

Deteksi dan Sekuensing Gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* pada *Avian Pathogenic Escherichia coli*

(DETECTION AND SEQUENCING GENES IRON, IUTA, AND HLYF IN AVIAN PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI)

Nyoman Anandiya Ramaditya^{1*}, I Nengah Kerta Besung²,
I Gusti Ngurah Kade Mahardika²

¹PT. Tekad Mandiri Citra, Jl. Siulan Gg. Sekar Sari IV A No. 4B, Penatih, Denpasar Timur, Bali, Indonesia 80238;

²Laboratorium Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali, Indonesia 80225;

³Laboratorium Virologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali, Indonesia 80225.

*Email: anandiya.ramaditya@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian telah dilakukan untuk mendeteksi gen patogenik *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) yaitu gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* pada bakteri *Escherichia coli* yang diisolasi dari organ pada ayam yang sakit di Bali, serta untuk mengetahui hubungan filogenetik antara gen penanda patogenik di Bali dengan di negara lain di dunia. Penelitian ini dilakukan secara eksploratif observasional dengan menggunakan enam isolat bakteri *Escherichia* dengan kode E2, E3, E7, E8, E9, dan E10 yang diisolasi dari ayam buras pada tahun 2018. Semua gen isolat dideteksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil penelitian menunjukkan semua sampel positif memiliki gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*. Sekuensing pada ketiga gen diperoleh hasil, bahwa gen *ironN* yang terbaca dengan baik adalah 659 bp, gen *hlyF* adalah 518 bp, dan gen *iutA* adalah 250 bp. Hasil analisis sekuens memiliki DNA yang homolog. Berdasarkan hasil analisis filogenetik, bakteri *E. coli* patogen di Bali berada dalam satu kluster dengan bakteri *E. coli* patogen yang ada di dunia.

Kata kunci: *iroN*; *iutA*; *hlyF*; *Escherichia coli* patogen; Bali

ABSTRACT

Research has been carried out to detect pathogenic gene markers of *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) *iroN*, *iutA*, and *hlyF* in *Escherichia coli* bacteria isolated from organs of sick chickens in Bali, and to determine phylogenetic relationships between those marker genes in Bali and in the other countries in the world. Six isolates of *E. coli* bacteria with codes E2, E3, E7, E8, E9, and E10 were used in this study. The isolates were isolated from domestic chicken in 2018. All genes were detected using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method. The genes of *iroN*, *iutA*, and *hlyF* could be detected from all isolates. Well readable sequence of *iroN*, *hlyF*, and *iutA* was 659 bp, 518 bp, and 250 bp, respectively. All three genes were homogenous. Phylogenical analysis shows that all pathogenic markers share same cluster with the pathogenic *E. coli* from all countries in the world.

Keywords: *iroN*; *iutA*; *hlyF*; pathogenic *Escherichia coli*; Bali.

PENDAHULUAN

Koliseptisemia adalah penyakit penting yang ditimbulkan oleh strain *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) (Nakazato *et al.*, 2009). APEC merupakan agen infeksius ekstra intestinal yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) pada unggas yang dimiliki oleh

kelompok *Extraintestinal Pathogenic E. coli* (ExPEC) (Filho *et al.*, 2015). Infeksi koliseptisemia pada unggas terjadi pada usia 4 sampai 9 minggu, dengan mortalitas sebesar 20% (Ewers *et al.*, 2007). Landman dan Eck (2016) menyatakan bahwa data tentang kuantifikasi kerugian karena kolibasilosis pada unggas belum banyak

dilaporkan padahal kerugian akibat penyakit ini dapat dirasakan langsung oleh peternak.

Avian Pathogenic E. coli (APEC) memberikan dampak kerugian besar dalam industri unggas. Pada ayam pedaging, *E. coli* strain APEC juga menyebabkan selulitis yang ditandai oleh dermatitis nekrotik pada perut dan paha. Lesi tersebut menyebabkan karkas yang terinfeksi harus diafkir (Moulin-Schouleur *et al.*, 2007). Infeksi APEC pada ayam petelur juga menyebabkan penurunan produksi dan kualitas telur. Konsumsi unggas yang kurang matang dapat menginfeksi manusia. APEC dilaporkan dapat menjadi *E. coli* patogen ekstraintestinal pada manusia (Johnson *et al.*, 2008).

Selama ini, diagnosis *E. coli* dilakukan dengan beberapa metode konvensional seperti metode biakan (kultur), uji biokimiawi, dan uji biologis. Cara tersebut memerlukan waktu lama dan hasil yang diperoleh tidak spesifik (Sudrajat *et al.*, 2000). Teknik diagnosa dengan teknik biologi molekuler, yaitu dengan cara amplifikasi gen yang spesifik yang terdapat pada genom bakteri *E. coli* telah terbukti lebih sensitif dan spesifik (Radji *et al.*, 2010).

Kemampuan APEC (*Avian Pathogenic E. coli*) menyebabkan penyakit tergantung banyak faktor virulensi. Faktor virulensi APEC dikendalikan oleh beberapa gen yang terdapat di dalam plasmid (Ashraf *et al.*, 2013). Menurut penelitian Rodriguez *et al.* (2005), gen-gen tersebut antara lain *cvaC*, *tsh*, *sitA*, *iutA*, *ompT*, dan *iroN* yang ditemukan pada plasmid ColV. Pada penelitian Johnson *et al.* (2006) gen yang ditemukan antara lain *etsABCD*, *cluster eitABC*, dan *hlyF*. Penelitian Johnson *et al.* (2006) juga menyatakan bahwa lebih dari 80% isolat-isolat *E. coli* yang mempunyai gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* menyebabkan koliseptisemia pada unggas.

Kasus kolibasilosis pada unggas yang terinfeksi telah banyak dilaporkan di berbagai daerah di Indonesia (Weidosari dan Wahyuwardani, 2015; Hidayati *et al.*,

2016; Jamin *et al.*, 2015; Wibowo dan Wahyuni, 2008; Poernomo dan Juarini, 1996), namun laporan tentang gen penanda APEC belum pernah dilaporkan di Indonesia. Di Bali, penyakit kolibasilosis ditemukan di berbagai peternakan unggas (Barus *et al.*, 2013). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mendeteksi gen patogenik APEC (*iroN*, *iutA*, dan *hlyF*) pada ayam di Provinsi Bali serta untuk mengetahui hubungan genetik dan filogenetik antara gen penanda patogenik dari APEC di Bali dengan gen penanda patogenik APEC di negara lain.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *E. coli* galur patogen penyebab *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) pada ayam. Isolat berasal dari kasus lapangan dan telah dimurnikan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi diperoleh sebanyak enam isolat. Isolat positif memiliki kode isolat E2, E3, E7, E8, E9, E10 yang diisolasi dari ayam buras. Keenam isolat tersebut berasal dari kabupaten Tabanan (E2, E3, E8, E9, E10) dan Badung (E7) pada tahun 2018.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan larutan *chelex* 10% (Walsh *et al.*, 1991). Bakteri *E. coli* pada media cair diambil sebanyak 200 µl kemudian dipindahkan ke dalam *microtube* yang telah berisi larutan *chelex* 10%. Larutan *chelex* 10% yang sudah berisi sampel di *vortex* selama lima menit, kemudian disentrifugasi selama satu menit. Selanjutnya larutan *chelex* 10% yang sudah berisi sampel dipanaskan pada *heating blok* pada suhu 94°C kurang lebih selama 45 menit, setelah itu sampel siap untuk dilakukan amplifikasi DNA dengan PCR.

Reaksi PCR dibuat volume 10 µl dengan komposisi 3 µl *dd H₂O*, 5 µl 2x *Taq plus PCR Mastermix TIANGEN*[®], 0,5 µl primer *forward*, 0,5 µl primer *reverse*, dan 1 µl *template DNA*. Kondisi *thermal cycler* dengan parameter predenaturasi pada suhu

94°C selama tujuh menit, denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* 50-59°C selama 45 detik, ekstensi 72°C selama satu menit 30 detik, siklus diulang sebanyak 35 kali, dan *post* ekstensi pada 72°C selama lima menit. Masing-masing

primer dilakukan kalibrasi terlebih dahulu untuk menentukan suhu *annealing* yang sesuai. Dalam penelitian ini menggunakan tiga pasang primer nukleotida dengan perbedaan suhu *annealing* sebagai berikut.

Tabel 1. Sekuen nukleotida DNA primer *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*

No.	Nama	Sekuen DNA (5'-3')	Target (bp)	Suhu <i>annealing</i> (°C)
1	<i>IroNF</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	667	59
	<i>IroNR</i>	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
2	<i>IutAF</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	302	55
	<i>IutAR</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG		
3	<i>HlyF</i>	GGCGATTTAGGCATTCCGATACTC	599	50
	<i>HlyR</i>	ACGGGGTCGCTAGTTAAGGAG		

DNA hasil amplifikasi divisualisasi dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa 1% sebanyak 0,75g dalam 10X buffer TBE sebanyak 75ml. Proses Elektroforesis dilakukan pada mesin elektroforesis (*BIO-RADTM PowerPac*) pada tegangan 100 V, 400mA, selama 30 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, pita-pita fragmen DNA diamati dengan UV transilluminator (*BIO-RADTM UVITEC*) untuk mengetahui panjang DNA. Ukuran DNA hasil PCR dibandingkan dengan penanda (*ladder*) untuk selanjutnya didokumentasikan menggunakan kamera.

Sekuensing DNA

Primer yang digunakan untuk amplifikasi digunakan juga untuk sekuensing. Proses sekuensing DNA dilakukan di PT Genetika Science Indonesia.

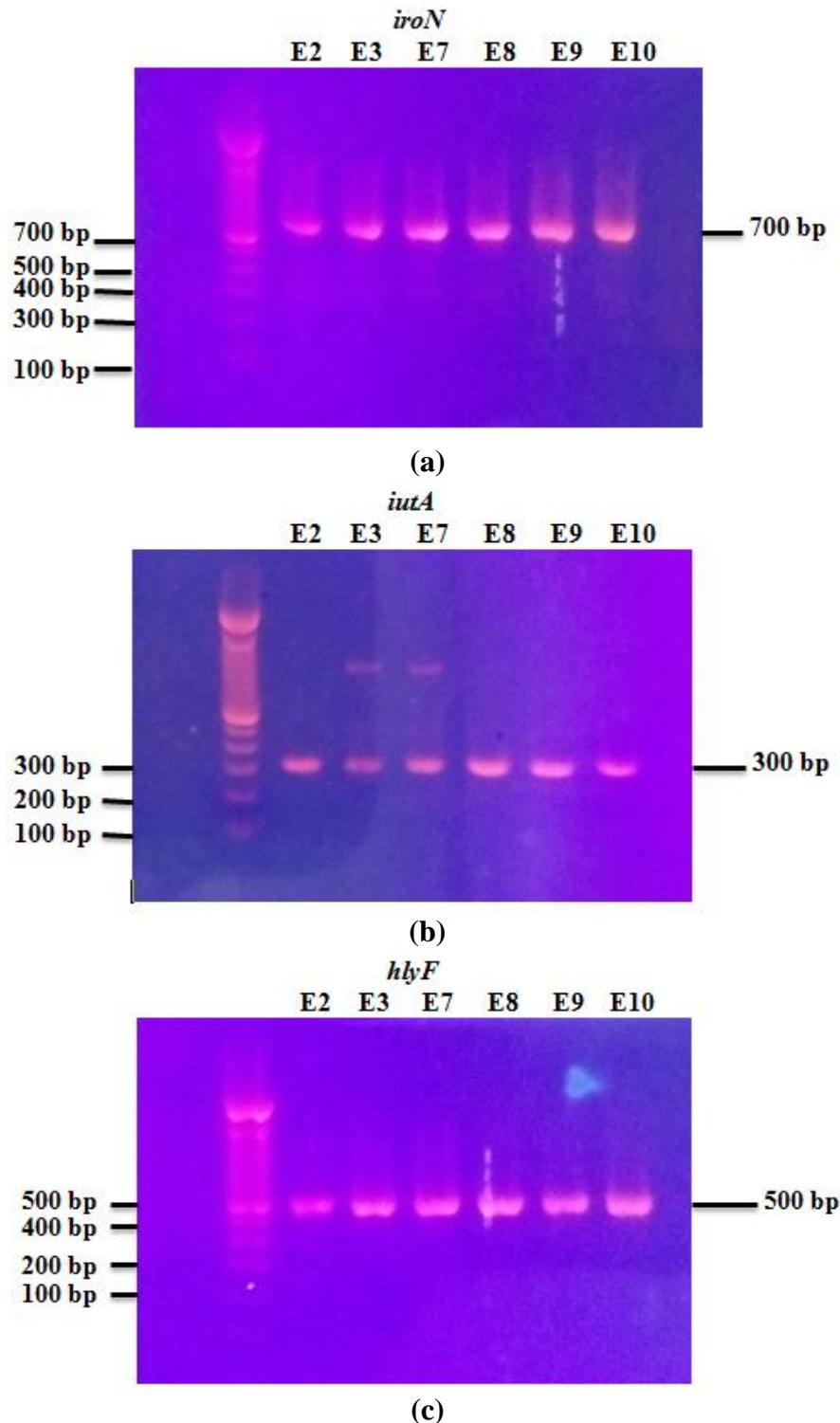
Analisis Data

Sekuens nukleotida gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* bakteri *E. coli* dari ayam penderita APEC yang diperoleh dari laboratorium bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana disepadankan dengan Clustal W dari program *MEGA 6.0* (Tamura *et al.*, 2013). Data yang dianalisis adalah konfirmasi hasil sekuensing dengan program *Basic Local Alignment Search*

Tool (BLAST), analisis filogenetik dengan nukleotida dan asam amino yang tersedia di *GenBank*. Sekuens gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* dari berbagai negara diunduh dari *GenBank*. Hubungan kekerabatan (estimasi jarak genetik dan filogenetik) dianalisis dengan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)*. Jarak evolusi dihitung menggunakan metode *Kimura-2*. Analisis secara filogenetik dilakukan dengan menggunakan program *MEGA 6.0 Software* (Tamura *et al.*, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri *E. coli* dari laborototium bakteriologi Fakultas kedokteran Hewan Universitas Udayana berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi diperoleh sebanyak enam isolat. Isolat positif memiliki kode isolat E2, E3, E7, E8, E9, E10 yang diisolasi dari ayam buras. Keenam isolat tersebut berasal dari kabupaten Tabanan (E2, E3, E8, E9, E10) dan Badung (E7) pada tahun 2018. Gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* dapat dideteksi dari semua isolat positif dengan PCR. Gambar 1 merupakan gambar hasil uji PCR dengan menggunakan primer spesifik *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*.



Gambar 1. Hasil elektrofesis PCR menggunakan gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*. Ket: (a) gen *iroN*, (b) gen *iutA*, dan (c) gen *hlyF*

Hasil sekuensing menggunakan ketiga gen yaitu *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*. diperoleh hasil gen *iroN* yang terbaca dengan baik adalah 659 bp, gen *iutA* adalah 250 bp, dan gen *hlyF* adalah 518 bp. Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri *E. coli*

mempunyai sekuens yang sama pada masing-masing gen (homologi 100%). Sampel E10 asal Kabupaten Tabanan teramplifikasi pada uji PCR, tetapi pada hasil sekuensing tidak teranalisis secara baik untuk itu sampel E10 tidak digunakan

dalam analisis filogenetik. Sampel E10 memiliki sekuen yang sama dengan sampel lainnya. Data sekuen semua gen tersebut telah diregistrasi di *Genbank* dengan kode akses (*accession number*) akan dipaparkan berikut ini.

Hasil data sekuen gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* untuk masing-masing sampel sudah teregistrasi di *Genbank* dengan *accession number* untuk gen *iroN* MK776774 – MK776779, untuk gen *iutA* adalah MK776780 – MK 776785, dan untuk gen *hlyF* adalah MK776769 - MK776773. Data hasil sekuen masing-masing gen digunakan sebagai acuan dalam pengunduhan data sekunder gen bakteri *E. coli* yang tersedia di *GenBank*. Data sekunder yang diunduh dari *GenBank*, dikelompokkan menggunakan metode *neighbor-joining* dengan metode *bootstrap* (500 pengulangan). Data sekunder diseleksi dengan cara mengambil satu negara dengan tahun isolasi terbaru dan terlama pada masing-masing kelompok, serta bakteri lainnya yang memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan masing-masing gen yang dimiliki oleh *E. coli*.

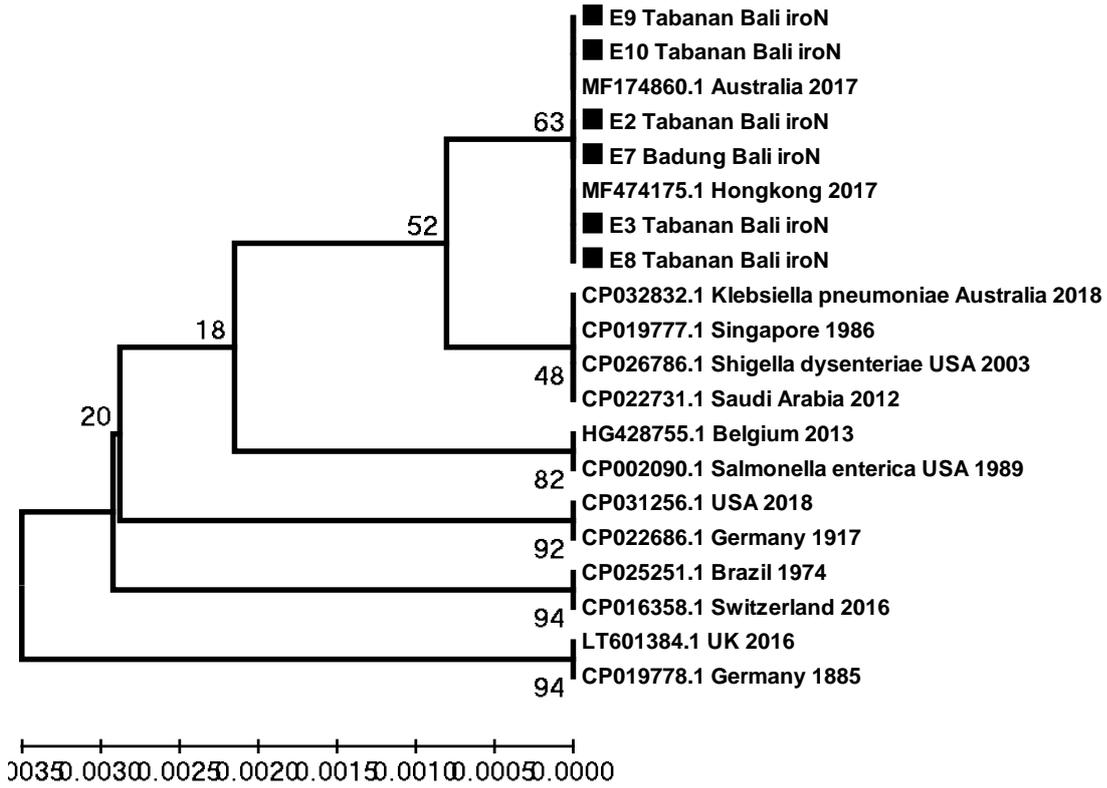
Hasil data setelah pengelompokan, dikelompokkan kembali ke dalam beberapa grup dan data diluar kelompok (*outgroup*). Data hasil pengeompokan secara grup diseleksi secara acak untuk masing-masing grup, pengecualian dilakukan terhadap gen *iroN* yang berasal dari spesies selain *Escherichia coli* untuk tetap dipertahankan. Tahapan selanjutnya data dianalisis filogenik kembali dengan menggunakan *Neighbor-joining tree* dengan metode *bootstrap* (500 pengulangan). Hasil berupa pohon filogenik dari masing-masing gen ditampilkan pada gambar 2.

Laporan tentang gen penanda APEC belum pernah dilaporkan di Bali ataupun di Indonesia. Pada penelitian ini keenam sampel isolat bakteri *E. coli* yang diisolasi dari ayam buras yaitu E2, E3, E8, E9, dan E10 asal Kabupaten Tabanan dan E7 asal Kabupaten Badung diisolasi menggunakan

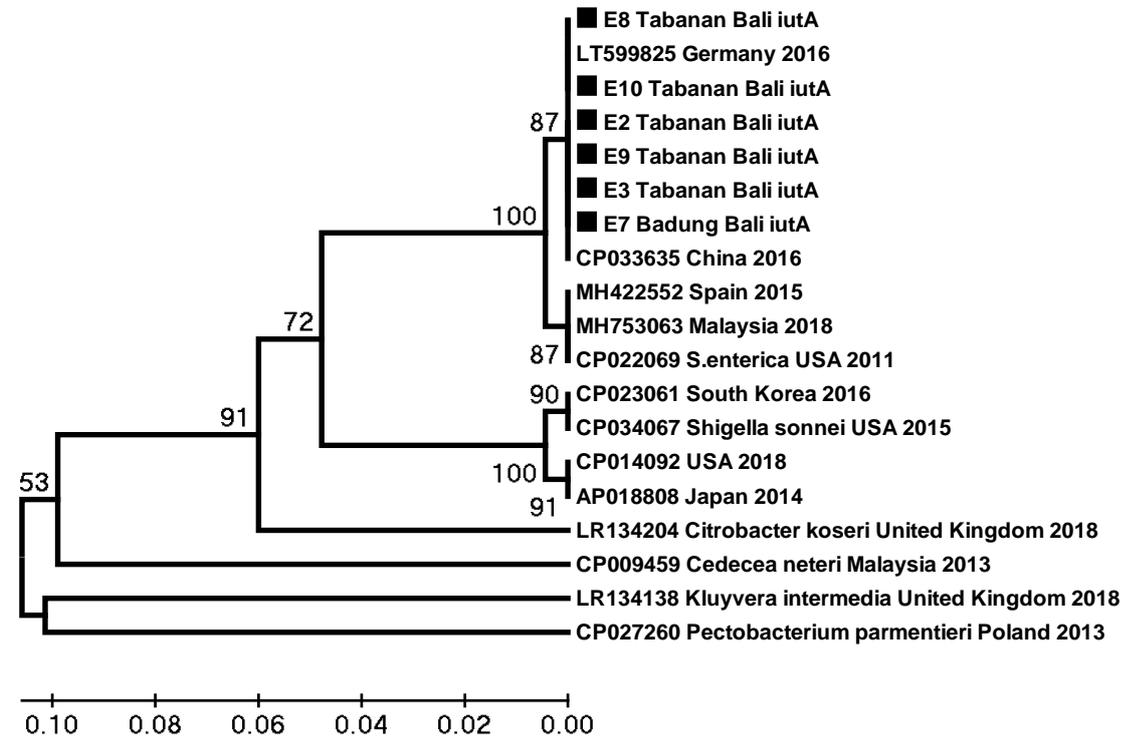
metode *cheelex*. Sampel E2, E3, E8, E9, dan E10 asal Kabupaten Tabanan dan E7 asal Kabupaten Badung positif memiliki gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*. Hasil ini membuktikan bahwa isolat lapangan yang diuji menunjukkan bakteri yang patogen dan dapat menimbulkan infeksi pada hewan. Penelitian Johnson *et al.* (2006) menyatakan bahwa lebih dari 80% isolat-isolat *E. coli* yang memiliki gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* berperan dalam koliseptisemia pada unggas. Vandekerchove *et al.* (2005) juga menyatakan bahwa gen *iutA* merupakan gen patogenik penyebab APEC. Pada penelitian Ashraf *et al.* (2013) juga dikatakan bahwa gen *iutA* dapat ditemukan pada 80% unggas penderita APEC. Penelitian Filho *et al.* (2015) menyatakan bahwa dari 994 sampel APEC yang diuji, sebesar 83% disebabkan oleh gen *iroN* dan *hlyF*.

Pada Penelitian ini ketiga gen yaitu *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* berhasil diamplifikasi menggunakan DNA primer yang telah dipublikasikan sebelumnya, yaitu untuk gen *iroN* pada penelitian Mellata *et al.* (2009), gen *iutA* pada penelitian Johnson *et al.* (2006), sedangkan gen *hlyF* pada penelitian (Morales *et al.*, 2004). Hasil sekuensing pada ketiga gen yaitu *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* diperoleh hasil gen *iron* yang terbaca dengan baik adalah 659 bp, gen *hlyF* adalah 518 bp, dan gen *iutA* adalah 250 bp.

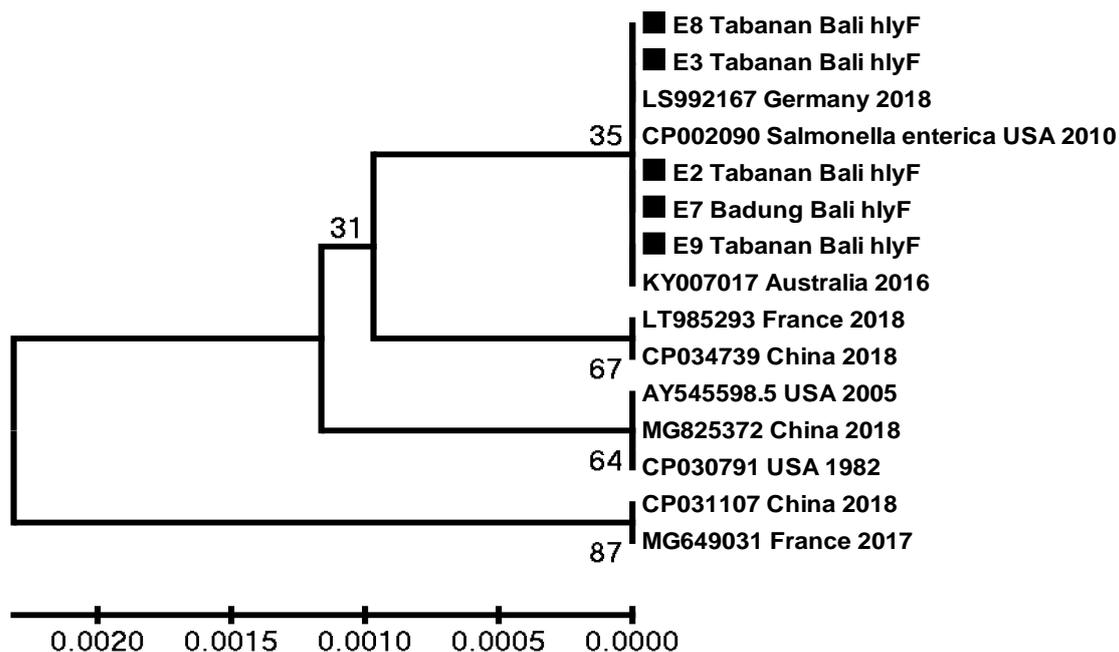
Penelitian Vidotto *et al.* (1991) dan Johnson *et al.* (2006) menyatakan bahwa gen *iroN* merupakan gen patogen pada APEC yang berperan dalam reseptor *siderophore* aerobactin untuk proses penyadapan zat besi pada protein sel inang, dan gen *iroN* juga berperan dalam mekanisme transfer senyawa di dalam sel. Gen *iutA* merupakan gen patogen pada strain APEC yang berperan dalam reseptor *siderophore* aerobactin ferric (Fe³⁺) dalam proses penyadapan zat besi pada protein sel inang (Rodriguez *et al.*, 2005).



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. Hasil analisis filogenik gen *iroN* (a), gen *iutA* (b), dan gen *hlyF* (c)

Ket: Analisis filogenetik menggunakan metode UPGMA untuk data primer sekuens masing-masing gen dengan data gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* dari berbagai negara di dunia yang telah diseleksi secara acak. Data dianalisis dengan metode *bootstrap* sebanyak 500 pengulangan, dimana presentase ulangan ditampilkan di sebelah cabang. Pohon ditarik sesuai skala dalam satuan yang sama untuk mengetahui jarak evolusi pada pohon filogenetik. Jarak evolusi dihitung dengan menggunakan metode Kimura-2 dan berada dalam satuan jumlah substitusi dasar per situs. Analisis evolusi dilakukan dalam MEGA 6.

Gen *hlyF* merupakan gen patogen pada strain APEC yang berperan dalam pembentukan membran luar pada bakteri *E. coli*, penyusunan protein *hemolysin F* yang berfungsi melisis sel darah merah inang (Rodriguez *et al.*, 2005).

Hasil Analisis Sekuens E2, E3, E8, E9, E10 asal Kabupaten Tabanan dan E7 asal Kabupaten Badung positif memiliki homologi DNA 100% untuk masing-masing gen yaitu *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*. Hasil ini menunjukkan bahwa APEC yang bersirkulasi di Bali berasal dari satu asal usul yang sama, hal ini disebabkan karena DNA cenderung stabil. Denamur dan Matic (2006) menyatakan bahwa tingkat mutasi DNA makhluk hidup diperkirakan 1 kali 10^{-6} .

Pada penelitian ini, enam isolat yang dipelajari positif gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*. Pada hasil analisis filogenetik dan situs

polimorfik, gen *iroN* memiliki homologi dengan gen *iroN* MF174860 asal Australia (2017) dan MF474175 asal Hongkong (2017). Gen *iutA* memiliki homologi dengan gen *iutA* CP033635 asal China (2016) dan LT599825 asal Jerman (2016). Gen *hlyF* memiliki homologi dengan gen *hlyF* LS992167 asal Jerman (2016) dan KY007017 asal Australia (2016). Berdasarkan pernyataan tersebut, bakteri *E. coli* patogen di Bali berasal dari satu cluster yang sama dengan bakteri *E. coli* patogen yang ada di dunia.

Pada hasil analisis filogenetik gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* juga ditemukan pada spesies bakteri lainnya. Hal ini dapat terjadi karena bakteri *E. coli* mampu melakukan pertukaran materi genetiknya yang diperantarai oleh plasmid ke bakteri *E. coli* atau spesies bakteri lainnya secara horizontal melalui proses konjugasi,

trasformasi, dan transduksi (Ochman *et al.*, 2000). Proses tersebut mengakibatkan gen patogenik dari bakteri *E. coli* dapat berpindah ke spesies bakteri lainnya.

Penelitian ini selain mengisolasi bakteri *E. coli* asal organ, juga melakukan uji biologi molekuler pada sampel feses ayam terinfeksi. Sampel feses ayam buras berasal dari desa Buruan Kabupaten Tabanan. Isolasi dilakukan untuk mengetahui apakah gen patogenik *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* juga dapat diisolasi dari feses ayam yang terinfeksi APEC. Pada Hasil PCR beberapa sampel menunjukkan hasil positif memiliki gen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*, tetapi pada Isolat *E. coli* 28 menunjukkan hasil negatif terhadap gen *hlyF*.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen penanda APEC dapat digunakan dalam penanda patogenik yang tepat untuk diagnosis APEC pada ayam di Bali dan di Indonesia. Gen penanda patogenik APEC yaitu *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* berhasil ditemukan dari hasil isolasi organ ayam di Bali (Tabanan dan Badung). Penemuan gen patogen tersebut diharapkan dapat mempermudah dalam diagnosis, tindakan pengobatan, dan pencegahan pada kasus APEC di Bali.

SIMPULAN

Bakteri *E. coli* yang diisolasi dari organ ayam di Bali (Tabanan dan Badung) memiliki gen patogenik *iroN*, *iutA*, dan *hlyF*. Isolat bakteri *E. coli* di Bali (Tabanan dan Badung) mempunyai sekuens yang sama pada masing-masing gen dan satu cluster yang sama dengan bakteri *E. coli* patogen yang ada di dunia.

SARAN

Penelitian lanjutan terhadap deteksi gen penanda patogenik APEC di seluruh kabupaten di Bali ataupun di seluruh Indonesia harus terus dilakukan, sehingga informasi mengenai gen penanda patogenik lainnya dapat diketahui. Uji biologis terhadap gen patogen *iroN*, *iutA*, dan *hlyF* juga perlu dilakuka sebagai uji prosedur

dasar untuk membuktikan patogenitas suatu agen penyakit.

UCAPAN TERIMAKASIH

Melalui kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, dan dosen pembimbing atas fasilitas, arahan dan kesempatan yang diberikan. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada *The Professor and Promotion Project* Universitas Udayana (DIPA-PNPB Tahun 2018, 383-1/UN14.4A/LT/2018) yang telah memeberikan dukungan dalam berlangsungnya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashraf HM, Ghanem IA, Eid AM, Sherwood JS, Li G, Nolan LK, Logue CM. 2013. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt. *Avian Dis.* 57(3): 602-611.
- Barus DO, Gelgel KTP, Suarjana IGK. 2013. Uji kepekaan bakteri *Escherichia coli* asal ayam pedaging terhadap antibiotik Doksisisiklin, Gentamisin, dan Tiamfenikol. *Indo. Med. Vet.* 2(5): 538-545.
- Denamur E, Matic I. 2006. Micro review: Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol. Microbiol.* 60(4): 820-827.
- Ewers C, Wilking H, Kiessling S, Ant ao EM, Laternus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, B ohnke U, Steinr uck H, Philipp HC. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 163-176
- Filho HCK, Carvalho D, Grassotti TT, Soares BD, Rossato JM, Cunha AC, Cavalli LS, Brito KCT, Brito BG. 2015. Avian pathogenic *Escherichia coli* – methods improved diagnosis. *World's Poult. Sci. J.* 71: 249-258.

- Hidayati SC, Darmawi, Rosmaidar, Armansyah T, Dewi M, Jamin F, Fakhrurrazi. 2016. Pertumbuhan *Escherichia Coli* yang diisolasi dari feses anak ayam broiler terhadap ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*). *J. Med. Vet.* 10(2): 101-104.
- Jamin F, Abrar M, Dewi M, Yanrivina SVS, Fakhrurrazi, Manaf ZF, Syafruddin. 2015. Infeksi bakteri *Escherichia Coli* pada anak ayam kampung (*Gallus domesticus*) di Pasar Lambaro Aceh Besar. *J. Med. Vet.* 9(1): 54-56.
- 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.
- Landman WJM, Eck JHH. 2016. The incidence and economic impact of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. *Avian Pathol.* 44(5): 370-378.
- Lynne AM, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Johnson TJ, Johnson SJ, Sinha AS, Lynner DK, Moon HW, Jordan DW, Logue CM, Foley SL, Nolan LK. 2012. Recombinant *iss* as a Potential Vaccine for Avian Colibacillosis. *Avian Disease.* 56: 192-199
- Mellata M. 2009. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* x7122 (O78:K80:H9). *Plos One.* 4(1): 1-12
- Morales C, Lee MD, Hofacre C, Maurer JJ. 2004. Detection of A novel virulence gene and a *Salmonella* virulence homologue among *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Foodborne Pathog. Dis.* 1(3): 160-165.
- Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouleur C. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3366-3376.
- Nakazato G, Tatiana AC, Eliana GS, Brocchi M, Silveira WD. 2009. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesq. Vet. Bras.* 29(7): 479-486.
- Radji M, Puspaningrum A, Sumiati A. 2010. Deteksi cepat bakteri *Escherichia Coli* dalam sampel air dengan metode *Polymerase Chain Reaction* menggunakan primer *16e1* dan *16e2*. *Makara. Sains.* 14(1): 39-43.
- Rodriguez KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* 36: 241-256.
- Sudrajat D, Maria LR, Suhadi F. 2000. Deteksi cepat bakteri *Escherichia coli* enterohemoragik (Ehek) dengan metode PCR (Polymerase Chain Reaction). *Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi.* Jakarta
- Sutrisno IK, Arundina I, Sosiawan A. 2013. Identifikasi bite marks dengan ekstraksi DNA metode chelex. *Dental J.* 46(2): 107-112.
- Tabrah FL. 2011. Koch's postulates, carnivorous cows, and tuberculosis today. *Hawai. Med. J.* 70(7): 144-148.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Vidotto M, Cacao CJM, Goes CR, Santos DS. 1991. Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of

- Escherichia coli* avian strains. *J. Med. Biol. Res.* 24: 677–685.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi. 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques.* 10: 506-513.
- Weidosari E, Wahyuwardani S. 2015. Studi kasus penyakit ayam pedaging di Kabupaten Sukabumi dan Bogor. *J. Ked. Hewan.* 9(1): 9-13.
- Wibowo MH, Wahyuni AETH. 2008. Studi patogenesisitas *Escherichia coli* isolat unggas pada ayam pedaging umur 15 hari. *J. Vet.* 9(2): 87-93.