

**Deteksi Gen *Shiga Like Toxin 1* isolat *Escherichia coli* O157:H7 Asal Sapi
Bali di Kuta Selatan, Badung**

(DETECTION OF GEN SHIGA LIKE TOXIN 1 ESCHERICHIA COLI O157:H7 ISOLAT FROM
BALI CATTLE IN KUTA SELATAN, BADUNG)

Dwi Lestari¹, Komang Januartha Putra Pinatih², I Wayan Suardana³

¹Mahasiswa Program Profesi Dokter Hewan,

²Laboratorium Mikrobiologi

³Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

Jln. P.B. Sudirman Denpasar Bali

Telp.0361-223791, Faks.(0361)223791

E-mail: Dwie_tary31@yahoo.com

ABSTRAK

Salah satu bakteri pencemar adalah serotipe *E. coli* O157:H. Bakteri ini diketahui tumbuh dan berkembang dan menghasilkan toksin. Toksin yang dihasilkan oleh strain ini adalah *verotoxin* atau disebut sebagai *shiga-like toxin* (Stx). Penelitian ini menggunakan lima isolate *E. coli* O157:H7 yaitu FSKS 5 Pecatu, FSKS 17 Kutuh, FSKS 35 Ungasan, FSKS 44 Ungasan, dan FSKS 55 Jimbaran. Kegiatan penelitian diawali dengan kultivasi isolate melalui penumbuhan pada media *Sorbitol MacConkey Agar* (SMAC), dilanjutkan dengan konfirmasi *E. coli* O157 dengan uji *latex agglutination test* dan konfirmasi *E. coli* O157:H7 melalui pengujian dengan anti serum H7. Deteksi molekuler diawali dengan tahapan isolasi DNA genom, dilanjutkan dengan deteksi gen *Stx 1* melalui metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), menggunakan primer LP 30 dan LP31. Hasil penelitian menunjukkan positif gen *Stx 1* pada dua isolate yaitu FSKS 5 Pecatu dan FSKS 35 Ungasan yang dicirikan dengan terdapatnya *band/pita* dengan panjang produk 348 bp. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolate local FSKS 5 Pecatu dan FSKS 35 Ungasan, berpotensi sebagai agen zoonosis yang berpeluang besar menimbulkan diare berdarah.

Kata kunci : Sapi bali, *E. coli* O157:H7, *shiga like toxin 1* (*stx1*).

ABSTRACT

The most common bacterial contaminant is the serotypes of *E. coli* O157: H7. This bacterium is known to produce toxins. Toxins produced by this strains was known as *verotoxin* or *shiga-like toxin* (Stx). This research use five isolates of *E. coli* O157: H7 i.e. FSKS 5 Pecatu, FSKS 17 Kutuh, FSKS 35 Ungasan, FSKS 44 Ungasan, and FSKS 55 Jimbaran. The research initially by cultivating of isolates on *sorbitol MacConkey Agar* (SMAC) medium, followed by confirmation of *E. coli* O157 latex agglutination test. Confirmation for *E. coli* O157:H7 was done through testing with antiserum H7. Molecular analysis was started by isolating DNA of *E. coli* O157:H7, and detection of *Stx 1* gene through *Polymerase Chain Reaction* method (PCR), using a paired primer LP 30 and LP31. The results showed that two isolates i.e. FSKS 5 Pecatu and FSKS 35 Ungasan were positive *Stx1* gene, respectively characterized by PCR product 348 bp. It can be concluded that local isolates namely FSKS 5 Pecatu and FSKS 35 Ungasan, were potentially as an agent of zoonoses which caused bloody diarrhea.

Keywords : Bali cattle, *E. coli* O157: H7, *Shiga Like Toxin 1* (*stx1*).

PENDAHULUAN

Shiga toxin yang dihasilkan *E. coli* (STEC) saat ini diakui sebagai kelompok penting dari bakteri *Enteropathogens*, setidaknya ada 100 serotipe dari *E. coli* yang mampu menghasilkan *Shiga toxin*, tetapi serotipe *E. coli* O157 yang paling dikenal dalam mikrobiologi dan masyarakat umum (Nataro and Kaper, 1998). Bakteri ini pertama kali diidentifikasi pada 1982 pada penyakit *haemorrhagic colitis* (HC) di USA (Riley *et al.*, 1983). Sejak saat itu, STEC O157 terlibat dalam kasus sporadis wabah diare di dunia.

Shiga like toxin yang dihasilkan *E. coli* O157:H7 akan memasuki lumen gastrointestinal tubuh hospes melalui sel epitel, pada awalnya bereaksi langsung dengan monosit di daerah submukosa dari sel epitel yang melepaskan mediator peradangan, hal ini berdampak pada semakin meningkatnya *uptake* toksin karena meningkatnya permeabilitas mukosa. Selanjutnya akan berdampak pada aktivasi pelepasan elemen protombin sehingga terjadi perdarahan pada daerah kolon atau terjadinya diare berdarah (O'Loughlin and Robins, 2001).

Sebagai bakteri yang bersifat patogen, *E. coli* O157: H7 memiliki beberapa faktor virulen yang membantu bakteri menyerang induk semangnya yaitu saluran pencernaan manusia. Suardana *et al.* (2013) melaporkan bahwa penderita yang terinfeksi oleh *Stx-1* cenderung menderita gastrointestinal dengan gejala diare berdarah jika dibandingkan dengan *Stx-2*. Gejala klinis dapat muncul beberapa saat setelah mengkonsumsi makanan yang telah terkontaminasi.

Adanya hasil temuan *E. coli* O157:H7 pada feses dan daging domba di Yogyakarta sebesar 13,2% dan 2,6% (Sumiarto, 2004) dan temuan Suardana *et al.* (2007) dan Suardana *et al.* (2008) yang berhasil mengidentifikasi *E. coli* O157:H7 di Kabupaten Badung, Bali pada feses sapi sebesar 7,61%, pada daging sapi sebesar 5,62% dan pada feses manusia sebesar 1,3%, menguatkan hipotesis bahwa serotipe lokal dari bakteri ini juga berpotensi besar sebagai agen zoonosis yang harus diwaspadai sehingga perludikaji secara lebih mendalam.

Penemuan Hananto *et al.* (2014) menunjukkan bahwa dari 60 sampel yang diuji, ditemukan positif *E. coli* O157:H7 sebanyak 5 isolat (8,33%). Isolat yang ditemukan sejauh ini belum dilakukan penelitian lebih lanjut terutama dari aspek molekuler terhadap penanda virulensi gen *Stx1* maupun gen *Stx2* (gen yang mengatur ekspresi toksin *Stx1* dan *Stx2*), dan gen *eae* (gen yang mengatur ekspresi protein yang berkaitan dengan *attaching* dan *effaching*).

Perkembangan penelitian untuk mendeteksi kehadiran STEC secara pesat telah dimulai sejak tahun 1987 (Doyle *et al.*, 2006; Pradel *et al.*, 2000; dalam Samad pour *et al.*, (2002)

dengan teknik penghitungan secara langsung terhadap toksin yang dihasilkan. Hasil penelitiannya berhasil menemukan 28 dari 172 sampel (16%) feses sapi positif STEC. Deteksi dengan menggunakan DNA probe *Stx-I* dan *Stx-II* juga telah digunakan oleh beberapa peneliti (Samad pour *et al.*, (2002). Selain metode diatas saat ini telah populer dikembangkan teknik deteksi yang cepat dan akurat yaitu perkembangan metode deteksi yang didasarkan atas *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sebagai suatu metode yang sangat membantu karena tingkat sensitifitas dan spesifitasnya tinggi (Moon *et al*, 2004 dalam Suardana *et al*, 2013).

METODE PENELITIAN

Kultivasi Isolat *E.coli* O157:H7

Pada penelitian ini digunakan 5 isolat dari Kecamatan Kuta Selatan yang positif *E. coli* O157:H7 dengan kode FSKS (Feses Sapi Kuta Selatan) yaitu FSKS 5 Pecatu, FSKS 17 Kutuh, FSKS 35 Ungasan, FSKS 44 Ungasan, FSKS 55 Jimbaran. Identifikasi serotipe *E. coli* O157:H7 mengacu pada prosedur Bridson (1998), yaitu hasil positif dari media EMBA yang ditanam pada media nutrisi agar miring, selanjutnya ditanam pada media selektif *sorbitol MacConkey* agar (SMAC). Dalam penelitian ini digunakan kontrol positif *E. coli* O157:H7 ATCC 43894. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, koloni *E. coli* yang diidentifikasi sebagai *E. coli* O157, menunjukkan koloni jernih, tidak berwarna, atau bersifat sorbitol negatif.

Uji serologis dengan isolat *E. coli* O157 yang menunjukkan sifat *colourless* pada media SMAC dengan harapan untuk lebih meyakinkan bahwa koloni tersebut adalah strain *E. coli* O157, maka diuji lebih lanjut dengan menggunakan *E. coli* O157 latex agglutination test. Dengan cara menginokulasi 2-3 ose biakan pada 1 ml *NaCl* fisiologis, dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam, dan mereaksikannya dengan pereaksi lateks (1 tetes isolat ditambah 1 tetes pereaksi lateks). Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya presipitasi pada kertas lateks sesuai dengan kontrol positif yang telah disediakan Kit (Bridson, 1998).

Tahap ini merupakan untuk memastikan koloni yang diisolasi merupakan serotipe *E. coli* O157:H7, dilakukan dengan cara uji aglutinasi dengan serum H7. Koloni yang positif pada uji lateks terlebih dahulu ditumbuhkan pada media SIM (*Sulfite Indol Motility*) sebanyak 2-3 kali pasase yang diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam. Hasil positif pada media ini ditandai dengan adanya penyebaran pertumbuhan dari tempat tusukan. Isolat selanjutnya ditumbuhkan

pada media *brain heart infusion* (BHI). Isolat diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Isolat yang tumbuh ditandai dengan terjadinya kekeruhan pada media. Isolat pada media BHI selanjutnya diinaktivasi dengan penambahan formalin 0,3%, Selanjutnya adalah mempersiapkan larutan difco *E. coli* H7 antiserum H7 yang telah diencerkan dengan perbandingan 1:500. Reaksi serologis dilakukan dengan mengambil 50 µl biakan bakteri yang telah diinaktivasi, ditambah dengan 50 µl antiserum H7 di dalam plat, dicampur secara merata. Plat selanjutnya diinkubasikan pada *waterbath* suhu 50 °C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya butiran pasir (presipitasi) pada supernatannya di dasar plat.

Tahap Deteksi Molekuler Gen *Shiga Like Toxin 1*

Isolasi DNA Genomik Bakteri

Tahapan isolasi DNA genomik bakteri mengacu pada prosedur suplaiyer (Kit Qiagen, 2007 dalam Suardana *et, al* 2008). Isolat *E.coli* O157:H7 hasil isolasi dan identifikasi dipanen dengan cara disentrifugasi (7500 rpm selama 5 menit), supernatannya dibuang, pelet sel ditambahkan 180 µl buffer ATL dan 20 µl larutan proteinase K, divortex selama 5 detik, ditambahkan 200 µl buffer AL divortex selama 15 detik, diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 56° C selama 10 menit, ditambahkan 200 µl etanol absolut 96-100% divortex selama 15 detik. *Lysate E. coli* selanjutnya digunakan untuk *binding* DNA. Kemudian *tube* 2 ml yang telah mengandung *tube* penyaring (*QIAamp Mini spin column*), *lysate* dimasukkan ke dalam penyaring, disentrifius 6000 g (8000 rpm) selama 1 menit, sisa cairan dibuang dan filter yang telah mengandung DNA dimasukkan ke dalam *tube* 2 ml yang baru, kemudian dilanjutkan *washing* DNA. Filtrat DNA ditambah 500 µl *wash buffer* (buffer AW1) dan didiamkan selama 5 menit, disentrifius 8000 rpm selama 1 menit, sisa cairan tertampung dibuang dan diganti dengan *tube* 2 ml yang baru. *Wash buffer* (buffer AW2) sebanyak 500 µl ditambahkan dan didiamkan selama 5 menit, disentrifius dengan kecepatan penuh (14.000 rpm selama 3 menit), sisa cairan yang tertampung dibuang dan dilanjutkan untuk *eluting* DNA. *QIAamp mini spin column* yang mengandung DNA dimasukkan ke dalam *ependorf* steril baru, ditambahkan 50 µl *elution buffer* (AE), didiamkan pada suhu kamar selama 5 menit, dan disentrifius dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit (*tube* telah mengandung DNA murni) untuk menghindari pengulangan *freezing* dan *thawing*, DNA murni disimpan pada 4° C untuk penggunaan langsung atau disimpan dalam *freezer* -20° C untuk menyimpan dalam waktu lama.

Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Konsentrasi dan kemurnian DNA diukur dengan spektrofotometer, yang mana prinsip kerjanya didasarkan pada prinsip iradiasi sinar ultra violet yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan iradiasi sinar UV secara maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm sedangkan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm.

DNA sampel diencerkan 50 kali (2 μ l DNA dicampur dengan 98 μ l air murni) dan *optical density* (OD) diukur pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dengan menggunakan Spektrofotometer (Backman DU-65). Konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan rumus: absorbansi pada OD₂₆₀ \times pengencer \times 50 μ g/ml. Kemurnian DNA dihitung menggunakan rasio absorbansi pada panjang gelombang (λ) 260 nm/280 nm yang berkisar antara 1,8-2,0. (Sambrook dan Russel, 2001).

Deteksi Gen *Shiga Like Toksin 1* (Stx-1) dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Deteksi keberadaan gen *Shiga like toksin* dilakukan menggunakan primer LP 30 (F) : (5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3') dan LP 31 (R): (5'-CACC AGACAATGTAACCGCTG-3') dengan panjang produk PCR 348 bp. Moon *et al.* (2004). Reaksi PCR untuk deteksi gen *Stx-1* dilakukan pada total volume 41 μ l yang mengandung 1,5 μ l DNA *template*, 36,5 μ l PCR SuprRmix 2x dan 1,5 μ l masing-masing primer. Amplifikasi dilakukan pada mesin *Thermalcycler Model TC25/H* dengan kondisi predenaturasi pada suhu 94° C selama 7 menit. Diikuti 35 siklus dengan kondisi reaksi denaturasi 94° C selama 1 menit, *annealing* pada 50° C selama 35 detik dan polimerisasi pada suhu 72° C selama 2 menit. Pada bagian akhir ditambahkan dengan polimerisasi pada suhu 72° C selama 5 menit. Setelah reaksi selesai, sebanyak 4 μ l produk PCR dicampur dengan 2 μ l *loading dye* (*orange loading dye*) dan dielektroforesis pada gel agarose 1% yang telah diisi *GoldViewTM Nucleic Acid Stain* 5 ml/30ml agar, bersama dengan *marker* 100 bp DNA *ladder*. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V, selama 35 menit. Visualisasi *band* yang muncul dilakukan dengan UV transilluminator dan difoto dengan kamera digital FE-270 7,1 Megapixel.

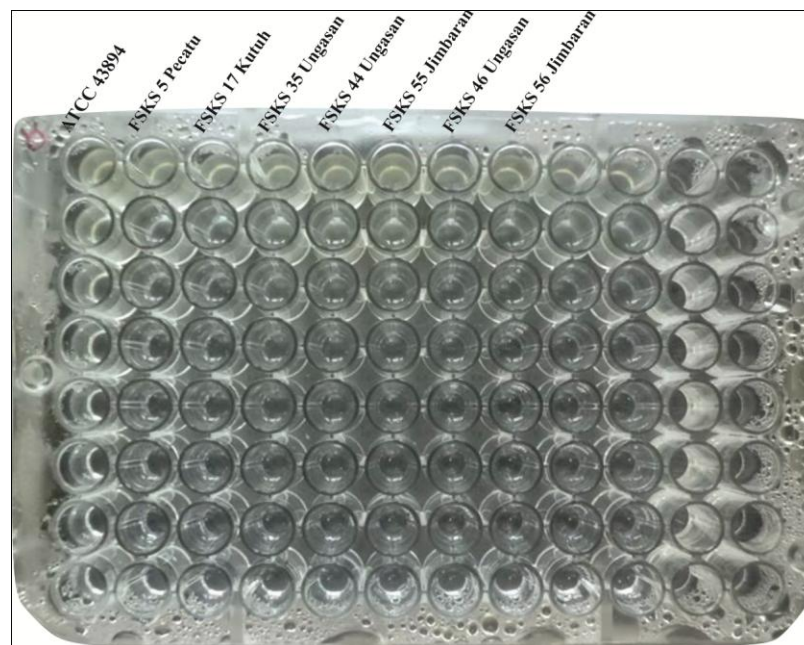
Analisis Data

Data dari hasil penelitian disajikan secara deskriptif kualitatif untuk selanjutnya disajikan dalam bentuk Gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultivasi Isolat *E. coli* O157:H7

Hasil kultivasi dari 5 isolat positif *E. coli* O157:H7 dengan kode FSKS (Feses Sapi Kuda Selatan) yaitu FSKS 5 Pecatu, FSKS 17 Kutuh, FSKS 35 Ungasan, FSKS 44 Ungasan, dan FSKS 55 Jimbaran. Uji hasil isolate *E. coli* O157 yang dilakukan yaitu pada media SMAC, hasil uji menunjukkan warna *colourless* yang berarti bahwa bakteri *E. coli* O157 tidak memfermentasikan sorbitol, disisi lain *E. coli* yang bukan strain O157 berwarna pink atau bersifat sorbitol positif. Pengujian selanjutnya adalah uji serologis dengan *E. coli* O157 latex agglutination test. Uji ini dilakukan untuk lebih meyakinkan atau meneguhkan bahwa *E. coli* yang positif pada uji SMAC benar-benar strain dari *E. coli* O157. Hasil positif pada latex agglutination test ditandai dengan terbentuknya presipitasi pada kertas lateks sesuai dengan kontrol positif yang telah disediakan oleh Kit. Tahap akhir dari kultivasi isolat *E. coli* O157:H7 adalah pengujian dengan serum H7 pada *E. coli* O157.



Gambar 1. Hasil positif *E. Coli* O157:H7 pada uji aglutinasi dengan serum H7.

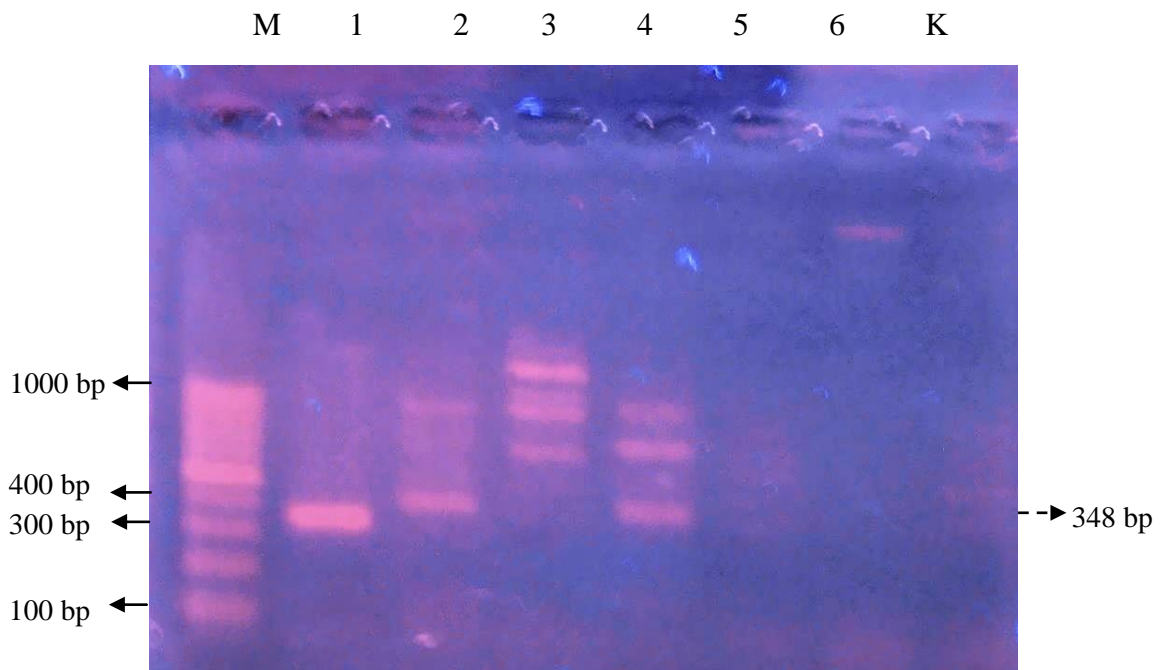
Tahap ini merupakan tahapan untuk memastikan koloni yang diisolasi merupakan serotipe *E. coli* O157:H7. Hasil kultivasi terhadap ke-5 isolat menunjukkan bahwa ke-5 isolat benar-benar merupakan strain dari *E. coli* O157:H7. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya presipitasi pada dasar plat.

Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Hasil Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA, diperoleh hasil DNA yang digunakan memiliki konsentrasi 200 mg/ μ l dengan kemurnian DNA 1,6.

Deteksi Gen *Shiga Like Toksin 1* (Stx-1) dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Deteksi keberadaan gen *Shiga Like Toksin 1* pada 5 isolat *E. coli* O157:H7 dengan teknik PCR seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Deteksi gen *stx-1* dengan primer LP30 dan LP 31 pada agarose 1 %. Lajur 1 kontrol positif: ATCC 43894; lajur 2: isolat FSKS 5 Pecatu; lajur 3: isolat FSKS 17 Kutuh; lajur 4: isolat FSKS 35 Ungasan; lajur 5: isolat FSKS 44 Ungasan; dan lajur 6: isolat FSKS 55 Jimbaran. K: Kontrol Negatif. M: Marker.

Pada gambar terlihat bahwa lajur 2 isolat FSKS 5 Pecatu dan lajur 4 isolat FSKS 35 Ungasan, positif membawa gen *Stx1* seperti pada kontrol ATCC 43894 yang dicirikan dengan terbentuknya pita pada posisi panjang basa sekitar 348 bp, sedangkan isolat FSKS 17 Kutuh,

FSKS 44 Ungasan dan FSKS 55 Jimbaran negatif membawa gen *Stx1*. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Suardana *et al.* (2010) yang menemukan sebanyak 2 dari 22 isolat *E. coli* O157:H7 (9,1%) asal feses hewan, daging, dan feses manusia, terdeteksi membawa gen *Stx1* dan *Stx 2*. Penelitian oleh Sahilah *et al.* (2010) di Malaysia pada 20 isolat daging sapi dari *E. coli* O157:H7 ditemukan 14 strain positif membawa gen *Stx1* dan *Stx2*, dan sebanyak 5 strain positif membawa gen *Stx1*. Adanya isolat *E. coli* O157 yang tidak lengkap memiliki gen *Stx* (*Stx1* dan *Stx2*), pernah dilaporkan oleh Avery *et al.* (2002) yang menemukan bahwa dari 24 isolat yang diuji, 19 isolat positif mengandung gen *Stx2* dan 2 isolat positif membawa gen *Stx1* dan *Stx2*, serta 3 isolat negatif membawa gen *Stx1* dan *Stx2*. Foley *et al.* (2004) juga melaporkan bahwa tidak semua isolat *E. coli* O157:H7 dapat menghasilkan kedua jenis *verocytotoxin* tersebut, ada kalanya 1 isolat menghasilkan kedua-duanya (*Stx 1* dan *Stx2*), namun ada beberapa strain yang hanya menghasilkan 1 jenis toksin saja, *Stx1* atau *Stx2*.

SIMPULAN

Hasil identifikasi terhadap 5 isolat *E. coli* O157:H7 asal feses sapi di kecamatan Kuta Selatan, Kabupaten Badung menunjukkan 2 isolat yaitu FSKS 5 dan FSKS 35 positif membawa gen *Stx-1*.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka disarankan untuk dilakukan konfirmasi lebih lanjut untuk memastikan pita hasil amplifikasi merupakan produk dari gen *Stx-1* melalui sekuensing terhadap susunan DNANYa, disamping juga dengan ditemukannya *Stx-1* pada isolat hasil isolasi, disarankan kepada pihak terkait untuk meningkatkan kewaspadaan terhadap bahaya zoonosis *E. coli* O157:H7.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih atas diikut sertakannya saya dalam penelitian kerjasama kemitraan penelitian dan pengembangan pertanian nasional (KP3N) yang didanai oleh Badan Penelitian Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Avery SM, Small A, Reid CA, Buncic S. 2002. Pulsid Field Gel Electroforesis Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* O157 from Hides of Cattle at Slaughter. Research Note. *Journal of Food Protection*. 65 (7): 1172-1176.
- Bridson EY. 1998. The oxoid manual 8th Ed. Centers for Disease Control and Prevention. *Escherichia Coli* O157:H7. <http://www.cdc.gov/ncidod/dmd/disease/info/escherichiacoli.g.htm>.
- Doyle, ME., Archer J., Kaspar CW., and Weiss R. 2006. Human Illnes Caused by *E. coli* O157:H7 from Food and Non-Food Sources. *Food Research Institut*, UW-Madison.
- Foley SL, Simjee S, Meng J, White DG, McDermott PF, Zhao S. 2004. Evaluation of Molecular Typing Methods for *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Cattle, Food and Humans. *Journal of Food Protection*. 67(4): 651-657.
- Hananto, W., Praja RKA, Rinca FR, 2014. Perbandingan Jumlah *Coliform*, *E.coli*, *E.coli* O157, *E.coli* O157:H7 Pada Sapi Bali Di Kecamatan Kuta Selatan, Kabupaten Badung. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Udayana. Denpasar.
- Moon G, Kim WJ, Shin WS. 2004. Optimization of Rapid Detection of *Escherichia Coli* O157:H7 and *Listeria Monocytogenes* by PCR and Appication to Field Test. *Journal Food of Protection*. 67(8): 1634-1640.
- Nataro, J.P., and Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 142–201.
- O’Loughlin, E.V and Robins-Browne. 2001. Effect of Shiga Toxin and Shiga-Like Toxins on Eukaryotic Cells. Review. *Microbes and Infection*.3:493-507.
- Pradel, N., V. Livrelli, C.D. Champs, J.B. Palcoux, A. Reynaud, F. Schiuts, B. Joly and Forestier. 2000. Prevalence and characterization of shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol*. 38(3): 1023 – 1031.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T.,1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia-coli* serotype. *NewEngl. J. Med*. 1983, 308, 681–685.
- Sahilah A.M., Aisyah Nor H., Noraidah I., Azuhairi Ahmad A. 2010. Detection of Shiga Toxin 1 and 2 (*Stx1* and *Stx2*) genes in *Escherichia Coli* O157:H7 Isolated from Retail Beef in Malaysia by Multiplex Polimerase Chain Reaction (PCR). *Sains Malaysia* 39(1): 57-63.

- Samadpour M, Kubler M, Buck FC, Depavia GA, Mazengia E, Stewart J, Yang P, Alfi D. 2002. Prevalence of *Shiga Toxin*-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Cattle Feces from King Country, Washington. *Journal of Food Protection*. 65 (8): 1322-1325.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. Molekuler Cloning:A Laboratory Manual. 3rd ED. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Suardana, I W., Artama W.T., Asmara W., Daryono B.S. 2010. Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 serta Deteksi Gen *Shiga Like Toxin 1* dan *2* Asal Feses Hewan, Daging, dan Manusia. *Jurnal Verteriner*.11 (4): 264-270.
- Suardana, I W., Ratnawati N.L.K.A, Sumiarto B, dan Lukman D.W. 2008. Deteksi Keterkaitan Keberadaan *Coliform, escherichia coli* dengan Keberadaan Agen Zoonosis *Escherichia coli* O157 dan *Escherichia coli* O157:H7 pada Feces Manusia di Kabupaten Badung Provinsi Bali. *Medicina*. 39 (3): 215-219.
- Suardana, I W., Sumiarto, B., dan Lukman, D.W. 2007. Isolasi dan Identifikasi *E. coli* O157:H7 pada daging sapi di Kabupaten Badung Provinsi Bali. *J. Vet* 8(1):16-23.
- Suardana, I W., Suyasa IN, Widiasih D.A, Nugroho W.S, Wibowo M.H.2013. Kajian Epidemiologi dan Pengembangan Probe Diagnostik Berbasis Kloning Gen untuk Diagnosis *Shiga Like Toxin-1* (Stx-1) dari *Escherichia coli* O157:H7 pada Sapi. *Laporan Akhir Hibah KKP3N tahun 2013*.
- Sumiarto, B. 2004. Tingkat Infeksi dan Kontaminasi Bakteri *Escherichia Coli* O157:H7 pada Daging Domba di Rumah Potong Hewan Yogyakarta. *Jurnal Veteriner* 5 (3):85-90.