

DETEKSI GEN PENGENDALI SINTESIS ANTIGEN PERLEKATAN K88, K99 DAN ENTEROTOKSIN PADA *ESCHERICHIA COLI* YANG DIISOLASI DARI ANAK BABI DAN ANAK SAPI PENDERITA DIARE DI INDONESIA

SUPAR

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 52, Bogor 16114, Indonesia

Diterima dewan redaksi 11 Juli 1996

ABSTRACT

SUPAR. 1996. The detection of K88, K99 fimbrial antigen and enterotoxin genes of *Escherichia coli* isolated from piglets and calves with diarrhoea in Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (1).

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains cause diarrhoeal disease in piglets and calves in Indonesia. These strains possess two virulence factors namely attachment and enterotoxin antigens. These factors could be detected phenotypically and genetically. Haemolytic *Escherichia coli* (*E. coli*) isolates possessing K88 fimbrial antigen associated with O-group 108 and 149. They were positive for K88 gene and demonstrated their ability to produce heat labile enterotoxin (LT) and genetically were all positive for LT gene. Seventeen isolates of *E. coli* K88 which associated with O-group 149 were positive for STb gene, other O-serotypes were negative. Ten isolates of *E. coli* K88 which associated with O-group 108 possessed K88, K99, LT and STa genes, but negative for STb gene. However, phenotypically the K99 antigen and STa toxin were not expressed under laboratory conditions, the reason was not well understood. *E. coli* K99 strains isolated from calves with diarrhoea were all associated with O-group 9 and produced STa toxin when tested by suckling mouse bioassay. The *E. coli* K99 calf isolates were all hybridized with K99 and STa gene only. It is likely that K99 gene is associated with STa gene. The DNA hybridization technique is more convenience to be used for confirmation diagnosis of colibacillosis, however, not all veterinary laboratories could perform these tests.

Keywords: *Escherichia coli*, probe, gene detection, virulence determinant

ABSTRAK

SUPAR. 1996. Deteksi gen pengendali sintesis antigen perlekatan K88, K99 dan enterotoksin pada *Escherichia coli* yang diisolasi dari anak babi dan anak sapi penderita diare di Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (1).

Escherichia coli enterotoksigenik (ETEC) merupakan agen penyebab diare pada anak babi dan anak sapi. Bakteri tersebut mempunyai 2 faktor virulensi yaitu: antigen perlekatan dan enterotoksin. Kedua faktor tersebut dapat dideteksi secara fenotipik dan genetik. Isolat *E. coli* yang bersifat hemolitik dan mempunyai antigen perlekatan K88 tergolong dalam serogrup-O₁₀₈ dan -O₁₄₉. Semua mempunyai gen pengendali sintesis antigen perlekatan K88 dan gen enterotoksin yang tidak tahan panas (*heat-labile toxin* = LT) mampu memproduksi toksin *in vitro* di bawah kondisi laboratorium. Sebanyak 17 isolat *E. coli* K88 yang tergolong dalam serogrup-O₁₄₉ mempunyai gen enterotoksin tahan panas (*heat-stable toxin* = STb) tetapi tidak mempunyai gen sintesis toksin STa. Sepuluh isolat *E. coli* K88 yang tergolong dalam serogrup-O₁₀₈ mempunyai gen K99, STa dan LT, tetapi tidak mempunyai gen STb. Namun demikian secara fenotipik bakteri ini tidak mampu memproduksi STa secara *in vitro* di bawah kondisi laboratorium. Faktor yang menyebabkan tidak terjadi ekspresi tersebut, tidak diketahui. Semua isolat *E. coli* K99 dari anak sapi diare tergolong dalam serogrup-O₉, dan mampu memproduksi toksin tahan panas STa yang dapat dideteksi secara *in vivo* dengan *suckling mouse bioassay*. Semua isolat tersebut menunjukkan adanya hibridisasi dengan gen *probe* K99 dan STa. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa *E. coli* K99 atau gen K99 hanya berasosiasi dengan gen toksin tahan panas (STa). Teknik hibridisasi gen *probe* lebih cocok dan lebih cepat dipakai untuk konfirmasi diagnosis kolibasilosis, akan tetapi tidak semua laboratorium veteriner dapat mengerjakannya.

Kata kunci: *Escherichia coli*, *probe*, deteksi gen, determinan virulensi

PENDAHULUAN

Escherichia coli enterotoksigenik (ETEC) merupakan bakteri patogenik penyebab diare pada anak babi dan anak sapi neonatal. Patogenik tersebut mengkolonisasi permukaan usus halus dengan perantaraan antigen

perlekatan atau antigen pili K88, K99, 987P atau F41, memproduksi enterotoksin tahan panas (*heat-stable toxin* = ST) dan enterotoksin yang tidak tahan panas (*heat-labile toxin* = LT) (GAASTRA dan DE GRAAF, 1982). Toksin tahan panas (ST) dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu STa dan STb, masing-masing

dapat menstimulasi sekresi cairan tubuh pada permukaan usus halus. STa hanya aktif pada anak babi dan anak sapi neonatal (GIANELLA dan DRAKE, 1979), sedangkan STb hanya aktif pada anak babi sapihan dan menyebabkan diare pascasapih (DOVE *et al.*, 1979, KENNEDY *et al.*, 1984). Meskipun sejumlah besar galur *E. coli* dapat diisolasi dari anak babi dan anak sapi diare, akan tetapi hanya sedikit galur yang mempunyai salah satu atau kedua faktor virulensi. Pada awal penelitian diketahui bahwa hanya *E. coli* serogrup O₈ K₈₇, O₁₄₇ K₈₉, O₁₄₉ K₉₁ dan O₁₅₇ yang dapat memproduksi antigen pili K₈₈ dan galur ini menyebabkan diare pada anak babi neonatal (SOJKA, 1971). Selanjutnya pada tahun-tahun berikutnya dilaporkan bahwa antigen pili K₉₉, 987P dan F41 ditemukan pada *E. coli* dari anak babi penderita diare, galur tersebut tergolong dalam serogrup O₉, O₆₄, O₁₀₁ (GUINEE *et al.*, 1977; MOON *et al.*, 1980; WILSON dan FRANCIS, 1986; FAIRBROTHER *et al.*, 1988).

Upaya deteksi isolat *E. coli* patogen dari anak sapi dan anak babi penderita diare di Indonesia telah dilakukan dengan dikembangkannya metode deteksi antigen perlekatan secara fenotipik dilakukan secara *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan koaglutinasi (SUPAR, 1986). *E. coli* yang mempunyai antigen K₈₈, K₉₉, F41 atau 987P banyak diisolasi dari anak babi penderita diare di Indonesia (SUPAR 1986, SUPAR *et al.*, 1988, 1989, 1991). Galur tersebut tergolong dalam serogrup-O-9, 20, 64, 108, 138, 149, 157, sedangkan dari anak sapi diare hanya dapat diisolasi *E. coli* K₉₉ yang tergolong dalam serogroup O₉. Selanjutnya vaksin *E. coli* multivalen yang mengandung semua jenis antigen pili dan semua jenis antigen somatik dipakai untuk pengendalian kolibasilosis pada anak babi di lapangan (SUPAR dan HIRST, 1990).

ETEC serotipe dari kasus diare pada anak babi di Indonesia lebih kompleks dibandingkan dengan yang pernah dilaporkan di luar negeri (SOJKA, 1971; GUINEE *et al.*, 1977; MOON *et al.*, 1980; LINKS *et al.*, 1985; WILSON dan FRANCIS, 1986; FAIRBROTHER *et al.*, 1988, SUPAR *et al.*, 1988, 1989, 1991). Namun demikian penelitian mengenai aspek genetik yang berhubungan dengan antigen virulensi terhadap isolat ETEC belum dilakukan. Dalam makalah ini dikemukakan hasil penelitian deteksi gen pengendali sintesis antigen perlekatan K₈₈ dan K₉₉ dan enterotoksin pada isolat ETEC dari anak babi dan anak sapi penderita diare.

MATERI DAN METODE

Isolat bakteri

Sebanyak 36 isolat *E. coli* bersifat positif K₈₈ dan 6 bersifat negatif K₈₈ diisolasi dari anak babi umur 4-10 hari dan menderita diare profus dari Daerah Khusus Ibukota Jakarta serta 12 isolat *E. coli* K₉₉ dari anak sapi perah penderita diare profus di daerah Sukabumi dan Bandung (SUPAR, 1986).

Uji fenotipik kemampuan memproduksi enterotoksin

Semua isolat diuji sifat enterotoksigenisitasnya secara konvensional, yaitu deteksi enterotoksin yang tidak tahan panas dilakukan dengan metode GM1 ELISA dan uji jaringan sel adrenal Y1 (SUPAR, 1987a), sedangkan uji kemampuan produksi toksin STa dilakukan secara *suckling mouse bioassay* (SUPAR, 1987a).

DNA pelacak (*probe*)

DNA pelacak gen antigen pili K₈₈, K₉₉ dan enterotoksin LT, STa dan STb disediakan oleh MONCKTON dan HASSE dari Regional Veterinary Laboratory, Bendigo, Australia (1987). DNA *probe* yang mempunyai gen pengendali sintesis antigen K₈₈ dan K₉₉ dibuat dari plasmid rekombinan pFM205 dan pRI9906-1; DNA *probe* pengendali sintesis enterotoksin LT, STa, dan STb dibuat berturut-turut dari plasmid pWD299, pRIT10036 dan pCHL6, sedangkan teknik untuk membuat DNA *probe* mengikuti prosedur MONCKTON dan HASSE (1988), secara ringkas sebagai berikut: Plasmid DNA diisolasi dari *E. coli* kompeten yang ditumbuhkan pada medium cair Luria-Bertani (LB) sesuai metode MANIATIS *et al.* (1982). Plasmid yang mengandung gen K₈₈ direaksikan dengan enzim restriksi endonuklease EcoRI, dan untuk plasmid yang membawa gen K₉₉ dipotong dengan enzim restriksi endonuklease Bgl II dan SmaI, plasmid yang mengandung gen enterotoksin LT (pWD299) dipotong dengan enzim restriksi HindIII, plasmid yang membawa gen toksin STa (pRIT10036) dipotong dengan enzim restriksi HinfI dan fragmen yang berukuran 157 pasang-basa diisolasi. *Probe* untuk gen pengendali STb dibuat dengan memotong plasmid PCHL6 dengan enzim HindIII menghasilkan 2 fragmen,

yakni fragmen dengan ukuran 1 kilo pasang-basa dipotong dengan enzim restriksi *HinfI* dan fragmen yang berukuran 510 pasang-basa diisolasi. Isolasi plasmid yang berukuran agak besar dengan gel agarose 0,8 atau 1,2%, sedangkan fragmen yang kecil diisolasi dari gel poliakrilamid 10% (MANIATIS *et al.*, 1982). Fragmen DNA untuk *probe* yang dilabel dengan radioisotop ^{32}P secara *nick translation* atau dengan oligo label seperti yang dideskripsi oleh FEINBERG dan VOGELSTEIN (1983) dengan ^{32}P -dCTP. DNA fragmen yang tidak terlabel dengan ^{32}P dipisahkan dari yang terlabel menggunakan gel filtrasi Sephadex G75 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden).

Penyiapan koloni untuk hibridisasi

Tiap isolat bakteri ditumbuhkan pada media cair Luria-Bertani (LB), diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam, kemudian disubkultur pada medium agar LB dan diinkubasikan seperti sebelumnya. Selanjutnya dipilih satu koloni terpisah dari setiap isolat yang akan diuji dan ditumbuhkan pada permukaan medium agar LB pada suatu titik. Letak titik inokulasi dari masing-masing isolat diatur sedemikian rupa sehingga tidak bersinggungan. Setelah inkubasi pada suhu 37°C selama satu malam, kertas saring Whatman no 541 yang telah dipotong selebar ukuran cawan Petri diletakkan di atas koloni yang tumbuh pada permukaan medium agar LB dan dидiamkan selama 2 jam. Setelah itu kertas diangkat dan diletakkan pada kertas saring Whatman sedemikian rupa sehingga posisi permukaan yang ada koloni bakteri berada di atas. Dibuat lima kali ulangan untuk lima macam hibridisasi.

Setelah itu kertas yang ada koloninya diletakkan dalam cawan Petri plastik dan diproses berturut-turut sebagai berikut: 1) dijenuhi dengan larutan 10% *sodium dodecyl-sulfate* (SDS) selama 3 menit, 2) diberi larutan 0,5 M NaOH selama 15 menit, 3) larutan 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 0,5 M Tris- HCl- 1,5 M NaCl 2x masing-masing selama 15 menit. Kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan selanjutnya di dalam oven vakum pada suhu 80°C selama 2 jam. Sampai pada tahap ini dapat langsung dilakukan hibridisasi atau disimpan selama beberapa hari.

Hibridisasi DNA

Seperti halnya pada pembuatan DNA *probe*, hibridisasi DNA dilakukan di Regional Veterinary Labora-

tory, Bendigo, Victoria, Australia. Setelah kertas Whatman yang terdapat DNA sampel *E. coli* selesai dipanaskan, kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik (lima kantong). Tahap-tahap hibridisasi mengikuti prosedur MONCKTON dan HASSE (1988) dan MAINIL *et al.* (1986), secara ringkas sebagai berikut: Ke dalam tiap kantong plastik dimasukkan larutan penyangga (*buffer*) hibridisasi yang terdiri 3XSSC (1X SSC ialah 0,15 M NaCl + 0,015 *sodium citrate*), 10 X larutan Denhardt [1 X larutan Denhardt ialah 0,02 % Ficoll (berat molekul 400.000 buatan Pharmacia Fine Chemical Piscataway, N.J.) + 0,02% *bovine serum albumin*], 1% larutan DNA dari sperma *salmon heat-denatured* dan 0,01% SDS, diinkubasikan selama 4 jam pada suhu 65°C. Setelah itu dipindahkan ke dalam larutan penyangga (*buffer*) baru yang mengandung 10^6 DNA *probe* yang mengandung radioisotop ^{32}P yang telah disiapkan di atas, kemudian ditutup rapat. Reaksi hibridisasi dilakukan pada suhu 42°C selama satu malam sambil digoyang pada alat *Rotary agglutinator* (Analite Pty. Ltd. Australia). Setelah hibridisasi selesai kemudian dilakukan pencucian. Untuk *probe* K88 dicuci dua kali dengan larutan 2X SSC+ 0,1% SDS masing-masing selama 10 menit, kemudian dengan larutan 0,2XSSC + 0,1% SDS selama satu jam pada suhu 65°C. Untuk K99, dua kali pencucian seperti pada K88 diikuti pencucian yang ke-3 satu kali pencucian dengan 1XSSC + 0,1% SDS selama 1 jam pada suhu 65°C. Untuk *probe* LT, STa dan STb semua pencucian dilakukan dengan larutan 5XSSC+ 0,1% SDS, selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar. Kertas saring yang sudah kering diperiksa atau dieksposekan kepada film *X-ray* (Kodak) secara otoradiografi selama satu malam pada suhu -70°C. Film diproses dan diamati adanya noda hitam pada film pada masing-masing lokasi inokulasi. Noda hitam pada film tersebut menunjukkan adanya reaksi hibridisasi antara gen *probe* terlabel ^{32}P pada DNA bakteri *E. coli* spesimen yang diperiksa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Escherichia coli hemolitik yang diisolasi dari anak babi penderita diare mempunyai antigen perlekatan atau pili K88. Sifat tersebut dapat dideteksi secara fenotipik dengan uji koaglutinasi dengan antiserum monospesifik K88 dan secara ELISA (SUPAR, 1986), dan hasil uji DNA hibridisasi dengan *probe* K88 menunjukkan bahwa isolat tersebut mempunyai gen K88 (Tabel 1), sedangkan isolat yang *E. coli* tidak mengaglutinasikan

reagen koaglutinasi K88, dalam uji DNA hibridisasi dengan *probe* K88 juga bersifat negatif. Kedua teknik tersebut dapat dipakai untuk konfirmasi diagnosis kolibasilosis pada anak babi yang disebabkan oleh *E. coli* K88. Semua isolat *E. coli* K88 tersebut memproduksi

enterotoksin yang tidak tahan panas (LT) baik dengan uji secara GM1 ELISA maupun dengan DNA hibridisasi. Namun demikian, pada isolat *E. coli* yang bersifat negatif LT, uji DNA hibridisasi dengan *probe* LT memberikan reaksi positif (Tabel 1).

Tabel 1. Deteksi antigen pili K88, K99 dan enterotoksin secara konvensional dan DNA hibridisasi pada *E. coli* isolat anak babi penderita diare di Daerah Khusus Ibukota Jakarta

Sumber isolat		Deteksi secara konvensional antigen pili dan enterotoksin				Deteksi DNA plasmid secara hibridisasi dengan <i>probe</i>				
Peternak/ No isolat	<i>E. coli</i> O-sero- tipe	ELISA		ELISA SMB		Gen pili		Gen enterotoksin		
		K88	K99	LT	STa	K88	K99	LT	STa	STb
Anak babi diare										
AS Jakarta										
23a	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
23b	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
31b	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
31c	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
32a	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
32b	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
33a	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
33d	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
36a	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
48c	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
48d	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
53a	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
44a	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
44b	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
51d	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
51e	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
53c	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
53d	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Anak babi diare										
BT Jakarta										
9b	45	+	-	+	-	+	-	+	+	-
9c	149	+	-	+	-	+	-	+	+	-
15a	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
15b	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Anak babi										
SH Jakarta										
68c	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
68b	108	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Anak babi diare										
TTS Jakarta										
7a	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
7b	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
10a	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
10c	149	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Anak babi tidak diare										
GP Jakarta										
5a	101	-	-	-	-	-	-	+	-	-
6a	8	-	-	-	-	-	-	+	-	-
13d	101	-	-	-	-	-	-	+	-	-
15f	20	-	-	-	-	-	-	+	-	-
37a	8	-	-	-	-	-	-	+	-	-
41c	9	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Keterangan:
+ : terdeteksi
- : tidak terdeteksi

E. coli K88 yang tergolong dalam serogrup-O₁₀₈, bersifat hemolitik secara fenotipik bersifat negatif K99, akan tetapi dalam uji DNA hibridisasi dengan *probe* K99 memberikan reaksi positif. Di samping mempunyai gen K88, dan K99, isolat yang tergolong dalam serogrup-O₁₀₈ ini juga memiliki gen enterotoksin LT dan STa. Namun demikian, secara fenotipik dalam uji *suckling mouse bioassay* bersifat negatif STa. Apakah ada faktor yang mempengaruhi ekspresi fenotipik sampai saat ini belum dilakukan penelitian. Pada tahun-tahun berikutnya (1988) diketahui bahwa *E. coli* dari anak babi penderita diare secara fenotipik memproduksi antigen pili K88 dan K99 (SUPAR *et al.*, 1989). Sampai saat ini belum ada publikasi dari luar negeri tentang satu sel ETEC yang mempunyai dua macam antigen K88 dan K99 baik secara fenotipik maupun genetik. ETEC K88 dari anak babi diare yang tergolong dalam O-serogrup 108 ini tidak mempunyai gen STb, sementara uji ekspresi toksin STb secara *in vivo* pada anak babi sapihan, tidak dilakukan. Dari penelitian pendahuluan ini diketahui bahwa sifat fenotipik dan genetik isolat ETEC dari anak babi di Indonesia bila dihubungkan dengan hasil-hasil penelitian variasi serotipe (SUPAR *et al.*, 1989, 1991) dan aspek antibiogram (SUPAR *et al.*, 1990) merupakan masalah yang sangat kompleks.

Semua isolat *E. coli* K99 dari anak sapi secara fenotipik dan genetik bersifat STa positif. Di samping itu, isolat ETEC anak sapi hanya memproduksi satu macam toksin (Tabel 2). Hasil deteksi antigen pili K99 dan enterotoksin secara DNA hibridisasi sama dengan hasil deteksi menggunakan metode konvensional. Variasi genetik yang mengendalikan faktor virulensi ETEC pada anak sapi tidak seperti pada ETEC isolat anak babi. Isolat ETEC penyebab kolibasilosis neonatal pada anak sapi mempunyai faktor virulensi antigen K99 dan enterotoksin STa. Temuan ini serupa dengan yang pernah dilaporkan di luar negeri (MAINIL *et al.*, 1986), yaitu STa dari ETEC sapi sama dengan STa pada ETEC isolat anak babi. Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa konfirmasi diagnosis kolibasilosis yang disebabkan oleh ETEC dapat dilakukan secara fenotipik dengan identifikasi antigen perlekatan dan enterotoksin atau secara genetik dengan identifikasi gen pengendali sintesis antigen tersebut. *E. coli* serogrup-O₁₀₈ mempunyai gen pengendali sintesis antigen perlekatan K99 dan enterotoksin STa. Dengan demikian, metode hibridisasi DNA *probe* lebih sensitif dan lebih akurat dibandingkan dengan metode konvensional reaksi koaglutinasi dan ELISA.

Tabel 2. Deteksi antigen pili K88, K99 dan enterotoksin secara konvensional dan DNA hibridisasi pada *E. coli* isolat anak sapi penderita diare di daerah Sukabumi dan Bandung

Sumber isolat		Deteksi secara fenotipik Antigen pili enterotoksin				Deteksi DNA plasmid secara hibridisasi dengan <i>probe</i>				
Pernak/ No isolat	<i>E. coli</i> O-sero- tipe	ELISA		ELISA SMB		Gen pili		Gen enterotoksin		
		K88	K99	LT	ST	K88	K99	LT	STa	STb
Anak sapi penderita diare TDF Sukabumi										
TDF888	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
TDF2908	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
TDF2909	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
TDF2910	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
TDF4136	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
TDF4142	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Anak sapi penderita diare BRJ Bandung										
BRJ2018	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
BRJ2049	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
BRJ2055	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
BRJ2326	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
BRJ2631a	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
BRJ2631b	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-

Keterangan:

+: terdeteksi

-: tidak terdeteksi

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Dr R. T. Jone (Direktur Regional Veterinary Laboratory, Bendigo, Australia), Dr. R. P. Monckton (Staf peneliti pada unit biologi molekuler), Dr A. Fahy dan Dr I. D. Conoughton (Staf peneliti pada unit Patologi dan Bakteriologi dalam pengembangan vaksin Colibacillosis) atas segala izin, nasehat serta bimbingan selama menjalankan latihan kerja tentang berbagai aspek vaksin kolibacillosis dan biologi molekuler November-Desember 1987, sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- DOVE, C.R., G. ZIMM, T.L. VEUM, M.D. ELLERSHICK, D. C. PARKER and A. A. WHITE. 1979. Effect of jejunal loop location on the activity of *Escherichia coli* heat-stable toxin in 4-5 week old pigs. *Am. J. Vet. Res.* 48: 558-561.
- FAIRBROTHER, J. M., S. LARIVIERE, and D W. JOHNSON. 1988. Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in non-classical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1325-1328.
- FEINBERG, A.P. and B. VOLGELSTEIN. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- GAASTRA, W. and DE GRAAF. 1982. Host specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46: 129-161.
- GIANELLA, R. A. and K. N. DRAKE. 1979. The effect of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. *Infect. Immun.* 24: 19-23
- GUINEE, P. A.M., C.M. AGTERBERG, W. H. JANSEN, and J. F. FRIK. 1977. Serological identification of pig enterotoxigenic *Escherichia coli* strains not belonging to the classical serotypes. *Infect. Immun.* 15: 549-555
- KENNEDY, D. J., R. N. GREENBERG and R.A. J. DUNN. 1984. The effect of *Escherichia coli* heat-stable STb on intestinal mice, rats and piglets. *Infect. Immun.* 46: 639-643.
- LINKS, I., R. LOVE and P. GREENWOOD. 1985. Colibacillosis in newborn piglets associated with class-2 enterotoxigenic *Escherichia coli*. Dalam Tzipori S. ed. Proceedings of An International Seminar on Diarrhoeal Diseases in South East Asia and the Western Pacific Region, Geelong, Australia. 281-287.
- MAINIL, J.G., S. L. MOSELY, and H. W. MOON. 1986. Hybridization of bovine *Escherichia coli* isolates with gene probes for four enterotoxins (STap, STaH, STb, LT) and one adhesin factor (K99). *Am. J. Vet. Res.* 47: 1145-1148.
- MANIATIS, T., E. F., FRITSCH, and J. SAMBROOK. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
- MONCKTON, R. P. and D. HASSE. 1988. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets in Victoria by DNA hybridisation using K88, K99, LT, ST1 and ST2 probes. *Vet. Microbiol.* 16: 273-281.
- MOON, H. W., E. M. KOHLER, R. A. SCHNEIDER, and S.C. WHIPP. 1980. Prevalence of pilus antigen and enterotoxin types and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.* 27: 222-230
- SOJKA, W. J. 1971. Enteric disease in new born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. *Vet. Bull.* 41: 509-522.
- SUPAR. 1986. Penggunaan metode enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) untuk deteksi antigen pili K99 dan K88 pada *Escherichia coli* dari anak sapi dan anak babi diare. *Penyakit Hewan* 17 (32): 159-168.
- SUPAR. 1987a. Diagnosis kolibacillosis pada anak sapi: Penggunaan anak mencit untuk identifikasi enterotoksin tahan panas. *Penyakit Hewan* 19 (34): 54-57.
- SUPAR. 1987b. Studi perbandingan uji ELISA dan biakan jaringan sel adrenal Y₁ pada enterotoksin yang tidak tahan panas pada kuman *Escherichia coli* K88 berasal dari anak babi penderita diare. *Penyakit Hewan* 19 (34): 58-64.
- SUPAR, and R. G. HIRST. 1990. Development of a whole cell vaccines from *Escherichia coli* bearing K88, K99, F41 and 987P antigens: Vaccine field trials to control piglet neonatal colibacillosis. *Penyakit Hewan* 22 (40): 69-75.
- SUPAR, R. G. HIRST, and B. E. PATTEN. 1988. K-adhesins, O-serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves and piglets with diarrhoea in Indonesia. Proceedings of the Sixth Congress of Asian Veterinary Association, Denpasar, Bali, Indonesia. 479-485.
- SUPAR, R. G. HIRST, and B. E. PATTEN. 1989. The detection of enterotoxic *Escherichia coli* with F41 fimbrial antigen from pigs in Indonesia. *Penyakit Hewan* 21 (37): 13-17.
- SUPAR, R. G. HIRST, and B. E. PATTEN. 1990. Antimicrobial drug resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99, F41 and 987P isolated from piglets in Indonesia. *Penyakit Hewan* 22 (39): 13-19.
- SUPAR, R. G. HIRST, and B. E. PATTEN. 1991. The importance of enterotoxigenic *Escherichia coli* containing the 987P antigen in causing neonatal colibacillosis in Indonesia. *Vet. Microbiol.* 26: 393-400.
- WILSON, R. A. and D. H. FRANCIS. 1986. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.* 47: 213-217