

KESAN BEBERAPA BAHAN KEMOTERAPEUTIK DAN VAKSIN TERHADAP
PENGAWALAN PENYAKIT VIBRIOSIS DALAM KULTUR IKAN KERAPU
(*Epinephelus* sp.)

Oleh :

MD. AKHIR BIN ARSHAD

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi keperluan bagi
Ijazah Sarjana Sains

PUSAT PENGAJIAN SAINS KAJIHAYAT
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA
PULAU PINANG
DISEMBER, 1996

MIKROFIS
5236

KANDUNGAN

Muka surat

SENARAI GRAF	vi
SENARAI JADUAL	vii
SENARAI RAJAH	x
SENARAI GAMBAR	xi
SENARAI LAMPIRAN	xii
PENGHARGAAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvii
BAB 1: MAKLUMAT LATAR BELAKANG DAN TINJAUAN BAHAN BACAAN	
1.1 LATAR BELAKANG	
1.1.1 SUMBANGAN TERNAKAN SANGKAR KEPADA INDUSTRI TERNAKAIR DI MALAYSIA	1
1.1.2 KULTUR IKAN LAUT DI MALAYSIA PROSPEK PEMBANGUNAN DAN MASALAH	3
1.2 TINJAUAN BAHAN BACAAN	6
1.2.1 PENYAKIT VIBRIOSIS TERNAKAN SANGKAR	6
1.2.2 PENGGUNAAN BAHAN KEMOTERAPEUTIK UNTUK KAWALAN DAN PENGELAKAN VIBRIOSIS	10
1.2.3 PENGGUNAAN VAKSIN DALAM MENGAWAL VIBRIOSIS	12
1.2.4 PEMILIHAN STRAIN <i>VIBRIO</i> UNTUK PENYEDIAAN VAKSIN	13
1.3 OBJEKTIF	15

BAB 2

2.0	KESAN BEBERAPA BAHAN KEMOTERAPEUTIK DALAM MENGAWAL PENYAKIT VIBRIOSIS IKAN KERAPU	16
2.1	PENDAHULUAN	16
2.2	OBJEKTIF	20
2.3	BAHAN DAN KAEDAH	20
2.3.1	RAWATAN PROFILAKTIK MELALUI MAKANAN TERHADAP ANAK IKAN KERAPU DARI THAILAND	20
2.3.2	KAJIAN PUNCA KEMATIAN ANAK IKAN KERAPU YANG DITERNAK DI KAWASAN TERNAKAN IKAN JELUTONG	24
2.3.3	KAJIAN RAWATAN RENDAMAN ANAK-ANAK KERAPU DENGAN AGEN KEMOTERAPEUTIK	25
2.3.4	KADAR KEMANDIRIAN PASCA-PELEPASAN ANAK-ANAK KERAPU DARI PERAK DI SANGKAR	26
2.3.5	ANALISA STATISTIK KEPUTUSAN KAJIAN	28
2.4	KEPUTUSAN	28
2.4.1	KESAN RAWATAN MELALUI MAKANAN TERHADAP ANAK IKAN KERAPU DARI THAILAND	28
2.4.2	KADAR TUMBESARAN ANAK KERAPU MENGIKUT JENIS RAWATAN PROFILAKTIK MELALUI MAKANAN	31
2.4.3	PREVALEN JANGKITAN PARASIT DAN VIBRIOSIS KE ATAS ANAK KERAPU THAILAND	40
2.4.4	KADAR KEMATIAN ANAK KERAPU DARI PERAK DAN KELANTAN SELEPAS RAWATAN RENDAMAN DENGAN BAHAN KEMOTERAPEUTIK.	42
2.4.5	KADAR PEMBESARAN ANAK KERAPU DARI KELANTAN SEMASA RAWATAN RENDAMAN DENGAN BAHAN KEMOTERAPEUTIK	45
2.4.6	KADAR KEMANDIRIAN DI SANGKAR ANAK KERAPU DARI PERAK SELEPAS RAWATAN RENDAMAN	55

2.4.7	BERAT YANG DICAPAI OLEH ANAK KERAPU DARI PERAK SEMASA TERNAKAN DI SANGKAR	57
2.5	PERBINCANGAN	65
2.6	KESIMPULAN DAN CADANGAN	70
BAB 3		
3.	PENYARINGAN DAN PENYENGGARAAN KEVIRULENAN STRAIN BAKTERIA BERPOTENSI UNTUK PENYEDIAAN VAKSIN	72
31	PENDAHULUAN	72
3.2	OBJEKTIF	77
3.3	BAHAN DAN KAEDAH	78
3.3.1	PENAKTIFAN STOK BAKTERIA DAN PENENTUAN KELOK PIAWAI KETUMPATAN BAKTERIA	78
3.3.2	PENYARINGAN BAKTERIA PATOGENIK	79
3.3.3	PENGESANAN PENGELUARAN TOKSIN OLEH STRAIN-STRAIN BAKTERIA	80
3.3.4	UJIAN LD ₅₀ KE ATAS STRAIN BAKTERIA VIRULEN DAN PENGELUAR TOKSIN	82
3.3.5	UJIAN PENYENGGARAAN KEVIRULENAN: KESAN PERTUMBUHAN DI ATAS AGAR DARAH TERHADAP KEVIRULENAN STRAIN BAKTERIA <i>VIBRIO</i> SP.	83
3.3.6	UJIAN BIOKIMIA, MORFOLOGI DAN FISIOLOGI	85
3.3.7	PENYENGGARAAN BAKTERIA	89
3.3.8	PENYENGGARAAN KEVIRULENAN BAKTERIA	89
3.4	KEPUTUSAN	90
3.4.1	KORELASI KEPATOGENAN ISOLAT KE ATAS KEMATIAN TILAPIA DAN NEKROSIS TERHADAP IKAN KELI	90
3.4.2	KORELASI KESAN GENANGAN KULTUR BAKTERIA KE ATAS IKAN TILAPIA DAN IKAN KELI	94
3.4.3	KORELASI KEPATOGENAN KUMPULAN REAKSI DEKARBOKSILASE BAKTERIA	98
3.4.4	KEPUTUSAN UJIAN LD 50	107

3.4.5	KEPUTUSAN KAJIAN KESAN PERTUMBUHAN DI ATAS AGAR DARAH TERHADAP KEVIRULENAN STRAIN BAKTERIA <i>VIBRIO</i> SP.	109
3.4.6	KEPUTUSAN UJIAN BIOKIMIA, MORFOLOGI DAN FISIOLOGI ISOLAT-ISOLAT BAKTERIA	109
3.5	PERBINCANGAN	113
4.0	KESIMPULAN DAN CADANGAN	120
BAB 4		
4.	KESAN VAKSIN KE ATAS KADAR HIDUP DAN TUMBESARAN IKAN KERAPU	122
4.1	PENDAHULUAN	122
4.2	OBJEKTIF	125
4.3	BAHAN DAN KAEDAH	125
4.3.1	PENYEDIAAN VAKSIN	125
4.3.2	UJIAN KESAN PENCAIRAN VAKSIN TERHADAP RPS <i>TILAPIA NILOTICUS</i>	126
4.3.3	UJIAN CABARAN ARTIFISIAL ANAK KERAPU YANG DIBERI PELALIAN DI MAKMAL	128
4.3.4	UJIAN KESAN VAKSIN <i>VIBRIO</i> TERHADAP ANAK KERAPU DI SANGKAR	129
4.3.5	ANALISA KEPUTUSAN PERCUBAAN	131
4.4.	KEPUTUSAN	131
4.4.1	KESAN PENCAIRAN VAKSIN TERHADAP RPS <i>TILAPIA NILOTICUS</i>	131
4.4.2	RPS IKAN KERAPU DICABAR SELEPAS DIBERI PELALIAN	133
4.4.3	KADAR HIDUP ANAK IKAN KERAPU DI SANGKAR SELEPAS PELALIAN DAN DIDEDAH PADA CABARAN SEMULAJADI	136
4.4.4	KADAR TUMBESARAN ANAK-ANAK IKAN KERAPU DIBERI PELALIAN DI SANGKAR	138

4.4.5	JANGKITAN VIBRIOSIS DAN RPS TERHADAP ANAK-ANAK KERAPU YANG DIBERI PELALIAN	140
4.5	PERBINCANGAN	144
5.0	PERBINCANGAN KESELURUHAN	149
	RINGKASAN	153
	RUJUKAN	160

SENARAI GRAF

	Muka surat
Graf 2.1 : Peratus kemandirian anak-anak ikan kerapu yang dirawat dengan bahan kemoterapeutik melalui makanan	29
Graf 2.2a : Berat anak-anak ikan kerapu yang diberi rawatan profilaktik melalui makanan semasa ditenak di sangkar	35
Graf 2.2b: Berat yang dicapai oleh anak-anak ikan kerapu yang ditenak di dalam sangkar dan diberi rawatan dengan bahan kemoterapeutik melalui makanan	36
Graf 2.2c : Purata berat anak-anak ikan kerapu dari Thailand yang ditenak dalam sangkar selepas rawatan dengan bahan kemoterapeutik melalui makanan	37
Graf 2.2d: Korelasi antara kadar kemandirian dan berat dicapai (g) bagi anak kerapu dari Thailand	39
Graf 2.3: Kadar hidup anak kerapu dari Perak yang dirawat dengan berbagai bahan kemoterapeutik	43
Graf 2.4: Kadar mortaliti anak-anak kerapu dari Kelantan (21.0 mm) yang dirawat dengan pelbagai bahan kemoterapeutik secara rendaman	46
Graf 2.5a: Panjang dicapai oleh anak-anak kerapu dari Kelantan (21.0 mm) selepas dua minggu dirawat dengan bahan kemoterapeutik	49
Graf 2.5b: Berat dicapai oleh anak-anak kerapu dari Kelantan (21.0 mm) selepas dua minggu dirawat dengan bahan kemoterapeutik secara rendaman	50
Graf 2.5c: Korelasi antara kadar kemandirian dan pertumbuhan panjang anak kerapu dari Kelantan	53
Graf 2.5d: Korelasi antara peratus kemandirian dan berat dicapai oleh anak kerapu dari Kelantan	54
Graf 2.6: Peratus kemandirian anak-anak kerapu dari Perak semasa ditenak di sangkar selepas rawatan dengan bahan kemoterapeutik	56
Graf 2.7a : Berat mingguan anak-anak ikan kerapu dari Perak semasa ditenak di dalam sangkar selepas rawatan dengan bahan kemoterapeutik	60

Graf 2.7b :	Purata berat kumulatif anak-anak ikan kerapu dari Perak yang ditenak di dalam sangkar selepas rawatan rendaman dengan bahan kemoterapeutik	61
Graf 2.7c:	Berat yang dicapai oleh anak-anak ikan kerapu dari perak yang ditenak dalam sangkar selepas rawatan rendaman dengan bahan kemoterapeutik	62
Graf 2.7d:	Korelasi antara peratus hidup dan berat (g) dicapai oleh ikan kerapu Perak di sangkar	64
Graf 3.1:	Korelasi antara peratus kematian kerana suntikan ampaian dan peratus kematian kerana suntikan genangan	99
Grad 3.2:	Korelasi antara peratus kematian tilapia (jumlah) dengan peratus keli berulser kerana suntikan ampaian bakteria	101
Graf 4.1:	Peratus hidup anak-anak ikan kerapu selama lima bulan di sangkar selepas diberi rawatan rendaman dengan vaksin yang berbeza	137
Graf 4.2a:	Panjang dan berat dicapai oleh anak kerapu purata saiz 5.9 ± 0.8 sm dan berat 3.4 ± 1.9 g selepas 5 bulan ternakan di sangkar selepas diberi pelalian dengan vaksin	141
Graf 4.2b:	Panjang dan berat dicapai oleh anak kerapu purata saiz 12.0 ± 1.3 sm dan berat 26.7 ± 8.3 g selepas 5 bulan ternakan di sangkar selepas diberi pelalian dengan vaksin	142

SENARAI JADUAL

Muka surat

Jadual 2.1 : Purata berat (g) mingguan anak-anak kerapu dari Thailand yang dirawat dengan bahan kemoterapeutik melalui makanan	32
Jadual 2.2: Prevalen jangkitan vibrio dan jangkitan parasit dalam anak-anak ikan kerapu yang diberi rawatan profilaktik melalui makanan	41
Jadual 2.3 : Panjang (mm) dan berat purata (g) anak-anak kerapu dari yang dirawat secara rendaman	47
Jadual 2.4 : Ringkasan keputusan ujian Wilk-Shapiro dan ANOVA bagi data data panjang (mm) dan berat (g) anak kerapu dari Kelantan mengikut minggu	
Jadual 2.5 : Purata berat mingguan anak-anak kerapu dari Perak semasa ditenak di sangkar selepas rawatan dengan bahan kemoterapeutik	58
Jadual 3.1 : Kesan suntikan ampaian bakteria ke atas mortaliti tilapia dan ulser pada ikan keli	91
Jadual 3.2 : Kesan suntikan genangan bakteria terhadap mortaliti tilapia dan pembentukan ulser pada keli	95
Jadual 3.3 : Perbandingan kematian tilapia oleh suntikan ampaian bakteria hidup dan suntikan genangan	97
Jadual 3.4 : Perbezaan kesan suntikan ampaian dan genangan terhadap keli	100
Jadual 3.5 : Kevirulenan strain-strain bakteria yang dikaji mengikut kumpulan reaksi dekarboksilase	102
Jadual 3.6 : Kevirulenan genangan strain-strain bakteria yang dikaji mengikut kumpulan dekarboksilase	106
Jadual 3.7 : Titer LD50 untuk strain patogenik pengeluar toksin	108
Jadual 3.8 : Peratus kematian <i>T. niloticus</i> yang disuntik dengan strain bakteria yang dikultur di atas agar darah	110
Jadual 3.9 : Keputusan ujian biokimia isolat-isolat yang dikaji	111
Jadual 3.10 : Peratus kesamaan strain kajian dengan 3 spesies <i>Vibrio</i> mengikut skema West dan Colwell (1984)	114

Jadual 4.1: Bilangan kematian dan RPS <i>Tilapia niloticus</i> yang diberi pelalian selepas cabaran dengan bakteria virulen	132
Jadual 4.2 : Bilangan kematian harian anak-anak kerapu yang diberi pelalian selepas dicabar dan RPS vaksin vibrio	134
Jadual 4.3: Purata panjang dan berat anak kerapu diberi pelalian pada awal dan akhir tempoh ternakan di sangkar	139
Jadual 4.4: Peratus jangkitan <i>Vibrio</i> sp. ke atas anak-anak ikan kerapu selepas pelalian celupan rendaman dan nilai RPS selepas lima bulan	143

SENARAI RAJAH

	Muka surat
Rajah 1 : Peta kawasan ternakan ikan sangkar di Semenanjung Malaysia	2
Rajah 2.1 : Peta kawasan percubaan ternakan ikan 'Jelutong Fsh Farm'	21
Rajah 2.2 : Gambarajah kedudukan tangki rawatan anak-anak ikan kerapu diapung di permukaan air secara separuh tenggelam di lubang sangkar	22
Rajah 3.1: Protokol penyediaan ampaian bakteria dari generasi agar darah yang berlainan.	84
Rajah 4.1 : Kaedah penyediaan vaksin mengikut modifikasi dari Fryer <i>et al.</i> (1976)	127

SENARAI GAMBAR

Muka surat

- Gambar 1.1 : Gambarfoto menunjukkan ikan kerapu bersaiz komersial
dijangkiti penyakit vibriosis . 5
- Gambar 3.1: Pembentukan ulser pada ikan keli pada tapak suntikan
dengan ampaian sel strain bakteria patogenik 81
- Gambar 3.2 : Ulser yang terbentuk pada ikan keli hasil suntikan ampaian kultur
bakteria hidup mengikut strain-strain yang digunakan 93

LAMPIRAN 1	Skima asas untuk pengecaman spesies bagi Vibrionaceae
LAMPIRAN 2	Ciri-ciri selektif <i>Vibrio</i> sp. mengikut cara West dan Collwell (1984)
LAMPIRAN 3	Kelok piawai ketumpatan optik (OD) pada 600 nm melawan ketumpatan sel ($\times 10^8$ sel / ml)
LAMPIRAN 4	Peratus mortaliti mengikut OD dan U.P.K/ ml kultur bakteria untuk ujian cabaran
LAMPIRAN 5	Contoh pengiraan LD50 mengikut Kaedah Reed dan Muench (1938)
LAMPIRAN 6	Kod strain bakteria kajian dan kod asal
LAMPIRAN 7	Ramuan untuk pewarna , reagen dan media
LAMPIRAN 8	Data-data kadar hidup dan kadar mortaliti ikan kerapu
LAMPIRAN 9	Data berat dan panjang anak kerapu mengikut rawatan dan percubaan
LAMPIRAN 10	
LAMPIRAN 10.1	Jadual ANOVA dan ujian Barlett's, Ujian LSD dan HSD untuk kadar kemandirian kerapu yang menerima rawatan kemoterapeutik melalui makanan
LAMPIRAN 10.2a	Ringkasan keputusan Ujian ANOVA bagi berat anak kerapu Thailand mengikut rawatan melalui makanan
LAMPIRAN 10.2b	Perbandingan Berpasangan LSD dan Tukey (HSD) bagi berat mingguan anak kerapu Thailand
LAMPIRAN 10.3	Keputusan Ujian ANOVA, Ujian Perbandingan Berpasangan LSD dan HSD bagi kadar mortaliti kerapu Perak mengikut jenis rawatan
LAMPIRAN 10.4	Keputusan Ujian ANOVA, Ujian Perbandingan Berpasangan LSD dan HSD bagi kadar kemandirian mengikut rawatan bagi anak kerapu dari Kelantan
LAMPIRAN 10.5	Jadual ANOVA untuk anak kerapu Kelantan yang diberi rawatan kemoterapeutik secara rendaman
LAMPIRAN 10.6	Perbandingan Berpasangan panjang dan berat mengikut minggu bagi anak kerapu Kelantan
LAMPIRAN 10.7	Keputusan Ujian ANOVA dan Ujian Perbandingan Berpasangan LSD dan Tukey (HSD) untuk kadar kemandirian anak kerapu dari Perak dalam sangkar

LAMPIRAN 10.8	Keputusan Ujian ANOVA (Model linear) untuk perbandingan berat mengikut rawatan bagi kerapu dari Perak di sangkar
LAMPIRAN 10.9	Perbandingan Berpasangan LSD dan HSD (Tukey) bagi berat anak kerapu Perak mengikut rawatan dalam sangkar
LAMPIRAN 10.10	Jadual ANOVA, LSD dan HSD untuk kadar kematian mengikut vaksin dan pencairan vaksin
LAMPIRAN 10.11	Jadual ANOVA, LSD dan HSD untuk mortaliti kerapu mengikut vaksin dan tempoh selepas suntikan
LAMPIRAN 10.12	Jadual ANOVA, LSD dan HSD untuk kemandirian anak kerapu mengikut vaksin dan bulan
LAMPIRAN 10.13	Jadual ANOVA, LSD dan HSD untuk panjang kerapu mengikut vaksin pada permulaan dan akhir percubaan di sangkar
LAMPIRAN 10.14	Jadual ANOVA, LSD dan HSD purata berat kerapu mengikut vaksin
LAMPIRAN 10.15	Perbandingan Berpasangan LSD dan HSD purata panjang dan berat mengikut replikat

PENGHARGAAN

Pada kesempatan ini saya ingin melahirkan ucapan terima kasih saya kepada penyelia utama saya Dr. Wong See Yong di atas bimbingan dan teguran yang diberikan sepanjang tempoh penyelidikan dan penulisan thesis ini.

Ucapan terima kasih juga saya tujukan kepada Dr. Leong Tak Seng selaku pemegang Grant IDRC (International Development research, Canada) untuk Projek Kajian Marine Fish Disease Malaysia yang telah memberi peluang kepada saya untuk menyertai program penyelidikan di bawah projek berkenaan dan di atas segala ulasan terhadap penulisan thesis ini.

Tidak lupa kepada bekas-bekas Dekan Pusat Pengajian Kajihayat yang membenarkan penggunaan makmal dan peralatan yang diperlukan untuk kajian dan kepada rakan-rakan yang turut membuat penyelidikan di bawah program IDRC terutama Dr. L.K.S.W. Balasuriya yang banyak membantu saya menyediakan peralatan kajian di 'Jelutong Fish Farm' dan pengangkutan air laut ke makmal kajian serta turut mengawasi sistem pengudaraan tangki asuhan di mana tanpa beliau beberapa keputusan percubaan sukar diperolehi.

Akhir sekali saya juga ingin mengucapkan terima kasih saya kepada semua individu yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam projek penyelidikan saya termasuk kakitangan makmal dan pentadbiran Pusat Pengajian Kajihayat di atas kerjasama dan perhubungan baik yang telah diberikan kepada saya sepanjang tempoh pengajian saya di USM.

ABSTRAK

Kajian ini bertujuan untuk mengurangkan masalah kematian dan meningkatkan kadar hidup anak ikan kerapu (*Epinephelus* sp.) semasa peringkat awal ternakan di sangkar. Keberkesanan beberapa agen kemoterapeutik iaitu NFS-Sodium, Kloramfenikol, Oksitetrasiklin, Diameton, Nitrofurazon, Furazolidon, Furanax^R, Asid Oksolinik dan Prefuran telah dikaji, melalui kaedah pemberian melalui makanan dan kaedah rendaman. Kesan bahan-bahan rawatan ini dan kaedah rawatan ke atas kadar hidup dan pertumbuhan telah ditentukan. Keputusan menunjukkan bahawa NFS-Sodium dan Kloramfenikol adalah berkesan dalam mengawal vibriosis di dalam sistem kultur tertutup tetapi tidak berkesan di dalam sistem sangkar di mana mortaliti yang direkodkan melebihi 85% bagi semua bahan rawatan.

Kesan yang ditunjukkan oleh vaksin 'formalin-killed' yang disediakan dari *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, dan *Vibrio* sp. dalam bentuk 'Peratus Kemandirian Relatif (RPS)' dibandingkan dengan kumpulan kawalan (tanpa pelalian) kedua-dua di dalam tangki dan dalam kultur ternakan sangkar telah dikaji. Keputusan menunjukkan bahawa penggunaan vaksin campuran meningkatkan kadar hidup ikan yang dirawat di sangkar ($p < 0.05$) dengan signifikan. Ujian di makmal menunjukkan vaksin dapat meningkatkan kerintangan dari ujian cabaran.

Penyaringan strain-strain bakteria berpotensi melalui suntikan ampaian kultur bakteria dan genangan (untuk mengesan keujudan faktor toksigenik) secara i.p. ke atas *Tilapia niloticus* dan *Oreochromis* sp. dan i.m. ke atas *Clarias batrachus* serta *Clarias gariepinus* telah dilakukan. Teknik-teknik ini telah berjaya dalam mengasingkan

strain-strain yang berpotensi iaitu M 16 (dari kumpulan dekarboksilase $A^+L^+O^-$), M 64 dan M 65 (dari kumpulan dekarboksilase $(A^-L^+O^+)$).

Penentuan LD_{50} telah digunakan di dalam pemilihan akhir strain bakteria virulen daripada kumpulan daripada kumpulan-kumpulan dekarboksilase yang sama. Kajian di sini telah menunjukkan penyaringan bakteria vibrio dapat difokuskan kepada kumpulan dekarboksilase $A^+L^+O^-$ dan $A^-L^+O^+$ yang mana telah menunjukkan peratusan strain patogenik yang lebih tinggi. Patogenisiti didapati dapat ditingkatkan atau dipulihkan semula melalui sub-kultur ke atas Agar Darah yang juga telah ditunjukkan melalui penggunaan kaedah suntikan cabaran ke atas *Tilapia niloticus*.

ABSTRACT

THE EFFECT OF SEVERAL CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS AND VACCINES IN THE CONTROL OF VIBRIOSIS IN THE CULTURE OF GROUPER (*Epinephelus* sp.)

This study is aimed at reducing mortality or increasing the survival rate of grouper fingerlings *Epinephelus* sp. during the initial cage culture period. The effectiveness of chemotherapeutic agents, namely NFS-Sodium, Chloramphenicol, Oxytetracycline, Diameton, Nitrofurazon, Furazolidon, Furanax^R, Oxolinic Acid and Prefuran were evaluated both by oral administration and immersion trials. The effects of these chemicals and treatment methods on the growth and survival rate were determined. Results indicated that NFS-Sodium and Chloramphenicol were effective in controlling vibriosis in a closed culture system but were ineffective in cage system where mortality recorded exceeded 85%, irrespective of treatments.

The performance of formalin-killed vaccine, prepared from *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio* sp. in term of Relative Percentage Survival (RPS) in comparison to the controlled group (without immunization) in both indoor tanks and under culture conditions were evaluated. The results showed that administration of mixed-vaccine did significantly increase ($p < 0.05$) the survival rate of treated fish in cage. Laboratory test showed that vaccination enhanced the resistant from challenge test.

Screening of potential bacterial strains through injecting suspensions of bacterial cultures and supernatants (to detect the existence of toxigenic factor) into *Tilapia niloticus*, *Oreochromis* sp., *Clarias batrachus* and *Clarias gariepenus* were made. These techniques have been successful in obtaining the pathogenic strains

namely M 16 (from A⁺L⁺O⁻ decarboxylase group), M 64 and M 65 (A⁻L⁺O⁺ decarboxylase group).

The LD₅₀ determination were used in the final selection of virulent strain from similar decarboxylase groups. This study also showed that screening could be focused on *Vibrio* bacteria belonging to the A⁺L⁺O⁻ and A⁻L⁺O⁺ which showed higher percentage of pathogenic strains. Pathogenicity of bacterial strains was found to increase through repeated culture on Blood Agar as indicated by the challenge test on *Tilapia niloticus*.

BAB 1

1.0 MAKLUMAT LATAR BELAKANG DAN TINJAUAN BAHAN BACAAN

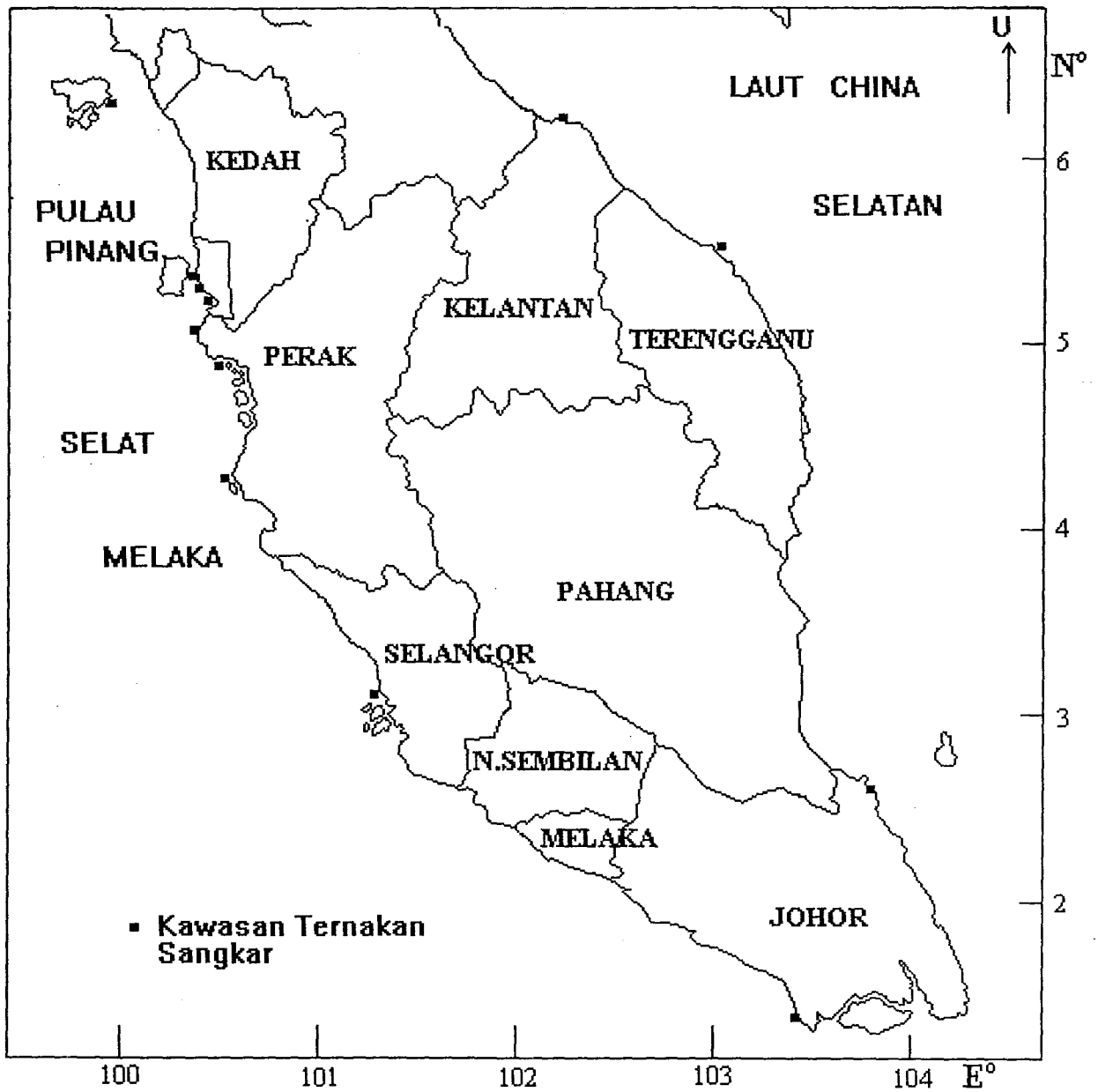
1.1 LATAR BELAKANG

1.1.1 Sumbangan Ternakan Sangkar Kepada Industri Ternakair Di Malaysia

Teknik menternak ikan dalam sangkar di perairan pantai yang mula diperkenalkan dalam tahun 1973 (Chua, 1979) telah berkembang dengan pesat dalam jangkawaktu yang singkat. Mengikut Perangkaan Perikanan 1994 62,756 buah sangkar dengan lebihkurang 679,484 meter persegi kawasan telah dibina (meningkat sebanyak 93% dari 1991) untuk ternakan sangkar. Seramai 923 orang penternak sangkar air payau telah terlibat dari keseluruhan 20,970 orang penternak ikan dalam industri ini (Anon, 1994). Perkembangan kawasan ternakan kebanyakannya tertumpu di pantai barat Semenanjung Malaysia (Rajah 1). Perkembangan industri ini di pantai barat disokong oleh keadaan lautnya yang terlindung dan tenang yang membolehkan usaha ternakan ikan dijalankan sepanjang tahun. Walaupun begitu, semakin banyak kawasan-kawasan baru dibuka di pantai timur di mana terdapatnya lagun dan kawasan-kawasan yang agak terlindung.

Sehingga tahun 1994 dianggarkan sebanyak 5,629 tan metrik ikan dari ternakan sangkar air payau telah dikeluarkan menunjukkan pertambahan sebanyak 164 % daripada tahun 1991 (2,130 tan metrik). Anggaran nilai jualan daripada aktiviti ternakan sangkar air payau pada tahun 1994 adalah lebih kurang RM 89.2 juta berbanding dengan tahun 1991 sebanyak RM 20.9 juta. Pengeluaran ternakan sangkar ini telah memberi sumbangan lebih kurang 10.8 % kepada jumlah pengeluaran ternakair keseluruhannya (114,114 tan metrik) yang bernilai RM 270.6 juta. Kenaikan jumlah pengeluaran dari aktiviti ternakair amat ketara sekali antara tahun 1991 hingga 1994. Keadaan ini berlaku kerana kemerosotan sumber ikan laut di kawasan pantai telah menarik lebih ramai nelayan dan beberapa syarikat besar untuk melibatkan mereka dalam aktiviti ternakair.

Perkembangan ini lebih terasa bila kerajaan menubuhkan pusat-pusat penetasan dan pengeluaran benih ikan dan udang seperti Pusat Pengeluaran dan Penyelidikan



Rajah 1: Peta kawasan ternakan ikan sangkar di Semenanjung Malaysia

Tanjung Demong. Kegiatan ini juga disokong oleh beberapa pusat penetasan benih ikan persendirian seperti benih ikan persendirian seperti Syarikat Hooi Ekspot-Impot dan Toh Gi Wan di Alor Star , Kedah serta Eastern Marine Trading di Johor Bharu, Johor (Munir, 1996). Kemudahan sistem pengangkutan juga turut membantu penternak menubuhkan jalinan sistem bekalan benih dari negara jiran terutamanya dari Thailand (Wong dan Leong, 1986). Benih-benih ikan yang popular untuk ternakan termasuklah ikan siakap (*Lates calcarifer*), kerapu (*Epinephelus* sp.) dan jenahak (*Lutjanus argentimaculatus*) serta benih udang (*Penaeus monodon*) untuk aktiviti ternakan di kolam. Ternakan ikan kebanyakannya dijalankan secara intensif bagi meninggikan kadar pengeluaran.

Permintaan bagi perkhidmatan diagnosis dan bantuan rawatan oleh penternak-penternak ikan kerap kali diterima oleh pihak-pihak yang terlibat dalam bidang kajian penyakit ikan. Ini termasuklah Jabatan Perikanan, Makmal Jabatan Haiwan , Universiti Pertanian Malaysia dan Universiti Sains Malaysia. Kajian-kajian penyakit ikan telah ditingkatkan oleh pihak-pihak yang terlibat ini untuk menyediakan seberapa banyak maklumat yang perlu bagi pembangunan sistem penerangan, diagnosis dan rawatan yang diperlukan.

1.1.2 Kultur Ikan Laut Di Malaysia : Prospek Pembangunan dan Masalah

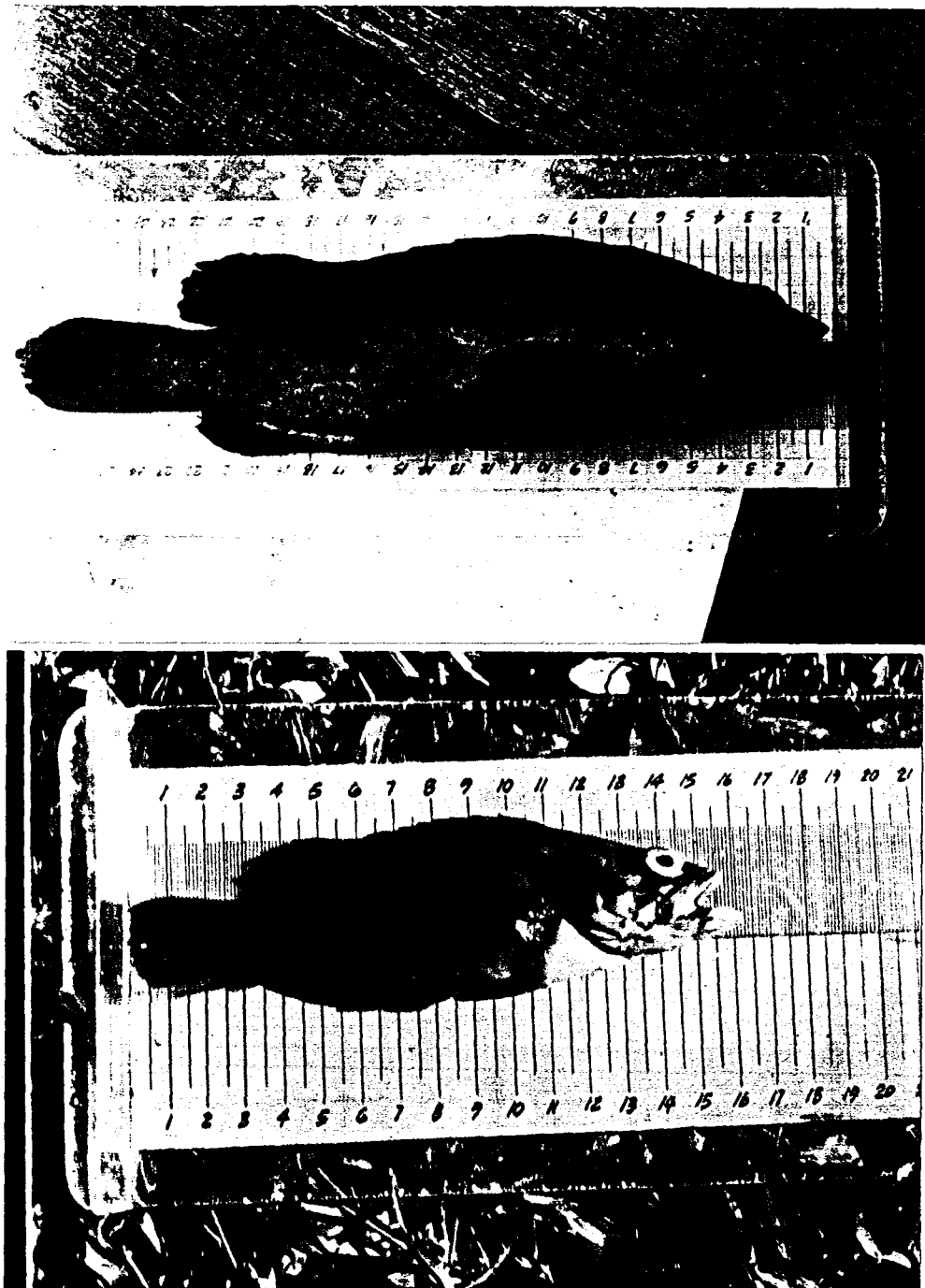
Ikan kerapu, siakap dan jenahak adalah merupakan tiga spesies ikan yang biasanya ditenak secara intensif di sangkar-sangkar ternakan di kawasan pantai negara ini.

Ternakan ikan kerapu masing bergantung kepada benih-benih yang dikutip dari kawasan semulajadi kerana masalah pengeluaran benih di peringkat pusat penetasan. Di Malaysia benih-benih kerapu ini biasanya dikutip di tepi pantai, di lagun-lagun atau kawasan paya bakau. Benih-benih ini boleh didapati disepanjang tahun tetapi musim puncaknya adalah amat pendek. Kutipan benih di pantai barat semenanjung biasanya dilakukan pada bulan September hingga Mac setiap tahun.

Bekalan yang diperolehi dari pengutipan dari kawasan semulajadi ini masih belum mencukupi bagi menampung keperluan ternakan kerapu negara. Bekalan benih untuk industri ternakan tempatan terpaksa disokong oleh bekalan yang diimport dari negara luar. Thailand, Filipina serta Sri Lanka adalah antara negara-negara yang

biasanya membekalkan benih-benih ikan berkenaan (Munir, 1996). Selain dari itu Kerajaan turut melarang eksport dengan tujuan untuk melindungi permintaan industri ternakan tempatan. Sebelum ini benih-benih kerapu banyak dijual kepada negara Taiwan (Munir, 1996).

Perkembangan ternakan kerapu yang menghadapi masalah bekalan benih telah diburukkan lagi oleh masalah penyakit yang kerap kali berlaku pada peringkat awal ternakan diperingkat sangkar dan selepas pengangkutan. Anak-anak ikan kerapu yang baru dibeli atau diimpot dari tempat asal akan mengalami keadaan tegasan selepas diangkut dan keadaan ini tidak pulih selepas dimasukkan ke dalam sangkar. Kematian yang biasa dialami oleh ikan-ikan ini semasa peringkat awal ternakan kebanyakannya disebabkan oleh penyakit 'vibriosis' yang biasanya dikenali dengan tanda-tanda berkudis pada bahagian kulit (Gambar 1.1) seperti yang pernah dilaporkan oleh Chua dan Teng (1978). Beberapa hasil kajian lain juga menunjukkan bahawa penyakit ikan kerapu biasanya disebabkan oleh bakteria *Vibrio* yang menjadi sebab utama kematian (Cheong *et al.*, 1983 dan Wong dan Leong, 1987). Ini menguatkan lagi laporan Chua dan Teng (1978) tentang sebab-sebab penyakit ikan kerapu sebelumnya yang melaporkan bahawa penyakit vibriosis adalah menjadi punca utama kematian. Penyakit 'vibriosis' pada ikan kerapu dapat dikatakan berlaku sepanjang tempoh ternakan dikebanyakan kawasan ternakan ikan yang utama di Malaysia. Ikan kerapu juga dikenalpasti sebagai spesies yang dapat dijangkiti beberapa penyakit lain seperti 'Cryptocaryoniasis' dan juga penyakit 'Swim Bladder Syndrome' dan akhir-akhir ini penyakit baru yang dipanggil 'Sleeping Sickness' atau 'Sleepy Grouper Disease' (Chua *et al.*, 1994) dan 'paralytic syndrome' (Danayadol, 1993). Masalah penyakit timbul selepas beberapa tahun sesuatu kawasan ternakan itu beroperasi. Masalah ini timbul kerana di dalam sistem intensif ikan ternakan lebih mudah diserang penyakit (Tan, 1993). Laporan-laporan kes penyakit ikan kerap kali dapat dibaca di akhbar-akhbar kebangsaan kebelakangan ini (Saiful, 1991). Mengikut rekod Jabatan Perikanan semenjak tahun 1989; beberapa kes penyakit ikan telah timbul dan melibatkan kerugian bernilai berjuta-juta ringgit. Contohnya ialah kes penyakit reput ekor dalam ikan siakap di Kukup, Johor dan Pulau Ketam, Selangor (1990) dan Bukit



Gambar 1.1 : Gambarfoto menunjukkan ikan kerapu bersaiz komersial dijangkiti penyakit vibriosis

Vibriosis ditunjukkan dengan bahagian luar badan ikan yang berulser dan tanda seperti melepuh (boil) pada ikan dijangkiti

Tambun serta Sungai Udang Pulau Pinang (1992) dan Pantai Merdeka Kedah (1993). Penyakit 'vibriosis' dan 'sleeping sickness' telah dilaporkan menjangkiti ikan kerapu dengan meluas di Bukit Tambun Pulau Pinang; Lumut Perak dan Pantai Merdeka Kedah pada tahun 1993 (Munir, 1996). Masalah penyakit yang timbul ini cukup membimbangkan penternak serta Jabatan Perikanan Malaysia. Usaha-usaha penyelidikan telah digiatkan bagi mengatasi masalah tersebut oleh berbagai pihak termasuk Universiti Sains Malaysia dan Universiti Pertanian Malaysia (Shariff dan Subasinghe, 1994).

Sungguhpun usaha ternakan ikan kerapu mempunyai masalah untuk berkembang sepenuhnya namun minat penternak untuk memelihara ikan ini masih berterusan. Ini adalah disebabkan oleh faktor harga yang amat tinggi di pasaran tempatan dan luar negeri. Sehingga akhir tahun 1994, harga ikan kerapu hidup adalah RM 50.00/kg di Hongkong dan merupakan ikan yang sangat popular dihidangkan di restoran-restoran. Harga yang tinggi ini dikaitkan dengan kesukaran untuk mengkultur ikan ini kerana masalah vibriosis yang menyebabkan pengeluaran kerapu yang rendah.

1.2. TINJAUAN BAHAN BACAAN

1.2.1 Penyakit Vibriosis Ternakan Sangkar

Vibriosis adalah satu dari penyakit ikan yang menjangkiti ikan air masin dan payau termasuk jenis-jenis ikan liar yang bersifat suka berpindah (Hjeltnes dan Roberts, 1993). Penyakit ini telah berkembang selari dengan perkembangan industri ternakan ikan. Dalam kes-kes yang teruk penyakit ini telah menyebabkan kematian sehingga 40%. Smith (1988) telah memetik bahawa di negara Jepun sahaja masalah vibriosis telah menyebabkan kerugian melebihi 11 juta pound. Vibriosis pada peringkat awal dikenalpasti sebagai penyakit 'red pest' yang dilaporkan oleh Bonaveri yang menyebabkan kematian kepada belut di dalam ternakan kolam di Itali dan agen penyebab kepada penyakit ini pertama kali disisihkan oleh Canestrini pada tahun 1761 dan dipanggil *Bacterium anguillarum* (dipetik selepas Smith, 1988). Agen penyakit ini kemudiannya dinamakan semula sebagai *Vibrio anguillarum* oleh Bergan pada tahun 1909 (dipetik selepas Smith, 1988).

Masalah vibriosis adalah bersifat global dan menjangkiti berbagai spesies ikan samada di Eropah, Jepun dan Asia Tenggara. Perkembangan penyakit ikan ini telah dikaitkan dengan keujudan bakteria patogenik dalam sekitaran samada secara normal atau dibawa dari tempat lain dengan tidak sengaja melalui pemindahan ikan ternakan yang berpenyakit atau dijangkiti bakteria patogenik. Antara spesies bakteria yang pernah dilaporkan sebagai penyebab kepada masalah vibriosis adalah *V.alginolyticus*, *V. carchariae*, *V.cholerae* (NON-01), *V. damsela*, *V. vulnificus* dan *V. salmonicida*. *Vibrio parahaemolyticus* juga termasuk dalam spesies yang dikaitkan dengan vibriosis (Wong dan Leong, 1990). Chong dan Chao (1986) dan Wong dan Leong (1986) melaporkan bahawa jangkitan vibrio lebih tinggi prevalennya pada ikan kerapu tidak sihat 58.3 % (samada anak ataupun kerapu bersaiz besar) berbanding dengan ikan kerapu sihat (37.1%).

Dari segi patogenesisiti, penyakit vibriosis menunjukkan simptom yang sama dengan jangkitan *Aeromonas salmonicida* dengan menunjukkan perdarahan pada pangkal sirip, pada insang dan dalam mulut. Ulser dan perdarahan juga boleh dilihat pada bahagian permukaan badan. Pada bahagian dalam usus menunjukkan keradangan dan bahagian abdomen menunjukkan perut yang kembung dan berisi dengan cecair 'viscous'. Chong dan Chao (1986) telah berjaya membuktikan bahawa kejadian-kejadian vibriosis yang berlaku di sangkar-sangkar menunjukkan gejala yang sama dengan vibriosis aruhan yang berjangkit pada peringkat makmal (Egidius, 1987). Beliau menerangkan bahawa kesan jangkitan vibrio dengan mendalam dalam tulisannya tentang patogenesisiti dan patologi penyakit ini pada ikan. Penyakit ini ditunjukkan melalui simptom-simptom kehilangan selera makan, pengumpulan bendalir badan, letargi, eksotalmus dan keadaan berkudis pada bahagian kulit. Keputusan nekropsi biasanya menunjukkan pembengkakan limpa dan buah pinggang yang parah dan ketulan darah dapat ditemui dalam bendalir peritoneal. Kajian Rasheed (1989) terhadap induk ikan 'sea bream' (*Acantophagrus cuvieri*) telah menunjukkan bahawa penyakit ini menunjukkan perubahan dan gejala-gejala seperti nekrosis setempat, hepatosit

dengan sitoplasma berasidofilik, kelompangan selaput epitelium dan nekrosis pada organ buah pinggang.

Penyakit vibriosis adalah penyakit berkait dengan faktor 'tegasan' yang disebabkan oleh suhu yang meningkat, perubahan cepat pada suhu air dan kemasinan, penstockan yang terlalu padat, kualiti air yang rendah termasuk paras oksigen yang rendah dan pepejal terampai yang tinggi (Makinen, 1991). Faktor-faktor lain yang membawa masalah adalah lebih makanan ternakan dan pengumpulan najis daripada ikan ternakan yang menyumbangkan bahan-bahan pencemaran seperti posfat dan amonia melalui pengumpulan bahan-bahan organik hasil pereputan makanan lebihan. Bahan-bahan ini boleh mengubah paras optimum kualiti air untuk kehidupan ikan dan seterusnya menimbulkan kesan kepada kesihatan seperti vibriosis Makinen (1991).

Komposisi bakteria paling dominan di kawasan sangkar adalah *Vibrio* sp. Kejudahan *Vibrio* sp. daripada sekitaran dan organisma dalam sekitaran pernah dikaji oleh Sarkar *et al.* (1985). Menurut Sarkar *et al.* (1985) turun naiknya jumlah bakteria ini adalah amat berkait dengan keadaan musim. Menurutnya pada musim hujan bilangan *Vibrio* akan menurun dan pada musim panas, bilangan *Vibrio* sp. akan meningkat. Vibriosis dalam ikan kerapu dapat ditemui sepanjang tahun. Ianya lebih kerap ditemui semasa musim panas dan pada awal musim hujan. Cheong *et al.*, (1983) telah melaporkan jangkitan vibriosis dan parasit boleh berlaku pada masa yang sama. dan Wong dan Leong (1987) telah melaporkan tentang kejudahan *Vibrio* sp. dalam ikan kerapu dan menerangkan bahawa kejadian penyakit vibriosis ini adalah bersifat jangkitan sekunder. Sifat *Vibrio* yang dapat mengambil kesempatan dari kelemahan mekanisma pertahanan perumah boleh mungkin menjadi faktor penyumbang kepada proses perjangkitan terhadap ikan-ikan yang tidak sihat.

Peningkatan kandungan pepejal terapung menyebabkan gangguan pada proses pernafasan ikan dan membawa kepada jangkitan penyakit. Bebanan nutrien yang meningkat hasil larian permukaan semasa musim hujan secara langsung juga menggalakkan perkembangan beberapa jenis parasit insang seperti Monogenea, Trichodinid yang dapat melemahkan ikan dan mendedahkan mereka kepada jangkitan

Vibrio sp. . Parasit tersebut adalah merupakan parasit yang biasa ditemui pada ikan kerapu samada ikan tempatan atau yang diimport dari Thailand (Chong dan Chao, 1986 dan Ruangpun, 1991). Keadaan ini diburukkan lagi dengan kedudukan sangkar yang terletak di muara sungai yang sentiasa terdedah kepada peningkatan organik dari masa ke semasa. Peningkatan bahan organik ini menjadi faktor galakan kepada perkembangan spesies *Vibrio*. Baross dan Liston (1970) menerangkan bahawa kenaikan paras *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio* sp. adalah kerana keupayaan mereka untuk menggunakan pelbagai bahan organik dari sekitaran. Sekitaran laut yang menerima bahan buangan haiwan mengandungi jumlah *Vibrio* sp, dan *Vibrio parahaemolyticus* yang tinggi berbanding dengan kawasan yang tidak tercemar kerana sifat istimewa tersebut hingga menyebabkan penyakit kepada ikan yang pada mulanya sihat.

Pada tahun 1990; Wong dan Leong telah melaporkan dengan lebih lanjut penemuan kajian perbandingan mereka tentang jangkitan vibrio terhadap ikan kerapu sihat dan sakit dalam sangkar terapung. Mengikut mereka kebanyakan bakteria yang diasingkan daripada ikan kerapu sihat dan sakit adalah spesies bakteria *Vibrio*. Mengikut Wong dan Leong (1990), 42% daripada ikan sihat yang diperiksa adalah dijangkiti. Bakteria yang menjangkiti ikan sihat kebanyakannya adalah dari kumpulan II ($A^-L^+O^+$) yang termasuk *V.campbelli*, *V.fischeri*, *V.logei* dan *V.marinus*. Dalam ikan sakit yang diperiksa, 79% adalah dijangkiti dan *Vibrio* yang didapati pada ikan sakit adalah $A^-L^+O^+$ (I) termasuk *V.parahaemolyticus* dan *V.alginolyticus* dan kumpulan V ($A^+O^-L^-$). Berdasarkan kepada hasil diagnosis dan nekropsi beberapa penyelidik lain didapati satu kumpulan bakteria *Vibrio* heterogenous mungkin terlibat walaupun *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio alginolyticus* adalah dua bakteria marin yang biasanya diasingkan daripada ikan kerapu sakit dan dikaitkan dengan insiden-insiden vibriosis (Cheong *et al*, 1983).

1.2.2 Penggunaan Bahan Kemoterapeutik Untuk Kawalan Dan Pengelakan Vibriosis

Dalam usaha untuk mengawal vibriosis, bermacam usaha dan teknik telah dicuba oleh ramai penyelidik serta penternak untuk mengatasi masalah penyakit dan kematian anak-anak ikan kerapu yang diimpot (Chong dan Chao, 1986). Anak kerapu yang dibeli dari kawasan lain yang berjauhan dari tempat ternakan mereka diberi pelbagai rawatan sanitasi untuk pencegahan penyakit semasa dan selepas pengangkutan. Semasa pengangkutan pengumpulan bahan buangan organik dan kenaikan paras ammonia dalam bungkusan atau tangki pengangkutan dikurangkan dengan cara merendahkan bilangan stok, menggunakan bahan-bahan anaestetik untuk mengurangkan pergerakan dan kadar metabolisme ikan, mengangkut ikan pada waktu malam semasa suhu lebih rendah, mengangkut ikan menggunakan lori dengan kontena berinsulasi atau dengan menyejukkan air yang mengandungi ikan dengan menggunakan ais (Hussin, 1992). Untuk mengawal pertumbuhan populasi bakteria di dalam media pengangkut (air), bahan kimia atau antibiotik juga kadangkala digunakan (Chong dan Chao, 1986). Pengurangan bilangan bakteria dalam sistem ternakan menggunakan kaedah seperti pancaran ultra lembayung pernah dicadangkan serta telah digunakan dalam pengurusan ternakan Sako dan Sorimachi, (1985).

Pengawalan penyakit ikan kerapu in-situ dibuat melalui dua kaedah iaitu melalui pengurusan kultur dan kemoterapeutik. Kaedah pengurusan adalah merupakan langkah asas untuk mengawal penyakit yang biasanya dibuat dengan mengawal ternakan supaya berada dalam keadaan sekitaran yang optima semasa dikultur. Penggunaan bahan-bahan ubatan hanya dianggap mustahak semasa penyakit mula merebak. Penggunaan bahan ubatan untuk rawatan profilaktik telah diketahui lama wujud (Sindermann, 1977). Pada masa ini terdapat kira-kira 26 jenis bahan ubatan anti-bakteria yang sering digunakan di Jepun (Ototake dan Hashizume, 1990) dan hampir kesemua ubatan ini yang terdiri dari 4 jenis Sulfa, 1 Nitrofurans, 7 ubatan anti-mikrobiol sintetik dan 14 antibiotik boleh didapati juga di Malaysia. Penggunaan bahan-bahan ini di Malaysia tidak begitu terkawal kerana tidak ada peraturan ketat penggunaannya. Tidak adanya kawalan khusus oleh agensi-agensi tertentu dalam pembelian dan penggunaan bahan-bahan tersebut. Walaubagaimanapun permit impot bahan-bahan kimia kemoterapeutik dan antibiotik hanya dikeluarkan kepada farmasi-

farmasi yang berdaftar sahaja. Kebanyakan bahan-bahan ubatan agak mudah diperolehi di pasaran. Peraturan penggunaan bahan-bahan kimia ubatan dan antibiotik di Malaysia yang diperakukan kebanyakannya adalah mengikut peraturan yang digunakan dilain-lain negara yang membuat kajian kesan bahan-bahan kemoterapeutik tersebut secara lebih komprehensif. Penternak-penternak ikan biasanya dimaklumkan tentang kaedah penggunaan yang sesuai, perkadaran yang betul dan tempoh pemberhentian rawatan supaya gejala tidak baik yang berkait dengan isu kesihatan pengguna hasil keluaran perikanan tidak timbul (Jacobsen dan Berglind, 1988 dan Nygaard *et al.*, 1992).

Pemberian bahan kemoterapeutik kepada ternakan dilakukan melalui makanan atau secara rendaman. Bahan-bahan rawatan seperti Oksitetrasiklin, Tetrasiklin dan Nitrofurantoin selalunya diberikan melalui makanan sebagai additif makanan (Poupard, 1978). Kaedah ini adalah yang agak praktikal untuk dijalankan. Keperluan untuk mengurus kesihatan ternakan menyebabkan penggunaan bahan-bahan rawatan menjadi tidak terbatas dengan penggunaan yang meluas. Kloramfenikol misalnya telah digunakan secara meluas di pusat-pusat penetasan udang (Brown, 1989). Di pusat-pusat penetasan ikan pula, bahan-bahan kimia seperti Formalin, Furanax dan Diametron-Sodium sering digunakan (Ali, 1992). Penggunaan antibiotik dan bahan kimia termasuk di peringkat pusat penetasan dan sistem asuhan yang dikenali dengan kaedah sanitasi samada sebelum pengangkutan, semasa pengangkutan atau pasca pelepasan pernah dilaporkan oleh Chong dan Chao (1986). Penggunaan bahan seperti NFS-Sodium untuk mengawal perkembangan bakteria di peringkat tangki adalah berkesan seperti dibuktikan oleh Tanasomwang dan Muroga (1989). Bagaimanapun penggunaan bahan kemoterapeutik dan antibiotik dalam sistem ternakan telah menyebabkan masalah kerintangan bakteria terhadap antibiotik yang digunakan. Aoki *et al.* (1974) telah melaporkan tentang masalah kerintangan bakteria yang melibatkan bahan-bahan kemoterapeutik yang biasa digunakan termasuklah Kloramfenikol, Tetrasiklin, Furazolidon, Diametron. Masalah kerintangan terhadap antibiotik ini juga telah diterangkan dengan mendalam dalam laporan Hjeltnes (1987) di mana Oksitetrasiklin, Asid oxolinik dan sebatian sulphonamide didapati terlibat dalam menimbulkan bakteria yang rintang di sekitaran.

Bahan kimia kemoterapeutik yang tersebar dikawasan sekitaran ternakan dan di sekitar kawasan ternakan boleh menyebabkan masalah kesihatan kepada manusia melalui perkembangan bakteria yang rintang kepada antibiotik ini. Oleh kerana potensi

masalah yang akan ditimbulkan, bahan kemoterapeutik seperti Kloramfenikol, Furazolidon, Nitrofurazon, Nifurpirinol, Prefuran dan sebatian sulfonamides merupakan contoh-contoh bahan-bahan popular dalam industri akuakultur yang juga perlu ditimbang penggunaan mereka secara meluas. Selain itu, bahan-bahan kemoterapeutik juga mempunyai kesan langsung kepada kesihatan pengguna. Kloramfenikol iaitu antibiotik yang berspektrum luas dapat menyebabkan 'aplasia' sum-sum tulang manusia, furazolidon diketahui dapat menyebabkan 'digestive disorder' serta alahan. Nifurpirinol yang menjadi komposisi Prefuran dan Nitrofurazon diketahui bersifat karsinogenik. Malah oksitetrasiklin juga dilaporkan menyebabkan 'hepatorenal disorder' manakala sebatian sulfonamides dapat menyebabkan 'hepatorenal disorder', leukopenia dan alahan. Furazolidon setakat ini diketahui sebagai mutagen (Schnick, 1990).

1.2.3 Penggunaan Vaksin Dalam Mengawal Vibriosis

Pelalian ikan-ikan ternakan yang pertama berjaya dijalankan adalah pada tahun 1942 (Duff, 1942). Kajian-kajian terkemudian telah membuktikan bahawa pelalian ikan-ikan jenis 'salmonid' dengan vaksin komersial yang disediakan dari spesies *Vibrio anguillarum* dan *Yersinia ruckeri* memberi perlindungan yang baik kepada ikan yang dirawat (Busch, 1983; Tebbit dan Goodrich, 1983). Kajian-kajian kesan vaksin dari segi perlindungan menggunakan *Vibrio anguillarum* dan *Vibrio ordalii* terhadap 'Pacific salmon' (Evelyn, 1984) dan terhadap penyakit 'enteric redmouth' dalam ikan trout (Bullock dan Anderson, 1984) telah mengesahkan bahawa pelalian menggunakan vaksin untuk meningkatkan sistem pertahanan tubuh ikan adalah teknik berpotensi dalam pengurusan kesihatan ikan. Kajian-kajian terhadap keberkesanan vaksin terhadap kadar hidup dan pertumbuhan seperti kajian Sawyer dan Strout (1977) terhadap 'coho salmon' telah membawa kepada perkembangan pengeluaran vaksin oleh syarikat-syarikat persendirian. Kajian-kajian lain yang berkaitan dengan penggunaan dan keberkesanan vaksin dalam rawatan penyakit ikan juga dilakukan oleh Fryer *et al.* (1976), Itami dan Kusuda (1978), Evelyn (1984), Adam *et al.* (1987) dan Lillehaug (1990 dan 1991).

Penggunaan vaksin telah dicadangkan untuk menyokong sistem pengurusan kesihatan ikan oleh Smith (1988). Kaedah kawalan vibriosis menurut Hjeltnes dan Robert (1993) merupakan pilihan terbaik kepada masalah vibriosis. Penggunaan vaksin secara komersial untuk mengawal penyakit 'vibriosis' telahpun diamalkan dikebanyakan negara Eropah dan Amerika Syarikat (Evelyn, 1984 dan Adam *et al.*, 1987). Bagaimanapun penggunaan vaksin di negara ini adalah masih diperingkat awal kajian (Ong, 1984, Ong dan Wong, 1988). Penggunaan vaksin telah dicadangkan untuk menyokong sistem pengurusan kesihatan ikan pada peringkat sangkar ini sebagai langkah pilihan memandangkan penggunaan bahan kimia kemoterapeutik mempunyai kelemahan seperti timbulnya bahaya dari bakteria yang rintang kepada bahan-bahan yang digunakan.

1.2.4 Pemilihan Strain *Vibrio* Untuk Penyediaan Vaksin

Kejayaan penggunaan vaksin adalah kerana pemilihan antigen yang dapat merangsang perlindungan seperti lipopolisakarid (LPS) yang terdapat pada dinding sel bakteria dan yang mungkin dirembeskan ke dalam genangan. Bahan LPS yang tahan haba telah membolehkan vaksin disediakan dengan mudah dan menjadi immunogen yang berkesan dalam kebanyakan ikan (Chart dan Trust, 1984). Bahan antigenik dari spesies *Vibrio anguillarum* dan *Vibrio alginolyticus* dikenalpasti oleh Faris *et al.* (1995) telah menunjukkan sifat perlekatan kepada sel. Bakteria-bakteria dikaji dapat melekat kepada kultur tisu seperti sel hati 'trout' (R1) dan embrio 'chinook Salmon' (CHSE). Spesis *V. anguillarum* dan *V. harveyi* yang dikaji juga melekat kepada mukos kulit ikan 'trout'. Akan tetapi *V. alginolyticus* yang lebih kerap dilaporkan sebagai patogen ikan (Cheong *et al.*, 1983) menunjukkan keupayaan 'binding' yang lebih tinggi dibandingkan dengan *V. harveyi*.

Pengeluaran toksin oleh spesis *Vibrio* dengan penggunaan medium mengandungi 'hypoxanthine' dan asid glutamik telah ditunjukkan oleh Brown (1990). Penggunaan Agar Darah juga didapati meningkat kevirulenan bakteria (Sarkar *et al.*

1987). Peningkatan kepatogenan bakteria selepas dikultur di atas Agar Darah juga pernah disebutkan oleh Sakazaki *et al.* (dipetik selepas Thompson dan Vanderzant, 1976). Penilaian keberkesanan penggunaan Agar Darah untuk meningkatkan kevirulenan dapat dijalankan dengan menggunakan teknik suntikan cabaran terhadap bakteria-bakteria kajian yang kurang virulen.

Kaedah Fryer *et al.* (1976) merupakan kaedah penyediaan vaksin yang diterima oleh ramai penyelidik dan sudahpun dikomersialkan (Smith, 1988). Faktor kos telah diambil berat dalam merekabentuk vaksin dan mempengaruhi pemilihan kaedah penyediaan vaksin (Horne dan Ellis, 1988 dan Tatner, 1993). Tatner (1993) mencadangkan penyediaan 'vaksin mati' seperti vaksin 'formalin-killed WCBS' mengikut kaedah lama seperti Kaedah Fryer *et al.* (1976) iaitu vaksin yang mengandungi sel dan genangan tanpa bahan lain. Vaksin ini telah digunakan dan menghasilkan imuniti atau perlindungan yang baik samada melalui kaedah suntikan atau rendaman (Tatner, 1993). Vaksin yang boleh didapati di pasaran sekarang ini adalah vaksin mati tanpa adjuvant. Penggunaan vaksin dengan 'adjuvant' akan meningkatkan kos pengeluaran dan komplikasi juga timbul semasa hendak digunakan oleh penternak. Penggunaan 'adjuvant' juga telah dilaporkan menimbulkan masalah sampingan terhadap ikan yang disuntik seperti pembentukan 'lesion' dan pembentukan 'granuloma' bila digunakan secara suntikan. Ini akan merendahkan kualiti ikan yang dikeluarkan. Penggunaan vaksin hidup mungkin merbahaya dan perlu didaftarkan. Kajian-kajian pembangunan vaksin yang dilakukan di Universiti of Stirling, U.K. menunjukkan bahawa kaedah rendaman terus dengan vaksin yang disediakan dengan cara ini menunjukkan kesan yang lebih baik jika dibandingkan dengan kaedah-kaedah penyediaan lain. Kajian awal yang dilakukan oleh Ong dan Wong (1988) terhadap ikan kerapu menggunakan vaksin yang disediakan dengan kaedah modifikasi dari Fryer *et al.* (1976) tanpa penambahan 'adjuvant' sebelum ini berjaya menunjukkan keupayaan perlindungan oleh ikan kerapu yang diberi pelalian.

1.3. Objektif

Objektif yang hendak dicapai dalam kajian ini adalah untuk meningkatkan kadar hidup benih-benih ikan kerapu ternakan daripada peringkat benih kepada saiz pasaran melalui rawatan sanitasi, rawatan ubat-ubatan dalam makanan dan vaksin. Objektif kajian diharap dapat dicapai melalui kajian-kajian yang melibatkan :

- i) Penilaian beberapa bahan kimia ubatan dan antibiotik terpilih darisegi keberkesanan mereka dalam rawatan melalui makanan dan rawatan rendaman dalam mengawal penyakit vibriosis kerapu.
- ii) Pemilihan kaedah penyenggaraan bakteria patogenik untuk memudahkan penyediaan vaksin melalui penggunaan teknik sub-kultur berulang kali di atas agar darah dengan menguji patogenisiti mereka dari segi mortaliti Tilapia yang dicabar dengan strain bakteria berkenaan.
- iii) Pemilihan strain bakteria patogenik melalui kaedah penyaringan bakteria iaitu suntikan mortaliti Tilapia dan pembentukan nekrosis untuk digunakan dalam penyediaan vaksin.
- iv) Penentuan keberkesanan vaksin dalam melindungi ikan yang diuji khususnya ikan kerapu daripada penyakit melalui penggunaan strain vibrio tempatan diberi secara rendaman kemudian dibiarkan di sangkar untuk cabaran semulajadi.

BAB 2

2.0 KESAN BEBERAPA BAHAN KEMOTERAPEUTIK DALAM MENGAWAL PENYAKIT VIBRIOSIS IKAN KERAPU

2.1 PENDAHULUAN

Penggunaan bahan kemoterapeutik dalam bidang akuakultur kini semakin meluas dan sering digunakan samada untuk kawalan penyakit, mencegah jangkitan air, memperbaiki kualiti air ternakan dan mengurangkan trauma pengendalian. Sindermann and Lightner (1988) dan Fitt *et al.*, (1992) telah menulis tentang keperluan bahan-bahan ini dalam kawalan penyakit spesies-spesies ternakan tertentu. Malangnya kebanyakan bahan kajian dan penemuan hanya untuk spesies-spesies ikan dari negara-negara beriklim sederhana (temperat). Maklumat tentang bahan-bahan kemoterapeutik dan kaedah penggunaannya terhadap spesies-spesies ikan di negara-negara beriklim tropika seperti Malaysia masih lagi berkurangan.

Penggunaan dan pemilihan bahan kemoterapeutik di negara ini masih berpandukan kepada kaedah yang diterima pakai di negara seperti negara Jepun yang lebih maju dalam bidang akuakultur. Antara maklumat berkenaan dengan penggunaan dan keberkesanan bahan-bahan kimia dan antibiotik untuk industri akuakultur yang digunakan adalah seperti laporan penyelidikan Endo *et al.* (1973) dan laporan kekesanan NFS-sodium atau 'Natrium-Nifurstirenat' ke atas bakteria pada rotifer yang digunakan sebagai makanan larva ikan oleh Tanasomwang dan Muroga (1989). Kekurangan maklumat khusus keberkesanan bahan kemoterapeutik akuakultur terhadap spesis akuakultur tempatan adalah amat ketara sekali dan keadaan ini telah memaksa industri akuakultur negara bergantung kepada kertas-kertas panduan yang dikeluarkan oleh agensi-agensi dari negara lain. Pergantungan maklumat dari negara lain membolehkan industri akuakultur negara menampung keperluan maklumat teknikal yang diperlukan walaupun disedari kesan yang dilaporkan adalah terhadap spesies temperat yang mungkin tidak bersesuaian dengan spesies akuakultur setempat seperti ikan kerapu. Sumber maklumat lain yang turut diterima pakai adalah maklumat-maklumat dari Sano dan Fukuda (1987) dan Schnick (1990) serta panduan yang dikeluarkan oleh Kementerian Pertanian, Perhutanan dan Perikanan Jepun (Ministrial Ordinance Regarding the Control of Use of Drugs for Animal).

Beberapa kaedah rawatan seperti pemberian ubatan melalui makanan dan secara rendaman merupakan rawatan penyakit ikan yang mudah untuk dijalankan. Rawatan rendaman dapat digunakan dalam kadaran yang tepat dan kesan rawatan dapat diperhatikan dengan teliti. Kaedah ini diterima sebagai kaedah sanitasi yang baik untuk kultur dan sistem ternakan dalam tangki. Ianya dapat memberi kesan yang baik kepada kesihatan berbagai spesies ikan ternakan seperti dilaporkan oleh Fitt *et al.* (1992). Tanasomwang dan Muroga (1989) telah menunjukkan bahawa rawatan begini dapat merendahkan bilangan bakteria dalam air. Chong dan Chao (1986) yang mengkaji kesan rawatan sanitasi ke atas benih-benih ikan selepas pengangkutan telah memperakukan bahawa kaedah rawatan ini baik untuk digunakan. Konsep rawatan sanitasi dipercayai dapat juga mengurangkan bilangan parasit yang terdapat pada ikan yang diangkut serta juga sebagai bahan antiseptik yang dapat melindungi ikan-ikan yang luka daripada serangan patogen. Dengan kaedah yang digunakan kesihatan ikan yang dikendalikan dan dipulihkan akan meninggikan kadar hidup ikan-ikan berkenaan semasa diasuh dan juga selepas ditenak di sangkar.

Kaedah rawatan melalui makanan dianggap terbaik dalam menentukan pengambilan bahan kemoterapeutik mengikut kepekatan yang dikehendaki bagi membunuh organisma sasaran. Bagaimanapun kaedah pemberian melalui makanan juga mempunyai kelemahan seperti kadar penyerapan yang berbeza bahan yang digunakan oleh tisu perumah dan beberapa bahan dapat menyebabkan makanan yang digunakan 'lenyap' di samping kekesanan atau ketoksikan bahan yang boleh berubah mengikut kualiti air. Pemilihan bahan-bahan yang digunakan dalam kemoterapi adalah bergantung kepada pertimbangan yang dibuat terhadap ketersediaan dalam perumah, takaran di mana mereka berkumpul di dalam tisu dan kadaran di mana mereka kurang berkesan, faktor harga dan kemungkinan kesan tidak baik kepada sekitaran (Leong, 1993).

Dalam kajian rawatan vibriosis yang dikaji disini, kaedah ditumpukan kepada pemberian bahan kemoterapeutik melalui makanan dan melalui kaedah rendaman. Dua kaedah ini telah dipilih kerana kesesuaian mereka dengan keadaan dan saiz ikan kerapu yang dirawat. Bahan kemoterapeutik yang telah dipilih untuk dicuba adalah Kloramfenikol, NFS-Sodium, Furanax, Prefuran, Nitrofurazon, Furazolidon, Asid Oxolinik, Oksitetrasiklin dan Diameton. Penggunaan bahan-bahan ini telah digunakan berdasarkan panduan penggunaan oleh FDA dan EPA. Kepekatan bahan-bahan yang

biasa diikuti adalah mengikut cadangan beberapa penyelidik seperti Snieszko, Eastern Fish Disease Laboratory, Amerika Syarikat (Brown dan Gratzek, 1980).

Mengikut Brown dan Gratzek (1980) kepekatan bahan-bahan yang dicadangkan oleh Snieszko adalah antara 50 hingga 75 mg/ kg berat ikan selama 5 hingga 10 hari (rawatan melalui makanan) dan antara 10 hingga 50 ppm (rendaman) bagi Kloramfenikol; Prefuran pada takaran 0.4 hingga 0.8 mg/ kg untuk rawatan profilaktik jangka panjang dan 2 hingga 4 mg/ kg untuk rawatan melalui makanan antara 3 hingga 5 hari dan 0.05 hingga 0.1 ppm untuk rawatan rendaman jangka panjang. Bagi Furazolidon kepekatan yang dicadangkan adalah antara 25 hingga 75 mg/ kg berat ikan sehari sehingga 20 hari diberi melalui makanan; Nitrofurantoin sebanyak 10 mg/kg makanan selama 3 hingga 6 hari rawatan dan 0.01 ke 0.1 ppm untuk rawatan rendaman jangka panjang. Asid Oxolinik pada kepekatan 3 mg/kg berat ikan sekali sehari selama 5 hari dan untuk rawatan rendaman pada 1 ppm untuk rawatan 24 jam manakala bagi Oksitetrasiklin digunakan pada 50 hingga 75 mg/kg berat ikan selama 10 hari melalui makanan. Bahan Diametron dicadangkan digunakan pada kepekatan antara 100 hingga 200 mg/ kg berat ikan sehari melalui makanan dan rawatan diberikan selama 14 hari. Alderman dan Michel (1992) turut menggariskan kepekatan rawatan melalui makanan terhadap beberapa bahan di atas untuk rawatan melalui makanan selama 10 hari pada kepekatan seperti berikut : oksitetrasiklin pada 50 hingga 80 mg/ kg, Kloramfenikol pada 50 hingga 80 mg/kg, Sulphonamide termasuk Diametron pada 200 mg/ kg, bahan Nitrofurantoin termasuk Furazolidon pada 50 hingga 80 mg/ kg dan Nifurfirinol atau Prefuran 10 hingga 50 mg/kg. Walaupun begitu bagi Asid Oxolinik terdapat cadangan lain bagi kepekatan rendaman iaitu 10 mg/ liter (10 ppm) air (Sano dan Fukuda, 1987) dan 15 mg/ kg berat badan (Hustvedt *et al.*, 1992) dan bagi NFS-Sodium untuk kaedah rendaman pada 0.5 hingga 2 ppm (Iwata *et al.*, 1988)

Kloramfenikol biasa digunakan dalam merawat penyakit reput ekor, 'furunculosis', 'haemorrhagic septicemia', 'pasteurellosis', ulser dan juga vibriosis pada kepekatan di atas. Prefuran sering digunakan untuk rawatan 'columnaris', reput ekor, penyakit insang, 'haemorrhagic septicemia' dan juga vibriosis pada kepekatan 0.5-1 ppm yang agak tinggi dari di atas untuk rendaman jangkapendek. Furazolidon selain digunakan untuk rawatan 'furunculosis' juga digunakan untuk rawatan vibriosis. Asid Oxolinik dilaporkan digunakan untuk 'columnaris', 'furunculosis', 'haemorrhagic septicemia' dan juga vibriosis manakala Oksitetrasiklin lebih meluas penggunaannya

termasuk dalam rawatan penyakit 'Acinobacter', 'erythrodermatitis', 'columnaris', 'edwardsiellosis', 'purefactive disease', bintik darah dalam ikan Salmon, 'furunculosis', 'enteric septicemia' dan penyakit ulser manakala NFS-Sodium pernah digunakan untuk penyakit 'Streptococciosis' pada kepekatan 50 mg/kg berat ikan untuk rawatan 5 hingga 10 hari manakala Diameton pada kepekatan 10-20 mg/kg. Diameton-Sodium banyak digunakan banyak digunakan dipusat penetasan udang (Brown, 1989; Austin dan Austin, 1987 serta Sindermann dan Lightner, 1988).

Kajian di sini dijalankan bagi menentukan keberkesanan bahan kemoterapeutik bagi pengelakan dan pengawalan penyakit dalam ikan kerapu yang sering menghadapi masalah vibriosis dengan kaedah rawatan melalui makanan dan secara rendaman. Kaedah-kaedah yang dicuba diharapkan berkesan seperti ke atas spesies ikan temperat. Data-data hasil rawatan yang spesifik kepada spesies ikan kerapu perlu diperolehi untuk digunakan sebagai panduan pengurusan penyakit ikan ini pada masa depan. Hasil kajian amat berguna bagi mengelakkan penggunaan bahan-bahan tersebut bersandarkan kepada laporan tentang kesan positif mereka terhadap spesies-spesies ikan lain yang mungkin tidak sesuai untuk ikan ini.

Hasil kajian diharapkan dapat mengurangkan kematian selepas pengangkutan. Ini akan dapat meningkatkan kadar hidup anak-anak ikan kerapu yang baru diangkut atau dibawa dari tempat lain yang sering mengalami penyakit dan kematian pada peringkat awal pelepasan di sangkar ternakan. Keputusan kajian dijangka dapat digunakan oleh Jabatan Perikanan dan penternak yang menghadapi masalah dalam ternakan ikan ini terutama sekali masalah vibriosis yang biasanya menyebabkan kematian yang adakalanya mencapai angka seratus peratus. Keputusan kajian tentang keberkesanan kaedah rawatan sanitasi dengan bahan kimia tertentu hasil pemerhatian dari kajian saintifik perlu disebarikan kepada mereka yang terlibat di dalam industri supaya penggunaan bahan kimia yang tidak berkesan atau tidak dihendaki tidak diteruskan.

2.2 OBJEKTIF

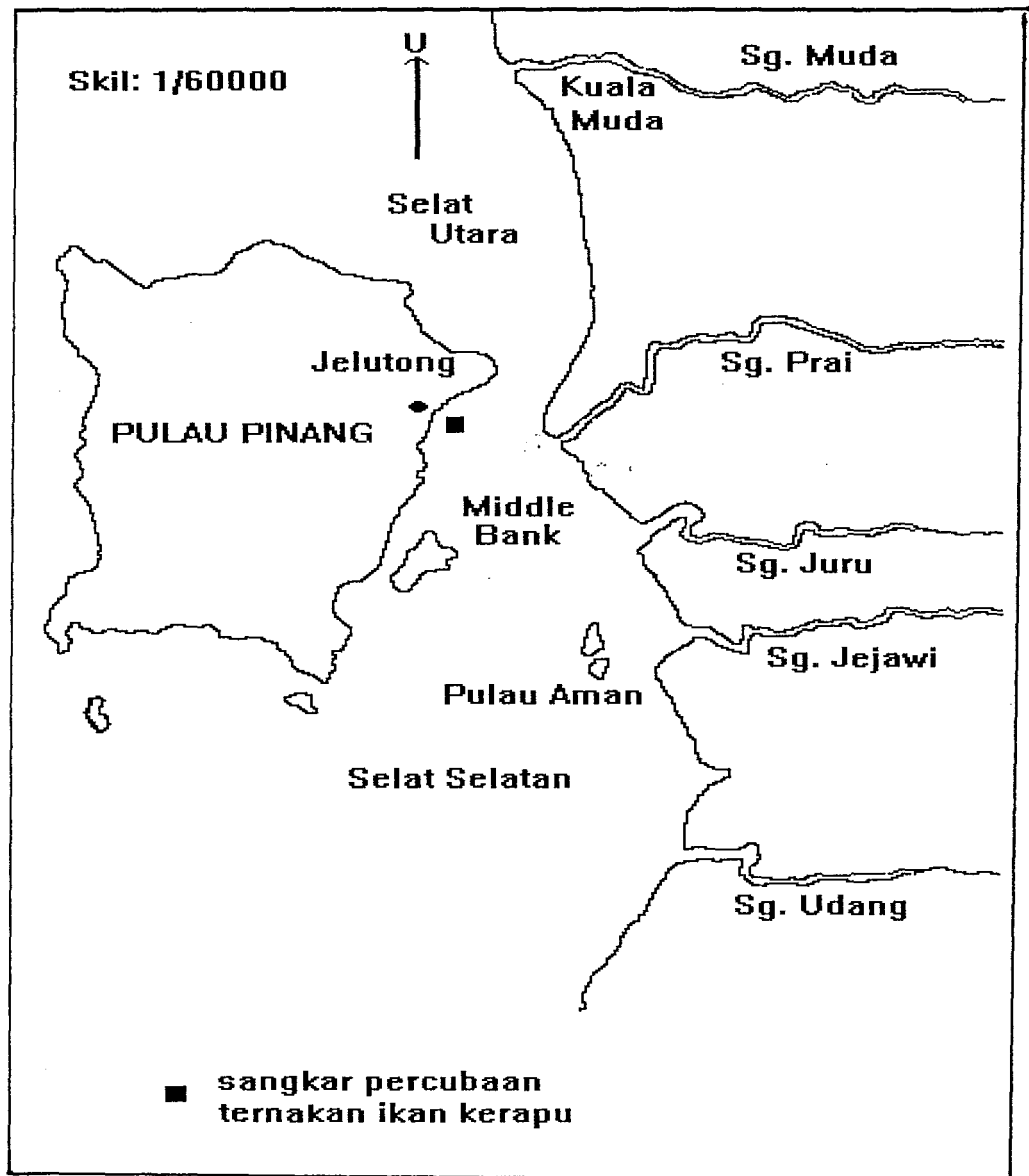
- i) untuk menilai kesan beberapa bahan kemoterapeutik yang diberi melalui makanan terhadap pengawalan penyakit vibriosis dalam anak-anak ikan kerapu baru ditenak di sangkar
- ii) untuk mengetahui kesan rawatan rendaman jangka panjang dengan bahan-bahan kemoterapeutik ke atas anak-anak ikan kerapu selepas pengangkutan dengan penentuan kadar kemandirian di dalam tangki asuhan dan kemudiannya menentukan kadar kemandirian serta kadar pertumbuhan di dalam sangkar.

2.3 BAHAN DAN KAEDAH

2.3.1 Rawatan Profilaktik Melalui Makanan Terhadap Anak Ikan Kerapu Dari Thailand

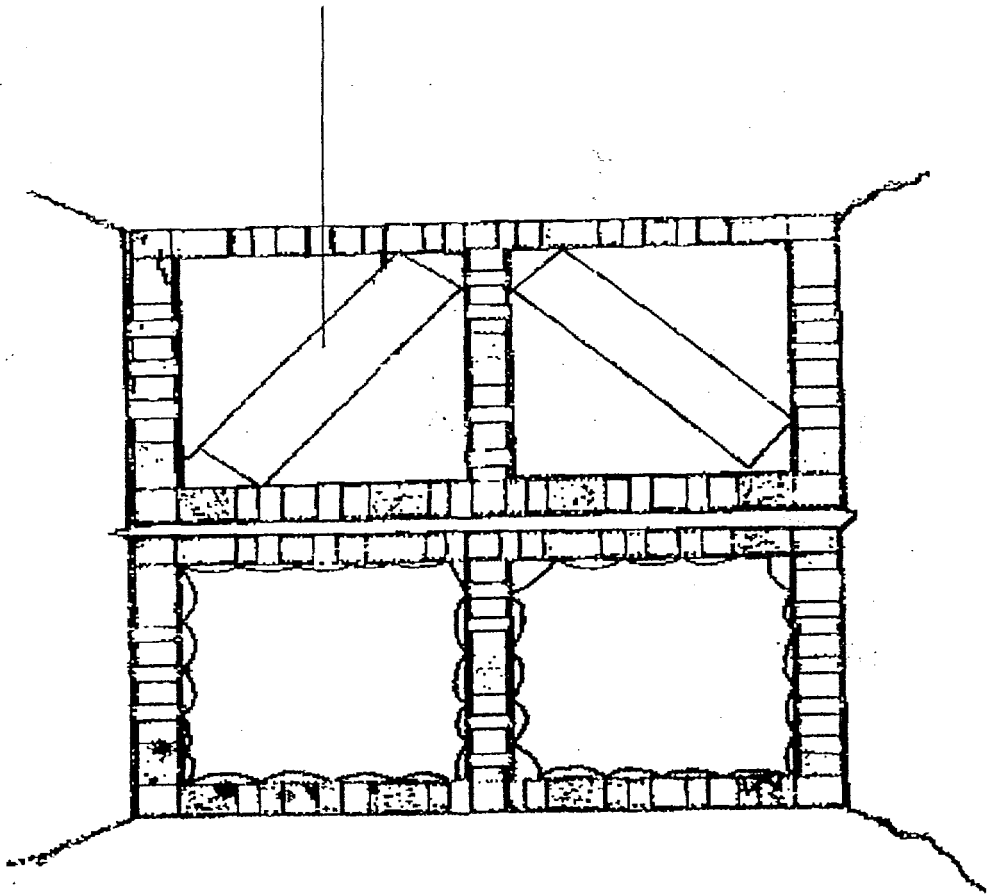
Anak-anak ikan kerapu bersaiz 41.1 ± 3.4 mm (purata berat 1.0 ± 0.2 g) dari Thailand digunakan. Lima ribu (5000) ekor anak-anak ikan diangkut dalam 20 tangki bulat setiap satu mengandungi 250 ekor anak ikan di dalam 20 liter air masin (25 ppt) dan diberi pengudaraan.

Percubaan rawatan telah dijalankan di 'Jelutong Fish Farm' berhampiran 'Middle Bank', Pulau Pinang (Rajah 2.1). Anak kerapu yang baru sampai dipindahkan daripada tangki-tangki pengangkut ke dalam dua buah tangki empat segi bujur bersaiz (2.7 x 0.5 x 0.6) meter padu diisikan dengan air laut pada 75% isipadu tangki (630 liter) pada kemasinan 30 ppt dan diberi pengudaraan. Tangki-tangki berkenaan diapungkan di atas permukaan air di lubang sangkar seperti ditunjukkan dalam Rajah 2.2 bagi mengurangkan bebanan ke atas sangkar. Untuk mengurangkan bebanan parasit dan bakteria, 63 ml larutan formalin (37 % formaldehid) dimasukkan ke dalam 630 liter air laut di dalam tangki berkenaan bagi mendapatkan kepekatan 100 ppm. Rawatan telah dijalankan selama 6 jam (Kepekatan menurut SEAFDEC, 1980) sebelum anak-anak kerapu tadi dipindahkan ke dalam sangkar bersaiz (1.3 x 1.3 x 1.3) meter padu.



Rajah 2.1 : Peta kawasan percubaan ternakan ikan 'Jelutong Fish Farm'

kedudukan tangki gentian kaca yang diapungkan
di permukaan air di lubang sangkar



Rajah 2.2 : Gambarajah kedudukan tangki rawatan anak-anak ikan kerapu diapung di permukaan air secara separuh tenggelam di lubang sangkar

Catitan : Berat tangki berisi air tidak dapat ditampung oleh sangkar yang boleh menyebabkan sangkar separuh tenggelam sekiranya tangki diletakkan di atasnya.

Anak kerapu yang sihat dipilih dan dimasukkan ke dalam 18 sangkar bersaiz seperti di atas dengan kadar penstokan 150 ekor setiap sangkar. Anak kerapu yang didapati sakit diasingkan ke dalam tangki kuarantin untuk rawatan segera dan pemerhatian. Makanan berubat mengandungi bahan kemoterapeutik mengikut perkadaran berat bahan dalam gram bagi setiap kilogram berat ikan iaitu Prefuran (0.5 g/kg), Kloramfenikol (0.242g/kg), Nitrofurazon (0.5 g/kg), Furazolidon (0.5 g/kg), Oksitetrasiklin (0.5 g/kg), Asid Oxolinik (12 g/kg), NFS-sodium (0.5 g/kg), Diameton (0.5 g/kg) berdasarkan Snieszko (dipetik selepas Brown dan Gratzek, 1980) diberi bermula pada hari yang kedua selepas penstokan sehingga hari keempat-belas. Bahan-bahan berkenaan masing-masing mengikut berat bahan bagi 1 kg ikan digaulkan dengan 100 g (10% berat ikan) ikan baja hancur. 117 bungkus ikan baja hancur seberat 100 g disediakan untuk rawatan selama 13 hari dengan duplikat. Bungkus ikan baja yang disediakan tersebut disimpan di dalam peti sejuk sebelum digunakan pada hari rawatan.

Pada hari rawatan sembilan bungkus mengandungi 100 g ikan baja (sebungkus untuk setiap rawatan termasuk kawalan) dikeluarkan dari peti sejuk dan dibiarkan supaya lembut dan dicampur bahan kemoterapeutik yang telah disediakan pada takaran untuk 1 kg berat ikan dan digaul sehingga sebati. Kadar pemberian makanan yang digunakan adalah menurut Chua dan Teng, 1978 (10% dari berat ikan) dengan memberi makanan hingga ikan didapati telah kenyang. Makanan diberi sebanyak duakali sehari iaitu sekali pada sebelah pagi dan petang. Pemberian makanan sebelah petang menggunakan makanan yang disediakan sebelah pagi yang disimpan di dalam bekas berinsulasi berisi ketulan ais untuk kegunaan sebelah petang. Ikan baja hancur tanpa bahan kemoterapeutik digunakan kawalan. Pengiraan bilangan ikan yang masih hidup dibuat sekali seminggu untuk mendapatkan jumlah kemandirian mingguan. Perlakuan ini dibuat selama enam minggu kecuali pada minggu pertama. Kematian kerana pengendalian pada minggu pertama tidak dapat diambil dengan tepat kerana kesukaran mengasingkan ikan mati, nazak dan ikan hidup di dalam sangkar.

Berat individu dari 16 ekor ikan pada permulaan percubaan, 7 ekor pada minggu pertama, kedua dan kelima, 6 ekor pada minggu ketiga dan 5 ekor pada minggu kelima diukur untuk analisa kadar tumbesaran mengikut jenis rawatan kemoterapeutik yang diberikan. Data berat tidak diambil pada minggu keenam memandangkan bilangan anak ikan yang masih hidup terlalu kecil. Bilangan sampel untuk berat ikan pada minggu

kedua adalah disekitar 16%. Bilangan sampel yang sama diambil dari kedua-dua replikat bagi setiap rawatan dan kawalan kecuali pada minggu kelima di mana sampel berat dari rawatan Prefuran adalah 5 dari replikat pertama dan 7 dari replikat kedua. Data-data dari replikat digabungkan dan proses untuk melihat pencapaian berat mingguan bagi setiap kumpulan rawatan bermula dengan minggu pertama hingga minggu keenam. Perbandingan pencapaian berat ikan dikira dengan mengambil berat awal sebagai 'kosong' dan perbezaan kesan rawatan dibuat dengan membandingkan berat yang dicapai setiap minggu yang diperolehi melalui perbezaan berat minggu sebelumnya. Korelasi kadar hidup dan pencapaian berat dikaitkan dari data minggu kedua, ketiga dan keempat dan kelima kadar hidup dan berat.

2.3.2. Kajian Punca Kematian Anak Ikan Kerapu yang Diternak Di Kawasan Ternakan Ikan Jelutong

30 ekor anak-anak ikan yang didapati tidak sihat, dijangkiti penyakit atau kehilangan selera makan dikutip setiap hari selama tiga hari dan disimpan di dalam bekas plastik dan dilabelkan. Sampel disimpan di dalam kotak berinsulasi berisi ais dan dibawa pulang ke makmal untuk dinekropsi sebaik sahaja sampai ke makmal. Pemeriksaan bahagian dalam badan ikan dibuat selepas bahagian luar badan ikan diperiksa. Pemeriksaan bakteriologi dilakukan ke atas 15 ekor sehari dari 30 ekor ikan dari sampel asal dan dilakukan selama tiga hari. Untuk pemeriksaan bakteriologi, bahagian luar badan ikan terlebih dahulu disapukan dengan alkohol 70% untuk mengelakkan pencemaran bakteria dari sekitaran. Alat bedah yang digunakan terlebih dahulu dicelupkan ke dalam alkohol 70% dan dibakar sebelum digunakan. Penyisihan bakteria *Vibrio* sp. dibuat dari buah pinggang dengan mengambil inokulum menggunakan gelungan wayar yang steril dan menginokulatkannya ke atas agar selektif 'Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar' (TCBS). Sampel untuk pemeriksaan parasit disimpan di dalam peti sejuk untuk diperiksa kemudiannya. Sampel untuk pemeriksaan bakteriologi juga digunakan untuk pemeriksaan parasit. Untuk pemeriksaan parasit, bahagian insang didedahkan dengan memotong operkulum dengan gunting dan bahagian yang melekatkan insang pada bahagian ikan dipotong. Insang dipindahkan ke atas sisip kaca dan bahagian 'arch' yang dari tulang rawan dipotong. Pemeriksaan parasit dibuat dengan kaedah pengikisan semua sisir insang iaitu dikiri dan kanan badan ikan. Insang dikikis dengan menggunakan pisau bedah dan hasil kikisan kemudiannya diletakkan di atas sisip kaca