

ANALISIS MOLEKULER *Escherichia coli* serotype O157:H7 PADA AIR MINUM DALAM KEMASAN DAN ISI ULANG MENGGUNAKAN TEKNIK *Polymerase Chain Reaction* (PCR) DENGAN *rfbE* SEBAGAI GEN TARGET

Febby Ester Fany Kandou¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Sam Ratulangi, Manado

Diterima 15-04-2009; Diterima setelah direvisi 21-04-2009; Disetujui 25-04-2009

ABSTRACT

Kandou, F. E. F., 2009. A Molecular Analysis on *Escherichia coli* serotype O157:H7 in Packaged and Refilled Drinking Water use *Polymerase Chain Reaction* Technique with gene target *rfbE*.

This research aims to analyze the existence of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in packaged and refilled drinking water using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique with gene target *rfbE*. The research was carried out at Molecular Biology and Immunology Laboratory of Medical Faculty, Hasanuddin University Makassar. The method used was *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique i.e. Isolation/Extraction DNA bacteria of *Escherichia coli* serotype O157:H7 with Boom method, Amplification DNA fragments of bacteria and Electrophoresis for visualization DNA fragments. The results show that based on DNA band that resulted, there are 8,33% of packaged drinking water samples and 25% of refilled drinking water samples are contaminated by *Escherichia coli* serotype O157:H7.

Keywords : *Escherichia coli*, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), refilled drinking water

PENDAHULUAN

Escherichia coli serotype O157:H7 merupakan satu dari ratusan strain bakteri *Escherichia coli* yang berbahaya, menghasilkan toksin yang sangat kuat dan dapat menyebabkan beragam penyakit pada manusia diantaranya *Hemorrhagic colitis* yaitu peradangan pada usus besar yang mengakibatkan pendarahan (*bloody diarrhea*) dan penyakit *Hemolytic Uremic Syndrome* (*HUS*) yang mengakibatkan gagal ginjal dan anemia (Clark, 2007; Anonim, 2006). *E. coli* serotype O157:H7 pertama kali dikenal sebagai bakteri patogen akibat hasil dari penyebaran yang luar biasa dari penyakit gastrointestinal pada tahun 1982 dimana penyebarannya ditemukan pada hamburger yang terkontaminasi (Wikipedia, 2007). Sejak tahun 1982, penyebaran dari infeksi *E.coli* serotype O157:H7 telah dikumpulkan dari bermacam-macam makanan yaitu sari buah apel, susu murni, kecambah tanaman alfalfa dan daging sapi giling serta produknya (Griffin and Tauxe, 1991). Penyebaran dapat juga berasal dari air minum atau air kolam renang yang terkontaminasi dengan *E. coli* serotype O157:H7. Pada tahun 2000, terjadi kontaminasi oleh *E. coli* serotype O157:H7 pada air yang disuplai oleh pemerintah Walkerton,

Canada, dalam penyebarannya terjadi lebih dari 2000 kasus dengan 6 kematian (Zhao *et al.*, 2001).

Air yang layak diminum harus memenuhi tiga persyaratan kelayakan yaitu dari segi fisik, kimia dan mikrobiologis. Syarat air minum adalah harus aman diminum artinya bebas mikroba patogen dan zat berbahaya dan diterima dari segi warna, rasa, bau dan kekeruhannya (Soemirat, 2004). Masalah yang timbul sekarang adalah masalah kualitas air minum yang tampaknya menimbulkan keresahan di kalangan masyarakat. Hasil penelitian air minum isi ulang di daerah Jabotabek 2003 - 2004 oleh Pusat Penelitian Pemberantasan Penyakit, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI, Jakarta menyebutkan bahwa secara mikrobiologis air minum isi ulang di daerah Jabotabek tidak memenuhi syarat kesehatan yaitu ditemukan bakteri aerob pada air minum isi ulang di DKI Jakarta 32%, Bogor 12,5%, Tangerang 20% dan Bekasi 38%. Juga ditemukan air minum isi ulang yang masih mengandung bakteri coliform dan *Escherichia coli* di DKI Jakarta 1,7%, Bogor 6%, Tangerang 11% dan Bekasi tidak ditemukan (Pracoyo *et al.*, 2006).

Metode molekuler untuk menguji kualitas air secara mikrobiologis yaitu menggunakan

teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan tingkat keakuratan yang lebih tinggi. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu reaksi untuk menggandakan jumlah molekul *Deoxyribonucleat Acid* (DNA) pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam satu *thermocycler* (Campbell, 1999). Dalam teknik ini yang harus dilakukan adalah mengisolasi sel-sel bakteri dari sampel air, kemudian dilakukan amplifikasi DNA dari bakteri tersebut (Yuwono, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keberadaan bakteri patogen *Escherichia coli* serotype O157:H7 sebagai indikator pencemaran pada air minum dalam kemasan dan isi ulang menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan *rfbE* sebagai gen target. Posisi sekuens gen pada strand 5' – 3' yaitu 7441 – 7680 bp, ukuran produk PCR adalah 239 bp (Morin *et al.* 2004).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan untuk pengambilan sampel yaitu alkohol 70%, kapas dan bahan untuk ekstraksi DNA yaitu suspensi Diatom, larutan L6 (*Lysis buffer*), larutan L2 (*Washing buffer*), etanol 70%, aseton dan larutan TE (Tris-EDTA) elution buffer. Bahan-bahan yang digunakan untuk PCR yaitu ekstrak DNA, PCR mix (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% gelatin), deoksinukleotida trifosfat (dNTP) yaitu dATP, dGTP, dTTP, dCTP, enzim *Taq* DNA polymerase, dua jenis primer yang secara spesifik mengamplifikasi gen *rfbE* sebesar 239 bp yaitu:

F:5'-GTGCTTTTGATATTTTTCCGAGTACATTGG-3'
R:5'-TTTATATCACGAAAACGTGAAATTGCTGAT-3'
(Morin *et al.*, 2004), dan *marker* (DNA λ / HindIII).

Bahan-bahan untuk elektroforesis yaitu gel agarosa 1,5% yang mengandung 0,5 mg/L ethidium bromide, buffer elektroforesis Tris acetic acid-EDTA (242 g Tris Base, 57 mL acetic acid, dan 100 mL dari 0,5 mol/L EDTA, pH 8,0) (Morin *et al.*, 2004).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol sampel, kotak es (*cool box*), inkubator, *safety cabinet*, *vortex shaker*, *gyrotary shaker*, tabung Eppendorf dan raknya, alat sentrifugasi, sarung tangan disposibel,

mikropipet, *thermocycler* (Hybaid, Ashford, UK), *freezer* -20 °C, lemari pendingin 4°C, mesin elektroforesis, perangkat UV light.

Teknik Pengambilan Sampel

Untuk air minum isi ulang. Desinfeksi tangan dengan alkohol 70% dan bersihkan terlebih dahulu kran, pengambilan dilakukan pada kran yang sering digunakan. Kran dibuka penuh dan biarkan air mengalir selama 2-3 detik, atau dalam waktu yang dianggap cukup, kemudian ditutup. Kran dibuka kemudian botol diisi air, pengiriman sampel dari lapangan sampai ke laboratorium paling lama 24 jam pada suhu 4 °C atau dalam *cool box* (Alaerts dan Santika, 1997).

Untuk air minum kemasan. Dikumpulkan sampel air minum kemasan dari berbagai merek. Sampel air minum kemasan tersebut selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan.

Pemeriksaan di Laboratorium

Sampel air minum disentrifus dingin pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit selanjutnya supernatan dibuang dan sedimen dikumpulkan untuk ekstraksi DNA. Sebanyak 100 μ L sedimen dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan 900 μ L larutan L6 (*lysis buffer*) kemudian diinkubasi selama 24 jam setelah itu dilakukan ekstraksi DNA.

Sebagai pembanding (kontrol positif) digunakan isolat *Escherichia coli* dari RS. Dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar yang ditemukan pada penderita Infeksi Saluran Kencing (ISK). Isolat *E.coli* ini dikultur pada medium Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC Agar) untuk melihat warna koloni yang terbentuk, perbedaan warna koloni menunjukkan strain *E.coli* tertentu.

Ekstraksi DNA dengan Metode Boom (Hatta and Smits, 2007)

Sampel sebanyak 100 μ L yang telah ditambahkan 900 μ L larutan L6 (*lysis buffer*) kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan DNA, selanjutnya sampel diletakkan pada *gyrotary shaker* selama 1 jam kemudian ditambahkan 20 μ L suspensi diatom (vortex dahulu suspensi tersebut setiap kali akan digunakan). Vortex campuran ini dan letakkan pada *gyrotary shaker* 100 rpm selama 10 menit. Vortex kembali campuran ini lalu sentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik buang supernatannya. Untuk mencegah terhisapnya diatom, sisakan 10

μL cairan supernatan pada tabung. Kemudian dicuci sebanyak dua kali dengan menambahkan 1 mL larutan L2 (*Washing buffer*), vortex, dan sentrifus selama 15 detik lalu buang supernatannya. Setelah itu, cuci dua kali dengan 1 mL etanol 70% dan satu kali dengan aseton. Buang supernatan aseton, biarkan tabung terbuka dan inkubasi pada suhu 56 °C dalam inkubator selama 10 menit. Tambahkan 60 μL TE-elution buffer, vortex dengan baik lalu inkubasi lagi tabung tersebut pada suhu 56°C selama 10 menit. Setelah itu, sentrifus selama 30 detik pada 12.000 rpm. Pindahkan 50 μL supernatan ke dalam vial yang baru (jangan menyentuh sedimennya) kemudian disimpan pada suhu -20°C hingga siap untuk diproses dengan teknik PCR.

Untuk kontrol positif, isolat *E.coli* yang telah dikultur pada medium SMAC Agar dan menampakkan koloni berwarna pucat atau tidak berwarna maka koloni tersebut diambil dan dilakukan ekstraksi DNA dengan prosedur yang sama dengan ekstraksi sampel.

Amplifikasi DNA dengan PCR (Morin et al., 2004)

Sebagai langkah awal dibuat campuran reaksi untuk PCR. Setiap tabung PCR mengandung 16,9 μL air steril, 2 μL 10 mM *deoxynucleotide triphosphate mixture* (dNTP mix), 1 μL 50 mM MgCl_2 , 2,5 μL 10X amplifikasi buffer, 0,5 μL 10 μM *forward primer* dan 0,5 μL 10 μM *reverse primer*, 0,1 μL (0,25 U/ μL) *Taq* DNA polymerase dan air steril ditambahkan sampai volume akhir 22,5 μL .

Selanjutnya disiapkan vial yang telah diisi masing-masing 2,5 μL sampel DNA. Masing-masing tabung diisi campuran reaksi PCR sebanyak 22,5 μL . Setelah itu, dilakukan amplifikasi dengan menggunakan mesin PCR (*Thermocycler*) (Hybaid, Ashford, UK) sebanyak 40 siklus setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 57 °C selama 1 menit 15 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik. Setelah itu dilakukan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama satu malam.

Deteksi Produk PCR / Elektroforesis (Morin, et al. 2004)

Masing-masing 5 μl produk amplifikasi dicampur dengan 2 μl larutan loading. Setelah tercampur dengan baik, masing-masing dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam tanki yang berisi buffer Tris

asetid acid-EDTA. Dimasukkan juga *marker* (DNA λ / HindIII) ke dalam sumur gel agarosa untuk mengetahui ukuran DNA produk PCR, kemudian elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 75 volt. Setelah 1 jam, elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV). Hasil yang diperoleh berupa pola pita DNA (band DNA) yang menunjukkan jumlah dan pola yang berbeda.

Analisis Data

Hasil deteksi PCR dengan elektroforesis dianalisis berdasarkan ada tidaknya potongan pada pita DNA (band DNA) yang terbentuk dan data disajikan secara deskriptif dengan menggunakan tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi DNA bakteri patogen *Escherichia coli* serotype O157:H7 dilakukan pada gen target *rfbE*, gen ini menyandi Lipopolisakarid (LPS) O157 dan merupakan gen yang unik untuk serogroup *E.coli* O157. Gen *rfbE* telah diidentifikasi sebagai penanda (*marker*) yang baik untuk mendeteksi kehadiran dari bakteri *E.coli* serotype O157:H7 dalam sampel karena diturunkan pada semua fase pertumbuhan (*growth phases*) dari fase eksponensial awal sampai fase stasioner akhir (Yaron and Matthews, 2002). Primer yang digunakan pada penelitian ini merujuk pada primer yang digunakan oleh Morin et al. (2004) dimana spesifisitasnya 100%, kedua primer secara spesifik mengamplifikasi DNA gen target. Sensitifitas dari teknik PCR untuk mendeteksi bakteri pathogen *E.coli* serotype O157:H7 adalah kurang lebih 30 sel.

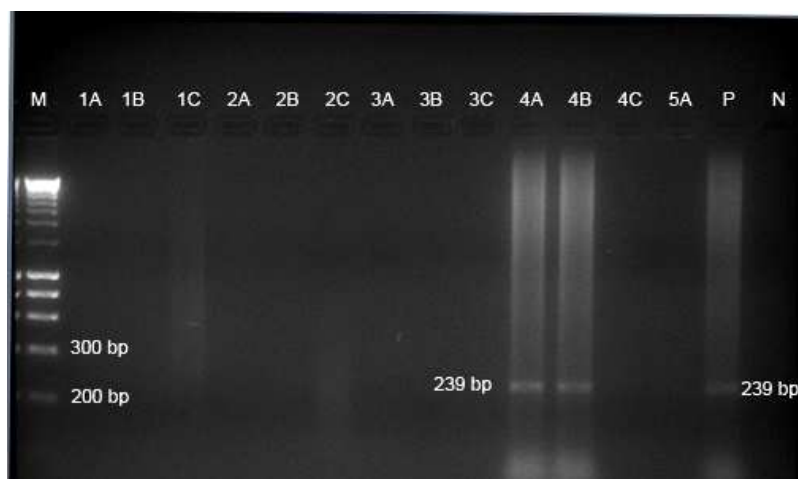
Hasil pemeriksaan sampel air minum dalam kemasan (AMDK) dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel AMDK

No. Merek	Kode Sampel	PCR		Keterangan
		(+)	(-)	
1	1A		(-)	
	1B		(-)	
	1C		(-)	
2	2A		(-)	
	2B		(-)	
	2C		(-)	
3	3A		(-)	
	3B		(-)	
	3C		(-)	
4	4A	(+)		Terdeteksi
	4B	(+)		Terdeteksi
	4C		(-)	
5	5A		(-)	
	5B		(-)	
	5C		(-)	
6	6A		(-)	
	6B		(-)	

	6C		(-)	
7	7A		(-)	
	7B		(-)	
	7C		(-)	
8	8A		(-)	
	8B		(-)	
	8C		(-)	

Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat dari 24 sampel yang dianalisis terdapat 2 sampel (8,33%) menunjukkan hasil PCR positif hal ini berarti bakteri pathogen *E.coli* serotype O157:H7 terdeteksi pada sampel AMDK. Lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 1 hasil elektroforesis, dimana hasil yang diperoleh berupa pita DNA (band DNA) pada posisi 239 bp pada sampel 4A dan 4B dan dibandingkan dengan pita DNA kontrol positif (P) dari isolat bakteri *E.coli* serotype O157:H7. Berdasarkan hasil elektroforesis pada Gambar 2, sampel 5B sampai 8C AMDK tidak diperoleh pita DNA (band DNA) bakteri *E.coli* serotype O157:H7.



Gambar 1. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel 1A-5A AMDK M = marker; P = kontrol positif; N = kontrol negatif



Gambar 2. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel 5B-8C AMDK (9A dan 9B adalah sampel AMIU yang digabungkan pada saat elektroforesis)

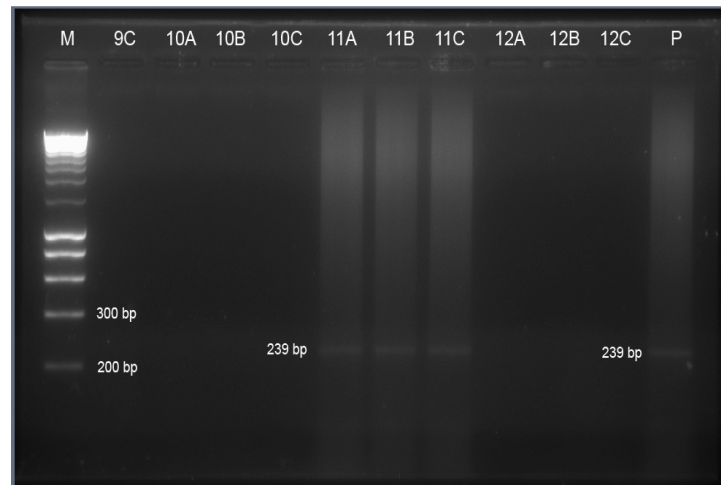
Hasil pemeriksaan sampel air minum isi ulang (AMIU) dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel AMIU

No. Depot	Kode Sampel	PCR		Keterangan
		(+)	(-)	
1	9A		(-)	
	9B		(-)	
	9C		(-)	
2	10A		(-)	
	10B		(-)	
	10C		(-)	
3	11A	(+)		Terdeteksi
	11B	(+)		Terdeteksi
	11C	(+)		Terdeteksi
4	12A		(-)	
	12B		(-)	
	12C		(-)	

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat dari 12 sampel yang dianalisis terdapat 3 sampel (25%) menunjukkan hasil PCR positif hal ini berarti bakteri pathogen *E.coli* serotype O157:H7 terdeteksi pada sampel AMIU. Dapat dilihat pada

Gambar 3 hasil elektroforesis dimana hasil yang diperoleh berupa pita DNA (band DNA) pada posisi 239 bp pada sampel 11A, 11B dan 11C dan dibandingkan dengan pita DNA kontrol positif (P) dari isolat bakteri *E.coli* serotype O157:H7



Gambar 3. Hasil PCR *E.coli* serotype O157:H7 pada sampel 9C-12C AMIU M = marker; P = kontrol positif

Kontrol positif diambil dari isolat bakteri *E.coli* yang diisolasi dari penderita infeksi saluran kencing (ISK) di Rumah Sakit Umum Dr. Wahidin Sudirohusodo – Makassar. Isolat bakteri tersebut ditumbuhkan pada medium Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC Agar) untuk melihat perbedaan warna koloni yang terbentuk yang

menandakan perbedaan strain *E.coli*. Gambar 4. menampakan pertumbuhan koloni bakteri *E.coli* pada medium SMAC Agar dengan warna koloni yang berbeda yaitu warna merah kontras merupakan bakteri *E.coli* yang umumnya non-patogen dan warna pucat merupakan *E.coli* serotype O157:H7.



Gambar 4. Perbedaan warna koloni *E.coli* pada medium SMAC Agar Merah = *E.coli* non-patogen; pucat = *E.coli* serotype O157:H7

Untuk mendapatkan air sehat perlu dilakukan serangkaian proses pengolahan (*water treatment*). Pada dasarnya air minum dalam kemasan (AMDK) dan air minum isi ulang (AMIU) diproses melalui 3 tahap yaitu: penyaringan, desinfeksi dan pengisian. Penyaringan dimaksudkan untuk menghilangkan kotoran dan bau yang terkandung dalam air. Desinfeksi bertujuan untuk menghilangkan sebagian besar mikroba dan membunuh bakteri

patogen dalam air, dengan menggunakan proses ozonisasi, ultra violet (UV) dan *reverse osmosis* sistem (pemurnian air). Pengisian merupakan tahap akhir berupa pengemasan air yang telah diproses. Namun, pada penelitian ini didapatkan sampel AMDK dan AMIU yang tidak memenuhi persyaratan yang telah ditentukan. Berdasarkan hasil PCR didapatkan terkontaminasi bakteri pathogen *E.coli* serotype O157:H7. Hal ini kemungkinan disebabkan proses pengolahan yang

tidak memenuhi syarat serta sumber air baku yang digunakan telah tercemar.

Kemungkinan kontaminasi berasal dari proses pengolahan yang tidak memenuhi standar yang telah ditentukan, untuk AMDK ada beberapa proses yang harus dilalui yaitu: proses *water treatment system*, proses *water sterilization*, proses *quality control system* dan proses pengemasan (gallon, botol dan gelas). Pada proses pengolahan air (*water treatment*) yang harus diperhatikan adalah kapasitas filter-filter pendukung, media yang digunakan, bahan tabung filter yang digunakan serta perawatan dari alat-alat yang digunakan. Menurut Warburton, *et al.* (1998), observasi melalui *scanning elektron microscopy* diindikasikan bahwa sel bakteri patogen *E.coli* serotype O157:H7 menempel dan memperbanyak diri pada dinding kontainer (tabung) dan bertahan selama lebih dari 300 hari. Jika kebersihan dari tabung-tabung (kontainer) filter tidak diperhatikan maka dapat terjadi pembentukan sel biofilm. Plauche (2006) mengemukakan bahwa sel biofilm lebih tahan terhadap bahan-bahan antimikroba, maupun kondisi fisik yang ekstrim seperti panas, sehingga kontaminasi yang disebabkan oleh sel ini dapat menyebarkan penyakit melalui makanan (*foodborne disease*) dan air (*waterborne disease*).

Sumber air yang digunakan oleh depot tersebut berasal dari air PDAM yang ditampung dalam tandon (bak penampungan) dan proses pengolahan menggunakan sistem ultra violet (UV) dan ozonisasi. Kemungkinan kontaminasi dapat terjadi pada sumber air yang digunakan yaitu air PDAM karena walaupun air PDAM tersebut telah diberikan perlakuan seperti klorinasi, namun kemungkinan bakteri *E.coli* serotype O157:H7 masih dapat bertahan hidup, kriterianya klorin bebas untuk desinfeksi air minum adalah 0,2 ppm. Zhao, *et al.* (2001) mengemukakan bahwa klorin dapat membunuh *E.coli* dengan merusak proses transportasi dan respirasi dari membran sel, mekanisme ini berlaku juga untuk bakteri *E.coli* serotype O157:H7, namun dari hasil penelitiannya didapatkan *E.coli* serotype O157:H7 strain G masih dapat bertahan pada konsentrasi 2,0 ppm klorin bebas.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa sebanyak 8,33% sampel air minum dalam kemasan dan 25% sampel air minum isi ulang tercemar bakteri *Escherichia coli* serotype O157:H7. Sumber kontaminasi berasal

dari proses pengolahan yang tidak memenuhi syarat yang telah ditentukan

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2006. *Escherichia coli* O157:H7 Infection (on line) (<http://www.health.state.ny.us>, diakses 12 November 2007).
- Alaerts, G.A. dan Santika, S.S. 1997. *Metode Penelitian Air*. Surabaya: Usaha Nasional.
- Campbell, N.A. *et al.* 1999. *Biology, fifth edition*. USA: Addison Wesley Langman, Inc.
- Clark, M. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 (on line). (<http://www.about-ecdi.com>, diakses 12 November 2007).
- Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic-uremic syndrome. *Epidemiol Rev.*, 13:60-98.
- Hatta, M. and Smits, H.L. 2007. Detection of *Salmonella Typhi* by Nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine, and Stool Samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(1), p. 139-143.
- Morin, N.J., Gong, Z. and Xing-Fang, L. 2004. Reverse Transcription-Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1, and *Salmonella Typhi*. *Clinical Chemistry*, 50:11, 2037-2044.
- Plauche, S.B. 2006. Detection and Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle Water Troughs and the Effects of Cetylpyridinium Chloride against *E.coli* O157:H7 biofilm on the Surface of Stainless Steel. Dissertation. Faculty of The Louisiana State University.
- Pracoyo, N.E., dkk. 2006. *Penelitian Bakteriologi Air Minum Isi Ulang di Daerah Jabotabek Tahun 2004*. Pusat Penelitian Pemberantasan Penyakit. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Soemirat, J. 2004. *Kesehatan Lingkungan*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Wikipedia, 2007. *Escherichia coli* O157:H7. (on line) (<http://en.wikipedia.org/wiki/E.coliO157:H7>, diakses 12 November 2007).
- Warburton, D.W., Austin, J.W., Harrison, B.H. *et al.* 1998. Survival and Recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in Inoculated Bottled Water. *Journal of food protection* Vol.61:948-952.
- Yaron, S. and Matthews, K.R. 2002. A Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Viable *Escherichia coli* O157:H7: Investigation of Specific Target Genes. *Journal of Applied Microbiology*, 92:633-640.
- Yuwono, T., 2006. *Teori dan Aplikasi PCR*. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Zhao, P. 2001. Chlorine Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Water. *Journal of Food Protection*, Vol. 64, No.10, p.1607-1609.