

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas* sp. AS THE BASIS FOR DEVELOPMENT OF SEROLOGICAL DIAGNOSTIC KIT OF FISH DISEASE IN INDONESIA

Abstract

Marine resources and fisheries of Indonesia through aquaculture industry are seen as an important component of food security. The biggest problem faced by the aquaculture industry world wide is diseases caused by various agent sof biological and non-biological. Among the group of microorganisms that cause serious losses in the cultivation is *Pseudomonas* sp. This study aims to determine : (1 The basis of phenotypic and genotypic characteristics of *Pseudomonas* sp; (2) The pathogenic level of *Pseudomonas* sp. on *Oreochromis niloticus*; (3) The effectiveness of some antibiotics against *Pseudomonas* sp in vitro (4) Understanding the antigenic properties of *Pseudomonas* sp for rapid identification. The research was conducted in September 2014 until July 2015. The material used is *Pseudomonas* sp. isolates originating from Jambi, Bali, Tanjung Pinang and Luwuk Banggai. Phenotypically identification is based on morphology, biochemistry and physiology of bacteria. Morphological observation include shape, colonies color, Gram coloring presumptive test, and motility. Biochemical tests include presence of catalase and oxidase enzym, fermentative ability, and acid formation from various sources of carbon. Extraction of DNA was performed using PCR and used primer PAR: 5-ATGCAGCACCTGTGTCTGAG-3 (20 mer) primer reverse dan PAF : 5-GGACGGGTCAGTAATGCCTA-3 (20 mer) primer forward pada fragmen 16S rRNA. Internal primer used is PsaNF: - 5' TTGGGAGGAAGGGCAGTAACC -3' and PsaNR: - 5' TGCGCCACTAAAATCTCAAG - 3'. The primer was designed with primer 3 software related to nucleotide sequence of *P. anguilliseptica* (<http://bioinfo.uf.ee/primer-0.4.0>) with considering design from Yamamoto and Harayama (1995) Then DNA sequenced and matched with genes from the World Bank (BLAST). The sequencing results were analyzed using phylogenetic tree by the Neighbor-Joining and maximum parsimony method to see the close ness of kin ship level. Sensitivity of bacteria to Gentamicin, Erythromycin, Enrofloxacin, and ampicillin tested using the disc diffusion technique. Pathogenic of bacteria to the fish determined by observing the histopathological changes of organs. Antigenic properties of the bacteria was confirmed using a serum plate agglutination test and then the antibody were measured using tube agglutination test respectively. Identification of the phenotype are not able to distinguish the species of *Pseudomonas* sp. Collected from all four locations. Molecular identification showed that the four isolates closely related (99%) with *P.stutzeri*. Antibiotic sensitivity test showed that *P.stutzeri* isolates PB is sensitive to Gentamycin, Enrofloxacin and resistant to Erithromycin, and Ampicillin. While *P.stutzeri* isolates PJ is sensitive to Gentamycin, Erithromycin, Enrofloxacin and resistant to Ampicillin. Examination of the experimental animals (rabbits) showed that there are not found rabbits that showed a negative reaction to *P.stutzeri* isolates from PB1, PB2, PB3, PJ1, PJ2 and PJ3 in serum plate agglutination test. Measurement of the antibody titer antibodies showed a range between 640-1280.

Keywords : *Pseudomonas* sp., *P. stutzeri*, disc diffusion, Neighbor-Joining, Maximum Parsimony, Patogenesitas, Respon Imun

Karakter Fenotip dan Genotip Bakteri *Pseudomonas* sp. Sebagai Dasar Pengembangan Perangkat Diagnostik Serologis pada Ikan di Indonesia

Intisari

Sumber daya kelautan dan perikanan Indonesia melalui industri akuakultur dipandang sebagai komponen ketahanan pangan yang penting. Masalah terbesar yang dihadapi oleh industri akuakultur di seluruh dunia adalah penyakit yang disebabkan karena berbagai agen hayati dan non-hayati. Diantara kelompok mikroorganisme yang menyebabkan kerugian serius dalam budidaya adalah golongan bakteri *Pseudomonas* sp. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui : (1) Karakteristik secara fenotipik dan genotipik bakteri *Pseudomonas* sp; (2) Sifat genotipik bakteri *Pseudomonas* spp ; (3) Efektifitas beberapa antibiotik terhadap *Pseudomonas* sp secara *in vitro*; (4) Patogenisitas bakteri *Pseudomonas* sp pada ikan; dan (5) Sifat imunogenik *Pseudomonas* spp. yang menghasilkan antibodi spesifik pada kelinci sehingga bermanfaat untuk uji serologi. Penelitian dilaksanakan dari bulan September 2014 hingga bulan July 2015. Materi yang digunakan adalah isolat bakteri *Pseudomonas* sp koleksi yang berasal dari Jambi, Bali, Tanjung Pinang dan Luwuk Banggai. Identifikasi secara fenotip dilakukan berdasarkan morfologi, biokimia dan fisiologi bakteri. Pengamatan morfologi meliputi bentuk, warna koloni, uji presumtif perwarnaan Gram, dan motilitas. Uji biokimia meliputi katalase, oksidase, fermentatif, pembentukan asam dari berbagai sumber karbon. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan PCR primer PAF: 5'- GGACGGGTCAGTAATGCCTA - 3' (20 mer) primer forward dan primer PAR: 5 - ATGCAGCACCTGTGTCTGAG - 3' (20 mer) primer reverse. Primer internal yang digunakan P_{sanF}: - 5' TTGGGAGGAAGGGCAGTAACC -3' dan P_{sanR}: - 5' TGCGCCACTAAAATCTCAAG - 3' Primer didisain menggunakan program primer 3 online berdasarkan sekuen nukleotida *P. anguilliseptica* (<http://bioinfo.uf.ee/primer-0.4.0>) dengan mempertimbangkan disain dari Yamamoto dan Harayama (1995). Kemudian DNA disekuensing dan dicocokkan dengan gen dari world bank (BLAST). Hasil sekuensing dianalisa menggunakan pohon filogenetik dengan metode *Neighbor-Joining* dan *Maximum Parsimony* untuk melihat kedekatan tingkat kekerabatannya. Sensitifitas bakteri terhadap antibiotik Gentamicin, Eritromisin, Enrofloxasin, dan Ampicilin diuji menggunakan teknik *disc diffusion*. Patogenisitas bakteri pada ikan nila dilihat dari perubahan histopatologi organ. Sifat antigenik bakteri dikonfirmasi menggunakan *serum plate agglutination* dan kemudian diukur titer antibodinya menggunakan metode uji aglutinasi tabung. Identifikasi fenotip tidak mampu membedakan spesies *Pseudomonas* sp. dari keempat lokasi. Identifikasi molekuler menunjukkan bahwa keempat isolat memiliki kekerabatan yang dekat (99%) dengan *P. stutzeri*. Uji sensitifitas antibiotik menunjukkan bahwa *P. stutzeri* isolat PB bersifat sensitif terhadap Gentamycin, Enrofloxacin dan resisten terhadap Eritromycin, Ampicilin. Sedangkan *P. stutzeri* isolat PJ bersifat sensitif terhadap Gentamycin, Eritromycin, Enrofloxacin dan resisten terhadap Ampicilin. Pemeriksaan terhadap hewan coba (kelinci) menunjukkan tidak ditemukan kelinci yang menunjukkan reaksi negatif terhadap *P. Stutzeri* isolat PB1, PB2, PB3, PJ1, PJ2 dan PJ3 pada uji *serum plate agglutination*. Pengukuran terhadap titer antibodi menunjukkan kisaran antibodi antara 640 – 1280.

Kata kunci: *Pseudomonas* sp., *P. stutzeri*, *disc diffusion*, *Neighbor-Joining*, *Maximum Parsimony*, Patogenisitas, Imun respon.