

## Studi Patogenisitas *Escherichia coli* Isolat Unggas pada Ayam Pedaging Umur 15 Hari

(PATHOGENICITY STUDY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM POULTRY ON BROILER CHICKEN AT 15-DAYS OF AGE)

Michael Haryadi Wibowo<sup>1</sup>, Agnesia Endang Trihapsari Wahyuni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Jl. Fauna, Karangmalang, Yogyakarta, 55281. Telp.: 0274-560862. Fax: 0274-560861. Email: mhbowo@gmail.com dan mhwibowo@ugm.ac.id

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui patogenisitas *Escherichia coli* asal unggas secara *in vivo*. Tiga isolat *E. coli*, yaitu Kalasan (Ec/Kls/4/02), Sleman (Ec/Sl/1/02), dan Wonosari (Ec/Wno/2/02), dipasasekan pada ayam broiler umur 15 hari. Dua isolat, yaitu Sleman (Ec/Sl/1/02) dan Kalasan (Ec/Kls/4/02) dikultur pada media *Brain Hearth Infussion* (BHI) selama 24 jam pada suhu 37°C, dan kemudian dibuat standar *Mac Farland 1*. Masing isolat diencerkan berkelipatan 10, mulai dari 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-10</sup>, dan sebanyak 0,5 ml dari setiap pengenceran disuntikkan secara intraperitoneal pada 5 ekor ayam broiler umur 15 hari. Ayam diobservasi selama 7 hari untuk melihat gejala klinis, dan lesi makroskopis yang timbul pascainokulasi. Dosis infeksi (DI)<sub>50</sub> dari kedua isolat ditentukan dengan metode Reed dan Muech. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *E. coli* isolat Kalasan (Ec/Kls/4/02) dan Sleman (Ec/Sl/1/02) merupakan isolat yang virulen karena mampu menimbulkan penyakit pada ayam broiler umur 15 hari dengan gejala klinis/lesi berupa perihepatitis, peritonitis, perikarditis dan airsakulitis. Dosis infeksi isolat Kalasan (Ec/Kls/4/02) adalah 2 X 10<sup>2.6</sup> sel bakteri per ml, sedangkan isolat Sleman (Ec/Sl/1/02) adalah 2 X 10<sup>1.8</sup> per ml. Dari nilai DI<sub>50</sub>-nya tampak bahwa isolat Kalasan bersifat lebih patogenik daripada isolat Sleman.

Kata kunci: *E. coli*, patogenisitas, dosis infeksi.

### ABSTRACT

A study was conducted to determine the pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from chickens. Three isolates, Kalasan (Ec/Kls/4/02), Sleman (Ec/Sl/1/02), and Wonosari (Ec/Wno/2/02) were firstly selected and inoculated into broiler chickens at 15 days of age. Two isolates, Kalasan (Ec/Kls/4/02) and Sleman (Ec/Sl/1/02) which showed clear clinical signs and macroscopic lesions, were cultured in Brain Hearth Infussion (BHI) media for 24 hours at 37°C. Serials ten fold dilution of the purified colonies, starting from 10<sup>1</sup> to 10<sup>10</sup> was prepared and 0,5 ml bacterial sample from each dilution were inoculated intraperitoneally into 5 chickens of 15 day-old. The inoculated chickens were monitored for seven days to observe the clinical signs and microscopic lesions. The infective dose (ID)<sub>50</sub> of each isolate was determined by Reed and Muench method. The result showed that the two isolates were pathogenic to 15 day-old broiler chickens with specific lesions of pericarditis, perihepatitis, peritonitis, and airsacculitis. Their infective dose-50 was 2 X 10<sup>2.6</sup> bacterial cells per ml for Kalasan isolate and 2 X 10<sup>1.8</sup> bacterial cells per ml for Sleman isolate. It appeared that Kalasan isolate was more pathogenic than Sleman isolate.

Key word: *E. coli*, pathogenic, infection dose.

### PENDAHULUAN

Dewasa ini, *Escherichia coli* banyak menarik perhatian para ahli di bidang veteriner, seiring dengan makin seringnya ditemukan *E. coli* patogen di lapangan. *E. coli* merupakan salah satu spesies bakteri yang tergolong dalam genus *Escherichia* dan familia *Enterobacteriaceae* (Carter dan Chenappa, 1990;

Edwards dan Ewing, 1972). Bakteri tersebut umumnya bersifat gram negatif, tidak tahan asam, dan tidak membentuk spora. Sebagian besar *E. coli* bersifat motil dengan alat pergerakan berupa flagella. Beberapa galur *E. coli* mempunyai kapsula, tetapi pada umumnya kebanyakan tidak berkapsula. Berdasarkan karakter antigenik dari protein strukturalnya dikenal beberapa jenis antigen *E. coli*, yaitu

antigen somatik (O), antigen kapsula (K) dan antigen flagela (H). Bentuk dan ukuran bakteri sangat bervariasi, dan umumnya berbentuk batang pendek gemuk yang merupakan peralihan antara bentuk kokus dan batang sehingga sering atau dikenal sebagai bentuk *cocco-bacillus* (Gillespie dan Timoney, 1981). Ukuran bakteri *E. coli* bervariasi, yaitu lebar 1,1-1,5 mikron dan panjang 2-6 mikron (Bisping *et al.*, 1988).

Pada umumnya *E. coli* merupakan mikroflora normal pada usus manusia dan hewan, tetapi beberapa galur bersifat patogenik (Gyles, 1983). Bakteri tersebut mempunyai inang yang khas yang berkaitan erat dengan penyakit tertentu pada berbagai spesies hewan, seperti diare pada anak sapi, diare pada anak babi, diare pada babi pasca sapih, diare pada anjing, dan desentri pada kelinci. Infeksi *E. coli* pada unggas umumnya bersifat sistemik dan menimbulkan bakteriemia (Bisping *et al.*, 1988).

Kolibasilosis pada unggas umumnya disebabkan oleh *avian pathogenic E. coli* (APEC). Sejauh ini, APEC didominasi tiga serogroup, yaitu O1, O2 dan O 78 (Mellata *et al.*, 2003). Bakteri tersebut mampu menyebar melalui peredaran darah sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada berbagai organ, seperti perihepatitis, perikarditis, airsakulitis, mesenteritis, ooforitis, salpingitis, arthritis, panophthalmitis dan koligranuloma atau *Hjarre's disease* (Lafont, *et al.* 1987; Tabbu, 2000). Di samping itu, infeksi *E. coli* pada embrio ayam dapat menyebabkan radang pusar (omfalitis) (Barnes and Gross, 1997). Pada unggas, serotipe *E. coli* tertentu dapat menyebabkan dermatitis nekrotika (selulitis), yaitu radang pada jaringan subkutan, terutama pada otot dada bagian bawah (Mellata *et al.* 2003). Selulitis cenderung menyerang ayam broiler (Peighambari *et al.* 1995), dan menyebabkan kerusakan karkas dan peningkatan angka afkir sampai 42,5 % (Brito *et al.* 2003). Karena itu, secara ekonomi, infeksi *E. coli* pada unggas sangat merugikan peternak (Wooley *et al.*, 2000; Knobl *et al.* 2006).

Berbagai faktor penentu virulensi *E. coli* telah ditemukan. Faktor penentu virulensi *E. coli* yang terpenting pada unggas adalah antigen polisakarida K-1. Antigen tersebut terdapat pada bagian kapsula dan sangat menentukan resistensinya terhadap pertahanan inang selama proses septisemia (Dho-Moulin, 2000). Selain itu, ada dua jenis pili yang menentukan sifat

adesi bakteri, yaitu pili tipe I dan pili tipe P. Pili tipe I berperan dalam kolonisasi awal bakteri pada saluran pernafasan bagian atas, sedangkan pili tipe P bertanggung jawab atas kolonisasinya pada organ internal, di luar saluran pencernaan. Pili tipe P ini dianggap berperan penting dalam infeksi sistemik (Knobl, *et al.* 2006). Ada pula APEC yang memiliki senyawa dengan berat molekul rendah yang disebut aerobaktin dan berperan dalam sistem *up take* zat besi (Fe) yang memungkinkannya untuk tumbuh pada kondisi jaringan dengan kadar Fe yang terbatas (Dho-Moulin, 2000; Peighambari *et al.* 1995). Dewasa ini, telah juga ditemukan protein *Tsh* hanya pada APEC dan senyawa semacam ini tidak ditemukan pada *E. coli* yang diisolasi dari tinja ayam sehat (Maurer *et al.* 1998). *Tsh* tampaknya berperan dalam tahap awal infeksi pada kantong udara ayam (Dozois *et al.* 2000 sitasi Dho-Moulin, 2000). Selain itu, APEC juga menghasilkan eksotoksin yang disebut *chick-lethal toksin* (CLT) (Parreira dan Yano, 1998).

Berdasarkan sifat virulensinya, *E. coli* dibedakan menjadi 3 kelompok, yaitu virulensi tinggi; virulensi sedang dan avirulen. Virulensinya dapat ditentukan dari kemampuannya untuk membunuh embrio ayam, waktu yang diperlukan untuk membunuh embrio dan persentase kematian embrio. *E. coli* yang sangat virulen mampu menyebabkan kematian embrio pada hari kedua pasca-infeksi dengan mortalitas di atas 29%. *E. coli* dengan virulensi sedang menyebabkan kematian embrio antara 10 dan 29%, sedangkan yang avirulen menyebabkan kematian embrio di bawah 10 persen (Wooley *et al.*, 2000). Sebelumnya telah dilaporkan oleh Berhoff dan Vinal (1986), bahwa secara *in vitro* *Escherichia coli* virulen pada ayam mampu tumbuh pada media dan mengikat zat warna merah kongo, sedangkan *E. coli* avirulen dapat tumbuh pada media merah kongo, tetapi tidak mengikat warna merah kongo. Namun, sejauh mana tingkat virulensi *E. coli* yang diisolasi dari ayam pedaging di Indonesia belum banyak diteliti sehingga perlu dilakukan penelitian.

## METODE PENELITIAN

### Isolat *Escherichia coli*

Isolat *E. coli* patogenik asal unggas yang digunakan dalam penelitian ini adalah koleksi penulis di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas

Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, yaitu isolat Kalasan (Ec/Kls/4/02), Sleman (Ec/SI/1/02), dan Wonosari (Ec/Wno/2/02). Isolat tersebut telah dikarakterisasi sebagai *E. coli* virulen menggunakan media merah kongo dan inokulasi pada telur ayam berembrio pada penelitian sebelumnya (Nugroho *et al.*, 2002).

#### Pasase *in-vivo* dan Re-identifikasi.

Tiga isolat *E. coli* tersebut telah dikonfirmasi kemurnian, sifat-sifat biokemis, dan patogenitasnya pada media merah kongo (Berkhoff dan Vinal, 1986). Skrining patogenitasnya secara *in vivo* dilakukan pada ayam broiler umur 15 hari. Bakteri disuntikkan secara intraperitoneal, diamati gejala klinis yang timbul dan diisolasi kembali. Isolat yang mampu menyebabkan sakit pada ayam tersebut dikultur dan disiapkan sebagai isolat yang akan ditentukan dosis infeksi-50-nya.

#### Uji Patogenitas.

Isolat yang sebelumnya telah dipasase secara *in vivo* dipupuk pada media *Eosin Methylene Blue* selama 24 jam pada suhu 24°C. Satu koloni bakteri diambil, dipupuk pada kaldu BHI, dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi yang setara dengan standar *Mc Farland I* dibuat dengan pengenceran berkelipatan 10 mulai dari pengenceran 10<sup>-1</sup> sampai dengan 10<sup>-10</sup>. Sebanyak 0,5 ml dari setiap pengenceran disuntikkan pada 5 ekor ayam broiler umur 15 hari secara intraperitoneal. Perkembangan ayam dimonitor selama 7 hari, dan ayam yang menunjukkan gejala klinis maupun mati dicatat. Ayam mati atau menunjukkan gejala klinis tersebut nekropsi dan bakteri *E. coli* diisolasi kembali sebagai konfirmasi penyebab penyakit pada ayam tersebut (Radji *et al.*, 2003). Kemampuan bakteri pada setiap pengenceran untuk menimbulkan penyakit dicatat untuk menentukan dosis infeksinya. Dosis infeksi (DI)<sub>50</sub> ditentukan dengan metode *Reed dan Muench* (Stehling *et al.* 2003 dengan modifikasi).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### *E. coli* yang Dipasase secara *in vivo*.

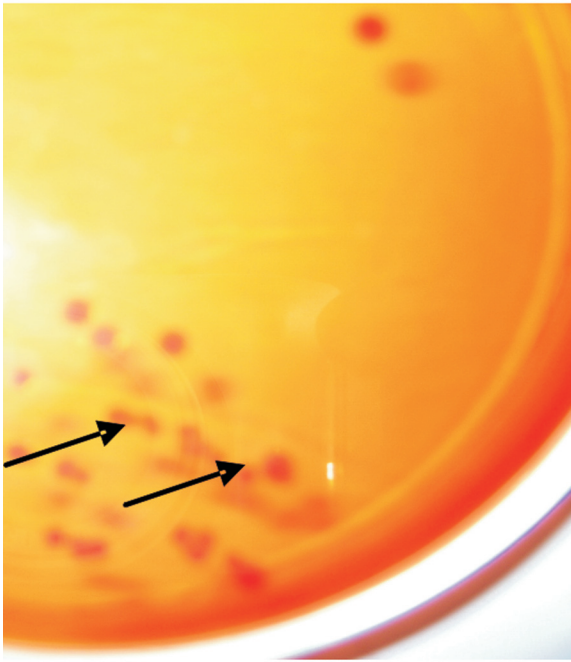
Dalam penelitian ini, digunakan ayam pedaging umur 15 hari untuk mengukur tingkat patogenitas *E. coli* isolat Sleman (Ec/SI/1/02), dan Kalasan (Ec/Kls/4/02). Umur tersebut dipilih karena, di lapangan, *E. coli* umumnya

menyerang ayam umur 2-3 minggu. Hal tersebut juga sejalan dengan penelitian Peighambari, *et al.*, (2000) bahwa pada infeksi buatan dengan APEC, kolibasilosis terjadi pada ayam yang berumur 2 sampai 4 minggu. Sementara itu, Radji *et al.*, (2003), menggunakan ayam berumur 20 hari dalam uji patogenitas *E. coli* secara *in vivo*.

Isolat *E. coli* mula-mula dipasase secara *in vivo* yang dimaksudkan untuk membangkitkan kembali patogenitasnya karena pemupukan bakteri secara *in vitro* dapat menurunkan patogenitasnya. Isolat Wonosari tidak mampu menimbulkan penyakit pada ayam setelah pasase *in vivo*. Hasil ini berbeda dengan isolat Kalasan dan Sleman yang mampu menimbulkan penyakit dan beberapa di antaranya menyebabkan kematian pada ayam uji. Hasil ini sejalan dengan hasil uji patogenitas isolat tersebut pada embrio ayam yang secara berturut-turut mampu menyebabkan kematian embrio ayam, yaitu isolat Kalasan (Ec/Kls/4/02) (100%), Sleman (Ec/SI/1/02) (60%), dan Wonosari (Ec/Wno/2/02) adalah (10%) (Nugroho *et al.*, 2002). Hasil nekropsi terhadap ayam sakit dan mati menunjukkan adanya beberapa lesi, yaitu peritonitis, perihepatitis, dan perikarditis dengan derajat keparahan yang bervariasi. Lesi yang ditimbulkan pada infeksi buatan ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Tabbu, (2000). Bakteri dapat diisolasi kembali dari sampel darah jantung dan hati yang menunjukkan lesi perihepatitis yang membuktikan bahwa penyakit yang muncul memang disebabkan oleh *E. coli*. Pada media merah kongo, bakteri mampu mengikat zat warna merah kongo yang mengindikasikan bahwa isolat bersifat patogen (Gambar 1).

#### Patogenitas *E. coli*

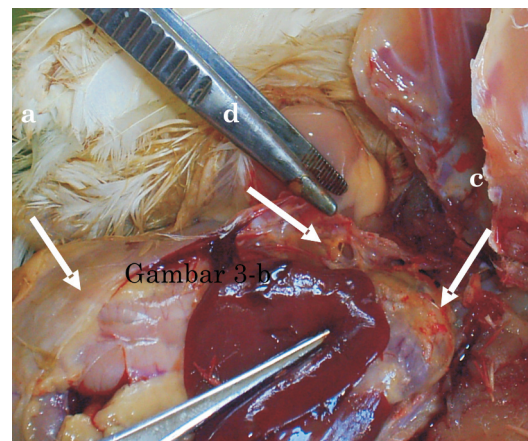
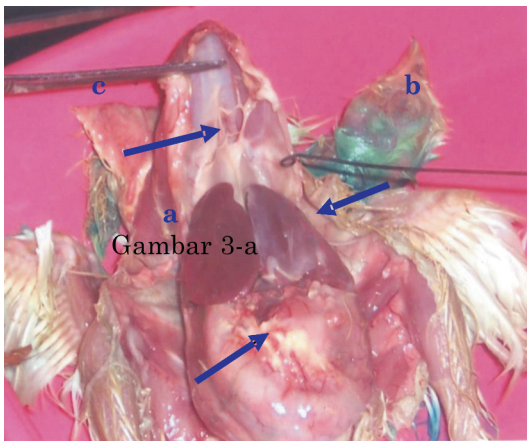
Hasil uji patogenitas isolat Sleman (Ec/SI/1/02) pada ayam broiler umur 15 hari, tampak bahwa pada pengenceran 10<sup>-1</sup> dan pengenceran 10<sup>-2</sup> bakteri mampu menimbulkan penyakit, sedangkan pada pengenceran 10<sup>-3</sup> sampai dengan 10<sup>-10</sup> tidak mampu menimbulkan gejala klinis sampai dengan 7 hari pasca infeksi. Sementara itu, infeksi *E. coli* isolat Kalasan (Ec/Kls/4/02) pada ayam broiler umur 15 hari dengan pengenceran sampai dengan 10<sup>-3</sup> mampu menyebabkan sakit pada ayam uji, sedangkan infeksi dengan pengenceran 10<sup>-4</sup> sampai dengan pengenceran 10<sup>-10</sup> tidak menyebabkan gejala



Gambar 1. Koloni *E. coli* isolat asal unggas mampu mengikat zat warna merah kongo pada media congo red (→).



Gambar 2. Gambaran klinis ayam yang diinfeksi *Escherichia coli* isolat kalasan (*Ec/Kls/4/02*) yang menunjukkan depresi, bulu-bulu kasar, sayap menggantung dan kelemahan umum.



Gambar 3. Lesi makroskopis ayam yang diinfeksi dengan bakteri *Escherichia coli* patogen isolat Kalasan (*Ec/Kls/4/02*. a) peritonitis, b) perihepatitis, dan c) perikarditis, d) airsakulitis.

sakit. Gejala klinis yang teramati adalah depresi, anoreksi, bulu-bulu kasar, sayap menggantung dan kelemahan umum (Gambar, 2). Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Radji *et al.*, (2003) bahwa *E. coli* patogen pada unggas dapat menimbulkan gejala diare pasta, depresi, anoreksi, bulu-bulu kasar, sayap menggantung dan kelemahan umum. Pada pemeriksaan pasca-mati ditemukan pembengkakan organ hati, kongesti jantung, limpa dan paru-paru.

Ayam sakit yang diperoleh dari setiap pengenceran, baik isolat Sleman (*Ec/SI/1/02*) maupun isolat Kalasan (*Ec/Kls/4/02*), dinekropsi pada hari ke-7 pasca infeksi. Perubahan yang teramati adalah peritonitis, perihepatitis, dan perikarditis dengan tingkat keparahan yang bervariasi (Gambar, 3a dan 3-b). Lesi airsakulitis yang tidak terlihat jelas sampai hari ke-7 menjadi sangat jelas pada hari ke-12 (Gambar 3-b). Pada infeksi buatan yang dilakukan secara intra peritoneal tampaknya memerlukan waktu yang lebih lama bagi bakteri untuk menginfeksi kantung udara. Infeksi *E. coli* secara aerosol dan intra thorak selalu menimbulkan lesi airsakulitis (Peighambari *et al.* 2000; Pourbakhsh *et al.*

1997). Selain itu, ditemukan pula lesi perihepatitis pada hati (Radji *et al.* 2003). Barner and Gross (1997) juga melaporkan adanya lesi perikarditis pada infeksi *E. coli* yang ditandai dengan penebalan dan kekeruhan perkardium. Namun, lesi yang diamati pada kasus ini adalah epikardium tampak berair dan ditutupi oleh eksudat kekuningan (Gambar 3-b).

Untuk membuktikan bahwa penyakit yang muncul disebabkan oleh bakteri yang diinokulasikan, dilakukan re-isolasi dan identifikasi *E. coli* dari ayam yang diinokulasi. Sampel darah jantung dan lesi organ terutama perihepatitis diambil dan bakteri *E. coli* yang patogen dapat diisolasi kembali. Kultur bakteri pada media merah kongo mampu mengikat zat warna merah kongo yang membuktikan bahwa bakteri tersebut bersifat patogenik. Data klinis akibat infeksi buatan dengan *E. coli* isolat Kalasan (*Ec/Kls/4/02*) pada ayam broiler umur 15 hari disajikan pada (Tabel 1)

Pada tabel 1 tampak bahwa bakteri masi mampu menimbulkan penyakit pada sebagian kecil pada pengenceran  $10^{-3}$ . Pada pengenceran  $10^{-4}$ , tidak ada ayam yang menunjukkan gejala penyakit. Menurut metode Reed dan Muench, dosis infeksi-50 terletak di antara pengenceran

Tabel 1. Data perhitungan dosis infeksi-50 isolat Kalasan (*Ec/Kls/4/02*) dengan metode Reed dan Muench.

Pengenceran bakteri	Jumlah ayam	Jumlah terinfeksi	Jumlah tidak terinfeksi	Kumulatif terinfeksi (A)	Kumulatif tidak terinfeksi (B)	Prosentase terinfeksi $\frac{A}{A+B}$
$10^{-1}$	5	5	0	11	0	100
$10^{-2}$	5	5	0	6	0	100
$10^{-3}$	5	1	4	1	4	20
$10^{-4}$	5	0	5	0	9	0
$10^{-5}$	5	0	5	0	14	0

Tabel 2. Data perhitungan dosis infeksi-50 isolat Sleman (*Ec/SI/1/02*) , menurut metode Reed dan Muench.

Pengenceran	Jumlah ayam	Jumlah terinfeksi	Jumlah tidak terinfeksi	Kumulatif terinfeksi (A)	Kumulatif tidak terinfeksi (B)	Prosentase terinfeksi $\frac{A}{A+B}$
$10^{-1}$	5/5	5	0	7	0	100
$10^{-2}$	2/5	2	3	2	3	40
$10^{-3}$	0/5	0	5	0	8	0
$10^{-4}$	0/5	0	5	0	13	0
$10^{-5}$	0/5	0	5	0	18	0

$10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ , dan setelah dihitung ternyata pengenceran tertinggi yang menyebabkan infeksi 50% adalah  $10^{-2,6}$ . Dosis infeksi dinyatakan sebagai antilog pengenceran tertinggi yang mampu menyebabkan infeksi pada 50 % ayam yang diinfeksi. DI-50 isolat Kalasan adalah  $10^{2,6}$  per 0,5 ml, atau setara dengan  $2 \times 10^{2,6}$  bakteri per ml yang ditentukan dari standar *Mac Farland I*. Dengan cara yang sama DI-50 isolat Sleman (*Ec/SI/1/02*) dihitung (Tabel 2) dan diperoleh DI-50nya  $10^{1,8}$  per 0,5 ml, atau  $2 \times 10^{1,8}$  per ml yang ditentukan dari pengenceran biakan menurut standar *Mac Farland I*.

Hasil tersebut DI-50 isolat Kalasan (*Ec/Kls/4/02*) ( $2 \times 10^{2,6}$ ) berbeda dengan dengan isolat Sleman (*Ec/SI/1/02*) ( $2 \times 10^{1,8}$ ) yang menunjukkan bahwa isolat Kalasan (*Ec/Kls/4/02*) lebih patogenik. Hasil ini sejalan dengan hasil uji letalitas pada embrio ayam, yaitu isolat kalasan (*Ec/Kls/4/02*) mampu menyebabkan kematian embrio ayam sebesar 100 persen, sedangkan isolat sleman (*Ec/SI/1/02*) menyebabkan kematian embrio ayam sebesar 60 % (Nugroho *et al.* 2002). Virulensi dan lama kontak dengan mikroba merupakan penentu utama bagi timbulnya penyakit pada inang (Radji *et al.* 2003). Meskipun, lesi yang ditimbulkan tidak selalu sama, bakteri *E. coli* selalu menimbulkan lesi pada inang yang peka (Peighambari, *et al.* 2000; Pourbakhsh, *et al.* 1997; Radji *et al.* 2003).

### SIMPULAN

Dari tiga isolat *E. coli* yang dipakai dalam penelitian ini, dua isolat, yaitu Kalasan (*Ec/Kls/4/02*) dan Sleman (*Ec/SI/1/02*), mampu menyebabkan sakit pada ayam broiler umur 15 hari dengan gejala tersifat septisemia seperti perihepatitis, peritonitis, perikarditis dan airsakulitis. Dosis infeksi (DI-50) isolat *E. coli* Kalasan (*Ec/Kls/4/02*) adalah  $2 \times 10^{2,6}$  per ml, sedangkan isolat Sleman (*Ec/SI/1/02*) adalah  $2 \times 10^{1,8}$  per ml. Ini membuktikan bahwa isolat Kalasan bersifat lebih patogenik jika dibandingkan dengan isolat Sleman.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, yang telah memberikan bantuan dana penelitian melalui

Dana Masyarakat, FKH UGM. dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian, Nomor: 1906A/J.01.1.22/LK/2005, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

### DAFTAR PUSTAKA

- Barnes HJ Gross WB. 1997. *Colibacillosis. Dalam Disease of Poultry*. Calnek B W, HJ Barnes; CW Beard, MLR M Dougald, YM Saif (eds). Tenth Edition. Iowa State University Press, Ames. USA. Hal : 131-139.
- Berhoff, Vinal. 1986. Congo Red Medium to Distinguish Invasive and Non-invasive *Escherichia coli* Pathogenic for Poultry. *Avian Dis* 30: 117-121.
- Bisping W, Amtsberg GA. 1988. *Color Atlas for The Diagnosis of Bacterial Pathgen in Animals*. Berlin : Paul Parey Scientific Publishers. Hal. 160-168.
- Brito BG, Gaziri LC, Vidotto MC. 2003. Virulence factors and clonal relationship among *Escherichia colis* starins isolated from broiler chickens with cellulitis. *J Infect Immun* 71: 4175-4177.
- Carter ME, Chengappa MM, 1990. *Enterobacteria. Dalam Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*. Carter, G. R. dan J. R. Cole (eds). San Diego : Academic Press. Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. Hal. 107-128.
- Dho-Moulin M 2000. Role of Various Virulence Factors in the Pathogenicity of Colibacillosis in Poultry. *World Poultry Congress, Scientific Program for Escherichia coli*. Pp.: 1-11.
- Edwards PR, Ewing WH. 1972. The Genus *Escherichia*. *Dalam Identification of Enterobacteriaceae*. Edwards, p. R. and W. H. Ewing (eds). Third Edition, Burgess Publishing Company. Hal. 67-107.
- Gillespie JH, Timoney JF. 1981. *The Enterobacteriaceae - The Lactose Fermenters. Dalam Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals, Seventh Edition*. Itacha : Cornell University Press. Hal 74-81.
- Gomis SM, Watt T, Riddel C, Potter AA, Allan BJ. 1997. Experimental Reproduction of *Escherichia coli* Cellulites and Septicemia in Broiler Chickens. *Avian Dis* 41: 234-240.

- Gyles CL. 1983. *Escherichia coli*. Dalam Pathogenesis of Bacterial Infection in Animal. Gyles, C. L. and. Thoen, C. O (eds). Second Edition. Ames : Iowa State University Press. Hal. 164-187.
- Knobl T, Gomes TAT, Vieira MAM, Bottino JA, Ferreira AJP. 2006. Occurance of Adhesin-encoding Operons in *Escherichia coli* Isolated from Breeder with Salpingitis and Chick with Omphalitis. *Braz J Microbiol* 37:Without page.
- Lafont JP, Maryvone D, Elena MD, Hauteville, BreedA, Sansonetti JP. 1987. Presence and Expression of Aerobactin Genes in Virulent Avian Strains of *Escherichia coli*. *J Infect Immun* 55:193-197.
- Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer GL. 1998. The Occurrence of Ambient Temperature-regulated Adhesins, Curli, and Temperature-sensitive Hemagglutinin Tsh Among Avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 42; 106-118.
- Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss M, Brown PK, Arne P, Bree A, Dasautels C, Fairbrother JM, 2003. Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to Serum and in Pathogenicity. *J Infect Immun*. 71: 536 - 540.
- Nugroho SN, Wibowo MH, Asmara W. 2002. Patogenesitas Isolat *Escherichia coli* Positif Congo Red pada Telur Ayam Berembrio Umur 12 Hari. *J Sain Vet* XX.:25 – 29.
- Parreira V R, Yano T. 1998. Cytotoxin Produced by *Echerichia coli* Isolated from Chicken with Swollen Head Syndrom. *Vet Microbiol* 62: 111-119.
- Peighambari SM, Villiancourt JP, Wilson RA, Gyles CL. 1995. Characteristic of *Escherichia coli* Isolates from avian Cellulitis. *Avian Dis* 39: 116-124.
- Peighambari SM, Julian SM, Gyles CL. 2000. Presence and Expression of Aerobactin Genes in Virulent Avian Strains of *Escherichia coli*. *J Infect Immun* 55: 193-197.
- Pourbakhsh SA, Boulianne M, Doize BM, Dozois CM, Desautel SC, Fairbrithers JM 1997. Dinamic of *Escherichia coli* Infection in Experimentally Inoculated Chicken. *Avian Dis* 41: 221-133.
- Radji MA, Adekeye JO, Kwaga JKP; Bale JOO. 2003. *In Vitro* and *in Vivo* Patogenicity Studies of *Escherichia coli* Isolated from Poultry in Nigeria. <http://www.isrvma.org/article/58-1-6.htm>.
- Stehling EG, Compos TA, Ferreiradan A, Silveira WD. 2003. Adhession and Invassion Characteristic a Septicemia Avian *Escherichia coli* Strain are Plasmid Mediated. *Int J Appl Res in Ve Med*. <http://www.jarvm.com/article/Vol1Iss1/STEHLJVM.htm>.
- Tabbu CR. 2000. *Kolibasilosis, Dalam Penyakit Ayam dan Penanggulangannya*. Penerbit Kanisius, Jogjakarta. Vol. 1, hal.:31-51.
- Wooley RE, Gibbs PS, Brown TP, Maurer JJ. 2000. Chicken embryo lethality assay for determing the virulence of avian *Escherichia coli* Isolates. *Avian Dis*. 44: 318-324.