

Penentuan Marka Genetik *Escherichia coli* O157:H7 Asal Hewan dan Manusia dengan Metode *Random Amplified Polymorphic DNA*

(GENETIC MARKERS IDENTIFICATION OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 ORIGINATED FROM ANIMALS AND HUMAN BY USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) TECHNIQUE

I Wayan Suardana¹, Dyah Ayu Widiasih² Komang Januartha Putra Pinatih³

¹Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. Sudirman, Denpasar, Bali Tlp.(0361) 22379; E-mail: iwayansuardana22@yahoo.com

²Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281

³Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Unud

ABSTRAK

Penggunaan metode *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) sebagai salah satu metode identifikasi penanda genetik pada bakteri telah digunakan secara luas oleh banyak peneliti. Metode ini diketahui bersifat sederhana, cepat dan dapat dipercaya. Tulisan ini mengulas aplikasi metode RAPD untuk mengetahui marka genetik dari *Escherichia coli* O157:H7 sebagai agen zoonosis yang sangat berbahaya. Hasil dari kajian ini diharapkan dapat memprediksi asal isolat apakah dari hewan ataupun manusia sebagai langkah cepat dalam penelusuran patogenesis dari agen. Penelitian diawali dengan kultivasi 20 isolat *E. coli* O157:H7 koleksi peneliti dengan rincian dua isolat asal feses sapi, dua isolat asal daging sapi, dua isolat asal feses ayam, dua isolat asal feses manusia sehat, dan 12 isolat asal feses manusia sakit (asal penderita gagal ginjal). Ke-20 isolat dikonfirmasi dengan menumbuhkan pada media selektif *sorbitol MacConkey agar* (SMAC) yang dilanjutkan dengan uji *latex O157 agglutination test* serta uji antiserum H7. Analisis molekuler untuk prediksi *marker*/penanda dilakukan dengan metode RAPD menggunakan gabungan primer *universal* OPA-01, OPA-02, OPA-03, dan OPA-04. Hasil penelitian diketahui bahwa ada pita spesifik yang peluang kehadirannya dapat membedakan antara isolat yang berasal dari kasus sakit dan sehat yaitu hadirnya pita-pita dengan panjang 1721 dan 700 bp. Ditemukan juga pita khusus sebagai penanda untuk isolat asal manusia sakit yaitu pita dengan panjang 1721 bp, sedangkan isolat asal manusia sehat adalah pita dengan panjang 300 bp. Isolat asal feses ayam dicirikan dengan pita 250 bp, isolat asal daging sapi 1400 dan 429 bp serta isolat asal feses sapi 342 bp. Kehadiran pita-pita spesifik ini diharapkan dapat menjadi penanda untuk penelusuran sumber agen *E. coli* O157:H7 secara cepat.

Kata-kata kunci : *E. coli* O157:H7, RAPD, marka genetik, zoonosis

ABSTRACT

The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) as a method to identify a genetic marker of bacteria is widely used by researcher. This method is known as a simple, faster, and reliable technique. This study is to find out the application of RAPD method in order to identify specific markers of *E. coli* O157:H7 as a zoonotic agent. The study began by cultivating of 20 isolates of *E. coli* O157:H7 collected by previous study that consist of 2 isolates originated from cattle feces, 2 isolates originated from beef, 2 isolates originated from chicken feces, 2 isolates originated from healthy human and 11 isolates originated from unhealthy human (human with kidney failure). All isolates were confirmed by culturing on selective medium sorbitol MacConkey agar (SMAC). Confirmation were followed by testing on O157 latex agglutination, and finally by testing on H7 antiserum. RAPD method as molecular analysis was performed using decamer primers mixture OPA-01, OPA-02, OPA-03, and OPA-04. Results of study showed both bands 1721 and 700 bp are specifically to differentiate of isolates originated from cases of healthy and unhealthy human. On the other hand, bands with position 1721 bp, 300 bp, and 250 bp indicate the isolates originated from unhealthy human, healthy human and chicken, respectively. Isolates from beef are characterized by both bands 1400 and 429 bp, and the isolates from cattle feces are identified by band with position 342 bp. The specific bands are considered as markers in order to know the source of *E. coli* O157:H7 fastly.

Key words : *E. coli* O157:H7, RAPD, genetic marker, zoonoses

PENDAHULUAN

Metode DNA *subtyping* sebagai bagian dari teknik baru dapat digunakan untuk mempelajari status epidemiologi suatu *foodborne disease*. Metode *subtyping* yang umum digunakan untuk karakterisasi genom bakteri adalah *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *ribotyping*, *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) atau sekuensing DNA (Hill dan Jinneman, 2000).

Metode RAPD sedikit berbeda dengan PCR standar. Teknik PCR standar menggunakan primer oligonukleotida tertentu untuk menghasilkan segmen yang umumnya tidak bervariasi di antara isolat yang diuji, namun pada metode RAPD, primer oligonukleotida yang digunakan akan menempel di beberapa tempat suatu genom. Wilayah suatu genom akan teramplifikasi dan terikat oleh sekuen nukleotida secara *random* sehingga dihasilkan suatu segmen tertentu yang dapat digunakan sebagai petunjuk atau karakterisasi dari strain (Hill dan Jinneman, 2000).

Kesederhanaan dan kemudahan teknik RAPD menarik perhatian dari banyak peneliti untuk mengaplikasikan teknik ini. Alasan utama yang mengakibatkan suksesnya penggunaan teknik ini adalah karena diperolehnya sejumlah besar penanda genetik dengan hanya membutuhkan sedikit DNA, tanpa perlu melakukan langkah kloning, sekuensing, atau bentuk karakterisasi molekuler lainnya dari spesies yang diteliti (Bardakci, 2001).

Al-Darahi *et al.*, (2008) menyatakan bahwa melalui teknik RAPD akan dapat dianalisis hubungan filogenetik (*phylogenetic relationships*), keragaman genetik (*genetic diversity*), penentuan asal usul (*parentage determination*), seleksi penanda (*marker-assisted selection*) dan deteksi ketidakstabilan genom (*detection of genomic instability*). Lebih lanjut Bardakci dan Skibinski (1999) menjelaskan bahwa dapat dianalisisnya daerah amplifikasi tertentu dari sekuen (*sequence characterized amplified regions /SCARs*) yang dihasilkan dari suatu polimorfisme RAPD, menunjukkan polimorfisme RAPD merupakan cerminan variasi susunan dari kromosom seperti insersi/delesi, sehingga produk amplifikasi dari alel yang sama dalam heterozigot akan berbeda dalam panjangnya dan akan terdeteksi sebagai kemunculan atau absennya suatu pita tersebut di dalam profil RAPD.

Penggunaan teknik RAPD untuk deteksi penanda genetik telah dilakukan oleh beberapa peneliti baik pada spesies hewan maupun

tumbuhan (Olivier *et al.*, 1999). Peneliti Yeo *et al.*, (2000) menggunakan teknik RAPD ini untuk identifikasi penanda genetik pada sapi asli Korea. Peneliti lainnya, Arslan *et al.*, (2005) menggunakan metode RAPD untuk identifikasi jenis daging, serta Saleh *et al.*, (2010) sukses menggunakan teknik RAPD untuk identifikasi marka genom pada penderita leukemia. Disisi lain penggunaan metode ini untuk identifikasi penanda genetik *E. coli* O157:H7 isolat lokal baik asal hewan ataupun manusia sejauh ini belum pernah dilaporkan. Berdasarkan atas latar belakang di atas, maka penentuan marka genetik *E.coli* O157:H7 asal hewan dan manusia dengan metode RAPD sangat menarik untuk disajikan, sehingga penentuan asal agen dalam kaitannya untuk menentukan sumber penularan dapat diketahui dengan cepat.

METODE PENELITIAN

Kultivasi Isolat *E. coli* O157:H7

Isolat *E. coli* O157:H7 yang digunakan dalam penelitian ini berasal hasil isolasi dan identifikasi dari feses sapi yaitu SM 25(1) dan SM 7(1), asal daging sapi yaitu DS 21(4) dan DS 16(2). Isolat asal hewan lainnya yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat asal feses ayam MK 35 dan MK 19(8)/4. Isolat asal manusia juga digunakan dalam penelitian ini. Isolat asal feses manusia sehat yang digunakan yaitu M 14(4) dan M 17(1), serta isolat asal feses manusia hasil isolasi dan identifikasi dari penderita gagal ginjal di Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah, Denpasar yaitu KL 52(7), KL 87(7), KL 30(4), KL 45(1), KL 48(2), KL 85(1), KL 83(5), KL 25(4), KL 68(1), KL 106(3) dan KL 55(6). Isolat yang tersimpan dalam gliserol 30% dengan suhu penyimpanan -20°C termasuk isolat kontrol ATCC 43894 tersebut, terlebih dahulu diremajakan dengan menumbuhkan pada media selektif *sorbitol MacConkey agar* (SMAC) (Oxoid CM 0813). Konfirmasi dilanjutkan dengan pengujian menggunakan uji *E. coli* O157 *latex agglutination test* (Oxoid DR620 M). Isolat yang positif pada uji lateks selanjutnya dibiakkan pada nutrien agar miring untuk pengujian selanjutnya.

Isolasi DNA Genomik Bakteri

DNA genomik bakteri diisolasi mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya dengan sedikit modifikasi (Suardana, 2010). Isolat *E. coli* O157:H7 diinokulasikan pada media *lactose broth* (LB) selanjutnya dipanen dengan sentrifugasi pada 7500 rpm selama lima menit. Supernatan

dibuang, sedang pelet sel ditambah 180 µL *tissue lysis buffer* (Bufer ATL) dan 20 µL larutan proteinase K lalu divortek 15 detik. Larutan selanjutnya ditambahkan 200 µL *lysis buffer* (Buffer AL), divorteks selama 15 detik, diinkubasikan pada penangas air/*waterbath* suhu 56°C selama 10 menit, ditambahkan 200 µL etanol absolut 96-100%, dan divorteks selama 15 detik. *Lysate E.coli* selanjutnya digunakan untuk *binding* DNA. *Lysate* dimasukkan ke dalam *microtube* penyaring yang terletak dalam *ependorf* 2 mL dan disentrifius 8000 rpm selama satu menit. Sisa cairan dibuang, dan filter yang telah mengandung DNA dimasukkan ke dalam *ependorf* 2 mL (Nunc, Inc) yang baru dan dilanjutkan dengan tahapan *washing* DNA. Filtrat DNA ditambah 500 µL *wash buffer* (buffer AW1) lalu disentrifius 8000 rpm selama satu menit. Tabung *ependorf* penampung sisa cairan dibuang dan diganti dengan *ependorf* 2 mL yang baru. *Wash buffer* (buffer AW2) sebanyak 500 µL ditambahkan dan didiamkan selama lima menit. Tabung *ependorf* disentrifius dengan kecepatan penuh 14.000 rpm selama tiga menit 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), dan disentrifius dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit. Untuk menghindari pengulangan *freezing* dan *thawing*, DNA murni disimpan pada 4°C untuk uji selanjutnya.

Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Sampel DNA diencerkan 50 kali dengan cara mencampur 2 µL DNA dengan 98 µL *distilled water* dan konsentrasi DNA diukur *optical density* (OD)-nya dengan menggunakan *Spectrofotometer* (Backman DU-65) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus seperti yang dilaporkan oleh Sambrook dan Russel (2001). Konsentrasi DNA 200-300 µg/mL serta kemurnian 1,8–2.0 digunakan dalam penelitian ini (Suardana, 2010).

Reaksi *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

Reaksi *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) dilakukan dengan memodifikasi metode William yaitu menggunakan metode primer *mixtures* (Sall *et al.*, 2000). Teknik RAPD dilakukan pada total volume 27 µL yang mengandung 1,0 µL *DNA template* (300 ng/µl), 12,5 µL *FastStart PCR Master* (Roche Cat

No. 04710436001), 1,0 µL (20 pmol/µL) masing-masing primer (Tabel 1) dan 9,5 µL *distilled water*.

Tabel 1. Primer oligonukleotida *universal Random Amplified Polymorphic DNA* yang digunakan

| Primer | Sekuen (5' → 3') |
|--------|------------------|
| OPA-01 | CAG GCC CTTC |
| OPA-02 | TGC CGA GCTG |
| OPA-03 | AGT CAG CCAC |
| OPA-04 | AAT CGG GCTG |

Sumber : Operon Technologies Inc. (Alameda, California, USA)

Amplifikasi dilakukan pada mesin *MJ Mini Personal Thermalcycler Biorad model PTC-1148* dengan kondisi *predenaturasi* pada suhu 94°C selama lima menit, diikuti 36 siklus dengan kondisi reaksi *denaturasi* 94°C selama satu menit, *annealing* pada 35°C selama 30 detik, dan *polimerisasi* pada suhu 72°C selama satu menit. Pada bagian akhir ditambahkan dengan *polimerisasi* tambahan pada suhu 72°C selama lima menit. Setelah reaksi selesai, sebanyak 5 µL produk PCR dicampur dengan 2 µL 5 X *DNA loading dye* (*blue/orange loading dye*) dan dielektroforesis pada gel agarose 1% (Gibco BRL Cat.No. 5510UA) yang telah diisi *ethidium bromide solution* 1,5 mL/ 25 mL (Promega Cat.No. H5041), bersama dengan *Marker* 100 bp *DNA Ladder* (Invitrogen, Cat.No.15628-019) dalam buffer TAE 1 X. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 v selama 30 menit. Visualisasi *band/pita* yang muncul dilakukan dengan *UV transilluminator* dan difoto dengan kamera digital FE-270 7,1 Megapixel.

Analisis Data RAPD

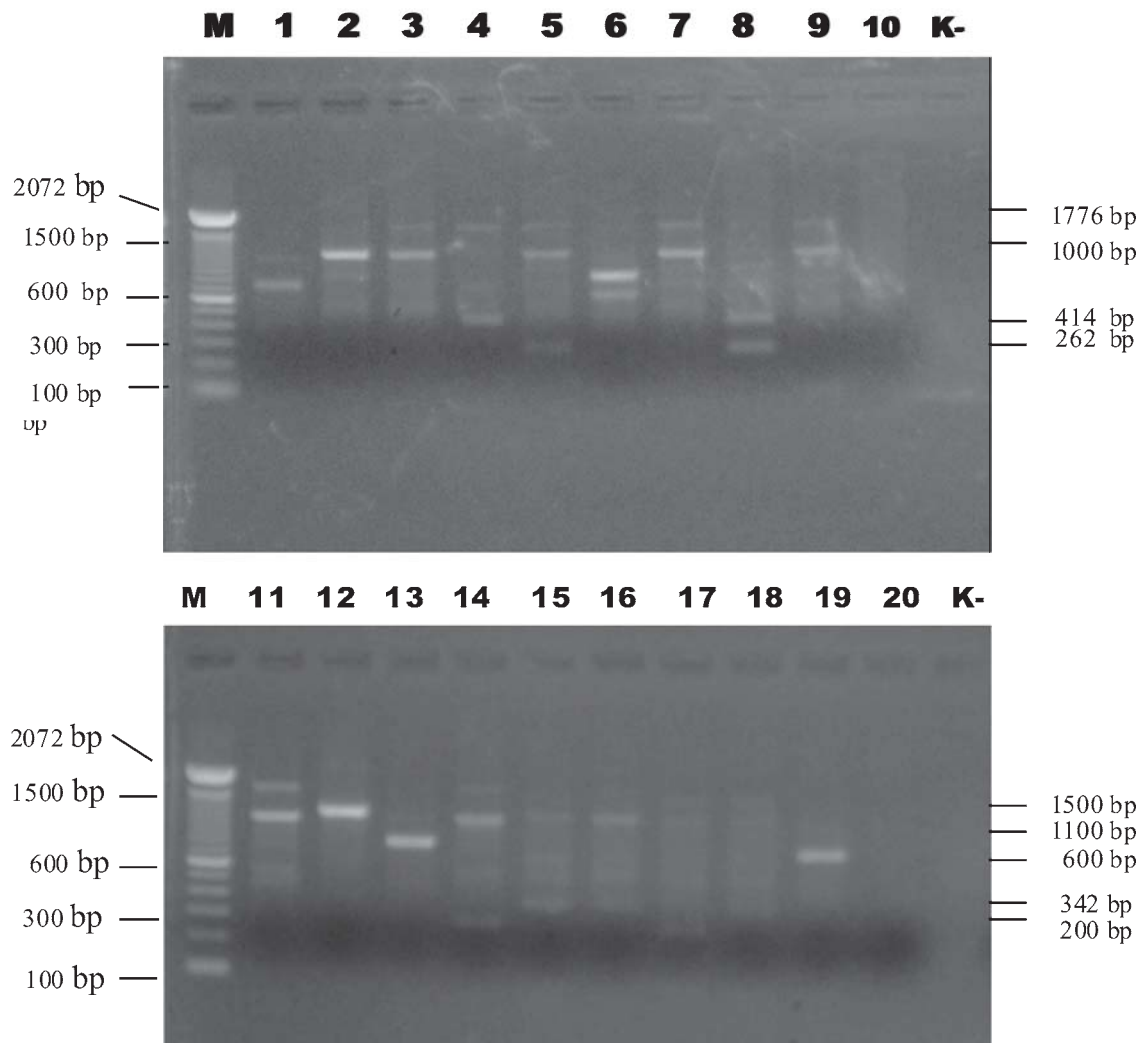
Data yang diperoleh dari hasil penelitian berupa *band/pita* dianalisis secara deskriptif dengan terlebih dahulu membuat grafik representatifnya. Posisi *band/pita* ditentukan dengan menghitung nilai mobilitasnya (*retention factor*/RF) untuk selanjutnya dikonversikan dalam bentuk matriks n x t (n = jumlah tipe pita, t = jumlah isolat) dengan metode sistematik numerik. Data selanjutnya dipreparasi pada program *programmer file editor* (PFE). Nilai similaritas ditentukan dengan metode *simple matching coefficient* (SSM) dan dikelompokkan dengan *algorithm unweighted pair group methode using arithmetic averages* (UPGMA) dalam program *multivariate statistical package* (MVSP) 3.1 (Sembiring, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Genom (DNA *Fingerprint*) *E. coli* O157:H7 Asal Hewan dan Manusia

Hasil analisis RAPD terhadap ke-20 isolat yang diuji menggunakan primer oligonukleotida universal OPA-01, OPA-02, OPA-03, dan OPA-04 dengan metode primer mixture (Sall *et al.*, 2000) disajikan pada Gambar 1.

Hasil perhitungan variasi jumlah pita yang muncul pada Gambar 1 dan posisi masing-masing pita ditentukan berdasarkan perhitungan nilai *retention factor*/RF maka kajian lebih jauh jumlah pita serta variasi fragmen yang terbentuk di antara masing-masing isolat secara ringkas disajikan pada Tabel 2



Gambar 1. Profil DNA genom isolat *E. coli* O157:H7 dengan metode RAPD pada agarose 1%. Jalur 1 kontrol positif : ATCC 43894; Jalur 2 sampai 12 feses manusia sakit yaitu; jalur 2: KL52(7); 3: KL87(7); 4: KL30(4); 5: KL45(1); 6: KL(48(2); 7: KL85(1); 8: KL83(5); 9: KL24(5); 10: KL68(1); 11: KL106(3); dan jalur 12: KL55(6); Jalur 13 sampai 14 feses ayam yaitu; jalur 13: MK35; 14: MK19(8)/4; Jalur 15 sampai 16 feses manusia sehat yaitu; jalur 15: M14(4)/ dan jalur 16: M17(1); Jalur 17 sampai 18 daging sapi yaitu; jalur 17: DS21(4) dan jalur 18: DS16(2); Jalur 19-20 feses sapi yaitu; jalur 19: SM25(1) dan jalur 20: SM7(1). M: Marker 100 bp DNA *Ladder* (Invitrogen cat. 15628-019); K-: Kontrol negatif.

Tabel 2. Fragmen dan jumlah pita isolat *E. coli* O157:H7 hasil *Random Amplified Polymorphic DNA*.

| No | Isolat | Asal isolat | Daerah pengambilan | Fragmen pita(bp) | Jumlah pita |
|-------|------------|-------------|--------------------|---------------------------|-------------|
| 1. | ATCC | fm | Jepang | 1100; 700 | 2 |
| 2. | KL 52(7) | fmsk | Karangasem | 1100;800;500 | 3 |
| 3. | KL 87(7) | fmsk | Denpasar | 1721;1100;700;500 | 4 |
| 4. | KL 30(4) | fmsk | Badung | 1721;700;414 | 3 |
| 5. | KL 45(1) | fmsk | Denpasar | 1721;1100;900;500;262 | 5 |
| 6. | KL 48(2) | fmsk | Badung | 1100;800;600 | 3 |
| 7. | KL 85(1) | fmsk | Karangasem | 1721;1100;900;737;500 | 5 |
| 8. | KL 83(5) | fmsk | Karangasem | 1721;1100;900;737;414;262 | 6 |
| 9. | KL 24(5) | fmsk | Badung | 1776;1127;737;538 | 4 |
| 10. | KL 68(1) | fmsk | Badung | 700 | 1 |
| 11. | KL 106(3) | fmsk | Negara | 1808;1200;800;553;500 | 5 |
| 12. | KL 55(6) | fmsk | Badung | 2366;1300 | 2 |
| 13. | MK 35 | fa | Denpasar | 1100;800 | 2 |
| 14. | MK 19(8)/4 | fa | Denpasar | 1808;1100;500;250 | 4 |
| 15. | M 14(4) | fmsk | Badung | 1100;600;300 | 3 |
| 16. | M 17(1) | fmsk | Badung | 1 500;1100;500;300 | 4 |
| 17. | DS 21(4) | ds | Pasar Badung | 1400;1100;429;200 | 4 |
| 18. | DS 16(2) | ds | Pasar Badung | 1400;1100;429 | 3 |
| 19. | SM 25(1) | fs | Badung | 1000;600;342 | 3 |
| 20. | SM7(1) | fs | Badung | 1100 | 1 |
| Total | | | | | 67 |

Keterangan : fm: feces manusia; fmsk: feces manusia sakit; fa: feces ayam; fmsk: feces manusia sehat; ds: daging sapi; dan fs: feces sapi.

Hasil RAPD pada Gambar 1 yang dikonversi dengan hasil perhitungan fragmen pita yang terbentuk disajikan pada Tabel 2. Terlihat adanya variasi fragmen dan jumlah pita di antara ke-20 isolat yang diuji. Hasil ini memperlihatkan adanya penempelan primer pendek RAPD A-01, A-02, A-03, dan A-04 yang berbeda-beda pada masing-masing isolat. Terdeteksinya variasi penempelan primer ini,

dapat digunakan sebagai petunjuk adanya perbedaan variasi sekuen DNA genom masing-masing isolat. Hasil RAPD pada 20 isolat yang diuji, ditemukan adanya jumlah *band*/pita yang bervariasi antara 1 sampai 6 pita. Fragmen pita DNA yang terbentuk juga bervariasi mulai dari 200 bp sampai 2366 bp dalam 20 genotipe *E. coli* O157:H7. Kajian lebih lanjut untuk melihat jumlah pita yang muncul serta *polymorphism*

Tabel 3. Jumlah pita yang teramplifikasi dan *polymorphism* yang dihasilkan dari uji *Random Amplified Polymorphic DNA* menurut asal sampel

| Asal sampel | Jml sampel | Jml pita | <i>Mono-morphism</i> | <i>Poly-morphism</i> | % <i>polymorphism</i> |
|---------------------|------------|----------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Feses manusia sakit | 12 | 43 | 0 | 43 | 100 % |
| Feses manusia sehat | 2 | 7 | 4 | 3 | 42,86 % |
| Feses ayam | 2 | 6 | 2 | 4 | 66,67 % |
| Daging sapi | 2 | 7 | 6 | 1 | 14,29 % |
| Feses sapi | 2 | 4 | 0 | 4 | 100 % |
| Total | 20 | 67 | 12 | 55 | 82,09 % |

yang dimunculkan dari analisis genom dengan RAPD untuk masing-masing asal sampel seperti disajikan pada Tabel 3.

Data pada Tabel 3 menunjukkan dari 20 sampel *E. coli* O157:H7 dengan 67 pita yang berhasil teramplifikasi, ditemukan 12 pita DNA *monomorphism* dan 55 pita DNA *polymorphism* dengan rincian pada feses manusia sakit, feses manusia sehat, feses ayam, daging sapi dan feses sapi masing-masing sejumlah 100; 42,86; 66,67; 14,29; dan 100%. Cukup tingginya jumlah pita yang bersifat *polymorphism* menunjukkan bahwa primer RAPD yang digunakan cukup selektif untuk menilai *genetic diversity* di antara ke-20 isolat.

Berpedoman pada jumlah/persentase munculnya pita-pita khusus untuk setiap isolat, maka pita dengan persentase kemunculan tertinggi dianggap sebagai penanda/*marker* untuk masing-masing isolat. Pita yang muncul pada Gambar 1 tersebut, ditemukan adanya pita spesifik yang peluang kehadirannya dapat membedakan antara isolat hasil isolasi dari kasus sakit dan sehat yaitu hadirnya pita-pita dengan panjang 1721 dan 700 bp. Ditemukan juga pita khusus sebagai penanda untuk isolat asal manusia sakit yaitu pita dengan panjang 1721 bp, isolat asal manusia sehat adalah pita dengan panjang 300 bp, isolat asal feses ayam 250 bp, isolat asal daging sapi 1400 dan 429 bp serta isolat asal feses sapi 342 bp. Hasil penelitian ini mencerminkan metode RAPD yang digunakan dapat dipakai sebagai penentu *marker*/penanda di samping fungsi lainnya untuk menganalisis hubungan filogenetik, penentuan asal-usul, sebagai prediksi *genetic diversity* dan deteksi ketidakstabilan suatu genom (Al-Darahi, 2008).

SIMPULAN

Hasil analisis RAPD terhadap ke-20 strain *E. coli* O157:H7 menggunakan primer OPA-01, OPA-02, OPA-03 dan OPA-04 dengan metode *primer mixture*, maka berhasil ditemukan adanya pita spesifik yang peluang kehadirannya dapat membedakan antara isolat hasil isolasi dari kasus sakit dan sehat yaitu hadirnya pita-pita dengan panjang 1721 dan 700 bp. Ditemukan juga pita khusus sebagai penanda untuk isolat asal manusia sakit yaitu pita dengan panjang 1721 bp, isolat asal manusia

sehat adalah pita dengan panjang 300 bp, isolat asal feses ayam 250 bp, isolat asal daging sapi 1400 dan 429 bp serta isolat asal feses sapi 342 bp.

SARAN

Perlu dilakukan uji lanjutan dengan metode RAPD menggunakan kit ataupun mesin PCR yang lain untuk melihat kestabilan pita-pita penanda genetik yang teramplifikasi di samping juga diperlukannya konfirmasi dengan metode RAPD menggunakan primer yang sama secara terpisah (tidak menggunakan metode *primer mixture*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof Dr Supar, APU (BBalitvet Bogor) atas bantuannya memberikan isolat kontrol ATCC 43894. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada pihak DP2M Dikti yang telah mendanai proyek penelitian ini melalui dana Penelitian Hibah Strategis Nasional Tahun Anggaran 2013 dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Nomor. /SP2H/PL/DIT.LITABMAS/V/2003, Tanggal 13 Mei 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Darahi KF, Mahdi LK, Al-Naib KT, Jubreal J. 2008. Molecular characterization of *E. coli* O157:H7 strains using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J Dohuk Univ* 11(1) : 198-204.
- Arslan A, Ilhak I, Calicioglu M, Karahan M. 2005. Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J Muscle Food* 16 : 37-45.
- Bardakci F. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol* 25 : 185-196.
- Bardakci F, Skibinski DOF. 1999. A polymorphic SCAR-RAPD marker between species of tilapia. *Genetics* 30 : 78-79.

- Hill WE, Jinneman KC. 2000. *Principles and application of genetic techniques for detection, identification, and subtyping of food-associated pathogenic microorganism* in Barbara ML, Baird-Parker TC, Gould GW (Ed). *The microbiological safety and quality of food*. Vol. II (ed). Aspen publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Olivier M, Meehl MA, Lust G. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies. *J Heredity* 90 : 78-82.
- Saleh N, Ibrahim MA, Archoukieh E, Makkiya A, Al-Obaidi, Alobydi H. 2010. Identification of genomic markers by RAPD-PCR primer in leukemia patients. *Biotechnology* 9(2) : 170-175.
- Sall T, Lind-Hallden C, Hallden C. 2000. Primer mixture in RAPD analysis. *Hereditas* 132 : 203-208.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rdEd. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Suardana IW, Artama WT, Asmara W, Daryono BS. 2010. Identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 serta deteksi gen *shiga like toxin 1* dan *2* asal feses hewan, daging dan feses manusia. *J Veteriner* 11(4) : 264-270.
- Sembiring L. 2002. *Sistematika mikrobial. Petunjuk praktikum*. Yogyakarta. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.
- Yeo JS, Lee JS, Lee CH, Jung YJ, Nam DH. 2000. Identification of genetic markers for Korean native cattle (Hanwoo) by RAPD analysis. *Biotechnol Bioprocess Eng* 5 : 23-26.