

Kerintangan Sista *Acanthamoeba* Isolat Persekitaran terhadap Bendalir Mukus Ikan Keli *Clarias batrachus*

(The Resistance of *Acanthamoeba* Environmental Isolates Cysts towards *Clarias batrachus* Catfish Mucus)

AHMAD ZORIN SAHALAN*, ASFARRIEZA ARSAD, ANISAH NORDIN, YUSOF SUBOH, NORAINA AB RAHIM, NORAZAH AHMAD & MOHAMED KAMEL ABD GHANI

ABSTRAK

Bahan semulajadi khasnya daripada protein haiwan telah diuji keberkesanannya dan mampu mengawal serta membasmi jangkitan patogen. Mukus epidermis ikan keli atau *Clarias batrachus* merupakan sumber protein yang dikenalpasti mempunyai peptida antimikrob. Insiden keratitis *Acanthamoeba* yang berkaitan penggunaan kanta sentuh semakin meningkat akibat penjagaan alatan kanta sentuh yang kurang higienik. Kerintangan *Acanthamoeba* terhadap kemoterapi antimikrob semakin berleluasa dan memerlukan sesuatu bahan pengawalan yang berkesan khasnya terhadap peringkat sistanya. Kajian ini dilakukan untuk menentukan keberkesanan mukus epidermis *Clarias batrachus* sebagai agen anti-*Acanthamoeba* ke atas 4 isolat persekitaran sista *Acanthamoeba*, (PBA 42, PBA 46, TKA 14 dan TTA 1). Mukus *C. batrachus* berkepekatan 20% dan 100% ditindakkan terhadap sista *Acanthamoeba*. Setiap campuran dipindahkan ke agar bukan nutrien yang dilapisi *Escherichia coli*. Plat agar diinkubasi pada 30°C dan diperhatikan setiap hari sehingga hari ke-14 untuk mengesan kehadiran trofozoit *Acanthamoeba* di bawah mikroskop. Kehadiran trofozoit menunjukkan mukus *C. batrachus* tidak berkesan. Hasil kajian menunjukkan mukus *C. batrachus* yang diuji ke atas kesemua isolat persekitaran adalah tidak berkesan. Secara kesimpulannya, mukus epidermis *C. batrachus* tidak berkesan untuk membunuh sista *Acanthamoeba*.

Kata kunci: Mukus epidermis *Clarias batrachus*; *Acanthamoeba* isolat persekitaran

ABSTRACT

Many forms of natural substances, including animal proteins have been tested for their effectiveness in controlling and eradicating infections. The epidermal mucus of *Clarias batrachus* has been identified to have antimicrobial peptides. The occurrence of incidence of *Acanthamoeba* keratitis related to contact lens usage is increasing probably due to the lack of hygiene in handling contact lenses. There is also widespread claim that *Acanthamoeba* is resistant towards many antimicrobial agents and an urgent remedy is needed to control *Acanthamoeba*, mainly its cysts form. This study was conducted to determine the effectiveness of *Clarias batrachus* epidermal mucus as anti-*Acanthamoeba* agent on 4 *Acanthamoeba* cyst environmental isolates, (PBA 42, PBA 46, TKA 14 and TTA 1). *C. batrachus* mucus with the concentrations of 20% and 100% was tested against the *Acanthamoeba* cysts isolates. Each mixture was transferred onto non-nutrient agar laid with *Escherichia coli*. The agar plates were incubated at 30°C and monitored daily until day 14 to detect the presence of *Acanthamoeba* trophozoites under the microscope. The presence of trophozoites indicated the ineffectiveness of *C. batrachus* mucus. The result showed *C. batrachus* mucus tested on all isolates was ineffective. It can be concluded that epidermal mucus extract of *C. batrachus* was not effective to kill *Acanthamoeba* cysts.

Key words: *Clarias batrachus* epidermal mucus; *Acanthamoeba* environmental isolates

PENGENALAN

Acanthamoeba spp. merupakan protozoa yang boleh menyebabkan jangkitan pada mata (keratitis *Acanthamoeba*), sistem saraf pusat (ensefalitis ambik bergranuloma) dan jangkitan pada kulit (dermatitis *Acanthamoeba*). Jangkitan *Acanthamoeba* pada kornea boleh menyebabkan kebutaan dan jangkitan ini dikenali sebagai keratitis (Schuster et al., 2004, Walker., 1996).

Acanthamoeba. wujud samada dalam bentuk trofozoit aktif atau sista dorman. Lapuran penyelidikan menunjukkan sebanyak 84% kes keratitis *Acanthamoeba* berkait rapat dengan pemakaian kanta sentuh (Stapleton et al. 2009). Individu yang berisiko tinggi mendapat jangkitan *Acanthamoeba* adalah pengguna kanta sentuh lembut yang tidak mengamalkan kebersihan ketika memakai dan menyimpan kanta sentuh (Anger & Lally 2008). Kini, jangkitan keratitis *Acanthamoeba* walaupun jarang berlaku, namun ia merupakan jangkitan yang dikira serius kerana ianya sangat sukar dikawal kerana *Acanthamoeba* semakin rintang terhadap terapi antimikrob (Moore et al. 1987). Keupayaan kerintangan *Acanthamoeba* telah mencetuskan pelbagai usaha untuk mengawal jangkitan ini khasnya dengan menggunakan bahan semulajadi. Beberapa bahan bioaktif yang dipencil dari tumbuhan dan haiwan telah diuji akan keberkesanannya. Mukus ikan keli kayu atau nama saintifiknya *Clarias batrachus* di dapati mampu memerancat pertumbuhan beberapa jenis bakteria (Debnath, 2011). Sebagai barisan pertahanan yang pertama, mukus epidermis ikan adalah salah satu komponen sistem imun semulajadi yang melindungi ikan daripada risiko jangkitan patogen akibat pendedahan yang berterusan terhadap mikroorganisma (Whyte., 2007). Ia dirembes keluar ke permukaan kulit ikan sebagai pelindung terhadap patogen akuatik disamping menjadi pelincir untuk pergerakan ikan. Kajian mendapati bahawa mukus epidermis ikan mempunyai komponen sistem imun seperti IgM dan lisozim serta bahan peptida yang dapat menghalang kolonisasi parasit akuatik, bakteria dan fungus (Ebran et al., 2000). Peptida yang dirembes oleh sesetengah ikan dan haiwan akuatik merupakan agen yang berupaya merencat atau memusnahkan mikroorganisma (Zasloff 2002), fungus, virus dan juga parasit tanpa sebarang kesan toksik terhadap sel perumah (Hancock et al., 2000).

Oleh itu di dalam kajian ini mukus *C. batrachus* diuji akan keberkesanannya untuk merencat pertumbuhan sista *Acanthamoeba*.

BAHAN DAN KAEDAH

Pemencilan mukus *Clarias batrachus* (Nagashima et al, 2001)

Ikan keli kayu yang masih hidup dibersihkan terlebih dahulu dengan air suling steril. Permukaan badan ikan dibilas dengan air suling dan mukus dikumpulkan dengan menggunakan spatula yang steril pada suhu 4°C.

Mukus yang dikumpulkan kemudiannya ditapis dengan penapis membran 0.45 µm. Mukus *Clarias batrachus* diuji pada dua tahap kepekatan iaitu 100% dan juga 20%. Untuk kepekatan 100%, mukus tidak dicairkan dengan sebarang larutan pelarut, manakala untuk pencairan 20% pula, mukus dilarutkan dengan air steril dengan nisbah mukus kepada air 1:4 (ml/ml atau isipadu kepada isipadu).

Isolat *Acanthamoeba* spp.

Sebanyak empat isolat persekitaran (PBA 42, PBA 46, TKA 14 dan TTA 1) *Acanthamoeba* spp. diperolehi daripada Makmal *Acanthamoeba*, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia digunakan dalam kajian ini.

Persiapan sista *Acanthamoeba* dan ujian anti-sista (Kamel et al 2005) oleh mukus *Clarias batrachus*

Suspensi sista *Acanthamoeba* divorteks selama satu minit untuk dihomogenkan bersama larutan salin PAGE. Sebanyak 10 µl suspensi sista dipipet masuk ke dalam telaga mikrotiter yang telah mengandungi 100 µl ekstrak mukus. Sista dimasukkan ke dalam semua telaga kecuali telaga untuk kawasan negatif. Terdapat dua kawalan positif dan dua kawalan negatif.

Kawalan positif terbahagi kepada kawalan positif pertama dan kawalan positif kedua. Kawalan positif pertama ialah *Page Amebic Saline* (PAS) dan kawalan positif kedua merupakan larutan hydrogen peroksida (3% H₂O₂). Manakala untuk kawalan negatif pula, kawalan negatif yang pertama ialah larutan PAS sahaja manakala larutan kawalan negatif kedua terdiri daripada agen anti-*Acanthamoeba*. Campuran dibiarkan selama 24 jam. Selepas dieram selama 24 jam di dalam

inkubator bersuhu 30°C, campuran di setiap telaga dipipet masuk ke dalam vial 1.5 ml yang berlainan. Campuran kemudian diempar pada kelajuan 740 xg selama 5 minit untuk mendapatkan mendapan sista. Supernatan di bahagian atas vial akan dibuang dan mendapan di bawah vial akan dipindahkan terus ke atas agar bukan nutrien yang telah dititiskan dengan suspensi *E. coli* matian haba pada hari sebelumnya. Setelah itu, semua piring petri ditutup dan dieramkan pada suhu 30°C selama 48 jam. Piring petri tersebut diperhatikan setiap hari selama

14 hari di bawah mikroskop songsang untuk mengesan kehadiran trofozoit *Acanthamoeba*.

HASIL

Ujian aktiviti mukus epidermis *Clarias batrachus* terhadap sista *Acanthamoeba*

Keputusan ujian kawalan positif dan negatif untuk menguji keberkesanan aktiviti mukus *Clarias batrachus* terhadap sista *Acanthamoeba* ditunjukkan dalam Jadual 1.

JADUAL 1. Keputusan kawalan ujian penentuan aktiviti anti-*Acanthamoeba* mukus epidermis *C. batrachus*

Isolat	Kawalan			
	Positif		Negatif	
	Suspensi sista	% H ₂ O ₂	Larutan PAS	Mukus <i>C. batrachus</i>
PBA 42	+	-	X	X
PBA 46	+	-	X	X
TKA 14	+	-	X	X
TTA 1	+	-	X	X

Petunjuk:

+ Kehadiran sista dan trofozoit *Acanthamoeba*

- Tiada trofozoit *Acanthamoeba*

X Tiada kehadiran sista dan trofozoit *Acanthamoeba*

H₂O₂ Hidrogen Peroksida

PAS Page Amebic Saline

Di dalam ujikaji ini, tujuan kawalan positif pertama iaitu Page Amebic Saline (PAS) dan kawalan positif kedua yang terdiri daripada hidrogen peroksida 3% (H₂O₂) adalah untuk menunjukkan isolat tersebut hidup dan boleh digunakan di dalam kajian. Tujuan kawalan negatif dilakukan adalah untuk memastikan tiada kontaminasi berlaku terhadap larutan PAS dan agen anti-parasit. Kedua-dua kawalan positif dan

negatif telah berfungsi dengan baik dan memberikan hasil yang seperti dijangkakan.

Mukus epidermis *C. batrachus* yang diguna juga diuji untuk dua tahap kepekatan iaitu 20% dan 100%. Jadual 2 menunjukkan kehadiran trofozoit *Acanthameoba* yang berjaya bereksistasi daripada sista walaupun sista tersebut telah ditindakkan dengan mukus epidermis *C. batrachus* pada kepekatan 20% dan 100%.

JADUAL 2. Keputusan ujian keberkesanan aktiviti anti-*Acanthamoeba* mukus epidermis *C. batrachus* terhadap sista *Acanthamoeba* isolat persekitaran.

Isolat Persekitaran	Kepekatan mukus 20%	Kepekatan mukus 100%
PBA 42	+	+
PBA 46	+	+
TKA 14	+	+
TTA 1	+	+

*Petunjuk : + trofozoit hadir

PERBINCANGAN

Potensi mukus epidermis *Clarias batrachus* sebagai anti-*Acanthamoeba* dikaji di dalam kajian ini. *C. batrachus* atau nama tempatan, ikan keli kayu, dipilih sebagai sumber kajian kerana ia mudah didapati di pasar dan pasaraya dalam keadaan masih hidup, dan dijual dengan harga yang agak murah.

Ujian kawalan positif telah dilakukan dengan menggunakan hidrogen peroksida sebagai agen anti-*Acanthamoeba*. Hidrogen peroksida sangat efektif sebagai disinfektan kanta sentuh kerana ia dapat membunuh bakteria, kulat dan *Acanthamoeba spp.* (Johnston et al. 2009). Kawalan positif dilakukan untuk memastikan bahawa *Acanthamoeba* yang digunakan bukanlah dari strain yang rintang.

Hasil ujian keberkesanan mukus epidermis *Clarias batrachus* terhadap sista *Acanthamoeba* isolat persekitaran (Jadual 2.), mendapati bahawa mukus epidermis *C. batrachus* daripada kepekatan yang dicairkan iaitu 20% dan kepekatan asal, 100% tidak mampu untuk menghalang penghasilan trofozoit *Acanthamoeba* daripada sistanya.

Walaupun hasil kajian kurang memberangsangkan terhadap kesan ekstrak mukus *C. batrachus*, namun masih banyak lagi ujian terperinci yang perlu dilakukan kerana menurut Su (2011), mukus epidermis ikan telah dibuktikan mempunyai aktiviti antibakteria, berpotensi sebagai sumber peptida antimikrob (Vizioli et al., 2002).

Beberapa cadangan kajian lanjutan dihasilkan bagi memperbaiki uji kaji yang sedia ada serta menambahbaik julat kajian. Mukus yang dihasilkan perlulah dalam jumlah yang banyak dan

mungkin dipekatkan., Walaubagaimanapun sista memang diketahui merupakan peringkat pertahanan *Acanthamoeba* yang kuat dan tahan pada persekitaran ekstrim. Daya ketahanan seperti inilah yang boleh membantu sistanya bertahan daripada sebarang bahan anti-mikrob.

KESIMPULAN

Hasil kajian menunjukkan bahawa sista *Acanthamoeba* untuk kesemua isolat persekitaran iaitu PBA 42, PBA 46, TKA 14 dan TTA 1 rintang terhadap mukus epidermis *Clarias batrachus* pada kepekatan 20% dan 100% .

RUJUKAN

- Anger, C. & Lally, J.M. 2008. *Acanthamoeba*: A review of its potential to cause keratitis, current lens care solution disinfection standards and methodologies, and strategies to reduce patient risk. *Eye & Contact Lens*. 34(5): 247-253.
- Debnath, S. 2011. *Clarias batrachus*, the medicinal fish: An excellent candidate for aquaculture & employment generation. *International Conference on Asia Agriculture and Animal IPCBE*. 13: 32-37.
- Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Auperin, B. & Molle, G. 2000. Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: Correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1467(2): 271-280.
- Hancock, R.E.W. & Scott, M.G. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97: 8856-8861.

- Johnston, S.P., Sriram, Rama., Qvarnstrom, Y., Roy, S., Verani, J., Yoder1, J., Lorick, S., Roberts, J., Beach, M.J. & Visvesvara, G. 2009. Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection in Multiple Contact Lens Solutions. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(7): 2040-2045.
- Kamel, A.G.M, Haniza, H., Anisah, N., Yusof, S., Faridah, H., Norhayati, M. & Norazah, A. 2005. More *Acanthamoeba* keratitis cases in Malaysia. *International Medical Journal*. 12(1): 7-9.
- Moore, M.B., McCulley, J.P., Netwon, C., Cobo, L.M., Foulks, G.N., O'day, D.M., Johns, K.J., Driebe, W.T., Epstein, R.J. & Doughmas, D.J. 1987. *Acanthamoeba* keratitis: A growing problem in soft and hard contact lens wearer. *Ophthalmol*. 94: 1654-1661.
- Nagashima, Y., Sendo, A., Shimakura, K., Kobayashi, T. & Kimura Fujii, T. 2001. Antibacterial factors in skin mucus of rabbitfishes. *Journal of Fish Biology*. 58: 1761-1765.
- Stapleton, F., Ozkan, J., Jalbert, I., Holden, B.A., Petsoglou, C. & McClellan, K. 2009. Contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis. *Optometry and Vision Science*. 86(10): 1196-201.
- Su, Y. 2011. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comparative Biochemistry and Physiology – B Biochemistry and Molecular Biology*. 158 (2): 149-154.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animal. 34: 1001-1027.
- Vizioli, J. & Salzet, M. 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacology Sciences*. 23(11): 494-496.
- Walker, C.W.B. 1996. *Acanthamoeba*: ecology, pathogenicity and laboratory detection. *British Journal of Biomedical Sciences*. 53: 146-151.
- Whyte, S.K. 2007. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*. 23(6): 1127-1151.
- Zassloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415: 389-395.

Ahmad Zorin Sahalan*,
Asfarrieza Arsad,
Mohamed Kamel Abd Ghani
Fakulti Sains Kesihatan,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
50300 Jalan Raja Muda Abdul Aziz,
Kuala Lumpur

Anisah Nordin
Yusof Suboh
Noraina Abd Rahim
Jabatan Parasitologi,
Fakulti Perubatan,
Universiti Kebangsaan Malaysia

Norazah Ahmad
Institut Penyelidikan Perubatan,
Jalan Pahang, Kuala Lumpur

*Corresponding author: ahmadzorinsahalan@ukm.edu.my