

Pemencilan *Acanthamoeba* spp. daripada Persekitaran Tanah (Isolation of *Acanthamoeba* spp. from Soil Environment)

MOHAMED KAMEL ABD GHANI*, MIMI FAZAH, ANISAH NORDIN, YUSOF SUBOH,
NORAINA ABD RAHIM & NORAZAH AHMAD

ABSTRAK

Acanthamoeba spp. adalah ameba hidup bebas di pelbagai persekitaran termasuk akuatik dan tanah. Ia boleh menyebabkan jangkitan mata dipanggil keratitis yang boleh membawa kebutaan, dan jangkitan sistem saraf pusat yang boleh membawa maut. Kajian ini dijalankan untuk memencilkan *Acanthamoeba* spp. daripada persekitaran tanah bagi melihat taburan kehadirannya. Sebanyak 117 sampel telah diambil daripada persekitaran tanah. Kesemua sampel dikultur di atas plat agar bukan nutrien yang telah diinokulasikan dengan suspensi *Escherichia coli* matian haba, diinkubasi pada suhu 30°C dan pemerhatian dibuat setiap hari selama 14 hari di bawah mikroskop kebalikan. Pengecaman trofozoit *Acanthamoeba* spp. dibuat berdasarkan saiz dan kehadiran akantopodia, ciri-ciri nukleus dan vakuol kontraktil serta pergerakannya manakala sista berdasarkan saiz serta morfologi endosista dan ektosista. Daripada keseluruhan sampel, 54.7 peratus sampel persekitaran tanah memberikan kultur positif untuk ameba tersebut. Pemencilan *Acanthamoeba* didapati lebih tinggi pada jenis tanah yang digunakan untuk tujuan pertanian seperti tanah liat (94.3%) dan tanah gambut (84%) berbanding tanah pasir dan tanah laterit. Majoriti *Acanthamoeba* yang dipencilkan adalah dari kumpulan Polyphagids (54.7%) diikuti oleh Culbertsonids (25%) dan Astronyxids (17.2%). Penemuan ini membuktikan yang *Acanthamoeba* spp. sememangnya wujud di persekitaran tanah di Malaysia dan lebih membimbangkan kerana ianya lebih mudah dipencilkan daripada jenis tanah yang diguna untuk bertani sekali gus meningkatkan risiko jangkitan.

Kata kunci : *Acanthamoeba*; pemencilan; persekitaran tanah; Malaysia

ABSTRACT

Acanthamoeba spp. are free-living amoebae found in various environment including aquatic and soil. It can cause severe eye infection called keratitis which can lead to blindness and infection of the central nervous system causing death. This study was carried out to isolate *Acanthamoeba* spp. from soil environment to observe their distributions. 117 samples were collected from soil environment. All samples were cultured onto non-nutrient agar (NN-A) inoculated with suspension of heat-killed *Escherichia coli*, incubated at 30°C and examined daily using an inverted microscope for 14 days. Trophozoite identification was based on size and the presence of acanthopodia, nucleus characteristics and contractile vacuole, and also its movement, while cyst identification was based on size and morphology of endocyst and ectocyst. Overall, 54.7 percent of soil samples were positive for the amoebae. The isolation of *Acanthamoeba* is found to be much higher in soil used for agriculture such as clay (94.3%) and peat soil (84%) as compared to sandy and laterite soil. Majority of the *Acanthamoeba* were from the Polyphagids group (57.8%) followed by Culbertsonids (25%) and Astronyxids (17.2%). These findings proved that *Acanthamoeba* does exist in soil environment in Malaysia dan whats more worrying is the fact that its more easily isolated from soil used for agricultural purposes, thereby increasing the risk for infection.

Keywords : *Acanthamoeba*; isolation; soil environment; Malaysia

PENGENALAN

Acanthamoeba spp. adalah ameba hidup bebas yang tersebar luas dalam persekitaran manusia seperti persekitaran akuatik, tanah dan udara. Ameba ini telah berjaya dipencilkan secara langsung daripada sampel persekitaran seperti tanah di taman permainan awam, habuk dan debu di kawasan apartmen dan bilik-bilik di hospital, sampel swab nasal dan juga kotoran najis (Mergeryan 1991). Taburan *Acanthamoeba* yang sangat luas dalam persekitaran manusia dan kemampuannya untuk menyerang sistem saraf pusat, kulit dan mata telah menyebabkan *Acanthamoeba* menjadi salah satu ameba yang penting dalam bidang kesihatan dan perubatan. Pada individu imunokompromi, kehadirannya dalam sistem saraf pusat menyebabkan "Granulomatous Amoebic Encephalitis" (GAE), manakala pada kulit menyebabkan kutaneus *Acanthamoeba*. Jangkitan *Acanthamoeba* pada mata pula menyebabkan keratitis *Acanthamoeba* iaitu jangkitan teruk pada kornea mata dan jika tidak dirawat segera boleh menyebabkan kebutaan. Jangkitan ini telah dinyatakan sebagai wabak yang baharu dan mendapat perhatian serius dari semua pihak yang terlibat (Schaumberg et al. 1998). Umum berpendapat bahawa pesakit keratitis *Acanthamoeba* mendapat jangkitan tersebut melalui pelbagai sumber eksogenous termasuklah persekitaran tanah. Di Malaysia kes pertama keratitis *Acanthamoeba* yang melibatkan pemakai kanta sentuh telah dilaporkan pada tahun 1995 (Mohamed Kamel & Norazah 1995). Setelah itu, lebih banyak kes keratitis *Acanthamoeba* telah dikesan dan dilaporkan di Malaysia (Kamel et al. 2005; Mohamed Kamel et al. 2000, 2003).

Faktor risiko lain yang boleh menyebabkan jangkitan keratitis *Acanthamoeba* adalah termasuk trauma pada kornea. Keadaan ini terjadi apabila berlaku kemasukan bahan vegetatif, batu, habuk dan debu serta percikan air yang telah terkontaminasi ke dalam mata (Sharma et al. 2000). Selain itu, kes akibat terkena simbahan lumpur atau tanah semasa bekerja di sawah atau ladang juga pernah dilaporkan (Seal 1995). Kes keratitis *Acanthamoeba* yang tidak berkaitan dengan pemakaian kanta sentuh juga pernah dilaporkan di Malaysia, melibatkan seseorang yang mendapat trauma pada mata semasa bekerja (Kamel et al. 2004). Namun, bilangan kes keratitis yang semakin

meningkat di seluruh dunia dan juga di Malaysia (Kamel et al. 2005; Mohamed Kamel et al. 1996, 2003) memerlukan penyelidikan menyiasat lebih lanjut persekitaran tanah yang berkemungkinan menjadi sumber penyebaran organisma ini. Tambahan pula, laporan mengenai kehadiran ameba hidup bebas ini di persekitaran tanah di Malaysia masih kurang dan oleh itu bagi memahami dengan lebih jelas, hubungan antara infeksi *Acanthamoeba* sp. terhadap manusia dengan sumber penyebab infeksi, kajian ini dijalankan untuk menentukan kehadiran *Acanthamoeba* sp. di dalam persekitaran tanah.

BAHAN DAN KAEDAH

Sebanyak 117 sampel diambil dari persekitaran tanah yang melibatkan empat jenis tanah yang berbeza iaitu tanah pasir, tanah gambut, tanah laterit dan tanah liat.

Bagi kesemua sampel, tanah diambil dengan menggunakan spatula yang steril. Anggaran 10 g sampel tanah dimasukkan ke dalam botol universal yang telah diisikan dengan 10 ml larutan PAS (Page Amoebic Saline) steril. Kesemua sampel diambil pada bahagian permukaan tanah kerana bahagian ini mempunyai kandungan bahan organik yang tinggi dan menjadi kawasan pemendapan bakteria yang berperanan sebagai sumber makanan ameba ini (Stout & Heal 1967; Subba-Rao 1977; Clarholm 1981). Botol universal yang mengandungi sampel tanah divortekskan selama lapan minit. Setelah itu, ia dibiarkan seketika bagi membolehkan pemendapan semula tanah di dalam botol tersebut. Seterusnya dengan menggunakan swab kapas steril, permukaan atas mendapan tanah itu diswabkan di atas plat agar bukan nutrien dan diinkubasikan pada suhu 30°C. Seterusnya pemerhatian di bawah mikroskop kebalikan dilakukan selama 14 hari untuk mencerap kehadiran trofozoit ataupun sista.

Selain itu, kriteria yang telah ditetapkan oleh Page (1967a) dijadikan sebagai garis panduan dalam mengenalpasti jenis kumpulan kesemua isolat tersebut, di mana pengecaman sista berdasarkan saiz serta morfologi endosista dan ektosista.

HASIL

Acanthamoeba spp. telah berjaya dipencilkan daripada persekitaran tanah di Malaysia. Prevalens

Acanthamoeba spp. daripada sampel persekitaran tanah menunjukkan peratusan yang tinggi iaitu

meliputi 54.7% (64/117) daripada keseluruhan sampel tanah yang telah diambil (Jadual 1).

JADUAL 1. Peratus taburan pemencilan positif *Acanthamoeba* spp. daripada persekitaran tanah

	Jumlah Sampel	Jumlah Pemencilan Positif <i>Acanthamoeba</i> spp.	Pemencilan Positif <i>Acanthamoeba</i> spp. (%)
Persekitaran Tanah	117	64	54.7

Persekitaran tanah melibatkan empat jenis tanah yang berbeza, dan Jadual 2. menunjukkan jumlah sampel yang diambil, jumlah dan peratusan pemencilan positif *Acanthamoeba* spp. bagi setiap jenis tanah. *Acanthamoeba* spp. paling banyak

dipencilkan daripada tanah liat iaitu sebanyak 33 sampel (94.3%) dan tanah laterit mencatatkan jumlah pemencilan *Acanthamoeba* spp. yang paling rendah iaitu sebanyak tiga sampel (15.0%).

JADUAL 2. Peratus taburan pemencilan positif *Acanthamoeba* spp. mengikut jenis tanah

Jenis Persekitaran Tanah	Jumlah Sampel	Jumlah Pemencilan Positif <i>Acanthamoeba</i> spp.	Pemencilan Positif <i>Acanthamoeba</i> spp. (%)
Tanah Pasir	37	7	18.9
Tanah Gambut	25	21	84.0
Tanah Laterit	20	3	15.0
Tanah Liat	35	33	94.3
Jumlah	117	64	54.7

Dari Jadual 3. dapat diperhatikan bahawa jenis kumpulan Polyphagids mencatatkan pemencilan

paling tinggi (57.8%) diikuti Culbertsonids (25%) dan Astronyxids (17.2%).

JADUAL3. Taburan pemencilan positif *Acanthamoeba* spp. berdasarkan jenis kumpulan *Acanthamoeba*

Jenis Persekitaran	Jenis Kumpulan <i>Acanthamoeba</i>			Jumlah Pemencilan Positif <i>Acanthamoeba</i> spp.
	Astronyxids (I)	Polyphagids (II)	Culbertsonids (III)	
Persekitaran Tanah	11 (17.2 %)	37 (57.8 %)	16 (25.0 %)	64

JADUAL 4. Taburan pemencilan positif *Acanthamoeba* spp. berdasarkan jenis kumpulan *Acanthamoeba* bagi setiap jenis tanah

Jenis Persekitaran Tanah	Jenis Kumpulan <i>Acanthamoeba</i>			Jumlah Pemencilan Positif <i>Acanthamoeba</i> spp.
	Astronyxids (I)	Polyphagids (II)	Culbertsonids (III)	
Tanah pasir	0 (0.0%)	5 (71.4%)	2 (28.6%)	7
Tanah gambut	9 (42.9%)	2 (9.5%)	10 (47.6%)	21
Tanah laterit	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3
Tanah liat	1 (3.0%)	29 (87.9%)	3 (9.1%)	33
Jumlah	11	37	16	64

Tanah liat mencatat pemencilan tertinggi bagi *Acanthamoeba* dari jenis kumpulan Polyphagids (Jadual 4.)

PERBINCANGAN

Pemencilan *Acanthamoeba* spp. yang tinggi dalam sampel tanah yang dikaji tidak mengejutkan dan sememangnya telah dijangkakan. Ini kerana Subba-Rao (1977) dan Clarholm (1981) telah melaporkan bahawa ameba merupakan konsumen major bakteria di dalam tanah. Selain itu, kebanyakan kajian terdahulu yang berkaitan ameba tanah telah memberi fokus utama terhadap interaksi antara organisma tersebut dengan bakteria (Nakisah & Zaiton 1986). Para penyelidik lain mendapati bahawa kehadiran bakteria yang tinggi dalam lapisan atas tanah (*top layers*) disebabkan oleh akumulasi bahan organik daripada akar pokok (Stout & Heal 1967). Menurut Gregorich et al. (2002), *top soil* merupakan lapisan permukaan tanah yang senantiasa mengalami perubahan akibat pelbagai aktiviti contohnya kegiatan penanaman dan biasanya kaya dengan bahan organik. Bahan organik tersebut menyediakan habitat yang sesuai bagi bakteria tanah (Stout & Heal 1967) yang menjadi sumber makanan bagi ameba termasuk *Acanthamoeba* spp.

Keputusan kajian ini juga menyokong kajian terdahulu yang dijalankan oleh Nakisah dan Zaiton (1986), yang mana telah berjaya memencilkan *Acanthamoeba* spp. daripada tiga jenis siri tanah yang berbeza. Keputusan kajian oleh Nakisah dan Zaiton juga menunjukkan terdapat perbezaan signifikan ($p=0.01$) di dalam

jumlah *Acanthamoeba* spp. yang dipencilkan daripada tiga jenis tanah tersebut. Setiap jenis tanah yang digunakan dalam kajian tersebut mempunyai tekstur dan warna yang berbeza serta kandungan lembapan yang berlainan. Oleh itu, perbezaan dalam jumlah pemencilan *Acanthamoeba* spp. bagi kesemua jenis tanah yang digunakan dalam kajian ini dapat difahami.

Berdasarkan hasil kajian ini, prevalens *Acanthamoeba* spp. daripada sampel tanah liat dan tanah gambut menunjukkan peratusan yang tinggi iaitu masing-masing sebanyak 94.3% dan 84.0% daripada jumlah keseluruhan setiap sampel tanah tersebut. Tanah liat dan tanah gambut mempunyai sifat dan tekstur yang agak berbeza, tetapi keduanya banyak digunakan untuk aktiviti pertanian. Kawasan tanah pertanian mengandungi bahan organik terutamanya yang berasal daripada tumbuhan. Bahan organik terdiri daripada kanji, lemak, asid organik, protein dan juga sebatian amino. Kesemua bahan ini membekalkan kandungan nitrogen dan karbohidrat yang diperlukan oleh bakteria dalam tanah. Selain itu, larutan tanah juga banyak membekalkan pelbagai garam bukan organik yang diperlukan oleh bakteria (Singh 1975). Oleh itu, tanah pertanian adalah kaya dengan bakteria yang merupakan sumber makanan bagi ameba. Maka, tanah dari jenis ini adalah amat sesuai sebagai habitat bagi ameba dan kehadiran *Acanthamoeba* spp. yang tinggi dalam tanah liat dan tanah gambut adalah munasabah.

Acanthamoeba spp. juga berjaya dipencilkan daripada sampel tanah pasir dan tanah laterit walaupun pada peratusan yang lebih rendah iaitu masing-masing meliputi 18.9% dan 15.0% daripada jumlah keseluruhan setiap sampel tanah tersebut. Dalam kajian ini, sampel tanah pasir diambil di sepanjang pesisiran pantai. Tanah pasir pada kawasan daratan di sepanjang tepi laut adalah terdedah kepada pancaran cahaya matahari yang terik. Keadaan tersebut menyebabkan tahap haba yang diterima oleh tanah pasir adalah tinggi dan keadaan panas yang melampau tidak menyokong pertumbuhan *Acanthamoeba* spp. (Bottomley 1999) begitu juga kandungan bahan organik yang lebih rendah pada tanah pasir dan laterit. Oleh itu, keadaan ini juga dapat menjelaskan peratusan yang rendah dalam pemencilan *Acanthamoeba* spp. daripada sampel tanah pasir.

Perubahan dalam kualiti sumber makanan menjadi faktor penting dalam menentukan kehadiran organisma protozoa dalam tanah. Selain itu, perubahan dalam suhu dan kandungan lembapan tanah, kepelbagaian dalam jumlah dan jenis bahan organik tanah, kedalaman dan kadar penguraian bahan organik dalam tanah serta jenis bahan asal tanah dapat menjelaskan perbezaan dalam jumlah pemencilan organisma dalam pelbagai jenis tanah (Ingham 1999). Hasil penemuan *Acanthamoeba* spp. daripada pelbagai sampel tanah dalam kajian ini membuktikan bahawa ameba ini sememangnya wujud dalam persekitaran tanah. Walaupun peranan tanah sebagai takungan bagi ameba berpatogen masih lagi belum dapat dipastikan, tanah boleh dikatakan sebagai habitat yang ideal bagi ameba hidup bebas ini dan kehadiran *Acanthamoeba* spp. dalam pelbagai persekitaran lain adalah disebabkan oleh penyebarannya daripada persekitaran tanah (Singh 1975). Majoriti pemencilan *Acanthamoeba* adalah daripada jenis kumpulan Polyphagids yang biasanya terkenal sebagai kumpulan yang patogenik. Ini adalah penemuan yang agak membimbangkan khususnya berkaitan risiko mendapat jangkitannya.

RUJUKAN

Bottomley, P.J. 1999. Microbial Ecology. Dlm. Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G. & Zuberer, D.A. (pnvt.). Principles and applications of soil

microbiology, hlm. 149-167. New Jersey: Prentice Hall.

Clarholm, M. 1981. Protozoan grazing of bacteria in soil: impact and importance. Microbial Ecology. 7: 343-350.

Gregorich, E.G., Turchenek, L.W., Carter, M.R. & Angers, D.A. (pngr.). 2002. *Soil and Environmental Science Dictionary*. London: CRC Press.

Ingham, E.R. 1999. Protozoa and nematodes. Dlm. Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G. & Zuberer, D.A. (pnvt.). Principles and applications of soil microbiology, hlm. 114-131. New Jersey: Prentice Hall.

Kamel, A.G.M., Faridah, H., Yusof, S., Norazah, A. & Nakisah, M.A. 2004. A case of trauma related *Acanthamoeba* keratitis. Tropical Biomedicine 21(2):135-138.

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.

Mergeryan, H. 1991. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. Reviews of Infectious Diseases 13 (Suppl 5): S390-391.

Mohamed Kamel, A.G. & Norazah, A. 1995. First case of *Acanthamoeba* keratitis in Malaysia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 89(6): 652.

Mohamed Kamel, A.G., Anisah, N., Yusof, S., Michael, L., Norhayati, M. & Norazah, A. 2003. *Acanthamoeba* keratitis is not so rare in Malaysia. Medical Journal Malaysia 58(Suppl E): 36.

Mohamed Kamel, A.G., Faridah Hanom, A., Norazah, A. & Noor Rain, A. 1996. Contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis in Malaysia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 90: 453.

Mohamed Kamel, A.G., Faridah Hanom, A., Norazah, A., Noor Rain, A., Hay, J. & Seal, D. 2000. A case of waterborne contact lens associated *Acanthamoeba* keratitis from Malaysia: Successful treatment with chlorhexidine and propamidine. International Medical Journal 7(1): 63-65.

Nakisah, M.A. & Zaiton, M.N. 1986. A study on the occurrence of *Acanthamoeba polyphaga* in three different types of soil. 9th Malaysian Microbiology Symposium. Universiti Pertanian Malaysia, Serdang, 22-23 Ogos.

Page, F.C. 1967a. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. Journal of Protozoology 14: 604-607.

- Schaumberg, D.A., Snow, K.K. & Dana, M.R. 1998. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand? *Cornea* 17: 3-10.
- Seal, D.V. 1995. *Acanthamoeba* keratitis: Experience from India. *Community Eye Health* 8(15): 3.
- Sharma, S., Garg, P. & Rao, G.N. 2000. Patient characteristics, diagnosis and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *British Journal of Ophthalmology* 84(10): 1103-1108.
- Singh, B.N. 1975. Pathogenic and non-pathogenic amoebae. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Stout, J.D. & Heal, O.W. 1967. Protozoa in soil biology. New York: Academic Press.
- Subba-Rao, N.S. 1977. Soil microorganisms and plant growth. New Delhi: Oxford and IHB Publishing Co.

Mohamed Kamel Abd. Ghani*
 Mimi Fazah
 Program Sains Bioperubatan,
 Fakulti Sains Kesihatan,
 Universiti Kebangsaan Malaysia,
 Jalan Raja Muda Abdul Aziz
 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

Anisah Nordin
 Yusof Suboh
 Noraina Abdul Rahim
 Jabatan Parasitologi dan Entomologi Perubatan,
 Fakulti Perubatan, PPUKM,
 Jalan Yaacob Latif,
 Bandar Tun Razak,
 56000 Batu 9 Cheras,
 Kuala Lumpur

Norazah Ahmad
 Institut Penyelidikan Perubatan,
 50588 Jalan Pahang,
 Kuala Lumpur, Malaysia

*Corresponding author: profkamel@ukm.edu.my