

## **Analisis Gen Patogenik *iroN* *Escherichia coli* Penyebab Kolibasilosis pada Ayam Kampung**

(*PATHOGENIC *iroN* GENE ANALYSIS IN *ESCHERICHIA COLI*  
CAUSES OF COLLIBACILLOSIS IN FREE-RANGE CHICKEN*)

**Tania Ria Gunawan<sup>1</sup>, I Gusti Ngurah Kade Mahardika<sup>2</sup>,  
I Nengah Kerta Besung<sup>3</sup>, I Gusti Ketut Suarjana<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,  
<sup>2</sup>Laboratorium Virologi Veteriner, <sup>3</sup>Laboratorium Mikrobiologi Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana  
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234  
Telpon 0361 223791, Email: [tanlieai19@gmail.com](mailto:tanlieai19@gmail.com)

### **ABSTRAK**

Kolibasilosis unggas adalah penyakit menular yang disebabkan oleh *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Kemampuan APEC untuk menyebabkan penyakit tergantung pada banyak faktor patogen, salah satunya adalah gen patogenik *iroN*. Penelitian bertujuan untuk mengetahui sekuen DNA gen *iroN* APEC di Bali serta kekerabatannya dengan gen *iroN* dari negara lain. Penelitian ini menggunakan dua isolat APEC asal ayam buras di Kabupaten Tabanan dan Badung yang telah dimurnikan dan tersedia di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. DNA isolat diisolasi dengan *Chelex* 10%. Gen *iroN* diamplifikasi dengan primer baku yang telah dipublikasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR). Produk PCR disekuensing di *First Base Laboratories* Malaysia dengan metode *Sanger's dideoxy nucleotide termination*. Kedua hasil sekuen gen *iroN* yang dapat dibaca dengan baik memiliki homologi 100% dengan panjang 659 bp. Analisis filogenik dengan 52 data gen *iroN* di *Escherichia coli* dan bakteri lain di dunia menggunakan metode *neighbor-joining* dengan *bootstrap* (500 pengulangan) dilakukan dengan *Mega 5.2*. Seluruh data memiliki 24 situs polimorfik pada tingkat asam nukleat dan delapan di tingkat asam amino. Gen *iroN* asal Bali berada di dalam satu kelompok dengan gen *iroN* asal Australia (MF174860) dan Hongkong (MF474175). Gen ini dapat digunakan sebagai penanda/*marker* patogenik APEC di Indonesia.

Kata-kata kunci : *Escherichia coli*; APEC; gen; patogenik; *iroN*; filogenik

### **ABSTRACT**

Avian colibacillosis is an infectious disease caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). APEC ability to cause disease depends on many pathogenic factors, one of them is *iroN* pathogenic gene. This study purposed to find out *iroN* gene sequence in APEC in Bali. Two APEC isolates from free range chicken in Tabanan dan Badung has been used. The isolates have been been purified and were available at Laboratory of Veterinary Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University. *Chelex* 10% was used for DNA isolation. DNA amplification using published DNA primer has been conducted with polymerase chain reaction (PCR) method. The PCR product was sequenced at *First Base Laboratories*, Malaysia using *Sanger's Dideoxy Nucleotide Termination* method. The *iroN* gene of both isolates can be analyzed and have 659 bp in length. Both were 100% homologous. Phylogenic test using 52 DNA sequence of *iroN* gene from *Escherichia coli* and other bacteria in the world was conducted in *MEGA 5.2*. All data have 24 polymorphic sites of nucleotide acid and eight polymorphic sites of amino acid. The *iroN* gene of Bali isolates was in the same group as *iroN* gene from Australia (MF174860) and Hong Kong (MF474175). This gene can be used as pathogenic marker of APEC in Indonesia.

Keywords: *Escherichia coli*; APEC; gene; pathogenic; *iroN*; phylogenic

## PENDAHULUAN

Kolibasilosis unggas adalah penyakit menular yang disebabkan oleh *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Kolibasilosis mempunyai arti ekonomi yang penting bagi industri perunggasan, karena dapat menimbulkan berbagai macam gangguan pertumbuhan dan dapat menyebabkan kematian (Tarmudji, 2003). Kerugian ekonomi akibat kolibasilosis cukup besar, tetapi data kerugian keuangan tidak tersedia (Landman *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2012).

Kasus kolibasilosis telah dilaporkan di berbagai daerah di Indonesia. Di Bali, penyakit ini ditemukan di berbagai peternakan ayam. Berbagai upaya dilakukan untuk pengobatan kolibasilosis. Pemberian antibiotik secara terus-menerus membuat APEC mudah mengalami resistensi terhadap antibiotik tertentu (Luhung *et al.*, 2017; Barus *et al.*, 2013)

Penentuan *Escherichia coli* (*E. coli*) galur patogenik harus dilakukan dengan uji infeksi percobaan pada unggas. Uji tersebut membutuhkan waktu, tenaga, tempat dan dana yang sangat banyak. Sehingga uji ini sulit untuk dilakukan oleh peternak dan petugas lapangan (Tarmudji, 2003).

Kemampuan APEC untuk menyebabkan penyakit tergantung pada banyak faktor patogen, salah satunya adalah faktor gen virulensi APEC. Terdapat beberapa gen di dalam plasmid yang menyebabkan faktor virulensi pada strain APEC. Gen-gen tersebut antara lain *cvaC*, *tsh*, *sitA*, *iutA*, *ompT*, *hlyF*, *etsABCD*, *eitABC*, dan *iroN* (Johnson *et al.*, 2006). Gen ini ditemukan dalam persentase yang cukup tinggi dari isolat kolibasilosis unggas di berbagai negara, seperti di Amerika sebesar 85,4%, di Mesir 91%, di Brazil 95% dan di Korea 100% (Johnson *et al.*, 2006; Ammar *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2011). Frekuensi gen ini lebih tinggi pada isolat patogen, yaitu sekitar 85%, dibandingkan dengan bakteri komensal, yaitu sekitar 25% (Johnson *et al.*, 2006).

Gen patogenik *iroN* APEC belum pernah dilaporkan di Indonesia. Isolat *E. coli* dari ayam kampung tersedia di Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. Penelitian ini bertujuan menganalisis gen patogenik *iroN* dari ayam kampung asal Kabupaten Tabanan, Provinsi Bali dan membandingkan gen *iroN* di Bali dengan gen *iroN* yang ada di seluruh dunia.

## METODE PENELITIAN

### Objek Penelitian

Objek yang diteliti adalah bakteri *E. coli* galur patogen atau *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) penyebab kolibasilosis pada ayam. Sampel yang digunakan merupakan isolat APEC yang telah dimurnikan berasal dari ayam kampung yang terserang penyakit kolibasilosis. Isolat APEC sebanyak dua isolat berasal dari Kabupaten Tabanan dan Kabupaten Badung. Isolat APEC telah positif dengan uji TSIA, SIM, Katalase, Oksidase, MR, Glukosa, Laktosa dan negatif dengan uji Oksidase dan VP. Isolat APEC didapatkan dan dimurnikan di Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.

### Prosedur Penelitian

Tahapan pertama dalam prosedur penelitian adalah persiapan isolat *E. coli* untuk dilakukan isolasi DNA dengan metode *Chelex* 10% (Walsh *et al.*, 1991). Hasil isolasi DNA digunakan untuk dilakukan tindakan PCR dengan suhu predenaturasi 94°C selama tujuh menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, suhu *annealing* 59°C selama 45 detik, dan ekstensi 75°C selama 1 menit 30 detik. Siklus tersebut dilakukan sebanyak 35 kali siklus. Setelah itu perpanjangan langkah terakhir (*post* ekstensi) 75°C selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan prosedur elektroforesis dan visualisasi hasil PCR gen *iroN*. Hasil PCR APEC yang positif *iroN* akan disekuensing DNA dilakukan di *First Base Laboratories*, Malaysia dengan metode *Sanger's dideoxy nucleotide termination*.

### Analisis Data

Hasil data penelitian ini digunakan sebagai data primer. Data primer dilakukan analisis filogenik dengan data sekunder yang didapatkan dari *genebank* dengan informasi asal negara dan kode akses (*accession number*). Analisis filogenik dan jarak genetik dilakukan dengan metode *neighbor-joining* dengan metode *bootstrap* (500 pengulangan). Analisis menggunakan program lunak (*software*) yaitu *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* atau MEGA versi 5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

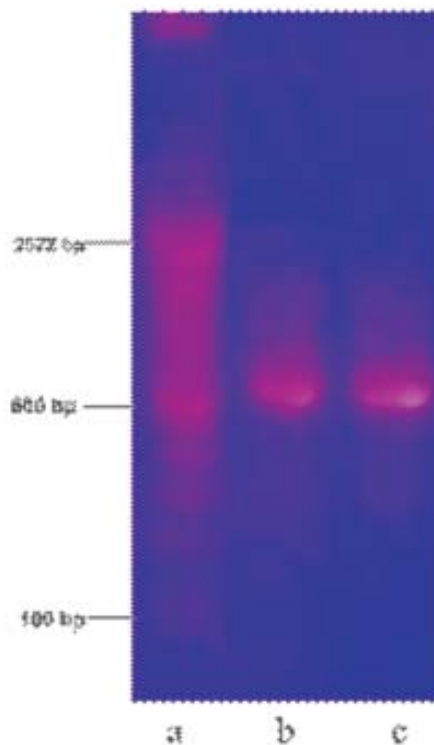
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *E. coli* asal Bali yang digunakan adalah isolat APEC sampel E3 dengan kode PCR

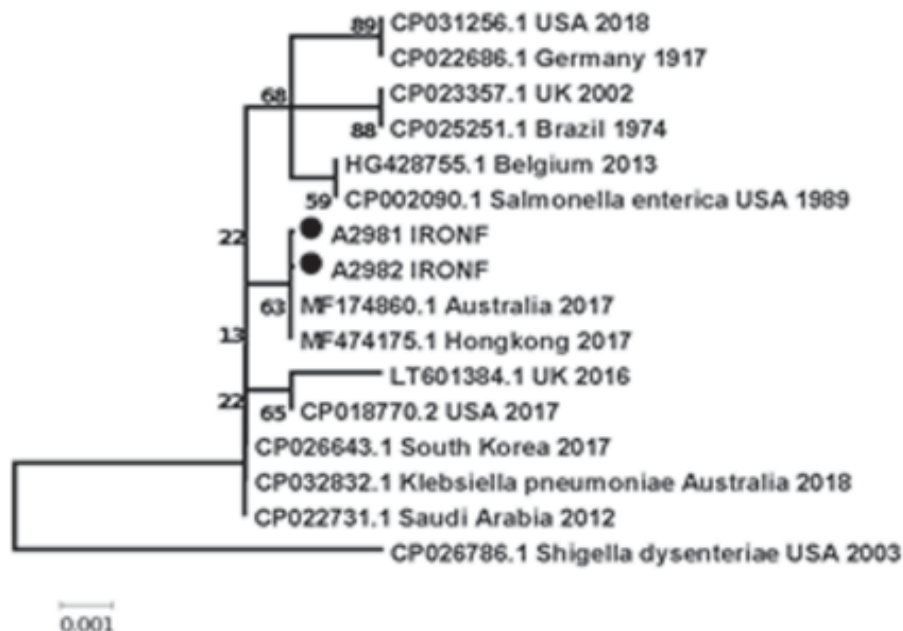
A2981 asal Tabanan dan sampel E7 dengan kode PCR A2982 asal Badung tahun 2018. Kedua sampel berhasil diamplifikasi dengan PCR. Hasil berupa visualisasi PCR gen *iroN* APEC asal ayam kampung disajikan pada Gambar 1, berada di sekitar panjang 700 bp. Hasil sekuensing kedua gen *iroN* yang dapat dianalisis dengan baik sepanjang 659 bp. Kedua sekuen tersebut menunjukkan urutan basa gen *iroN* yang sama (homologi 100%). Hasil sekuensing gen *iroN* diregistrasi di *gene bank* dengan kode akses (*accession number*) MK776775 dan MK776776.

Data primer dan 52 data sekunder yang diunduh dari *genebank* dianalisis dengan situs polimorfik (*polymorphic sites*). Hasil analisis menunjukkan 24 situs basa yang berbeda di tingkat asam nukleat (Tabel 1). Pada tingkat asam amino terdapat delapan situs polimorfik (Tabel 2). Berdasarkan hasil tersebut, data dikelompokkan menjadi delapan kelompok dengan satu datum yang di luar kelompok (*outgroup*). Kemudian data diseleksi secara acak dengan mengambil satu hingga dua gen di setiap kelompok. Kelompok dengan gen *iroN* *E. coli* asal Bali tidak dilakukan seleksi.

Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbor-joining tree* dengan metode *bootstrap* (500 pengulangan). Hasil berupa pohon filogenetik ditampilkan pada Gambar 2 dengan nilai



Gambar 1. Elektroforesis agarosa 1% (a) *Ladder Invitrogen* 100 bp, (b) sampel E3 (c) sampel E7, divisulasiasi pada UV dengan pewarna *ethidium bromide*.



Gambar 2. Analisis filogenetik dengan metode Neighbor-Joining sekuens gen *iroN* asal Tabanan (A2981) dan Badung (A2982) dengan data gen *iroN* dari berbagai negara di dunia yang telah diseleksi secara acak. Tanda lingkaran hitam menandakan gen *iroN* *Escherichia coli* asal Bali.

Tabel 1. Situs polimorfik gen *iroN* yang dideteksi dari *Escherichia coli* asal Bali (A2981 dan A2982) dengan data yang tersedia di *genebank* di tingkat asam nukleat

Kode Akses, Asal Negara, Tahun	Group	Nomor Urutan Basa																											
		1	1	1	2	2	3	3	3	4	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
A2981 IRONF	Group 4	C	A	C	G	T	C	A	T	C	G	T	C	T	G	C	G	T	C	T	A	T	C	T	A	T	G	T	
A2982 IRONF	Group 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MF174860.1 Australia 2017	Group 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MF474175.1 Hong Kong 2017	Group 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP031256.1 USA 2018	Group 1	.	.	.	A	C	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP022686.1 Germany 1917	Group 1	.	.	.	A	C	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
HG428755.1 Belgium 2013	Group 2	.	.	.	A	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP002090.1 Salmonella enterica USA 1989	Group 2	.	.	.	A	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP023357.1 UK 2002	Group 3	.	C	.	A	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP025251.1 Brazil 1974	Group 3	.	C	.	A	C	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP026643.1 South Korea 2017	Group 5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP032832.1 Klebsiella pneumoniae Australia 2018	Group 5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LT601384.1 UK 2016	Group 6	.	.	T	.	C	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP022731.1 Saudi Arabia 2012	Group 7	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP018770.2 USA 2017	Group 8	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CP026786.1 Shigella dysenteriae USA 2003	Outgroup	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	C	T	G	C	G	T	C	T	A	T	C	T	A	T	G	

Keterangan : Data dari *genebank* diseleksi secara acak  
Tanda titik ( . ) pada tabel menandakan asam nukleat pada urutan tersebut sama dengan sekuen A2981 *iroN* .

Tabel 2. Situs polimorfik gen *iroN* yang dideteksi dari *Escherichia coli* asal Bali (A2981 dan A2982) dengan data yang tersedia di *genbank* di tingkat asam amino

Kode Akses, Asal Negara, Tahun	Group	Nomor Urutan Asam Amino							
		1	1	1	2	2	2	2	
		9	2	6	6	1	1	1	1
		1	2	8	9	5	6	7	8
A2981 IRONF	Group 4	T	D	S	V	N	L	R	L
A2982 IRONF	Group 4	.	.	.	.	.	.	.	.
MF174860.1 Australia 2017	Group 4	.	.	.	.	.	.	.	.
MF474175.1 Hongkong 2017	Group 4	.	.	.	.	.	.	.	.
CP031256.1 USA 2018	Group 1	.	E	.	F	.	.	.	.
CP022686.1 Germany 1917	Group 1	.	E	.	F	.	.	.	.
HG428755.1 Belgium 2013	Group 2	.	.	.	.	.	.	.	.
CP002090.1 Salmonella enterica USA 1989	Group 2	.	.	.	.	.	.	.	.
CP023357.1 UK 2002	Group 3	.	.	N	.	.	.	.	.
CP025251.1 Brazil 1974	Group 3	.	.	N	.	.	.	.	.
CP026643.1 South Korea 2017	Group 5	.	.	.	.	.	.	.	.
CP032832.1 Klebsiella pneumoniae Australia 2018	Group 5	.	.	.	.	.	.	.	.
LT601384.1 UK 2016	Group 6	I	.	.	.	.	.	.	.
CP022731.1 Saudi Arabia 2012	Group 7	.	.	.	.	.	.	.	.
CP018770.2 USA 2017	Group 8	.	.	.	.	.	.	.	.
CP026786.1 Shigella dysenteriae USA 2003	Outgroup	.	.	.	.	K	S	A	S

Keterangan : Data dari *genbank* diseleksi secara acak  
 Tanda titik ( . ) pada tabel menandakan asam amino pada urutan tersebut sama dengan sekuen A2981 *iroN*.

*bootstrap* semua kelompok di atas 60. Gen *iroN* dari sampel E3 (A2981) dan E7 (A2982) tergabung di kelompok 4. Sekuen DNA gen *iroN* sama persis dengan gen *iroN* asal negara Australia (2017) dan Hongkong (2017).

Kolibasilosis pada unggas adalah penyakit menular yang disebabkan oleh *E. coli* galur patogen atau *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Kolibasilosis unggas menyebabkan kerugian ekonomi (Dho-Moulin dan Fairbrother, 1999; Landman *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2012). Dampak APEC menurut Guabiraba dan Schouler (2015) menyebabkan *aerosacculitis*, poliserositis, septisemia dan banyak gejala lainnya. APEC umumnya mulai menginfeksi sistem respirasi unggas dan menimbulkan infeksi dengan gejala umum berupa sekresi fibrinopurulen dan lesi-lesi pada organ-organ internal. Akan tetapi mekanisme APEC tidak dapat diprediksi secara jelas. Kolonisasi APEC pada trakea dan kantung udara unggas merupakan awal terjadinya infeksi yang lebih lanjut yaitu bakteremia (Kabir, 2010).

Serotipe APEC beragam. Serotipe dapat diklasifikasikan berdasarkan variasi antigen O dan K (Whittam dan Wilson, 1988). Beberapa serotipe APEC yang sering teridentifikasi di Jawa dan Bali yaitu serotipe O2:K1, O1:K1, dan O78:K80, dan serotipe lainnya (Tarmudji, 2003). Karena itu, diagnosis *E. coli* tidak mudah dilakukan. Identifikasi *E. coli* hanya dapat mengetahui serotipe bakteri tersebut, tetapi tidak dapat mengetahui patogenitasnya. Beberapa faktor yang memengaruhi patogenitas *E. coli* telah diketahui dan telah dibuktikan secara *in vivo* serta uji biologis (Guabiraba dan Schouler, 2015). Lima gen patogenik APEC yaitu gen *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, dan *iutA* (Johnson, *et al.*, 2008). Gen-gen tersebut ditemukan dalam frekuensi yang tinggi pada isolat APEC dari seluruh dunia.

Gen *iroN* berperan sebagai reseptor *siderophore aerobaction* dan *salmocheilin* dalam proses penyadapan zat besi dari protein sel inang (Jhonson *et al.*, 2006; López *et al.*, 2017). Gen

ini ditemukan dalam persentase yang cukup tinggi dari isolat kolibasilosis unggas di berbagai negara, seperti di Amerika sebesar 85,4%, di Mesir 91%, di Brazil 95% dan di Korea 100% (Johnson *et al.*, 2006; Ammar *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2011). Frekuensi gen ini lebih tinggi pada isolat patogen, yaitu sekitar 85%, dibandingkan dengan bakteri komensal, yaitu sekitar 25% (Johnson *et al.*, 2006).

Dalam penelitian ini, gen *iroN* berhasil diamplifikasi dengan spesifik menggunakan sepasang DNA primer gen *iroN* yang sudah dipublikasi (Jeong *et al.*, 2013). Hasil berupa pita DNA tunggal dengan panjang sekitar 700 bp. Kemudian hasil sekuensing DNA gen *iroN* yang dapat dianalisis dengan baik yaitu sepanjang 659 bp.

Sekuens gen *iroN* sampel E3 (A2981) dari Kabupaten Tabanan dan E7 (A2982) dari Kabupaten Badung tidak memiliki perbedaan urutan basa DNA. Hal tersebut membuktikan bahwa gen *iroN* APEC pada ayam kampung asal Tabanan dan Badung memiliki homologi DNA 100%. Hal ini dapat terjadi karena APEC yang bersirkulasi di Bali berasal dari satu asal-usul yang sama. Sekuen DNA makhluk hidup cenderung stabil. Tingkat mutasi DNA *Escherichia coli* diperkirakan  $2-8 \times 10^{-4}$  (Kibota dan Lynch, 1996; Boe *et al.*, 2000).

Hasil analisis situs polimorfik gen *iroN* menunjukkan 24 situs polimorfik di tingkat asam nukleat dan delapan situs di tingkat asam amino dari 54 sekuens yang ada. Data dibagi menjadi delapan kelompok (group) dengan satu data yang di luar kelompok (outgroup). Gen *iroN* asal Bali memiliki homologi 100% dengan gen *iroN* asal MF174860 Australia (2017) dan MF474175 Hongkong (2017). Hal ini menunjukkan kekerabatan gen *iroN* *E. coli* asal Bali dengan negara tersebut. Artinya asal-usul gen *iroN* *E. coli* Bali sama dengan isolat dari kedua negara tersebut. Hal tersebut dapat terjadi karena DNA *E. coli* memiliki kemungkinan yang sangat kecil untuk mengalami mutasi.

Selain itu, gen *iroN* bakteri *Salmonella enterica* termasuk kedalam kelompok 2 dan bakteri *Klebsiella pneumonia* di kelompok 5 dengan gen *iroN* *E. coli* di setiap kelompok gen. Hal ini dapat terjadi karena bakteri memiliki kemampuan untuk melakukan transfer gen interspesies secara horizontal (Ochman *et al.*, 2005; Rahn *et al.*, 1999).

Penelitian tentang gen *iroN* harus dilakukan di seluruh provinsi di Indonesia untuk mengetahui frekuensi gen *iroN* pada APEC seperti yang dilakukan di negara lain seperti Korea dan Amerika (Jeong *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2006). Kajian lebih lanjut tentang gen *iroN* dan gen patogenik lainnya dapat membantu untuk pengembangan obat antimikrob yang secara khusus menargetkan *E. coli* patogen atau APEC. Selain itu kajian tentang gen patogenik APEC dapat membantu untuk mendiagnosis secara cepat. Kajian lebih lanjut tentang sifat gen patogenik APEC dan kerja sistem imun unggas dapat membantu untuk pengembangan vaksin APEC yang akan sangat menguntungkan peternakan ayam.

Beberapa penelitian mengkaji lebih lanjut tentang vaksin kolibasilosis unggas, seperti *iss-based vaccine* yang berpotensi menargetkan tiga serotipe APEC yaitu O2, O78 dan O1 (Lynne *et al.*, 2012). Vaksin *Poulvac E. coli* yang menghilangkan gen *aroA* pada serotipe O78 (Uotani *et al.*, 2017). Gen *iroN* memiliki potensi yang cukup besar untuk dikembangkan sebagai vaksin APEC. Hal ini karena persentase gen *iroN* pada isolat APEC cukup tinggi di berbagai negara bahkan sampai 100% di Korea (Jeong *et al.*, 2012)

## SIMPULAN

Gen *iroN* dapat dideteksi dari dua isolat *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) asal ayam kampung di Tabanan dan Badung tahun 2018. Kedua isolat itu mempunyai gen *iroN* dengan sekuens yang sama (homologi 100%). Hasil analisis filogenik gen *iroN* asal Tabanan dan Badung dengan gen *iroN* dari seluruh negara menunjukkan kekerabatan dengan gen *iroN* isolat *E. coli* dengan kode akses MF174860 asal Australia dan MF474175 asal Hong Kong.

## SARAN

Penelitian dan pendataan perlu dilakukan di seluruh provinsi di Indonesia tentang gen *iroN* dan gen patogenik APEC lainnya. Selain itu, uji biologis perlu juga dilakukan untuk mengetahui dampak gen *iroN* pada sifat patogenik *E. coli*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ammar AM, El-Hamid MIA, Eid SEA, El Oksh AS. 2015. Insight Into Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of Emergent Multidrug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Egypt: How closely related are they. *Revue Méd Vét* 166(9-10): 304-314
- Barus DO, Gelgel KTP, Suarjana IGK. 2013. Uji Kepekaan Bakteri *Escherichia coli* Asal Ayam Pedaging terhadap Antibiotik Dosisiklin, Gentamisin, dan Tiamfenikol. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(5): 538-545.
- Dho-Moulin M, Fairbrother JM. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* 30(1999): 299-316.
- Guabiraba R, Schouler C. 2015. Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiology Letters* 362(12): 1-8.
- Jeong YW, Kim TE, Kim JH, Kwon HJ. 2012. Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. *J Vet Sci* 13(2): 145-152.
- 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. *Journal of Bacteriology* 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. *Journal of Clinical Microbiology* 46(12): 3987-3996.
- Kibota TT, Lynch M. 1996. Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*. *Nature* 381: 694-696.
- Kurnia RS, Indrawati A, Mayasari N, Priadi A. 2018. Molecular detection of genes encoding resistance to tetracycline and determination of plasmid-mediated resistance to quinolones in avian pathogenic *Escherichia coli* in Sukabumi, Indonesia. *Veterinary World* 11(11): 1581-1586.
- Landman WJMM, van Eck JHH. 2016. The incidence and economic impact of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. *Avian Pathology* 44(5): 370-378.
- Lau GL, Siew CC, Tan WS, Ho YW. 2012. Characteristic of Phage Effective for Colibacillosis Control in Poultry. *J Sci Food Agric* 92(13): 57-63. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505020>. Tanggal Akses 3 Desember 2018.
- López VHM, Serrano IQ, Delgado PDP, Rodríguez LEV, Olague-Marchán M, Rodríguez SHS, Luna MAL, de la Torre AF, Santoyo RMR. 2017. Genes of Virulence and Phylogenetic Group in Isolates of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *I Med Pub Journals* 9(6): 5.
- Luhung YGA, Suarjana IGK, Gelgel KTP. 2017. Sensitivitas Isolat *Escherichia coli* Patogen dari Organ Ayam Pedaging Terinfeksi Koliseptisemia terhadap Oksitetrasiklin, Ampisilin dan Sulfametoksazol. *Buletin Veteriner Udayana* 9(1): 60-66.
- Lynne AM, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Johnson TJ, Johnson SJ, Sinha AS, Lynner DK, Moon HW, Jordan DM, Logue CM, Foley SL, Nolan LK. 2012. Recombinant *iss* as a Potential Vaccine for Avian Colibacillosis. *Avian Dis* 56: 192-199
- Ochman H, Lerat E, Daubin V. 2005. Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *PNAS* 102(1): 6595-6599.
- Rahn A, Drummelsmith J, Whitefield C. 1999. Conserved Organization in the *cps* Gene Clusters for Expression of *Escherichia coli* Group 1 K Antigens: Relationship to the Colanic Acid Biosynthesis Locus and the *cps* Gene from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 181(7): 2307-2313.
- Tabrah FL. 2011. Koch's Postulates, Carnivorous Cows, and Tuberculosis Today. *Hawai'i Medical Journal* 70(7): 144-148.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tarmudji. 2003. Kolibasiolosis pada ayam : Etiologi, Patologi dan Pengendaliannya. *Wartazoa* 13(2): 65-73.

- Uotani Y, Kitahara R, Imai T, Tsutsumi N, Sasakawa C, Nagai S, Nagano T. 2017. Efficacy of an avian colibacillosis live vaccine for layer breeder in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79(7): 1215–1219.
- Walsh SP, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506-513.
- Whittam TS, Wilson RA. 1988. Genetic relationships among pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Infect Immun* 56(9): 2458–2466.