



LAPORAN PROJEK PEMBANGUNAN PENYELIDIKAN KESIHATAN IKAN RMK-9 (2006-2010)



Laporan Kajian Kesihatan Ikan RMK-9 (2006-2010)

National Fish Health Research Division(NaFisH)

Fisheries Research Institute(FRI)

Hak Cipta Terpelihara. Tidak dibenarkan mengeluarkan mana-mana bahagian artikel, ilustrasi, dan isi kandungan buku ini dalam apa jua bentuk dan dengan apa jua sama ada cara elektronik, fotokopi, mekanik, rakaman, atau cara lain sebelum mendapat izin daripada Ketua Pengarah Jabatan Perikanan Malaysia.

Perpustakaan Negara Malaysia Data Pengkatalogan-dalam-Penerbitan

Laporan Kajian Kesihatan Ikan RMK-9 (2006-2010)/ Siti Zahrah Abdullah, Kua Beng Chu, Azila Abdullah, Padilah Bakar,

ISBN 978-967-2946-12-0

1. Fishes--Health--Research--2006-2010.
2. Government publications—Malaysia.

I.Siti Zahrah Abdullah, II.Kua Beng Chu, III.Azila Abdullah, IV.Padilah Bakar.

597.

Diterbitkan oleh:

INSTITUT PENYELIDIKAN PERIKANAN

National Fish Health Research Center(NaFisH)

Fisheries Research Institute(FRI)

11960 Batu Maung, Pulau Pinang

Tel: +604-6263922

Fax: +604-6263977

Webiste: www.fri.gov.my

Siti Zahrah, A, Kua BC, Azila A, Padilah B. 2019. Laporan Kajian Kesihatan Ikan RMK-9 (2006-2010). ISBN 978-967-2946-12-0. 81 mukasurat

PRAKATA

Assalamualaikum dan Salam Sejahtera.

Puji-pujian dan setinggi kesyukuran ke hadrat Allah S.W.T kerana dengan limpahNya, Laporan Kajian Kesihatan Ikan RMK-9 (2006-2010) berjaya diterbitkan.

Sepanjang RMK-9, NaFisH telah mendapat 2 program penyelidikan dengan jumlah keseluruhan peruntukan RM5.7 juta. Dua program tersebut adalah pembangunan vaksin dalam industri akuakultur (22501-008) dan pembangunan protokol diagnosis dan kit-kit diagnosis mudah pakai dalam industri akuakultur(22501-009).

Syabas diucapkan kepada Ketua NaFisH, pegawai penyelidik dan kakitangan yang terlibat kerana telah melaksanakan kedua-dua program penyelidikan tersebut dengan jayanya. Melalui kedua-dua program tersebut juga, kemudahan makmal untuk menjalankan penyelidikan telah berjaya dipertingkatkan selaras dengan kehendak piawaian semasa. Beberapa output penyelidikan telah dihasilkan dan antara yang paling *significant* adalah produk vaksin StrepToVax bagi pengawalan penyakit Streptococcosis. Begitu juga dengan penghasilan kertas teknikal yang telah berjaya diterbitkan samada di dalam jurnal kebangsaan atau antarabangsa.

Akhir sekali, saya percaya semua warga penyelidik NaFisH dapat meningkatkan produktiviti dan berusaha mencapai kejayaan yang lebih cemerlang di tahun-tahun yang mendatang.

RAJA MOHAMAD NOORDIN. B RAJA OMAR AINUDDIN

Pengarah Penyelidik

Institut Penyelidikan Perikanan (IPP)

Batu Maung, Pulau Pinang

Disediakan oleh:
Siti Zahrah Abdullah
Kua Beng Chu
Azila Abdullah
Padilah Bakar

CARTA RMK-9

Ketua Pusat NafisH



**Faazar
Abdul Latif**
(2006)



**Dr. Siti Zahrah
Abdullah**
(2007-2010)

Pegawai Penyelidik



**Dr. Kua
Beng Chu**
(2006-2010)



**Dr. Azila
Abdullah**
(2006-2010)



**Dr. Padilah
Bakar**
(Jan-Sept.2006)



**Rimatulhana
Ramly**
(2006)
2007-2010:cuti belajar

Staf Sokongan



**Shahidan
Hashim**
(2006-2010)



Zuraidah Roli
(2006-2010)



Oo Mooi Gaik
(2006-2010)



**Muhd Nasrul
Moorthy Abdullah**
(2006-2010)



**Mohd Roslan
Saad**
(2006-2010)



**Abdul Karim
Abdullah**
(2006-2010)



Saidin Saad
(2006-2010)

PROGRAM:
Pembangunan Vaksin Dalam
Industri Akuakultur

SIRI PROJEK:
21 22501 008

SENARAI KANDUNGAN

Mukasurat

Siri Program : 22501-008

Pembangunan Vaksin Dalam Industri Akuakultur

1.0 Latar Belakang.....	9
2.0 Projek.....	11
3.0 Objektif	11
4.0 Justifikasi.....	11
5.0 Peruntukan.....	11
6.0 Tujuan Laporan.....	12
7.0 Kaedah/ Metodologi penilaian	
7.1 Projek 1: Pembangunan vaksin bakteria (Streptococcosis) pada ikan tilapia.....	12
7.1.1 Reka Bentuk kajian	
7.1.2 Kaedah persampelan merangkumi di lapangan dan makmal	
7.1.3 Analisis data kajian	
7.2 Projek 2: Pembangunan vaksin parasit <i>C. irritans</i> ...	14
7.2.1 Reka Bentuk kajian	
7.2.2 Kaedah persampelan merangkumi di makmal	
7.2.3 Kaedah pembangunan data antigenik protein parasit	
7.2.4 Kaedah pengepressan gen yang dipilih	
8.0 Indikator-indikator pencapaian	
8.1 Pencapaian Fizikal.....	15
8.1.1 Makmal basah untuk kajian (<i>Experimental Wet Lab.</i>)	
8.1.2 Makmal biologi molekul	
8.1.3 Makmal kualiti air	
8.1.4 Peningkatan makmal spesimen kajian	
8.1.5 Peningkatan peralatan makmal	
8.2 Pencapaian bukan fizikal.....	18
8.2.1 Projek 1: Pembangunan vaksin bakteria (Streptococcosis) pada ikan tilapia	
8.2.1.1 Kaedah pencirian molekular <i>Streptococcus agalactiae</i>	
8.2.1.2 Kaedah molekular menghasilkan 'recombinant vaccine'	

8.2.1.3	Kaedah penentuan imuniti mukosa (ketahanan) ikan tilapia terhadap penyakit Streptococcosis	
8.2.1.4	Jangkitan Streptococcosis pada tilapia dan parameter kualiti air	
8.2.1.5	Data epidemiologi penyakit Streptococcosis	
8.2.1.6	Kajian patogenisiti <i>S. agalactiae</i> terhadap tilapia	
8.2.1.7	Kajian pengawalan jangkitan Streptococcosis melalui penggunaan 'Whole-cell Killed Vaccine(FNV)' dan 'Adjuvant Whole-cell Killed Vaccine (FAV)'	
8.2.1.8	Kajian aplikasi vaksin dengan 'route of administration'	
8.2.2	Projek 2: Pembangunan vaksin parasit <i>C. irritans</i>	
8.2.2.1	Penghasilan parasit <i>C.irritans</i> dalam makmal	
8.2.2.2	Pembangunan data antigenik protein 'whole cell <i>C. irradians</i> '	
8.2.2.3	Kaedah pengepressan gen terpilih	
9.0	Peningkatan kemahiran dan kepakaran.....	39
9.1	Bidang kesihatan ikan	
9.2	Kerjasama dan kemahiran kakitangan	
9.3	Penyertaan dalam seminar / Simposium	
9.4	Penerbitan	
9.5	Pembentangan Lisan dan Poster	
10.0	Isu-isu berbangkit.....	47
11.0	Cadangan penilaian.....	48
12.0	Kesimpulan.....	49
13.0	Penutup.....	53

Siri Program : 22501-008 Pembangunan Vaksin Dalam Industri Akuakultur

1.0 Latar Belakang

Pengeluaran akuakultur dunia telah meningkat pada tahap 8.7% setahun sejak tahun 1970 hingga 2004. Statistik tahun 2005 menunjukkan sektor akuakultur mencapai peratus pertumbuhan tahunan sebanyak 9.4% dan dijangka akan terus meningkat. FAO menganggarkan permintaan ikan dunia pada tahun 2010 akan meningkat kepada 110-120 juta tm berbanding 90 juta tm pada tahun 1990. Walau bagaimanapun, pengeluaran ikan semasa sebanyak 143.6 juta tm pada tahun 2006 telah melebihi nilai ini dan hampir memenuhi separuh daripada keperluan ikan untuk penduduk dunia. Rantau Asia menghasilkan 82.0% dari pengeluaran akuakultur dunia. Dua spesies penting diternak ialah *carps* dan *cyprinids* serta tilapia yang menunjukkan peningkatan 26.8% (*carps/cyprinid*) dan 52.5% (*tilapia/cichlid*) sejak tahun 2000-2007.

Di Malaysia umpamanya, bidang akuakultur berkembang lebih cepat daripada perikanan tangkapan iaitu peningkatan sebanyak 35.6% dari tahun 2000-2007, manakala hanya 6.9% bagi perikanan tangkapan yang direkodkan dalam tempoh yang sama. Akuakultur dilihat sebagai sumber utama penambahan pengeluaran ikan, kemerosotan sumber ikan semulajadi dan akuakultur terus berkembang di antara 1.4% hingga 5.3% per tahun untuk membekalkan anggaran 70 juta tm ikan menjelang tahun 2020. Pertambahan aktiviti akuakultur secara tidak langsung akan membawa kepada masalah penyakit yang sukar dikawal di dalam ekosistem semulajadi.

Peningkatan masalah penyakit dalam industri akuakultur telah membawa kerugian yang besar kepada penternak seterusnya membawa kepada kemerosotan hasil keluaran perikanan negara. Masalah ini berpunca dari peningkatan sistem akuakultur secara intensif yang menekankan kepada hasil produktiviti yang tinggi tanpa mengambilkira masalah yang bakal berlaku.

Anggaran terbaru berdasarkan kajian yang dijalankan di 16 buah negara-negara Asia menunjukkan kerugian akibat penyakit yang berjumlah lebih dari US\$3.0 bilion. Sebagai contoh penyakit EUS dalam ternakan ikan keli yang membawa kerugian sebanyak RM5.57 juta dalam tahun 1994 dan meningkat kepada RM18.6 juta pada tahun 1998. Nilai kerugian bagi akuakultur marin telah meningkat dari RM17.75 juta pada tahun 1994 kepada RM64.03 juta dalam tahun 1998. Kegunaan bahan kimia seperti antibiotik juga telah meningkat dari RM105, 000 pada tahun 1994 kepada RM873, 240 pada tahun 1998. Laporan rasmi jangkitan EUS pada ternakan ikan kap di Bangladesh menunjukkan 15% pengurangan atau dianggarkan bernilai US\$344/ha/tahun daripada jumlah keseluruhan pengeluaran ikannya. Masalah serangan penyakit ini dijangka akan terus meningkat selaras dengan peningkatan aktiviti akuakultur yang intensif, jumlah pendaratan ikan tangkapan yang berkurangan dan permintaan ikan sebagai sumber protein yang semakin meningkat.

Penggunaan antibiotik secara berleluasa dan tidak terkawal menghasilkan organisma patogen yang rentang terhadap antibiotik. Selain dari itu, kekurangan pemahaman tentang penggunaan antibiotik (withdrawal period) menyebabkan terdapat residu antibiotik yang tertinggal di dalam produk-produk akuakultur yang memudaratkan kesihatan pengguna. Kerugian besar yang dialami oleh industri akuakultur yang berpunca dari masalah penyakit akan dapat diatasi dengan menggunakan vaksin. Vaksin telah terbukti efektif dari segi kos. Sebagai contoh, vaksin digunakan secara meluas di dalam penternakan ikan Salmon Norwegian di mana antibiotik hampir tidak digunakan langsung dan pengeluaran ikan telah meningkat secara mendadak.

2.0 Projek

Terdapat 2 projek yang telah dikenalpasti iaitu:

- i. Epidemiologi dan pengawalan jangkitan *Streptococcus sp.* terhadap ternakan sangkar Tilapia Merah (*Oreochromis sp.*)
- ii. Pembangunan vaksin bagi jangkitan *Cryptocaryon sp.* terhadap kultur ikan marin

3.0 Objektif

Melalui 2 projek yang telah dikenalpasti, objektif program adalah untuk:

- i. Menghasilkan vaksin bagi mengawal penyakit-penyakit ikan yang serius yang disebabkan oleh bakteria dan parasit.
- ii. Meningkatkan ketahanan ikan terhadap serangan penyakit seterusnya mengurangkan kerugian akibat kematian.
- iii. Mengurangkan penggunaan antibiotik dan bahan kimia dalam rawatan penyakit ikan.

4.0 Justifikasi

Impak penggunaan vaksin dalam industri akuakultur adalah seperti berikut:

- i. Dapat mengawal kes-kes kejadian penyakit akuakultur seterusnya memperkukuhkan daya saing aktiviti akuakultur dalam menghasilkan sumber makanan kepada negara.
- ii. Meningkatkan kualiti dan pengeluaran hasil akuakultur.
- iii. Meningkatkan taraf ekonomi golongan sasaran.
- iv. Mewujudkan ternakan lebih mesra alam.
- v. Mewujudkan daya saing produk untuk dipasarkan.
- vi. Membolehkan kerjasama dengan lain-lain agensi yang berkaitan.

5.0 Peruntukan

Sebanyak RM3,380,000.00 peruntukan telah diterima dari Rancangan Malaysia Kesembilan (RMK9) untuk tempoh lima tahun bermula dari 2006 hingga 2010. Jadual di bawah merupakan perbelanjaan yang telah dibelanjakan mengikut tahun seperti Jadual 1.

Jadual 1: Peruntukan dan perbelanjaan yang diterima

Siling RMK9	2006	2007	2008	2009	2010
Peruntukan	0	1,000,000.00	1,000,000.00	550,000.00	830,000.00
Perbelanjaan (%)	0	999,360.30 (99.9)	995,562.83 (99.6)	541,200.00 (98.4)	830,000.00 (100)

6.0 Tujuan Laporan

Laporan ini merupakan laporan akhir kajian-kajian yang telah dirancang dan dilaksanakan bagi program 22502-008 (Pembangunan vaksin dalam industri akuakultur) dalam RMK-9 bagi tempoh 5 tahun (1996 – 2010). Program ini merangkumi tiga projek iaitu a). Pembangunan vaksin bakteria (*Streptococcus*) pada ikan tilapia, b). Pembangunan vaksin parasit (*Cryptocaryoniasis*) pada ikan marin dan c). Pembangunan sumber manusia.

7.0 Kaedah / Metodologi penilaian

Merangka reka bentuk kajian dan pendekatan yang menepati objektif mengenalpasti permasalahan sebenar dalam aspek/bidang yang dikaji supaya dapat ditangani. Pendekatan yang digunakan bagi membuat penilaian merangkumi kaedah penilaian seperti berikut:-

7.1 Projek 1: Pembangunan vaksin bakteria (*Streptococcus*) pada ikan tilapia

7.1.1 Reka bentuk kajian

Reka bentuk kajian mengambil kira kaedah yang praktikal dan objektif supaya data kajian yang di dapati menepati tujuan sebenar untuk mengetahui permasalahan penyakit ikan ternakan yang di hadapi oleh industri melalui persampelan yang dirancang.

7.1.2 Kaedah persampelan di lapangan dan makmal

Persampelan melibatkan pemilihan tapak kajian yang terperinci di lapangan dan pengenalpastian punca masalah penyakit ikan di makmal dengan menggunakan kaedah yang tepat dan relevan selama tempoh 2 tahun. Data yang dikumpul dan direkodkan memberi fakta sebenar masalah yang dihadapi.



Bekas lombong



Terusan MADA



Sungai Terengganu



Tasik



Kolam

7.1.3 Analisis data kajian

Data kajian direkodkan melalui persampelan di lapangan/tapak kajian dan data penentuan kaedah pengenalpastian identiti patogen yang piawai di makmal untuk mendapat maklumat kajian yang tepat. Kompilasi pengkalan data komprehensif yang dapat dilihat hubungkaitnya dengan masalah kajian yang dijalankan dan dikenalpasti supaya masalah dapat diatasi setelah difahami.

7.2 Projek 2: Pembangunan vaksin parasit *C. irritans* pada ikan marin

7.2.1 Reka Bentuk kajian

Reka bentuk kajian mengambil kira pembangunan parasit di peringkat makmal dengan menggunakan kaedah yang dibangunkan oleh Kua (2002). Parasit yang dibangunkan dikumpul untuk tujuan kajian yang berkaitan untuk pembangunan calon vaksin parasit tersebut.

7.2.2 Kaedah persampelan di makmal

Persampelan melibatkan lokasi di makmal basah hatceri Institut Penyelidikan Perikanan dan makmal parasit di NaFisH. Kaedah pengekstrakan protein daripada parasit bagi peringkat 'whole cell *C. irritans*' secara manual atau melalui kit ekstrak protein yang sedia ada. Pengenalpastian antigenik protein dari parasite peringkat 'whole cell *C. irritans*' melalui keadah SDS-PAGE gel dan 'western-blot'.

7.2.3 Kaedah pembangunan data antigenik protein parasit

Pembangunan data antigenik protein parasit berdasarkan kepada peringkat 'whole cell *C. irritans*'. Pengenalpastian antigenik protein dari parasite peringkat 'whole cell *C. irritans*' melalui keadah 2d-gel dan 'immunoblotting' dengan kerjasama dari Malaysia Genome Institute(MGI), UKM dan INFORMN, USM.

7.2.4 Kaedah pengekpressan gen yang dipilih

Pembangunan kaedah RT-PCR bagi mengenalpasti gen yang tahan penyakit *C. irritans* daripada organ insang dan otot dan seterusnya menentukan keberkesanan ekstraksi DNA/RNA, pengoptimalan dan pengklonan bagi gen yang telah dikenalpasti.

8.0 Indikator-indikator pencapaian

Indikator pencapaian bagi program ini dapat dibahagikan dalam bentuk fizikal dan bukan fizikal yang dapat dikaitkan sebagai hasil dari kejayaan projek yang di jalankan.

8.1 Pencapaian Fizikal

Infrastruktur yang dibangunkan atau dipertingkatkan dapat membantu dan menjamin kelancaran kajian projek.

8.1.1 Makmal basah untuk kajian (*Experimental Wet Lab*)

Makmal ditingkatkan supaya 40 tangki kajian berkapasiti 200L termasuk paip, pam dan alat pengudaraan dimuatkan di ruang kajian untuk membolehkan kajian di peringkat makmal dapat dijalankan dengan lancar (Gambar 1).

8.1.2 Makmal biologi molekul

Satu makmal diubahsuai untuk berfungsi sebagai makmal untuk menjalankan kajian biologi molekul bagi memastikan aspek kajian yang melibatkan biologi molekul dapat dijalankan dengan lancar. Makmal ini dilengkapi dengan peralatan yang berkaitan termasuk *Freezer(-20°C)*, *microcentrifuge*, *PCR*, *sonicator*, *shaker incubator*, *ELISA machine*, dan *proteomics center* (Gambar 2).

8.1.3 Makmal kualiti air

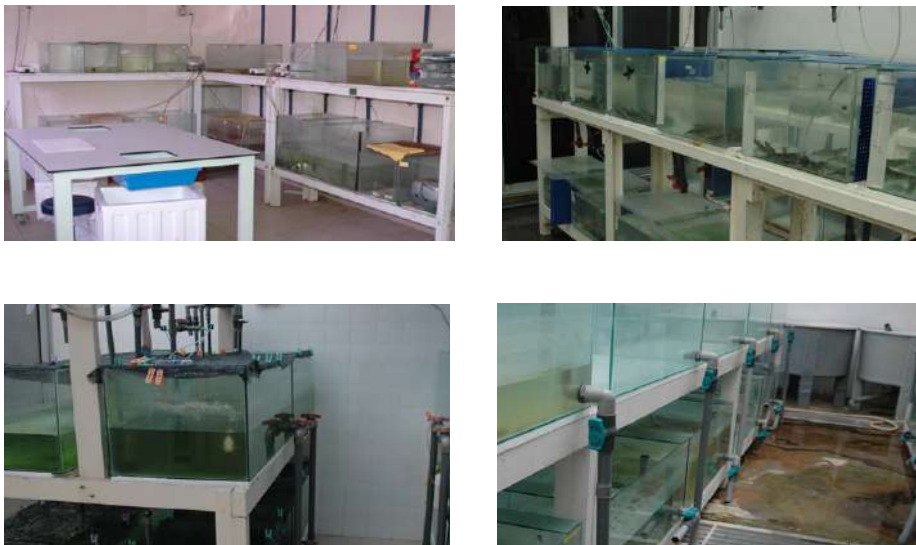
Makmal yang dilengkapi dengan peralatan dan *probe* yang berteknologi tinggi untuk menganalisa kualiti air dari aspek fizikal dan biokimia untuk kajian parameter kualiti air yang berhubung rapat dengan kesihatan ikan (Gambar 3). Kajian terperinci kualiti air membantu dalam kajian epidemiologi penyakit ikan.

8.1.4 Peningkatan makmal specimen kajian

Makmal dipertingkatkan dengan menambah 2 *Freezer (-80°C)* dan 2 penghawa dingin yang berkuasa tinggi, untuk menampung spesimen hasil kajian dari aspek bakteriologi seperti isolat-isolat bakteria, stok *cell-culture* dan sampel tisu (Gambar 4).

8.1.5 Peningkatan peralatan makmal

Peralatan makmal yang ditingkatkan untuk kemudahan dan kelancaran projek seperti mikroskop, *mikrocentrifuge*, *microtome*, *incubator*, *autoclave oven*, ELISA reader, PCR, mikro pipette dan sebagainya diperolehi bagi melancarkan kajian projek (Gambar 5).



Gambar 1: Makmal basah untuk kajian (*Experimental Wet Lab.*)



Gambar 2: Makmal biologi molekul.



Gambar 3: Makmal kualiti air



Gambar 4: Peningkatan Makmal Spesimen Kajian



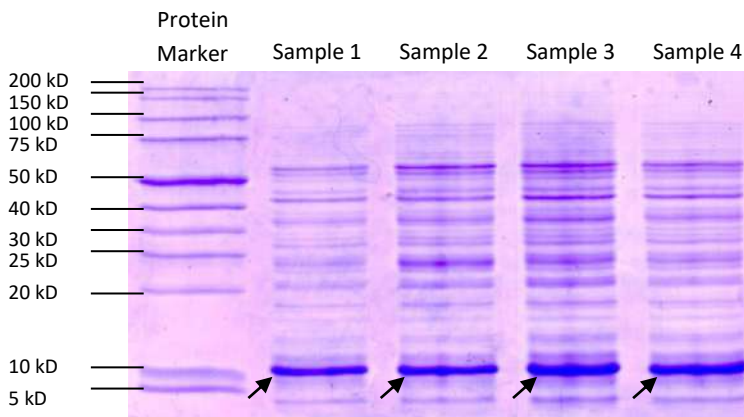
Gambar 5: Peningkatan Peralatan Makmal

8.2 Pencapaian Bukan Fizikal

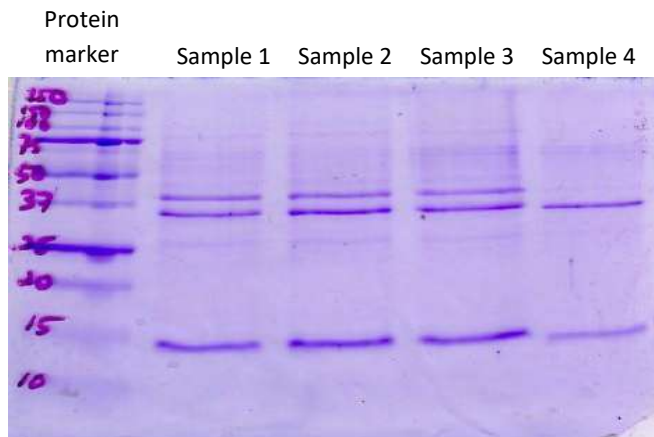
8.2.1 Projek 1: Pembangunan vaksin bakteria (*Streptococcus*) pada ikan tilapia

8.2.1.1 Kaedah pencirian molekular untuk *Streptococcus agalactiae*

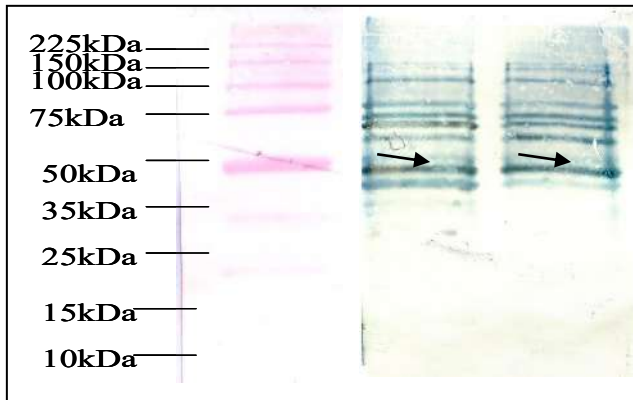
Identiti patogen *Streptococcus agalactiae*, bakteria Gram +ve, yang menyebabkan penyakit Streptococcosis pada ikan tilapia disangkar telah berjaya dicirikan dan maklumat berkaitan protein yang sesuai dan berpotensi untuk dijadikan vaksin.



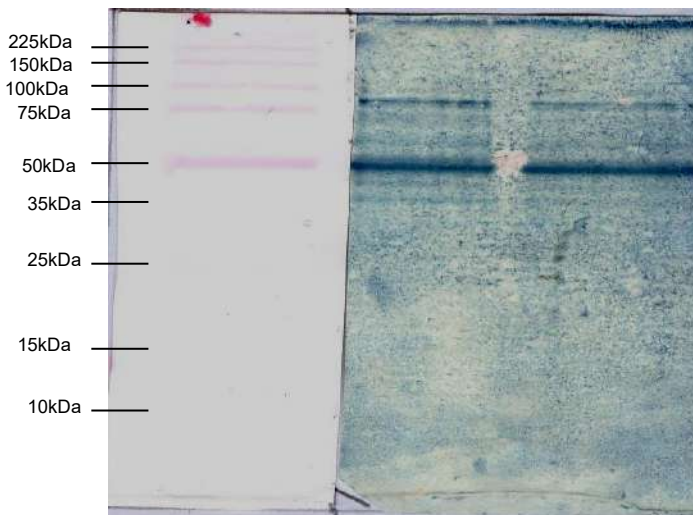
Whole Protein of Streptococcus agalactiae



Outer Surface Protein of Streptococcus



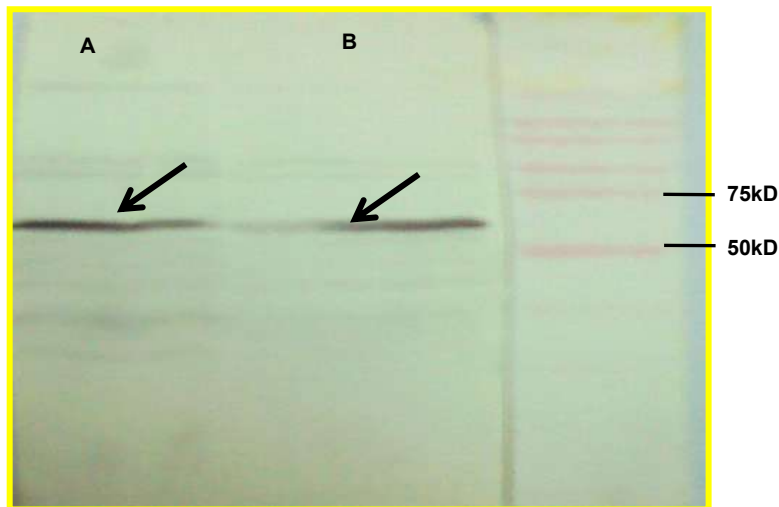
Whole cell Protein of S. agalactiae (after immunodetection)



Outer Surface Protein of S. agalactiae (after immunodetection)

8.2.1.2 Kaedah molekular menghasilkan `recombinant vaccine`

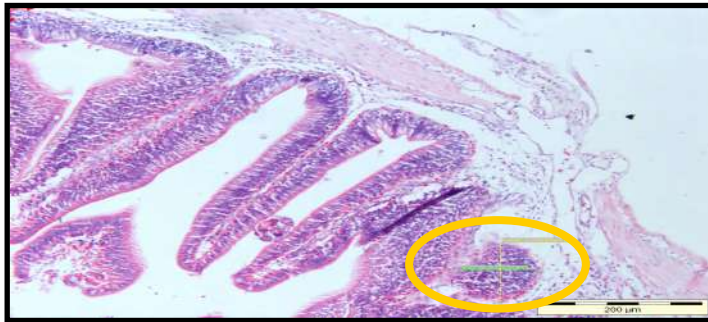
Proses molekular yang rumit, kompleks, sistematik dan berterusan selama setahun diperlukan untuk menghasilkan vaksin yang spesifik dan efektif untuk mengawal penyakit tersebut. Antara proses-proses yang telah dijalankan adalah penentuan protein yang paling antigenik melalui SDS-PAGE dan Western Blot, penjujukan strain, pengklonan dan pengekspresan gen.



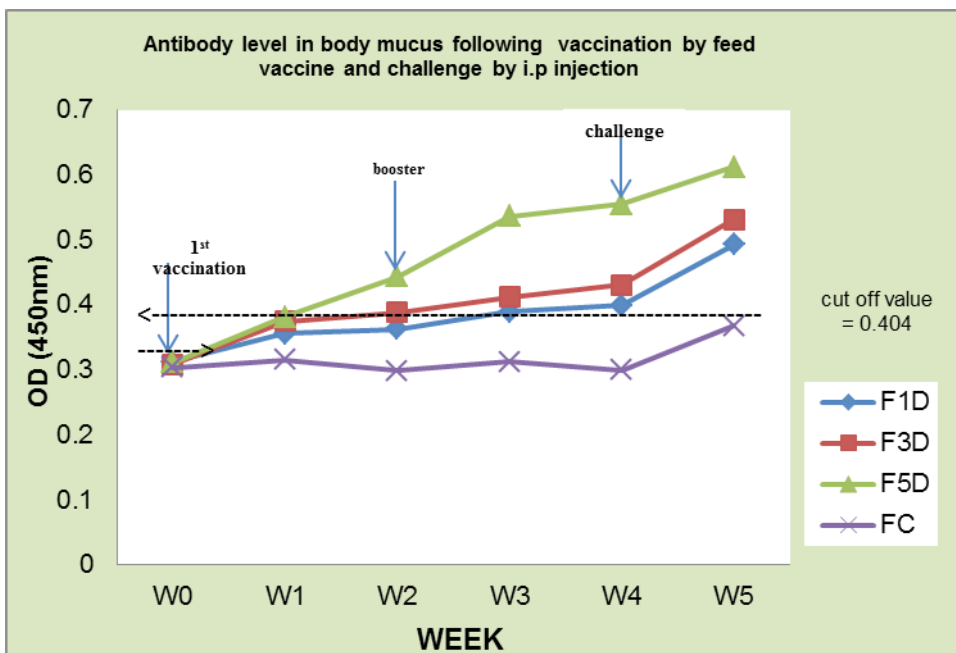
Western blots of BL21 *E.coli* clone PET32Ek/Lic (Lane A&B) expressing Recombinant OMP48 protein. Immunoblotting of the protein of BL21 *E.coli* clone PET32Ek/Lic (Lane A) were analyzed using rabbit antiserum against the whole cell protein of *Streptococcus agalactiae*. Immunoblotting of the protein of BL21 *E.coli* clone PET32EK/Lic (LaneB) were analyzed using rabbit antiserum against 48kDA protein of *Streptococcus agalactiae*. Broad range Protein weight markers (Promega) were used. The resulting Western Immunoblots showed that the protein of 48kDa was present in both lanes.

8.2.1.3 Kaedah penentuan imuniti mukosa (ketahanan) ikan tilapia terhadap penyakit Streptococcosis.

Kaedah kajian secara histologi telah dapat memperlihatkan perubahan pada tisu usus ikan dengan penghasilan 'Gut-associated Lymphoid Tissues (GALT)' dan kaedah kajian paras antibodi di dalam mukus pada badan ikan melalui penggunaan teknik ELISA sebagai hasil tindak balas imuniti mukosa selepas pemberian vaksin.



GALT telah terhasil di dalam usus ikan tilapia hasil tindak balas imuniti mukosa selepas pemberian vaksin seperti di dalam bulatan. (H&E x200)

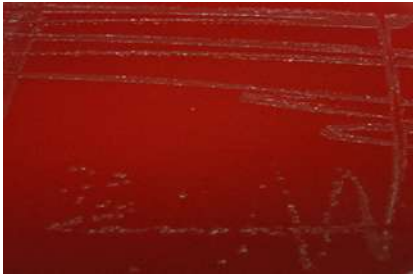


Kenaikan paras antibodi dalam mucus badan ikan setelah divaksinasi (F1D, F3D & F5D) melalui teknik ELISA.

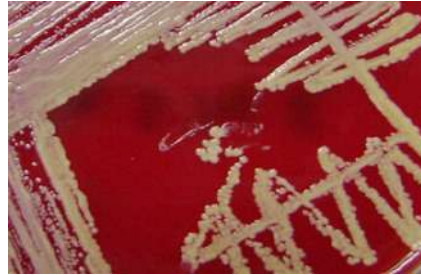
8.2.1.4 Jangkitan Streptococcosis pada tilapia dan parameter kualiti air

Input dan pengumpulan data maklumat penyakit berkaitan selama 2 tahun tempuh kajian memberi maklumat yang dapat dijadikan sebagai satu pangkalan data yang komprehensif. Analisis data memberi maklumat yang mendalam dan terperinci seperti berikut:-

- i. Telah dapat mengenalpasti patogen sebenar yang menjadi punca penyakit Streptococcosis iaitu ***Streptococcus agalactiae*** dan juga oportunistik bakteria seperti ***Staphylococcus spp.***



S. agalactiae



Staphylococcus sp.

- ii. **Tanda tanda klinikal yang spesifik** pada tilapia yang menghadapi Streptococcosis seperti sebarang perubahan abnormal pada **mata** terutamanya 'pop-eye', **kemerahan pada bahagian pektoral dan perut dan berenang berpusing-pusing.**



Pop eye



Kemerahan pada perut

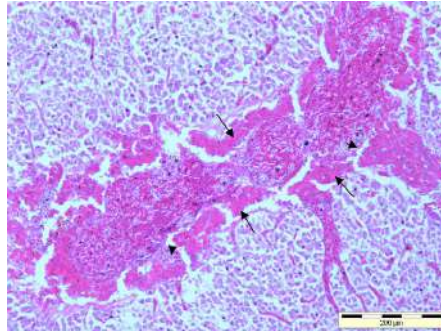


Kemerahan pada opercula dan sirip pektoral

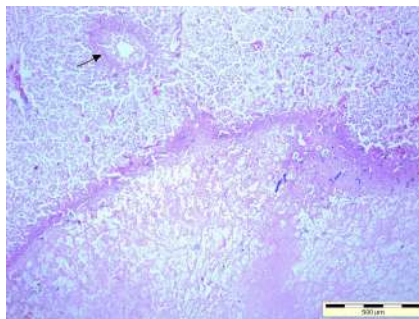


Berenang berpusing-pusing

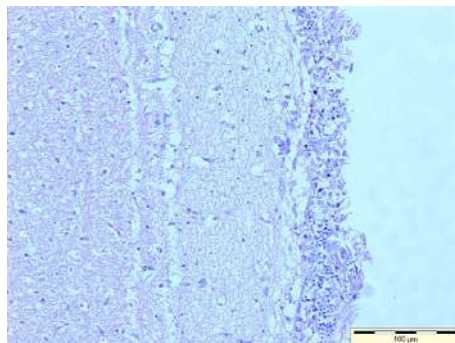
- iii. **Histopatologi memperlihatkan perubahan abnormal tisu seperti 'meningoencephalitis' di otak yang menyebabkan ikan berpusing-pusing.**



Liver of a red tilapia naturally infected by S. agalactiae showing congested blood vessels with swollen endothelium (arrows) and thrombosis. Note the purple discoloration in the vessels consistent with bacterial colonies (arrowheads). HE.

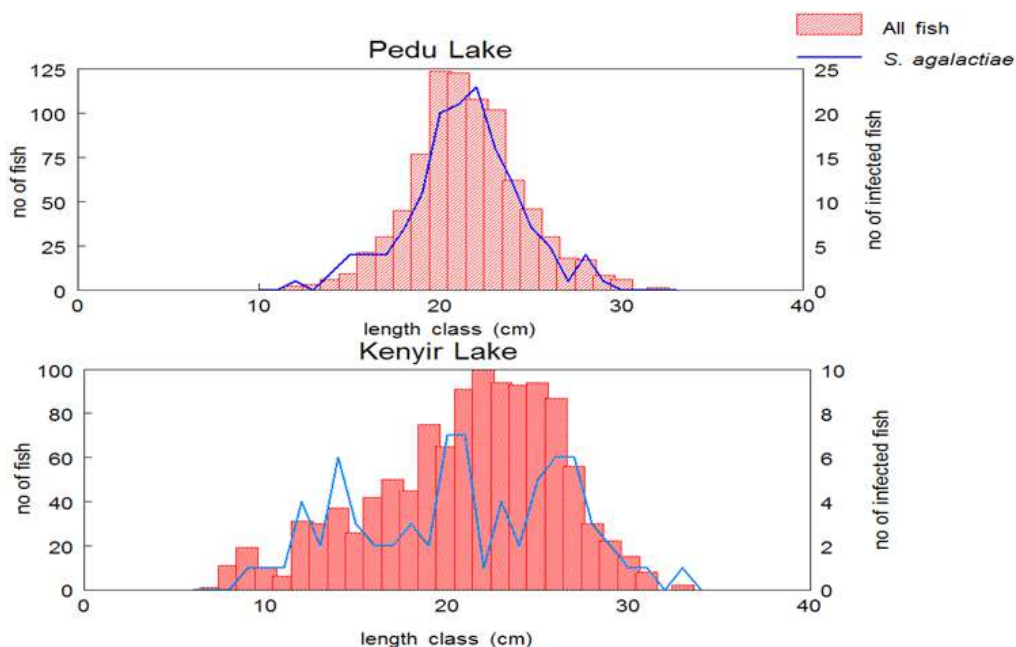


Liver of a red tilapia naturally infected by S. agalactiae showing extensive infarction of tissue adjacent to an affected blood vessel (arrow). HE.



Meninges of a red tilapia naturally infected by S. agalactiae showing thickening due to infiltration of heterophils. HE.

- iv. Patogen ***Streptococcus agalactiae*** tidak dapat dipencilkan dari tilapia yang mempunyai **tanda klinikal yang extreme/serius**.
- v. Ikan tilapia yang melebihi 150g sahaja yang diserang jangkitan **Streptococcosis, terutamanya 250g ke atas**.

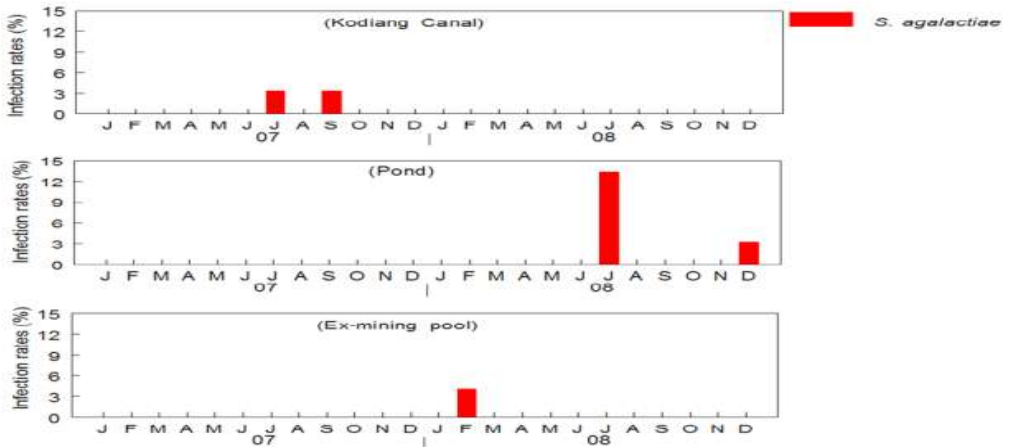


- vi. Patogen ***Streptococcus agalactiae*** selalunya tidak dapat dipencil dari ikan tilapia di peringkat benih dan rega jika menggunakan cara pencilan konvensional.

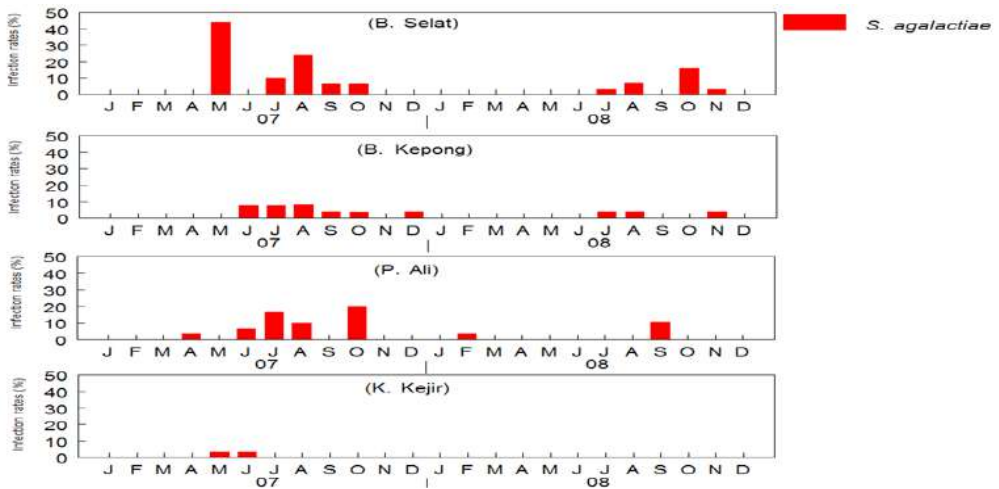
8.2.1.5 Data epidemiologi penyakit Streptococcosis

Input data epidemiologi Streptococcosis terhadap tilapia mengkaji penyakit ini di beberapa populasi ternakan sangkar dan kolam yang menggunakan sistem perairan yang berbeza. Data merangkumi data jangkitan, patogen, parameter kualiti air di tapak kajian, saiz ikan, dan faktor risiko lain seperti taburan hujan dan kaedah pengurusan ternakan selama tempoh 2 tahun. Pengkalan data yang komprehensif ini setelah dianalisa secara statistik telah mengenalpasti :-

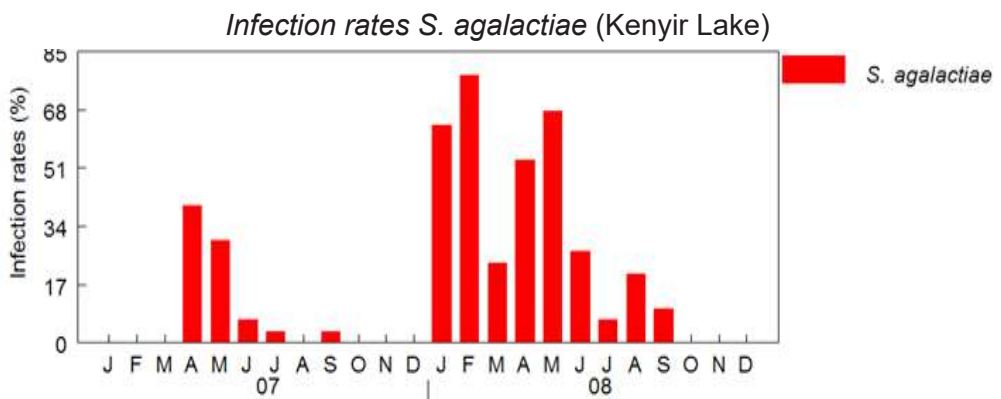
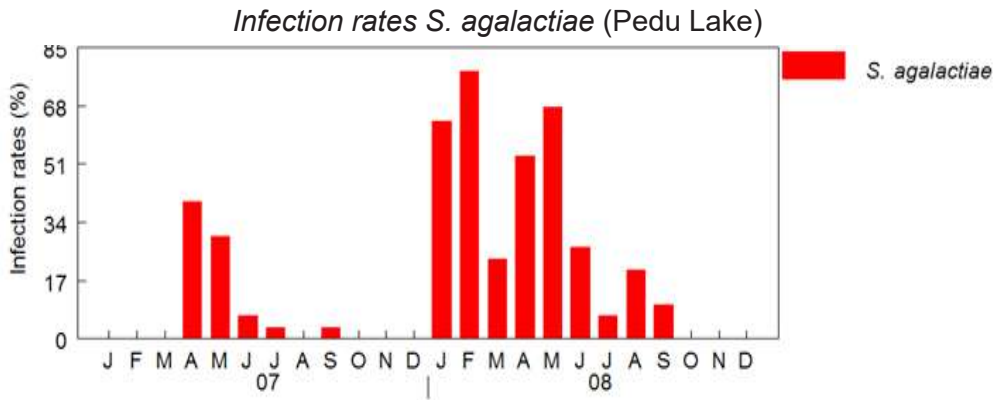
- i. Dari 11 tapak kajian ke atas populasi ternakan tilapia yang beroperasi di sistem perairan yang berbeza, hanya **tasik dan sungai yang mempunyai peratus jangkitan yang tinggi, kurang di kolam, terusan dan bekas lombong.**



Peratusan jangkitan di pengairan MADA, kolam dan bekas lombong

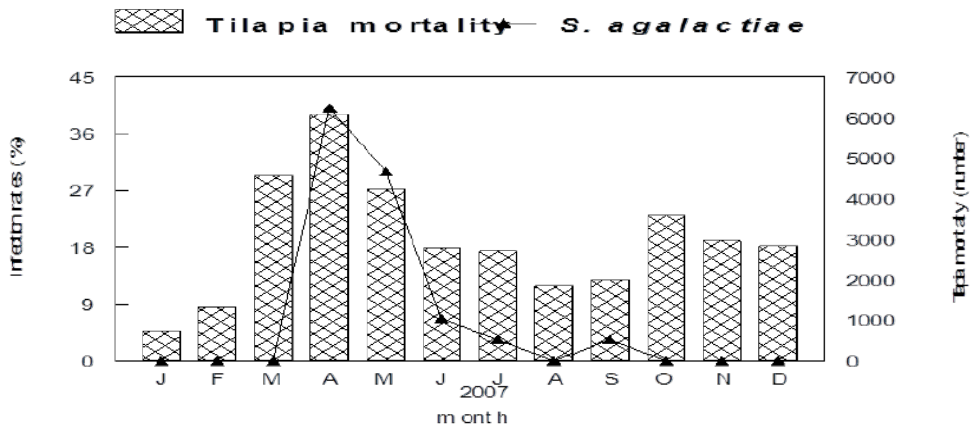


Peratusan jangkitan di Sg Terengganu



Peratus jangkitan di tasik

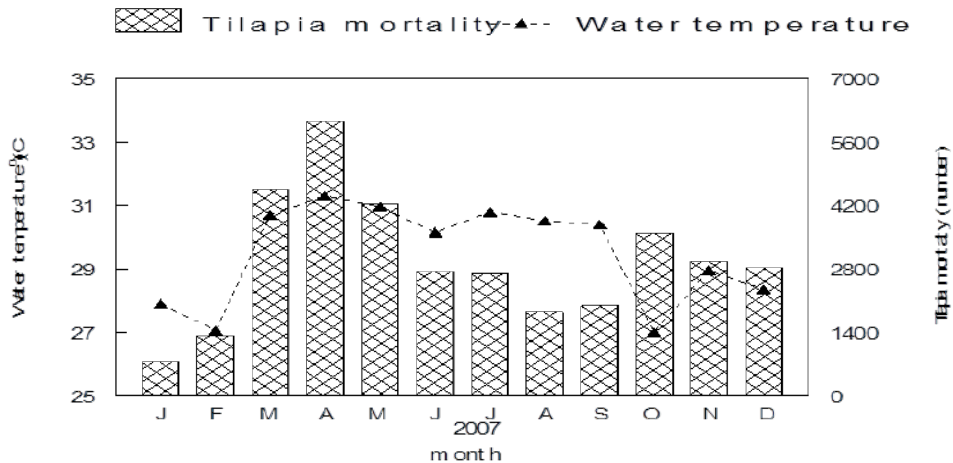
- ii. **Peratus jangkitan Streptococcosis terhadap tilapia lebih tinggi dan ketara di tasik diikuti oleh sungai jika dibandingkan dengan sistem perairan yang lain.**
- iii. **Ciri fizikal tasik termasuk kualiti airnya yang tidak dapat dikawal di pihak pengurusan menyebabkan ternakan mudah terdedah kepada jangkitan.**
- iv. **Peratus kematian sehingga 30-50% berkait secara langsung dengan peratus jangkitan penyakit dilihat dalam ternakan di tasik.**



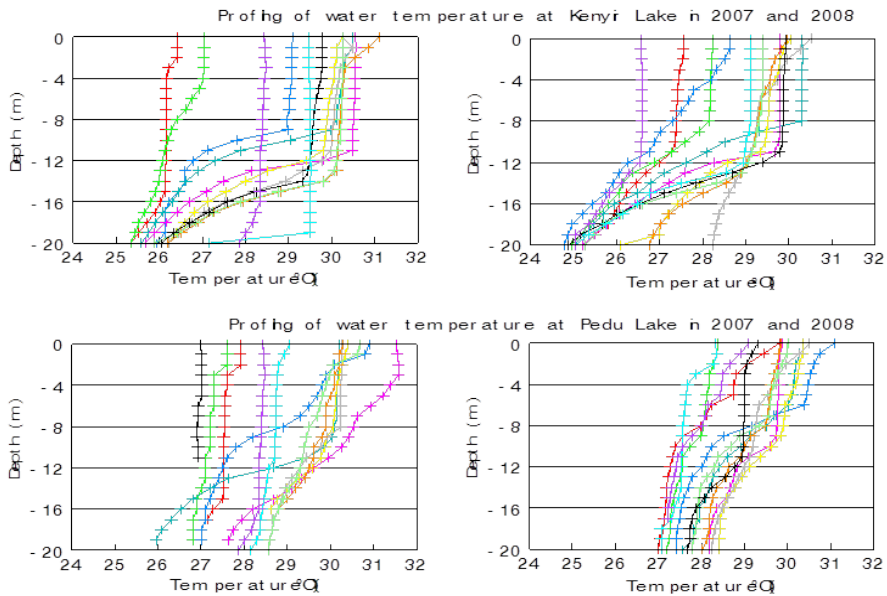
- v. **Parameter kualiti air menjadi faktor utama yang menjadi tekanan/ stress** kepada ternakan sangkar tilapia di tasik dan sungai.

Sampling sites	The strong of association between prevalence of <i>S. agalactiae</i> and water quality parameters (Pearson's Correlation, $p < 0.05$)
<i>Irrigation canal</i>	-
<i>Pond</i>	-
<i>Ex-mining pool</i>	-
<i>B. Selat</i>	<i>Temperature</i> ($r=0.5404$), <i>water conductivity</i> ($r=0.4083$)
<i>B. Kepong</i>	<i>NH3</i> ($r=0.5018$), <i>water conductivity</i> ($r=0.5352$), <i>dissolved iron</i> ($r=0.6420$)
<i>P. Ali</i>	<i>Temperature</i> ($r=0.4298$), <i>NH3</i> ($r=0.4796$)
<i>K. Kejir</i>	-
<i>Pedu Lake</i>	<i>Temperature</i> ($r=0.5444$), <i>pH</i> ($r=0.5862$)
<i>Kenyir Lake</i>	<i>Temperature</i> ($r=0.6312$), <i>water turbidity</i> ($r=0.7232$)

- vii. Hubungkait secara langsung antara peratus jangkitan **Streptococcosis** dengan suhu air yang tinggi melebihi 30°C, terutama peralihan ke musim kemarau atau kualiti/suhu air yang berubah-ubah.



- viii. **Dua kritikal paten pada peratus jangkitan Streptococcosis yang tinggi pada tilapia dalam setahun yang bermula pada bulan April-Jun (September - Oktober)**
- ix. **Faktor pengurusan ternakan yang kurang menekankan pengurusan kesihatan ikan dalam ternakan seperti 'stocking density', regim pemakanan dan pembuangan ikan mati memudahkan jangkitan Streptococcosis.**
- x. **Kesan profil kualiti air di tasik kajian menunjukkan suhu yang tinggi hingga kedalaman air mencecah 12 m di musim tertentu, juga menjadi faktor tekanan terhadap jangkitan Streptococcosis pada tilapia.**



- xi. Sistem perairan yang dapat dikawal pengurusan airnya seperti di kolam lebih mudah untuk mengawal jangkitan **Streptococcosis pada tilapia.**

8.2.1.6 Kajian patogenisiti *Streptococcus agalactiae* terhadap tilapia.

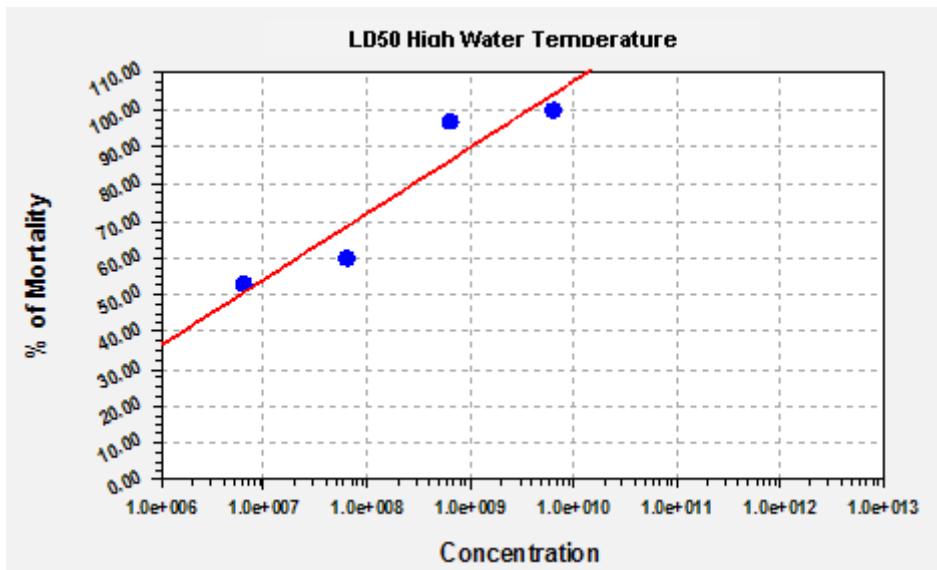
Kajian dimakmal menunjukkan *Streptococcus agalactiae* sebagai punca patogen penyebab jangkitan Streptococcosis kerana tanda-tanda klinikal yang sama seperti yang dapat dilihat di tapak kajian. LD 50 juga telah dapat ditentukan.

8.2.1.7 Kajian pengawalan jangkitan Streptococcosis melalui penggunaan `Whole-cell Killed Vaccine (FNV)' dan `Adjuvant Whole-cell Killed Vaccine (FAV)'.

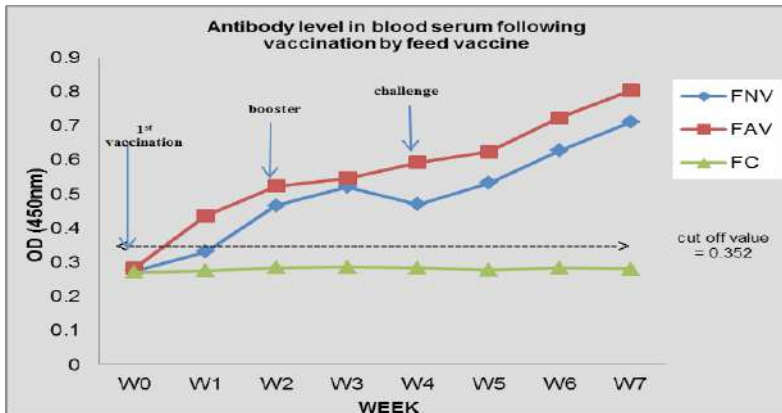
Kajian dapat menentukan perlindungan yang diberikan oleh vaksin FAV dan FNV setelah dicabar dengan *S. agalactiae* hidup secara intraperitonium dan kesan terhadap imuniti sel pada ikan melalui tahap antibodi dalam serum (IgM/IgG).



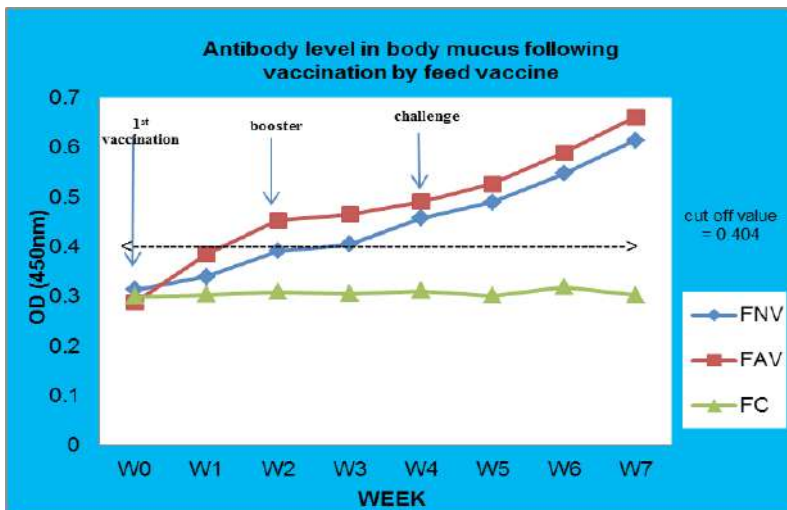
Tanda-tanda klinikal yang diperhatikan pada ikan-ikan ketika kajian patogenesisiti adalah sama seperti yang dapat dilihat di tapak kajian seperti exophthalmia pada mata (gambar kiri) dan keradangan pada operkulum (gambar kanan).



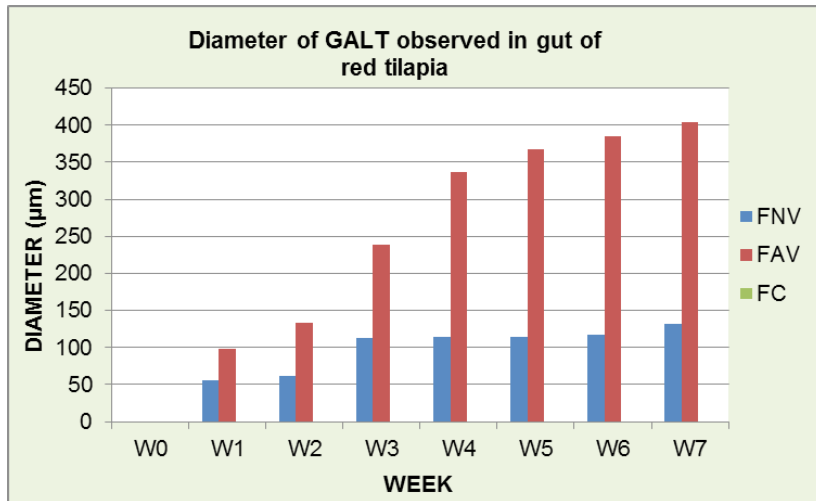
Ld_{50} bagi ikan yang disuntik secara intraperitonium (i.p) pada pelbagai kepekatan *S. agalactiae* dan dibela didalam air bersuhu tinggi ($33^{\circ}C$) adalah 5.7×10^6 dalam masa 12 jam.



Paras antibodi serum pada kumpulan ikan yang divaksinasi dengan vaksin FAV didapati lebih tinggi berbanding yang divaksinasi dengan FNV, manakala tiada pertambahan paras antibodi diperhatikan pada kumpulan ikan yang tidak divaksinasi (FC)



Paras antibodi mukus pada kumpulan ikan yang divaksinasi dengan vaksin FAV didapati lebih tinggi berbanding yang divaksinasi dengan FNV, manakala tiada pertambahan paras antibodi diperhatikan pada kumpulan ikan yang tidak divaksinasi (FC)



Kumpulan	Kadar Kemandirian (%)
FNV	50
FAV	100
FC	12.5

Peratusan hidup dikalangan ikan yang divaksinasi dengan vaksin FAV, FNV dan ikan yang tidak divaksinasi setelah dicabar dengan *S. agalactiae* hidup secara suntikan intraperitonium.

8.2.1.8 Kajian aplikasi vaksin dengan 'route of administration'

Kajian kekerapan semburan telah dilakukan bagi menentukan tindak balas antibodi ikan terhadap Formalin-Killed Cell (FKC) bakteria *Streptococcus agalactiae*. Kajian menunjukkan semburan sekali sudah mencukupi untuk merangsang penghasilan antibodi ikan terhadap penyakit streptococcosis. Hasil daripada kajian ini, satu lagi kajian telah dilakukan bagi menentukan keberkesanan kaedah pemvaksinan melalui semburan (spray) dapat memberi perlindungan kepada ikan apabila didedahkan dengan penyakit streptococcosis. Hasil kajian mendapati 80% ikan dapat hidup setelah didedahkan dengan penyakit tersebut.

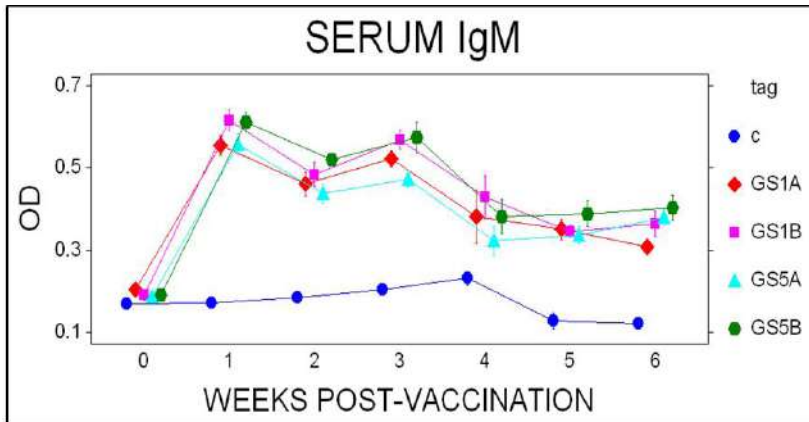


Fig. 1. Serum IgM responses following spray exposures to FKC of *Streptococcus agalactiae*.

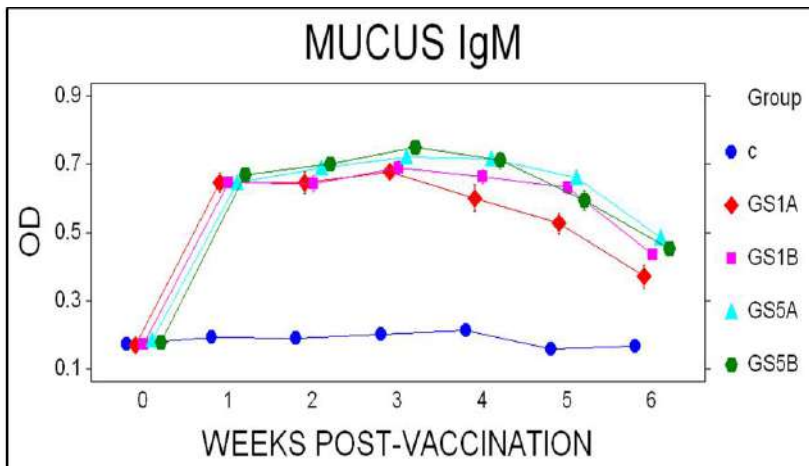


Fig. 2. Mucus IgM responses following spray exposures to FKC of *Streptococcus agalactiae*.

Kajian keberkesanan vaksinasi secara rendaman (immersion) selama 1 minit atau 10 minit turut dijalankan. Didapati rendaman selama 1 minit mencukupi bagi merangsang penghasilan antibodi ikan terhadap penyakit streptococcosis. Kajian selanjutnya dijalankan bagi menentukan keberkesanan kaedah tersebut bagi memberi perlindungan kepada ikan apabila didedahkan dengan penyakit streptococcosis. Hasil kajian mendapati 90% ikan dapat hidup setelah didedahkan dengan penyakit tersebut.

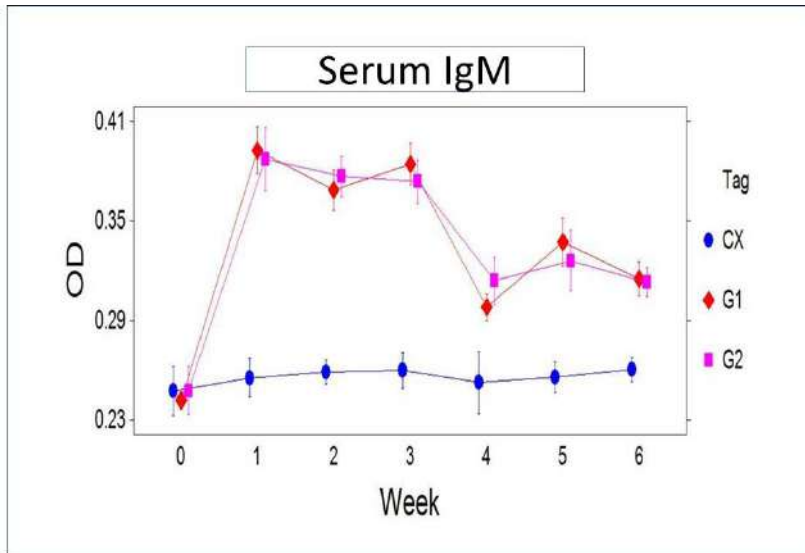


Fig. 3. Serum IgM responses following immersion exposure to FKC of *Streptococcus agalactiae*.

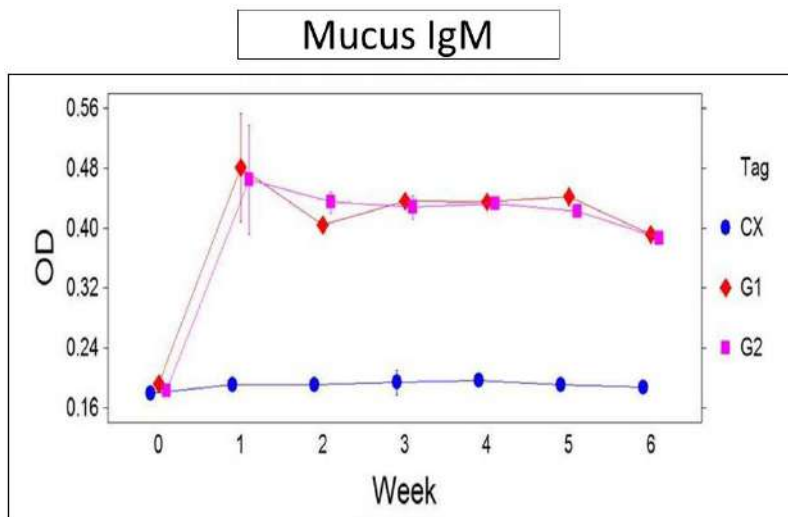


Fig. 4. Mucus IgM responses following immersion exposures to FKC of *Streptococcus agalactiae*.

Aplikasi melalui **makanan** didapati **mampu meningkatkan ketahanan ikan tilapia** terhadap **Streptococcosis** dan cara ini juga **lebih praktis dan mudah** dikendalikan.

8.2.2 Projek 2: Pembangunan vaksin parasit *C. irritans*

8.2.2.1 Penghasilan parasit *C. irritans* dalam makmal

Sebanyak 32 kali pembangunan parasit telah berjaya dilakukan. Jumlah keseluruhan penghasilan parasit *C. irritans* dalam makmal bagi setiap kali pembangunan adalah antara 800,000 hingga 1,000,000 parasit.



Proses stimulasi suhu untuk pembangunan parasit pada perumah ikan.



Parasit pada badan(bintik putih) pada perumah ikan yang berjaya dibangunkan



Parasit peringkat `whole cell *C. irritans*' yang berjaya dikutip sebelum pembersihan dan proses pengeraman dalam inkubator

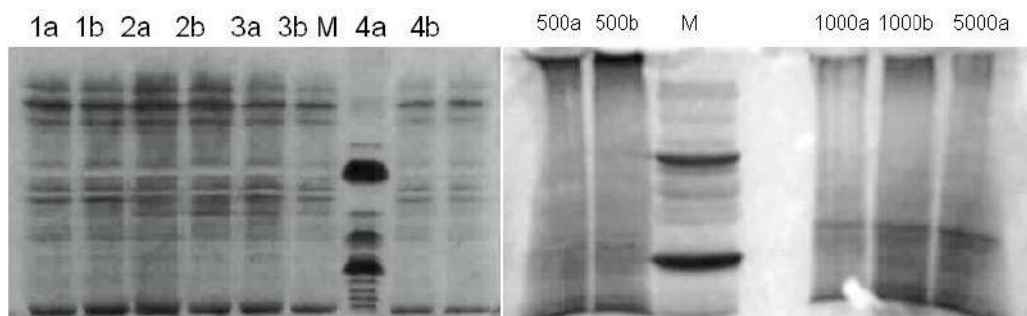
8.2.2.2 Pembangunan data antigenik protein `whole cell *C. irritans*'

- i. Pembangunan kaedah pengekstrakan protein berjaya dilakukan melalui kaedah manual. Walau bagaimanapun, pengekstrakan protein melalui kit yang sedia ada tidak berjaya kerana kit sedia ada bersifat tidak spesifik.



Proses pengekstrakan protein dengan kaedah manual

- ii. Pembangunan profil antigen protein yang antigenik daripada `whole cell *C. irritans*' melalui kaedah SDS-PAGE gel dan `western-blot' melibatkan protein yang diekstrak dari peringkat jangkitan `theront' dan peringkat sista. Profile protein dari peringkat sista menunjukkan 12 jalur protein pada SDS-PAGE gel dengan 5 jalur protein yang konsisten di bawah `western blot'. Bagi jangkitan `theront', hanya 2 jalur protein dan satu jalur protein yang konsisten di bawah `western blot'.



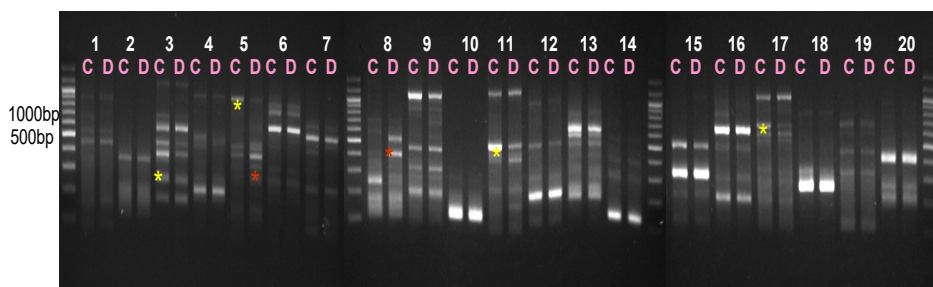
Pengekstrakan protein dari *C. irritans* selepas diwarna dengan Coomassie blue(a) protein dari sista dan (b). Protein dari peringkat jangkitan *C. irritans*.

- iii. Pembangunan profile antigenik protein daripada 'whole cell *C. irritans*' melalui keadah 2D-Gel dan 'immunoblotting' memperlihatkan lebih banyak jalur protein yang antigenik. Analisis protein peringkat sista menunjukkan lebih 20 bintik protein dan 12 daripadanya adalah antigenik. Hanya satu bintik protein dipilih iaitu protein 66kDa untuk tujuan jujukan. Hasil jujukan dan Blast protein melalui protein bank menunjukkan *C. irritans* mempunyai 'Cap50' (capsular polysaccharide biosynthesis protein putative). Pengklonan jujukan protein ini tidak berjaya dilakukan selepas percubaan pertama pengklonan gagal. Percubaan kedua tidak dilakukan memandangkan tiada peruntukan khusus pada tahun 2010.

8.2.2.3 Kaedah pengepressan gen terpilih

Peningkatan matlumat saintifik mengenai ikan yang tahan serangan penyakit *C. irritans* melalui kaedah RT-PCR melalui pembangunan gen yang tahan serangan *C. irritans*. 'Differentially Expressed Genes (DEGs)' di insang ikan siakap yang sembuh selepas 7-hari jangkitan *C. irritans* dibandingkan dengan ikan kawalan (tidak dijangkiti oleh *C. irritans*) menunjukkan terdapat 8 DEGs (Rajah 2). Hasil pengklonan 8 DEGs tersebut, 3 DEGs adalah 'unknown cloned genes' manakala 5 klon gen lagi mempunyai jujukan yang sama dengan GenBank. Analisis RT-PCR mengesahkan 5 gen yang diketahui merupakan gen yang diexpresskan pada ikan siakap yang sembuh selepas 7-hari jangkitan *C. irritans*. Lapan

DEGs yang ditemui dalam kajian ini adalah berpotensi untuk dicalonkan sebagai penunjuk marker untuk pemilihan stok ikan siakap yang tahan serangan *C. irritans*.



‘Differentially Expressed Genes (DEGs)’ yang diperolehi melalui ‘GeneFishing DEG Premix kit’: 5 dari kawalan ikan dan 3 dari ikan yang sembuh selepas dijangkiti oleh *C. irritans* * - ‘Overexpressed genes’ di insang ikan kawalan (C), * - ‘Overexpressed genes’ pada ikan yang sembuh selepas diserang *C. irritans*(D)

9.0 Peningkatan kemahiran dan kepakaran

Pembangunan kapasiti dan keupayaan sangat diperlukan dalam industri akuakultur dalam mengendalikan pengurusan kesihatan ikan dalam akuakultur. Kepakaran yang diperolehi di NaFisH dapat juga membantu penternak dalam menjalankan pengurusan ternakan yang akan menerapkan ‘Best Aquaculture Practises’.

Melalui program ini kajian yang dirancang dijadikan sebagai tesis kajian untuk penuntut Program Sarjana dan PhD telah berjaya dilaksanakan.

9.1 Bidang Kesihatan ikan

a) PhD- 3 pelajar dalam aspek:-

- i) Nur Nazifah bt. Mansor, PhD, UPM- Molecular Biologi bagi Pembangunan vaksin *Streptococcus agalactiae* (recombinant).
- ii) Mohammad Noor Amal bin Azmai, PhD, UPM- Epidemiologi penyakit Streptococcosis pada tilapia di sangkar dalam sistem perairan yang berbeza.
- iii) Yoges Lokanathan, PhD, UKM-Immunologi bagi *Cryptocaryon irritans* recombinant proteins as potential antigens for sero-surveillance of cryptocaryonosis.

b) MSc- 5 pelajar dalam aspek:-

- i) Mohd Firdaus bin Nawawi, Master Sc, UPM-Immunologi bagi mengkaji keberkesanan pengawalan Streptococcosis secara oral atau pemberian makanan.
- ii) Noraini bt. Omar@Isa, Master Sc, UPM - Immunologi bagi mengkaji keberkesanan pengawalan Streptococcosis secara spray dan immersion (semburan dan rendaman).
- iii) Saidatul Atyah bt Appendei Master Sc, UPM - Molecular Biologi bagi Pembangunan vaksin *Staphylococcus aureus*.
- iv) Khoo Choon Kiat, Master Sc. UKM. – Molecular Biologi bagi Transcriptome analysis of *Lates calcarifer* immune response towards *Cryptocaryon irritans* infection
- v) Norashikin@Suzani Mohd. Shahrudin. Master Sc. UKM. *Gene expression* bagi Expression profile of immune-related gene in *Lates calcarifer* infected by *Cryptocaryon irritans*.

c) Peningkatan kemahiran kakitangan sokongan dalam kerja persampelan di lapangan dan makmal, yang melibatkan aspek pencilan patogen dari ikan dan pengenalan pastiannya di makmal, juga persampelan kualiti air dan pembangunan pangkalan data. Membantu pihak Pusat Akuakultur Jitra membangunkan model kursus.

- d) Peningkatan kemahiran dalam analisis data secara saintifik menggunakan statistik dan dihubungkan dengan data yang diperolehi dari makmal bagi kajian epidemiologi.

9.2 Kerjasama dan kemahiran kakitangan

Peningkatan kerjasama dan kemahiran kakitangan melalui kursus singkat dan kursus yang dihadiri seperti berikut:-

- i. Kursus penyakit ikan akuakultur(UMT)
- ii. Kursus hubungkait permasalahan penyakit ikan ternakan dan kualiti air setempat'
- iii. Latihan mengenalpasti bakteria Enteriobacteriaceae
- iv. Kursus immublotting di INFROMN, USM
- v. Kursus pengekstrakan protein di UKM

9.3 Penyertaan dalam seminar / Simposium

Penyertaan dalam sebarang bentuk seminar atau simposium akan meningkatkan keyakinan diri penyelidik dalam kajian dan berpeluang menulis dan membentangkan kajian secara saintifik selain dari aspek berikut:-

- i. Pengetahuan dan kemahiran dalam aspek berkaitan kesihatan haiwan akuatik melalui pendedahan maklumat teknologi terkini yang telah dan sedang dijalankan oleh para saintis lain.
- ii. Mengenal para saintis lain yang juga menjalankan kajian yang sama dan dapat berinteraksi untuk meningkatkan 'networking'.
- iii. Dapat bertukar-tukar fikiran sesama penyelidik jika terdapat masalah yang perlu dibincang dan meningkatkan kefahaman mengenai masalah yang dihadapi supaya kaedah penyelesaian dapat dikenalpasti.
- iv. Merancang dan mengenalpasti aspek kajian yang perlu diberi penekanan bersama agensi penyelidikan yang berkaitan supaya dapat diperkembangkan.
- v. Merancang kerjasama atau 'collaborative research work' bersama pihak yang berkaitan untuk mendapat maklumat saintifik yang sebenar.

- vi. Penyertaan seminar di dalam dan luar Negara telah dapat memberikan maklumat yang terkini mengenai masalah Streptococcosis dan kryptokaryoniasis yang juga dijalankan oleh pihak berkaitan di luar Negara.

Sehingga 2010, sebanyak 18 penyertaan dalam sebarang bentuk seminar atau simposium.

	Tahun	2006	2007	2008	2009	2010
1	Kebangsaan	1	1	4	3	4
2	Antarabangsa			4	3	1

9.4 Penerbitan

- a. Najiah, M., Lee, S.W., Nadirah, M., Ruhil, H., Lee, K.L., Wendy, W., Amal, M.N.A., Basiriah, M.K. and Siti-Zahrah, A. (2009) Streptococcosis in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. *Aquaculture Research*, 40:630-632.
- b. Amal A.M.N., Zamri-Saad, M., Siti-Zahrah, A., Zulkafli, R., Misri, S., Nur-Nazifah, M., and Shahidan, H. (2010) Prevalence of *Streptococcus agalactiae* in tilapia kept in different water bodies. *Online J. Vet. Res.*, 14(2):153-162.
- c. Zamri-Saad, M., Amal, A.M.N. and Siti-Zahrah, A. (2010) Pathological Changes in Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Naturally Infected by *Streptococcus agalactiae*. *J. Comp. Path*, 143:227-229.
- d. Amal, M.N.A., Zamri-Saad, M., Zulkafli, A.R., Siti-Zahrah, A., Misri, S., Ramley, B., Shahidan, H. and Sabri, M.Y. (2010) Water thermocline confirms susceptibility of tilapia cultured in lakes to *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(22):2811-2817.
- e. Amal, A.M.N. and Zamri-Saad, M. (2011) Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): a Review. *PERTANIKA Journal of Tropical Agriculture Science*

- f. Wing-Keong Ng, Chik-Boon Koh, Kumar Sudesh and Abdullah Siti-Zahrah (2009). Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 40:1490-1500
- g. M. Firdaus-Nawi, O.Noraini, M.Y. Sabri, A. Siti-Zahrah, M. Zamri-Saad and H, Latifah (2011). The effect of oral vaccination of *Streptococcus agalactiae* on stimulating gut associated lymphoid tissue (GALT) in Tilapia (*Oreochromis spp*). *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34(1): 137-143.
- h. Atyah, M.A.S., Zamri-Saad, M. and Siti-Zahrah, A. (2010) First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Microbiology*, 144 (3-4). pp. 502-504.
- i. Amal, A.M.N., Zamri-Saad, M., Zulkafli, A.R., Siti-Zahrah, A., Misri, S., Ramley, B. and Shahidan H. Water quality influences the susceptibility of red tilapia (*Oreochromis sp.*) to *Streptococcus agalactiae* infection. *Journal of Aquatic Animal Health*.
- j. Khoo CK, Kua BC, Adura MA & Abdul MAM. 2007. Development and fabrication of *Lates calcarifer* cDNA microarray slide. *Malaysiana Journal*.
- k. Kua Beng Chu. 2008. The internal transcribed spacer (ribosomal DNA) of Cryptocaryon irritans isolated from cultured seabass, *Lates calcarifer* in Penang waters. *Journal of Asian Fisheries Science*.21(3):285-292
- l. Khoo, C. K, A.M, Mohd-Adnan Kua, B. C & Abdul Munir, A.M. 2009. Fabrication of *Lates calcarifer* cDNA Microarray Slide. *Sains Malaysiana* 38(4): 609–617

9.5 Pembentangan Lisan dan poster

(i) Peringkat antarabangsa:

- a. Amal, A.M.N., Siti-Zahrah, A., Zulkafli, R., Misri, S., Ramley, A. and Zamri-Saad, M. (2008a). The effect of water temperature on the incidence of *Streptococcus agalactiae* infection in cage cultured tilapia. Proceeding of International Seminar on Management Strategies on Animal Health and Production Control in Anticipation of Global Warming. 3rd-4th June 2008. Surabaya, Indonesia. Pp. 48-51
- b. Amal, A.M.N., Nur Nazifah, M., Siti-Zahrah, A., Sabri, M.Y. and Zamri-Saad, M. (2008b). Determination of the LD50 for *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia and GIFT. Proceeding of 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 12th-14th October 2008. Cairo, Egypt. Pp. 1245-1251.
- c. Amal, A.M.N., Zamri-Saad, M., Siti-Zahrah, A. and Sabri, M.Y. (2008c). *Streptococcus agalactiae* isolation pattern from cage cultured tilapia. Proceeding of 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 12th-14th October 2008. Cairo, Egypt. Pp. 1253-1256.
- a. M. Firdaus-Nawi., M.Y. Sabri., M. Nur-Nazifah., Siti Zahrah, A., M. Zamri-Saad. (2009). *Streptococcus agalactiae* Infection in Tilapia: Role of water temperature, Proceeding of the 1st International Congress on Aquatic Animal Health Management and Disease. 27th – 28th January 2009, Tehran, Iran. Editor: Dr. S. Shamsi.
- b. Amal, A.M.N., Zamri-Saad, M., Siti-Zahrah, A., Nur Nazifah, M., Nurazlan, M., Shahidan, H. (2009). Bacterial isolation pattern from Tilapia infected with *Streptococcus agalactiae*. Proceeding of the 1st International Congress on Aquatic Animal Health Management and Disease. 27th-28th January 2009, Tehran, Iran. Pp. 82.
- c. Amal M.N.A., Zulkafli A.R., Misri S., Zamri-Saad M., Siti-Zahrah A., Ramley B., and Shahidan H. (2010). The significance of water quality profiling on prevalence of *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia. Proceeding of Aquaculture Global Conference 2010, 22th-25th September 2010, Movenpick Resort and Spa, Phuket, Thailand. Pp-150-151.

- d. Nur-Nazifah, M, M.Y.Sabri, M. Zamri-Saad, Siti-Zahrah, A, Amal, A.M.N. (2010). Multiplex PCR Detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus*. Proceeding of Aquaculture Global Conference 2010, 22th-25th September 2010, Movenpick Resort and Spa, Phuket, Thailand. Pp. 167
- e. M. Nur-Nazifah., M.Y. Sabri., M. Zamri-Saad., Siti Zahrah, A., M. Firdaus-Nawi. (2008). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD): powerful method to differentiate *Streptococcus agalactiae* strains. The Seventh Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 22nd – 26th June 2008, Taipei, Taiwan. Pp 227
- f. M. Firdaus-Nawi., M.Y.Sabri., M. Zamri-Saad., Siti-Zahrah, A., M. Nur-Nazifah (2008). Stimulation of Gut associated lymphoid tissues (GALTs) by live and killed *Streptococcus agalactiae* in Tilapia. The Seventh Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 22nd – 26th June 2008, Taipei, Taiwan. Pp 173.

(ii). Peringkat kebangsaan:

- a. Siti-Zahrah, A., Shahidan, H., Wan Norazlan, G., Amal, M.N.A., Nur-Nazifah, M. and Misri, S. (2008). Isolation of *Staphylococcus spp.* in cage cultured tilapia of different water bodies. Proceeding of National Fisheries Symposium, 14th-16th July of 2008, Wisma Darul Iman, Kuala Terengganu, Malaysia
- b. Siti-Zahrah, A., Zamri-Saad M., Zulkafli, A.R., Sabri, M,Y., Amal, A.M.N., Misri, S., Norazlan, G.W., and Nur-Nazifah M., (2009). Prevalence and significant of Streptococcosis in cage cultured red tilapia of West Malaysia. Proceeding of Asian Pacific Aquaculture Conference, 4th-6th November of 2009, PWTC Kuala Lumpur. Pp. 49.
- c. Zulkafli, A.R., Amal, M.N.A. and Misri, S. (2009). The effect of water quality and fish sizes on the susceptibility of red tilapia in floating net cages to *Streptococcus agalactiae* infection. Proceeding of Asian Pacific Aquaculture Conference, 4th6th November of 2009, PWTC Kuala Lumpur. Pp. 78.

- d. M. Firdaus-Nawi., M.Y. Sabri, O. Aini, M.Y. Hanan, A. Siti Zahrah and M. Zamri-Saad. (2009). Mucosal immune response following oral vaccination against *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia (*Oreochromis spp.*). Asian Pacific Aquaculture 2009. 3rd-6th November 2009, Kuala Lumpur, Malaysia. Pg. 26.
- e. Nur-Nazifah, M., Sabri, M.Y., Amal, M.N.A., Latifah, H. and Siti-Zahrah, A. (2009). Isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from *Oreochromis spp.* at Broga, Semenyih, Malaysia. Proceeding of the 21st Malaysian Veterinary Annual Conference, 8th-9th August 2009, Port Dickson, Negeri Sembilan, Malaysia. Pp. 360-362.
- f. O. Noraini, M.Y.Sabri, A. Siti-Zahrah, M. Zamri-Saad (2009) Induction Of IgM Production in Tilapia By Spray Administration Of *Streptococcus agalactiae*. Proceeding of Asian Pacific Aquaculture Conference, 4th-6th November of 2009, PWTC Kuala Lumpur.
- g. Khoo CK, Abdul Munir AM, Kua BC and Adura Mohd-A. Transcriptome respond of Late *calcarifer* following *Cryptocaryon irritans* infections. *Paper presented as oral presentation at the National Fisheries Symposium, 26-28 June. 2006 Kuching, Sarawak*
- h. Khoo C.K, Abdul Munir A.M. Kua BC and Adura M.A. 2007. Transcriptome analysis of *Lates calcarifer* in response to *Cryptocaryon irritans* infection. *Paper submitted as poster presentation for 43rd MSPTM Annual Scientific Seminar & Centenary Celebration of the royal society of tropical medicine and Hygiene (UK).*
- i. Kua Beng Chu. Identification of resistant candidate gene(s) of fish protozoan, *Cryptocaryon irritans* in sea bass (*Lates calcarifer*) fingerlings. *Paper submitted to 7th Symposium in Asian Diseases Aquaculture, 22-26 June 2008, Taipei, Taiwan.*
- j. Khoo, C.K, Abdul Munir A.M, Kua B.C & Adura M.A. Microarray analysis of *Lates calcarifer* immune response following *Cryptocaryon irritans* ectoparasite infection. *Paper presented as poster presentation for the 7th Diseases in Asian Aquaculture Symposium at Taipei, Taiwan on 22-26 June 2008.*

- k. Kua BC and Subha B. Identification of fish protozoan, *cryptocaryon irritans* resistant candidate gene(s) in survived sea bass (*Lates calcarifer*) fingerlings. Paper presented as *poster presentation for the National Biotechnology Seminar at KLCC on May 2010*

10.0 Isu-isu berbangkit

Terdapat perkara yang perlu diberi perhatian dalam mengendalikan projek kajian yang dijalankan seperti perkara berikut:-

- a. **Dana peruntukan kajian di bidang penyakit ikan akuakultur perlu diberi keutamaan dan mencukupi**
- i) Dana yang mencukupi memastikan kajian berjalan lancar tanpa sekatan supaya hasil yang dicapai seperti yang dijangka dalam perancangan.
 - ii) Peruntukan yang mencukupi diperlukan untuk pembelian bahan kimia dan guna pakai yang sangat diperlukan untuk kajian molekular biologi dalam pembangunan vaksin.
 - iii) Peralatan makmal untuk aspek molekular biologi, imunologi dan epidemiologi dalam bidang penyakit ikan perlu dipertingkatkan supaya kajian tidak tertangguh.
 - iv) Persampelan ikan dan kualiti air di tapak kajian memerlukan peruntukan untuk menampung keperluan logistik dan selenggaraan kenderaan pejabat termasuk kereta sewaan.
 - v) Peruntukan yang mencukupi dapat mempertingkatkan kajian yang melibatkan kerjasama di antara agensi dan institut pengajian tinggi.
- b. Kekurangan pegawai dan kakitangan sokongan yang tetap menyebabkan kebergantungan yang tinggi kepada kakitangan kontrak untuk menjalankan kajian yang telah dirancang supaya berjalan lancar.

- c. Sokongan yang kurang memberangsangkan dalam aspek penyertaan pegawai-pegawai di seminar antarabangsa menyebabkan kurang mendapat maklumat teknologi terkini yang dapat dijadikan sebagai panduan untuk merancang projek yang lebih baik.

11.0 Cadangan penilaian

- a. **Kesenambungan kajian pembangunan vaksin dari segi dana peruntukan.**

Projek Pembangunan Vaksin ini telah **memberi hasil yang memuaskan dan memberangsangkan serta bermanfaat untuk NaFisH khususnya dan Jabatan amnya.** Ini memandangkan **matlamat kajian tercapai bagi menghasilkan vaksin yang berpotensi digunakan** bagi mengawal penyakit Streptococcosis pada tilapia. Namun, kajian ini masih di peringkat makmal yang perlu dijalankan di peringkat lapangan. **Oleh itu, projek ini perlu diberi dana peruntukan supaya kajian lanjutan dapat dijalankan tanpa sekatan supaya dapat diuji keberkesanannya di ladang.**

- b. **Pengambilan sumber manusia yang pakar dan berpengalaman sebagai pegawai tetap di NaFisH, yang sudah terlatih dari program Pembangunan Vaksin.**

Pembangunan modal insan iaitu diperingkat PhD dan MSc di dalam bidang penyakit ikan yang mempunyai kepakaran secara langsung sangat berguna dalam mempertingkatkan kejayaan NaFisH. Dengan pengambilan pelajar PhD ini menjadi tenaga pekerja tetap, iaitu sebagai pegawai penyelidik di NaFisH, dapat merancang dan melaksanakan kajian yang setaraf atau lebih baik bagi memperbaiki dan mengawal masalah penyakit ikan dalam akuakultur yang amat kritikal, melalui pengalaman dan bimbingan ketika menjadi pelajar lepasan ijazah. Ini memandangkan NaFisH masih belum mempunyai pegawai penyelidik di bidang kepakaran yang relevan

dengan pembangunan vaksin dalam penyakit ikan. Bidang yang dimaksudkan ialah molekular biologi, epidemiologi dan imunologi termasuk patologi yang sangat diperlukan oleh pihak NaFisH untuk menjadi 'Centre of Excellence' dan 'Reference Laboratory' dalam kesihatan haiwan akuatik dalam industr akuakultur di Malaysia.

12.0 Kesimpulan

Tujuan utama projek ini ialah untuk menghasilkan vaksin yang dapat digunapakai untuk mengawal penyakit tersebut selain dari menghalang jangkitan penyakit Streptococcosis atau kryptokaryoniasis. Kajian juga bertujuan mengetahui punca penyebab penyakit atau patogen serta faktor risiko yang bertanggungjawab memudahkan jangkitan berlaku serta mekanisma jangkitan yang sebenar, saintifik dan terperinci. Melalui maklumat saintifik yang didapati langkah kawalan yang efektif dan praktikal perlu dihasilkan.

Dalam konteks ini analisis keseluruhan mengenai program Pembangunan Vaksin yang menjalankan projek kajian '***Molecular epidemiology and control of Streptococcal infection in cage-culture red tilapia***' telah berjaya dilaksanakan dalam jangka masa yang telah dirancang dan ditetapkan untuk menangani masalah penyakit Streptococcosis terhadap tilapia ternakan sangkar dalam pelbagai 'water bodies' yang berbeza.

Bagi projek kajian pembangunan vaksin parasit *C. irritans*, objektif seperti penghasilan profil protein yang antigenik iaitu sebanyak 12 melalui SDS-PAGE gel dan western blot manakala 20 bintik protein yang antigenik melalui 2d-gel dan 'immunoblotting' dengan satu jujukan protein yang berpotensi untuk diuji telah berjaya dilaksanakan. Penghasilan profil gen untuk ikan siakap yang sembuh dari 7-hari jangkitan *C. irritans* iaitu sebanyak 8 DEGs yang boleh digunakan sebagai petunjuk marker untuk pemilihan stok ikan siakap yang tahan serangan *C. irritans*. Ia juga boleh digunakan untuk tujuan pemantauan bagi stok ikan marin yang dibawa masuk ke Malaysia.

Pencapaian kajian yang memberangsangkan dapat dilihat dari beberapa aspek:-

A. Pendekatan dan reka bentuk kajian yang tepat dan fokus untuk kajian penyakit.

- i) Pendekatan yang melibatkan **kajian `in-situ` di lapangan dan makmal serentak**- membolehkan maklumat yang tepat dan sebenar mengikut sistem perairan yang berbeza-beza diperolehi secara terperinci. Reka bentuk kajian mengambil kira tujuan kajian yang merangkumi semua aspek penting dalam jangkitan penyakit.
- ii) **Persampelan ikan dan kualiti air ditapak kajian dilakukan serentak dalam masa yang sama**- untuk tempoh 2 tahun supaya data jangkitan dan kualiti air yang direkodkan dapat dihubungkan untuk memberi situasi atau gambaran sebenar di mana `critical pattern of infection` dalam semua perairan dapat ditentukan.
- iii) **Kaedah atau metodologi kajian**- yang dijalankan menghasilkan keputusan yang tepat supaya kajian lanjut dapat diteruskan untuk mendapat **output yang dijangkakan untuk diuji di makmal seterusnya di lapangan**.
- iv) **Himpunan data input(database)**- data yang direkodkan memberi maklumat komprehensif mengenai jangkitan Streptococcosis, **kaitan pengurusan ternakan dan mekanisme jangkitan serta faktor risiko atau `stress`** yang menyebabkan jangkitan menjadi serius.

B. Penglibatan kerjasama yang berfaedah antara Institusi Pengajian Tinggi dan Agensi Luar yang berkaitan

- i) **Jalinan kerjasama antara institusi penyelidikan yang mempunyai bidang pengkhususan dan kepakaran tersendiri menambahbaik kajian dan pendekatan kajian lebih**

efektif dan memberi manfaat kepada semua penyelidik yang terlibat termasuk industri.

- ii) **Kemahiran dan kepakaran dari IPT diperolehi secara langsung** kepada pihak yang melaksanakan kajian melalui pelajar/kakitangan program **lepasan Ijazah samada MSc atau PhD yang menjalankannya. Melalui cara ini teknologi yang dikenalpasti** dapat dijalankan dengan lebih tepat dan teratur supaya matlamat kajian tercapai.
- iii) Kerjasama yang terjalin **menambahbaik keberkesanan projek kerana pengawasan dan perbincangan sentiasa diberi keutamaan** untuk kemajuan projek serta kajian lebih fokus.
- iv) Peningkatan **kefahaman dalam aspek pengkhususan seperti pencirian molekular, imunologi, epidemiologi dan mekanisma jangkitan** bagi penyakit ikan dimanfaatkan bersama oleh pihak penyelidikan, kakitangan dan penternak dalam industri akuakultur yang terlibat.
- v) Dapat **merancang untuk menghasilkan penerbitan atau laporan saintifik termasuk menghadiri seminar/ simposium / persidangan** supaya mendapat pendedahan mendalam mengenai maklumat tambahan kajian yang dijalankan selain dari menubuhkan `networking team' apabila bertemu dengan rakan kajian dari luar.
- vi) Mengurangkan **perbelanjaan dari segi bebanan peruntukan `outsourcing'**, bahkan meningkatkan kemahiran.

C. Penglibatan pihak industri akuakultur secara langsung melalui penternak

- i) Tapak kajian yang dipilih melibatkan kawasan yang menghadapi masalah oleh penternak, di mana kajian telah dapat meningkat kesedaran dan kefahaman mengenai

penyakit Streptococcosis yang berkait rapat dengan pengurusan dan faktor stress terutama kualiti air.

- ii) Kerjasama yang rapat memberi peluang untuk mendapatkan maklumat kajian yang lebih tepat dan terperinci.
- iii) Perbincangan dan masalah kajian yang timbul dapat diselesaikan dengan lebih mudah yang membantu meningkatkan keprihatinan penternak terhadap langkah pengawalan penyakit secara langsung.

D. Penyertaan dalam seminar / simposium / persidangan dalam aspek akuakultur dalam dan luar negara

- i) Melatih penyelidik menulis secara saintifik, analisa keputusan dan membuat pembentangan supaya pengetahuan dapat dikongsi termasuk masalah yang ada untuk diatasi dan diperbaiki bersama.
- ii) Meningkatkan keupayaan dan kefahaman dalam bidang yang dikaji akibat dari pendedahan maklumat yang komprehensif serta mendalam mengenai kajian yang sama yang dibentangkan oleh penyelidik luar di seminar tersebut.
- iii) Memberi peluang membentangkan hasil kajian selain daripada mengetahui perkembangan teknologi semasa mengenai kajian yang sama selain dari mengenalpasti pakar penyelidik dalam bidang yang sama sebagai pakar rujuk.
- iv) Merancang dan memberi pelan kajian yang lebih khusus untuk kajian lanjutan dalam projek yang telah diberi tumpuan untuk menghasilkan maklumat serta kesan yang lebih memberi impak yang berkesan pada industri ternakan tilapia.
- v) Maklumat kajian yang dihasilkan dapat disusun dan dibukukan untuk diguna pakai oleh penternak supaya sebaran maklumat sentiasa terdapat dalam bentuk yang mudah termasuk melalui IT.

13.0 Penutup

Secara keseluruhannya kedua-dua projek telah mencapai sekurang-kurangnya 75% matlamat yang ingin dicapai termasuk dari aspek peningkatan fizikal, kejayaan kajian, data yang dikumpul dan dianalisis serta vaksin yang diuji di peringkat makmal yang didapati berpotensi untuk digunakan. Pada masa ini sudah terdapat pihak swasta yang ingin membantu dalam kajian lanjutan di lapangan yang akan dapat dinilai sendiri keberkesanan vaksin yang dihasilkan.

Bagi aspek peningkatan kemahiran sumber manusia dan pengetahuan yang mendalam mengenai penyakit Streptococcosis pada tilapia atau penyakit Kypokaryoniasis, kedua projek telah menyumbang 100% kejayaan kerana dapat menghasilkan 3 pelajar PhD dan 5 orang pelajar lepasan Master yang berpengalaman dalam aspek kajian penyakit ikan dalam akuakultur yang melibatkan aspek biologi molekul untuk pemilihan calon vaksin, epidemiologi yang mengenalpasti faktor risiko yang mengakibatkan penyakit serta mekanisma jangkitan termasuk imunologi yang perlu untuk mengetahui tahap ketahanan ikan terhadap penyakit yang berkesan apabila divaksin.

PROGRAM:
**Pembangunan Protokol
Diagnosis dan Kit-kit Diagnosis
Mudah Pakai Dalam Industri
Akuakultur**

**SIRI PROJEK:
21 22501 009**

Senarai Kandungan

Mukasurat

Siri Program: 21 22501 009

Pembangunan Protokol Diagnosis dan Kit-kit Diagnosis Mudah Pakai Dalam Industri Akuakultur

1.0 Latar Belakang	57
2.0 Projek.....	58
3.0 Objektif	58
4.0 Justifikasi	58
5.0 Peruntukan	59
6.0 Tujuan Laporan.....	60
7.0 Kaedah/ Metodologi penilaian	
7.1 Projek 1: Pembangunan kit pengesanan penyakit virus.....	61
7.2 Projek 2: Pembangunan kultur sel untuk tujuan penyelidikan.....	61
7.3 Projek 3: Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin	61
8.0 Indikator-indikator Pencapaian	
8.1 Pencapaian Fizikal.....	62
8.1.1 Makmal 'Clean Room'	
8.1.2 Makmal PCR dan ELISA	
8.1.3 Makmal Umum/General Laboratory	
8.1.4 Makmal Penyelenggaraan dan Cucian	
8.2 Pencapaian Bukan Fizikal.....	66
8.2.1 Projek 1: Pembangunan kit pengesan penyakit virus	
8.2.2 Projek 2: Pembangunan kultur sel untuk tujuan penyelidikan	
8.2.3 Projek 3: Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin	

9.0 Keputusan Analisis.....	68
9.1 Projek 1: Pembangunan kit pengesanan penyakit virus	
9.2 Projek 2: Pembangunan kultur sel untuk tujuan penyelidikan	
9.3 Projek 3: Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin	
10.0 Pembangunan Sumber Manusia.....	74
11.0 Isu-isu Berbangkit.....	75
12.0 Cadangan Penilaian.....	76
13.0 Kesimpulan.....	77
14.0 Penutup.....	79

Siri Projek: 21 22501 009 Pembangunan Protokol Diagnosis dan Kit-kit Diagnosis Mudah Pakai Dalam Industri Akuakultur

1.0 Latar Belakang

Peningkatan masalah penyakit dalam industri akuakultur telah membawa kerugian besar kepada penternak yang seterusnya membawa kepada kemerosotan hasil keluaran perikanan negara. Berdasarkan kepada peningkatan penyakit dalam haiwan akuatik yang selari dengan pembangunan akuakultur yang pesat, satu program khusus untuk membangunkan protokol diagnosis dan kit-kit diagnosis mudah pakai telah diprogramkan.

Program ini diwujudkan berasaskan RMK8 yang telah memberi gambaran jenis penyakit utama dalam ternakan marin. Program ini menumpukan kepada pengesanan penyakit virus (VNN dan iridovirus) dan langkah kawalan jangkitan ektoparasit (parasit badan). Pengesanan penyakit virus adalah melalui pembangunan kit mudah pakai dan makmal kultur sel. Langkah kawalan jangkitan ektoparasit dilaksanakan melalui pengumpulan data-data saintifik ektoparasit (prevalen dan kitaran hidup) dan aplikasi bahan mesra alam untuk mengawal kejadian masalah penyakit ektoparasit.

Program ini menyediakan data-data awal mengenai pembangunan kit mudah pakai pengesanan penyakit virus khususnya penyakit VNN dan iridovirus dalam industri akuakultur marin. Program ini juga menyediakan protokol yang khusus dalam mengawal kejadian serangan ektoparasit dalam sangkar terapung ikan marin. Menerusi program ini, sistem maklumat penyakit yang sistematik dan terkini dapat diperolehi bagi membolehkan Jabatan Perikanan Malaysia melaporkan status penyakit tempatan atau penyakit senarai OIE melalui wakil OIE (Jabatan Perkhidmatan Haiwan) kepada OIE.

2.0 Projek

Program ini dirangka melalui 3 projek iaitu:

- i. Pembangunan kit pengesanan penyakit virus
- ii. Pembangunan kultur sel untuk tujuan penyelidikan dan
- iii. Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin

3.0 Objektif

Melalui 3 projek yang telah dikenalpasti, objektif program adalah untuk:

- i. Menghasilkan kit bagi mengawal penyakit-penyakit yang disebabkan oleh penyakit virus.
- ii. Membangunkan kultur sel sebagai kaedah pengesanan virus untuk tujuan penyelidikan
- iii. Mendapatkan data asas penyakit ektoparasit pada ikan marin yang diternak dalam sistem sangkar bagi tujuan pembangunan langkah-langkah kawalan jangkitan ektoparasit

4.0 Justifikasi Program

(i). Pembangunan kit pengesanan penyakit virus & kultur sel untuk tujuan penyelidikan

Pengesanan patogen virus sukar dijalankan menggunakan kaedah yang sedia ada. Oleh itu kaedah pengesanan yang terkini perlu dicari. Selain dari itu, teknik yang digunapakai sekarang memakan masa yang agak lama. Oleh itu, pembangunan kit-kit mudah pakai amat berguna kerana ia boleh digunakan dengan mudah dan lebih cepat. Pembangunan teknik-teknik yang pantas, sensitif, praktikal dan mudah pakai, dalam mengesan patogen virus dengan menggunakan teknik-teknik seperti PCR. Pengesanan penyakit dengan kadar yang cepat dan dari peringkat awal dapat membantu dalam merawat penyakit seterusnya mengawal penyakit

akuakultur dari merebak . Sejar dengan itu, sistem kawalan meningkatkan kualiti dan pengeluaran hasil akuakultur serta meningkatkan taraf ekonomi penternak.

(ii) Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin

Pengawalan jangkitan ektoparasit tanpa mengetahui prevalen dan mekanisma patogen serta kitaran hidupnya akan meningkatkan masa, tenaga dan kos rawatan. Gambaran sebenar jenis ektoparasit perlu jelas sebelum langkah pencegahan dan kawalan diambil. Maklumat mengenai serangan ektoparasit pada ikan marin biasanya berasaskan kepada spesis ternakan dan tiada satu pengkalan data yang khusus mengenai kehadiran ektoparasit dengan ternakan ikan dalam sistem polikultur dimana ikan didedahkan kepada serangan penyakit sekunder seperti bakteria atau virus. Langkah kawalan yang tepat berdasarkan matlumat saintifik mengenai jenis serangan ektoparasit akan meningkatkan hasil pengeluaran dalam setiap pusingan ternakan.

5.0 Peruntukan

Peruntukan sebanyak RM2,500,000 telah diluluskan dan RM2,329,980.26 telah diterima dan dibelanja untuk tempoh 2006-2010 (Jadual 1).

Jadual 1: Peruntukan yang diterima sepanjang RMK9

Siling RMK9	Tahun	Jangkaan Peruntukan (RM)	Peruntukan yang diterima (RM)	Perbelanjaan (RM)
2,500,000	2006	0	0	0
	2007	900,000	900,000	699,980.71
	2008	900,000	900,000	951,355.09
	2009	490,000	490,000	387,555.86
	2010	358,000	300,000	291,088.60
	Jumlah	2,648,000	2,590,000	2,329,980.26

6.0 Tujuan Laporan

Laporan ini merupakan **laporan akhir** kajian-kajian yang telah dirancang dan dilaksanakan bagi program 22502-009 (Pembangunan protokol diagnosis dan kit-kit diagnosis mudah pakai dalam industri akuakultur) dalam RMK-9 bagi tempoh 5 tahun (2006 – 2010). Program ini merangkumi objektif yang dirangka berdasarkan 3 projek tersebut seperti berikut:

6.1 Projek 1: Pembangunan kit pengesanan penyakit virus

- 6.1.1 Membangunkan kit pengesanan penyakit VNN
- 6.1.2 Membangunkan kit pengesanan penyakit iridovirus

6.2 Projek 2: Pembangunan kultur sel untuk tujuan penyelidikan

- 6.2.1 Meningkatkan kapasiti kemudahan kultur sel
- 6.2.2 Mempertingkatkan bilangan kultur sel @ 'cell line' dengan penemuan CPE untuk menentukan ciri-ciri virus yang dijumpai di Malaysia

6.3 Projek 3: Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin

- 6.3.1 Pembangunan pengkalan data mengenai maklumat saintifik serangan ektoparasit dalam ternakan ikan sangkar
- 6.3.2 Peningkatan matlumat mekanisma jangkitan dan kitaran hidup ektoparasit kumpulan capsalid (*Benedenia* spp.), krustasea (*Caligus* spp.) dan lintah laut (*Z. arugamensis*)
- 6.3.3 Peningkatan penggunaan patogen yang lemah dalam pendekatan immunisasi dan aplikasi bahan mesra alam (Jus bawang putih dan bahan buangan kelapa sawit (Bio-fish /Fish Tonik) sebagai alternatif bahan kimia dalam mengawal jangkitan ektoparasit ikan ternakan sangkar.

7.0 Kaedah/ Metodologi Penilaian

7.1 Pembangunan kit pengesanan penyakit virus

- (i) Melaksanakan aktiviti persampelan, pemantauan dan pengawasan dalam sistem ternakan serta menjalankan kajian epidemiologi ke atas penyakit berjangkit yang penting dalam industri akuakultur Malaysia.
- (ii) Membangunkan kit pengesanan penyakit nodavirus/iridovirus dan ciri-ciri molekul virus melalui kerjasama dengan Institut Penyelidikan Marin Borneo, UMS, Sabah.
- (iii) Membangunkan kaedah PCR bagi menentukan keberkesanan ekstraksi DNA/RNA, pengoptimalan dan pengklonan bagi penyakit nodavirus/iridovirus/ KHV.
- (iv) Menjalankan pemilihan positif VNN/iridovirus/KHV sampel dengan menggunakan kaedah 'sequencing' bagi pengesanan origin.
- (v) Menggunakan kaedah validasi untuk pengesanan penyakit VNN/iridovirus.

7.2 Pembangunan kultur sel untuk tujuan penyelidikan

- (i) Membangunkan dan memperkukuhkan teknik-teknik / kaedah-kaedah kultur sel untuk penghasilan sel-sel yang bermutu tinggi.
- (ii) Menggunakan teknik kultur sel untuk menentukan ciri-ciri fizikal daripada virus yang diuji kaji (nodavirus/iridovirus/KHV) dengan menggunakan isolasi kultur sel iaitu sel E-11, sel SSN-1, sel SB, sel CCB, sel FHM dan sel EPC.

7.3 Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin

- (i) Melaksanakan aktiviti persampelan aktif dalam ternakan ikan marin sangkar untuk mendapat gambaran sebenar kejadian serangan ektoparasit.

- (ii) Membangunkan pengkalan data (prevalen dan min keamatan) penyakit ektoparasit pada ikan marin ternakan sangkar.
- (iii) Mengenalpasti mekanisma jangkitan dan membangunkan kitaran hidup ektoparasit kumpulan casalid (*Benedenia* spp.), crustasea (*Caligus* spp.) dan lintah laut (*Z.arugamensis*) yang menjangkiti ikan marin ternakan sangkar
- (iv) Pembangunan langkah pencegahan dan rawatan melalui immunisasi dan bahan mesra alam (Jus bawang putih dan bahan buangan kelapa sawit (Bio-Fish/Fish-Tonik) di makmal atau sangkar ternakan.

8.0 Indikator-indikator Pencapaian

Pencapaian yang dapat dihasilkan daripada pembangunan yang telah dijalankan dalam Rancangan Malaysia Ke-9 (RMK9) terbahagi kepada dua bentuk pencapaian iaitu pencapaian dalam bentuk fizikal dan non fizikal.

8.1 Pencapaian Fizikal

Pencapaian dalam bentuk fizikal merupakan peningkatan dan penambahbaikan pembangunan struktur makmal-makmal yang sedia ada dan penambahan kapasiti peralatan makmal yang lebih berteknologi tinggi. Antara makmal-makmal yang telah ditambahbaikan adalah seperti berikut:

8.1.1 Makmal 'Clean Room' atau Makmal Kultur Sel

Makmal ini telah dilengkapi dengan 'Class 10K and 100K Clean Room' iaitu paras zarah udara di dalam sesebuah bilik/makmal bertujuan untuk mengelak daripada berlaku kekerapan kontaminasi ketika menjalankan kerja-kerja pengkulturan sel. Penyelenggaraan dan servis akan dilakukan sebanyak dua tahun sekali di mana ujian pada paras zarah udara, gas, penapis akan ditukar ganti untuk mengelak dari berlaku kerosakkan. Lampu 'UV Light' juga dipasang bertujuan untuk mengurangkan berlaku

kontaminasi semasa kerja-kerja pengkulturan sel. Perolehan peralatan untuk makmal ini juga dipertingkatkan (Jadual 2).

Jadual 2: Kemudahan peralatan yang terdapat dalam Makmal Kultur Sel

Bil.	Jenis Peralatan	Jenama
1.	Inverted Microscope dan Komputer	Olympus
2.	Refrigerated Centrifuge	Eppendorf
3.	Biohazard Cabinet	ESCO
4.	Low Temperature Incubator	Memmert
5.	Ultrasonic Cleaner	Branson



Rajah 1 & 2: Peningkatan kapasiti peralatan makmal

8.1.2 Makmal PCR dan ELISA

Makmal PCR lama telah diubahsuaikan menjadi tiga bahagian utama iaitu bahagian proses sampel/ ekstrasi DNA/RNA, analisa ELISA dan peralatan elektroforesis/ sistem penganalisa gel. Hanya bahagian peralatan elektroforesis/ sistem penganalisa gel telah diasingkan ke dalam satu bilik yang berasingan bertujuan untuk mengelak dari berlaku kontaminasi. Perolehan peralatan baru untuk makmal ini juga telah ditingkatkan seperti (Jadual 3).

Jadual 3: Kemudahan peralatan baru dalam makaml PCR dan ELISA.

Bil.	Jenis Peralatan	Jenama
1.	Nanodrop System dan Komputer	Nanodrop
2.	Water Purification System	Millipore
3.	Master Cycler Personnel System	Eppendorf
4.	Mini Spin Centrifuge	Eppendorf
5.	Pipettes Set	Bio-Hit
6.	Refrigerated Centrifuge	Eppendorf
7.	Air Purifier System	AtmoSphere
8.	Refrigerated Circulating Bath	Yih Der
9.	Dry Bath Incubator	Major Science
10.	Centrifuge 5418	Eppendorf
11.	Proline Multipipettes	Bio-Hit
12.	Multipette Stream	Eppendorf



Rajah 3-5 : Kerja-kerja untuk analisa ELISA

8.1.3 Makmal Umum / General Laboratory

Makmal ini diubahsuai sebagai makmal penyimpanan sampel virus untuk jangka masa pendek dan tempat proses sampel untuk sampel-sampel seperti sampel kes penyakit, kajian penyelidikan virus, industri/orang perseorang dan sebagainya. Perolehan peralatan dalam makmal ini juga ditingkatkan seperti Jadual 4.

Jadual 4: Kemudahan peralatan dalam Makmal Umum.

Bil.	Jenis Peralatan	Jenama
1.	Laboratory -80°C Freezer	Sanyo
2.	Laboratory -20°C Freezer	Sanyo



Rajah 6 & 7: Peralatan-peralatan di Makmal Umum.

8.1.4 Makmal Penyelenggaraan dan Cucian

Makmal ini telah diubahsuai menjadi tempat cucian dan penyelenggaraan peralatan atau barangan makmal seperti barangan kaca dan plastik. Antara penambahan-penambahan yang dibuat adalah seperti sinki, tempat autoclave dan oven. Kemudahan peralatan dalam makmal ini ialah seperti dalam Jadual 5.

Jadual 5: Kemudahan peralatan dalam Makmal Penyelenggaraan

Bil.	Jenis Peralatan	Jenama
1.	<i>Autoclave</i>	Hirayama
2.	<i>Glassware Washer</i>	Smeg



Rajah 8: Peralatan yang baru dalam Makmal Penyelenggaraan.

8.2 Pencapaian Bukan Fizikal

Pencapaian dalam bentuk bukan fizikal pula merupakan hasil penyelidikan yang telah dicapai daripada tujuan penyelidikan pembangunan yang dilaksanakan. Antara-antara hasil kajian yang telah dicapai adalah seperti berikut:

8.2.1 Projek 1: Pembangunan kit pengesanan penyakit virus

- (i) Dapat mengenalpasti analisa risiko dan faktor-faktor berisiko dalam kejadian penyakit berjangkit melalui targeted surveillance ke atas penyakit yang penting terutama dalam senarai OIE.
- (ii) Pembangunan data rekod yang komprehensif mengenai virus nodavirus/iridovirus/KHV dalam sistem ternakan akuakultur di Malaysia

- (iii) Menghasilkan protokol dan kit diagnosis penyakit nodavirus yang pantas dan lebih cepat, mudah digunapakai, murah dan mesra pengguna untuk digunakan dalam industri akuakultur, seperti gambarajah di bawah.
- (iv) Pengesanan penyakit dengan kadar yang cepat dan dari peringkat awal dapat membantu dalam merawat penyakit seterusnya mengawal penyakit akuakultur dari merebak. Sejar dengan itu, sistem kawalan meningkatkan kualiti dan pengeluaran hasil akuakultur serta meningkatkan taraf ekonomi penternak.
- (v) Dapat menghasilkan optimalisasi bagi pengesanan penyakit nodavirus/iridovirus.

8.2.2 Projek 2: Pembangunan kultur sel untuk tujuan penyelidikan

- (i) Dapat membangunkan peningkatan kapasiti Makmal Kultur Sel.
- (ii) Dapat menghasilkan enam jenis sel untuk pengesanan virus ikan daripada hasil pembangunan tersebut. Dan penemuan CPE untuk menentukan ciri-ciri virus yang dijumpai di Malaysia.

8.2.3 Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin

- (i) Peningkatan maklumat saintifik mengenai serangan ektoparasit dalam ternakan ikan sangkar melalui persampelan aktif dalam 2 pusingan ternakan ikan marin (siakap, jenahak dan kerapu) dan 3 pusingan bagi ikan jenahak. Tempoh ternakan yang berbeza dapat menentukan serangan jenis ektoparasit yang konsisten dan gambaran penyakit ektoparasit yang sebenar di sangkar.
- (ii) Peningkatan status pengkalan data mengenai prevalen dan min keamatan penyakit ektoparasit pada ikan siakap, jenahak dan kerapu yang diternak di sangkar membolehkan status serangan ektoparasit di sangkar ternakan diketahui dan kerja-kerja pelaporan jenis penyakit senarai OIE dapat dilakukan dengan tepat.

- (iii) Peningkatan mekanisma jangkitan dan kitaran hidup ectoparasit kumpulan capsalid (*Benedenia* spp.), krustasea (*Caligus* spp.) dan lintah laut (*Z.arugamensis*) di kawasan tropika di mana data-data ini adalah amat kurang.
- (iv) Peningkatan penggunaan patogen yang lemah dalam pendekatan immunisasi dan applikasi bahan mesra alam (Jus bawang putih dan bahan buangan kelapa sawit (Bio-fish /Fish Tonik) sebagai alternatif bahan kimia dalam mengawal jangkitan ectoparasit ikan ternakan sangkar.

9.0 Keputusan Analisis

9.1 Projek 1: Pembangunan kit pengesanan penyakit virus

- (i) Dapat membangunkan teknik-teknik yang pantas, sensitif, praktikal dan mudah pakai, dalam mengesan patogen virus menggunakan teknik-teknik seperti PCR (Rajah 9 & 10)

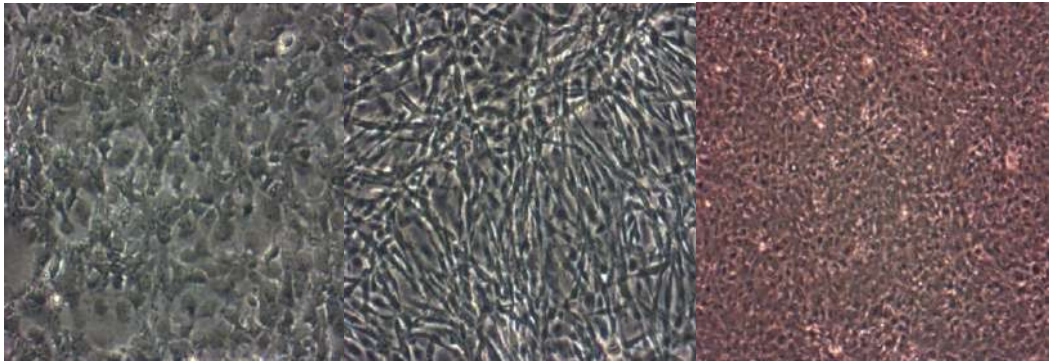


Rajah 9 & 10 : Pengesanan kit diagnosis baru yang dikenali sebagai MyVNN Easy Kit (kiri) dan kit yang mudah digunapakai dan mesra pengguna (kanan)

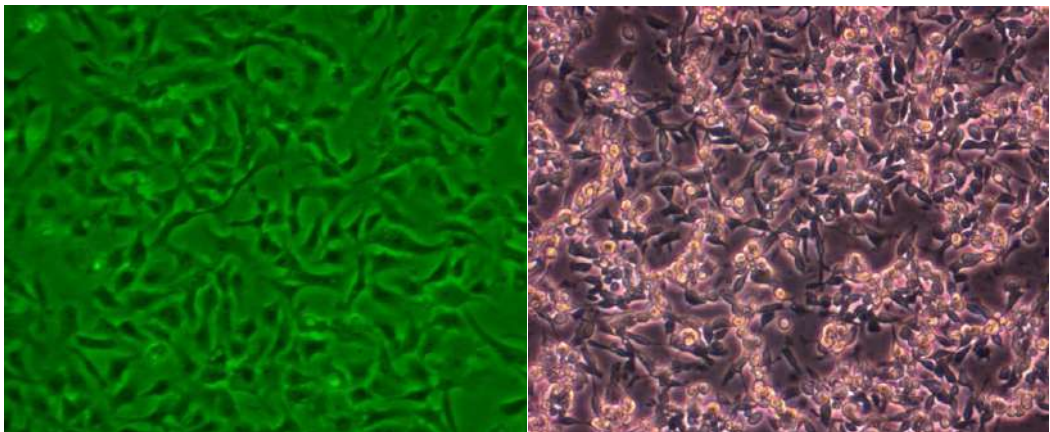
- (ii) Mengurangkan kos dan masa pengesanan penyakit untuk tujuan diagnosis awal samada di peringkat ladang atau di peringkat makmal diagnosis.
- (iii) Merupakan kaedah yang sistematik untuk pengawalan penyakit virus dapat diwujudkan melalui pengesanan awal jangkitan dan seterusnya meningkatkan kualiti, pengeluaran hasil akuakultur dan taraf ekonomi kumpulan sasaran.
- (iv) Menghasilkan kit diagnosis pengesanan penyakit KHV dengan menggunakan 'primers' yang dicadangkan oleh OIE telah dibangunkan dan sedang diujikaji.
- (v) Kajian pengesanan kit diagnosis bagi penyakit iridovirus tidak dapat diteruskan kerana ketiadaan peruntukan dan akan diperbincangkan dengan lebih lanjut bersama-sama dengan UMS akan datang.

9.2 Projek 2: Pembangunan kultur sel untuk tujuan penyelidikan

- (i) Dapat menghasilkan enam jenis sel daripada hasil pembangunan dan pengukuhan teknik/kaedah kultur sel iaitu sel EPC, sel FHM, sel BF₂, sel CCB, sel SSN-1 dan sel E-11 (Rajah 11).
- (ii) Penemuan 'suspected CPE' dalam sel CCB pada ikan kelah dan koi, sel BF₂ pada ikan arowana dan masih dalam ujikaji.
- (iii) Penemuan CPE untuk virus nodovirus pada ikan bawal emas dan siakap dengan menggunakan isolasi sel E-11 (Rajah 12).



Rajah 11 : Normal sel EPC (kiri), normal sel BF₂ (tengah) dan normal sel CCB (kanan)

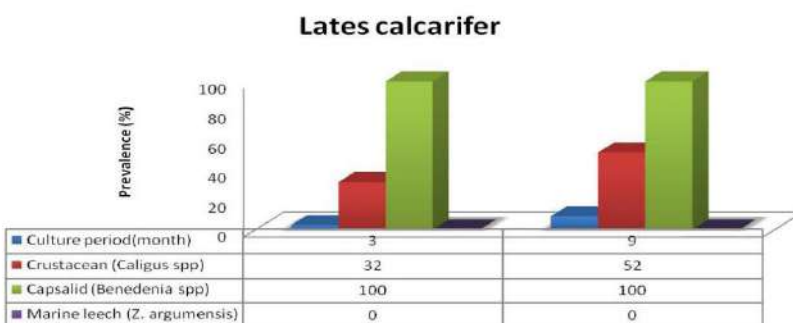
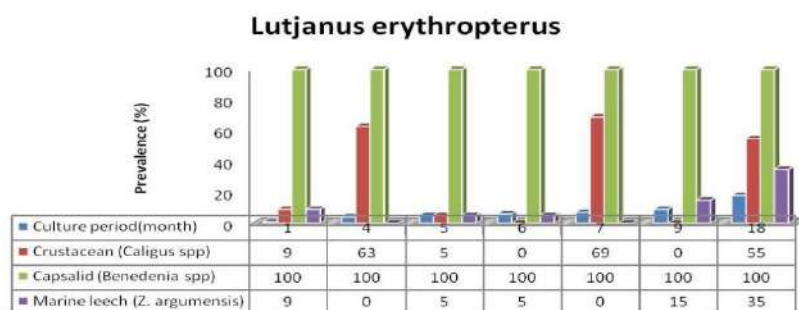
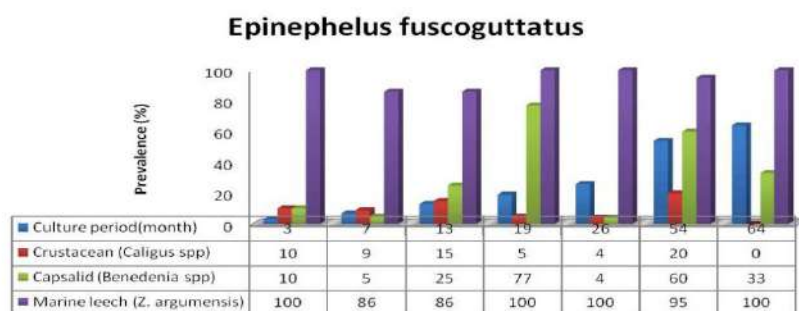


Rajah 12: Normal sel E-11 (kiri) dan sel E-11 selepas terhasil CPE nodovirus pada ikan bawal emas (kanan)

9.3 Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin

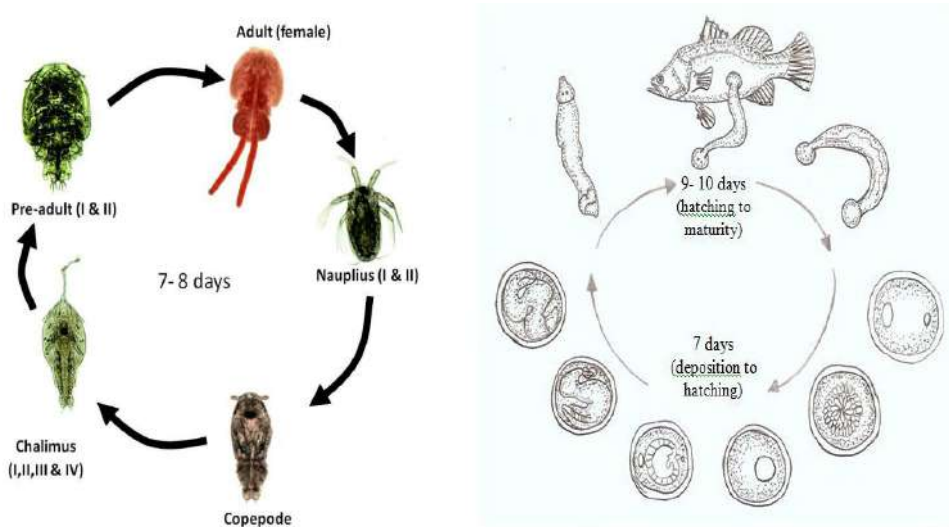
- (i) Penemuan 3 kumpulan utama ektoparasit iaitu kumpulan capsalid, krustasea dan lintah laut dalam sangkar ternakan ikan marin. Serangan kumpulan ektoparasit pada ikan marin didapati berbeza bagi sistem ternakan secara polikultur dan monokultur. Kumpulan sasar telah didedahkan dengan jenis ektoparasit yang menyerang sistem ternakan polikultur dan monokultur melalui dialog/hebahan/laporan di akhir setiap kajian di sangkar berkaitan.

(ii) Penemuan prevalen dan min keamatan kumpulan ektoparasit yang berbeza pada ternakan ikan marin sangkar berdasarkan spesies ikan (siakap, jengahak dan kerapu) dan tempoh ternakan (Rajah 13). Tempoh ternakan ikan jengahak yang kurang dan melebihi 5 bulan didapati mempunyai jangkitan kumpulan capsalid (*Benedenia* spp.) yang paling banyak. Kumpulan sasar telah disyorkan untuk mengalami pengurusan 'sekali masuk sekali keluar' dan pengurusan kesihatan ikan seperti mandian air tawar yang lebih sistematik.



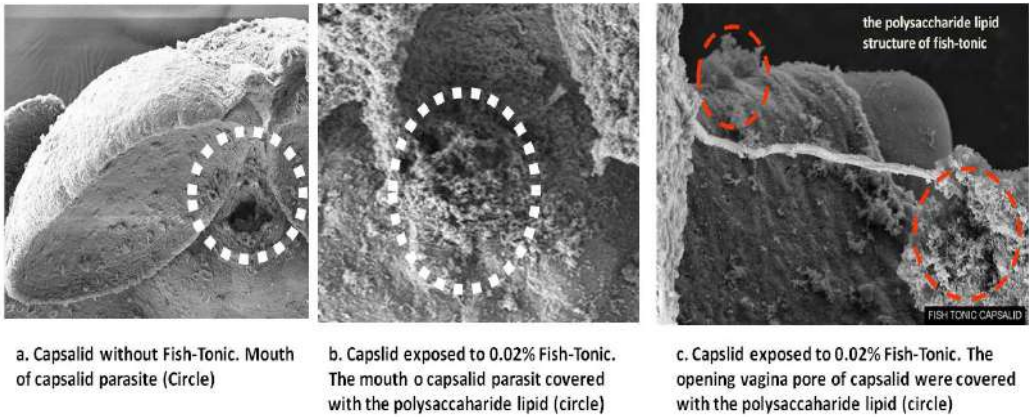
Rajah 13: Prevalen dan min keamatan tiga kumpulan ektoparasit (Capsalid, caligus dan lintah laut) pada ternakan ikan marin di sangkar.

(iii) Penemuan mekanisma jangkitan dan 2 kitaran hidup ektoparasit kumpulan crustasea (*Caligus epidemicus*) dan lintah laut (*Z. arugamensis*) yang mana dapat digunakan untuk membentuk strategi pencegahan dan rawatannya di sangkar (Rajah 14 dan Lampiran 1). Faktor persekitaran seperti saliniti juga didapati mempengaruhi jangkitan kumpulan *Caligus* spp.



Rajah 14: Kitaran hidup ektoparasit *Caligus epidemicus* (a) dan lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* (b).

(iv) Peningkatan 60-70% ikan siakap yang menerima immunisasi patogen capsalid dan penggunaan jus bawang putih yang boleh memulihkan pendarahan pada ikan. Aplikasi bahan buangan kelapa sawit (Bio-Fish/Fish-Tonik) yang telah melalui proses bioteknologi didapati boleh menghalang proses pengambilan makanan dan pengeluaran telur pada ektoparasit kumpulan capsalid (Rajah 15). Aplikasi PVC sebagai substract untuk pelekatan cocoon lintah laut telah berjaya memutuskan kitaran hidup lintah dalam ternakan ikan kerapu harimau dan mampu mengurangkan prevalen jangkitan lintah sebanyak 50% selepas 10 hari jangkitan(Rajah 16)



Rajah 15: Aplikasi bahan buangan kelapa sawit (Fish Tonic) yang menyekat pengambilan makanan dan proses pengeluaran telur oleh parasit.

Kajian Kawalan Parasit Lintah Laut Pada Ikan Kerapu: Pendekatan pengurusan kesihatan ikan melalui kitaran hidup

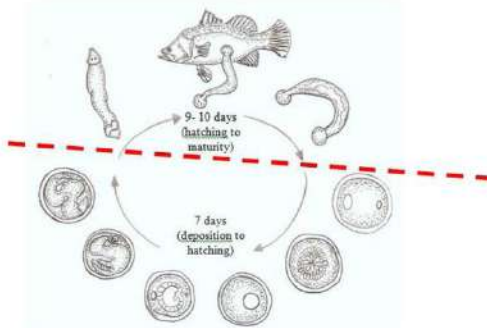


Figure 4: The life cycle of *Z. arugamensis* under laboratory condition at 27°C.

Treatment	Prevalence(average of mean intensity) of adult marine leech	
	Before	Day 10
Control	100 (2.0±0.0)	100 (2.5± 0.7)
1.5% Iodine	100 (2.5±0.7)	100 (3.0± 1.4)
200ppm Formalin	100 (2.0±0.0)	100 (1.5± 0.7)
PVC substrates	100 (1.5±0.7)	50* (0.5±0.7)



Rajah 16: Aplikasi PVC sebagai substrat untuk pelekatan cocoon lintah laut dan dikeluarkan daripada system sangkar selepas hari ke-10 mampu memutuskan kitaran hidup lintah pada ikan kerapu harimau.

10.0 Pembangunan Sumber Manusia

- (i) Peningkatan pendedahan di luar jabatan melalui penyertaan aktif dalam bengkel/persidangan/seminar di peringkat kebangsaan dan antarabangsa (Jadual 6).

- (ii) Peningkatan tenaga mahir dan kepakaran kakitangan serta menjadikan teknik makmal yang berpiawaian tinggi sebagai rujukan diperingkat kebangsaan (Rajah 17).



Rajah 17: Peningkatan peralatan dalam makmal (kiri) dan Kerja-kerja penghasilan sel dalam biohazard kabinet (kanan)

- (iii) Peningkatan kesedaran jenis penyakit pada kumpulan sasaran melalui dialog/hebahan semasa atau selepas kajian dijalankan.

- (iv) Peningkatan penerbitan kertas saintifik diperingkat kebangsaan dan antarabangsa (Lampiran 2 dan 3).

Jadual 6: Peningkatan pembangunan sumber manusia dari tahun 2006-2010.

A. Peningkatan penyertaan penyelidik dalam bengkel/persidangan/seminar					
	Tahun	2006	2007	2008	2009 & 2010
1	Kebangsaan	4	5	12	8
2	Antarabangsa	4	2	4	5
B. Peningkatan kepakaran penyelidik dalam bidang yang khusus					
	Nama	ijazah	Bidang Kajian (Area of study)	Tarikh Mula	Tarikh Tamat
1	Rimatuhana Ramly	PhD (Norway)	Fish virology	2008	2012
2	Leaw Yoon Yan Mohd. Faizul Mohd.Helmi	MSc (UKM)	Fish Parasitology	2008	2011
C. Kesedaran mengenai masalah punca, jenis penyakit ikan marin di sangkar dan langkah pengawalan					
	Tajuk	Tempat	Tahun	Kumpulan sasar	
1	Penyakit Virus	Perak	2007 & 2008	Penternak ikan hiasan	
2	Penyakit ektoparasit	Kedah	2008	Penternak ikan marin sangkar kawasan Tj. Dawai	
3	Hebahan hasil kajian penyakit ektoparasit (2006-2010)	Penang	25 Jan 2011	Penternak ikan marin sangkar kawasan Bt. Kawan	

11.0 Isu-isu Berbangkit

11.1 Projek 1 & 2: Pembangunan kit pengesanan penyakit virus

- a. Iridovirus primers kurang berkesan/sensitif.
- b. Kelemahan kajian berstruktur epidemiologi untuk iridovirus/VNN/KHV.
- c. Hanya seorang virologist bagi banyak jenis virus.

11.2 Projek 3: Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin

- a. Jangkaan peningkatan masalah ektoparasit dan kemunculan parasit yang baru.
- b. Kewujudan kepelbagaian spesies ternakan secara polikultur menyukarkan proses rawatan kerana spesies ikan turut dijangkiti oleh pelbagai penyakit.
- b. Mekanisma dan kitaran hidup ektoparasit masih tidak mencukupi. Hanya 2 spesies ektoparasit (*Z. arugamensis* dan *C. epidemicus*) yang telah dibangunkan dalam program ini. Masih terdapat banyak lagi ektoparasit di kawasan tropika yang kitaran hidupnya tidak diuraikan lagi.
- c. Tahap kesedaran pada kumpulan sasaran mengenai jangkitan ektoparasit sebagai serangan primari penyakit sebelum sekunder penyakit (bacteria/virus) datang pada ikan ternakan masih rendah di setengah kawasan ternakan. Ini terbukti semasa kerja-kerja lapangan di sangkar-sangkar tertentu menemui pelbagai bahan kimia di lapangan.

12.0 Cadangan penilaian

12.1 Projek 1 & 2: Pembangunan kit pengesanan penyakit virus

- a. Mengkaji dan menguji semula kelemahan primers dan teknik PCR. Perlukan lebih banyak sampel positif iridovirus untuk membuat perbandingan.
- b. Kajian epidemiologi perlu diberi fokus (setiap satu virus/seorang penyelidik).
- c. Kerjasama dengan IPTA di mana pelajar ijazah lanjutan boleh digunakan untuk mempercepatkan kajian pembangunan kit.

12.2 Projek 3: Langkah kawalan jangkitan ektoparasit ikan marin

- a. Kajian epidemiologi yang berterusan dan mengkaji kesamaan spesis ektoparasit yang boleh menyerang spesis ternakan dalam sistem polikultur untuk tujuan kawalan. Kajian tertumpu pada jangkitan ektoparasit dalam persekitaran ternakan multispesis.
- b. Kajian terperinci mengenai mekanisma dan kitaran hidup ektoparasit pada spesies *C. rotundigenitalis* (parasit yang tersembunyi di operkulum) dan Capsalid (*Neobenedenia sp.*).
- c. Mempertingkatkan lagi kempen kesedaran penyakit ikan pada kumpulan sasar dengan menggunakan hasil kajian di lokasi kajian dijalankan. Kesedaran terhadap serangan primari ektoparasit yang utama dan aplikasi bahan asli juga perlu ditekankan.

13.0 Penutup

Program ini telah berjaya membangunkan matlumat data asas, penghasilan kit mudah pakai untuk pengesanan penyakit virus dalam ikan marin dan pembangunan pengkalan data serta langkah kawalan yang spesifik dalam jangkitan ektoparasit.

Pelaksanaan projek pembangunan pengesanan penyakit virus telah mencapai objektif seperti berikut:

- a) Pengenalpastian patogen dengan lebih cepat dan tepat, seterusnya dapat mengawal penyakit daripada merebak.
- b) Penghasilan kit-kit mudahpakai yang boleh digunakan oleh makmal-makmal diagnosis dan kumpulan sasar.
- c) Mengurangkan kos dan masa pengesanan penyakit untuk tujuan diagnosis awal samada di peringkat ladang atau di peringkat makmal diagnosis.

Pelaksanaan projek langkah kawalan jangkitan penyakit ektoparasit dalam sangkar ikan marin telah mencapai tujuan seperti berikut:

- a) Informasi prevalen jangkitan ektoparasit ikan ternakan marin ditingkatkan. Status pengkalandata peravlendan minkeamatan ektoparasit yang menjangkiti ikan ternakan di sangkar dalam sistem polikultur dikemaskinikan. Matlumat saintifik ini telah membolehkan dua pekerja kontrak melanjutkan pelajaran mereka ke peringkat Master Science di UKM (En. Mohd. Faizul Helmi) dan selesai pada Mac 2011 manakala En. Leaw Yoon Yau di UMT dan selesai pada oktober 2012.
- b) Immunisasi ikan siakap terhadap jangkitan parasit capsalid dapat ditingkatkan dengan kadar kemandirian sebanyak 70%.
- c) Kitaran hidup ektoparasit (*Caligus epidemicus* dan *Z. arugamensis*) yang lengkap. Huraian kitaran hidup *Z. arugamensis* merupakan yang pertama di dunia dan telah diterbitkan dalam jurnal Aquaculture. Melalui kitaran hidupnya, langkah kawalannya dapat dilakukan pada ikan kerapu harimau.
- d) Peningkatan aplikasi bahan mesra alam (jus bawang putih, Bio-Fish, Fish Tonik) sebagai alternatif pencegahan serangan parasit ektoparasit.

14.0 Lampiran

Lampiran 1:

Senarai penerbitan projek 1 & 2: pembangunan kit penyakit virus

Penerbitan & Laporan

1. Mayada,H., Hassan,M.D., **Azila,A.**, Arshad,S.S. and Hair Bejo,M. Isolation and Characterization of Viral Nervous Necrosis (VNN)Virus from Malaysian Sea Perch (Siakap). *Submission of VNN sequence to genbank database on 6-APR-2009*. ACCESSION; FJ89614 and VERSION; FJ896142.1 GI:228065461
2. Julian R, Benny OM, **Azila A** & Roziah KI. Transolation of nervous necrosis virus through fish seed importation : A major threat to local Aquaculture (Research Category). *Pemenang anugerah 'Bronze medal' pada Anugerah Cemerlang pereka, 10-11 July 2009, UMS*.
3. Padilah,B., **Azila, A**, Kua BC., Rimatulhana R & Siti Zahrah A & Faazaz, A.L. 2008. Outbreak of iridovirus in grouper(*Epinephelus sp.*) at open sea cages Langkawi, kedah Malaysia. *Malaysia Fisheries Journal*. 7:19-23
4. **Azila A** submitted and presented a progress report entitled `Development of PCR based diagnostic kit for the detection of iridovirus in cultured marine fish and freshwater fish' to E-Sciencefund committee on November 2007.
5. Penerbitan poster ketika Program MAHA 2010, Mardi, Serdang, Selangor.

Symposium/Seminar/Conference

1. **Azila A.**, Siti-Zahrah A., Erni F.S., Padilah B., Hassan M.D., Kua B.C. and Faazaz A.L. VNN infection in Malaysia: Status and development of polymerase chain reaction (PCR) based diagnostic technique. Paper presented ora presentation at National Fisheries Symposium (NaFis) Symposium at Kuching , Sarawak , 26-28th June 2006
2. **Azila A**, Padilah B. Kua B.C , Rimatulhana R & Siti Z.A. Mass mortality of giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) in deep sea cages at Langkawi, Malaysia. *Paper presented as poster presentation at DAA VI Sri Langka on 15 May 2006*.
3. Noor Mahya.Y. & **Azila.A**. Observation of koi herpesvirus disease (KHVD) in ornamental koi carp. *Paper presented as poster presentation at national Fisheries Symposium on 26 -27 June 2006*.
4. **Azila A**. Epidemiology of koi herpesvirus disease (KHV) in Perak. Paper presented for KHV awareness program, Tronoh, 21 Ogos 2007.
5. **Azila A**. Epidemiology of koi herpesvirus disease (KHV) in Perak. A Country report for 'workshop on strengthening aquatic animal health and biosecurity in Asean', Vietnam,February 2007.
6. **A.Azila**, Erni F.S., Che Utama Che Musa, Siti Zahrah A. & Kua B.C.(2009). Progress of VNN infection in T.Blochii cultured in deep sea cages,

Langkawi. 'Oral presentation' pada 1st International Congress On Aquatic Animal Health Management, 27 – 28 January, Tehran.

7. **Azila.A**, Way, K., Wood, G., Siti Zahrah.A, Raihan S.A & Sabri M.Y. Preliminary study of detection of antibodies to koi herpesvirus in Koi stocks in Malaysia using an ELISA. Poster presentation' pada International Aquaculture Biosecurity Conference, August 17-18, 2009, Trondheim, Norway.
8. Pembentangan Poster : Biotechnology Seminar MOSTI, 24 – 26 Mei 2010.

Lampiran 2:

Senarai penerbitan projek 3: Langkah kawalan jangkitan ektoparasit dalam sangkar ikan marin

Penerbitan & Laporan

1. **Kua BC** and Oo MG. 2007. Efficacy of garlic bath treatment against sea bass (*Lates calcarifer*) fingerlings showing hemorrhage, ulcer, tail and fin rot symptoms at hatchery. *Malaysia Fisheries Journal*, 6: 97-102
2. **Kua BC**, Chuah TT, Che Utama CM & Oo MG. 2008. Experimental treatments against Body monogenenan (Capsalid) in cage-cultured marine fish. *Malaysian Fisheries Journal*. 7(1):24-30
3. **Kua BC**. 2008. What is the risk of leech infestation in cultured marine seabass?. FRINewsletter 12:22.
4. **Kua BC**, Eugene M. Burreson & Oo Mooi Gaik. 2009. Morphology of haematophagous marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) isolated from sea bass (*Lates calcarifer*). *Malaysian Fisheries Journal*. 8: 28-34
5. **Kua BC.**, Muhd. A.A & Khalidah N. 2010. Life cycle of marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) isolated from body of sea bass (*Lates calcarifer*) under laboratory conditions. *Aquaculture* 302:153-157
6. **Kua BC** submitted progress report entitled 'Identification of fish protozoan, *Cryptocaryon irritans* resistant candidate gene(s) in sea bass (*Lates calcarifer*) fingerlings' to eScienceFund, MOSTI on 1st April and 10 Nov. 2007.

Symposium/Seminar/Conference

1. **Kua BC** and Oo MG. Studies of garlic juice on the tolerance and challenge test against Cryptocaryoniasis on sea bass fingerlings at hatchery. *Oral presentation at DAA VI Sri Langka, 15 May 2006*.
2. **Kua BC**, Eugene M. B & Oo MG. Morphology of haematophagous marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) isolated from sea bass (*Lates calcarifer*). *Poster presentation at the 15th Scientific Conference of the Electron Microscopy Society of Malaysia (EMSM) on 5 Dec. 2006*.

3. **Kua B.C.**, S.Z. Abdullah, M.F. Abtholuddin, N.F. Mohd. & N.N Mansor. Marine leech isolated from cage-cultured sea bass (*Lates calcarifer*) fingerlings: A parasite or vector? *Oral presentation at the 15th Scientific Conference of the Electron Microscopy Society of Malaysia(EMSM) on 5 Dec. 2006.*
4. **Kua BC** and Subha B. 'Identification of resistant candidate gene(s) of fish protozoan, *Cryptocaryon irritans* in sea bass (*Lates calcarifer*) fingerlings'. *Poster presentation at Biotechnology R&D project monitoring and evaluation on 8-11 December 2007, Kuala Lumpur.*
5. **Kua B.C.**, Suganti E & Khalidah N. Life cycle of marine leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) isolated from body of sea bass (*Lates calcarifer*) under laboratory conditions. *Poster presentation at SEAFDEC Inter.I Workshop on Emerging Fisg Diseases in Asia at Bangkok, Thailand on 6-7 Dec 2007.*
6. **Kua B.C**, Azila A, Siti Zahrah A, Ramley AB & Erni FS. A case study of mass mortality in cobia, *Rachycentron canadum* (Rachycentridae) cultured in cages. *Oral presentation at 4th Nat.Fish.Symposium at Terengganu ,14-16 July 2008*
7. **Kua BC**, Norhasma I, Muhd, A, A & Nik Rahimah A.R. Preliminary study on the life cycle of *Caligus* sp, a crustacean parasite isolated from sea bass (*Lates calcarifer*). *Poster presentation at 4th Nat.Fish. Symposium at Terengganu*
8. **Kua BC**, Noraziah MR and Nik RAR.. Histological Study and Scanning Electron Microscopy of the Gill parasite, *Lernanthropus latis* (Copepoda: Lernanthropidae) from Cage-Cultured Seabass (*Lates calcarifer*). *Poster presentation at 17th Electron Microscopy Society Malaysia Scientific Conference on 17- 20 Dec. 2008*
9. **Kua BC**, Azmi MA and Nik RAR. Scanning electron microscopy (SEM) of gill copepod, *Caligus* sp at chalimus stages in seabass fry (*Lates calcarifer*). *Poster presentation at Asian Pasific Aquaculture on 3-6 Nov. 2009, KL*
10. **Kua BC**, Azmi MA and Oo MG. Capsalid monogenean (Benedeniinae) in cage-cultured white spotted snapper (*Lutjanus erythropterus*). *Poster presentation at 6th International Symposium on Monogenean. 2-7 August 2009, Cape Town,S.Africa*
11. **Kua BC**, Azmi MA, Nik RAR & Thavalingam M.P. Fish-Tonic versus *Benedenia* sp (Benedeniinae) under in vitro study and Scanning Electron Microscopy (SEM). *Oral presentation at the 6th International Symposium on Monogenean, 2-7 August 2009, Cape Town, South Africa*
12. **Kua BC**, Che Utama CM and Choong FC. Preliminary study on control measure of marine leech *Zeylanicobdella arugamensis* infecting tiger grouper *epinephelus fuscoguttatus* cultured in floating cages. *Oral presentation at The 9th Asian Fisheries Forum, Shanghai 21-25 April 2011*



National Fish Health Research Center (NaFiSH)
Fisheries Research Institute
Jabatan Perikanan Malaysia
Pertanian dan Industri Makanan

ISBN 978-967-2946-12-0



9 789672 194612 0