

Analisis Marka Gen Patogenik *iutA* *Escherichia Coli* Penyebab Colibasilosis pada Ayam Buras

(ANALYSIS OF PATHOGENIC IUTA GENE MARKERS IN ESCHERICHIA COLI CAUSES OF COLLIBACILLOSIS IN FREE-RANGE CHICKEN)

Kadek Satria Adi Marhendra^{1*}, I Gusti Ngurah Kade Mahardika², I Nengah Kerta Besung³, I Gusti Ketut Suarjana³

¹Mahasiswa Program Profesi Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali; ²Laboratorium Virologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. Raya Sesetan, Gg. Markisa No. 6, Denpasar, Bali; ³Laboratorium Mikrobiologi Veteriner Universitas Udayana, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali. *Email: kecik_kecil@yahoo.com

Abstrak

Kolibasilosis merupakan penyakit menular pada ayam yang disebabkan oleh *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Kemampuan APEC untuk menyebabkan penyakit tergantung pada banyak faktor patogen, salah satunya adalah gen patogenik *iutA*. Penelitian bertujuan untuk mengetahui sekuen DNA gen *iutA* APEC di Bali serta kekerabatannya dengan gen *iutA* dari negara lain. Penelitian ini menggunakan dua isolat APEC asal ayam buras di Kabupaten Tabanan dan Badung yang telah dimurnikan dan tersedia di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. DNA isolat diisolasi dengan *Chelex* 10%. Produk *polymerase chain reaction* (PCR) disekuensing di *First Base Laboratories* Malaysia dengan metode *Sanger's dideoxy nucleotide termination*. Kedua hasil sekuen gen *iutA* memiliki homologi 100% dengan panjang 250 bp. Analisis filogenik dengan 58 data gen *iutA* di *Escherichia coli* dan bakteri lain di dunia memiliki 43 situs polimorfik pada tingkat asam nukleat dan 13 di tingkat asam amino. Gen *iutA* asal Bali berada di dalam satu kelompok dengan gen *iutA* asal Brazilia (KP657535) tahun 2011, Jerman (LT599825) tahun 2016, dan Cina (CP033635) tahun 2016. Gen ini dapat digunakan sebagai marker patogenik APEC di Indonesia.

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

Abstract

Colibacillosis is an infectious disease in chickens caused by *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). The ability of APEC to cause disease depends on many pathogenic factors, one of which is the *iutA* pathogenic gene. This study was purposed to determine the DNA sequence of the APEC *iutA* gene in Bali and its kinship with the *iutA* gene from other countries. Two APEC isolates from free-range chicken in Tabanan dan Badung has been used. The isolates have been purified and were available at the Bacteriology Laboratory of Veterinary Medicine Faculty, Udayana University. *Chelex* 10% was used for DNA isolation. DNA amplification using published DNA primer has been conducted with the polymerase chain reaction (PCR) method. The PCR product was sequenced at Malaysia, *First Base Laboratories* using *Sanger's Dideoxy Nucleotide Termination* method. The *iutA* gene of both isolates can be analyzed and have 250 bp in length. Both were 100% homologous. A phylogenic test using 58 DNA sequences of *iutA* gene from *Escherichia coli* and other bacteria in the world was conducted in MEGA 5.2. All data have 43 polymorphic sites of nucleotide acid and 13 polymorphic sites of amino acid. The *iutA* gene from Bali is in one group, with the *iutA* gene from Brazil (KP657535) in 2011, Germany (LT599825) in 2016, and China (CP033635) in 2016. This gene can be used as a pathogenic marker of APEC in Indonesia.

Keywords: *Escherichia coli*; APEC; gene; pathogenic; *iutA*; phylogenic.

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit menular pada ayam adalah kolibasilosis yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*) galur patogen atau *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Infeksi penyakit ini dapat menimbulkan berbagai macam gangguan pertumbuhan dan dapat menyebabkan kematian (Tarmudji, 2003). Kolibasilosis menimbulkan kerugian pada peternakan ayam (Landman *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2012). Hal ini berdampak penting bagi peternakan ayam.

Kasus kolibasilosis telah dilaporkan di berbagai daerah di Indonesia. Penyakit ini telah ditemukan pada ayam petelur maupun pedaging di berbagai daerah (Tarmudji, 2003). Di Bali, penyakit ini ditemukan di peternakan ayam di berbagai kabupaten (Barus *et al.*, 2013). Beberapa upaya telah dilakukan untuk mengatasi penyakit kolibasilosis salah satunya dengan pemberian antibiotik. Namun, pemberian antibiotik secara terus-menerus membuat kolibasilosis mudah mengalami resistensi terhadap antibiotik tertentu (Luhung *et al.*, 2017).

Faktor gen virulensi APEC merupakan faktor yang menentukan kemampuan untuk menyebabkan penyakit. Beberapa gen ini ada di dalam plasmid. Dari beberapa gen yang ditemukan, lima gen yang umum yaitu *iutA*, *hlyF*, episomal *iss*, *iroN*, dan episomal *ompT*. Gen ini merupakan gen yang disebut sebagai marka patogenik dari APEC (Johnson *et al.*, 2008). Tingkat frekuensi deteksi gen *iutA* berbeda-beda di berbagai negara. Gen *iutA* berasosiasi dengan sifat patogenis APEC, dimana frekuensi gen patogen *iutA* pada APEC di negara lain yaitu di Amerika Serikat sebesar 79,5% (Johnson *et al.*, 2006), di Zimbabwe sebesar 80% (Mbangai dan Nyararai, 2015), di Cina sebesar 70,3% (Wang *et al.*, 2015), dan di Eropa (Perancis, Spanyol, dan Belgia) sebesar 82,7% (Schouler *et al.*, 2012). Gen *iutA* di *E.coli* galur patogen memiliki frekuensi gen *iutA* 79,5% dibandingkan dengan frekuensi gen *iutA*

pada *E.coli* komensal yang hanya 34,2% (Johnson *et al.*, 2006). Frekuensi gen marka patogenik *iutA* APEC di Indonesia belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini menganalisa gen patogenik *iutA* dari ayam buras asal Kabupaten Tabanan dan Badung, Provinsi Bali dan membandingkan gen *iutA* di Bali dengan gen *iutA* yang ada di seluruh dunia.

METODE PENELITIAN

Objek Penelitian

Sampel yang digunakan merupakan isolat *E. coli* yang berasal dari organ ayam buras penderita kolibasilosis dengan ciri-ciri bulu kusam, diare, nafsu makan menurun, kurus, pembengkakan pada daerah kepala, dan perdarahan pada jaringan subkutan. Isolat yang digunakan sebanyak dua isolat yang berasal dari Kabupaten Tabanan dan Kabupaten Badung. Isolat telah positif pada media *Eoisn Metylen Blue Agar* (EMBA), uji TSIA, SIM, Katalase, MR, Glukosa, Laktosa dan negatif dengan uji Oksidase, SCA dan VP. Isolat didapatkan dan dimurnikan di Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan metode Chelex (Walsh *et al.*, 1991). Sampel *E.coli* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang sudah berisi larutan *chelex* 10%. Larutan itu *vortex* atau *shaker* selama 15 detik, kemudian dimasukkan ke dalam *sentrifuge* selama 1 menit, dipanaskan selama 60 menit pada suhu 94°C. Prosedur diulang dua kali, lalu sampel disimpan selama satu malam pada suhu 4°C. Sampel siap digunakan untuk dilakukan tindakan PCR

Uji PCR

Gen diamplifikasi dengan menggunakan sepasang DNA primer *iutA* :
iutAF 5'-
GGCTGGACATCATGGGAACTGG -3'
dan *iutAR* 5'-

CGTCGGGAACGGGTAGAATCG -3' untuk menghasilkan pita 302 bp (Johnson *et al.*, 2006). DNA primer masing-masing sebanyak 0,5 μ L. Metode uji PCR sesuai dengan yang dilakukan oleh Brown, 1992.

Program PCR dengan aturan suhu predenaturasi 94°C selama 7 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, suhu *annealing* 55°C selama 45 detik, dan ekstensi 75°C selama 1 menit 30 detik. Siklus tersebut dilakukan sebanyak 35 kali siklus. Setelah itu perpanjangan langkah terakhir (*post* ekstensi) 75°C selama 5 menit. Suhu *annealing* ditetapkan setelah ditentukan sebelumnya di lab Biomedik Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.

Sekuensing DNA

Hasil PCR APEC yang positif *iutA* akan disekuensing DNA menggunakan metode *Sanger dedeksi termination* melalui *First Base Laboratories* Malaysia.

Analisis Data

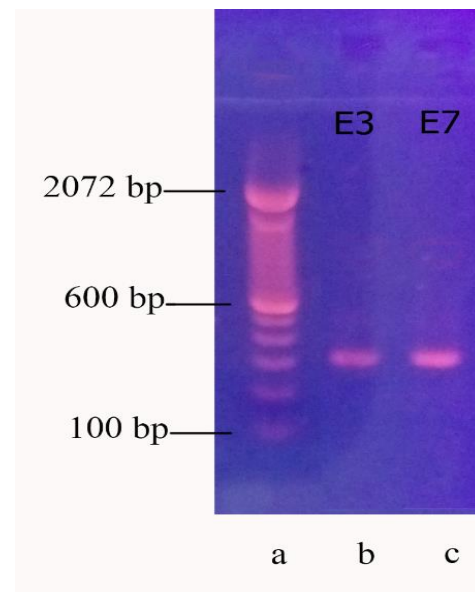
Hasil penelitian data sekuensing digunakan sebagai data primer. Data primer akan dilakukan analisis filogenik dan jarak genetik dengan data sekunder yang didapatkan dari *gene bank* dengan informasi asal negara dan kode akses (*geneid*). Analisis filogenik dan jarak genetik akan menggunakan program lunak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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

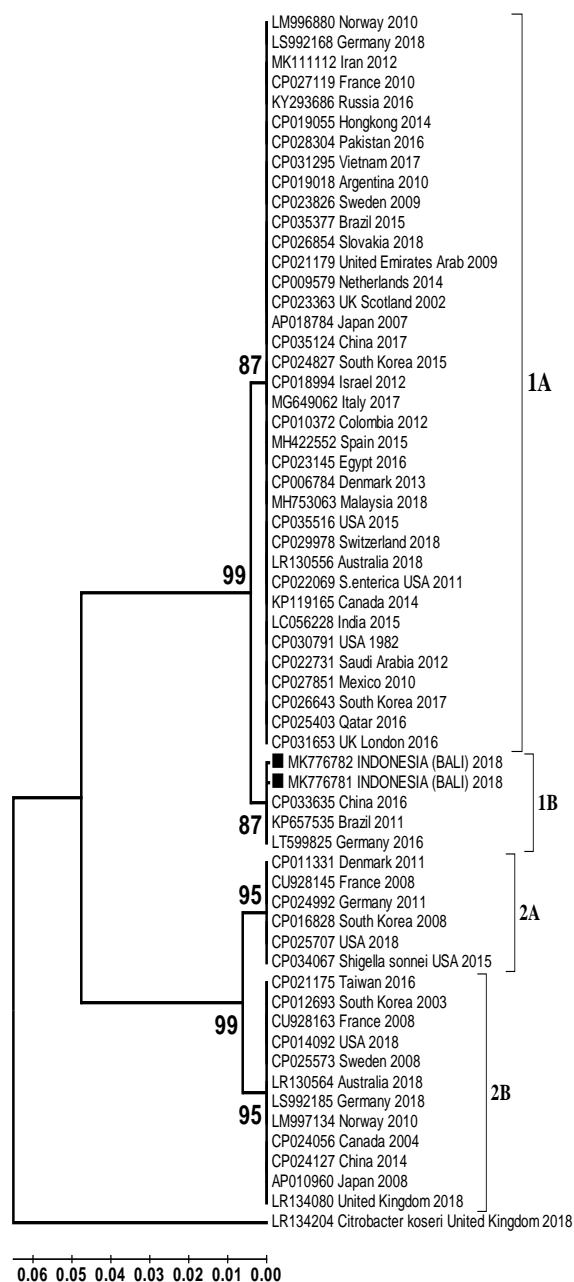
Isolat *E. coli* asal Bali yang digunakan adalah isolat APEC dengan kode isolat E3 asal Tabanan dengan kode PCR A2984 dan isolat E7 asal Badung dengan kode PCR A2985 tahun 2018. Kedua sampel berhasil diamplifikasi dengan PCR. Hasil berupa visualisasi PCR gen *iutA* APEC asal ayam buras dengan panjang 300bp terlihat pada gambar 1. Hasil sekuensing kedua gen *iutA* yang dapat dianalisis dengan baik sepanjang 250 bp. Kedua sekuen tersebut menunjukkan urutan basa gen *iutA* yang

sama (homologi 100%). Hasil sekuensing gen *iutA* diregistrasi di *genebank* dengan kode akses (*accession number*) MK776781 dan MK776782.



Gambar 1. Elektroforesis agarosa 1% (a) *Ladder Invitrogen* 100 bp, (b) sampel E3 (c) sampel E7, divisualisasi pada UV dengan pewarna *ethidium bromide*.

Data primer dan 58 data sekunder yang diunduh dari *genebank* dianalisis menggunakan metode *Uweighted Pair-Group Method with Arithmetic* (UPGMA) *tree* dengan metode *bootstrap* (500 pengulangan). Hasil berupa pohon filogenik ditampilkan pada gambar 2. Gen *iutA* dari kode akses MK776781 dan kode akses MK776782 berada dalam satu kelompok yang sama dengan gen *iutA* asal Brazilia (KP657535) tahun 2011, Jerman (LT599825) tahun 2016, dan Cina (CP033635) tahun 2016. Secara filogeni gen *iutA E.coli* dunia dikelompokkan menjadi dua kelompok besar. Pembagian kelompok genetik tersebut mempunyai dukungan nilai *bootstrap* yang kuat (99%). Kelompok 1 sebelah atas selanjutnya terbagi menjadi dua yaitu 1A dan 1B, sedangkan yang sebelah bawah menjadi 2A dan 2B. Pembagian 1A dan 1B mempunyai dukungan *bootstrap* 87%, sementara 2A dan 2B 95%. Isolat yang diperoleh dalam penelitian ini termasuk kluster 1B.



Gambar 2. Analisis filogenetik dengan metode UPGMA sekuens gen *iutA* asal Tabanan (MK776781) dan Badung (MK776782) dengan data gen *iutA* dari berbagai negara di dunia. Tanda lingkaran hitam menandakan gen *iutA* *Escherichia coli* asal Bali.

Semua data pada MEGA lalu dibuat situs polimorfik (*polymorphic sites*). Hasil analisis menunjukkan 43 situs basa yang berbeda di tingkat asam nukleat (tabel 1). Pada tingkat asam amino terdapat 13 situs polimorfik (tabel 2). Berdasarkan hasil tersebut, Substitusi T108C dan T192C unik untuk kluster isolat dalam studi ini bersama

isolat KP657535 Brazilia 2011, LT599825 Jerman 2016, dan CP033635 Cina 2016. Substitusi itu termasuk mutasi bisu (*silent mutation*), yaitu tidak menyebabkan perubahan asam amino.

Pembahasan

Gen *iutA* merupakan gen patogen pada strain APEC yang merupakan reseptor untuk *ferric aerobactin* dalam proses penyadapan zat besi pada protein sel inang (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Gen ini ditemukan dalam persentase yang cukup tinggi dari isolat kolibasilosis unggas di berbagai negara, seperti di Amerika Serikat sebesar 79,5% (Johnson *et al.*, 2006), di Zimbabwe sebesar 80% (Mbangai dan Nyararai, 2015), di Cina sebesar 70,3% (Wang *et al.*, 2015), dan di Eropa (Prancis, Spanyol, dan Belgia) sebesar 82,7% (Schouler *et al.*, 2012). Frekuensi gen ini lebih tinggi pada isolat patogen, yaitu sekitar 79,5%, dibandingkan dengan bakteri komensal, yaitu sekitar 34,2% (Johnson *et al.*, 2006).

Dalam penelitian ini, gen *iutA* berhasil diamplifikasi dengan spesifik menggunakan sepasang DNA primer gen *iutA* yang sudah dipublikasi (Johnson *et al.*, 2006). Hasil berupa pita DNA tunggal dengan panjang sekitar 302 bp. Kemudian hasil sekuensing DNA gen *iutA* yang dapat dianalisis dengan baik yaitu sepanjang 250 bp.

Sekuens gen *iutA* sampel MK776781 dari kabupaten Tabanan dan MK776782 dari kabupaten Badung tidak memiliki perbedaan urutan basa DNA. Hal tersebut membuktikan bahwa gen *iutA* 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. Disamping itu, sekuen DNA makhluk hidup cenderung stabil. Tingkat mutasi DNA *E. coli* diperkirakan $2-8 \times 10^{-4}$ (Kibota and Lynch, 1996; Boe *et al.*, 2000).

CP026854 Slovakia 2018	1A
CP027119 France 2010	1A
MK776782 INDONESIA (BALI) 2018	1B C..... C.....
MK776781 INDONESIA (BALI) 2018	1B C..... C.....
KP657535 Brazil 2011	1B C..... C.....
LT599825 Germany 2016	1B C..... C.....
CP033635 China 2016	1B C..... C.....
CP024992 Germany 2011	2A	. AC ACTAA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. . . CA
CP016828 South Korea 2008	2A	. AC ACTAA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. . . CA
CP011331 Denmark 2011	2A	. AC ACTAA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. . . CA
CP025707 USA 2018	2A	. AC ACTAA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. . . CA
CU928145 France 2008	2A	. AC ACTAA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. . . CA
CP034067 Shigella sonnei USA 2015	2A	. AC ACTAA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. . . CA
CP024056 Canada 2004	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
CP024127 China 2014	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
CP021175 Taiwan 2016	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
CP014092 USA 2018	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
CU928163 France 2008	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
LM997134 Norway 2010	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
AP010960 Japan 2008	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
CP012693 South Korea 2003	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
LR130564 Australia 2018	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
CP025573 Sweden 2008	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
LS992185 Germany 2018	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
LR134080 United Kingdom 2018	2B	. AC ACTGA. . . . TC. C. CA. ACTC. TAC. . . . A. A. . . C.
LR134204 Citrobacter koseri United Kingdom 2018	Outgroup	A. C. C. . . CTAT. CTCC. . . AC. . CTCACA. ACTT. T. CCTC.

Keterangan: K: Kelompok; Data diseleksi dari *genbank* Gen *iutA* dari kode akses MK776781 dan kode akses MK776782 berada dalam kelompok 1B

Tabel 2. Situs polimorfik gen *iutA* yang dideteksi dari *Escherichia coli* asal Bali (A2981 dan A2982) dengan data yang tersedia di *genbank* di tingkat asam amino

Geneid, Negara, Tahun	K	Urutasn Situs Asam Amino												
		1	2	3	3	3	4	6	6	6	8	8		
LC056228 India 2015	1A	R	D	G	R	T	F	N	D	A	L	G	R	F
CP021179 United Emirates Arab 2009	1A
CP018994 Israel 2012	1A
CP019018 Argentina 2010	1A
CP006784 Denmark 2013	1A
CP010372 Colombia 2012	1A
LM996880 Norway 2010	1A
CP009579 Netherlands 2014	1A

CP023826 Sweden 2009	1A
MH753063 Malaysia 2018	1A
MK111112 Iran 2012	1A
CP022731 Saudi Arabia 2012	1A
KP119165 Canada 2014	1A
CP031653 UK London 2016	1A
MH422552 Spain 2015	1A
AP018784 Japan 2007	1A
CP026643 South Korea 2017	1A
CP035516 USA 2015	1A
CP035377 Brazil 2015	1A
LR130556 Australia 2018	1A
CP035124 China 2017	1A
CP031295 Vietnam 2017	1A
CP027851 Mexico 2010	1A
LS992168 Germany 2018	1A
CP025403 Qatar 2016	1A
CP019055 Hongkong 2014	1A
CP022069 S.enterica USA 2011	1A
KY293686 Russia 2016	1A
CP023145 Egypt 2016	1A
CP023363 UK Scotland 2002	1A
CP024827 South Korea 2015	1A
CP029978 Switzerland 2018	1A
CP030791 USA 1982	1A
MG649062 Italy 2017	1A
CP028304 Pakistan 2016	1A
CP026854 Slovakia 2018	1A
CP027119 France 2010	1A
MK776782 INDONESIA (BALI) 2018	1B
MK776781 INDONESIA (BALI) 2018	1B
KP657535 Brazil 2011	1B
LT599825 Germany 2016	1B
CP033635 China 2016	1B
CP024992 Germany 2011	2A	. N . S S Y K . D . . . Y
CP016828 South Korea 2008	2A	. N . S S Y K . D . . . Y
CP011331 Denmark 2011	2A	. N . S S Y K . D . . . Y
CP025707 USA 2018	2A	. N . S S Y K . D . . . Y
CU928145 France 2008	2A	. N . S S Y K . D . . . Y
CP034067 Shigella sonnei USA 2015	2A	. N . S S Y K . D . . . Y
CP024056 Canada 2004	2B	. N . S S Y K . D . R . .
CP024127 China 2014	2B	. N . S S Y K . D . R . .
CP021175 Taiwan 2016	2B	. N . S S Y K . D . R . .
CP014092 USA 2018	2B	. N . S S Y K . D . R . .
CU928163 France 2008	2B	. N . S S Y K . D . R . .
LM997134 Norway 2010	2B	. N . S S Y K . D . R . .
AP010960 Japan 2008	2B	. N . S S Y K . D . R . .
CP012693 South Korea 2003	2B	. N . S S Y K . D . R . .
LR130564 Australia 2018	2B	. N . S S Y K . D . R . .

CP025573 Sweden 2008	2B . N . S S Y K . D . R . .
LS992185 Germany 2018	2B . N . S S Y K . D . R . .
LR134080 United Kingdom 2018	2B . N . S S Y K . D . R . .
LR134204 Citrobacter koseri United Kingdom 2018	Outgroup Q . D S A Y K N D F . L .

Keterangan: K: Kelompok; Data diseleksi dari *genbank*

Hasil analisis situs polimorfik gen *iutA* menunjukkan 43 situs polimorfik ditingkat asam nukleat dan 13 situs ditingkat asam amino dari 61 sekuens yang ada. Gen *iutA* asal Bali memiliki homologi 100% dengan gen *iutA* asal KP657535 Brazilia (2017), LT599825 Jerman (2016), dan CP033635 Cina (2016). Hal ini menunjukkan kekerabatan gen *iutA* *E. coli* asal Bali dengan negara tersebut. Asal-usul gen *iutA* *E. coli* Bali sama dengan isolat dari tiga negara tersebut. Hal tersebut dapat terjadi karena DNA *E. coli* memiliki kemungkinan yang sangat kecil untuk mengalami mutasi

Penelitian tentang gen *iutA* harus dilakukan di seluruh provinsi di Indonesia untuk mengetahui frekuensi gen *iutA* pada APEC. Kajian lebih lanjut tentang gen *iutA* dan gen patogenik lainnya dapat membantu untuk pengembangan obat antimikrobal yang secara khusus menargetkan *E. coli* patogen atau APEC. Selain itu kajian tentang gen patogenik APEC dapat membantu untuk mendiagnosis secara cepat. Kajian lebih lanjut tentang sifat gen patogenik APEC dan kerja sistem imun unggas dapat membantu untuk pengembangan vaksin APEC yang akan sangat menguntungkan peternakan ayam.

Beberapa penelitian 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). Vaksin *Poulvac Escherichia coli* yang menghilangkan gen *aroA* pada serotipe O78 (Uotani *et al.*, 2017). Gen *iutA* memiliki potensi yang cukup besar untuk dikembangkan sebagai vaksin APEC. Hal ini dikarenakan persentase gen *iutA* pada isolat APEC cukup tinggi di berbagai negara.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Gen *iutA* dapat dideteksi dari dua isolat *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) asal ayam buras di Tabanan dan Badung tahun 2018. Kedua isolat tersebut mempunyai gen *iutA* dengan sekuens yang sama (homologi 100%). Hasil analisis filogenik gen *iutA* asal Tabanan dan Badung dengan gen *iutA* dari seluruh negara menunjukkan kekerabatan dengan gen *iutA* isolat *E. coli* asal Brazilia (KP657535) tahun 2011, Jerman (LT599825) tahun 2016, dan Cina (CP033635) tahun 2016.

Saran

Penelitian dan pendataan perlu dilakukan di seluruh provinsi di Indonesia tentang gen *iutA* dan gen patogenik APEC lainnya. Selain itu, uji biologis perlu juga dilakukan untuk mengetahui dampak gen *iutA* pada sifat patogenik *E. coli*.

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. *Indonesia Medicus Veterinus.* 2(5): 538-545.
- Brown TA. 1992. *Genetics: Molecular Approach, Second Edition.* Chapman & Hall, London.
- Boe L, Danielsen M, Knudsen S, Petersen JB, Maymann J, Jensen PR. 2000. The frequency of mutators in populations of *Escherichia coli*. *Mutation Res. Fund. Mol. Mechanisms Mutagenesis.* 448(1): 47-55.
- Guabiraba R, Schouler C. 2015. Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol. Letters.* 362(12): 1-8.
- Handoyo D, Rudiretna A. 2000. Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas,* 9(1):17-29
- 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 TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberg 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.
- Kabir SML. 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environ. Res. Pub. Health.* 7(1): 89-114.
- Kibota TT, Lynch M. 1996. Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*. *Nature.* 381(6594): 694-696.
- Landman WJMM, van Eck JHH. 2016. The incidence and economic impact of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. *Avian Pathol.* 44(5): 370-378.
- Lau GL, Sieo CC, Tan WS, Ho YW. 2012. Characteristic of phage effective for colibacillosis control in poultry. *J. Sci. Food Agric.* 92(13): 57-63.
- Luhung YGA, Suarjana IGK, Gelgel KTP. 2017. Sensitivitas isolat *escherichia coli* patogen dari organ ayam pedaging terinfeksi koliseptisemia terhadap oksitetrasiklin, ampisilin dan sulfametoksazol. *Buletin Veteriner Udayana.* 9(1): 60-66.
- 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(1): 192-199.
- Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* 36(2): 241-256.
- Schouler C, Schaeffer B, Brée A, Mora A, Dahbi G, Biet F. 2012. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 50(5): 1673-1678.
- Tabrah FL. 2011. Koch's postulates, carnivorous cows, and tuberculosis today. *Hawai'i Med. J.* 70(7): 144-148.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731-2739.
- Tarmudji. 2003. Kolibasiolosis pada ayam: etiologi, patologi dan pengendaliannya. *Wartazoa* 13(2):65-73.
- Uotani Y, Kitahara R, Imai T, Tsutsumi N, Sasakawa C, Nagai S, Nagano T. 2017. Efficacy of an avian colibacillosis live vaccine for layer breeder in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 79(7): 1215-1219.

- 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.
- Wang J, Tang P, Tan D, Wang L, Zhang S, Qiu Y, Dong R, Liu W, Huang J, Chen T, Ren J, Lil C, Liu H. 2015. The pathogenicity of chicken pathogenic *Escherichia coli* is associated with the numbers and combination patterns of virulence-associated genes. *J. Vet. Med.* 5: 243-254.
- Whittam TS, Wilson RA. 1988. Genetic relationships among pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56(9): 2458–2466.