

ALI MUHAMMAD MASTOI

DOCTOR OF PHILOSOPHY

2013

**ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SEAWEED
AND OYSTER EXTRACTS AND THEIR EFFECTS
ON PATHOGENIC BACTERIA TOLERANCE,
IMMUNE STATUS, GROWTH AND PROXIMATE
COMPOSITION IN FEEDING TRIALS OF THE RED
TILAPIA, *Oreochromis* sp. JUVENILES**

ALI MUHAMMAD MASTOI

**DOCTOR OF PHILOSOPHY
UNIVERSITI MALAYSIA TERENGGANU**

2013

**ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SEAWEED
AND OYSTER EXTRACTS AND THEIR EFFECTS
ON PATHOGENIC BACTERIA TOLERANCE,
IMMUNE STATUS, GROWTH AND PROXIMATE
COMPOSITION IN FEEDING TRIALS OF THE RED
TILAPIA, *Oreochromis* sp. JUVENILES**

ALI MUHAMMAD MASTOI

**Thesis submitted in Fulfillment of the
requirement of the Degree of
Doctor of Philosophy in the
Institute of Tropical Aquaculture,
Universiti Malaysia Terengganu**

February, 2013

Dedicated to

My beloved late father and mother

&

My wife & sons

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu
in fulfillment of the requirements for the
Degree of Doctor of Philosophy

**ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SEAWEED AND OYSTER EXTRACTS
AND THEIR EFFECTS ON PATHOGENIC BACTERIA TOLERANCE, IMMUNE
STATUS, GROWTH AND PROXIMATE COMPOSITION IN FEEDING TRIALS
OF THE RED TILAPIA, *Oreochromis* sp. JUVENILES**

ALI MUHAMMAD MASTOI

February' 2013

Main Supervisor : Prof. Anuar bin Hassan, Ph.D.

Co-Supervisor : Prof. Emeritus Faizah Shaharom, Ph.D.

: Anil Chatterji, Ph.D.

Institute : Institute of Tropical Aquaculture

Consistent expansion of aquaculture practices has led in generating increased interest to understand various fish diseases and their control measures. The occurrence of diseases in aquaculture fish farm is primarily due to several factors related to rearing methods and deteriorating environmental conditions. Infectious diseases are also a major problem in cage grown fishes causing heavy loss to the fish farmers. The most effective methods of controlling diseases in aquaculture practices are through strengthening the defense mechanisms of the fish by

prophylactic administration of effective immune-stimulants. The demand for affordable and effective immune-stimulants has been increasing to enhance the immune response in commercially important fishes basically due to disease problems. At present the most effective preventive measure for controlling fish diseases is vaccination which is relatively an expensive and pathogen specific practice. These vaccines are not efficacious against many important bacterial and viral diseases. Therefore, in the present study an attempt was made to study the effects of feeds incorporated with hydrolysates and ethanolic extracts from a marine oyster (*Saccostrea cucullata* Born, 1778) and seaweed (*Sargassum baccularia*; Mertens C. Agardh, 1824) on different immunological parameters of fingerlings of red tilapia. The outcome of this study was presented in different chapters of this thesis.

The extracts of oyster and seaweed were at first screened for the presence of antibacterial activities against *Aeromonas hydrophila*. The ethanolic extract of oyster showed highest activity (36.36% inhibition) against *A. hydrophila* as compared to ethanolic extract of seaweed (18.18% inhibition). The lysozyme activity in the ethanolic extracts of oyster and seaweed showed more than 50 and 62% higher activities respectively as compared to the hydrolysate extracts of both the species. The lysozyme activity was relatively 50% higher in the ethanolic extract of oyster than ethanolic extract of the seaweed. Similarly, the specific activities in the ethanolic extracts of oyster and seaweed were also higher by 10 and 30% respectively as compared to the hydrolysate of both the species.

An attempt was also made to compare the oxygen consumption by the uninfected (control) and infected fishes to optimize the culture conditions. In uninfected (control) group, the oxygen consumption was normal without much fluctuation. Infected fishes showed maximum stress condition and as such they were found to consume more oxygen as compared to uninfected (control) fishes. Different extracts prepared from oyster and seaweed were mixed at various concentrations in commercial diet and fed to the fingerlings of red tilapia for 15 days. This group of fishes was named as immune-primed fishes. All groups of fishes fed with experimental and normal diets except uninfected (control) group were challenged by a gram-negative bacterium (*Aeromonas hydrophila*) to evaluate the effects of pathogen on survival, biochemical and immunological changes in the blood profile of the fishes.

The experimental feed consisting of ethanolic extract of oyster showed better survival as compared to other experimental feeds. Maximum total leucocytes ($22 \pm 43 \times 10^3$ cell/mm³) and erythrocytes ($32 \pm 33 \times 10^6$ cells/mm³) were recorded in fishes fed with ethanolic extract of oyster ($P < 0.05$) which were similar to fishes of the control group. Significant ($P < 0.05$) changes differential cell counts were also observed in lymphocytes (78±78%), neutrophils(6±06%), monocytes(5±05%) and basophils(10±10%) cells in feed incorporated with ethanolic extract of oyster.

Detailed histological studies of skin, gills, liver and heart tissues of uninfected (control), infected and immune-primed fishes showed marked differences in their

histological characteristics. The skin of uninfected (control) and immune-primed fishes showed presence of mucus cells and mucus glands which were totally degenerated in infected fishes. Similarly, in the gill tissues of uninfected (control) and immune-primed fishes, primary and secondary lamellae were clearly visible which were considerably degenerated in infected fishes. The uninfected (control) and immune-primed fishes showed typical parenchymatous appearance with central glycogen vacuole and round nucleus cells including von Kupffer cells in the liver. But these structures were degenerated in the liver of the infected fishes. The heart tissues consisting of two prominent layers – the visceral epicardium and outer pericardial sac were distinct in uninfected (control) and immune-primed fishes but these layers were degenerated in infected fishes.

The supplementation of ethanolic extract in commercial feed helped in enhancing significantly the growth of the red tilapia. The body weight in fishes in all experimental groups/ fish almost similar at day 60. However slight increase (1.8%) in weight of fishes fed with seaweed hydrolysate (7.5) and 4.15% with hydrolysate of oyster occurred on day 90. The average weight gain on the 90th day was the maximum in fishes fed with ET-seaweed (17.14 g) as compared to ET-oyster (14.02 g) and control (10.2 g). The percent increments were 40.49% and 27.24% for ET-oyster and ET-seaweed extracts, respectively. The feed incorporated with ethanolic extract showed highest specific growth rate (4.55%) as compared to control and fishes fed with feed incorporated with hydrolysate extracts. The minimum FCR was for the seaweed hydrolysate 7.5 (0.66 ± 0.3) and

ethanolic oyster extract (0.67 ± 0.1) as compared to control group (1.60 ± 0.3). The feed supplemented with 2.5% ethanolic extract of oyster showed better efficiency in terms of FCR.

The proximate composition of the body tissue in uninfected (control), infected and fishes fed with 2.5, 5.0 and 7.5% concentrations of seaweed and oyster hydrolysates showed the highest variation in lipid and carbohydrate contents. The ethanolic extracts of seaweed and oyster showed higher crude protein (43.33 & 46.39%) and ash (5.44 & 6.29%) contents as compared to infected fishes (Protein 38.52 % and ash 4.13%). The results of the present study clearly demonstrated that the incorporation of ethanolic oyster extract was not only effective in inhibiting the bacterial infection but also helped fishes to maintain their proximate composition adequately.

Abstract ini dikemukakan kepada Senate Universiti Malaysia Terengganu untuk memenuhi keperluan untuk ijazah Doktor Falsafah.

SIFAT ANTIBAKTERIA RUMPAI LAUT DAN EKSTRAK TIRAM SERTA KESANNYA TERHADAP BAKTERIA PATOGENIK BAGI ASPEK TOLERANSI, STATUS IMUN, PERTUMBUHAN DAN PROKSIMAT KOMPOSISI DALAM MAKAN UJIAN TILAPIA MERAH UNTUK ANAK IKAN *Oreochromis sp.*

ALI MUHAMMAD MASTOI

February' 2013

Penyelia Utama : Prof. Anuar bin Hassan, Ph.D.

Penyelia Bersama : Prof. Emeritus Faizah Shaharom, Ph.D.

: Anil Chatterji, Ph.D.

Institut : Institut Akuakultur Tropika

Perkembangan dalam amalan akuakultur yang konsisten telah membawa kepada penjanaian minat untuk memahami pelbagai penyakit ikan dan langkah-langkah kawalan ikan tersebut. Kejadian penyakit dalam akuakultur terutamanya ternakan ikan disebabkan oleh beberapa faktor yang berkaitan dengan kaedah penternakan dan kemerosotan keadaan alam sekitar. Penyakit berjangkit merupakan masalah utama dalam ternakan ikan sangkar yang sedang berkembang dan menyebabkan kerugian yang besar kepada penternak ikan. Kaedah yang paling berkesan dalam pengawalan penyakit akuakultur adalah dengan mengukuhkan mekanisma pengawalan ikan menggunakan pengurusan

sistem profilaksis imun yang berkesan. Permintaan bagi sistem pertahanan imun yang berkesan dan mampu dimiliki telah meningkat disebabkan oleh peningkatan dalam rawatan penyakit ikan komersial nilai tinggi. Pada masa kini, langkah pencegahan yang paling berkesan untuk mengawal penyakit ikan ialah dengan mendapatkan vaksin yang secara relatifnya adalah mahal dan spesifik kepada beberapa jenis patogen. Vaksin ini kebanyakannya tidak berkesan terhadap bakteria dan virus penyakit utama. Oleh itu, kajian ini telah dijalankan untuk membangunkan satu jenis makanan campuran daripada ekstrak ethanol dan hidrolisat yang diperolehi daripada tiram marin (*Saccostrea cucullata* Born, 1778) dan rumpai laut (*Sargassum baccularia*; Mertens). Hasil kajian ini dibentangkan dalam bab-bab yang berlainan.

Pada awalnya, kajian ke atas ekstrak tiram dan rumpai laut dilakukan untuk menghalang kehadiran antibakteria terhadap *Aeromonas hydrophila*. Ekstrak ethanol tiram menunjukkan aktiviti tertinggi (36.36% perencatan) terhadap *A. hydrophila* berbanding ethanolic ekstrak rumpai laut (18.18% perencatan). Aktiviti lysozyme ekstrak ethanol pada *S. cucullata* dan *S. baccularis* menunjukkan lebih daripada 50 dan 62% lebih tinggi aktiviti masing-masing berbanding dengan ekstrak hidrolisat dengan kedua-dua spesies. Aktiviti lysozyme secara relatifnya 50% lebih tinggi dalam ekstrak ethanol daripada tiram berbanding dengan ekstrak ethanolic rumpai laut. Begitu juga, aktiviti tertentu dalam ekstrak ethanolic pada *S. cucullata* dan *S. baccularis* dimana ianya lebih tinggi sebanyak 10 dan 30% masing-masing berbanding dengan hidrolisat kedua-dua spesies. Ujikaji juga

telah dibuat untuk menilai penggunaan oksigen dalam ikan yang sihat dan dijangkiti untuk mengoptimumkan keadaan pengkulturan. Dalam keadaan yang terkawal, penggunaan oksigen adalah seragam dan ini menunjukkan keadaan yang paling baik. Ikan yang dijangkiti didapati mengambil lebih oksigen berbanding dengan ikan yang sihat. Ekstrak yang berlainan disediakan daripada tiram dan rumpai laut yang dicampurkan dengan pelbagai kepekatan dalam diet komersial dan diberikan kepada ikan tilapia merah selama 15 hari. Kumpulan ikan ini telah dinamakan sebagai ikan imun-bersedia. Semua kumpulan ikan yang diberi ekstrak bercampur makanan termasuk kumpulan kawalan telah dicabar oleh bakteria gram-negatif (*Aeromonas hydrophila*) untuk menilai kesan patogen kepada kelangsungan hidup, perubahan biokimia dan imunologi dalam profil darah ikan. Makanan eksperimen daripada ekstrak ethanolic tiram menunjukkan kelangsungan hidup yang lebih baik berbanding makanan eksperimen yang lain. Jumlah maksimum leukosit ($22 \pm 43 \times 10^3$ cell/mm³) dan eritrosit ($32 \pm 33 \times 10^6$ cells/mm³) telah direkodkan dalam ikan yang diberi makan ekstrak ethanolic tiram ($P < 0.05$) yang sama dengan ikan kumpulan kawalan. Perubahan yang signifikan ($P < 0.05$) telah juga diperhatikan dalam limfosit ($78 \pm 78\%$), neutrophil ($6 \pm 06\%$), monosit ($5 \pm 05\%$) dan basophil ($10 \pm 10\%$) (sel-sel dalam pemakanan yang diperbadankan dengan ekstrak tiram).

Kajian histologi yang terperinci terhadap tisu kulit, insang, hati dan jantung kawalan, dijangkiti dan ikan-imunisasi menunjukkan perbezaan dalam ciri-ciri histologi mereka. Kulit ikan kawalan dan ikan imunisasi menunjukkan kehadiran

sel-sel mukus dan kelenjar lendir yang sama sekali tidak hadir dalam ikan yang dijangkiti. Begitu juga, dalam perbandingan tisu insang kawalan dan ikan imun, lamela primer dan sekunder jelas kelihatan merosot dalam ikan yang dijangkiti. Ikan kawalan dan ikan-imunisasi menunjukkan penampilan paranchymatous tipikal dengan vakuol glikogen berpusat dan sel-sel nukleus bulat termasuk von Kuppfer iaitu sel-sel di dalam hati. Tetapi struktur-struktur ini tidak kelihatan di dalam hati ikan yang dijangkiti. Tisu-tisu jantung yang terdiri daripada dua lapisan penting iaitu epicardium visceral dan pundi perikardium luar kelihatan berbeza dalam kawalan dan ikan-imunisasi sebab lapisan ini tidak dijumpai dalam ikan yang dijangkiti. Pertambahan ekstrak ethanol dalam makanan komersial jelas membantu meningkatkan pertumbuhan tilapia merah. Berat badan ikan dalam semua kumpulan eksperimen tidak banyak berbeza sehingga sampai hari ke 60. Terdapat sedikit peningkatan sebanyak 1.8% dalam berat ikan yang diberi makan dengan hidrolisat rumpai laut (7.5) dan 4.15% dengan hidrolisat tiram pada hari ke-90. Kadar kenaikan purata berat pada hari ke-90 adalah maksimum dalam ikan yang diberi makan rumpai laut ET (17.14 g) berbanding dengan ET-tiram (14.02 g) dan kawalan (10.2 g) yang menunjukkan 40.49 dan 27.24% masing-masing. Makanan yang dicampurkan dengan ekstrak ethanol menunjukkan kadar pertumbuhan spesifik maksimum (4.55%) berbanding dengan kawalan berbanding dengan ikan yang diberikan makanan yang digabungkan dengan ekstrak ethanol. FCR minimum dicapai untuk hidrolisat rumpai laut 7.5 (0.66 ± 0.3) dan ekstrak tiram ethanol (0.67 ± 0.1) berbanding untuk kawalan (1.60 ± 0.3).

Makanan yang ditambah dengan ekstrak tiram 2.5% ethanol menunjukkan kecekapan yang lebih baik dari segi FCR.

Komposisi proksimat tisu badan dalam kawalan, dijangkiti dan ikan yang diberi makan dengan 2.5, 5.0 dan 7.5% kepekatan rumpai laut dan hidrolisat tiram menunjukkan variasi yang maksimum dalam kandungan lipid dan karbohidrat berbanding dengan ikan yang telah dijangkiti dan ikan yang diberi makan dengan 2.5% rumpai laut dan hidrolisat tiram. Ekstrak rumpai laut dan tiram ethanol menunjukkan protein mentah (43.33 & 46.39%) dan kandungan abu (5.44 & 6.29%) yang lebih tinggi berbanding dengan ikan yang dijangkiti (Protin 38.52 % dan abu 4.13%). Hasil kajian ini jelas menunjukkan bahawa ekstrak tiram ethanol tidak hanya berkesan dalam menghalang jangkitan bakteria, tetapi juga membantu ikan untuk mengekalkan komposisi proksimat dengan secukupnya.