

Analisis Marka Gen Patogenik *hlyF* pada *Escherichia coli* Penyebab Kolibasilosis pada Ayam Buras

(ANALYSIS OF PATHOGENIC GENE MARKER *hlyF* IN *ESCHERICHIA COLI* CAUSES OF COLIBACILLOSIS IN FREE-RANGE CHICKEN)

**I Gede Eka Chandrawan^{1*}, I Gusti Ngurah Kade Mahardika², I Nengah Kerta Besung³,
I Gusti Ketut Suarjana³**

¹Mahasiswa, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali.

²Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali.

³Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali.

*Email: ekachandrawan@gmail.com

Abstrak

Kolibasilosis merupakan penyakit bakteri pada unggas yang disebabkan oleh *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Kemampuan APEC untuk menyebabkan penyakit tergantung pada faktor virulensi, salah satunya adalah gen patogenik *hlyF* yang ada dalam plasmid. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan keberadaan gen *hlyF* APEC di Bali dan mengetahui sekuen DNA dari gen *hlyF* tersebut serta kekerabatannya dengan gen *hlyF* dari negara lain. Penelitian ini menggunakan dua isolat APEC asal ayam buras di Kabupaten Tabanan dan Badung yang telah dimurnikan. Dalam penelitian ini, gen *hlyF* berhasil diamplifikasi dengan Panjang sekitar 600 pb. Kedua hasil sekuen gen *hlyF* yang dapat dibaca dengan baik memiliki homologi 100% dengan panjang 518 bp. Analisis filogenik dengan 25 data gen *hlyF* pada *Escherichia coli* dan bakteri lain di dunia menggunakan metode UPGMA dengan *bootstrap* (500 pengulangan). Seluruh data memiliki enam situs polimorfik pada tingkat asam nukleat dan dua tingkat asam amino. Gen *hlyF* asal Bali berada di dalam satu kelompok dengan gen *hlyF* isolat *E. coli* dari berbagai negara di dunia. Gen ini dapat digunakan sebagai marker patogenik APEC di Indonesia.

Kata kunci: APEC; *Escherichia coli*; filogenik; gen; *hlyF*; patogenik

Abstract

Colibacillosis by *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) is an infectious disease in poultry. The ability of APEC to cause disease depends on various virulence factors, including *hlyF*. The study aimed to prove the existence of the APEC *hlyF* gene in Bali and to find out the DNA sequences of these *hlyF* genes and their kinship with the *hlyF* gene from other countries. This study used two APEC isolates from free range chicken in Tabanan and Badung regencies. The isolates have been purified and were available at the Bacteriology Laboratory of Veterinary Medicine Faculty, Udayana University. DNA isolates were isolated using Chelex 10%. The *hlyF* gene is amplified using published DNA primers by *polymerase chain reaction* (PCR). PCR products were sequenced at First Base Laboratories in Malaysia using the *Sanger's Dideoxy Nucleotide Termination* method. Both the *hlyF* gene sequences that can be analyzed have 100% homology with a readable length of 518 bp. Phylogenetic test with 25 DNA sequences of *hlyF* gene on *Escherichia coli* and other bacteria in the world using UPGMA method with *bootstrap* (500 repetitions) was conducted with MEGA 5.2. All data have six polymorphic sites of nucleic acid and two polymorphic sites of amino acid. The *hlyF* gene from Bali was in same group with *hlyF* genes from various countries in the world. This gene can be used as a pathogenic marker of APEC in Indonesia.

Keywords: APEC; *Escherichia coli*; gene; *hlyF*; pathogenic; phylogenetic.

PENDAHULUAN

Daging ayam merupakan salah satu bahan pangan asal hewan yang paling sering dikonsumsi. Peningkatan konsumsi daging ayam yang cukup tinggi tiap tahunnya menjadi salah satu alasan bagi peternak untuk terus menjalankan dan mengembangkan usaha peternakan ayam. Dalam usaha mengembangkan peternakan ayam, permasalahan utama yang merupakan tantangan terberat di peternakan ayam adalah munculnya penyakit, sehingga pengelolannya perlu dilakukan secara efisien dan profesional (Tarmudji, 2005).

Salah satu penyakit menular pada unggas yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*) galur pathogen atau *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) adalah kolibasilosis. Kasus kolibasilosis telah dilaporkan di berbagai negara di dunia. Di Indonesia, penyakit ini ditemukan pada ayam pedaging maupun petelur di berbagai daerah (Tarmudji, 2003). Di daerah Bali khususnya, penyakit ini ditemukan di peternakan ayam di berbagai kabupaten (Barus, *et al.*, 2013).

Faktor gen virulensi APEC merupakan salah satu faktor yang menentukan kemampuan APEC untuk menyebabkan penyakit. Dari beberapa gen yang diungkap, lima gen yang umum adalah *iutA*, *hlyF*, episomal *iss*, *iroN*, dan episomal *ompT*. Lima gen itu dianggap sebagai marka patogenik APEC (Johnson *et al.*, 2008). Frekuensi tingkat deteksi gen *hlyF* pada *E. coli* galur pathogen dilaporkan berbeda di berbagai negara. Akan tetapi, gen itu ditemukan di atas 50% pada APEC. Persentase gen *hlyF* di Brazil ditemukan di atas 60%, di Amerika 81,7%, di Korea 87.1 %, dan di Nepal 100% (De Carli *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2012; Subedi *et al.*, 2018).

Gen marka patogenik *hlyF* APEC pada ayam bukan ras (buras) belum pernah dilaporkan di Indonesia. Selama ini pengujian kuman penyebab kolibasilosis dilakukan dengan isolasi dan identifikasi kuman. Hasil yang didapatkan adalah

kuman *E.coli* yang belum pasti sebagai penyebab penyakit. Untuk mendapatkan kuman patogen perlu dilakukan dengan mengidentifikasi marka gen patogen. Dengan demikian identifikasi kuman dengan uji PCR adalah sangat penting.

METODE PENELITIAN

Objek Penelitian

Objek yang akan diteliti lebih lanjut adalah bakteri *Escherichia coli* galur pathogen atau *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) penyebab kolibasilosis pada ayam. Sampel yang digunakan merupakan isolat APEC yang telah dimurnikan berasal dari organ ayam buras yang terserang penyakit kolibasilosis. Sampel berjumlah dua isolat didapatkan dari Laboratorium Bakteriologi FKH Universitas Udayana dari kabupaten Tabanan dan Badung, Provinsi Bali.

Isolasi DNA

Tahapan pertama dalam prosedur penelitian adalah persiapan isolat *Escherichia coli* untuk dilakukan isolasi DNA dengan metode Chelex (Walsh *et al.*, 1991). Sampel diambil setitik saja, kemudian sampel dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang sudah berisi larutan *chelex* 10% sebanyak 3µl. Larutan itu di *vortex* atau *Shaker* selama 15 detik. Larutan berisi sampel tersebut setelah selesai dilakukan *vortex* kemudian dimasukkan ke dalam *sentrifuge* selama 1 menit. Kemudian dipanaskan selama 60 menit pada suhu 94°C. Ulangi prosedur *vortex* dan *sentrifuge* terhadap larutan *chelex* 10% berisi sampel. Setelah itu sampel tersebut disimpan selama satu malam pada suhu 4°C.

Uji PCR

Gen diamplifikasi dengan menggunakan sepasang DNA primer *hlyF* :
hlyF 5'-
GGCGATTAGGCATTCCGATACTC-3'
dan *hlyR* 5'-
ACGGGGTCGCTAGTTAAGGAG-3'
dengan target amplifikasi DNA sebesar

599bp (Jhonson *et al.*, 2006). Dalam tabung PCR dimasukkan 3 μ L ddH₂O dan 5 μ L 2x tag plus PCR MM. DNA primer dimasukkan masing-masing sebanyak 0,5 μ L. DNA sampel dimasukkan sebanyak 1 μ L. Program PCR dilakukan dengan suhu predenaturasi 94°C selama tujuh menit, denaturasi 94°C selama satu menit, suhu annealing 50°C selama 45 detik, dan ekstensi 72°C selama satu menit 30 detik. Siklus tersebut dilakukan sebanyak 35 kali siklus. Setelah itu perpanjangan langkah terakhir (*post* ekstensi) 75°C selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan prosedur elektroforesis dan visualisasi hasil PCR gen *hlyF*

Elektroforesis

Sebanyak 1 gram bubuk agarose ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang berisi 50 ml larutan TAE 1x. Lalu campuran tersebut dihomogenkan di dalam microwave selama 1,5 menit sampai larutan berwarna bening. Jika campuran sudah bening, dikeluarkan dari dalam *microwave* dan dalam kondisi masih panas kemudian ditambahkan etidium bromida 5 μ L. Campuran gel yang masih panas tadi segera dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah berisi sisir untuk cetakan sumur. Biarkan gel mengeras (selama 15-45 menit), kemudian dengan hati-hati sisir diangkat setelah gel mengeras, lalu gel diletakkan di dalam peralatan elektroforesis dan rendam dalam larutan TAE 1x. Sebanyak 5 μ L sampel amplikon PCR (dari dalam *microtube* PCR) dimasukkan ke dalam masing-masing sumur *gel* tadi. Sebanyak 3,5 μ L *marker DNA ladder* dipipet dan dimasukkan ke dalam sumur yang memang disiapkan untuk *marker*. Lalu alat elektroforesis *BIO-RAD™ PowerPac* disetel pada tegangan 80-100 Volt, Ampere 400 mA, dan waktu 25-30 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diangkat lalu masukan ke dalam alat UV.

Visualisasi Hasil PCR

Gel dimasukkan ke dalam alat UV *BIO-RAD™ UVITEC*. Pita-pita fragmen DNA yang terbentuk dari setiap sampel amplikon

diamati dan ditentukan posisi atau letaknya, apakah sejajar dengan garis pita *base pairs* di 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, atau 1000 bp dari *pita marker DNA ladder*. Hasil visualisasi pita DNA dari setiap sampel difoto dan disimpan.

Sekuensing DNA *hlyF*

Hasil PCR APEC yang positif *hlyF* disekuensing. Sekuensing dilakukan pada *Automatic DNA Sequencer Applied Biosystem 3130/3130x Genetic Analyzer* yang tersedia di *First Laboratories, Malaysia*. Sekuensing dilakukan dengan metode *Sanger's dideoxy nucleotide termination*.

Analisis Data

Hasil data penelitian ini akan digunakan sebagai data primer. Data primer akan dilakukan analisis filogenik dan jarak genetik dengan data sekunder yang didapatkan dari *genbank* dengan informasi asal negara dan kode akses (*accession number*). Analisis filogenik dan jarak genetik akan menggunakan program lunak analisis DNA yaitu MEGA 5.2 atau *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura *et al.*, 2011).

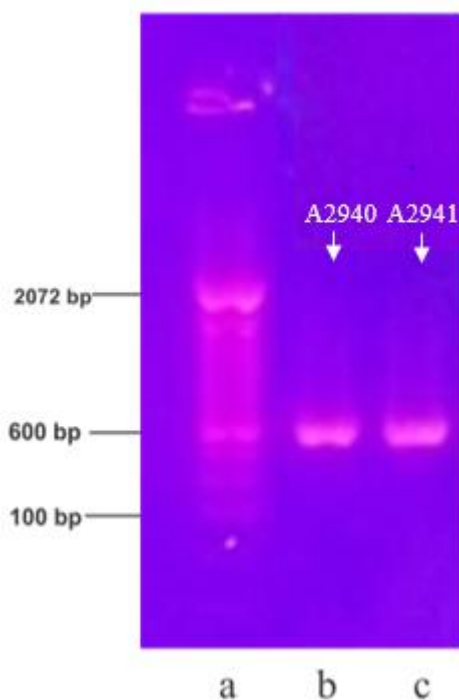
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil PCR dua isolat APEC menunjukkan hasil positif, berada pada posisi sekitar 600 bp. Hasil elektroforesis PCR ditampilkan pada Gambar 1. Isolat APEC berasal dari ayam buras yang terinfeksi kolibasilosis di Kabupaten Tabanan dan Badung pada tahun 2018. Isolat APEC asal Tabanan dan Badung memiliki kode PCR A2940 dan A2941. Hasil sekuensing gen *hlyF* yang dapat dianalisis dengan baik adalah 518 bp. Kedua gen *hlyF* APEC asal Tabanan dan Badung memiliki homologi DNA 100%. Hasil sekuensing gen *hlyF* diregistrasi di *gen bank* dengan kode akses atau *accession number* MK776769 dan MK776770.

Sebanyak 25 data sekunder yang diunduh dari *genbank* dan data primer dianalisis dengan situs polimorfik

(*polymorphic sites*). Hasil analisis menunjukkan pada tingkat asam nukleat terdapat enam situs basa yang berbeda (Tabel 1). Situs polimorfik ditingkat asam amino menunjukkan dua situs yang berbeda dari keseluruhan data yang ada (Tabel 2). Berdasarkan hasil tersebut, data dibagi menjadi 5 kelompok. Substitusi T234C unik untuk kluster isolat asal Tabanan dan Badung Bali bersama isolat dari berbagai negara yang termasuk di group 3. Substitusi tersebut termasuk mutasi bisu (*silent mutation*) yaitu tidak menyebabkan perubahan asam amino.



Gambar 1. Elektroforesis agarosa 1% (a) *Ladder Invitrogen* 100 bp, (b) sampel asal Tabanan (c) sampel asal Badung, divisualisasi pada UV dengan pewarna *ethidium bromide*.

Data kemudian dianalisis secara filogenik menggunakan metode *UPGMA* (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) dengan metode *bootstrap* (500 pengulangan), model substitusi kimura-2-parameter model. Hasil berupa pohon filogenik ditampilkan pada gambar 2. Gen *hlyF* dengan kode akses MK776769 dan MK776770 berada dalam satu

kelompok yang sama dengan gen *hlyF E. coli* asal berbagai negara, termasuk bersama satu sekuens *Salmonella enterica* USA (CP002090). Secara filogeni gen *hlyF E. coli* dunia dikelompokkan menjadi 5 kelompok (1A, 1B, 1C, 1D, dan 1E). Pembagian kelompok genetik tersebut memiliki dukungan nilai bootstrap lemah (30%). Isolat yang diperoleh dalam penelitian ini termasuk kelompok 1A.

Pembahasan

Kolibasilosis merupakan penyakit menular pada unggas yang disebabkan oleh APEC. Penyakit ini sering terjadi pada ayam dalam kondisi stres tertentu seperti kepadatan yang berlebihan (*overcrowding*), sanitasi yang buruk, malnutrisi, suhu ekstrem, dan penekanan kekebalan tubuh (*immunosupresi*) (Abalaka *et al.*, 2017).

Serotipe APEC beragam. Serotipe dapat diklasifikasikan berdasarkan variasi antigen O dan K (Whittam dan Wilson, 1988). Beberapa serotipe APEC yang sering teridentifikasi di Jawa dan Bali yaitu serotipe O2:K1, O1:K1, dan O78:K80, dan serotipe lainnya (Tarmudji, 2003). Patogenitas APEC dipengaruhi oleh banyak gen patogenik. Lima gen patogenik APEC yaitu gen *hlyF*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, dan *iutA* (Johnson *et al.*, 2008). Gen-gen tersebut ditemukan dalam frekuensi yang tinggi pada isolat APEC dari seluruh dunia.

Di Indonesia, kajian molekuler gen patogenik APEC belum banyak di temukan. Kajian ilmiah yang membahas tentang gen *hlyF* APEC di Indonesia juga belum ada. Penelitian ini adalah penelitian pertama yang mengkaji gen *hlyF* APEC di Indonesia, khususnya Bali.

Dalam penelitian ini, gen *hlyF* berhasil diamplifikasi dengan spesifik menggunakan sepasang DNA primer gen *hlyF* yang sudah dipublikasi (Johnson, *et al.*, 2006). Hasil berupa pita DNA tunggal dengan panjang sekitar 600 bp. Kemudian hasil sekuensing DNA gen *hlyF* yang dapat dianalisis dengan baik yaitu sepanjang 518 bp.

Sekuens gen *hlyF* sampel dari kabupaten Tabanan dengan kode akses

MK776769 dan dari kabupaten Badung dengan kode akses MK776770 tidak memiliki perbedaan urutan basa DNA. Hal tersebut membuktikan bahwa gen *hlyF* APEC pada ayam buras asal Tabanan dan Badung memiliki homologi DNA 100%. Hal ini dapat terjadi karena APEC yang bersirkulasi di Bali berasal dari satu asal-usul yang sama.

Hasil analisis situs polimorfik gen *hlyF* menunjukkan enam situs polimorfik ditingkat asam nukleat dan dua situs ditingkat asam amino dari 25 sekuens yang ada. Data dibagi menjadi 5 kelompok (group). Gen *hlyF* asal Bali memiliki homologi 100% dengan gen *hlyF* asal berbagai negara. Ini nampaknya membuktikan bahwa marka patogenik *hlyF* dibawa oleh plasmid (Murase *et al.*, 2016).

Dalam penelitian ini, gen *hlyF* asal Bali memiliki homologi 100% dengan salah satu sekuens yang berasal dari *Salmonella enterica*. Dalam beberapa penelitian, dilaporkan bahwa *Salmonella enterica*, dalam hal ini *Salmonella enterica* Serovar Kentucky (S.Kentucky) memiliki plasmid yang mirip dengan plasmid yang ditemukan pada APEC (Fricke *et al.*, 2009). Dalam satu penelitian lainnya, diungkapkan bahwa S.Kentucky ini memiliki plasmid ColV dengan prevalensi cukup tinggi yaitu 73% dari sekitar 900 sampel (Johnson *et al.*, 2010). Plasmid ColV pada APEC mengandung gen *hlyF*. Plasmid ColV ditemukan pada S.Kentucky dapat menjelaskan gen *hlyF* asal Bali memiliki homologi 100% dengan *Salmonella enterica* yang diisolasi di Amerika tahun 2010. Hal ini juga membuktikan bahwa gen *hlyF* dapat ditransfer dari satu bakteri ke bakteri lainnya.

Hasil kajian gen pada penelitian ini juga berbeda dengan kajian marka patogenik APEC lainnya, yaitu gen *iroN* (Gunawan, 2019) dan *iutA* (Marhendra, 2019). Kemungkinan bahwa ketiga gen tersebut dapat dibawa oleh plasmid yang berbeda sehingga mempunyai pola filogeni yang berbeda. Hal ini perlu diungkap lebih lanjut.

Penelitian tentang gen *hlyF* harus dilakukan untuk mengetahui frekuensi gen *hlyF* pada APEC di seluruh provinsi di Indonesia. Kajian lebih lanjut tentang gen patogenik APEC dapat membantu untuk mendiagnosis secara cepat di masa yang akan datang. Selain itu, kajian lebih lanjut tentang sifat gen patogenik APEC dan kerja sistem imun unggas dapat digunakan sebagai acuan untuk pengembangan vaksin APEC yang akan sangat menguntungkan peternakan ayam. Penelitian yang telah mengkaji tentang vaksin kolibasilosis unggas, seperti *iss-based vaccine* yang berpotensi menargetkan tiga serotipe APEC yaitu O2, O78 dan O1 (Lynne *et al.*, 2012). Persentase gen *hlyF* pada isolat APEC yang cukup tinggi di berbagai negara menandakan gen *hlyF* memiliki potensi yang cukup besar untuk dikembangkan sebagai vaksin APEC.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan, gen *hlyF* dapat dideteksi dari dua isolat *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) asal ayam buras di Tabanan dan Badung tahun 2018. Kedua isolat tersebut mempunyai gen *hlyF* dengan sekuens yang sama (homologi 100%). Hasil analisis filogenik gen *hlyF* asal Tabanan dan Badung dengan gen *hlyF* dari berbagai negara menunjukkan kekerabatan dengan gen *hlyF* isolat *Escherichia coli* asal berbagai negara di dunia.

Saran

Penelitian lebih lanjut tentang gen *hlyF* dan gen patogenik APEC lainnya perlu dilakukan. Pendataan frekuensi gen *hlyF* di seluruh provinsi di Indonesia juga perlu dilakukan. Selain itu, perlu juga dilakukan penelitian untuk membandingkan frekuensi gen *hlyF* pada APEC dan *E. coli* komensal unggas.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada drh. Ni Made Ritha Krisna Dewi, S.KH,

M.Si dan drh. Ni Putu Sutrisna Dewi, S.KH selaku asisten laboratorium yang telah membantu dalam penelitian ini. Penelitian ini didanai oleh The Professor and Promotion Project, Universitas Udayana, Bali, DIPA-PNBP 2018, nomor kontrak 383-1/UN14.4.4.A/LT/2018, tertanggal 28 Maret 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Abalaka SE, Sani NA, Idoko IS, Tenuche OZ, Oyelowo FO, Ejeh SA, Enem SI. 2017. Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock. *Sokoto J. Vet. Sci.* 15(3): 95-102.
- Barus DO, Gelgel KTP, Suarjana IGK. 2013. Uji kepekaan bakteri escherichia coli asal ayam pedaging terhadap antibiotik doksisisiklin, gentamisin, dan tiamfenikol. *Indon. Med. Vet.* 2(5): 538-545.
- De Carli S, Ikuta N, Lehmann FK, da Silveira VP, de Melo PG, Fonseca AS, Lunge VR. 2015. Virulence gene content in Escherichia coli isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. *Poult. Sci.* 94(11): 2635-2640.
- Fricke WF, McDermott PF, Mammel MK, Zhao S, Johnson TJ, Rasko DA, Fedorka-Cray PJ, Pedroso A, Whichard JM, LeClerc JE, White DG, Cebula TA, Ravel J. 2009. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic escherichia coli strains in salmonella enterica serovar kentucky isolates from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(18): 5963-5971.
- Gunawan TR. 2019. Analisis gen patogenik iron pada escherichia coli penyebab kolibasilosis pada ayam buras. Skripsi. Denpasar: Universitas Udayana.
- Jeong YW, Kim TE, Kim JH, Kwon HJ. 2012. Pathotyping avian pathogenic Escherichia coli strains in Korea. *J. Vet. Sci.* 13(2): 145-152.
- Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. 2006. DNA Sequence of a CoIV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian Escherichia coli Strains. *J. Bacteriol.* 188(2): 745-758.
- Johnson T J, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic escherichia coli virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 46(12): 3987-3996.
- Johnson TJ, Thorsness JL, Anderson CP, Lynne AM, Foley SL, Han J, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Khatri M, Stell AL, Flores C, Singer RS. 2010. Horizontal gene transfer of a ColV plasmid has resulted in a dominant avian clonal type of *Salmonella enterica* serovar kentucky. *PLoS One* 5(12): e15524.
- Lynne AM, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Johnson TJ, Johnson SJ, Sinha AS, Lynner DK, Moon HW, Jordan DM, Logue CM, Foley SL, Nolan LK. 2012. Recombinant *Iss* as a Potential Vaccine for Avian Colibacillosis. *Avian Dis.* 56(2012): 192-199.
- Marhendra KSA. 2019. Analisis Marka Gen Patogenik iutA pada Escherichia coli Penyebab Kolibasilosis pada Ayam Buras. Skripsi. Denpasar: Universitas Udayana.
- Murase K, Martin P, Porcheron G, Houle S, Helloin E, Pénary M, Nougayrède JP, Dozois CM, Hayashi T, Oswald E. 2016. HlyF Produced by extraintestinal pathogenic Escherichia coli is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis. *J. Infect. Dis.* 213: 856-865.
- Subedi M, Luitel H, Devkota B, Bhattarai RK, Phuyal S, Panthi P, Shrestha A, Chaudhary DK. 2018. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic Escherichia coli (APEC) from broiler chickens in

- Chitwan, Nepal. *BMC Vet. Res.* 14(113): 1-6.
- Tarmudji. 2003. Kolibasiolosis pada ayam: etiologi, patologi dan pengendaliannya. *Wartazoa.* 13(2): 65-73.
- Tarmudji. 2005. Asites pada ayam pedaging. *Wartazoa.* 15(1): 38-48.
- Walsh SP, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506-513.
- Whittam TS, Wilson RA. 1988. Genetic relationships among pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Infect. Immune.* 56(9): 2458–246.

Tabel 1. Situs polimorfik gen *hlyF* yang dideteksi dari *Escherichia coli* asal Bali (MK776769 dan MK776770) dengan data yang tersedia di genbank di tingkat asam nukleat.

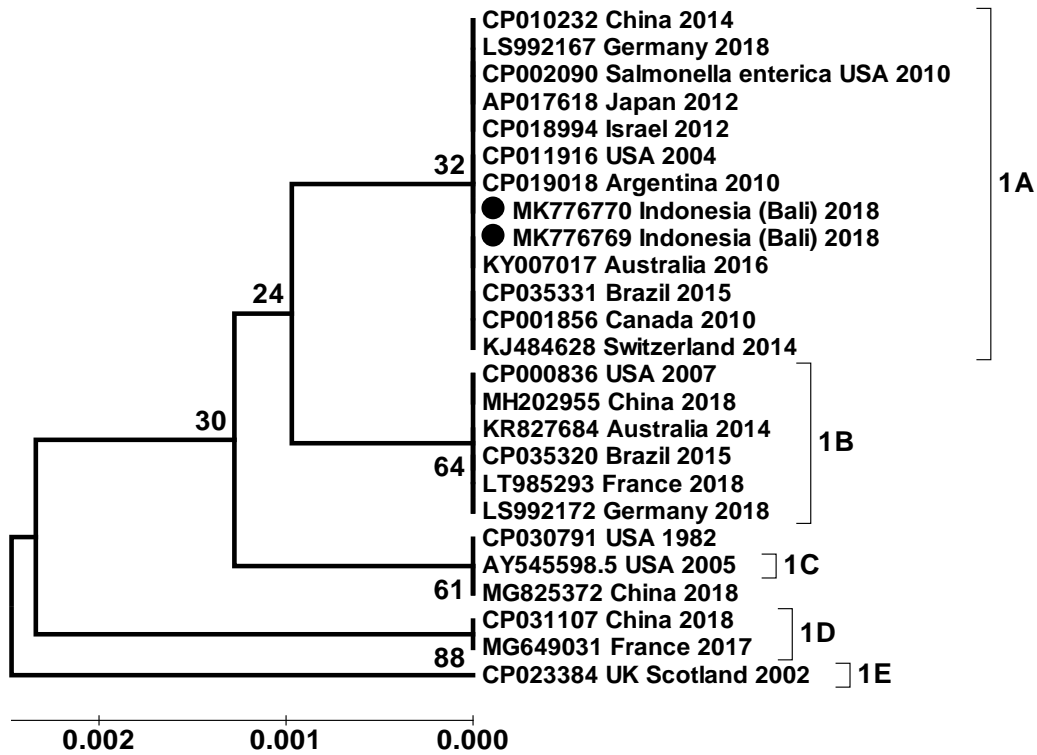
Kode Akses, Asal Negara, Tahun	Group	Nomor Urutan Basa					
		1	1	2	3	3	4
		6	8	3	3	9	8
		6	9	4	5	6	0
LT985293 France 2018	Group 1	C	C	T	A	T	T
KR827684 Australia 2014	Group 1
CP000836 USA 2007	Group 1
LS992172 Germany 2018	Group 1
CP035320 Brazil 2015	Group 1
MH202955 China 2018	Group 1
CP031107 China 2018	Group 2	.	.	C	T	C	.
MG649031 France 2017	Group 2	.	.	C	T	C	.
CP010232 China 2014	Group 3	.	.	C	.	.	.
CP011916 USA 2004	Group 3	.	.	C	.	.	.
CP019018 Argentina 2010	Group 3	.	.	C	.	.	.
CP018994 Israel 2012	Group 3	.	.	C	.	.	.
AP017618 Japan 2012	Group 3	.	.	C	.	.	.
MK776769 Indonesia (Bali) 2018	Group 3	.	.	C	.	.	.
MK776770 Indonesia (Bali) 2018	Group 3	.	.	C	.	.	.
CP002090 Salmonella enterica USA 2010	Group 3	.	.	C	.	.	.
CP001856 Canada 2010	Group 3	.	.	C	.	.	.
KY007017 Australia 2016	Group 3	.	.	C	.	.	.
KJ484628 Switzerland 2014	Group 3	.	.	C	.	.	.
LS992167 Germany 2018	Group 3	.	.	C	.	.	.
CP035331 Brazil 2015	Group 3	.	.	C	.	.	.
AY545598.5 USA 2005	Group 4	.	.	C	.	.	C
MG825372 China 2018	Group 4	.	.	C	.	.	C
CP030791 USA 1982	Group 4	.	.	C	.	.	C
CP023384 UK Scotland 2002	Group 5	A	T	C	.	.	.

Keterangan : Data diseleksi dari *genbank*. Gen *hlyF* dari kode akses MK776769 dan MK776770 berada dalam group 3.

Tabel 2. Situs polimorfik gen *hlyF* yang dideteksi dari *Escherichia coli* asal Bali (MK776769 dan MK776770) dengan data yang tersedia di *genbank* di tingkat asam amino.

Kode Akses, Asal Negara, Tahun	Group	5	1
		6	2
LT985293 France 2018	Group 1	L	D
KR827684 Australia 2014	Group 1	.	.
CP000836 USA 2007	Group 1	.	.
LS992172 Germany 2018	Group 1	.	.
CP035320 Brazil 2015	Group 1	.	.
MH202955 China 2018	Group 1	.	.
CP031107 China 2018	Group 2	.	V
MG649031 France 2017	Group 2	.	V
CP010232 China 2014	Group 3	.	.
CP011916 USA 2004	Group 3	.	.
CP019018 Argentina 2010	Group 3	.	.
CP018994 Israel 2012	Group 3	.	.
AP017618 Japan 2012	Group 3	.	.
MK776769 Indonesia (Bali) 2018	Group 3	.	.
MK776770 Indonesia (Bali) 2018	Group 3	.	.
CP002090 <i>Salmonella enterica</i> USA 2010	Group 3	.	.
CP001856 Canada 2010	Group 3	.	.
KY007017 Australia 2016	Group 3	.	.
KJ484628 Switzerland 2014	Group 3	.	.
LS992167 Germany 2018	Group 3	.	.
CP035331 Brazil 2015	Group 3	.	.
AY545598.5 USA 2005	Group 4	.	.
MG825372 China 2018	Group 4	.	.
CP030791 USA 1982	Group 4	.	.
CP023384 UK Scotland 2002	Group 5	M	.

Keterangan: Data diseleksi dari *genbank*



Gambar 2. Analisis filogenetik dengan metode UPGMA sekuens gen *hlyF* asal Tabanan (MK776769) dan Badung (MK776770) dengan data gen *hlyF* dari berbagai negara di dunia.