

Identifikasi *Campylobacter jejuni* dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Identification of *Campylobacter jejuni* Using *Polymerase Chain Reaction* Method

Liza Angeliya¹, Ruri Rumpaka Kurdiwa²

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,

²Laboratorium Bioteknologi BPPV Regional III, Lampung

Email: liza_angeliya@yahoo.com

Abstract

Campylobacter jejuni is a curved-rod shaped bacteria, non-spore, microaerophilic Gram-negative and motile. It is commonly found in the feces of animals. They grow at a temperature of 37–42° C and are zoonotic causing a disease called campylobacteriosis. *Campylobacter jejuni* naturally presents in the chicken digestive tract and does not cause any diseases. However, chicken carcasses contaminated with this bacteria are closely related to the the incidence of campylobacteriosis in humans. Cases of human campylobacteriosis primarily caused by *Campylobacter jejuni* contamination on chicken carcasses. During the cutting process, *Campylobacter jejuni* will be able to spread to the chicken carcasses. Alternative approach for detecting *Campylobacter jejuni* contamination of chicken products is by using polymerase chain reaction (PCR) method. Therefore, to determine diagnosis of animal diseases in relation to the veterinary public health due to *Campylobacter jejuni* is by applying PCR with forward primer: 5'-TGACGCTAGTGTGTAGGAG-3 and reverse primer: 5'-CCATCATCGCTAAGTGCAAC-3'. The PCR primers can amplify DNA *Campylobacter jejuni* as long as 402 bp. The PCR method is a molecular laboratory approach which is sensitive, specific, rapid and accurate for determining diagnosis of campylobacteriosis.

Key words: *Campylobacter jejuni*, chicken carcass, zoonotic, PCR, DNA band 402 bp

Abstrak

Campylobacter jejuni adalah bakteri yang berbentuk batang lengkung, non-spora, Gram-negatif mikroaerofilik dan motil. Bakteri tersebut, pada umumnya, ditemukan di kotoran hewan dan tumbuh pada suhu 37–42°C. *Campylobacter jejuni* bersifat zoonotik, menyebabkan penyakit yang disebut *campylobacteriosis* dan telah meluas ke berbagai negara. *Campylobacter jejuni* secara alami ada dalam saluran pencernaan ayam dan tidak menyebabkan penyakit, tetapi kontaminasi karkas ayam oleh bakteri tersebut erat kaitannya dengan campylobacteriosis pada manusia. Kasus campylobacteriosis pada manusia pada umumnya disebabkan oleh adanya kontaminasi *Campylobacter jejuni* pada karkas ayam. Selama proses pemotongan, *Campylobacter jejuni* akan dapat menyebar ke karkas ayam. Metode alternatif untuk mendeteksi *Campylobacter jejuni* sebagai bakteri yang mampu mengkontaminasi produk ayam adalah menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR), sehingga untuk peneguhan diagnosa penyakit hewan yang erat hubungannya dengan kesehatan masyarakat veteriner, terutama yang disebabkan oleh *Campylobacter jejuni* perlu diaplikasikan PCR dengan primer Forward: 5'-TGACGCTAGTGTGTAGGAG-3 dan primer Reverse: 5'-CCATCATCGCTAAGTGCAAC-3'. Primer PCR tersebut dapat mengamplifikasi DNA *campylobacter jejuni* sepanjang pita DNA 402 bp. Metode PCR merupakan metode uji laboratorik molekuler yang sensitif dan spesifik, cepat dan akurat untuk menentukan diagnosa *campylobacteriosis*.

Kata kunci: *Campylobacter jejuni*, karkas ayam, zoonotik, PCR, pita DNA 402 bp

Pendahuluan

Campylobacter jejuni adalah spesies bakteri berbentuk lengkung, batang, non-spora, Gram-negatif dan bersifat motil. Pada umumnya, bakteri tersebut ditemukan di kotoran hewan, tumbuh pada suhu 37-42°C (Carter *et al.*, 2004). Bakteri ini bersifat zoonosis dan menyebabkan penyakit yang disebut dengan *campylobacteriosis*. Gastroenteritis pada manusia di dunia salah satunya juga disebabkan oleh bakteri tersebut. Keracunan makanan yang disebabkan oleh spesies *Campylobacter* dapat menimbulkan penyakit, tetapi sangat jarang mengakibatkan kematian (Adenkunle *et al.*, 2009). Penyakit ini berhubungan dengan *Guillain-Barre syndrome* (GBS), yang biasanya berkembang dua sampai tiga bulan setelah infeksi. Faktor virulensinya meliputi *adhesin*, *endotoxin*, *cytotoxin*, dan *enterotoxin*. Penyakit yang invasif didukung oleh *flagella* dan *adhesin*, dimana diikuti dengan kolonisasi bakteri. Lebih dari itu *C. jejuni* mampu hidup pada fagosom (Carter *et al.*, 2004). Lipopolisakarida merupakan endotoksin yang poten. *Enterotoxin* yang dihasilkan mirip dengan toksin kolera yang mengaktifkan *adenylate cyclase*, sehingga meningkatkan CAMP intraseluler (Vandamme, 2000; On, 2001).

Campylobacter jejuni secara alami ada dalam saluran pencernaan ayam. Gejala klinis tidak terlihat meskipun invasi bakteri ini terjadi pada organ internal ayam (Berry *et al.*, 1988; Young *et al.*, 1999; Knudsen *et al.*, 2006;). Bakteri ini diperlukan dalam jumlah besar untuk dapat menimbulkan penyakit pada ayam yang terinfeksi dan dapat diisolasi dari swab kloaka dan feses dalam periode yang lama (Sahin *et al.*, 2003). Sumber terjadinya infeksi pada

ayam dapat terjadi dengan beberapa cara, yaitu mulai dari infeksi *day old chick* (DOC) sampai pada ayam dewasa, kontaminasi pakan dan kontaminasi air (Zang, 2008). *Campylobacter jejuni* pada ayam terdapat di dalam sel epitelial dan sel monoklear dari *lamina propria* yang dapat menyebabkan *jejenum* dan *ileum* rusak parah. Pada umumnya *Campylobacter* pada unggas (ayam, kalkun) menyebabkan gejala subklinis, ditandai dengan turunnya produksi telur secara drastis, kurus, kering, layu (*shriveled*), pial bersisik (*scaly combs*), tidak berdaya dan menyendiri (Neil *et al.*, 1984; Lam *et al.*, 1992). Pada pemeriksaan histopatologis ditemukan perdarahan dan daerah-daerah nekrotik dalam jaringan hati, *ascites* dan *hydropericardium*, ginjal pucat dan membesar (Welkos, 1984). *Campylobacteriosis* biasanya menyebabkan infeksi intestinal akibat mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi dengan *Campylobacter jejuni*. Gejala yang timbul akibat penyakit ini adalah berupa sakit kepala, demam, gangguan saluran pencernaan seperti mual, muntah, sakit perut, dan diare yang sering disertai dengan darah, bahkan menyerang otot yang menimbulkan nyeri otot. Bakteri ini merupakan salah satu penyebab terjadinya *Guillain barre syndrome* pada kondisi tertentu yang berkaitan dengan sistem imun (Blaser, 1997; Altekruse., 1999; Skirrow and Blaser, 2000).

Campylobacter jejuni pada ayam tidak menyebabkan penyakit tetapi kejadian kontaminasi karkas ayam oleh bakteri ini cukup tinggi yang mengakibatkan *campylobacteriosis* pada manusia (Altekruse *et al.*, 1999). Kasus *campylobacteriosis* pada manusia disebabkan oleh adanya kontaminasi *C. jejuni* pada karkas ayam. Selama proses pemotongan bakteri *C. jejuni* akan menyebar ke

karkas ayam. Kontaminasi *C. jejuni* pada ayam telah dilaporkan di beberapa negara pada produk ayam (Wang *et al.*, 1999; Hazeleger *et al.*, 1994; Katzav *et al.*, 2008). Karkas ayam yang dijual di pasaran terkontaminasi oleh *C. jejuni* dapat dibuktikan dari hasil pegujian dengan metode PCR pada sampel air cucian (Winters *et al.*, 1995). Isolasi *Campylobacter* pada air minum dan lingkungan lokasi pariwisata juga pernah dilaporkan akibat adanya kontaminasi oleh *campylobacter* tersebut (Moore, 2001).

Pengujian yang pernah dilakukan di BPPV Regional III, Lampung adalah isolasi dan identifikasi secara konvensional dengan mengkultur bakteri tersebut. Isolasi dan identifikasi membutuhkan waktu yang lebih lama dan membutuhkan tenaga teknis yang trampil dalam melakukan kultur bakteri. Pengembangan metode ini dilakukan supaya pengujian terhadap *Campylobacter jejuni* dapat dilakukan secara cepat dan akurat. Metode PCR ini digunakan sebagai metode uji untuk identifikasi *Campylobacter jejuni* yang merupakan agen kontaminasi pada karkas ayam yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia. Monitoring dan survailans agen kontaminasi karkas ayam di wilayah kerja BPPV Regional III, Lampung digunakan metode uji PCR, sehingga hasil yang diperoleh lebih cepat dan akurat dan dapat mendukung program pemerintah dalam penyediaan bahan asal hewan yang ASUH.

Materi dan Metode

Materi yang digunakan antara lain: sampel berupa daging ayam, air bilasan mencuci daging ayam, dan air di sekitar peternakan maupun Rumah Potong Ayam (RPA), Purelink™ viral RNA/DNA

mini kit, alkohol absolut, *loading dye*, DNA ladder 100 bp, Sybr safe dan TAE 1x. Reagen yang digunakan untuk amplifikasi menggunakan reagen produk Invitrogen dengan label Platinum Blue. Pada metode identifikasi *Campylobacter jejuni* digunakan *primer forward* : 5'-TGACGCTAGTGTGTAGGAG-3' dan reverse: 5'-CCATCATCGCTAAGTGCAAC-3' (Wang *et al.*, 1999).

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *Purelink Viral RNA/DNA mini kit*. Prosedur yang digunakan sesuai dengan petunjuk pabrik (Invitrogen). Sampel berupa daging ayam, air bilasan mencuci daging ayam, dan air di sekitar peternakan maupun Rumah Potong Ayam (RPA) yang telah dibuat suspensi sebanyak 200 µl ditambah dengan 200 µl *lysis buffer* dan 25µl *Proteinase K* kemudian dicampurkan di dalam tube 1,5 ml. Suspensi tersebut divortex dan diinkubasikan pada suhu 56° C selama 15 menit dengan memasukkan dalam *waterbath*. Suspensi ditambah dengan 250 µl *alcohol absolute* dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit. Suspensi dipindahkan ke dalam *spin column* dan disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4-8° C selama 1 menit. *Collection tube* diganti dan ditambahkan 500 µl *wash buffer I* pada *spin column* kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4-8°C selama 1 menit. Cairan pada *collection tube* dibuang. *Collection tube* ditambahkan 500 µl *wash buffer II*. *Collection tube* disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4-8°C selama 1 menit. *Collection tube* diganti kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4-8° C selama 1 menit. *Collection tube* diganti dengan *recovery tube* ukuran 1,5 ml dan

ditambahkan 50 μl *nuclease free water* (NFW). *Recovery tube* yang berisi NFW diinkubasikan pada suhu ruang selama 1 menit. Larutan tersebut disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4-8^o C selama 1 menit. *Spin column* dibuang dan diberi label pada tube. DNA yang diperoleh dapat langsung segera diamplifikasi atau disimpan dalam *freezer* -20^o C/-80^o C.

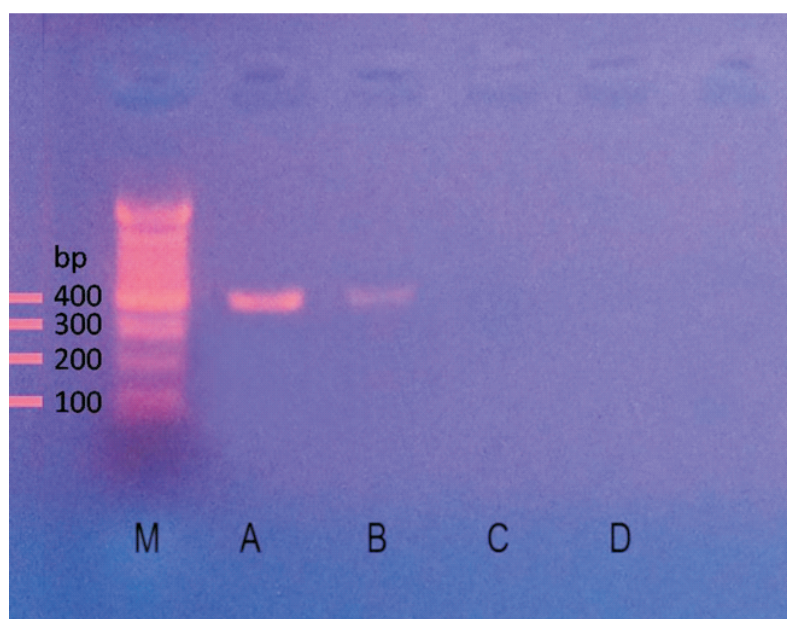
Metode yang digunakan adalah *One Step PCR*. Adapun formulasi untuk *master mix* yang digunakan: PCR *mix* 21 μl , *primer forward* 1 μl , *primer reverse* 1 μl dan *template DNA* 2 μl . Program amplifikasi DNA yang digunakan adalah sebagai berikut : denaturasi awal pada suhu 95^o C selama 10 menit sebanyak 1x siklus, selanjutnya pada siklus ke dua sebanyak 30x siklus, antara lain denaturasi pada suhu 95^o C selama 15 detik, tahapan annealing pada suhu 55^o C selama 15 detik dan elongasi pada suhu 72^o C selama 1 menit. Pada siklus ke tiga sebanyak 1x yaitu elongasi akhir pada suhu 72^o C selama 4 menit. Produk PCR yang diperoleh dilanjutkan visualisasi dengan elektroforesis DNA yang dilakukan pada gel agarose 1,5 % dengan pewarnaan *sybr safe* dalam larutan TBE buffer 1x. Larutan tersebut dididihkan di dalam *microwave* dalam gelas Erlenmeyer ukuran 100 ml. Larutan ditambah dengan 10 μl *sybr safe*. Agarose dituang ke dalam *chamber electrophoresis* yang telah dipasang sisir larutan. Agarose akan mengeras (berbentuk gel) setelah 20 menit. Selanjutnya, sisir diambil sehingga terbentuk sumuran pada gel agarose. Larutan *trisboric EDTA* (TBE) dituang ke dalam alat elektroforesis. Produk PCR sebanyak 5 μl dicampur dengan 1,5 μl *loading buffer*. Suspensi sebanyak 6,5

μl tersebut dimasukkan ke masing-masing sumur pada gel agarose. Sumuran terakhir diisi dengan 5 μl penanda molekuler (*DNA ladder 100 bp*). Elektroforesis dijalankan pada voltase 125 volt selama 25 menit. Gel produk amplifikasi PCR divisualisasikan di atas UV *transilluminator* dan hasilnya didokumentasikan dengan kamera.

Hasil dan Pembahasan

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan agar gel konsentrasi 1,5% selama 25 menit dengan daya 125 volt 400 ampere. Primer yang digunakan dapat mengamplifikasi gen ORF1. Primer ini di desain spesifik pada daerah yang conserve yang membedakan dengan bakteri yang lain. Hasil visualisasi menunjukkan produk DNA *Campylobacter jejuni* menggunakan primer ini adalah sepanjang 402 bp pada posisi asam amino ke 574-975 pada gen ORF1 dari parsial genome. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 1, terlihat adanya band pada isolat sampel lapangan yang sejajar dengan *band* pada kontrol positif sepanjang 402 bp.

Selama ini identifikasi *Campylobacter jejuni* pada bahan asal hewan khususnya dalam hal ini daging ayam dilakukan dengan kultur terhadap bakteri tersebut, namun memerlukan waktu yang lama dan perlakuan khusus dengan media khusus. Semakin berkembangnya kemajuan teknologi perlu adanya uji pendukung yang lebih cepat dan mempunyai tingkat sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi sehingga hasil uji dapat dipertanggung jawabkan.



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA *Campylobacter jejuni*.

Keterangan:

M: Marker

A : ATCC (K+)

B : Isolat dari sampel lapangan

C : K-

D : NTC

Teknik *polimerase chain reaction* (PCR) dipakai sebagai salah satu metode uji alternatif karena hasilnya cepat, akurat, spesifik dan sensitif (Hazeleger *et al.*, 1994; Winters *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999; Katzav *et al.*, 2008). Penggunaan primer yang spesifik pada gen tertentu menjadikan uji PCR mempunyai tingkat spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi sehingga hasil diagnosa menjadi lebih akurat terhadap suatu antigen tertentu yang dalam hal ini adalah *Campylobacter jejuni*.

Pengujian dengan pendekatan biologi molekuler seperti teknik PCR sekarang ini mulai dikembangkan dan dipakai di BPPV Regional III, Lampung untuk mendeteksi agen penyakit secara langsung maupun yang mengkontaminasi bahan asal hewan. Dengan menggunakan uji PCR, primer spesifik yang digunakan dapat mengamplifikasi DNA *Campylobacter jejuni* sepanjang 402 bp.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada BBVet Wates atas sumbangan sampel lapangan sehingga penulis dapat menampilkan tulisan ini.

Daftar Pustaka

- Carter, G. R. and Wise, D. J. (2004) *Essentials of Veterinary Bacteriology and Micology 6th edition*. A Blackwell Publishing Company. Iowa.
- Adenkunle, O.C., Coker, A.O. and Kolawole, D.O. (2009) *Incidence, Isolation and Characterization of Campylobacter Species in Osogbo*.
- Altekruse, S.F., Stern, N.J., Field, P.I. and Swerdlow, D.L. (1999) *Campylobacter jejuni* an Emerging Food Borne Pathogen. *Emerg Infect Dis.* 5: 28-35.

- Beery, J.T., Hugdahl, M.B. and Doyle, M.P., (1988) Colonization of Gastrointestinal Tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 54: 2365–2370
- Blaser, M.J., (1997) Epidemiologic and Clinical Features of *Campylobacter jejuni* Infection. *J. Infect. Dis.* 76 Suppl 2: S103–S105.
- Hazeleger W., Arkesteijn C., Toorop-Bouma A. and Beumer R., (1994) Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 273–281.
- Katzav, M., Isohanni, P., Lund, M., Hakkinen, M. and Lyhs U. (2008) PCR Assay for Detection of *Campylobacter* in Marinated and non-marinated Poultry Products. *Food Microbiol.* 25: 908–914.
- Knudsen, K.N., Bang, D.D., Andresen, L.O. and Madsen, M. (2006) *Campylobacter* Strain of Human and Chicken Origin are Invasive in Chicken after oral Challenge. *Avian Dis.* 50: 10–14.
- Lam, K.M., DaMassa, A.J., Morishita, T.Y., Shivaprasad, H.L. and Bickford, A.A. (1992) Pathogenicity of *Campylobacter jejuni* for Turkey and Chicken. *Avian Dis.* 36: 359–363.
- Moore J., Caldwell P. and Millar B. (2001) Molecular detection of *Campylobacter spp.* in drinking, recreational and environmental water supplies. *Int J Hyg Environ Health.* 204: 185–189.
- Neil, S.D., Campbell, J.N. and O'Brien, J.J. (1984) *Campylobacter spp.* in broiler chickens. *Avian Pathol.* 13: 313–320.
- On, S. L. W. (2001) Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and Related Bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J. Appl. Microbiol.* 90: 1–15.
- Sahin, O., Morishita, T., and Zhang Q. (2003) *Campylobacter* colonization in poultry: Sources of infection and modes of transmission. *Anim. Health Res. Rev.* 3: 95–105.
- Skirrow, M.B., and Blaser, M.J. (2000) Clinical aspects of *Campylobacter* Infection. In: *Campylobacter*, 2nd ed., Nachamkin, I and M.J., Blaser Eds. ASM Press, Washington, D.C., USA. 69–88.
- Vandamme, P. (2000) Taxonomy of The Family *Campylobacteriaceae*. In *Campylobacter*. I. Nachamkin Blaser M.B. eds. American Society for Microbiology. Washington D.C. 3–26.
- Welkos, S.L. (1984) Experimental Gastroenteritis in Newly Hatched chick– infected with *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* 18: 233–248
- Young, C.R., Ziprin, R.L., Hume, M.E. and Stanker, L.H. (1999) Dose Response Invasion of day–Hatch Leghorn chick by Different Isolates of *Campylobacter jejuni*. *Avian Dis.* 43: 763–767.
- Wang H., Farber J.M., Malik N. and Sanders G. (1999) Improved PCR detection of *Campylobacter jejuni* from chicken rinse by a simple sample preparation procedure. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 39–45.
- Winters, K.D., and Slavik, F.M. (1995) Evaluation of PCR based Assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. *Mol. Cell. Probes* 9: 307–310.
- Zhang, Q. (2008) *Campylobacteriosis In: Disease of Poultry* 12th ed Syaif.YM., A.M. Fadly, J.R. Glysson., L.B. Mc.Dougald., L.K. Nolan., and D.E. Swyne. Blackwell publishing professional. IOWA. USA. 675–689