

## **POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) UNTUK IDENTIFIKASI GEN *bfpA*, *stx1*, dan *stx2* DARI BAKTERI *Escherichia coli* YANG TERISOLASI DARI SPESIMEN USAP DUBUR PENJAMAH MAKANAN DI KOTA DENPASAR TAHUN 2015**

**I Gusti Agung Indah Pradnyani R.S<sup>1</sup>, Ni Nyoman Sri Budayanti<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

<sup>2</sup>Bagian/SMF Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah

Email: indah.pradnyani@gmail.com

### **ABSTRAK**

*Diarrheagenic Escherichia coli* (DEC) merupakan bakteri penyebab tersering pada diare yang terkait dengan *foodborne disease*. Penjamah makanan, sebagai seseorang yang terlibat dalam proses penanganan makanan, berperan besar dalam transmisi diare, salah satunya adalah sebagai pembawa (*carrier*) DEC. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen *bfpA*, *stx1*, dan *stx2* dari *E.coli* yang terisolasi dari spesimen usap dubur penjamah makanan di Denpasar, Bali. Penelitian deskriptif observasional potong lintang ini menggunakan sampel sebanyak 17 isolat bakteri *Escherichia coli* yang didapat dari usap dubur penjamah makanan di Denpasar, Bali pada tahun 2015. Setelah dilakukan ekstraksi DNA, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) digunakan untuk mengamplifikasi DNA tersebut dengan tujuan mengidentifikasi keberadaan gen *bfpA*, *stx1*, dan *stx2*. Hasil amplifikasi kemudian divisualisasi dengan bantuan elektroforesis gel agarose. Dalam penelitian ini, tidak terdeteksi adanya penjamah makanan pembawa gen *bfpA* yang mewakili patotipe EPEC, sementara lima penjamah makanan terdeteksi sebagai pembawa EHEC dengan rincian satu penjamah makanan terdeteksi keberadaan gen *stx1* saja dan pada empat penjamah makanan lainnya terdeteksi keberadaan gen *stx2* saja. Tidak ada penjamah makanan yang terdeteksi keberadaan gen *stx1* dan *stx2* sekaligus. Gen *bfpA* dan *stx1* lebih optimal jika diamplifikasi dengan suhu dan durasi denaturasi yang lebih tinggi, serta dengan suhu annealing yang lebih rendah jika dibandingkan dengan *stx2*.

**Kata kunci:** PCR, EPEC, EHEC, Penjamah Makanan.

### **ABSTRACT**

*Diarrheagenic Escherichia coli* (DEC) is known as the most common etiology of foodborne diarrhea. Food handlers play important role in the transmission of this disease, namely as the asymptomatic carriers of DEC. This study aimed to identify the presence of *bfpA*, *stx1*, and *stx2* gene isolated from rectal swab specimens of food handlers, which would determine whether they asymptotically carry these genes. This cross-sectional descriptive study used 17 *Escherichia coli* isolates collected as rectal swab specimens from food handlers residing in Denpasar, Bali in 2015. DNA extraction was then performed, followed by amplification by means of Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect the presence of *bfpA*, *stx1*, and *stx2* gene. Agarose gel electrophoresis was used to visualize the amplicons. In this study, no food handlers were detected as the carrier of *bfpA* which represented EPEC pathotype. Five food handlers were positive for carrying

EHEC, where one carried only *stx1* and four others carried *stx2* only. There were no food handlers in which *stx1* and *stx2* were simultaneously detected. Both *bfpA* and *stx1* gene achieved optimal amplification in higher denaturation temperature, longer denaturation period, and lower annealing temperature compared to *stx2*.

**Keywords:** PCR, EPEC, EHEC, Food Handlers.

## PENDAHULUAN

Selain mengandung gizi yang cukup, makanan yang baik dikonsumsi juga harus terjaga keamanan dan kebersihannya. Menurut data yang dirilis *World Health Organization* (WHO), ada lebih dari 200 jenis penyakit yang diketahui dihantarkan melalui makanan. Diare merupakan salah satu dari penyakit-penyakit tersebut yang menyebabkan kematian pada kurang lebih 1.800.000 orang dan diduga disebabkan oleh air dan makanan yang terkontaminasi oleh mikroorganisme penyebab diare.<sup>1</sup>

Di dunia, sebagian besar kasus diare yang dihantarkan melalui makanan disebabkan oleh kontaminasi bakteri. *Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan bakteri penyebab diare terkait makanan yang paling umum. Bakteri ini diketahui memiliki beberapa patotipe yaitu *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *Enteraggregative E. coli* (EAEC), *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), dan *Shiga toxin-producing E. coli* (STEC) yang juga dikenal sebagai *Enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC). Diantara kelima patotipe tersebut, ETEC adalah patotipe yang paling banyak ditemukan, diikuti oleh EPEC dan STEC/EHEC.<sup>2</sup>

Sebagai penyakit yang ditransmisikan melalui jalur fekal-oral, penyebaran diare sebagai *foodborne disease* sangat dipengaruhi oleh kebersihan dalam proses pengolahan makanan. Penjamah makanan (*food handlers*), yang didefinisikan sebagai orang yang secara langsung berhubungan dengan makanan dan peralatan mulai dari tahap persiapan, pembersihan, pengolahan, pengangkutan, sampai dengan penyajiannya, berpotensi menyebabkan kontaminasi pada makanan yang dijamahnya apabila penjamah makanan tersebut tidak menerapkan hygiene dan sanitasi yang baik selama ia bekerja. Penjamah makanan dapat pula berperan sebagai pembawa (*carrier*) beberapa patogen, salah satunya adalah *Escherichia coli*. Keadaan ini dapat memperbesar risiko kontaminasi pada makanan yang dijamah.<sup>3,4</sup> Untuk mengetahui apakah seorang penjamah makanan merupakan pembawa patogen atau

bukan, diperlukan suatu metode identifikasi yang akurat. Hal ini penting agar langkah-langkah hygiene dan sanitasi khusus bisa diterapkan pada penjamah makanan tersebut sebagai bentuk pencegahan kontaminasi pada makanan yang dijamah, juga dalam penatalaksanaan misalnya dalam pemilihan antibiotik yang sesuai seandainya ia terbukti sebagai pembawa patogen. Saat ini, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu metode yang umum digunakan untuk mengidentifikasi patogen dari spesimen yang tersedia. Metode ini menguntungkan dalam identifikasi patogen seperti bakteri *E. coli* yang sulit dibedakan antara patotipe yang satu dengan yang lain jika menggunakan metode konvensional, misalnya dengan mengamati koloni bakterinya saja, serta lebih efisien seperti pada PCR multipleks yang memungkinkan identifikasi cepat terhadap lebih dari satu patotipe sekaligus. Target PCR adalah gen-gen virulensi yang khas untuk suatu patotipe tertentu, misalnya gen *eaeA* dan *bfpA* untuk identifikasi EPEC, serta gen *stx1* dan/atau *stx2* untuk identifikasi EHEC.<sup>5</sup> Identifikasi keberadaan patotipe ETEC dan EAEC dari *E. coli* pada penjamah makanan menggunakan metode PCR telah dilakukan,<sup>6</sup> namun belum ada penelitian terhadap keberadaan patotipe lainnya seperti EPEC atau EHEC.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional potong-lintang yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, mulai bulan Maret sampai Oktober 2016. Total sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 17 sampel. Sampel tersebut merupakan isolat bakteri *E. coli* yang didapat dari usap dubur penjamah makanan yang dipilih secara acak di restoran dan rumah makan di Denpasar, Bali pada tahun 2015. Isolat *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari penjamah makanan yang berusia diatas 18 tahun, tidak memiliki riwayat diare, serta tidak sedang

dalam pengobatan diare atau konsumsi antibiotik. Isolat bakteri *E. coli* yang tidak tumbuh homogen pada proses subkultur dieksklusi dari penelitian ini.

Stok isolat bakteri *E. coli* yang telah diisolasi dari sampel usap dubur kemudian ditumbuhkan dalam media agar Mueller Hinton (MH) selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil kultur kemudian diidentifikasi ulang menggunakan metode pengecatan Gram dan uji biokimia. Dari hasil kultur, diambil koloni tersangka *E. coli* dan dimasukkan dalam tabung ukuran 1,5 mL berisi 200 µL Tris EDTA (TE) dengan pH 8. Tabung tersebut kemudian dimasukkan dalam *water bath* 100°C selama 10 menit. Selanjutnya, tabung dimasukkan dalam es dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Supernatan diambil sebanyak 100 µL dan disimpan pada suhu -80°C hingga siap digunakan.

Dalam penelitian ini, gen yang dijadikan target untuk identifikasi *E. coli* pada sampel adalah *bfpA* untuk EPEC, serta *stx1* dan/atau *stx2* untuk EHEC. Primer-primer yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sekuens primer yang telah digunakan dalam penelitian sebelumnya<sup>5</sup> yang disajikan dalam Tabel 1.

**Tabel 1.** Daftar Primer, Sekuens, dan Ukurannya yang Digunakan dalam Penelitian.

Target gen	Primer	Sekuens (5'-3')	Ukuran (bp)	Referensi
<i>bfpA</i>	EP300F	GGAAGTCAAATTC	301	Taniuchi dkk (2012) <sup>5</sup>
		ATGGGGG		
	EP300Rbt	GGAATCAGACGCA		
<i>stx1</i>		GACTGGT	132	Taniuchi dkk (2012) <sup>5</sup>
	EH132F	ACTTCTCGACTGCA		
		AAGACGTATG		
<i>stx2</i>	EH132Rbt	ACAAATTATCCCCT	255	Taniuchi dkk (2012) <sup>5</sup>
		GAGCCACTATC		
	EH255F	GGCACTGTCTGAA		
		ACTGCTCC	255	Taniuchi dkk (2012) <sup>5</sup>
EH255Rbt	TCGCCAGTTATCTG			
		ACATTCTG		

Amplifikasi dilakukan dengan prosedur sesuai seperti pada penelitian sebelumnya<sup>5</sup> (Tabel 2). Hasil amplifikasi kemudian divisualisasi dengan bantuan elektroforesis gel agarose di bawah sinar UV. Setelah sampel diamplifikasi dengan PCR dan divisualisasi dengan gel agarose, data

diambil dan diolah dengan program pengolahan data untuk mengetahui prevalensi EPEC dan EHEC yang terdeteksi pada sampel. Data kemudian ditampilkan dalam bentuk narasi, tabel, dan gambar. Penelitian ini telah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etika Penelitian kedokteran Universitas Udayana/Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar dengan nomor 1314/UN.14.2/Litbang/2016.

## HASIL

### 1. Identifikasi gen *bfpA*

Identifikasi gen *bfpA* dilakukan pertama kali dengan program PCR seperti yang tersaji dalam Tabel 2. Dari 17 sampel yang diidentifikasi, terdapat satu sampel (sampel nomor 12) yang menunjukkan gambaran pita spesifik untuk *bfpA* (301 pasang basa) pada gel elektroforesis.

Namun, karena pita yang nampak pada elektroforesis pertama ini masih sangat tipis, maka dilakukan re-PCR dengan program PCR yang sama namun dengan *template* DNA berupa hasil PCR pertama ini. Hasil re-PCR menunjukkan adanya pita yang spesifik untuk *bfpA* pada tiga sampel (sampel nomor 14, 15, dan 16), namun didapatkan pula pita nonspesifik dalam jumlah yang cukup banyak. Oleh karena banyaknya pita nonspesifik yang muncul pada hasil elektroforesis re-PCR, maka dilakukan optimasi dengan menurunkan suhu *annealing* sebanyak 2°C, menaikkan suhu denaturasi sebanyak 1°C, dan menambah durasi denaturasi sebanyak 30 detik. Program PCR kedua ini ditampilkan dalam Tabel 3.

**Tabel 2.** Program PCR Pertama untuk Identifikasi Gen *bfpA*, *stx1*, dan *stx2*.

Program PCR	Durasi	Suhu
Pre-denaturasi	3 menit	95°C
Denaturasi	30 detik	94°C
<i>Annealing</i>	30 detik	50°C
Ekstensi	60 detik	72°C
Ekstensi final	5 menit	72°C
Putaran		40 kali

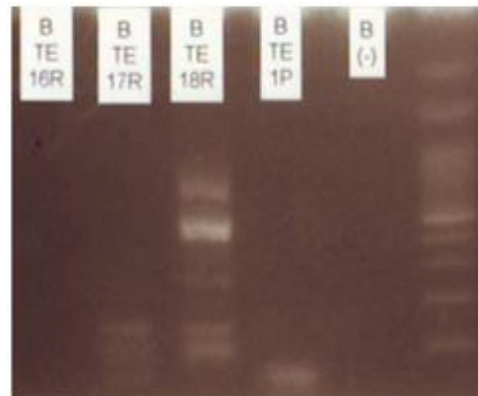
**Tabel 3.** Program PCR Kedua untuk Identifikasi Gen *bfpA* dan *stx1*.

Program PCR	Durasi	Suhu
Pre-denaturasi	3 menit	95°C
Denaturasi	60 detik	95°C
Annealing	30 detik	48°C
Ekstensi	60 detik	72°C
Ekstensi final	5 menit	72°C
Putaran		40 kali

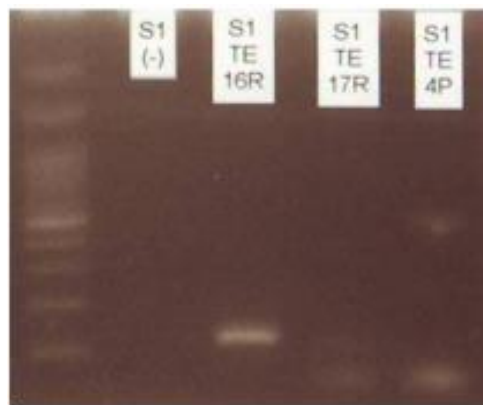
Sampel yang digunakan adalah tiga sampel yang sebelumnya telah terdeteksi keberadaan *bfpA* (sampel nomor 14, 15, dan 16). Pada hasil elektroforesis kedua ini, tampak ada pita yang muncul pada semua sampel kecuali kontrol negatif, namun tidak ada yang spesifik untuk *bfpA*. Hasil elektroforesis ditampilkan pada Gambar 1.

## 2. Identifikasi gen *stx1*

Proses identifikasi gen *stx1* mengalami kendala serupa dengan identifikasi gen *bfpA* sehingga dilakukan langkah-langkah yang sama untuk mengatasinya. Identifikasi pertama untuk gen *stx1* dilakukan dengan program PCR yang sama seperti Tabel 2. Dari 17 sampel yang diidentifikasi, terdapat dua sampel (sampel nomor 15 dan 17) yang menunjukkan gambaran pita tipis yang spesifik untuk *stx1*. Untuk mendapatkan hasil elektroforesis yang lebih jelas, maka dilakukan re-PCR dengan tetap menggunakan program yang sama seperti pada Tabel 2. Hasil re-PCR menunjukkan adanya pita spesifik pada dua sampel (sampel nomor 14 dan 15), disertai beberapa pita nonspesifik. Oleh karena itu, maka dilakukan optimasi dengan program PCR seperti yang ditampilkan pada Tabel 3. Dari hasil elektroforesis kedua ini, tampak ada satu sampel yang mengandung pita spesifik untuk *stx1* yaitu pada sampel S1TE16R (sampel nomor 14). Hasil elektroforesis ditampilkan pada Gambar 2.



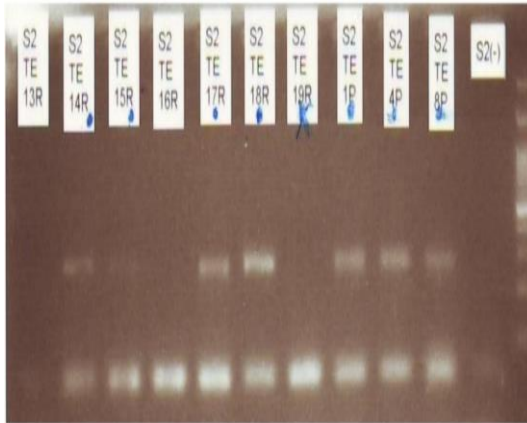
**Gambar 1.** Hasil Elektroforesis Kedua untuk Identifikasi Gen *bfpA* (sampel nomor 14, 15, dan 16).



**Gambar 2.** Hasil Elektroforesis Kedua untuk Identifikasi Gen *stx1* (sampel nomor 14 dan 15).

## 3. Identifikasi gen *stx2*

Identifikasi pertama untuk gen *stx2* dilakukan dengan program PCR yang sama seperti pada Tabel 2. Identifikasi gen ini tidak mengalami kendala seperti pada identifikasi gen *bfpA* dan *stx1*. Dari 17 sampel yang diidentifikasi, terdapat empat sampel yang menunjukkan gambaran pita yang spesifik untuk *stx2* yaitu pada sampel S2TE14R (sampel nomor 12), S2TE15R (sampel nomor 13), S2TE17R (sampel nomor 15), dan S2TE18R (sampel nomor 16). Pita yang terdeteksi sudah cukup jelas dan spesifik, sehingga tidak dilakukan optimasi untuk gen *stx2*. Hasil elektroforesis ditampilkan pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Hasil Elektroforesis Pertama untuk Identifikasi Gen *stx2* (sampel 11-17).

Dari sampel akhir sejumlah 17 sampel, tidak terdeteksi adanya gen *bfpA* (yang mewakili patotipe EPEC), sementara lima sampel positif terdeteksi sebagai EHEC dengan rincian sebagai berikut: satu sampel terdeteksi keberadaan gen *stx1* saja dan pada empat sampel lainnya terdeteksi keberadaan gen *stx2* saja. Tidak ada sampel yang terdeteksi keberadaan gen *stx1* dan *stx2* sekaligus.

### PEMBAHASAN

Proses amplifikasi DNA *template* akan menjadi lebih efisien jika *annealing* dilakukan pada suhu yang relatif rendah, namun dengan konsekuensi berupa meningkatnya kemungkinan terjadinya mispriming secara signifikan.<sup>7</sup> Dalam penelitian ini, suhu *annealing* diturunkan dengan tujuan membantu proses terbentuknya ikatan antara primer dan target sekuens dari DNA *template* dengan harapan amplifikasi *template* DNA mengalami peningkatan dan pita yang tampak pada hasil elektroforesis menjadi lebih terang dan jelas.<sup>8</sup> Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat dilihat bahwa program PCR pada Tabel 2 bersifat lebih optimal jika digunakan untuk mengamplifikasi gen *stx2*, sementara gen *bfpA* dan *stx1* lebih optimal jika diamplifikasi dengan suhu dan durasi denaturasi yang lebih tinggi, serta dengan suhu *annealing* yang lebih rendah. Walaupun penelitian ini menggunakan set primer yang sama dengan penelitian sebelumnya<sup>5</sup>, terdapat perbedaan program PCR dalam penelitian ini yang kemungkinan disebabkan oleh perbedaan alat-alat serta bahan yang digunakan dalam proses amplifikasi.

Patotipe EPEC yang memiliki gen *bfpA* disebut EPEC tipikal, sementara yang tidak memilikinya disebut EPEC atipikal. EPEC atipikal merupakan galur penyebab diare terbanyak dan ditemukan sedikit lebih banyak pada orang sehat dibandingkan orang dengan diare, yang menunjukkan kecenderungan adanya *asymptomatic carrier*.<sup>9</sup> Oleh karena seluruh sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari orang sehat, maka kemungkinan hal ini menjadi penyebab tidak terdeteksinya gen *bfpA* dalam penelitian ini.

Dahulu, EPEC tipikal diyakini sebagai penyebab utama diare di negara berkembang sementara EPEC atipikal lebih umum ditemukan di negara maju. Namun, data penelitian terbaru menunjukkan bahwa prevalensi EPEC atipikal cenderung meningkat baik di negara berkembang maupun negara maju.<sup>10</sup> Fakta tersebut kemungkinan juga menjadi alasan tidak terdeteksinya gen *bfpA* dalam penelitian ini. Hasil penelitian ini memiliki dua implikasi. Pertama, kemungkinan bahwa galur EPEC yang lebih umum ditemukan di Indonesia adalah galur atipikal. Implikasi kedua adalah bahwa kemungkinan Indonesia telah mengalami pergeseran pola prevalensi galur EPEC dari pola prevalensi negara berkembang (EPEC tipikal lebih umum) menuju pola prevalensi negara maju (EPEC atipikal lebih umum). Berkurangnya prevalensi EPEC tipikal bisa jadi merupakan tanda keberhasilan dalam upaya perbaikan aspek kesehatan publik.<sup>11</sup> Namun, kedua implikasi ini perlu dibuktikan lebih lanjut kebenarannya sebab tidak tersedia data mengenai prevalensi kedua galur EPEC di Indonesia.

Patotipe EHEC/STEC dapat diidentifikasi melalui keberadaan gen *stx1* dan/atau *stx2*. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa EHEC/STEC lebih umum ditemukan pada orang sehat.<sup>12</sup> Pada penelitian ini, proporsi gen *stx1* yang terdeteksi lebih sedikit jumlahnya dibandingkan dengan gen *stx2*. Gen *stx2* merupakan gen penyandi faktor virulensi yang dikaitkan dengan penyakit yang lebih berat pada manusia.<sup>13</sup> Oleh karena itu, fakta bahwa seluruh sampel penelitian ini didapat dari penjamah makanan dan empat dari lima sampel tersebut terdeteksi membawa gen *stx2* mengimplikasikan bahwa perlu dipertimbangkan untuk melakukan tindakan pencegahan kontaminasi yang lebih lanjut



pada orang-orang yang menjadi sumber keempat sampel tersebut.

*Asymptomatic carrier* merupakan salah satu sumber kontaminasi DEC terbesar.<sup>14</sup> Seseorang bisa menjadi pembawa DEC setelah melalui proses interaksi yang kompleks antara kerentanan pejamu (contohnya umur, status gizi, serta imunitas) dan juga faktor lingkungan (contohnya hygiene yang buruk serta kontaminasi feses).<sup>9</sup> Oleh karena itu, hasil penelitian ini mengimplikasikan bahwa para pejamu makanan harus menjaga kondisi kesehatan dirinya serta kebersihan lingkungannya untuk mengurangi peluang menjadi pembawa DEC yang akhirnya berpotensi mengontaminasi makanan yang ditangani.

### SIMPULAN

Dalam penelitian ini, tidak terdeteksi adanya penjamah makanan pembawa gen *bfpA* yang mewakili patotipe EPEC, sementara lima penjamah makanan terdeteksi sebagai pembawa EHEC dengan rincian satu penjamah makanan terdeteksi keberadaan gen *stx1* saja dan pada empat penjamah makanan lainnya terdeteksi keberadaan gen *stx2* saja. Tidak ada penjamah makanan yang terdeteksi keberadaan gen *stx1* dan *stx2* sekaligus. Gen *bfpA* dan *stx1* lebih optimal jika diamplifikasi dengan suhu dan durasi denaturasi yang lebih tinggi, serta dengan suhu *annealing* yang lebih rendah jika dibandingkan dengan *stx2*.

### SARAN

Diharapkan ada penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih besar agar hasil penelitian dapat digeneralisasi ke populasi yang lebih luas.

### DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Five Keys to Safer Food Manual. France: WHO Press, 2006. Diunduh dari: <http://www.who.int/foodsafety/publications/5keysmanual/en/>. (diakses 18 Januari 2016).
2. Kirk M., Pires S., Black R., Caipo M., Crump J., Devleeschauwer B., Dofer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C., Hald, T., Hall, A., Keddy, K., Lake R., Lanata C., Torgerson, P., Havelaar, A., dan Angulo, F. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med.* 2015; 12(12):7-11.
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 715 Tahun 2003 tentang Persyaratan Hygiene Sanitasi Jasaboga. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia: 2003.
4. Rane, S. Street Vended Food in Developing World: Hazard Analyses. *Indian J Microbiol.* 2011; 51(1):100-106.
5. Taniuchi, M., Walters, C., Gratz, J., Maro, A., Kumburu, H., Serichantalergs, O., Sethabutr, O., Bodhidatta, L., Kibiki, G., Toney, D., Berkeley, L., Nataro, J., Houpt, E. R. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and Its Evaluation on Colonies, Culture Broths, and Stool. *J Diag Microbio.* 2012; 73:121-128.
6. Gitaswari, D. A. I. Identifikasi Subtipe Enterotoxigenic *Escherichia coli* dan Enteroaggregative *Escherichia coli* dari Spesimen Usap Dubur Penjamah Makanan di Denpasar Menggunakan Polymerase Chain Reaction. Denpasar: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana: 2015.
7. Green, M. dan Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th ed.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2012.
8. ThermoFisher Scientific Inc. PCR Troubleshooting Guide [Thermo Fisher Scientific. *ThermoFisher Scientific Inc.*, 2017. Tersedia di: <https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-troubleshooting.html>. (Diakses 17 Januari 2017).
9. Contreras, C., Ochoa, T., Lacher, D., DeRoy, C., Navarro, A., Talledo, M., Donnenberg, M., Ecker, L., Gil, A., Lanata, C. dan Cleary, T. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *J Med Microbio.* 2010; 59(1):25-31.
10. Ochoa, T., Barletta, F., Contreras, C. dan Mercado, E. New insights into the

- epidemiology of enteropathogenic Escherichia coli infection. *J Trans Trop Med H.* 2008; 102(9):852-856.
11. Araujo, J., Tabarelli, G., Aranda, K., Fabbriotti, S., Fagundes-Neto, U., Mendes, C. dan Scaletsky, I. Typical Enteroaggregative and Atypical Enteropathogenic Types of Escherichia coli Are the Most Prevalent Diarrhea-Associated Pathotypes among Brazilian Children. *J Clin Microbio.* 2007; 45(10):3396-3399.
  12. Moura, C., Fregolente, M., Martini, I., Domingos, D., Silva, E., Ferraz, M., Gatti, M. dan Leite, D. Prevalence of enteropathogens in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil. *J Infect Dev C.* 2012; 6(02):177-179.
  13. Pradel, N., Bertin, Y., Martin, C. dan Livrelli, V. Molecular Analysis of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains Isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome Patients and Dairy Samples in France. *Appl Environ Microbio.* 2008; 74(7):2118-2128.
  14. Bardiau, M., Szalo, M. dan Mainil, J. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *J Vet R.* 2010; 41(5):57.