl air terdestilasi dimasukkan tepat di atas Sephadex™ G-50 Fine yang berada di dalam kolom filter. Kolom filter beserta tabung mikro 1,5 ml kemudian disentrifugasi pada kecepatan  $3.000 \times g$  selama 2 menit. Filtrat yang didapatkan ( $\pm 20 \mu\text{l}$ ) kemudian dimasukkan ke dalam MicroAmp Optical 96-*well reaction plate* dan dimuat ke dalam mesin *sequencing* (ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer [Applied biosystems]) untuk dilakukan pembacaan urutan nukleotidanya melalui elektroforesis kapiler dengan kondisi *fast run*.

## 7. Analisis sekuen dan rekonstruksi pohon filogenetik

Hasil *sequencing* berupa elektroferogram diedit secara manual untuk mengganti basa N dengan basa A, G, T, atau C dengan menggunakan program Chromas Lite. *Sequencing* diulangi jika terdapat beberapa sampel positif yang menunjukkan elektroferogram yang kurang baik, seperti banyaknya nukleotida ambigu (N) dan puncak-puncak yang saling

bertumpuk. Hasil *sequencing* dengan primer AN88 dan AN89 dari masing-masing sampel kemudian disatukan dengan memerhatikan bagian yang saling tumpang tindih melalui aplikasi CAP (Contig Assembly Program) pada program BioEdit. Sekuen konsensus kemudian diubah ke dalam format FASTA (.txt) dengan menggunakan program Notepad [Microsoft® Notepad].

Sekuen nukleotida gen VP1 enterovirus yang diperoleh (*query*) kemudian ditelusuri identitasnya dalam pangkalan data GenBank melalui program BLAST pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Serotipe sekuen hasil BLAST dengan skor tertinggi ditentukan sebagai serotipe sekuen *query*, dengan ketentuan bahwa sekuen tersebut memiliki skor BLAST di atas 165, *e-value* di bawah  $10^{-40}$  (Smith 2003: 42), dan persentase identitas di atas 75% (Oberste *dkk.* 1999: 1288). Beberapa sekuen referensi yang mempunyai persentase identitas terbesar dengan sekuen *query* dari hasil penelusuran BLAST juga diunduh untuk disertakan dalam MSA.

Seluruh sekuen hasil penelitian dan sekuen prototipe dari semua serotipe enterovirus digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik dengan tujuan mengkonfirmasi hasil penelusuran BLAST. Sekuen penelitian dari masing-masing serotipe bersama-sama dengan sekuen referensi lain dari berbagai galur di seluruh dunia yang diambil dari GenBank digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik lainnya untuk mengetahui hubungan kekerabatan di antara sekuen-sekuen tersebut. Sekuen masing-masing isolat hasil penelitian beserta sekuen referensi dari pangkalan data GenBank

merupakan input untuk melakukan MSA dengan menggunakan program ClustalX (Thompson *dkk.* 1997: 4876).

*Multiple sequence alignment* (MSA) untuk merekonstruksi pohon filogenetik dijalankan pada program ClustalX dengan metode NJ dan parameter Kimura-2 (*correct for multiple substitutions*). Gap sekuen pada MSA diabaikan dengan menjalankan perintah *exclude positions with gaps*. Reliabilitas pohon filogenetik diestimasi dengan uji *bootstrap* (1.000 kali pengulangan) melalui perintah *bootstrap NJ tree*. Data output (.phb) hasil MSA program ClustalX digunakan untuk menggambarkan pohon filogenetik dengan menggunakan program NJPlot (Perrière & Gouy 1996: 364) dalam bentuk filogram. Pohon filogenetik yang ditampilkan oleh program NJplot kemudian diedit dengan menggunakan program CorelDraw<sup>®</sup> X4 untuk memperjelas tampilan. Persentase hasil uji *bootstrap* di atas 70% ditampilkan pada tiap pangkal cabang.

## **F. PENYUSUNAN, PENGOLAHAN, DAN ANALISIS DATA**

Penelitian yang dilakukan bersifat noneksperimental. Data perolehan hasil penelusuran BLAST dan analisis pohon filogenetik ditabulasi ke dalam Tabel 1. Karakteristik data demografi anak-anak balita partisipan dalam penelitian ditabulasi ke dalam Tabel 2. Data perolehan serotipe enterovirus ditabulasi berdasarkan prevalensi, lokasi pengumpulan sampel, kelompok umur, dan jenis kelamin (Tabel 3--6).