

**Potensi Primer Baru untuk Deteksi Molekuler
Escherichia coli dari Air Sumur di Wilayah Klitren**

Skripsi



RADEN AJENG MERTHA PRANA KUSUMANINGRUM

31110016

**Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana
Yogyakarta**

2015

Potensi Primer Baru untuk Deteksi Molekuler *Escherichia coli* dari Air Sumur di Wilayah Klitren

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains (S. Si) pada Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana



RADEN AJENG MERTHA PRANA KUSUMANINGRUM

31110016

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2015

Lembar Pengesahan

Skripsi dengan judul

POTENSI PRIMER BARU UNTUK DETEKSI MOLEKULER *Escherichia coli* DARI AIR
SUMUR DI WILAYAH KLITREN

Telah diajukan dan dipertahankan oleh :

RA MERTHA PRANA KUSUMANINGRUM

31110016

Dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Sains pada tanggal 30 September 2015

Nama Dosen

1. Dr. Dhira Satwika M.Sc
(Dosen Pembimbing I/Penguji)
2. Tri Yahya Budiarmo, S.Si, M.P
(Dosen Pembimbing II/Penguji)
3. Dr. Charis Amarantini, M.Si
(Dosen Penguji/ Ketua Tim Penguji)

Tanda Tangan



Yogyakarta, 12 Oktober 2015

Disahkan oleh :

Dekan,



Drs. Kisworo, M.Sc

Ketua Program Studi



Dr. Dhira Satwika, M.Sc

LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : RA. Mertha Prana Kusumaningrum

NIM : 31110016

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul : “Deteksi Molekuler *Escherichia coli* dari Air Sumur di Wilayah Klitren” adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian dan seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjana di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu di dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 12 Oktober 2015



RA. Mertha Prana Kusumaningrum

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur penulis haturkan ke hadirat Tuhan Yang Esa, karena Kasih dan Rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Deteksi Molekuler *Escherichia coli* dari Air Sumur di Wilayah Klitren**” yang bertujuan untuk meraih gelar Sarjana Sains (S.Si) di Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana. Naskah skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang dilakukan di bulan Maret - Agustus 2015, yang meliputi uji mikrobiologi, uji biokimia, dan uji molekuler pada sampel air sumur. Penulis menyadari penyelesaian proses pembuatan laporan ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari pihak selama melakukan skripsi. Dengan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Drs. Kisworo, M.Sc sebagai Dekan Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta.
2. Dr. Dhira Satwika, M.Sc dan Tri Yahya Budiarmo, S.Si, M.P sebagai Dosen Pembimbing dan Penguji yang membantu penulis dalam melakukan penelitian dan penulisan naskah.
3. Dr. Charis Amarantini, M.Si sebagai Dosen Penguji yang telah memberikan masukan bagi penulis untuk penyempurnaan naskah skripsi.
4. Laboran Fakultas Bioteknologi : **mas Hari, mas Setya, mbak Retno, dan Kak Dewi yang telah memberikan bimbingan dan bantuan kepada penulis dalam menjalani penelitian di Laboratorium.**
5. **Seluruh angkatan Bioteknologi 2011 yang telah membantu dan menyemangati penulis untuk penelitian dan penulisan naskah skripsi.**

Demikian yang dapat penulis sampaikan dan penulis masih memerlukan saran dan kritik untuk membuat naskah ini menjadi lebih baik. Penulis berharap naskah skripsi ini dapat bermanfaat dan berguna bagi yang membutuhkannya.

Yogyakarta, 12 Oktober 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
Abstrak	1
Abstract	2
PENDAHULUAN	3
1. LatarBelakang	3
2. Tujuan	3
3. RumusanMasalah	4
4. ManfaatPenelitian	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Standar Kualitas Air	5
B. Keberadaan <i>E. coli</i> di Lingkungan	6
C. Uji Biokimia <i>E. coli</i>	8
D. PCR (Polymerase Chain Reaction)	10
METODE PENELITIAN	11
A. WaktudanTempatPenelitian	11
B. AlatdanBahan	11
2.1. Alat	11
2.2. Bahan	11
C. Cara Kerja	12
1. Tahap Mikrobiologis	12
2. Pembuatan Primer	15
3. Tahap Molekuler	13
• Ekstraksi DNA dengan metode fenol kloroform	13
• Penggunaan PCR dan Elektroforesis	13
HASIL DAN PEMBAHASAN	15
A. Hasil sampling (proses pengolahan) air	15
B. Deteksi jenis <i>E. coli</i> dari uji biokimia	16
C. Pembuatan primer	19
D. Deteksi molekuler <i>E. coli</i>	26
KESIMPULAN DAN SARAN	29
1. Kesimpulan	29
2. Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	35
LAMPIRAN 1	34
LAMPIRAN 2	38
LAMPIRAN 3	48
LAMPIRAN 4	50

DAFTAR TABEL

Pedoman air minum di beberapa Negara	5
Standar kualitas air minum Indonesia	6
Uji Biokimia <i>E. coli</i>	9
Hasil uji biokimia koloni biru gelap	17
Penggunaan primer untuk uji molekuler	26

©UKDWN

DAFTAR GAMBAR

Metode penelitian dari uji mikrobiologi hingga molekuler	14
Pertumbuhan bakteri pada media <i>EE Broth</i>	16
Koloni yang muncul dari sampel air sumur	16
Hasil positif uji biokimia	19
<i>Conserved area</i> untuk <i>E. coli gyrB</i> 531 bp dan <i>lacZ</i> 465 bp	20
Hasil Blast pada gen <i>gyrB</i> 531 bp	21
Hasil blast pada gen <i>lacZ</i> 465 bp	22
Analisis filogenetik berdasarkan <i>gyrB</i> dan <i>lacZ</i> yang spesifik mendeteksi <i>E. coli</i>	24
Produk PCR dengan primer <i>gyrB</i> 531 bp dan <i>lacZ</i> 465 bp	27

©UKDW

Potensi Primer Baru untuk Deteksi Molekuler *Escherichia coli* dari Air Sumur di Wilayah Klitren

Raden Ajeng Mertha Prana Kusumaningrum
31110016

Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana

Abstrak. *Escherichia coli* dikenal sebagai bakteri indikator untuk keamanan air minum, kehadiran *Escherichia coli* sebagai tanda bahwa air tidak aman untuk diminum. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan *E. coli* di sumur daerah Klitren, Yogyakarta yang digunakan sebagai air minum. Sampel air sumur dikumpulkan, dan kemudian diolah pada membran ultra filtrasi. Sampel air sumur kemudian diinokulasi pada media selektif *E. coli*. Diperoleh 81 isolat biru gelap yang diduga *E. coli* dari media selektif. Kemudian tes biokimia dilakukan untuk memastikan koloni yang diduga sebagai *E. coli* termasuk uji motilitas, indol dan fermentasi sorbitol, metil merah, tes lisin dekarboksilase dan pertumbuhan pada laktosa broth. Hasil penelitian menunjukkan 27 koloni memberi hasil positif *E. coli*. Kemudian konfirmasi dilakukan dengan deteksi molekuler menarget gen *gyrB* dan *lacZ*. Pasangan primer spesifik yang berasal dari *conserved area* meliputi gen yang digunakan untuk *in silico* dan *in vitro* dalam studi PCR. Analisis ini menghasilkan pasangan primer baru yang spesifik untuk *E. coli*. Hasil penelitian menunjukkan adanya *E. coli* dalam sampel sebelum filtrasi dan tidak ditemukan *E. coli* pada sampel setelah filtrasi. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa jenis *E. coli* adalah *Enterohemorrhagic* (EHEC), *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli* (ExPEC), *Invasive E. coli* (AIEC), dan *Shiga Toxin Producing E. coli* (STEC).

Kata kunci: *E. coli*, sampel air sumur, gen *gyrB*, gen *lacZ*, *in silico* study, PCR

Molecular Detection of *Escherichia coli* from Well Water in Klitren

Raden Ajeng Mertha Prana Kusumaningrum
31110016

Faculty of Biotechnology
Duta Wacana Christian University

Abstract. Wells water in Klitren have been contaminated by *E. coli*. Ultra filtration membrane was used to reduce the amount of *E. coli* found in wells water. Samples of well water before and after filtration method were taken and tested to detect the presence of *E. coli*. Microbiological test to detect the presence of *E. coli* was done by using EE broth for enrichment and CCA medium. Dark blue colonies which are the characteristic of *E. coli* were found in the inlet samples, and not in the outlet. Biochemical tests were done to ensure the isolates obtained, including indole test, methyl red test, test for motility, lysine decarboxylase test, MacConkey sorbitol test, and lactose broth test. Biochemical test showed a total of 27 isolate positive for *E. coli*. After this biochemical test, it is followed by a test using new primer pairs for *E. coli* targetting *gyrB* producing fragments of 531 bp, and *lacZ* producing a 465 bp fragment, made with some software to determine the exact genetic position for detection of *E. coli*. Results of *in vitro* amplification and *in silico* by new primer pairs for *gyrB* and *lacZ* apparently showing specific results for the detection of *E. coli*. Analysis of inlet sample resulting in the indication of the presence of *E. coli* belonging to the sub group *Enterohemorrhagic* (EHEC), *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli* (ExPEC), *Invasive E. coli* (AIEC), and *Shiga Toxin Producing E. coli* (STEC), and no *E. coli* was found in the outlet samples.

Keywords : *E. coli*, well water, *gyrB* gene, *lacZ* gene, *in silico* study, PCR

Potensi Primer Baru untuk Deteksi Molekuler *Escherichia coli* dari Air Sumur di Wilayah Klitren

Raden Ajeng Mertha Prana Kusumaningrum
31110016

Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana

Abstrak. *Escherichia coli* dikenal sebagai bakteri indikator untuk keamanan air minum, kehadiran *Escherichia coli* sebagai tanda bahwa air tidak aman untuk diminum. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan *E. coli* di sumur daerah Klitren, Yogyakarta yang digunakan sebagai air minum. Sampel air sumur dikumpulkan, dan kemudian diolah pada membran ultra filtrasi. Sampel air sumur kemudian diinokulasi pada media selektif *E. coli*. Diperoleh 81 isolat biru gelap yang diduga *E. coli* dari media selektif. Kemudian tes biokimia dilakukan untuk memastikan koloni yang diduga sebagai *E. coli* termasuk uji motilitas, indol dan fermentasi sorbitol, metil merah, tes lisin dekarboksilase dan pertumbuhan pada laktosa broth. Hasil penelitian menunjukkan 27 koloni memberi hasil positif *E. coli*. Kemudian konfirmasi dilakukan dengan deteksi molekuler menarget gen *gyrB* dan *lacZ*. Pasangan primer spesifik yang berasal dari *conserved area* meliputi gen yang digunakan untuk *in silico* dan *in vitro* dalam studi PCR. Analisis ini menghasilkan pasangan primer baru yang spesifik untuk *E. coli*. Hasil penelitian menunjukkan adanya *E. coli* dalam sampel sebelum filtrasi dan tidak ditemukan *E. coli* pada sampel setelah filtrasi. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa jenis *E. coli* adalah *Enterohemorrhagic* (EHEC), *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli* (ExPEC), *Invasive E. coli* (AIEC), dan *Shiga Toxin Producing E. coli* (STEC).

Kata kunci: *E. coli*, sampel air sumur, gen *gyrB*, gen *lacZ*, *in silico study*, PCR

Molecular Detection of *Escherichia coli* from Well Water in Klitren

Raden Ajeng Mertha Prana Kusumaningrum
31110016

Faculty of Biotechnology
Duta Wacana Christian University

Abstract. Wells water in Klitren have been contaminated by *E. coli*. Ultra filtration membrane was used to reduce the amount of *E. coli* found in wells water. Samples of well water before and after filtration method were taken and tested to detect the presence of *E. coli*. Microbiological test to detect the presence of *E. coli* was done by using EE broth for enrichment and CCA medium. Dark blue colonies which are the characteristic of *E. coli* were found in the inlet samples, and not in the outlet. Biochemical tests were done to ensure the isolates obtained, including indole test, methyl red test, test for motility, lysine decarboxylase test, MacConkey sorbitol test, and lactose broth test. Biochemical test showed a total of 27 isolate positive for *E. coli*. After this biochemical test, it is followed by a test using new primer pairs for *E. coli* targetting *gyrB* producing fragments of 531 bp, and *lacZ* producing a 465 bp fragment, made with some software to determine the exact genetic position for detection of *E. coli*. Results of *in vitro* amplification and *in silico* by new primer pairs for *gyrB* and *lacZ* apparently showing specific results for the detection of *E. coli*. Analysis of inlet sample resulting in the indication of the presence of *E. coli* belonging to the sub group *Enterohemorrhagic* (EHEC), *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli* (ExPEC), *Invasive E. coli* (AIEC), and *Shiga Toxin Producing E. coli* (STEC), and no *E. coli* was found in the outlet samples.

Keywords : *E. coli*, well water, *gyrB* gene, *lacZ* gene, *in silico* study, PCR

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kawasan Klitren merupakan salah satu kawasan di Yogyakarta dengan pemukiman padat penduduk sehingga kebutuhan air bersih relatif tinggi. Hampir semua penduduk menggunakan air sumur untuk keperluan sehari-hari, seperti memasak, mencuci, dan minum. Jarak antara sumur dengan *septic tank* rata-rata cukup dekat dan terdapat juga air sumur yang dekat dengan sungai. Banyaknya aktivitas tersebut menjadi faktor utama kemunculan *E. coli* yang secara luas mengakibatkan sumber air terkontaminasi dan dapat menjadi patogen enterik (American Public Health Association, 1998). *E. coli* dikenal sebagai bakteri indikator untuk keamanan air minum. Berdasarkan standar kualitas air minum di Indonesia menurut Menteri Kesehatan Republik Indonesia, kandungan *E. coli* untuk air minum adalah 0/100 mL. Pengolahan air dengan menggunakan berbagai macam metode ternyata belum tentu terbebas dari *E. coli* yang menyebabkan penyakit seperti sakit perut dan diare.

Pada penelitian ini, dilakukan pembuatan atau desain penanda alternatif secara *in silico* untuk deteksi molekuler *E. coli* pada sampel air sumur pada proses pengolahan air. Desain ini dibuat untuk menghasilkan primer baru yang spesifik untuk mendeteksi *E. coli*. Desain primer ini dibuat dengan beberapa *software* yaitu *ClustalX*, *Mega6*, *GeneDoc*, *Clone Manager*, dan program BLASTN yang terdapat pada www.blast.ncbi.nlm.nih.gov. Desain primer ditentukan berdasarkan *conserved area* yang terdapat pada gen *gyrB* dan *lacZ*. Tahap awal untuk deteksi *E. coli* yaitu isolasi bakteri, uji biokimia, dan uji molekuler. Untuk isolasi bakteri dilakukan dengan media CCA untuk menemukan koloni biru gelap. Uji biokimia untuk *E. coli* dilakukan untuk melihat perbedaan jenis *E. coli* seperti *E. coli* Enterotoxigenic (ETEC), *E. coli* Enteropathogenic (EPEC), dan *E. coli* Enteroinvasive (EIEC).

B. Tujuan

Untuk mendeteksi *E. coli* dengan menggunakan desain primer *gyrB* 531 bp dan *lacZ* 465 bp.

C. Rumusan Masalah

Mengetahui hasil deteksi *E. coli* dengan menggunakan desain primer *gyrB* 531 bp dan *lacZ* 465 bp.

D. Manfaat

Untuk mengetahui potensi pada deteksi *E. coli* dengan menggunakan desain primer *gyrB* 531 bp dan *lacZ* 465 bp.

©UKDW

KESIMPULAN DAN SARAN

1. KESIMPULAN

Pasangan primer baru untuk deteksi *E. coli* berdasarkan gen *gyrB* dan *lacZ* berhasil dibuat melalui *in silico study*. Berdasarkan uji mikrobiologis dan biokimia serta molekuler, ditemukan tiga isolat *E. coli* pada sampel air sumur sebelum diolah. Jenis *E. coli* yang ditemukan dan diidentifikasi berdasarkan analisis filogenetik adalah *Enterohemorrhagic (EHEC)*, *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC)*, *Invasive E. coli (AIEC)*, dan *Shiga Toxin Producing E. coli (STEC)*.

2. SARAN

1. Masyarakat harus tetap waspada terhadap air sumur yang digunakan, karena terdapat bakteri jenis *Enterobacteriaceae* yang terdapat pada air sumur, walaupun sudah melalui filtrasi.
2. Masyarakat sebaiknya memasak air terlebih dahulu untuk dikonsumsi karena walaupun *E. coli* sudah tidak muncul di air sumur tetapi bakteri jenis *Enterobacteriaceae* yang lain masih hidup di air yang sudah menggunakan metode filtrasi.
3. Perlu dilakukan identifikasi atau sekuensing untuk dapat mengetahui jenis *E. coli* pada sampel tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Bartlett, J. M. S., & Stirling D. 2003. *A short history of the polymerase chain reaction*. Methods in Molecular Biology. 226, 3-6.

Bettelheim, K.A. 2003. The genus *Escherichia*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, electronic release 3.14, 3th ed.; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Eds.; Springer-Verlag: New York, NY, USA.

Bidet P, Mariani P, Grimont F, Brahim N, Courroux C, Grimont P, Bingen E. 2005. Characterization of *Escherichia coli* O157: H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. J. Med. Microbiol., vol 54, pp 71 - 75.

Bogdanova ES, Mirkin S, Shmerling ZG, 1982, Changed properties of the A subunit in DNA *gyrase* with a subunit B mutation, Mol Gen Genet, 186;572-574.

Catherine R.B, Catharine P, Patrick B, Danielle Daignault, Lucie D, Richard J. R, George G. Z, Ameer R. M. 2012. Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Humans, Canada. Emerging Infectious Diseases. 10(3201) Vol. 18, No. 3.

Douglas H, Brian W, Reuben E. 2012. *LacZ* β -galactosidase : Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. Protein Sci. 21(12): 1792-1807.

Entis P. 1989. Hydrophobic grid membrane filter MUG method for total coliform and *Escherichia coli* enumeration in foods: collaborative study. J Assoc of Anal Chem. 72:936-50.

Escobar P, Giudicelli C, Parsot C, Denamur E. 2003. The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. J. Mol. Evol., vol 57, 140-148.

Eslava C, Navarro-Garcia F, Czczulin J, Henderson I, Cravioto A, Nataro J. 1998, Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun., vol 66, pp 5302-5306.

Fujisawa T, Sata S, Aikawa K, Takahashi T, Yamai S, Shimada T. 2002. Evaluation of sorbitol-salicin MacConkey medium containing cefixime and tellurite (CT-SSMAC medium) for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from raw vegetables. Int. J. Food Microbiology., vol 74, pp 161 - 163.

Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R. 2002. Phylogenetic Analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* Strains on the Basis of the *gyrB* Gene Sequence. p. 2779-2785

Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. 2005. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. Basic Microbiol.45:403-4.

Foyosal J, Rahman M, Rabbee F, Hossain N, Mahmud R, Rahman J, Miah F, Islam K. 2013. Identification and Assay of Putative Virulence Properties of *Escherichia coli* gyrase Subunit A and B among Hospitalized UTI Patients in Bangladesh. Vol 1, 54-59.

Geldreich EE, Le-Chavellier MW. 1999. Microbiological quality control in distribution systems. In: Letterman RD, ed. Water supplies. 5th ed. New York:McGraw-Hill. pp 1-49.

Gibbs R. 1990. *DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction*. Analytical Chemistry. 62:1202-1214.

George M, Garrity R. 2005. The gammaproteobacteria. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd edition. New York: Williams; p. 1108.

Hemraj V, Diksha S, Avneet G. 2013. A Review on Commonly used Biochemical Test for Bacteria. Vol 1

Hendricks CW. 1978. Exceptions to the coliform and the fecal coliform tests. In: Berg G, ed. Indicators of viruses in water and food. Ann Arbor: Ann Arbor Scipp. 99-145.

Higgins J, Hohn C, Hornor S, Frana M, Denver M, Rolf J. 2007. Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. pp 227 – 235.

Hudault S, Guignot J, Servin AL. 2001. *Escherichia coli* strains colonizing the gastrointestinal tract protect germ-free mice against *Salmonella typhimurium* infection. 49:47-55.

Ingledeew WJ, Poole RK. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. Microbiol Rev ;48:222-71.

Irwanto M. I. 2015. Karakterisasi Biokimiawi dan Molekuler Isolat *Staphylococcus aureus* dari Produk Susu Segar. Skripsi.

Joshi M, Deshpande J. 2011. Polymerase Chain Reaction : Method, Principles and Application. International Journal of Biomedical Research.

Kaper J, Nataro J, Mobley H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Microbiol vol 2,pp. 123 - 140.

Kalnins A, Ruther O, Muller-Hill B. 1983. Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 2: 593–597.

Kuhnert P, Boerlin P, Frey J. 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol. Rev*,vol 24, pp. 107 - 117.

Lan R, Chehani M, Donohoe K, Martinez M, Reeves P. 2004. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun.* vol 72, pp.5080 – 5088

Leclercq A, Wanegue C, Baylac P. 2002. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods, *Appl Environ Microbiol* 68:1631-8.

Madigan MT, Martinko JM. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. San Francisco: Pearson Education Inc. p 13.

Marcia K. 1997. Occurrence, Distribution, and Associations of O and H Serogroups, Colonization Factor Antigens, and Toxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews.* p. 569–584

Meng J, Doyle M, Zhao T, Zhao S. 2001. *Escherichia coli* 0157:H7. In: Doyle MP, Beauchat LR, Montville TJ, eds. Food microbiology: fundamentals and frontiers, 2nd ed. Washington DC: ASM Press. pp 193-213.

Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2010. Persyaratan Kualitas Air Minum.

Min J, Baeumner D. 2001. Highly sensitive and specific detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. 303:186-93.

Molina F, Acendo E, Tabla R, Roa I, Gomez A, Rebollo J. 2015. Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnology.* 15:48

Nagy B, Fekete PZ. 2005 Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* Vol 295, pp.443 - 454.

Nakao H, Takeda T. 2000. *Escherichia coli* shiga toxin. *J. Nat. Toxins.* vol 9, pp. 299 - 313.

Nataro J. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol 21, pp. 4 - 8.

Nitiss JL. 2009. DNA Topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions, *Nature.* 16;1-6.

Nollmann M, Stone MD, Bryant Z, Gore J, Crisona J, Hong S, Mittelheiser S, Maxwell A, Bustamante C, Cozzarelli NR. 2007. Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nature Struct Mol Biol.* 14;264-271.

Ochman H, Gerber A, Hartl D. 1988. *Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction* *Genetics.* 120: 621–623.

Odonkor T, Ampofo K. 2013. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. volume 4:e2

Paton J, Paton A. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*;11:450-79.

Peter F. 1995. *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 1, No. 2

Podschun R, Ullmann U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clinical Microbiol Rev*, 11;589-603.

Prasannan M, Jesudason M, Kang G, Sridharan G. 2001. A study of some phenotypic virulence markers of entero-pathogenic *E. coli*. *Indian J. Med. Res.*, vol 114, pp 95 – 98.

Rendón MA, Saldaña Z, Erdem AL. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:10637-42.

Scheutz F, Strockbine N. 2005. Genus *Escherichia coli*. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. 2nd ed.; Nrener, Krieg D, Staley N, Eds J.; Springer: New York, NY, USA. Volume 2, Part B, pp. 607-623.

Thenmozhi M. 2010. Isolation of Potentially Pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 from the Water Sources. ISSN 0975-6299

Turner S, Scott T, Cooper L, Henderson I. 2006. Weapons of mass destruction: Virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* , Vol 263, pp. 10 - 20.

Todar K. 1996. Pathogenic *E. coli*. Wenten, I., *Membrane Technology for Industry and Environmental Protection*, UNESCO, Center for Membrane Science and Technology, Institut Teknologi Bandung.

Tonyia E.P, Christopher A, Joanna T, Alexander S, Christopher B. T, Eric J, Martha I, Alfredo G. T. 2007. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*. 10(1016) 1438-4221.

Vanessa B, Marcelo P, Carla R.T, Maurilio F, Marcia R.F, Marina M, Suzana R.F, Mauricio L.B, Luiz R.T. 2007. Detection of diarrheanic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 102 (7): 839-844.

Vogt RL, Dippold L. 2005. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef. *Public Health Rep*;120:174-8.