

Deteksi *Escherichia coli* O157:H7 pada Bahan Pangan Asal Ternak dan Olahannya dengan Teknik IDAS-ELISA

(Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Cattles and in Foods of Animal Products with IDAS-ELISA)

Tati Aryanti, Maryam R

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30 Bogor, 16114
aryantita@yahoo.co.id

ABSTRACT

Escherichia coli O157:H7 strains are important pathogen bacteria which cause foodborne diseases in human. The objective of the study was to detect of pathogenic bacteria *E.coli* O157:H7 in dairy cattles and in foods of animal products using *Indirect Double Antibodies Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (IDAS-ELISA). The optimum conditions obtained by 1:1,000 of the antigen dilution, 1:50 antibody dilution (equivalent to 5.3 µg/well of goat antibody and 12.7 µg/well of rabbit antibody) and 1:15,000 of the conjugate dilution (goat anti-rabbit IgG HRPO). A total of 120 samples from cattle and dairy products consisted of 30 meat samples, 30 samples of fresh milk, 10 samples of meatballs, 10 samples of *dendeng*, 10 sample of sausages, 12 samples of *abon*, 10 samples of Ultra High Temperature (UHT) milk, eight samples of yoghurt and cheese were collected from traditional markets and supermarkets in several regions around Bandung, Sukabumi and Bekasi. The samples were analysed for *E. coli* O157: H7 contamination using IDAS-ELISA technique. The test results indicated that 32.5% (39/120) of the samples contained *E. coli* O157: H7 with a concentration range of 10^3 - 10^4 cells/ml for samples of milk and yogurt, 10^3 - 10^4 cells/g for samples of meat, *dendeng* and meatballs.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, IDAS-ELISA, Animal Products

ABSTRAK

Escherichia coli O157:H7 merupakan salah satu bakteri patogen penting yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia (*foodborne disease*). Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi bakteri patogen *E. coli* O157:H7 pada bahan pangan asal ternak dan olahannya dengan *Indirect Double Antibodies Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (IDAS-ELISA). Kondisi optimum IDAS-ELISA diperoleh pada pengenceran antigen 1:10³, antibodi 1:50 (setara dengan 5,3 µg/lubang antibodi kambing dan 12,7 µg/lubang antibodi kelinci), serta pengenceran konjugat (*goat-anti rabbit IgG-HRPO*) yaitu 1:15.000. Sebanyak 120 sampel bahan pangan asal ternak dan olahannya dikoleksi dari berbagai pasar tradisional dan supermarket di wilayah Bandung, Sukabumi dan Bekasi. Sampel terdiri dari 30 sampel daging, 30 sampel susu segar, 10 sampel bakso, 10 sampel dendeng, 10 sampel sosis, 12 sampel abon, 10 sampel susu *Ultra High Temperature* (UHT), delapan sampel yoghurt dan keju. Sampel-sampel tersebut diperiksa menggunakan teknik IDAS-ELISA. Hasil pengujian dengan teknik IDAS-ELISA tersebut menunjukkan adanya *E. coli* O157:H7 sebanyak 32,5% (39/120) pada sampel susu dan yoghurt dengan kisaran konsentrasi 10^3 - 10^4 sel/ml, serta sampel daging, dendeng dan bakso sebanyak 10^3 - 10^4 sel/g.

Kata Kunci: *Escherichia coli* O157:H7, IDAS-ELISA, Pangan Asal Ternak

PENDAHULUAN

Escherichia coli O157:H7 merupakan salah satu *food borne pathogen* penting pada manusia (Radu et al. 2001; Zhao d & Liu 2005). Faktor virulensi yang penting dari *E. coli* O157:H7 adalah toksin yang diproduksinya yaitu *shiga-toxin* (stx1 dan/atau stx2).

Penyakit yang ditimbulkan oleh patogen ini adalah *Hemorrhagic Colitis* (HC) dan *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS). Sekitar 10% pasien dengan diagnosa HC, dapat menjadi parah dan menderita HUS terutama pada anak-anak dan orang tua dengan status imunitas yang rendah (Fedio et al. 2011).

Reservoir utama *E. coli* O157:H7 adalah ternak sapi dan feses sapi yang merupakan sumber infeksi pada manusia, ternak lain dan kontaminasi pada lingkungan. Bahan pangan yang berasal dari ternak sapi seperti daging dan susu dapat menjadi perantara terjadinya infeksi *E. coli* O157:H7 pada manusia. Kontaminasi silang daging sapi dengan bahan pangan lain selama penanganan, pemrosesan, penjualan, pemanasan yang kurang sempurna pada saat memasak dapat mendukung *food borne infection* yang disebabkan oleh *E. coli* O157:H7 pada manusia. Bahan pangan lain yang berkaitan dengan wabah yang disebabkan oleh *E. coli* O157:H7 di beberapa negara berkembang adalah daging sapi giling, daging sapi panggang, sosis, keju, yoghurt, sari buah apel, selada dan tauge. Sebagian besar wabah tersebut disebabkan oleh kontaminasi *E. coli* O157:H7 pada daging sapi giling yang dimasak setengah matang (Fedio et al. 2011; Radu et al. 2001; Robinson & McKillip 2010). Beberapa peneliti di Indonesia telah melaporkan bahwa bakteri *E. coli* O157:H7 dapat diisolasi dari daging sapi, susu segar dan pasteurisasi, makanan laut (*seafood*), air minum dalam kemasan dan air minum isi ulang (Kandau 2009; Marlina et al. 2009, Sartika et al. 2005; Suardana et al. 2007). Dosis infeksi bakteri *E. coli* O157:H7 diperkirakan cukup rendah yaitu kurang dari 100 sel bakteri (Fedio et al. 2011; Liu et al. 2008).

Pemeriksaan *E. coli* O157:H7 pada bahan pangan menjadi perhatian yang besar karena sejumlah kecil patogen ini sudah dapat menyebabkan penyakit yang serius pada manusia bahkan kematian (Liu et al. 2008). Pengembangan teknik deteksi cepat yang handal menjadi sangat penting untuk menjamin keamanan dan kesehatan masyarakat (Shen et al. 2014). Namun demikian, metode standar deteksi *E. coli* O157:H7 pada sampel makanan yang menggunakan larutan pengkayaan, media selektif, identifikasi biokimia, pewarnaan Gram dan konfirmasi serologis, membutuhkan waktu yang lama sekitar 5-6 hari, dengan menggunakan media, peralatan gelas dan memerlukan banyak tenaga (Fedio et al. 2011; Shen et al. 2014). Saat ini, beberapa metode deteksi cepat dan akurat telah banyak dikembangkan. *Polymerase Chain Reactions* (PCR), baik teknik PCR konvensional, *multiplex* PCR, maupun *real-time* PCR sudah umum digunakan untuk deteksi cepat *E. coli* O157:H7. Namun, teknik ini membutuhkan peralatan yang mahal dan personel yang terlatih. Teknik deteksi *E. coli* O157:H7 lain yang telah banyak dikembangkan dan dilaporkan sangat sensitif dan bersifat selektif namun membutuhkan biaya yang mahal antara lain *immunomagnetic separation* (IMS) *analysis*, *flow cytometry*, *fluorescence in situ hybridization*, *DNA microarrays* dan penggunaan elektrokimia untuk imunosensor (Shen et al. 2014).

Salah satu teknik deteksi antigen spesifik *E. coli* O157 yang didasarkan pada reaksi imunologi, yang terus dikembangkan adalah *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Teknik ELISA konvensional digunakan secara luas di dunia untuk mendeteksi keberadaan dan jumlah agen penyakit seperti bakteri, virus, protein dan kontaminan seperti pestisida karena sangat sensitif (Zhao & Liu 2005; Shen 2014). Kekurangan teknik ELISA konvensional adalah adanya reaksi silang terhadap antisera spesifik yang digunakan sehingga mengganggu hasil pengukuran (Zhao & Liu 2005). Oleh karena itu, dilakukan pengembangan teknik *Indirect Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (IDAS-ELISA) untuk deteksi cepat *E. coli* O157:H7. Pada teknik IDAS-ELISA digunakan dua jenis antibodi yang spesifik terhadap *E. coli* O157:H7 yang diproduksi pada hewan yang berbeda dengan tujuan untuk mencegah terjadinya reaksi silang.

Teknik IDAS-ELISA ini dipilih karena sangat sensitif, membutuhkan waktu sekitar 1-2 hari dan sederhana penanganannya dalam mendeteksi antigen sampai dengan jumlah 10^3 sel/g atau 10^3 sel/ml, baik dalam bahan pangan maupun produk olahan asal ternak dan dapat diterapkan juga pada sampel feses sapi. Teknik IDAS-ELISA yang telah dikembangkan dan divalidasi di laboratorium ini digunakan untuk mendeteksi kontaminasi *E. coli* O157:H7 pada bahan pangan asal ternak dan olahannya.

MATERI DAN METODE

Teknik IDAS-ELISA diaplikasikan untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 pada sampel lapang berupa produk peternakan dan olahannya sebanyak 120 sampel yang terdiri dari 30 sampel daging, 30 sampel susu segar, 10 sampel bakso, 10 sampel dendeng, 10 sampel sosis, 12 sampel abon, 10 sampel susu UHT, delapan sampel yoghurt dan keju. Sampel tersebut dikoleksi dari pasar tradisional dan supermarket di beberapa wilayah di sekitar Bandung, Sukabumi dan Bekasi.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu penyiapan antibodi poliklonal anti *E. coli* O157:H7, penentuan format IDAS-ELISA, serta aplikasi IDAS-ELISA untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 pada sampel pangan asal ternak dan produk olahannya.

Penyiapan antibodi poliklonal

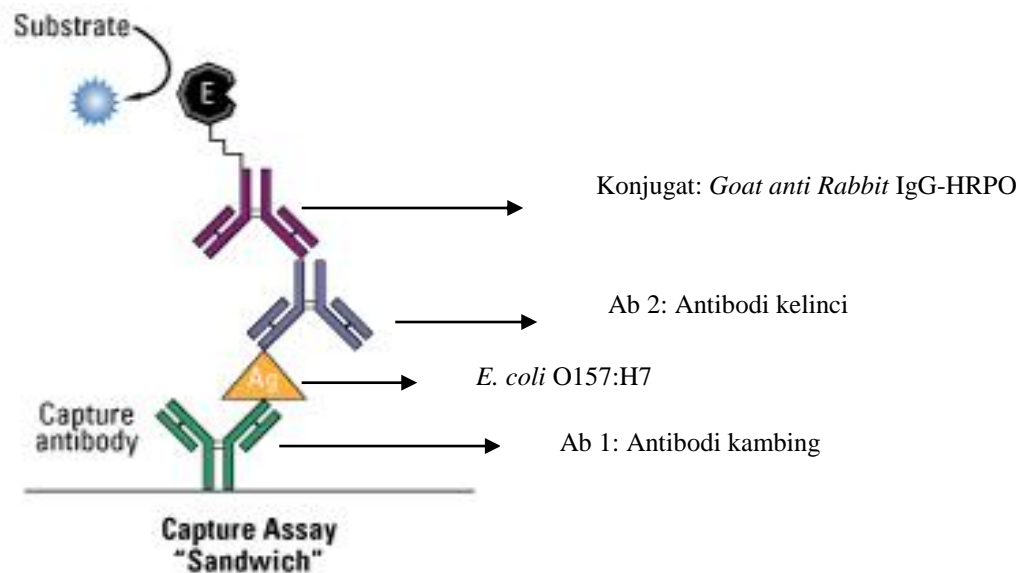
Antibodi yang digunakan pada penelitian ini adalah antibodi terhadap *E. coli* O157:H7 yang diproduksi pada kambing dan kelinci pada penelitian sebelumnya (Ariyanti et al. 2009). Antibodi tersebut dimurnikan melalui pengendapan dengan ammonium sulfat, kemudian dilewatkan melalui kolom HiTrapTM Protein A HP (Amersham 17-0402-01, GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden).

Pengendapan antibodi menggunakan larutan ammonium sulfat jenuh yang dibuat dengan melarutkan 75 g ammonium sulfat pada dalam 100 ml akuades. Supernatan diukur volumenya, ditambahkan larutan ammonium sulfat jenuh dengan volume yang sama secara perlahan sambil diaduk. Pengadukan diteruskan selama satu jam pada suhu 4°C. Selanjutnya campuran disentrifus pada 3.000 g selama 15 menit. Supernatan dibuang dan endapan dicuci dua kali dengan larutan ammonium sulfat jenuh, kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak setengah dari volume semula. Larutan didialisis selama tiga hari dalam larutan *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,6 pada suhu 4°C. Pergantian *buffer* dilakukan setiap hari hingga ion sulfat tidak ada lagi yang diketahui dengan menambahkan larutan barium klorida.

Pemurnian antibodi yang dihasilkan dari supernatan dilanjutkan dengan menggunakan kolom *HiTrap Protein A HP* (Amersham). Disiapkan *buffer* pengikat (*binding buffer*) 20 mM sodium fosfat pH 7,0; *buffer* pengelusi 0,1M asam sitrat pH 3-6 dan *buffer* tris-HCl pH 9,0. Sebanyak 10 tabung penampung fraksi diisi dengan 0,2 ml *buffer* tris-HCl pH 9,0. Kolom dikondisikan dengan 25 ml *binding buffer* dan dibilas kembali dengan 50 ml *binding buffer*. Sebanyak 2 ml supernatan ditambahkan 8 mL *buffer* pengikat, dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dicuci dengan 35 ml *binding buffer*. Imunoglobulin dielusi dari kolom dengan 20 ml *buffer* pengelusi dan 2 ml fraksi ditampung ke dalam botol penampung yang berisi *buffer* tris-HCl. Selanjutnya imunoglobulin diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm (Luciani et al. 2006).

Penentuan format IDAS-ELISA

Teknik IDAS-ELISA menggunakan dua jenis antibodi untuk dilapiskan pada pelat mikro ELISA (Gambar 1). Antibodi 1 yaitu antibodi spesifik terhadap *E. coli* O157:H7 yang dihasilkan dari kambing dan antibodi 2 yaitu antibodi spesifik terhadap *E. coli* O157:H7 yang dihasilkan dari kelinci. Optimasi ELISA dilakukan dengan menentukan konsentrasi optimum dari kedua jenis antibodi (IgG) kambing dan kelinci tersebut, serta pengenceran optimum antigen dan konjugat *Goat anti-Rabbit IgG-HRPO* (*Horseradish Peroxidase*). Proses optimasi tersebut meliputi titrasi serum, titrasi antigen dan titrasi konjugat. Bakteri yang digunakan untuk kontrol positif adalah *E. coli* O157:H7 (*American Type Culture Collection/ATCC 43984*).



Gambar 1. Format teknik IDAS-ELISA

Penyiapan suspensi sampel

Sebanyak 10% sampel produk peternakan dan olahannya, dimasukkan dalam larutan PBS pH 7,2, masing-masing sampel dihancurkan dengan menggunakan *stomacher*. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 6.000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan cairan (supernatan) dan endapan. Supernatan tersebut kemudian digunakan sebagai sampel yang diuji dengan teknik IDAS-ELISA. Apabila tidak segera digunakan dapat disimpan dalam *freezer* sampai saatnya uji ELISA dilakukan.

Aplikasi IDAS-ELISA

Teknik IDAS-ELISA untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 pada bahan pangan asal ternak dan olahannya mengikuti prosedur *Office International Des Epizooties* (1987). Pelat mikro ELISA yang terdiri dari 96 lubang dilapisi dengan 100 µl antibodi kambing yang dilarutkan dalam *buffer* karbonat-bikarbonat pH 9,6 (1:100). Pelat ditutup dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam atau pada suhu 4°C selama satu malam. Pelat dicuci tiga kali dengan PBST pH 7,5 yang mengandung 0,05% Tween 20.

Blocking dilakukan dengan menambahkan 100 µl larutan *bovine serum albumin* (BSA) 0,25% dalam *phosphat buffer saline tween* (PBST) ke dalam tiap lubang, lalu

diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Pelat dicuci tiga kali seperti sebelumnya. Lubang pelat nomor 11 dan 12 baris A diisi dengan kontrol positif dari suspensi supernatan biakan bakteri *E. coli* O157:H7, kemudian diencerkan secara bertahap dengan faktor pengenceran 1:2 sampai pada baris G, lubang 11 dan 12 baris H diisi PBST.

Suspensi supernatan dari sampel bakteri diisikan ke dalam lubang pelat ELISA sebanyak 100 µl secara duplikat. Pelat diinkubasi pada suhu 37°C seperti sebelumnya selama satu jam dan dicuci tiga kali dengan PBST.

Selanjutnya, tiap lubang ditambahkan 100 µl antibodi kelinci dengan pengenceran 1:100 dalam PBST yang mengandung 0,25% BSA. Pelat ditutup dan diinkubasikan pada suhu 37°C seperti sebelumnya selama satu jam, kemudian dicuci tiga kali dengan PBST kembali. Sebanyak 100 µl suspensi konjugat dalam PBST yang mengandung BSA 0,25%. Pelat ditutup, diinkubasikan pada suhu 37°C seperti sebelumnya selama satu jam, kemudian dicuci tiga kali dengan PBST seperti sebelumnya.

Sebanyak 100 µl substrat ABTS yang dilarutkan dalam 0,1 M *buffer* sitrat pH 4,2 yang mengandung 2,5 M H₂O₂ dimasukkan ke dalam tiap lubang. Pelat ditutup dan diinkubasikan seperti sebelumnya selama satu jam. Reaksi enzim yang terikat dalam kompleks antigen-antibodi dengan substrat dapat dibaca secara visual (kualitatif), dimana reaksi positif terlihat berwarna hijau atau negatif tidak berwarna. Reaksi warna tersebut dapat dibaca dengan alat pembaca ELISA (Titertek Multiskan) pada panjang gelombang 420 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik IDAS-ELISA telah digunakan untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 pada bahan pangan asal ternak dan olahannya dengan menggunakan dua antibodi poliklonal yang berasal dari kambing dan kelinci (Ariyanti et al. 2009). Dalam penelitian ini, pengenceran yang dipergunakan dalam menentukan optimasi terhadap teknik IDAS-ELISA adalah lima pengenceran antigen yaitu 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ sel/ml, lima pengenceran antibodi yaitu 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 dan tiga pengenceran konjugat yaitu 1:5.000, 1:10.000, 1:15.000. Berdasarkan titrasi tersebut diperoleh kondisi optimum yaitu pengenceran antigen 1:10³, antibodi 1:50 (setara dengan 5,3 µg/lubang antibodi kambing dan 12,7 µg/lubang antibodi kelinci), sedangkan pengenceran konjugat (*goat-anti rabbit IgG-HRPO*) yaitu 1:15.000. Limit deteksi pada teknik IDAS-ELISA ini adalah 10³ sel/ml.

Tabel 1 memperlihatkan hasil pengujian sampel lapang dengan teknik IDAS-ELISA menunjukkan sebanyak 32,5% (39/120) sampel positif mengandung *E. coli* O157:H7. Tiga puluh sembilan sampel yang terkontaminasi *E. coli* O157:H7 tersebut terdiri dari sampel daging (17/120), dendeng (4/120), bakso (2/120), sampel susu segar (15/120) dan yoghurt (1/120). Kisaran konsentrasi untuk susu segar dan yoghurt adalah 10³-10⁴ sel/ml sedangkan untuk sampel daging, bakso dan dendeng adalah 10³-10⁴ sel/g. Data ini menunjukkan bahwa beberapa produk peternakan yang beredar di wilayah Bandung, Sukabumi dan Bekasi telah terkontaminasi oleh bakteri *E. coli* O157:H7. Sedangkan untuk sampel sosis, abon, susu UHT dan keju tidak terdeteksi adanya *E. coli* O157:H7.

Beberapa peneliti sebelumnya telah melaporkan bahwa bakteri *E. coli* O157:H7 dapat diisolasi dari bermacam-macam sumber. Sartika et al. (2005) melaporkan bakteri *E. coli* O157:H7 dapat diisolasi dari 100% (12/12) daging sapi yang berasal dari RPH Cibinong, RPH kota Bogor dan beberapa pasar tradisional di Bogor. Kontaminasi *E. coli* O157:H7 juga ditemukan pada sampel susu segar dan pasteurisasi dari peternakan sapi perah (PSP) dan industri skala rumah tangga sebanyak 73,7% (14/19), sampel air dari RPH dan PSP sebanyak 60% (3/5), tenaga pekerja di RPH, PSP dan pasar tradisional sebanyak 41,7% (5/12). Suardana et al. (2007) juga melaporkan bahwa bakteri *E. coli* O157:H7 dapat

diisolasi dari sampel daging di Kabupaten Badung, Provinsi Bali sebesar 5,62%. Sedangkan Kandau (2009) melaporkan bahwa sebanyak 8,33% (2/24) sampel air minum dalam kemasan dan 25% (3/12) sampel air minum isi ulang yang beredar di Manado juga terkontaminasi *E. coli* O157:H7. Marlina et al. (2009) telah mengisolasi *E. coli* O157:H7 dari enam sampel rajungan dan udang putih di Padang yaitu sebanyak 83,33% (15/18 kultur *E. coli* O157:H7 dinyatakan positif memiliki gen *fliCH7* yang diuji dengan metode MPN-PCR. Beberapa laporan tersebut membuktikan bahwa *E. coli* O157:H7 telah terdistribusi luas di Indonesia dan mengkontaminasi pada bermacam-macam jenis sampel.

Tabel 1. Hasil analisis *E. coli* O157:H7 pada sampel lapang asal Bandung, Sukabumi dan Bekasi dengan teknik IDAS-ELISA

Jenis sampel	Jumlah sampel	Jumlah sampel positif	Persentase sampel positif	Rata-rata konsentrasi <i>E. coli</i> O157:H7 pada sampel positif
Daging	30	17	56,7	10 ³ sel/g
Susu Segar	30	15	50,0	10 ³ sel/mL
Bakso	10	2	20,0	10 ³ sel/g
Dendeng	10	4	40,0	10 ⁴ sel/g
Sosis	10	0	0	TT
Abon	12	0	0	TT
Susu UHT	10	0	0	TT
Yoghurt	5	1	20,0	10 ⁴ sel/mL
Keju	3	0	0	TT
Total sampel	120	39	32,5	

TT: Tidak terdeteksi (<10³ sel)

Sumber kontaminasi *E. coli* O157:H7 berasal dari sapi yang terinfeksi, bakteri berkolonisasi di usus besar dan rektum yang selanjutnya akan disekresikan di dalam feses. Dilaporkan bakteri *E. coli* O157:H7 yang disekresikan dalam feses sapi $\geq 10^4$ CFU/g feses. Pada sapi dewasa yang terinfeksi, tidak menunjukkan gejala penyakit namun pada anak sapi diawali dengan terjadinya diare yang selanjutnya menjadi asimtomatik. Bakteri yang terdapat pada feses sapi tersebut dapat terdistribusi secara luas ke lingkungan sekitar dan menyebabkan terjadinya kontaminasi pada kulit sapi dan karkas yang dihasilkannya (Robinson & McKillip 2010). Sumber infeksi *E. coli* O157:H7 pada manusia dapat terjadi melalui konsumsi produk ternak yaitu daging atau susu segar yang terkontaminasi dan dimasak/diolah dengan pemanasan yang kurang sempurna. Penularan infeksi *E. coli* O157:H7 dapat terjadi melalui kontak antara orang yang sakit dengan orang yang sehat. Infeksi *E. coli* O157:H7 juga dapat terjadi melalui air yang terkontaminasi, kontak langsung atau tidak langsung dengan feses sapi yang mengandung *E. coli* O157:H7 (Arthur et al. 2013; Robinson & McKillip 2010).

KESIMPULAN

Teknik IDAS-ELISA yang dikembangkan dapat digunakan untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 pada produk ternak dan olahannya. Sebanyak 32,5% sampel lapang telah terkontaminasi oleh *E. coli* O157:H7 dengan kisaran konsentrasi 10³-10⁴ sel/ml untuk sampel susu segar dan yoghurt, serta 10³-10⁴ sel/g untuk sampel daging, dendeng dan bakso.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanti T, Kusmiyati, Rahmawati F. 2009. Isolasi dan karakterisasi *E. coli* enterohemoragik O157:H7 dan pengembangan teknik ELISA untuk deteksi *E. coli* enterohemoragik O157:H7 pada sapi perah, produk pangan asal ternak dan olahannya. Laporan Akhir Penelitian Bansos Dikti (Sinta) TA 2009. Bogor (Indonesia): Balai Besar Penelitian Veteriner. Unpublished.
- Arthur TM, Ahmed R, Chase-Topping M, Kalchayanand N, Schmidt JW, Bono JL. 2013. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Strains Isolated from Supershedding Cattle. *Appl Environ Microbiol.* 79:4294-4303.
- Fedio WM, Jinneman KC, Yoshitomi KJ, Zapata R, Wendakoon CN, Browning P, Weagant SD. 2011. Detection of *E. coli* O157:H7 in raw ground beef by Pathatrix™ immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods. *Int J Food Microbiol.* 148:87-92.
- Kandau FEF. 2009. Analisis molekuler *Escherichia coli* serotipe O157:H7 pada air minum dalam kemasan dan isi ulang menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dengan *rfbE* sebagai gen target. *Chem Prog.* 2:8-14.
- Liu Y, Gilchrist A, Zhang J, Liu X. 2008. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water dan river water. *Appl Environ Microbiol.* 74:1502-1507.
- Luciani M, Armillota G, Magliulo M, Portanti O, Febo TD, Giannatale ED, Roda A, Lelli R. 2006. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for *Escherichia coli* O157:H7. *Vet Italiana.* 42:183-191.
- Marlina, Husni E, Amalinda F, Radu S, Nishibuchi M. 2009. Isolasi bakteri patogen *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel seafood dan deteksi gena *fliC7* secara PCR. *Majalah Farmasi Indonesia.* 20:73-76.
- Office International des Epizooties. 1987. Enzyme immunoassay techniques, ELISA, in animal and plant disease, Second Edition. 12, rue de Prony-75017 France (Paris). p. 6:22-24.
- Radu AS, Ling OW, Rusul G, Karim MIA, Nishibuchi M. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR *Escherichia coli* O157:H7 and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PEGF Analysis. *J Microbiol Methods.* 46:131-139.
- Robinson AL, McKillip JL. 2010. Biology of *Escherichia coli* O157:H7 in human health and food safety with emphasis on sublethal injury and detection. In: Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. A. Mendez-Vilas (ed). p 1096-1105.
- Sartika RAD, Indrawani YM, Sudiarti T. 2005. Analisis mikrobiologi *Escherichia coli* O157:H7 pada hasil olahan hewan sapi dalam proses produksinya. *Makara Kesehatan.* 9:23-28.
- Shen ZN, Jin HM, Qiu Z, Wang J, Zhang B, Wang X, Wang J, Zhou D, Li J. 2014. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic and beacon gold nanoparticles. *Gut Pathogens.* 6:14.
- Suardana IW, Sumiarto B, Lukman DW. 2007. Isolasi dan identifikasi *Escherichia coli* O157:H7 pada daging sapi di Kabupaten Badung Provinsi Bali. *J Vet.* 8:16-23.
- Zhao Z and Liu X. 2005. Preparation of monoclonal antibody and development of enzyme-linked immunosorbent assay specific for *Escherichia coli* O157 in Foods. *Bio Environ Sci.* 18:254-259.