

Aplikasi Kandidat Pemindai untuk Diagnosis Gen *Shiga like toxin-2* dari *Escherichia coli* O157:H7

(PROBE APPLICATION TO DIAGNOSTIC PROGRAMME OF SHIGA LIKE TOXIN-2 (STX2)
GEN FROM *ESCHERICHIA COLI* O157:H7)

I Wayan Suardana¹, I Nengah Sujaya², Wayan Tunas Artama³

¹Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,
Jl. Sudirman Denpasar, Bali Telepon (0361) 223791, 701808

E-mail : iwayansuardana22@yahoo.com

²Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana,
Jl.PB.Sudirman Denpasar, Bali. Tlp. (0361) 222510, 701805.

E.mail: sakabali@hotmail.com

³Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna No. 2, Yogyakarta 55281, Tlp.(0274) 560864, Fax.(0274) 560861

E-mail: artama@ugm.ac.id

ABSTRAK

Ditemukannya Shiga-like toxin dari *Escherichia coli* O157:H7 pada feses sapi, daging sapi dan feses manusia, mengindikasikan keberadaan bakteri tersebut sebagai agen zoonosis sangat membahayakan dan mengancam kehidupan. Mengingat pentingnya *E.coli* O157:H7 bagi kesehatan masyarakat, analisis keragaman genetik *Shiga Toxin Escherichia coli* (STEC) serta pengembangan perangkat diagnostik seperti *probe* gena menjadi sangat penting dilakukan. Kegiatan penelitian diawali dengan tahapan perancangan dan sintesa *probe* PS2 dengan susunan nukleotida 5'TTACACATATATCAGTGCCCGG-TGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACTCTGCAACGTGTCGACGCGCTGGAA-ACGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCA '3, dilanjutkan dengan analisis hasil pelabelan *probe*, ekstraksi DNA genom, hibridisasi *dot blot* DNA-DNA, diakhiri dengan deteksi hibridisasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *probe* PS2 berhasil dikembangkan untuk mendeteksi gen Shiga like toksin (gen *Stx2*) dari *E. coli* O157:H7. *Probe* yang dirancang diketahui memiliki efisiensi pelabelan sampai 10 pg/μl. *Probe* PS2 dengan konsentrasi 25 ng/ml diketahui mampu mendeteksi komplementernya pada sampel sampai pada konsentrasi DNA template 10 ng/μl.

Kata kunci : *E.coli* O157:H7, *Shiga like toxin*, *probe* PS2.

ABSTRACT

A Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 has been detected in cattle fecal sample, at beef, and human as well as in beef and indicating that the agent is a harmful zoonosis bacteria. Genetic analysis of Shiga toxin *Escherichia coli* (STEC) gene is important for development of probe to improve the diagnosis method for the agent. The study consisted of degrading and synthesizing of PS2 probe with nucleotide sequence, 5'TTACACATATATCAGTGCCCGGTGTA-CAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACTCTGCAACGTGTCGACGCGCTGGAA-CGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCA '3, analyzing of labeled probe, extracting of genomic DNA, hybridizing dot-blot DNA-DNA, and finally detecting of hybridization signal. The results show that PS2 probe can be used to detect Shiga like toxin gene (*stx2* gene) from *E. coli* O157:H7. The Probe has labeling efficiency up to 10 pg/μl. PS2 probe with 25 ng/ml concentration has a capability to detect its complementary in 10 ng/μl DNA samples concentration.

Key words: *E.coli* O157:H7, *Shiga like toxin*, PS2 *probe*

PENDAHULUAN

Sampai saat ini informasi keberadaan *Escherichia coli* O157:H7 dalam kaitannya sebagai agen zoonosis di Indonesia masih sangat jarang terungkap, padahal *Shiga toxin* yang dihasilkan oleh bakteri ini dapat menimbulkan bahaya yang cukup fatal terutama pada anak-anak dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi (Acheson, 2000; Wani *et al.*, 2004). Sebagian besar efek merugikan dari kejadian infeksi *E.coli* O157:H7 diawali dengan dihasilkannya salah satu atau kedua jenis toksin yaitu *Shiga Like Toxin-1* (Stx-1) maupun *Shiga Like Toxin-2* (Stx-2) (Centers for Disease Control and Prevention, 2000; Barlow *et al.*, 2006). 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 feces sapi sebesar 7,61%, pada daging sapi sebesar 5,62% dan pada feces manusia sebesar 1,3%, menguatkan hipotesis bahwa serotipe lokal dari bakteri ini juga berpotensi besar sebagai agen zoonosis yang harus diwaspadai sehingga perlu dikaji secara lebih mendalam.

Hill dan Jinneman (2000) menyatakan bahwa, untuk tujuan kajian epidemiologi suatu agen zoonosis sebaiknya digunakan aplikasi teknik genetik mengingat keunggulan dari metode ini yakni memiliki sensitivitas yang sangat tinggi. Bhaduri *et al.*, (2001 dalam Moon *et al.*, 2004) mengungkapkan bahwa dalam beberapa dekade belakangan ini, berbagai teknik diagnostik secara molekuler telah digunakan dalam memantau *foodborne pathogen* untuk tujuan perlindungan masyarakat.

Metode deteksi yang didasarkan atas PCR merupakan suatu alat yang sangat membantu karena spesifisitasnya yang tinggi serta kesederhanannya (Hill and Jinneman 2000). Gen target untuk deteksi spesifik dengan teknik PCR biasanya terkait dengan faktor virulensi dari pathogen seperti gen *Shiga-like toxins* (Stx1 dan Stx2) dari *E.coli* O157:H7 yang merupakan gen penyandi dalam produksi verotoksin (Gyles, 2007), disamping juga gen lainnya seperti gen yang terkait dengan protein yang berperan dalam penempelan atau perlekatan pada tubuh hospes yaitu gen *eaeA* (Ghanbarpour and Oewald, 2010).

Selain teknik PCR, sangat perlu dikembangkan teknik diagnosis lainnya yang

lebih cepat dan lebih mudah khususnya apabila digunakan untuk aplikasi lapangan, mengingat teknik PCR membutuhkan adanya suatu peralatan dan laboratorium yang cukup mahal. Salah satu teknik modern tersebut adalah pengembangan teknik diagnosis dengan menggunakan *probe* molekuler (Sambrook and Russel, 2001).

Probe secara kimiawi dan biologis merupakan suatu molekul yang hanya dapat berinteraksi secara kuat dengan molekul targetnya, akibat adanya ikatan yang kuat antara basa C-G dan A-T, seperti halnya ikatan antara antigen dengan antibodi, ataupun ikatan antara avidin dan biotin serta ikatan antara lateks dengan karbohidrat (Reisch *et al.*, 2003). Lebih lanjut Hill dan Jinneman (2000), menyatakan bahwa adanya penemuan gene *probe*, disamping keunggulannya dapat mempercepat deteksi suatu strain bakteri dan / atau gen virulensi, pemakaian *probe* juga dapat mengurangi penggunaan media pertumbuhan ataupun hewan coba, disamping kemudahannya dapat diaplikasikan pada laboratorium-laboratorium dengan peralatan yang minimum. Bertitik tolak dari permasalahan diatas maka penelitian "Pengembangan Kandidat *Probe* untuk Optimalisasi Diagnosis Agen Zoonosis *E.coli* O157:H7" ini sangat penting untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Sintesis Probe

Sintesis *probe* PS2 dilakukan dalam bentuk oligonukleotida dengan memesan pada distributor.

Pelabelan Probe dengan dig 11-dUTP

Probe hasil sintesis dilabel dengan dig 11-dUTP yang dilakukan melalui dua tahap yaitu penyiapan bahan pelacak, dan proses pelabelan dengan *dig high prime* (dNTP mix yang mengandung *dig 11 dUTP alkali labil*, enzim *Klenow* dan *reaction buffer*). Tahap pertama adalah oligonukleotida yang dibeli di pasaran yang mengandung 32 µg/µl diencerkan dengan 32 µl ddH₂O steril sehingga diperoleh konsentrasi sebanyak 1 µg/µl. Sebanyak 1 µl dari larutan tadi dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml selanjutnya ditambahkan 16 µl ddH₂O. Oligonukleotida tadi selanjutnya di denaturasi dengan jalan memanaskan pada air mendidih selama 10 menit, untuk selanjutnya segera

ditaruh dalam es (*chilled on ice*). Pada tahap ke-dua, tabung *dig high prime* yang ada dalam kit diambil dan dicampur dengan jalan diketuk ketuk dengan jari. Sebanyak 4 µl *dig high prime* dipipet dan ditambahkan ke dalam tube yang mengandung larutan *probe* tadi. Tube selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama semalam. Setelah 20 jam inkubasi, reaksi dihentikan dengan cara pemberian 2 µl EDTA 0.2 M pH 8,0. DNA pelacak yang sudah terlabel selanjutnya disimpan dalam *freezer*.

Kuantifikasi Efisiensi Hasil Pelabelan Probe

Kuantifikasi efisiensi hasil pelabelan *probe* dilakukan melalui tahapan penyiapan berbagai konsentrasi *probe*, yang dilanjutkan dengan tahap proses deteksi. Tahap penyiapan konsentrasi *probe* dilakukan untuk DNA kontrol (konsentrasi 5 µg/µl) dan *probe* terlabel (konsentrasi 43700 pg/µl) secara bersama sama dengan cara membuat konsentrasi yang sama yaitu 1000 pg/µl. Selanjutnya, dari konsentrasi 1000 pg/µl dibuat konsentrasi berseri yaitu 500 pg/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 0,3 pg/µl dan 0,1 pg/µl. Sebanyak 1,5 µl dari masing-masing seri pengenceran tadi diteteskan pada membran nilon bermuatan positif, selanjutnya difiksasi pada oven bersuhu 120°C selama 30 menit. Membran selanjutnya dipindahkan ke plat kecil yang berisi 10 ml *maleic acid buffer* untuk selanjutnya di inkubasikan pada suhu kamar selama 2 menit di atas *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Membran selanjutnya di blok dengan *blocking solution* 1 X selama 10 menit, diinkubasikan dengan *antibody solution* (*anti-digoxigenin AP conjugate* dengan pengenceran 1:5000) masing-masing selama 30 menit pada suhu kamar di atas *shaker* dengan kecepatan sama. Membran selanjutnya dicuci 2 x 15 menit dengan *washing buffer* (0.1 M *maleic acid*; 0,15 M NaCl pH 7,5; 0.3% Tween 20), selanjutnya di *equilibrate* dengan 10 ml *detection buffer* selama 2 menit. Pada tahapan akhir dari deteksi, membran di inkubasikan dengan 2 ml *color substrat solution* (20 µl NBT/BCIP dengan 1 ml *detection buffer*) pada ruang gelap selama 5-30 menit. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya *dot* pada membran, dan reaksi dihentikan dengan merendamkan membran pada dH₂O steril selama 5 menit.

Ekstraksi DNA Genom Bakteri

Untuk menguji kemampuan *probe* sebagai perangkat diagnostik, *probe* yang dibuat

selanjutnya diuji terhadap genom bakteri. Isolasi DNA genom bakteri dilakukan dengan *QIAamp DNA Mini Kit* (*Qiagen*) dengan prosedur sebagai berikut:

Tahap isolasi DNA genomik bakteri mengacu pada prosedur kit. Isolat *E. coli* hasil isolasi dan identifikasi dipanen dengan cara sentrifugasi (7500 rpm selama 5 menit), supernatannya dibuang, pelet sel ditambahkan 180 µl buffer ATL dan 20 µl larutan proteinase K, divortek selama 5 detik, ditambahkan 200 µl buffer AL divortek selama 15 detik, diinkubasikan pada *waterbath* suhu 56°C selama 10 menit, ditambahkan 200 µl etanol absolut 96-100%, divortek selama 15 detik. *Lysate E. coli* selanjutnya digunakan untuk *binding* DNA. Disiapkan 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 di buang, dan filter yang telah mengandung DNA dimasukkan ke dalam tube 2 ml yang baru, dilanjutkan dengan *washing* DNA. Filtrat DNA ditambahkan 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 dengan tahapan *eluting* DNA.

QIAamp Mini spin column yang mengandung DNA dimasukkan ke dalam ependorf steril baru, ditambahkan 50 µl *elution buffer* (buffer AE), didiamkan pada suhu kamar selama 5 menit, dan disentrifius dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit (*tube* telah mengandung larutan DNA murni). Untuk menghindari pengulangan *freezing* dan *thawing*, DNA murni disimpan pada 4°C untuk penggunaan langsung atau disimpan dalam *freezer* -20°C untuk penyimpanan dalam waktu lama.

Hibridisasi dot-blot DNA-DNA

Hibridisasi *dot-blot* dilakukan pada template DNA genom *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 sebagai kontrol positif, serta DNA yang mau diuji. DNA kontrol dan DNA sampel diencerkan hingga konsentrasi yang dikehendaki, dilanjutkan dengan *denaturasi* pada suhu 100°C selama 10 menit dan segera dimasukkan ke dalam es. Sebanyak 2 µl sampel DNA di imobilisasikan pada membran nylon

Hybond bermuatan positif (Roche). Membran dikeringkan anginkan selama 2 menit pada suhu ruang, dilanjutkan dengan pengeringan dalam oven dengan suhu 120°C selama 30 menit. Prehibridisasi dilakukan pada suhu 43°C selama 60 menit dalam medium prehibridisasi (*DIG easy hyb*). Hibridisasi dilakukan selama satu malam pada suhu 43°C dengan menambahkan 2 µl/ml *probe* yang dilabel dengan DIG yang sudah didenaturasi sebelumnya pada suhu 100°C selama 10 menit ke dalam medium hibridisasi. Sesudah tahap hibridisasi, membran dicuci dua kali pada suhu ruang dengan 2X SSC 0.1% SDS selama 5 menit, dilanjutkan dengan pencucian dua kali dengan 0.5X SSC 0.1% SDS selama 15 menit pada suhu 68°C (Roche, 2006).

Deteksi Hibridisasi

Deteksi hibridisasi dilakukan dengan mereaksikan antara *anti-digoxigenin alkaline phosphatase-conjugated* pada membran dengan substrat *nitroblue tetrazolium chloride* (NBT) dan *5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate* (BCIP) dengan prosedur kerja sesuai petunjuk suplaiyer sebagai berikut: membran hibridisasi terlebih dahulu dicuci dengan *washing buffer I* (100 mM *maleic acid*, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,3% Tween 20) selama 1-3 menit, diblok dengan larutan *blocking solution* (100 mM *maleic acid*, 150 mM NaCl, pH 7,5, 1% *blocking reagent*) selama 1 jam. Membran selanjutnya diinkubasikan dengan *antibody solution (anti-digoxigenin AP conjugate)* dengan pengenceran 1:3000 masing-masing selama 1 jam pada suhu kamar di atas *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Membran selanjutnya dicuci 2 x 15 menit dengan *washing buffer* (0,1 M *maleic acid*, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 0,3% Tween 20), selanjutnya di *equilibrate* dengan 10 ml *detection buffer* selama 2 menit. Pada tahapan akhir dari deteksi hibridisasi, membran di inkubasikan dengan 2 ml *color substrat solution* (20 µl NBT/BCIP dengan 1 ml *detection buffer*) pada ruang gelap selama 5-30 menit. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya *dot* pada membran, dan reaksi distop dengan cara merendamkan membran ke dalam dH₂O steril selama 5 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

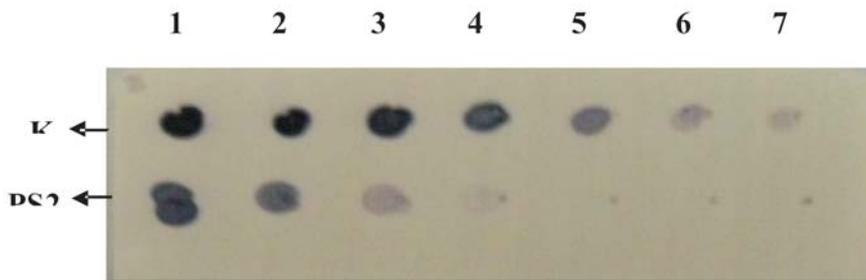
Probe PS2 yang telah disintesis selanjutnya dilabel dengan *dig 11-dUTP* dan hasil kuantifikasi pelabelan dibandingkan dengan

kontrol DNA yang telah terlabel DIG yang disediakan dalam Kit. Hasil pelabelan dan kuantifikasi efisiensi pelabelan *probe* PS2 seperti tersaji pada Gambar 1.

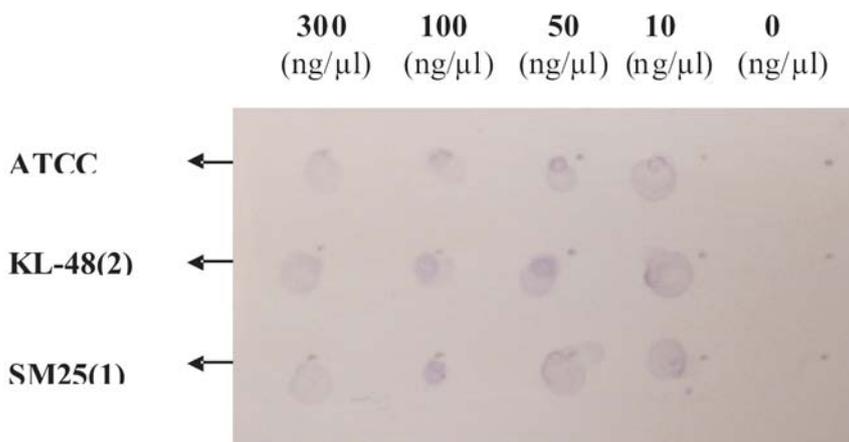
Dari gambar 1. terlihat bahwa *probe* PS2 yang dirancang dengan panjang 115 bp berhasil di label dengan *dig 11-dUTP* dengan tingkat kuantifikasi pelabelan sampai 10 pg/µl. Pelabelan *probe* dapat berhasil karena *probe* yang dirancang bereaksi dengan *dig high prime* yang mengandung random primer, nukleotida-nukleotida, *dig 11 dUTP*, enzim *polymerase* (enzim *Klenow*) dan komponen *buffer*. Terbentuknya dot berwarna biru merupakan hasil reaksi antara antibodi anti dig yang dikonyugasikan dengan *alkali fosfatase* (AP) bereaksi saat penambahan substrat NBT/BCIP. Timbulnya warna menunjukkan bahwa terdapat DNA yang berlabel dengan pelabel *dig-11 dUTP*. Bila tidak ada DNA yang terlabel, maka antibodi *anti dig* akan bebas dan akan hilang saat pencucian. Pada membran kontrol terlihat bahwa antibodi *anti dig* mampu mendeteksi DNA berlabel sampai pada konsentrasi 0,1 pg/µl, sedangkan pada PS2 (*probe* yang dirancang) antibodi *anti dig* mampu mendeteksi DNA berlabel hanya sampai konsentrasi 10 pg/µl. Dengan kata lain efisiensi pelacak berlabel (*probe* PS2) untuk dapat dideteksi dengan antibodi *anti dig* adalah 10 pg/µl. Menurut protokol pelabelan, jumlah minimal suatu *probe* yang ideal untuk digunakan dalam proses diagnosis adalah 30 pg/µl. Atas dasar ini, maka *probe* yang dirancang (*probe* PS2) dapat digunakan lebih lanjut dalam proses diagnosis.

Hasil penghitungan terhadap konsentrasi dan kemurnian DNA template memperlihatkan bahwa konsentrasi DNA yang digunakan dalam uji hibridisasi berkisar antara 172,5 µg/ml sampai 235.0 µg/ml dengan tingkat kemurnian antara 1,25 sampai 1,40. Kemurnian DNA yang baik adalah berkisar antara 1,5 – 1,8. Angka kemurnian di atas 1,8 menunjukkan terdapatnya protein pada larutan, sedangkan angka kemurnian kurang dari 1,5 menunjukkan DNA terkontaminasi oleh RNA (Sambrook and Russel, 2001).

Pada pengujian dengan metode hibridisasi, diperlukan kontrol positif dan negatif yang bertujuan sebagai kontrol sensitivitas dan spesifisitas dalam hibridisasi, disamping juga untuk menjamin kepastian hasil uji hibridisasi (Foy and Parkes, 2001). Kontrol positif yang digunakan yaitu DNA *E. coli* ATCC 43894, sedangkan kontrol negatif digunakan PBS



Gambar 1. Hasil identifikasi efisiensi labeling *probe* PS2 dengan berbagai konsentrasi pada membran nylon *hybond* muatan positip. K: DNA kontrol terlabel DIG; PS2 : *Probe Suardana 2*. Kolom 1-9 masing-masing: Konsentrasi 1: 1 ng/μl; 2: 500 pg/μl; 3: 100 pg/μl; 4: 10 pg/μl; 5: 1 pg/μl; 6: 0,3 pg/μl; dan 7: 0,1 pg/μl.



Gambar 2: Hasil deteksi komplementer oleh DNA *Probe* PS2 pada sampel DNA template yang diuji.

sebagai pengganti DNA template. Menurut Roche (2006), untuk mendapatkan hasil yang baik dalam hibridisasi khususnya dalam mendeteksi *single copi gene* dalam suatu kompleks genom, konsentrasi *probe* DNA yang dilabel dengan metode *random primed labeling* adalah 25 ng/ml larutan hibridisasi dengan konsentrasi DNA template paling tidak 300 ng. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi DNA template dengan seri pengenceran mulai dari 300 ng/μl, 100 ng/μl, 50 ng/μl, 10 ng/μl, dan 0 ng/μl. Hasil hibridisasi DNA template dengan *probe* PS2 seperti tersaji pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa DNA *probe* PS2 menunjukkan sinyal hibridisasi *dot blot* masih mampu tervisualisasi hingga konsentrasi DNA template 10 ng/μl, sebaliknya pada konsentrasi DNA template 0 ng/μl tidak terlihat adanya sinyal hibridisasi. Keberhasilan deteksi DNA komplementer oleh pelacak yang dilabel dengan dig-11-dUTP ditentukan oleh beberapa

faktor utama yaitu: a) keberhasilan fiksasi DNA sampel pada membrane support; b) keberhasilan hibridisasi antara pelacak yang berlabel dengan komplementernya yang ada pada DNA target; dan 3) proses deteksi (Sumartono, 2009). Disamping itu, Glick dan Pasternak (2003) juga mengungkapkan bahwa keberhasilan dalam uji diagnostik menggunakan hibridisasi asam nukleat ditentukan oleh tiga unsur utama yaitu: DNA *probe*, DNA target, dan deteksi sinyal.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *probe* PS2 sebagai rancangan *probe* dengan panjang 115 basa, diketahui memiliki efisiensi pelabelan dengan konsentrasi 10 pg/μl dan dapat mendeteksi DNA komplementernya dengan konsentrasi 10 ng/μl.

SARAN

Perlu dilakukan uji lanjutan untuk lebih mengoptimasi kemampuan dari *probe* PS2 di dalam melacak komplementernya pada DNA genom, serta uji sensitivitas dan spesifisitasnya untuk melihat adanya positif palsu ataupun negatif palsu dari hasil hibridisasi. Disamping itu, diperlukan adanya diseminasi hasil penelitian *probe* PS2 sebagai piranti diagnosis yang baru dalam deteksi gen *stx2* dari *E. coli* O157:H7.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada pihak LPPM-UNUD yang telah mendanai proyek penelitian ini melalui dana Penelitian Hibah Bersaing Tahap III Tahun Anggaran 2011 yang *dibiayai dari Dana DIPA PNBP Universitas Udayana Tahun Anggaran 2011 dengan Surat Perjanjian Kontrak Nomor: 1696.A.14/UN 14/KU.03.04/Perjanjian/2011, Tanggal 11 Mei 2011.*

DAFTAR PUSTAKA

- Acheson DWK. 2000. How does *E. coli* O157:H7 Testing in Meat Compare with What We are Seeing Clinically ? *J. Food. Protect.* (6):819-821.
- Barlow RS, Gobius KS Desmarchelier PM. 2006. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef. *Int. J. Food. Microbiol.* 111: 1-5.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2000. *Escherichia coli* O157:H7. http://www.cdc.gov/ncidod/dmd/disease_info/escherichiacoli.g.htm.
- Foy CA, Parkes HC. 2001. Emerging Homogenous DNA-based Technologies in The Clinical Laboratory. *Clin. Chem.* 47:pp: 990-1000.
- Ghanbarpour R, Oswald E. 2010. Phylogenetic Distribution of Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitis in Iran. *Res. Vet. Sci.* 88: 6-10.
- Glick BR, Pasternak, JJ. 2003. Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. 3rdEd. Asm Press.
- Gyles CL. 2007. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: in Overview. *J. Anim. Sci.* 85: 45-62.
- Hill WE, Jinneman KC. 2000. Principles and Application of Genetic Techniques for Detection, Identification, and subtyping of Food-Associated Pathogenic Microorganism in The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol. II (ed) Barbara, M.Lund, T.C.Baird-Parker, and G.W. Gould. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Moon G, Kim WJ, Shin WS. 2004. Optimization of Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by PCR and Application to Field Test. *J. Food. Protect.* 67 (8): 1634-1640.
- Reischel U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. 2003. Comparison of two DNA targets for The Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Hybridization Probes. *BMC. Inf. Dis.* May2, 3 (1):7
- Roche PJ. 2006. Preparation of Template DNA and Labeling Techniques <http://www.spinger.com>
- Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rdED. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Suardana IW, Sumiarto B, Lukman DW. 2007. Isolasi dan identifikasi *E. coli* O157:H7 pada daging sapi di Kabupaten Badung Provinsi Bali. *J. Vet.* 8(1): 16-23.
- Suardana IW, Ayu Ratnawati NLK, Sumiarto B, Lukman DW. 2008. Deteksi keterkaitan keberadaan coliform, *E. coli*, dengan keberadaan agen zoonosis *E. coli* O157 dan *E. coli* O157:H7 pada feses manusia di Kabupaten Badung Provinsi Bali. *Medicina.* 39(3): 215-219.
- Sumartono, 2009. Analisis Sekuen *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) Repetitif Genom *Toxoplasma gondii* Isolat Lokal. Disertasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Sumiarto B. 2004. Tingkat Infeksi dan Kontaminasi Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada Daging Domba di Rumah Potong Hewan Yogyakarta. *J. Vet.* 5(3): 85-90.
- Wani SA, Samanta I, Munshi ZH, Bhat MA, Nishikawa Y. 2004. Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* and Enteropathogenic *Escherichia coli* in Healthy Goats in India: Occurrence and Virulence Properties. *J. Appl. Microbiol.* 100:108-113.