

**KAJIAN HISTOPATOLOGI TISU OTAK *Lates Calcarifer* YANG DIJANGKITI
*VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN)***

NOR ASHIDA BINTI AHMAD

**DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
DENGAN KEPUJIAN**

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

MEI 2008

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: KAJIAN HISTOPATOLOGI TISU OTAK LATES CAL CARIFER
YANG DIJANGKITI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN).

IJAZAH: IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN

SAYA NOR ASHIDA BINTI AHMAD
 (HURUF BESAR)

SESI PENGAJIAN: 07 / 08

mengaku membenarkan tesis (LPSM/Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institut pengajian tinggi.
4. Sila tandakan (/)

SULIT

TERHAD

TIDAK TERHAD

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau Kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

Disahkan Oleh

NURULAIN BINTI ISMAIL
LIBRARIAN

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

DR. ROZIAH H. KAMBUL

Nama Penyelia

(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: J-5739
JALAN PENAGA TAMAN MAJU
77000 JASIN, MELAKA

Tarikh: 14/5/08

Tarikh: 14/5/08

CATATAN:- *Potong yang tidak berkenaan.

**Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa /organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan atau disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

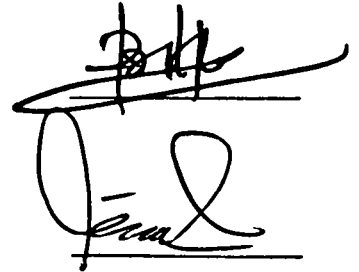
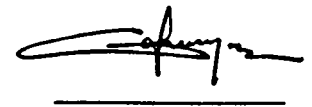
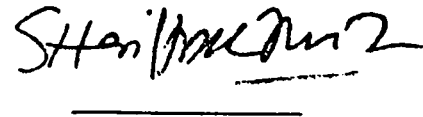
16 Mei 2008



NOR ASHIDA BINTI AHMAD

HS2005-1815



DIPERAKUKAN OLEH**Tandatangan****1. PENYELIA****(DR. ROZIAH HJ. KAMBOL)****2. PENYELIA BERSAMA****(JULIAN RANSANGAN)****3. PEMERIKSA****(DR. WONG NYET KUI)****4. DEKAN****(PROF. MADYA DR. SHARIFF A. KADIR S. OMANG)**

PENGHARGAAN

Bismillahirrahmanirrahim...

Bersyukur saya ke hadrat Allah S.W.T kerana dengan izin-Nya dan limpah kurnia-Nya, disertasi ini dapat juga saya siapkan sebagai memenuhi syarat untuk pengijazahan. Dalam menyiapkan kajian ini, sesungguhnya saya tidak berkeseorangan di mana saya mendapat pelbagai bentuk bantuan serta tunjuk ajar yang tidak berbelah bagi daripada pelbagai pihak. Pertamanya saya ingin mengucapkan jutaan terima kasih ke atas Dr. Roziah Haji Kambol selaku penyelia dan Encik Julian Ransangan selaku penyelia bersama bagi kajian saya selama ini. Pelbagai tunjuk ajar, nasihat, bantuan, teguran, didikan, dorongan, dan sokongan mereka telah menguatkan lagi keazaman saya untuk menyiapkan kajian ini.

Seterusnya saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada kakitangan makmal Institut Penyelidikan Marin Borneo (IPMB) yang banyak memberikan kerjasama dan membantu saya dalam menyiapkan kajian disertasi ini.

Ucapan terima kasih yang tidak terhingga ini juga ditujukan kepada ayah saya, Encik Ahmad bin Haji Ibrahim, emak saya, Puan Sa'diah binti Salim, Along, Angah, Kak Ain, Allahyarham Edi, Nadia, dan Mira yang amat banyak memberikan semangat dan dorongan dari segi kerohanian kepada saya selama ini. Segala perit jerih anda semua sesungguhnya tidak dapat saya balas. Juga buat rakan-rakan seperjuangan yang sama-sama membantu saya dalam menyiapkan kajian ini, ribuan terima kasih yang tidak terhingga saya ucapkan. Semoga apa yang kita usahakan ini akan menjadi titik tolak ke atas kejayaan yang mendatang, insya-Allah.

Akhir sekali, saya ingin memohon maaf di atas segala kekurangan dan kesilapan yang ada dan semoga kajian disertasi ini dapat dimanfaatkan oleh pihak lain untuk kajian pada masa akan datang.

ABSTRAK

Viral nervous necrosis (VNN) adalah salah satu penyakit ikan yang disebabkan oleh jangkitan betanodavirus. Kajian mengenai jangkitan VNN telah dijalankan ke atas tisu otak ikan daripada spesies *Lates calcarifer* menggunakan teknik histopatologi. Beberapa sampel ikan yang berlainan usia telah digunakan dalam kajian ini, iaitu ikan-ikan yang berusia 15, 19, 20, 24, 26, 27, 30, 31, 32, 35, 37, 41, 45, 50, 52, 56, 60, 65, 70, 74, 80, 92, dan 102 hari selepas penetasan. Objektif kajian ini adalah untuk mempelajari teknik histopatologi bagi mengenalpasti tisu otak yang dijangkiti oleh VNN, mengenalpasti perubahan serta kesan yang berlaku pada tisu otak ikan yang dijangkiti oleh VNN, dan menentukan peringkat usia ikan yang dijangkiti oleh VNN. Daripada hasil kajian ini, beberapa teknik baru telah dapat dipelajari dan boleh diaplikasikan dalam kajian serta penyelidikan histopatologi yang lain pada masa akan datang. Melalui kajian histopatologi ini, pembentukan vakuolasi berlaku di dalam tisu otak beberapa sampel ikan yang dijangkiti oleh VNN. Perubahan-perubahan yang banyak atau sedikit akibat daripada penyakit ini telah diperhatikan pada sampel-sampel tersebut. Keputusannya, tiada penentuan usia ikan yang spesifik bagi jangkitan VNN. Ciri-ciri klinikal bagi ikan-ikan ini juga tidak dapat menentukan samada tisu otak ikan-ikan tersebut telah dijangkiti atau belum dijangkiti. Penerangan tambahan mengenai kajian ini telah diterangkan di dalam bab perbincangan.

HISTOPATHOLOGICAL STUDY OF THE BRAIN'S TISSUE OF *Lates Calcarifer* INFECTED WITH VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN)

ABSTRACT

Viral nervous necrosis (VNN) is one of the fish diseases causing by infection of betanodavirus. The study of the infection of VNN was investigated in the brain's tissue of *Lates calcarifer* by using histopathology technique. Several ages of species were studied which are 15, 19, 20, 24, 26, 27, 30, 31, 32, 35, 37, 41, 45, 50, 52, 56, 60, 65, 70, 74, 80, 92, and 102 days after hatchery. The objectives of this study were to learn histopathology technique for identification of brain's tissues which had been infected by VNN, to identify the changes and the effects of VNN infected on brain's tissue of *Lates calcarifer* and to determine the starting age of fish infected by VNN. From this study, several of new techniques had been learned and can be applied for the future of histopathology studies and researches. Histopathologically, vacuolations were formed in the brain's tissues of the samples which had been infected by VNN. The observed lesions were more or less severe in several of the samples. The results suggest that no specific age of fish had been infected by VNN. The clinical signs of fish also cannot be used to determine whether the brain's tissue had been infected or not. Further description about this study had been shown in the discussion chapter.

KANDUNGAN

Muka Surat

PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	x
SENARAI SIMBOL	xii
SENARAI UNIT	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 ULASAN LITERATUR	6
2.1 Kajian Histopatologi	6
2.1.1 Pengawetan	7
2.1.2 Pemprosesan	11
2.1.3 Pembenaman	14
2.1.4 Pemetongan	16
2.1.5 Pewarnaan Hematoksilin Dan Eosin (H&E)	18
2.2 <i>Lates calcarifer</i>	19
2.3 <i>Viral Nervous Necrosis (VNN)</i>	22
2.4 Betanodavirus	26
BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	28
3.1 Pengumpulan Sampel	28
3.2 Pengawetan	29
3.3 Pemprosesan	30
3.3.1 Pengeringan	30
3.3.2 Pembersihan	31
3.3.3 Penembusan Lilin	31
3.4 Pembenaman	32



3.5	Pemotongan	33
3.6	Pewarnaan	35
3.7	Pelekapan	38
3.8	Penggunaan Mikroskop	39
BAB 4 KEPUTUSAN		40
4.1	Sampel Yang Dijangkiti Nodavirus	40
4.2	Sampel Yang Tidak Dijangkiti Nodavirus	43
4.3	Kesan Tidak Mengambil Langkah Berjaga-jaga	47
BAB 5 PERBINCANGAN		50
5.1	Kajian Histopatologi Ke Atas Sampel Otak Ikan	50
5.2	Langkah Berjaga-jaga	52
BAB 6 KESIMPULAN		56
RUJUKAN		58
LAMPIRAN		65

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Muka Surat
2.1	Jadual pemprosesan bagi tisu otak	14
3.1	Masa yang digunakan bagi proses-proses pemprosesan	30

SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 <i>Histocynate</i> SHANDON CITADEL 1000	13
2.2 SHANDON <i>Histocentre</i> 2	15
2.3 Mikrotom SHANDON AS325	16
2.4 <i>Electrothermal Paraffin Section Mounting Bath</i>	17
2.5 <i>Lates calcarifer</i>	20
2.6 Peta penyebaran <i>Lates calcarifer</i>	20
2.7 Negara pengeluar utama <i>Lates calcarifer</i>	21
2.8 Vakuolasi (V) pada otak <i>Lates calcarifer</i> yang dijangkiti virus	23
2.9 Pembentukan vakuolasi.	26
3.1 Ikan spesies <i>Lates calcarifer</i> yang berusia kurang 9 bulan	29
3.2 Sampel-sampel ikan direndam di dalam botol Bjou yang mengandungi larutan Bouin	29
3.3 Kaset	31
3.4 <i>Histocynate</i> SHANDON CITADEL 1000	32
3.5 SHANDON <i>Histocentre</i> 2	33
3.6 Proses pemotongan menggunakan mikrotom SHANDON AS325	34
3.7 Takungan air suam (<i>mounting bath</i>)	34
3.8 Keratan riben yang dikeringkan dan sedia diwarnakan	35
3.9 Jar-jar yang mengandungi larutan-larutan yang digunakan dalam proses pewarnaan	36
3.10 Jar-jar larutan xilol di dalam kebuk wasap	37
3.11 Slaid kaca yang sedia diperhatikan di bawah mikroskop cahaya	38
3.12 Mikroskop cahaya	39
4.1 Sampel otak ikan yang dijangkiti pada usia yang berlainan, 20, 26, 37, dan 50 hari selepas penetasan	41
4.2 Sampel otak ikan yang dijangkiti pada usia yang berlainan, 65, 70, dan 102 hari selepas penetasan	42

4.3	Sampel otak ikan yang tidak dijangkiti pada usia yang berlainan, 15, 19, 24, dan 27 hari selepas penetasan	43
4.4	Sampel otak ikan yang tidak dijangkiti pada usia yang berlainan, 30, 31, 32, dan 35 hari selepas penetasan	44
4.5	Sampel otak ikan yang tidak dijangkiti pada usia yang berlainan, 45, 50, 5, dan 56 hari selepas penetasan	45
4.6	Sampel otak ikan yang tidak dijangkiti pada usia yang berlainan, 60, 74, 80, dan 92 hari selepas penetasan	46
4.7	Kesan koyak pada sampel	47
4.8	Kesan lipatan pada sampel	47
4.9	Kesan goresan pada sampel	47
4.10	Kesan pemotongan yang tidak sekata pada sampel	47
4.11	Kesan lebihan lumuran larutan campuran albumin dan gliserol yang tebal	48
4.12	Perbezaan yang ketara di antara sampel yang mempunyai kesan sel epitelial jari dan sampel yang tiada kesan sel epitelial jari	48
4.13	Buih-buih yang terhasil pada slaid sampel	48
4.14	Kesan pewarnaan H&E yang berbeza	49



SENARAI SIMBOL

:	nisbah
/	per
&	dan
=	sama dengan
α	alfa

SENARAI UNIT

°	darjah
°C	darjah Celsius
%	peratus
μ	mikro
x	kali ganda
g	gram
cm	sentimeter
μm	mikrometer
ml	mililiter
mm	milimeter
nm	nanometer
am	pagi
pm	tengah hari, petang atau malam



SENARAI SINGKATAN

BFNNV	Virus Nekrosis Saraf <i>Barfin flounder</i>
DNA	Asid Deoksiribonukleotida
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	Organisasi Makanan dan Agrikultur
FAT	Teknik Antibodi Fluoresans
H&E	Hematoksilin dan Eosin
IPMB	Institut Penyelidikan Marin Borneo
LcEV	Virus Ensefalitis <i>Lates calcarifer</i>
RGNNV	Virus Nekrosis Saraf <i>Redspotter grouper</i>
RNA	Asid Ribonukleik
SJNNV	Virus Nekrosis Saraf <i>Striped jack</i>
TPNNV	Virus Nekrosis Saraf <i>Tiger puffer</i>
UMS	Universiti Malaysia Sabah
VER	<i>Viral Encephalopathy and Retinopathy</i>
VNN	<i>Viral Nervous Necrosis</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

Bidang perikanan telah mula berkembang dengan pesatnya di Malaysia pada tahun 1980-an. Kebanyakan ikan marin yang diternak ialah ikan siakap, kerapu dan merah. Ikan-ikan ini diternak di dalam sangkar air payau, kolam dan laut. Terdapat juga ternakan ikan air tawar yang biasanya diternak di dalam kolam tanah, bekas lombong, sangkar, dan tangki simen. Selain itu, Malaysia juga terkenal sebagai pengeksporth ikan kepada negara-negara luar. Seiring dengan perkembangan yang pesat ini, penyakit ikan lebih mudah berlaku. Semua jenis ternakan ikan mudah terdedah kepada jangkitan bakteria dan virus yang menyebabkan wabak dan kematian yang tinggi. Penyakit ikan boleh menyebabkan kerugian yang besar kepada penternak dan juga industri akuakultur Malaysia. Keperluan pengawalan penyakit amat penting tetapi maklumat yang ada mengenai diagnosa seperti histologi dan rawatan penyakit terutamanya ikan jenis tropika adalah tidak mencukupi terutamanya di Malaysia (Najjah *et al.*, 2007).

Menurut Najjah *et al.*, (2007) penyakit boleh didefinisikan sebagai satu proses di mana badan mengalami perubahan samada dari segi fizikal dan tingkah laku yang

disebabkan oleh faktor-faktor yang mungkin diketahui ataupun tidak. Penyakit boleh terjadi akibat daripada gabungan beberapa faktor. Contohnya, penyakit pada ikan yang pada mulanya disebabkan oleh satu faktor utama, iaitu faktor primer tetapi faktor ini tidak jelas kerana diselindungi oleh satu faktor yang lain. Dalam kes sedemikian, faktor kedua boleh menjadi faktor sekunder di mana ianya bersifat oportunistik, iaitu ia mengambil kesempatan ke atas kesihatan ikan akibat daripada kesan faktor primer dan seterusnya menyebabkan penyakit. Maka amatlah penting untuk mengetahui faktor sebenar yang menyebabkan penyakit pada ikan sebelum sesuatu rawatan diberikan.

Sejarah penyakit, pemerhatian ciri-ciri klinikal atau simptom-simptom pada ikan yang dijangkiti dapat memberi gambaran tentang patogen-patogen yang terlibat dalam serangan sesuatu penyakit. Keadaan patologi yang biasa dilaporkan di dalam kes ikan yang sakit akibat jangkitan ialah luka, ulser, hemoraj septisemik akut dengan kematian yang tinggi serta granuloma dengan kematian yang rendah dan berterusan. Masalah utama penyakit ternakan ikan yang disebabkan oleh jangkitan yang merbahaya ialah ciri-ciri klinikal dan patologi yang hampir sama pada ikan yang sakit. Oleh yang demikian, amatlah sukar untuk mendiagnosa dan mengecam bakteria dan virus yang terlibat dengan cepat dalam sesuatu jangkitan penyakit berdasarkan ciri-ciri klinikal dan patologi (Najjah *et al.*, 2007).

Dalam kebanyakan kes kematian ikan atau penyakit ikan, jangkitan biasanya tersebar ke seluruh populasi ikan yang berkongsi akuarium, tangki, sangkar atau kolam yang sama. Dalam keadaan ini, tahap keseriusan penyakit mungkin berbeza pada setiap individu ikan di dalam persekitaran yang sama. Maka, diagnosa jangkitan

mestilah bermula daripada pemeriksaan ikan yang terpilih untuk dikorbankan daripada populasi yang dijangkiti. Rawatan yang sesuai dan langkah-langkah pencegahan penyakit dapat dilakukan terhadap populasi ikan yang dijangkiti.

Terdapat dua kategori penyakit haiwan akuatik, iaitu penyakit berjangkit dan merbahaya serta penyakit yang tidak berjangkit dan kurang merbahaya. Kebanyakan penyakit merbahaya adalah disebabkan oleh jangkitan bakteria, parasit, virus, dan fungus. Penyakit yang tidak berjangkit dan kurang merbahaya pula adalah disebabkan oleh pemakanan, genetik dan tekanan. Tindak balas akan berlaku pada tisu haiwan apabila berlaku jangkitan atau kecederaan. Setiap patogen mempunyai tindak balas yang berbeza di dalam perumah yang berlainan. Kajian perubahan pada tisu ini dikenali sebagai histologi. Kajian ini penting untuk digunakan sebagai satu kaedah untuk mengesan dan mendiagnosa sesuatu penyakit berdasarkan perubahan yang berlaku di peringkat sel. Histologi dapat mendedahkan mekanisme patogen berlainan di dalam tisu yang dikaji sama ada ia adalah merbahaya atau tidak merbahaya. Proses histologi memerlukan beberapa langkah seperti penyampelan, pemprosesan, pemotongan, pewarnaan, dan akhirnya pemeriksaan diagnostik. Slaid yang mengandungi keratan tisu bahan kajian akan diwarnakan supaya sel-sel di dalam tisu atau organ dapat dilihat dengan jelas. Histopatologi pula merujuk kepada sel-sel yang abnormal atau lesi pada tisu yang dikaji seperti nekrosis dan granuloma (Najjah *et al.*, 2007).

Kebaikan histologi adalah teknik keratan tisu ini memudahkan penghantaran sampel tisu yang dikaji dari suatu tempat ke tempat yang lain. Contohnya, penghantaran sampel tisu kajian dari satu makmal ke makmal yang lain. Teknik ini

lebih mudah di mana keratan tisu adalah ringan dan dapat dihantar dengan cepat dan mudah, contohnya, penghantaran melalui pos. Secara tidak langsung ianya dapat menjimatkan kos penghantaran berbanding dengan menghantar sampel hidup. Selain itu, keratan tisu ini boleh disimpan untuk kegunaan pada masa akan datang sebagai rekod kekal.

Salah satu virus yang menjangkiti ikan adalah nodavirus yang menyebabkan berlakunya *viral nervous necrosis* (VNN). Nodavirus adalah patogen yang menjangkiti kebanyakan larva dan anak-anak ikan marin di serata dunia. Di antara ciri-ciri nodavirus adalah tidak bersampul, berbentuk ikosahedral serta merupakan virus RNA berdiameter di antara 25 hingga 34 nm. Terdapat beberapa ikan yang sering dijangkiti nodavirus seperti *Lates calcarifer*, *Dicentrarchus labrax*, *Epinephelus akaara*, *Pseudocaranx dentex*, *Oplegnathus jasciatus*, *Hippoglossus hippoglossus*, dan *Scophthalmus maximus*. Jangkitan virus ini menyebabkan ikan-ikan yang dijangkiti mempunyai ciri-ciri seperti cara berenang yang tidak normal atau berpusing-pusing, aneroksia, berwarna pucat atau gelap, lesu, dan perut menggelembung (Munday & Nakai, 1997).

Objektif kajian ini adalah bertujuan untuk mengenalpasti masalah penyakit yang dihadapi oleh sampel ikan, *Lates calcarifer*, iaitu dengan:

- a. Mempelajari teknik histopatologi bagi mengenalpasti tisu yang dijangkiti oleh *virus nervous necrosis* (VNN).

- b. Mengenalpasti perubahan serta kesan yang berlaku pada tisu otak ikan siakap yang dijangkiti VNN.

- c. Menentukan peringkat umur ikan yang dijangkiti VNN.

BAB 2

ULASAN LITERATUR

2.1 Kajian Histopatologi

Histologi adalah istilah yang berasal daripada perkataan Greek, *histos* bermaksud tisu dan *logia* bermaksud kajian atau pengetahuan. Oleh itu histologi adalah kajian, pengetahuan atau sains tentang tisu organisma hidup seperti tumbuh-tumbuhan dan haiwan. Histologi bukan hanya melibatkan kajian tentang tisu tetapi juga tentang sel individu dan sistem-sistem organ. Oleh kerana histologi merujuk kepada kajian tentang sel, tisu dan organ, maka kajian ini merangkumi aspek-aspek fungsi dan struktur. Perubahan struktur dan fungsi organ, tisu dan sel yang diakibatkan oleh penyakit dipanggil sebagai patologi atau kajian hal-hal ketaknormalan.

Salah satu perkara penting yang berkait dengan metodologi dalam kajian histologi adalah penyediaan tisu atau organ mengikut cara yang sesuai untuk pemerhatian melalui mikroskop. Pada umumnya, perkembangan teknik histologi adalah jauh tertinggal ke belakang. Walaupun mikroskop telah lama diciptakan,

namun ia tidak digunakan langsung untuk kajian histologi sehinggalah pada akhir tahun 1940-an dan awal tahun 1950-an apabila kaedah-kaedah keratan nipis dimajukan. Pada penghujung abad ke-19, mikrotom telah dapat dihasilkan secara komersial, dan seiring dengan ini muncul pula perkembangan teknik-teknik pengawetan, pembenaman, dan pewarnaan. Teknik pewarnaan masih lagi dalam proses perkembangan. Keputusan akan diperoleh melalui penggunaan pelbagai bentuk mikroskop dan teknik histologi.

2.1.1 Pengawetan

Pengawetan dilakukan untuk memelihara kandungan sampel supaya ciri-ciri yang ada pada sampel tidak berubah selepas mati. Hanya perubahan yang paling minimum sahaja berlaku daripada keadaan hidupnya. Proses pengawetan ini dilakukan untuk membekukan sampel supaya kandungan sampel tidak meresap keluar. Proses ini juga menguatkan sampel daripada kesan-kesan yang boleh merosakkannya semasa penyediaan sampel yang seterusnya, iaitu semasa proses pengeringan, pembersihan, dan pembenaman. Pengawetan adalah proses penyediaan sampel yang penting untuk memudahkan proses pewarnaan yang menggunakan pewarna dan reagen yang berlainan. Proses pengawetan ini juga dijalankan bagi mengelakkan perubahan autolisis, pertumbuhan bakteria dan supaya sampel tidak menjadi busuk (Drury *et al.*, 1967).

Autolisis adalah kerosakan sel, tisu atau organ yang bukan disebabkan faktor-faktor luaran. Ia berlaku selepas kematian sel yang disebabkan oleh tindakan enzim intrasel, iaitu enzim yang mengubah keadaan normal sel tersebut. Autolisis memberi

kesan yang cepat dan serius ke atas sel-sel khusus dalam organ-organ kompleks seperti otak dan buah pinggang. Sel-sel khusus tersebut adalah seperti gentian-gentian elastik dan kolagen. Autolisis menyebabkan penguraian protein dan akhirnya sel mencair. Nukleus sel yang mengalami autolisis akan terkondensasi dan pecah menyebabkan nukleus tiada atau disebut karyolisis. Sitoplasma pula akan membengkak dan menjadi granul. Kesan autolisis menunjukkan sel terpisah daripada membrannya. Tambahan pula, tanpa proses pengawetan yang cepat dan sesuai, bahan diagnosis seperti glikogen akan menyusut atau meresap keluar daripada sampel tersebut. Penguraian bakteria pula adalah sama seperti autolisis, iaitu menyebabkan perubahan dalam sampel. Ia disebabkan oleh penggandaan bakteria dalam sampel berpenyakit semasa kematian atau disebabkan oleh bakteria yang sedia ada dalam sampel (Drury *et al.*, 1967).

Salah satu kesan penting dalam proses pengawetan adalah pembekuan protein dan kandungan tisu yang mencegah peresapan keluar kandungan tersebut semasa pemrosesan sampel. Selain itu, agen pengawet juga boleh meninggikan afiniti protoplasma terhadap pewarna-pewarna tertentu. Hanya beberapa agen pengawet mempunyai kesan positif ke atas beberapa pewarna, manakala selebihnya merencat tindak balas pewarna. Terdapat juga agen pengawet yang bertindak balas secara langsung di antara komponen tisu tertentu dengan pewarna. Oleh itu, agen pengawet tersebut dikenali sebagai *mordant*.

Agan pengawet boleh dibahagikan kepada dua, iaitu pertama adalah agen pengawet mikro-anatomi. Agan pengawet ini mengawet lapisan-lapisan tisu dan kumpulan sel yang besar dengan tepat. Kebanyakan teknik histologi yang normal dan

RUJUKAN

- Ackermann, H. W., Berthiaume, L. & Tremblay, M. 2000. *Viral Pathogenesis in Diagrams*. CRC Press, Boca Raton, ms. 5-6.
- Ali, A., Ramli, A. & Ahmad, F. 1985. Pengeluaran benih ikan siakap (*Lates calcarifer*). Risalah Perikanan Bil. 21. Jabatan Perikanan, Kementarian Pertanian Malaysia.
- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K. & Furusawa, I. 1992. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol* **27**, ms. 191-195.
- Ball, L. A. 1999. *Nodaviruses (Nodaviridae)*. Academia Press, Birmingham.
- Bandin, I., Oliveira, J. G., Borrego, J. J., Dopazo, C. P. & Barja, J. L. 2006. Susceptibility of the Fish Cell Line SAF-1 to Betanodavirus. *Journal of Fish Diseases* **29**, ms. 633-636.
- Banu, G. R. & Nakai, T. 2004. Inoculation of BALB/c Mice with Fish-pathogenic Nodaviruses. *J. Comp. Path* **130**, ms. 202-204.
- Barker, D. E., MacKinnon, A. M., Boston, L., Burt, M. D. B., Cone, D. K., Speare, D. J., Griffiths, S. Cook, M., Ritchie, R. & Olivier, G. 2002. First Report of Piscine Nodavirus Infecting Wild Winter Flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* **49**, ms. 99-105.
- Bovo, G., Borghesan, F., Multinelli, F., Montesi, F. & Comuzzi, M. 1996. Viral Encephalo-retinopathy of Reared Seabass: First Detection in Italy). *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* **8**, ms. 52-64.

- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Multinelli, F., Montesi, F. & Mas, S. D. 1999. Viral Encephalopathy and Retinopathy of Farmed Marine Fish Species in Italy. *Virus Research* **63**, ms. 143-146.
- Breuil, G., Bonami, J. R., Pepin, J. F. & Pichot, Y. 1991. Viral Infection (Picorna-like Virus) Associated with Mass Mortalities in Hatchery-Reared Sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) Larvae and Juveniles. *Aquaculture* **97**, ms. 109-116.
- Chinabut, S., Limsuwan, C. & Kitsawat, P. 1991. *Histology of the Walking Catfish, Clarias Batrachus*. International Development Research Centre, Canada, ms. 1.
- Chua, F. H. C., Ng, M. L., Ng, K. L., Loo, J. J. & Wee, J. Y. 1994. Investigation of Outbreaks of a Novel Disease, 'Sleepy Grouper Disease,' Affecting the Brown-spotted Grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *Journal of Fish Diseases* **17**, ms. 417-427.
- Comps, M., Pepin, J. F. & Bonami, J. R. 1994. Purification and Characterisation of Two Fish Encephalitis Viruses (FEV) Infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **123**, ms. 1-10.
- Curtis, P. A., Drawbridge, M., Iwamoto, T., Nakai, T., Hedrick, R. P. & Gendron, A. P. 2001. Nodavirus Infection of Juvenile White Seabass, *Atractoscion nobilis*, Cultured in Southern California: First Record of Viral Nervous Necrosis (VNN) in North America. *Journal of Fish Diseases* **24**, ms. 263-271.
- Drury, R. A. B., Wallington, E. A. & Cameron, S. R. 1967. *Carleton's Histological Technique*. Ed. ke-4. Oxford University Press, New York.
- Fisheries and Aquaculture Department, 2000-2007. *Lates calcarifer*. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AC230E/AC230E00.HTM>.

- Fisheries and Aquaculture Department, 2000-2007. *Lates calcarifer*.
<http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml#tcNF003F>.
- Glazebrook, J. S., Heasman, M. P. & de Beer S. W. 1990. Picorna-like Viral Particles Associated with Mass Mortalities in Larval Barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases* 13, ms. 245-249.
- Granoff, A. & Webster, R. G. (pnyt.). 1999. Volume 2: *Encyclopedia of Virology*. Ed. ke-2. Academic Press, San Diego, ms. 1026-1031.
- Gomez, D. K., Lim, D. J., Baeck, G. W., Youn, H. J., Shin, N. S., Youn, H. Y., Hwang, C. Y., Park, J. H. & Park, S. C. 2006. Detection of Betanodaviruses in Apparently Healthy Aquarium Fishes and Invertebrates. *Journal of Veterinary Science* 7 (4), ms. 369-374.
- Grotmol, S., Bergh, O. & Totland, G. K. 1999. Transmission of Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER) to Yolk-sac Larvae of the Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*: Occurrence of Nodavirus in Various Organs and Possible Route of Infection. *Dis. Aquat. Org.* 36, ms. 95-106.
- Grotmol, S., Totland, G. K., Thorud, K. & Hjeltnes, B. K. 1997. Vacuolating Encephalopathy and Retinopathy with a Nodavirus-like Agent: A Probable Cause of Mass Mortality of Cultured Larval and Juvenile Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis. Aquat. Organ* 29, ms. 85-97.
- Grotmol, S., Totland, G. K., Kvellestad, A., Fjell, K. & Olsen, A. B. 1995. Mass Mortality of Larval and Juvenile Hatchery-Reared Halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) Associated with the Presence of Virus-like Particles in Vacuolated Lesions in the Central Nervous System and Retina. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 15 (5), ms. 176-180.

- Grove, S., Johansen, R., Dannevig, B.H., Reltan, L. J. & Ranheim, T. 2003. Experimental Infection of Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus* with Nodavirus: Tissue Distribution and Immune Response. *Diseases of Aquatic Organisms* **53**, ms. 211-221.
- Hedge, A., The, H. C., Lam, T. J. & Sin, Y. M. 2003. Nodavirus Infection in Freshwater Ornamental Fish, Guppy, *Poicelia reticulate* – Comparative Characterization and Pathogenicity Studies. *Archives of Virology* **148**, ms. 575-586.
- Ikenaga, T., Tatecho, Y., Nakai, T. & Uematsu, K. 2002. Betanodavirus as a Novel Transneuronal Tracer for Fish. *Neuroscience Letters* **331**, ms. 55-59.
- Johansen, R. Ranheim, T., Hansen, M. K., Taksdal, T. & Totland, G. K. 2002. Pathological Changes in Juvenile Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus* Persistently Infected With Nodavirus. *Disease of Aquatic Organisms* **50**, ms. 161-169.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J. & Kelley, R. O. 1995. *Basic Histology*. Ed. ke-8. Prentice-Hall International, Inc., United Kingdom.
- Kaesbergh, P. 1987. Dlm: Rowlands, D. J., Mayo, M. A. & Mahy, B. W. J. (pnyt.). *Molecular Biology of Positive Strand RNA Viruses*. Academic Press, London, ms. 207-218.
- Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J. & Ollevier, F. 1996. Viral Nervous Necrosis (VNN) Associated with Mass Mortalities in Cage-Reared Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Diseases* **20**, ms. 145-151.
- Lin, C. S., Lu, M. W., Tang, L., Liu, W., Chao, C. B., Lin, C. J., Krishna, N. K., Johnson, J. E. & Schneemann, A. 2001. Characterization of Virus-like Particles Assembled in a Recombinant Baculovirus System Expressing the Capsid Protein of a Fish Nodavirus. *Virology* **290**, ms. 50-58.

- Luna, L. G. (pnyt.). 1960. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Ed. ke-3. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Maeno, Y., de la Peña, L. D. & Cruz-Lacierda, E. R. 2004. Mass Mortalities Associated with Viral Nervous Necrosis in Hatchery-Reared Sea Bass *Lates calcarifer* in the Philippines. *JARQ* **38**, ms. 69-73.
- Maeno, Y., de la Peña, L. D. & Cruz-Lacierda, E. R. 2007. Susceptibility of Fish Species Cultured in Mangrove Brackish Area to Piscina Nodavirus. *JARQ* **41**, ms. 95-99.
- Mori, K. I., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. & Furusawa, I. 1992. Properties of a New Virus Belonging to Nodaviridae Found in Larval Striped Jack (*Pseudocaranx dentex*) with Nervous Necrosis. *Virology* **187**, ms. 368-371.
- Munday, B. L. & Nakai, T. 1997. Special Topic Review: Nodaviruses as Pathogens in Larval and Juvenile Marine Finfish. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **13** ms. 375-381.
- Munday, B. L., Kwang, J. & Moody, N. 2002. Betanodavirus Infections of Teleost Fish: A Review. *Journal of Fish Diseases* **25**, ms. 127-142.
- Munday, B. L., Nakai, T. & Nguyen, H. D. 1994. Antigenic Relationship of the Picarno-like Virus of Larval Barramundi, *Lates calcarifer* Bloch to the Nodavirus of Larval Striped Jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *Aust. Vet. J.* **71** (11), ms. 384-385.
- Muroga, K. 1995. Viral and Bacterial Diseases in Larval and Juvenile Marine Fish and Shellfish A Review. *Fish Pathol.* **30**, ms. 71-85.

- Najjah, M., Wendy, W., Ruhil, H. H., Lee, S. W., Lee, K. L. & Noorasikin, H. 2007. *Bakteria & Ikan*. Universiti Malaysia Terengganu, Kuala Terengganu.
- Nakai, T., Mori, K., Nishizawa, T. & Muroga, K. 1995. Viral Nervous Necrosis of Larval and Juvenile Marine Fish. Proceedings of the International Symposium on Biotechnology Applications in Aquaculture Asian Fisheries Society Special Publication No. 10. National Taiwan University, Taipei, ms. 147-212.
- Nakai, T., Nguyen, H. D., Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M. & Ootsuki, K. 1994. Occurrence of Viral Nervous Necrosis in Kelp Grouper and Tigre Buffer. *Fish Pathol.* **29**, ms. 211-212.
- Nguyen, H. D., Mushiake, K., Nakai, T. & Muroga, K. 1997. Tissue Distribution of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) in Adult Striped Jack. *Diseases of Aquatic Organisms* **28**, ms. 87-91.
- Nguyen, H. D., Nakai, T. & Muroga, K. 1996. Progression of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) Infection in Naturally and Experimentally Infected Striped Jack *Pseudocaranx dentex* Larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* **24**, ms. 99-105.
- Oh, M. J., Jung, S. J., Kim, S. R., Rajendran, K. V., Kim, Y. J., Choi, T. J., Kim, H. R. & Kim, J. D. 2002. A Fish Nodavirus Associated with Mass Mortality in Hatchery-Reared Red Drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* **211**, ms. 1-7.
- Peducasse, S., Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., Ven, L. & Laurencin, F. B. 1999. Comparative Study of Viral Encephalopathy and Retinopathy in Juvenile Sea Bass *Dicentrarchus labrax* Infected in Different Ways. *Diseases of Aquatic Organisms* **36**, ms. 11-20.
- Rovozzo, G. C. & Burke, C. N. 1973. *A Manual of Basic Virological Techniques*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, ms. 153-157.

- Sindermann, C. J. 1990. Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Volume 2: *Diseases of Marine Shellfish*. Ed. Ke-2. Academic Press, New York, ms. 93-144.
- Skliris, G. P., Krondiris, J. V., Sideris, D. C., Shinn, A. P., Starkey, W. G. & Richards, R. H. 2001. Phylogenetic and Antigenic Characterization of New Fish Nodavirus Isolates from Europe and Asia. *Virus Research* 75, ms. 59-67.
- Skliris, G. P. & Richards, R. H. 1999. Induction of Nodavirus Disease in Seabass, *Dicentrarchus labrax*, Using Different Infection Models. *Virus Research* 63, ms. 85-93.
- Starkey, W. G., Ireland, J. H., Muis, K.F., Jenkins, M. E., Roy, W. J., Richards, R. H. & Ferguson, H. W. 2001. Nodavirus Infection in Atlantic Cod and Dover Sole in the UK. *Vet Record* 149, ms. 179-181.
- Thiery, R., Raymond, J. C. & Castric, J. 1999. Natural Outbreak of Viral Encephalopathy and Retinopathy in Juvenile Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*: Study by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Virus Res.* 63, ms. 11-17.
- Yoshikoshi, K. & Inoue, K. 1990. Viral Nervous Necrosis in Hatchery-Reared Larvae and Juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 13, ms 67-77.
- Wheather, P., Burkitt, G., Stevens, A. & Lowe, J. 1985. *Basic Histopathology: A Text and Colour Atlas*. Churchill Livingstone, United Kingdom.