

Komunikasi Pendek/Short Communication

Kesan Sistisidal Klorin Terhadap *Acanthamoeba* Pencilan Persekitaran dan Klinikal

(Cysticidal Effect of Chlorine Against Environmental and Clinical Isolates of *Acanthamoeba*)

NURUL FARHANA JUFRI, ANISAH NORDIN, MOHAMED KAMEL ABD GHANI, YUSOF SUBOH & NORAINA ABD RAHIM

ABSTRAK

Acanthamoeba adalah ameba hidup bebas yang telah dikenal pasti menjadi penyebab keratitis *Acanthamoeba* dan ensefalitis amebik bergranuloma. Ciri-ciri fisiologinya dapat dikaitkan dengan potensi patogenisiti yang mempunyai kepentingan perubatan. Kajian ini dijalankan bagi mengkaji nilai sistisidal minimum kepekatan klorin terhadap *Acanthamoeba*. Pencilan *Acanthamoeba* yang digunakan terdiri daripada pencilan klinikal dari hospital (HSB 1, HKL 48 dan HKL 95) dan pencilan persekitaran (PHS 2, PHS 11 dan PHS 15). Kepekatan sistisidal minimum klorin ditentukan dengan melakukan pencairan di dalam plat mikrotiter 12 telaga iaitu bermula dengan kepekatan 2500 ppm. 100 µl suspensi sista yang dipiawaikan kepada kepekatan 105/ml dimasukkan ke dalam setiap telaga dan dieram semalaman pada suhu 30°C. Sista kemudiannya dibasuh dengan salin Page dan dikultur pada agar tanpa nutrien yang mengandungi *Escherichia coli*. Kehadiran trofozoit diperhatikan. Kepekatan terendah yang berjaya menghalang pembentukan trofozoit dicatatkan sebagai kepekatan sistisidal minimum. Ujian kepekatan sistisidal minimum menunjukkan kepekatan yang sama iaitu 156 ppm (156 µg/ml) diperlukan bagi membunuh semua pencilan sista *Acanthamoeba*. Ini menunjukkan ciri fisiologikal pencilan spesimen persekitaran dan klinikal adalah sama. Pencilan spesimen persekitaran juga mampu menunjukkan potensi patogenisitinya menyerupai pencilan spesimen klinikal yang mampu mengakibatkan penyakit kepada manusia.

Kata kunci: *Acanthamoeba*, klorin, kepekatan sistisidal minimum, pencilan persekitaran dan klinikal

ABSTRACT

Acanthamoeba is a free-living amoeba that has been identified to cause *Acanthamoeba* keratitis and granulomatous amoebic encephalitis. Their physiological characteristics can be related to pathogenic potential which have a medical importance. This study was carried out to investigate the value of minimum cysticidal concentration of chlorine against them. *Acanthamoeba* strains tested were from clinical isolates from hospitals (HSB 1, HKL 48 and HKL 95) and environmental isolates (PHS 2, PHS 11 and PHS 15). The minimum cysticidal concentration of chlorine was determined by dilution process using 12 wells microtitre plate starting with 2500 ppm. 100 µl cyst suspensions standardized at 105/ml were pipetted into all wells and incubated overnight at 30°C. Cysts were then washed using Page saline and cultured on non nutrient agar overlaid with *Escherichia coli*. The presence of trophozoites was then observed. The lowest concentration able to prevent trophozoites formation was noted as the minimum cysticidal concentration. Minimum cysticidal concentration test showed the same concentration of 156 ppm (156 µg/ml) chlorine solution was needed to kill all cysts of *Acanthamoeba* isolates. This indicates that the physiological traits of environmental and clinical isolates are the same. Isolates from the environmental specimens are also able to show the pathogenic potential similar to clinical specimens, thus capable of causing disease to human.

Keywords: *Acanthamoeba*, chlorine, minimum cysticidal concentration, clinical and environmental isolates

Acanthamoeba merupakan protozoa hidup bebas yang berupaya menyebabkan dua penyakit utama iaitu keratitis *Acanthamoeba* dan ensefalitis amebik bergranuloma (Visvesvara et al. 2007). Namun begitu, keratitis *Acanthamoeba* dianggap sebagai penyakit yang jarang berlaku jika dibandingkan dengan keratitis yang disebabkan jangkitan fungus dan bakteria (Ibrahim et al. 2007). Di negara yang mempunyai prevalens penduduk pemakai kanta sentuh yang tinggi, 85-88% kes keratitis *Acanthamoeba* dilaporkan berlaku pada populasi ini.

Acanthamoeba jarang dianggap sebagai penyebab keratitis pada mereka yang tidak memakai kanta sentuh, sekaligus menyebabkan diagnosis lambat dilakukan.

Ketahanan terhadap bahan kimia merupakan salah satu aspek fisiologi *Acanthamoeba* yang menyumbang kepada potensi patogenisitinya. Klorin merupakan disinfektan yang digunakan secara meluas di seluruh dunia. Klorin telah diperkenalkan sebagai disinfektan yang digunakan dalam air sejak tahun 1900-an. Kerintangan *Acanthamoeba* terhadap disinfektan boleh berlaku dan

oleh itu pencilan *Acanthamoeba* perlu dipantau bagi mengetahui tahap kerintangannya di persekitaran (Sriram et al. 2008). Menurut Chomicz et al. (2010), amoeba rintang pada pelbagai bahan kimia. Oleh itu, kajian ini dilakukan bagi mendapatkan kepekatan sistisidal minimum disinfektan klorin bagi membunuh sista yang dipencilkan di persekitaran dan klinikal.

Enam pencilan *Acanthamoeba* iaitu tiga pencilan klinikal dari hospital (HSB 1, HKL 48 dan HKL 95) dan tiga pencilan persekitaran (PHS 2, PHS 11 dan PHS 15) telah digunakan dalam kajian ini. Larutan disinfektan klorin disediakan dengan melarutkan sebiji tablet Germicep (Hovid) seberat 1.25 g dengan 300 ml air suling bagi menghasilkan kepekatan 2500 ppm. Pencairan dilakukan di dalam plat mikrotiter dengan air suling, bagi menghasilkan kepekatan klorin separuh dari kepekatan telaga sebelumnya. Suspensi sista yang telah dipiawaikan pada 10^5 /ml divortex terlebih dahulu selama satu minit. Kemudian 100 µl suspensi sista dipipetkan ke dalam setiap telaga plat mikrotiter yang mengandungi disinfektan klorin pada kepekatan tertentu.

Terdapat dua kawalan negatif digunakan dalam ujian ini. Bagi kawalan negatif pertama, telaga diisi dengan 100 µl klorin. Sementara kawalan negatif kedua, telaga diisi dengan 100 µl salin Page sahaja. Ini bagi memastikan ia bebas *Acanthamoeba*. Kawalan positif pertama merupakan telaga diisi dengan 100 µl suspensi sista sahaja. Ini bagi memastikan kebolehidupan sista yang digunakan. Kawalan positif kedua menggunakan telaga yang diisi dengan 100 µl suspensi sista yang dicampur dengan 100 µl hidrogen peroksida 3%. Ini bagi memastikan sista yang diuji boleh dibunuh dengan bahan kimia. Kesemua ujian dan kawalan dieram pada suhu 30°C selama 24 jam.

Selepas dieram semalaman pada 30°C, campuran setiap telaga akan dipipetkan ke dalam tiub mikropengempar. Campuran kemudiannya diempar pada kelajuan 1500 rpm. Sista dibilas sebanyak tiga kali dengan salin Page. Selepas basuhan terakhir, sedimen sista dititiskan pada agar tanpa

JADUAL 1. Keputusan kawalan bagi ujian kepekatan sistisidal minimum klorin

Pencilan	Kawalan			
	Positif		Negatif	
	Suspensi sista	3 % H ₂ O ₂	Salin Page	Disinfektan klorin
HSB 1	+	-	x	x
HKL 48	+	-	x	x
HKL 95	+	-	x	x
PHS 2	+	-	x	x
PHS 11	+	-	x	x
PHS 15	+	-	x	x

Petunjuk:

- + Kehadiran trofozoit
- Tiada trofozoit
- x Tiada sista dan trofozoit
- H₂O₂ Hidrogen peroksida

JADUAL 2. Keputusan ujian kepekatan sistisidal minimum disinfektan klorin

Pencilan	Kepekatan sistisidal minimum (ppm)
HSB 1	156
HKL 48	156
HKL 95	156
PHS 2	156
PHS 11	156
PHS 15	156

nutrien yang telah dilapisi dengan *E. coli* matian haba. Agar dieram pada suhu 30°C dan pemerhatian dengan mikroskop *inverted* dilakukan setiap hari selama dua minggu bagi melihat kehadiran trofozoit.

Berdasarkan ujian disinfektan klorin terhadap *Acanthamoeba*, kesemua pencilan yang diuji berjaya dibunuh pada kepekatan sistisidal minimum yang sama iaitu 156 ppm. Tiada perbezaan antara nilai pencilan spesimen klinikal dan persekitaran. Walaupun patogenisiti pencilan persekitaran masih tidak diketahui, namun nilai kerintangannya yang tinggi terhadap klorin menunjukkan ia berpotensi menyebabkan penyakit.

Kajian Storey et al. (2004) mendapati sista masih hidup walaupun telah dirawat dengan klorin berkepekatan 100 mg/l (100 ppm). Kajian ini telah mendapatkan satu nilai kepekatan sistisidal minimum klorin yang baru bagi membunuh sista *Acanthamoeba* iaitu 156 ppm.

Bahan aktif yang terdapat di dalam disinfektan yang digunakan adalah sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) iaitu salah satu bentuk alternatif klorin (Clasen & Edmondson 2006). Apabila dilarutkan di dalam air, asid hipoklorus (HOCl) akan dihasilkan pada pH optimal bagi aktiviti germisidal. Menurut Mogo et al. (2010), HOCl mampu menghalang ATP, meningkatkan metabolit, mempengaruhi ketelapan membran dan menghalang sintesis DNA. Selain itu, klorin berupaya menyebabkan perubahan selular, kehilangan pseudopodia serta mengurangkan kebolehan pembiakan *Acanthamoeba*.

Berdasarkan hasil kajian ini, kita boleh mengandaikan bahawa kepekatan klorin yang dibekalkan pada air paip dan kolam renang (1 ppm) tidak mencukupi bagi membunuh sista *Acanthamoeba*. Walau bagaimanapun, kepekatan klorin yang tinggi tidak boleh digunakan kerana kesan kemudaratanya kepada manusia. Selain itu, penggunaan klorin sebagai disinfektan bagi membasuh kanta lekap adalah tidak berkesan disebabkan kerintangannya sista terhadap klorin pada kepekatan yang rendah (Khan 2008). Oleh itu, langkah-langkah pencegahan seperti mengelakkan pemakaian kanta sentuh semasa mandi di kolam renang atau tidak membasuh kanta sentuh dengan menggunakan air paip harus dititikberatkan untuk mengelakkan *Acanthamoeba* daripada menginfeksi manusia.

RUJUKAN

- Chomicz, L., Padzik, M., Graczyk, Z., Starosciak, B., Graczyk, T.K., Naprawska, A., Oledzka, G. & Szostakowska, B. 2010. *Acanthamoeba castellanii*: in vitro effects of selected biological, physical and chemical factors. *Exp. Parasitology* 126(1): 103-105.
- Clasen, T. & Edmondson, P. 2006. Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. *Int. J. Hyg. Environ.-Health* 209: 173-181.
- Ibrahim, Y.W. Boase, D.L. & Cree, I.A. 2007. Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmic Epidemiology* 14: 53-60.
- Khan, N.A. 2008. *Emerging Protozoan Pathogen*. United States: Taylor & Francis Gp.
- Mogoa, E., Bodet, C., Legube, B. & Hechard, Y. 2010. *Acanthamoeba castellanii*: cellular changes induced by chlorination. *Experiment Parasitol Article in Press*.
- Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P. & Visvesvara, G. 2008. Survival of *Acanthamoeba* cyst after desiccation for more than 20 years. *Journal of Clinical Microbiology* 46(12): 4045-4048.
- Storey, M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J. & Stenstrom, T. 2004. The efficiency of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoeba* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* 36: 656-662.
- Vivesvara, G.S., Moura, H. & Schuster, F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free living amebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillae*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 1-26.

Nurul Farhana Jufri
Mohamed Kamel Abd. Ghani
Jabatan Sains Bioperubatan
Fakulti Sains Kesihatan
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur

Corresponding author: Anisah Nordin
Email address: anisah@medic.ukm.my
Tel: 603-92897547; Faks: 603-26982640

Anisah Nordin
Yusof Suboh
Noraina Abd. Rahim
Jabatan Parasitologi dan Entomologi
Fakulti Perubatan
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur

Received: Mei 2011

Accepted for publication: Julai 2011