

# BULETIN FSK

Jilid Volume **2** Bilangan Number **1** ISSN 2250-1852 Julai July **2018**

- Peranan MicroRNAs dalam Pengawalaturan Proses Hematopoiesis 1 – 4  
*Ramya Dewi A/P Mathialagan & Zariyantey Abd Hamid*
- Pemencilan *Acanthamoeba* sp. daripada Persekitaran Akuatik 5 – 10  
*Mohamed Kamel Abd Ghani, Nurulhuda, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Abd Rahim & Norazah Ahmad*
- Qualitative Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Illicium verum* against Foodborne Pathogens 11 – 17  
*Hartini Yusof, Siti Nasuha Abd Hadi, Reena Leeba Richard, Mohamad Azlan Abd Majid, Zed Zakari Abdul Hami*
- The Impact of Salt Boiled and Acid Boiled Treatments on Allergenicity of Giant River Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) 18 – 24  
*Komathi Sockalingam, Rosmilah Misnan, Zailatul Hani Mohd Yadzir, Noormalin Abdullah & Faizal Bakhtiar*
- Penentuan Tahap Kemurungan, Kebimbangan dan Tekanan Dalam Kalangan Pegawai Sains dan Staf Pelaksana di Fakulti Sains Kesihatan Universiti Kebangsaan Malaysia Kuala Lumpur 25 – 37  
*Anuar Ithnin and Amirul Razak*
- Preliminary Study of Antimicrobial Potential of *Pandanus amaryllifolius* Leaves using Methanol Solvent Extract against Pathogenic Bacteria 38 – 44  
*Hartini Yusof, Fathin Nur'ezzah Hishamuddin, Reena Leeba Richard, Mohamad Azlan Abd Majid & Zed Zakari Abdul Hamid*
- Kehadiran *Acanthamoeba* Dalam Swab Nasal Individu Normal 45 – 50  
*Mohamed Kamel Abd. Ghani, Andry Dauni, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Abd Rahim & Norazah Ahmad*
- Kesan Variasi Diurnal Tekanan Intraokular ke atas Panjang Bola Mata pada Miopia 51 – 57  
*Norlaila Mat Daud & Nurhazimah Khir Johari*
- Kerintangan sista *Acanthamoeba* isolat persekitaran terhadap bendalir mukus ikan keli *Clarias batrachus* 58 – 62  
*Ahmad Zorin Sahalan, Asfarrieza Arsad, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Ab Rahim, Norazah Ahmad & Mohamed Kamel Abd Ghani*
- Pemencilan *Acanthamoeba* spp. daripada Persekitaran Tanah 63 – 68  
*Mohamed Kamel Abd Ghani, Mimi Fazah, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Abd Rahim & Norazah Ahmad*



**SIDANG EDITOR/ EDITORIAL BOARD**

**Penasihat**

SITI BALKIS BUDIN

**Ketua Editor / Editor-in-Chief**

MOHAMED KAMEL ABD GHANI

**Pembantu Ketua Editor / Assistant Editor-in-Chief**

AHMAD ZORIN SAHALAN

**Editor Jaringan / Web Editor**

MAZLYZAM ABD LATIFF

**Setiausaha Editorial / Editorial Secretary**

NURUL FARHANA JUFRI

RAHAIDA RAMLI

**Editor / Editors**

*Dietetik dan Nutrisi / Dietetic and Nutrition*

HASLINA ABD HAMID

*Kesihatan Persekitaran / Environmental Health*

HING HIANG LIAN

MUHAMMAD IKRAM ABD WAHAB

*Penjagaan Kesihatan / Healthcare*

BADRULZAMAN ABD HAMID

BASHIRA ISHAK

NOH AMIT

NOOR ALAUDIN ABD WAHAB

*Rehabilitasi / Rehabilitation*

NOORAFIFI RAZAOB@RAZAB

NOOR NAJWATUL AKMAL ABD RAHMAN

*Sains Forensik / Forensic Science*

KHAIRUL OSMAN

HUKIL SINO

*Sains Perubatan dan Diagnostik / Medical Science and Diagnostic*

MAZLYZAM ABD LATIFF

NURULFAHANA JUFRI

**Penasihat Antarabangsa / International Advisors**

BAY BOON HUAT, NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE, SINGAPORE

SUKUMAL CHONGTHAMMAKUN, MAHIDOL UNIVERSITY, THAILAND

WOJCIEH PAWLINA, MAYO CLINIC COLLEGE OF MEDICINE

SAMUEL TAY SAM WAH, NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE

**Jawatankuasa Editorial Teknikal / Technical Editorial board**

AZEEDA SHAMSUDIN

MAZLIN AMAN

DATU KHARNAIN DATU ZAINAL

## **Peranan MicroRNAs dalam Pengawalan Proses Hematopoiesis** (The Role of MicroRNAs in Regulating Haematopoiesis)

RAMYA DEWI A/P MATHIALAGAN, ZARIYANTEY ABD HAMID\*

### **ABSTRAK**

MicroRNAs (miRNAs) adalah jujukan RNAs bersaiz pendek yang terlibat dalam pengawalan transkripsi akhir dalam pelbagai proses biologi sel. Pengikatannya secara komplementari pada sasaran RNA pengutus boleh merangsang kemerosotan proses translasi dan degradasi molekul sasaran yang membawa kepada penurunan pengekspresan protein. Pengawalan translasi protein oleh miRNA adalah mekanisme pengawalan transkripsi akhir pengekspresan gen yang luas dan berevolusi. Oleh itu, sebahagian besar gen mamalia mungkin dikawal oleh miRNAs. Dalam sistem hematopoietik, kedua-dua pengawalan proses transkripsi dan transkripsi akhir pengekspresan gen menjamin kelancaran proses pembezaan dan keberfungsian sel stem, sel progenitor yang komited serta sel matang. MiRNAs telah dikaitkan pada semua peringkat haematopoiesis termasuklah untuk pengawalan aktiviti pembaharuan diri dan pembezaan sel-sel stem hematopoietik (HSCs) kepada sel hematopoietik berbeza keturunan. Dalam penulisan ini, peranan umum biogenesis miRNA dalam perkembangan sel-sel hematopoietik, serta fungsi-fungsi spesifik miRNAs tertentu dalam pengawalan haematopoiesis dibincangkan.

Kata kunci: MicroRNAs, Hematopoiesis

### **ABSTRACT**

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs involved in the posttranscriptional regulation of a wide range of biological processes. By binding to complementary sequences on targeted messenger RNAs, they trigger translational repression and degradation of the target, eventually resulting in reduced protein expression. MiRNA-dependent regulation of protein translation is a very widespread and evolutionarily conserved mechanism of posttranscriptional control of gene expression. Thus, a high proportion of mammalian genes are likely to be regulated by miRNAs. In the hematopoietic system, both transcriptional and posttranscriptional regulation of gene expression ensure proper differentiation and function of stem cells, committed progenitors as well as mature cells. MiRNAs have been implicated in all stages of haematopoiesis including for maintenance of self-renewal and differentiation activities of hematopoietic stem cells (HSCs) into hematopoietic lineages. In this review, the general role of miRNA biogenesis in the development of hematopoietic cells, as well as specific functions of individual miRNAs in regulation of haematopoiesis are discussed.

Keywords: MicroRNAs, Hematopoiesis, Lineage Commitment

### **PENGENALAN**

Hematopoiesis merupakan satu proses di mana sel stem hematopoietik (SSH) menghasilkan sel darah matang yang berfungsi dalam peredaran darah yang terdiri daripada eritrosit, trombosit, dan leukosit (Warr, Pietras, & Passegué, 2011). Proses hematopoiesis bermula dari pembahagian SSH

tidak simetri di mana mereka menghasilkan sel stem yang baru melalui proses pembaharuan diri dan juga proses pembezaan untuk menghasilkan sel progenitor bersifat multipotensi (*Multipotent progenitors*, MPP) (Seita & Weissman, 2010). Sel progenitor ini seterusnya akan melalui proses pembezaan untuk menghasilkan dua jenis progenitor berlainan keturunan iaitu progenitor

berketurunan mieloid dan limfoid (*common myeloid progenitor CMP/ common lymphoid progenitor, CLP*). CMP akan menjalani pembezaan sel untuk menghasilkan dua jenis progenitor iaitu progenitor megakariotik/eritroid (*megakaryocytes/erythroid progenitor, MEP*) dan progenitor mielomonositik (*myelomonocytic, GMP*) di mana kedua-dua progenitor ini masing-masing akan membentuk sel matang eritrosit/platlet dan granulosit/makrofaj. Manakala bagi CLP, pembezaannya akan menghasilkan sel progenitor jenis Pro-T, Pro-B, dan Pro-NK (*natural killer*) di mana ketiga-tiga jenis progenitor ini masing-masing dapat membeza kepada sel darah putih matang iaitu sel limfosit-T sel limfosit-B dan sel-NK (Boisset & Robin 2012).

#### **PERANAN MICRORNAs DALAM PROSES PEMBAHARUAN DAN PEMBEZAAN SEL STEM DAN PROGENITOR HEMATOPOIETIK**

Proses hematopoiesis secara umumnya dikawalatur melalui tindakbalas rangkaian genetik yang kompleks. Ini melibatkan pengawalaturan oleh rangkaian faktor transkripsi yang menentukan corak pengekspresan gen tertentu untuk setiap jenis sel (Huang, Cho, & Spangrude, 2007). Selain daripada penglibatan faktor transkripsi, terdapat beberapa kelompok microRNAs (miRNAs) yang juga di laporkan terlibat di dalam proses pengawalaturan hematopoiesis (O'Connell et al., 2010). MicroRNAs adalah jujukan RNAs bersaiz pendek yang tidak ditranslasikan kepada protein semasa pengawalaturan transkripsi akhir dalam proses biologi sel (Gulyaeva & Kushlinskiy, 2016). MiRNAs ini berupaya untuk mengikat secara komplementari pada sasaran RNA pengutus (*messenger RNA, mRNA*) yang terlibat dalam penghasilan protein, dan menyebabkan berlakunya kemerosotan fungsi mRNA dan penghasilan ekspresi protein yang sedikit. Pengawalaturan protein yang bergantung pada aktiviti miRNAs ini adalah antara mekanisme kawalan pengekspresan gen transkripsi akhir yang sangat meluas dan evolusional. Oleh itu, kajian mencadangkan bahawa miRNAs terlibat dalam mengawalatur pengekspresan gen bagi pelbagai proses biologi tubuh (O'Connell et al., 2010).

Dalam sistem hematopoietik, pengawalaturan genetik yang terlibat dalam proses pengekspresan gen dan transkripsi akhir adalah penting untuk memastikan pengekalan fungsi biologi sel stem dan progenitor bagi penghasilan sel darah matang dengan betul (Ardekani & Naeini, 2010). MiRNAs telah dikenalpasti terlibat dalam semua peringkat hematopoiesis termasuk dalam pengawalaturan keseimbangan di antara proses pembaharuan diri dan pembezaan SSH (O'Connell et al., 2010). Kumpulan miR-125 yang terdiri daripada miR-125a, miR-125b1 dan miR-125b2 dilaporkan memainkan peranan penting dalam pengawalaturan keseimbangan fungsi biologi sel hematopoietik pada peringkat yang paling primitif. Pengekspresan kumpulan miR-125 adalah tinggi pada populasi sel SSH dan sel progenitor hematopoietik (SPH) dan tahap pengekspresannya didapati menurun pada populasi sel yang matang (Gerrits et al., 2012). Peningkatan pengekspresan gen pada SPH yang dikawal oleh kelompok miRNAs ini adalah penting bagi merangsang proses proliferasi dan pembezaan sel. Selain miR-125, kajian juga menunjukkan bahawa pengekspresan kelompok miR-196 juga tinggi pada populasi sel SSH dan SPH. miR-196 pula didapati memainkan peranan penting dalam pengawalaturan proses hematopoiesis di mana ia diekspres bersama dengan gen HOX iaitu gen yang memainkan peranan penting dalam pengawalaturan proses pembaharuan diri dan pembezaan SSH (Yekta, 2004). Kelompok miR-196 berfungsi dalam mengekalkan SSH dalam fasa tidak membeza dengan merangsang transkripsi gen yang terlibat dalam proses proliferasi sel dan pada masa yang sama merencat ekspresi gen yang merangsang pembezaannya.

#### **PERANAN MICRORNAs DALAM PROSES HEMATOPOIESIS MELIBATKAN SEL BERLAINAN KETURUNAN**

Kajian menunjukkan bahawa pengawalaturan proses hematopoiesis bagi sel berlainan keturunan melibatkan kelompok miRNAs yang berbeza bagi setiap keturunan sel. Bagi pengawalaturan proses eritropoiesis, antara miRNAs yang terlibat ialah miR-15a, mir-24, miR-144 dan miR-451 (Wang et

al., 2014). Pembezaan eritroid memerlukan penindasan pengekspresan pembaharuan diri oleh SPH. Oleh itu, kebanyakan miRNA yang terlibat dalam regulasi sel eritroid biasanya menyasarkan gen yang terlibat dalam pembezaan keturunan mieloid seperti GATA-1 dan GATA-2, yang dikawal oleh miRNA-24, miR-27a dan miR-451. Manakala, dalam proses megakariopoiesis, miR-150 memainkan peranan penting dimana miRNA ini menyasarkan gen *c-myb* yang terlibat dalam regulasi faktor transkripsi seperti *Kruppel Like Factor* (Klf1) dan *Lmo2* yang menggalakkan eritropoiesis (Lorenzo et al., 2011). Semasa granulopoiesis, miR-223 pula bertindak dalam tapakjalan negatif berperingkat dengan menyahaktifkan faktor transkripsi erythroid NFI-A di peringkat RNA (Starnes et al., 2009). Mir-150 juga diekspreskan dalam sel B dan T matang. Namun demikian, penyekatan pembezaan sel B pada peringkat sel pro-B berlaku sekiranya miR-150 diaktifkan pengekspresannya pada tahap SPH (Zhou, Wang, Mayr, Bartel, & Lodish, 2007). Ini menunjukkan peranan miRNA tertentu dalam pengawalaturan hematopoiesis adalah berbeza mengikut masa dan jenis keturunan. Pengekspresan miR-150 boleh menggalakkan pembezaan sel T bukan sahaja melalui tapak jalan Notch, namun dengan penyekatan pembezaan keturunan yang lain seperti pembezaan sel B dalam sel-sel progenitor (Ghisi et al., 2011).

### KESIMPULAN

Kesimpulannya, miRNA memainkan peranan yang spesifik dalam setiap peringkat pengawalaturan hematopoiesis yang bermula dari sel stem yang bersifat primitif sehinggalah ke peringkat pembezaan sel-sel progenitor. Kajian terdahulu menunjukkan bahawa ketaknormalan miRNA boleh mengganggu keseimbangan proses hematopoiesis secara signifikan dan seterusnya berupaya merangsang pelbagai ketaknormalan hematologi seperti leukemia. Oleh itu, penelitian lebih lanjut terhadap peranan miRNA dengan pengawalaturan proses hematopoiesis adalah penting bagi pemahaman mekanisme ketaknormalan hematologi yang melibatkan kecelaruan proses hematopoiesis bagi tujuan perubahan.

### PENGHARGAAN

Pengarang ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada  geran  penyelidikan FRGS/1/2016/SKK13/UKM/03/1  yang membiayai projek ini.

### RUJUKAN

- Ardekini, A.M. & Naeini, M.M. 2010. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna Journal Medical Biotech* 2(4): 161-179.
- Boisset, J. C. & Robin, C. 2012. On the origin of hematopoietic stem cells: Progress and controversy. *Stem Cell Research*.
- Gerrits, A., Walasek, M. A., Olthof, S., Weersing, E., Ritsema, M., Zwart, E. & De Haan, G. 2012. Genetic screen identifies microRNA cluster 99b/let-7e/125a as a regulator of primitive hematopoietic cells. *Blood* 119(2): 377-387.u
- Ghisi, M., Corradin, A., Basso, K., Frasson, C., Serafin, V., Mukherjee, S. & Zanovello, P. 2011. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: Targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood* 117(26): 7053-7062.
- Gulyaeva, L. F. & Kushlinskiy, N. E. 2016. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of Translational Medicine* 14(1): 143.
- Huang, X., Cho, S. & Spangrude, G. J. 2007. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ* 14(11): 1851-1859.
- Lorenzo, P. I., Brendeford, E. M., Gilfillan, S., Gavrillov, A. A., Leedsak, M., Razin, S. V. & Gabrielsen, O. S. 2011. Identification of c-Myb target Genes in K562 cells reveals a role for c-Myb as a master regulator. *Genes & Cancer* 2(8): 805-17.
- O'Connell, R. M., Chaudhuri, A. A., Rao, D. S., Gibson, W. S. J., Balazs, A. B. & Baltimore, D. 2010. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(32): 14235-14240.
- Seita, J. & Weissman, I. L. 2010. Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 14(7): 80-85
- Starnes, L. M., Sorrentino, A., Pelosi, E., Ballarino, M., Morsilli, O., Biffoni, M. & Peschle, C. 2009. NFI-A directs the fate of hematopoietic

- progenitors to the erythroid or granulocytic lineage and controls  $\beta$ -globin and G-CSF receptor expression. *Blood* 114(9): 1753–1763.
- Wang, F., Zhu, Y., Guo, L., Dong, L., Liu, H., Yin, H. & Yu, J. 2014. A regulatory circuit comprising GATA1/2 switch and microRNA-27a/24 promotes erythropoiesis. *Nucleic Acids Research* 42(1): 442–457.
- Warr, M. R., Pietras, E. M. & Passegué, E. 2011. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 10(8): 708–710
- Yekta, S. 2004. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304(5670): 594–596.
- Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D. P. & Lodish, H. F. 2007. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(17): 7080–7085.

Ramya Dewi a/p Mathialagan  
Zariyantey Abd Hamid\*  
Biomedical Science Programme,  
Centre of Health and Applied Sciences,  
Faculty of Health Sciences, Universiti  
Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul  
Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

\*Corresponding author: zyantey@ukm.edu.my

**Pemencilan *Acanthamoeba* sp. daripada Persekitaran Akuatik**  
(Isolation of *Acanthamoeba* sp. from Aquatic Environment)

MOHAMED KAMEL ABD GHANI\*, NURULHUDA, ANISAH NORDIN, YUSOF SUBOH,  
NORAINA ABD RAHIM & NORAZAH AHMAD

**ABSTRAK**

*Acanthamoeba* sp. merupakan sejenis ameba hidup bebas yang boleh menyebabkan keratitis dan infeksi sistem saraf pusat. Ia telah ditemui dari pelbagai persekitaran khasnya persekitaran akuatik, tanah dan debu di udara. Di Malaysia kajian *Acanthamoeba* di persekitaran masih lagi kurang. Kajian ini dijalankan untuk memencilkan *Acanthamoeba* sp. daripada persekitaran akuatik. Sebanyak 80 sampel air telah diambil terdiri daripada air laut (20), air tasik (30), dan air sungai (30). Sebanyak 500 ml sampel air setiap satu daripada laut, tasik dan sungai dimasukkan ke dalam botol Schott yang steril. Kesemua sampel dituras menggunakan membran turas dengan liang bersaiz 5 µm. Sedimen yang diperolehi diletakkan di atas agar bukan nutrien yang telah dititiskan dengan *Escherichia coli* matian haba. Plat kemudian dieram pada suhu 30°C dan diperiksa setiap hari di bawah mikroskop songsang selama 14 hari untuk melihat jika ada sebarang pertumbuhan *Acanthamoeba* sp. Secara keseluruhannya, hampir 42.5% (34/80) daripada keseluruhan sampel menunjukkan kehadiran *Acanthamoeba*. Bagi sampel air tasik sebanyak 53.3% memberikan kultur positif, diikuti dengan sampel air laut (50%) dan air sungai (26.6%). Hasil penemuan ini menunjukkan pelbagai jenis persekitaran akuatik berupaya menyediakan habitat untuk organisma ini membiak. Penemuan organisma ini daripada persekitaran akuatik menjadi peringatan berguna tentang potensi jangkitan yang boleh disebabkan olehnya.

Kata kunci: Pemencilan; *Acanthamoeba*; persekitaran akuatik; Malaysia

**ABSTRACT**

*Acanthamoeba* sp. is a free-living amoeba that can cause keratitis and infection of the central nervous system. It has been isolated from various environment especially the aquatic environment, soil and dust in the air. However, research on *Acanthamoeba* in the Malaysian environment is still very limited. This study was carried out to isolate *Acanthamoeba* sp. from various aquatic environments. A total of 80 water samples were collected from the sea (20), lakes (30) and rivers (30). 500 mls of water samples each from sea, lakes and rivers were collected into sterilised Schott bottle. All samples were filtered through a membrane filter of 5 µm pore size. Heat-killed *Escherichia coli* as nutrient source was overlaid onto the surface of non-nutrient agar (NNA). The plates were incubated at 30°C and examined daily using inverted microscope for 14 days for growth of *Acanthamoeba* sp. Approximately 42.5% (34/80) of total collected samples showed positive culture for *Acanthamoeba*. In lake samples, 53.3% were positive for *Acanthamoeba* followed by seawater (50%) and river samples (26.6%). These findings indicate that the various aquatic environment have the potential to provide a niche for *Acanthamoeba* to thrive. The presence of these organisms in various aquatic environment should alert us on their potential infection risk.

Key words: Isolation; *Acanthamoeba*; Aquatic environment; Malaysia



## PENGENALAN

Persekitaran akuatik telah menjadi habitat bagi pelbagai jenis mikroorganisma samaada yang patogenik mahupun yang tidak. Ia juga menjadi habitat sesuai bagi ameba hidup bebas seperti *Acanthamoeba sp.* yang tersebar luas di persekitaran termasuk air, udara dan tanah. Kepentingan perubatan *Acanthamoeba* terserlah kerana ia boleh menyebabkan jangkitan mata yang dipanggil keratitis yang boleh menyebabkan kebutaan. Disamping itu ia juga boleh menyebabkan jangkitan pada otak yang boleh membawa maut. Organisma ini hadir di persekitaran dan tisu manusia dalam 2 peringkat hidup iaitu peringkat sista yang sangat rintang terhadap keadaan persekitaran dan peringkat trofozoit yang mampu berensistasi dalam keadaan persekitaran yang tidak sesuai untuk ia terus bermandiri (Ma et al. 1990).

Keratitis *Acanthamoeba* biasanya berlaku dalam kalangan pengguna kanta sentuh dan penggunaan kanta sentuh dianggap sebagai salah satu faktor risiko yang utama. Ameba ini boleh hidup dalam peralatan kanta sentuh seperti bekas simpanan dan larutan kanta sentuh. Ia juga telah ditemui dalam air paip (Mohamed Kamel et al. 2017; Seal et al. 1992) yang kadangkala digunakan untuk membasuh kanta sentuh oleh pengguna yang kurang prihatin. Sumber kontaminasi boleh diperolehi daripada persekitaran apabila pengguna membasuh kanta sentuh dengan air paip atau salin pencuci yang tidak steril atau pemakaian kanta sentuh semasa mandi atau berenang (Kilvington & White 1994; Schaumberg et al. 1998). Selain daripada penggunaan kanta sentuh, keratitis *Acanthamoeba* juga berasosiasi dengan insidens trauma pada mata atau pendedahan mata kepada air terkontaminasi. Di India, kebanyakan kes keratitis *Acanthamoeba* melibatkan golongan petani yang mendapat jangkitan semasa bekerja (Sharma et al. 2000), sebagai contoh akibat percikan tanah ataupun air lumpur yang terkontaminasi kepada mata.

Namun, bilangan kes keratitis yang semakin meningkat di seluruh dunia dan juga di Malaysia (Kamel et al. 2005; Mohamed Kamel et al. 2000) memerlukan penyelidikan menyasiat lebih lanjut persekitaran akuatik yang berkemungkinan menjadi sumber penyebaran organisma ini. Tambahan pula, laporan mengenai kehadiran

ameba hidup bebas ini di persekitaran akuatik 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 beberapa persekitaran akuatik seperti air laut, tasik dan sungai.

## BAHAN DAN KAEDAH

### Pemilihan dan kaedah pengambilan sampel

Persampelan air laut dilakukan di dua lokasi yang berbeza iaitu di Morib dan Mersing. Sebanyak 10 sampel diambil daripada setiap lokasi dengan menggunakan botol Schott 500 ml. Berdasarkan pemerhatian yang dilakukan, pantai Morib boleh dikategorikan sebagai pantai tercemar manakala pantai Mersing masih dilindungi dan kurang tercemar. Sampel diambil pada kawasan permukaan air yang berbeza. Lapisan teratas permukaan air terdiri daripada 'microlayer' yang merupakan kawasan yang padat dengan ameba ini.

Sampel air diambil daripada 3 batang sungai (Sungai Ulu Yam, Sungai Bukit Belacan dan Sungai Gabai) dan 3 buah tasik (Tasik Titiwangsa, Tasik Bangi dan Tasik Perdana). Sebanyak 10 sampel air diambil daripada setiap sungai dan tasik. Sampel dimasukkan ke dalam botol Schott 500 ml. Bagi sampel air sungai, sampel diambil daripada bahagian permukaan air pada kawasan berbeza. Manakala bagi sampel air tasik, sampel diambil di kawasan persisiran tasik kerana kawasan ini menjadi tempat pempendapan bahan organik.

### Pemprosesan sampel

Teknik pemprosesan yang digunakan adalah mengikut kaedah oleh Gradus et al. 1989. Sebanyak 500 ml air yang diambil dituras dengan menggunakan pam vakum. Membran turas selulos nitrat bersaiz liang 5um diletakkan di atas set penuras sebelum proses penurasan dijalankan. Apabila proses penurasan selesai, membran turas dipindahkan daripada set penuras. Kemudian, membran tersebut diletakkan secara terbalik di atas plat agar bukan nutrien yang mengandungi *E. coli* matian haba dan dieram pada suhu 30°C. Sampel kemudian diperiksa di bawah mikroskop songsang selama 14 hari sebelum sampel tersebut disahkan negatif.

### **Kaedah identifikasi *Acanthamoeba***

Bagi peringkat trofozoit, pergerakan ameba di atas agar membentuk tapak laluan beralun dengan garis halus. Saiz trofozoit berukuran di antara 15-45 um. Terdapat kehadiran akantopodia yang mempunyai struktur halus pada permukaan ameba dan vakuol kontraktil yang mengecut setiap 30-60 saat. Pergerakannya perlahan dan terdapat kehadiran nukleus dengan kariosom yang besar.

Bagi peringkat sista, terdapat 2 lapisan dinding iaitu lapisan luar, ektosista dan lapisan dalam, endosista. Ektosista berkedut dan endosista berbentuk bintang, empat atau tiga segi ataupun bulat. Saiz sista adalah di antara 10-25 um.

## **HASIL**

### **Hasil pemencilan *Acanthamoeba sp.***

Sebanyak 34 daripada 80 (42.5%) sampel menunjukkan hasil positif kehadiran *Acanthamoeba sp.* Bilangan sampel positif daripada setiap lokasi yang diambil ditunjukkan dalam Jadual 1. Bagi air laut, sampel daripada Morib menunjukkan peratusan pencilan tertinggi sebanyak 90%. Bagi sampel air tasik pula, Tasik Titiwangsa menunjukkan pencilan tertinggi sebanyak 70% manakala untuk sampel air sungai, Sungai Gabai mencatat peratusan tertinggi sebanyak 40%. Jadual 2. menunjukkan peratusan sampel yang positif mengikut jenis sampel. *Acanthamoeba sp.* paling banyak dipencilkan daripada sampel air tasik dengan peratusan sebanyak 53.3% diikuti dengan air laut 50% dan air sungai 26.6%.

### **Hasil pengkulturan kawalan positif dan kawalan negatif**

Pertumbuhan *Acanthamoeba sp.* berlaku pada kesemua plat kawalan positif. Manakala bagi plat kawalan negatif, tiada sebarang pertumbuhan yang berlaku. Hasil ujian ini ditunjukkan dalam Jadual 3.

## **PERBINCANGAN**

Kehadiran ameba ini di persekitaran akuatik bergantung kepada pelbagai faktor seperti struktur dan fisiologi organisma terabit, keadaan cuaca dan tahap pencemaran persekitaran. Namun begitu, setakat ini tiada bukti kukuh yang menyatakan hubungan di antara pengaruh alam sekitar atau bahan kimia dan kehadiran ameba di persekitaran akuatik (Rivera et al. 1991).

Berdasarkan hasil kajian ini, prevalens *Acanthamoeba sp.* daripada sampel air tasik menunjukkan peratusan tertinggi iaitu 53.3%. Mengikut kajian yang dijalankan oleh John dan Howard (1996), ameba ini ditemui tersebar meluas di persisiran tasik. Fakta ini turut disokong oleh kajian terdahulu yang dijalankan oleh Kyle dan Noblet (1985) yang menyatakan *Acanthamoeba sp.* paling banyak ditemui di kawasan yang padat dengan bahan partikulat yang biasanya banyak terdapat di persisiran tasik. Fakta ini mengukuhkan hasil yang diperolehi dalam kajian ini kerana persampelan air tasik dibuat di sekitar persisiran tasik.

Selain itu, populasi *Acanthamoeba sp.* di dalam tasik berkait rapat dengan kandungan bahan kimia yang terlarut dalam air tasik (Kyle & Noblet 1987; Kyle & Noblet 1986). Walaubagaimanapun, satu kajian yang lain menyatakan kehadiran *Acanthamoeba sp.* di dalam air tasik tidak dipengaruhi oleh faktor suhu air tasik tersebut (O'Dell 1979).

Prevalens *Acanthamoeba sp.* daripada sampel air laut dalam kajian ini adalah 50%. Dalam kajian ini, persampelan air laut dilakukan pada kawasan permukaan air. Pada permukaan air laut terdapat kawasan 'microlayer' yang melapisi lapisan teratas permukaan air laut (Davies et al. 1978). Kawasan 'microlayer' yang lebih tercemar mengandungi banyak bakteria yang menjadi sumber makanan bagi ameba ini (Sawyer et al. 1982). Kajian yang dijalankan oleh Kyle dan Noblet (1985), mendapati *Acanthamoeba sp.* banyak ditemui di kawasan yang padat dengan partikel yang terdapat pada permukaan air laut.

Kehadiran *Acanthamoeba sp.* dalam air sungai pernah dilaporkan dalam kajian terdahulu (Visvesvera & Stehr-Green 1990). Oleh itu, kehadiran ameba ini dalam sampel air sungai yang dikaji tidak mengejutkan kerana ia telah berjaya dipencilkan dalam kajian sebelum ini.

JADUAL 1. Pemencilan *Acanthamoeba sp.* daripada sampel persekitaran akuatik.

Jenis sampel	Bilangan sampel yang positif <i>Acanthamoeba sp.</i> / jumlah keseluruhan sampel yang diuji
1. Air Laut	
Morib	9/10 (90%)
Mersing	1/10 (10%)
2. Air Tasik	
Tasik Titiwangsa	7/10 (70%)
Tasik Bangi	4/10 (40%)
Tasik Perdana	5/10 (50%)
3. Air Sungai	
Ulu Yam	1/10 (10%)
Bukit Belacan	3/10 (30%)
Sungai Gabai	4/10 (40%)

JADUAL 2. Peratus sampel yang positif mengikut jenis sampel

Jenis sampel	Bilangan sampel yang positif/ jumlah keseluruhan sampel	Peratus sampel yang positif (%)
Air Laut	10/20	50
Air Tasik	16/30	53.3
Air Sungai	8/30	26.6

JADUAL 3. Hasil pengkulturan sampel kawalan positif dan kawalan negatif

	Sampel kajian	Sampel kawalan positif	Sampel kawalan negatif
Kultur positif	34	17	0
Kultur negatif	46	0	17
Jumlah keseluruhan	80	17	17

Dalam kajian ini, sebanyak 26.6% *Acanthamoeba* telah berjaya dipencilkan daripada sampel air sungai. Peratusan ini kurang berbanding peratusan yang dicatatkan bagi sampel air tasik dan laut. Ini mungkin disebabkan aliran air sungai yang mengalir secara konsisten menyusuri sepanjang sungai. Oleh itu, ameba ini turut dialirkan bersama air sungai untuk menuju ke tempat takungan utama iaitu di laut.

Tiada sebarang pertumbuhan pada plat kawalan negatif sebaliknya ia hadir dalam kesemua plat kultur kawalan positif. Ini menunjukkan tiada sebarang kontaminasi berlaku daripada persekitaran sepanjang proses pengkulturan dijalankan.

Teknik penurasan digunakan dalam kajian ini untuk memerangkap *Acanthamoeba sp.* yang mungkin hadir di dalam sampel. Teknik ini adalah teknik yang biasa digunakan untuk memencilkan *Acanthamoeba sp.* daripada persekitaran akuatik (Gradus et al. 1989).

Membran turas digunakan untuk memerangkap *Acanthamoeba sp.* yang mungkin hadir. Membran turas yang biasa digunakan dalam kajian mikrobiologi ialah selulos. Ia dipilih kerana mempunyai ciri-ciri seperti hidrofilik, boleh diautoklaf dan berpotensi dalam pelekatan organisma tertentu. Ciri hidrofilik perlu diambil kira dalam kajian mikrobiologi air. Ia berupaya mengikat protein dengan kapasiti 150 µg/cm<sup>2</sup>, secara tidak langsung ia berpotensi melekatkan organisma yang dikehendaki.

Dalam kajian yang dijalankan oleh Gradus et al. (1989), membran turas daripada jenis selulos nitrat dengan liang bersaiz 0.22 µm digunakan untuk diagnosis *Acanthamoeba sp.* Walaubagaimanapun, dalam kajian ini, membran turas jenis selulos nitrat dengan saiz liang 5 µm digunakan. Ini kerana membran turas bersaiz 0.22 µm menyebabkan pengumpulan banyak debris dan bendasing yang tidak dikehendaki yang boleh mengganggu proses penurasan.

Dalam kajian ini, teknik yang digunakan untuk mendiagnos *Acanthamoeba* adalah teknik pengkulturan. Pengkulturan adalah kaedah yang paling sensitif untuk melihat kehadiran ameba ini (Walker 1996). Media kultur yang digunakan untuk mengkulturkan *Acanthamoeba sp.* ialah agar bukan nutrien. Ia merupakan media selektif yang

digunakan untuk diagnosis *Acanthamoeba sp.* (Page 1967).

Ameba ini telah dibuktikan wujud di persekitaran akuatik dalam kajian yang dilakukan di luar negara. Keputusan yang diperolehi melalui kajian ini menunjukkan *Acanthamoeba sp.* memang wujud di persekitaran akuatik di Malaysia.

## KESIMPULAN

Kajian pemencilan *Acanthamoeba sp.* daripada persekitaran akuatik yang dipilih telah berjaya membuktikan kehadirannya. Daripada 80 sampel yang diambil daripada pelbagai jenis persekitaran akuatik, 34 (42.5%) daripadanya menunjukkan hasil yang positif. Hasil kajian ini mendapati *Acanthamoeba sp.* hadir di dalam air tasik dengan peratusan tertinggi diikuti dengan air laut dan air sungai. Sementara itu, kehadiran organisma ini di dalam beberapa jenis persekitaran akuatik yang diuji, seharusnya menjadi peringatan tentang potensi jangkitan yang boleh disebabkan olehnya.

## RUJUKAN

- Davies, P.G., Caron, D.A. & Sieburth, J.M.N. 1978. Oceanic amoebae from the North Atlantic: Culture, distribution and taxonomy. *Transactions of the American Microscopy Society* 97: 73-88.
- Gradus, M.S., Koenig, S.B., Hyndiuk, R.A. & Decarlo, J. 1989. Filter culture technique using amoeba saline transport medium for the noninvasive diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *American Journal of Clinical Pathology* 92: 682-685.
- John, D.T. & Howard, M.J. 1996. Isolation of thermotolerant free living amebae from Lake Tenkiller, Oklahoma. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 76: 1-4.
- Kamel AGM, 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.
- Kilvington, S. & White, D.G. 1994. *Acanthamoeba*: biology, ecology and human disease. *Reviews in Medical Microbiology* 5(1): 12-20.

- Kyle, D.E. & Noblet, G.P. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *Journal of Protozoology* 32: 99-105.
- Kyle, D.E. & Noblet, G.P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *Journal of Protozoology* 33: 422-434.
- Kyle, D.E. & Noblet, G.P. 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *Journal of Protozoology* 34: 10-15.
- Ma, P., Visvesvera, G.S., Martinez, A.J., Theodore, F.H., Daggett, P.M. & Sawyer, T.K. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: Review. *Reviews of Infectious Diseases* 12(3): 490-510.
- 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.
- Mohamed Kamel, A.G., Nurulhuda S., Anisah, N., Yusof S., Noraina AR. & Norazah, A. 2017. Isolation of *Acanthamoeba* spp. from domestic water tap. *Buletin FSK* 1(1): 89-94.
- O'Dell, W.D. 1979. Isolation, enumeration and identification of amoeba from Nebraska Lake. *Journal of Protozoology* 26(2): 265-269.
- Page, F.C. 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *Journal of Protozoology* 14: 709-724.
- Rivera, F., Lares, F., Ramirez, E., Bonilla, S., Labastida, A., Ortiz, R. & Hernandez, D. 1991. Pathogenic *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in Mexico. *Reviews of Infectious Disease* 13(5): S388-S389
- Sawyer, T.K., Lewis, E.J., Galasso, M., Lear, D.W., O' Malley, M.L., Adams, W.N. & Gaines, J. 1982. Pathogenic amoebae in ocean sediments near waste water sludge disposal sites. *Journal of Water Pollution Control Federation* 54: 1318-1323.
- Schaumberg, A.D., Snow, K.K. & Dana, M.R. 1998. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: Where do we stand. *Cornea* 17(1): 3-10.
- Seal, D.V., Stapleton, F. & Dart, J. 1992. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp. in contact lens wearers. *British Journal of Ophthalmol* 76:424-427.
- Sharma, S., Garg, P. and Rao, G.N. (2000). Patients characteristics, diagnosis, and treatment of noncontact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *British Journal of Ophthalmol.* 84:10:1103-8.
- Visvesvera, G.S. & Stehr-Green, J.K. 1990. Epidemiology of free living ameba infections. *Journal of Protozoology* 37(4): 25S-33S.
- Walker, C.W.B. 1996. *Acanthamoeba*: ecology, pathogenecity and laboratory detection. *British Journal of Biomedical Science* 53: 146-151.
- Mohamed Kamel Abd Ghani\*  
Nurulhuda  
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: profkamel@ukm.edu.my

## Qualitative Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Illicium Verum* Against Foodborne Pathogens

HARTINI YUSOF, SITI NASUHA ABD HADI, REENA LEEBA RICHARD, MOHAMAD AZLAN ABD MAJID, ZED ZAKARI ABDUL HAMID\*

### ABSTRACT

The occurrence of food-borne diseases caused by pathogenic microorganisms led to a public concern on food safety. Moreover, chemical preservatives that are known to be toxic are widely contained (used) in food (industry) while synthetic antibiotics that are used to treat these diseases might cause side effects to the consumers. Due to the potential human health risks, antimicrobial drugs derived from organic products (i.e. herbs and spices) can be an alternative source for modern medicine. The aim of this study was to evaluate antimicrobial activity of *Illicium verum* (star anise) extract against foodborne pathogens and investigate phytochemical compounds found from the spices. Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) by disc diffusion method, determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using broth microdilution method and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) via sub-cultivation in well suspension onto Tryptic Soy Agar media were performed in this study. The largest diameter zone of inhibition was shown by *S. aureus* and *E. coli* followed by *S. typhimurium* and *B. cereus*. In addition, the phytochemical compounds were screened and results revealed that glycosides, phenols, alkaloids, tannins and terpenoids were found present in the extract. In conclusion, the methanolic extract of *Illicium verum* contained antimicrobial activity against selective food-borne pathogens, hence, considered to be an alternative for food preservative.

**Keywords:** *Illicium verum*, antimicrobial activity, pathogenic bacteria, food-borne diseases, phytochemical compound

### ABSTRAK

Penyakit bawaan makanan yang berlaku disebabkan oleh mikroorganisma patogenik membawa kepada kebimbangan orang ramai terhadap keselamatan makanan. Selain itu, bahan pengawet kimia yang toksik juga banyak digunakan secara meluas di dalam makanan manakala antibiotik sintetik yang digunakan untuk merawat penyakit tersebut boleh menyebabkan kesan sampingan kepada para pengguna. Oleh kerana potensi risiko kesihatan terhadap manusia, ubat-ubatan antimikrobial yang diperolehi daripada produk organik (iaitu herba dan rempah) boleh menjadi sumber alternatif kepada perubatan moden. Tujuan kajian ini adalah untuk menilai aktiviti antimikrobial bagi ekstrak *Illicium verum* (bunga lawang) terhadap patogen bawaan makanan dan mengenalpasti sebatian fitokimia yang didapati daripada rempah tersebut. 'Antimicrobial Susceptibility Testing' (AST) dengan kaedah 'disc diffusion', 'Minimum Inhibitory Concentration' (MIC) menggunakan kaedah 'microdilution' dan 'Minimum Bactericidal Concentration' (MBC) melalui pengkulturan dalam media 'Tryptic Soy Agar' telah dijalankan dalam kajian ini. Zon diameter terbesar telah ditunjukkan oleh *S. aureus* dan *E. coli* diikuti oleh *S. typhimurium* dan *B. cereus*. Di samping itu, sebatian fitokimia daripada ekstrak tersebut telah disaring dan didapati mengandungi glikosida, fenol, alkaloid, tanin dan terpenoid. Kesimpulannya, ekstrak metanol bunga lawang mengandungi aktiviti antimikrob terhadap patogen bawaan makanan yang terpilih, dan berpotensi sebagai alternatif sebagai pengawet makanan.

**Kata kunci:** *Illicium verum*, aktiviti antimikrobial, bakteria patogenik, penyakit bawaan makanan, sebatian fitokimia

## INTRODUCTION

Globally, foodborne outbreak is still an ongoing issue and considered a public health threat that resulted in social and economic problems (Wilcock et al. 2004; Jeyaletchumi et al. 2010; WHO 2015). The method of transmission or infection of foodborne diseases is either due to the ingestion of bacteria, viruses or parasites or consumption of non-infectious agents like toxin and chemicals (Linscott 2011).

Moreover, diarrhoea, the most known symptom of foodborne diseases, had affected 1 in every 10 people each year with African and South-East Asia regions revealed the highest burden of foodborne cases (WHO 2015). In Malaysia alone, approximately 50% of foodborne cases resulted due to unhygienic food handlers (Sharifa Ezat 2013; Abdul-Mutalib et al. 2015). *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* are some of the common agents of foodborne outbreaks (Pires et al. 2012). To make matters worse, these pathogens does not emit foul odour or food spoilage characteristics (New et al. 2017) resulting in difficulties to observe or sense that food may not be suitable to be consumed.

Numerous efforts that involved the physical and chemical approaches, had been carried out to control the increasing rate of foodborne pathogen (Sibi et al. 2013) ranging from changing of temperature, pH, osmotic pressure, usage of weak organic acids, hydrogen peroxide and organic biomolecules (Ray 1996; Brull & Coote 1999). Meanwhile, chemical preservatives that includes the usage of monosodium glutamate (MSG), aspartame, saccharin and nitrates are widely used as food additives to produce desirable effects (Chaudhary 2010). However, prolonged consumption of these synthetic materials can cause adverse effects such as childhood hyperactivity (Tuormaa 1994) and other behavioural disorders as well as eczema (Gultekin et al. 2013). Another alarming concern centered on the rising of antibiotic resistance of several pathogens associated with foodborne disease (White et al. 2002; Walsh & Fanning 2008; DeWaal & Grooters 2013). Hence, many had resorted to natural-based approach for food safety, especially spices. Spices had become a very important commodity in each household. However, limited findings available on

highlighting the antimicrobial activity of spices (Arora & Kaur, 1999; Ceylan & Fung, 2004; de Souza et al. 2005).

One of the most known spices, star anise is not only a common choice but it also contained health benefits. Star anise or scientifically known as *Illicium verum* Hook. f., is commonly used star-shaped spice that produced the scent of anise (Parthasarathy et al., 2008). Star anise is classified as family *Illiciaceae*, order *Austrobaileyales*, subclass *Magnoliidae*, class *Magnoliopsida* and division *Magnoliophyta* (Wang et al. 2011). Although star anise is commonly grown in Asian countries, its usage is not limited within the region but had yet disseminated worldwide. In China, star anise is one of the essential spices in the five-spice powders used in Chinese cooking and act as flavour enhancer in Chinese stew whilst in Europe countries, the spice was first introduced in the seventeenth century (Wang et al., 2011). From then onwards, the usage of star anise had broaden until it is today – used in confectionary industries and added as flavours to liquors (Parthasarathy et al., 2008).

The aim of this study is to investigate whether the methanol extract of *Illicium verum* had the antimicrobial activities to selected foodborne pathogens that commonly caused foodborne diseases. Furthermore, this study would also provide the information regarding the phytochemical constituents or secondary metabolites present in *Illicium verum* that may contribute to its antimicrobial properties. In addition, preliminary phytochemical screening test was also performed in order to qualitatively screen the presence of compounds and associate their presence with antimicrobial activity.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample preparation

One kg of *Illicium verum* (star anise) was bought and grinded into fine powder by a grinding machine or blender. The powdered form of star anise was kept in airtight container and stored in dry place until further use.

### Extraction method

The extraction method was carried out based on a study by Vijayakumar et al. (2012) with slight

modification. 250 g of star anise powder was weighed with analytical balance and soaked in 1 L of methanol for 72 hrs with intermittent shaking. Then, the solution was filtered into a Schott bottle by using Whatmann No. 1 filter paper. The filtrate was concentrated under reduced pressure by using rotary vacuum evaporator at 40°C. The crude extract obtained was stored in a sealed, sterile container at 4°C until use.

#### **Bacterial strains and antibiotics**

There are four types of bacterial strains that were used, namely *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) with antibiotics consisted of Tetracycline (30 µg), Gentamicin (10 µg), Streptomycin (10 µg) and Ampicillin (10 µg), respectively. The bacterial stocks were obtained from Microbiology Laboratory, Centre of Medical Laboratory Technology, Faculty of Health Sciences, UiTM Puncak Alam Campus, Selangor. Each bacterial suspension was prepared by inoculating 5 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) with three to five colonies of bacteria obtained from Blood Agar plate prior to incubation at 37°C for 2 to 3 hrs. The turbidity of the suspension was adjusted equivalent to 0.5 MacFarland standards (Cavalieri 2009). Meanwhile, the confirmation tests of these organisms were performed for each organism that include sub-culturing on different agar medium (i.e. Blood Agar, Nutrient Agar, Mueller Hinton Agar).

#### **Antibiotic susceptibility testing (AST) test**

The *Illicium verum* crude extract was prepared by transferring 20 µL of 250 mg/mL onto sterile filter paper discs prior to dry at room temperature for 24 hrs. Positive control was carried out using standard antibiotics as mentioned above (Cockerill 2012; Vijayakumar et al. 2012) while for negative control, 10 µL of 10% DMSO was placed onto a filter paper disc. Then, three to five colonies of organism were selected from nutrient agar and suspended into Tryptic Soy Broth (TSB) as stated by Cavalieri (2009). Interpretation of sensitivity or resistance of the inhibition zones was determined by the measurement of diameter. The experiment was performed three times to confirm the reproducible results and the mean±SD (Standard Deviation) for zone of inhibition were determined.

#### **Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests**

Bacterial suspension that only showed sensitivity against *Illicium verum* crude extract was prepared as mentioned by Cavalieri (2009). In order to determine MIC value, 96-microtiter well plate was used by detecting the well with the lowest concentration of extract that completely inhibit the growth of the tested organism. Meanwhile, for the determination of MBC, a loop contained bacterial suspension (Shalayel et al. 2017) that showed no visible growth in MIC well was sub-cultured on Tryptic Soy Agar (TSA) prior to incubation at 37°C for 24 hrs. Both procedures were performed in triplicate to obtain reproducible results.

#### **Phytochemical analysis**

The qualitative test of methanol extracts of *Illicium verum* was performed in triplicates according to Deb et al. (2013) and Sibi et al. (2013) with slight modification. The methanol extract of *Illicium verum* were screened for presence of glycosides (using Fehling's test method), phenols (using Ferric Chloride's test method), alkaloids (using Wagner's test method), tannins (using Ferric Chloride's test method) and terpenoids (using Salkowski's test method).

### **RESULTS AND DISCUSSION**

In this study, dried *Illicium verum* was used as most scientists reported that the water content may influence the solubility of subsequent separation, hence, the secondary metabolic plants components need to be stable (Ncube et al. 2008), especially in determining the antimicrobial agent from a plant material. Besides, a better efficacy of extraction can be achieved by increasing the surface area of the plant material by grinding it into powdered-form (Tiwari et al. 2011). Meanwhile, methanol was used during the extraction process as the solvent has been found easier to penetrate into the cellular membrane of plant material and to extract out the intracellular compounds (Jones & Kinghorn 2006; Tiwari et al. 2011). Previous studies had reported that methanol able to exhibit more activity than aqueous extract (Ahmad & Beg, 2001; Nair et al. 2005;) and proven to be more consistent (Parekh et al. 2005). In addition, other



findings of *Illicium verum* also used methanol as solvent in extraction procedure (Shan et al. 2007; Sibi et al. 2013). In addition, positive control consisted of Ampicillin, Gentamicin, Streptomycin and Tetracycline were selected in this study as the aforementioned are considered commercial standards that are commonly used in most studies that exhibit against a wide range of gram-positive and gram-negative bacteria (Halawani 2009; Ahmed et al. 2010; Aburowais et al. 2017).

Subsequently, agar disk diffusion method was used during the preliminary screening of the extract's antimicrobial activity. This technique was chosen as it adopts simple process as well as least costly among other susceptibility methods (Reller et al. 2009; Das et al. 2010). The findings were then evaluated via the presence of inhibition zone and measuring of the diameter (Othman et al. 2011). The extract produced antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, similarly to a previous study by Shan et al. (2007). However, results revealed that the inhibition zone for *Illicium verum* appeared smaller in comparison to the standard antibiotic. The usage of 100% extract is unable to produce larger zone of inhibition as it may be due to the limitation of disk diffusion method that is considered less sensitive (Manoharan et al. 2003; Valgas et al. 2007) against the selected antibiotics. Hence, higher concentration is required as poor activity at lower concentrations may influence the solubility of the active compounds (Jagtap et al. 2010) while the variation results may also influence by several factors that include climate, environmental condition, test organism and dose (Ncube et al. 2008). Manoharan et al. (2003) had also suggested to further confirmed the findings with MIC tests.

Then, broth microdilution method was employed for the determination of MIC. This technique was preferred due its simplicity and practicality. Furthermore, due to the miniaturization by the use of small, disposable plastic microdilution tray which was microtiter plate has made this method popular and widely accepted by researchers (Jorgensen & Ferraro

2009). Other than that, broth microdilution method has been proven to be more sensitive accurate, appropriate for rapid quantitative determination of antimicrobial activity of plant extract as well as inexpensive and consumes less time than screening agar method (Jorgensen & Ferraro 2009; Klančnik et al. 2010). Meanwhile, for MBC, the test was done via sub-culturing the clear dilution suspension in MIC onto Tryptic Soy Agar (TSA). The methanolic extract of *Illicium verum* produced antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. According to previous studies, the Gram-negative bacteria have been reported to be more resistance towards plant extract compared to Gram-positive bacteria (Shan et al. 2007; Sibi et al. 2013). However, contradicting to other reports in which *E. coli* also showed same sensitivity as *S. aureus* towards the *Illicium verum* extract. Furthermore, *B.cereus* that belongs to Gram-positive bacteria showed the most sensitivity towards the extract. Meanwhile, the absence of bacterial growth indicated that the tested extract was bactericidal whilst the presence of bacterial growth displayed the bacteriostatic or bacterial-inhibiting at a particular concentration. The results for AST, MIC and MBC are further summarized in Table 1.

In addition, qualitative phytochemical analysis was employed by carrying tests using colour changes and precipitation of the chemicals reagents. Based on our findings in Table 2, all of the tested compounds were present in the *Illicium verum* extract. The results showed similarities with previous reports by Das and Kumar (2013), Harsha et al. (2013) and Sibi et al. (2013). According to Vijayakumar et al. (2012), Das & Kumar (2013) and Harsha et al. (2013), the compounds found in the extract possessed properties that exhibit the antimicrobial activity. These compounds might inhibit the microorganisms in several mechanism of action.

TABLE 1. AST, MIC and MBC results for *Illicium verum* extract against tested bacterial strains

Bacterial Strains	AST – Diameter Zone of Inhibition (Mean±SD; mm)			MIC (%)	MBC (%)
	Methanolic extract (100%)	Positive control	Negative control		
<i>S. aureus</i> (ATCC 43300)	9.00±0.00	21.00±1.00	0	6.25	6.25
<i>B. cereus</i> (ATCC 14579)	8.30±0.58	20.3±0.58	0	0.78	0.78
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	9.00±0.00	14.30±0.58	0	3.13	6.25
<i>S. typhimurium</i> (ATCC 13311)	8.70±0.58	22.70±2.08	0	1.56	3.13

ATCC = American Committee of Clinical Laboratory Standards; AST = Antimicrobial Susceptibility Testing; MIC = Minimum Inhibitory Concentration; MBC = Minimum Bactericidal Concentration; mg = milligram; mL = milliliter; mm = millimeter;  
% = Percentage; SD = Standard deviation; ± = plus minus

TABLE 2. Phytochemical analysis of methanolic extract of *Illicium verum*

Phytochemical compounds	Reaction
Alkaloids	+ve
Glycosides	+ve
Phenols	+ve
Tannins	+ve
Terpenoids	+ve

+ = Presence of compound (positive)

## CONCLUSION

In summary, *Illicium verum* extract contained the antimicrobial activity against selected foodborne pathogens, hence, a potential substitute for synthetic chemical in food preservative. Further studies are required to fractionate and isolate the active compounds in *Illicium verum* and the study on the evaluation of the possible synergistic action among multiple active compounds present. Moreover, other solvents can also be tested to enhance the antimicrobial effects.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Faculty of Health Sciences, UiTM Selangor Branch, Puncak Alam Campus for providing laboratory facilities and financial support.

## REFERENCES

Abdul-Mutalib NA, Syafinaz AN, Sakai K, & Shirai Y. 2015. An overview of foodborne illness and food

- safety in Malaysia. *Int Food Res J.* 22(3):896-901.
- Aburowais A, Banu A, & Nisha M. 2017. Activity of Orange (*Citrus sinensis*) and Lemon (*Citrus limon*) juice and oil on different bacteria that cause wound infection. Proceedings at International Conference on Advances in Engineering and Technology (RTET-2017). Retrieved from [http://eirai.org/images/proceedings\\_pdf/F0217715.pdf](http://eirai.org/images/proceedings_pdf/F0217715.pdf).
- Ahmad I, & Beg A. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol.* 74(2):113-123.
- Ahmed Z, Khan SS, Khan M, Tanveer A, & Lone ZA. 2010. Synergistic effect of *Salvadora persica* extracts, tetracycline and penicillin against *Staphylococcus aureus*. *Afr J Basic & Appl Sci.* 2(1-2):25-29.
- Arora DS, & Kaur J. 1999. Antimicrobial activity of spices. *Int J Antimicrob Ag.* 12(3):257-262.
- Brull S, & Coote P. 1999. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol.* 50:1-17.
- Cavaliere S. 2009. Manual of antimicrobial susceptibility testing. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Ceylan E, & Fung DYC. 2004. Antimicrobial activity of spices. *J Rapid Meth Aut Mic.* 12(1):1-55.
- Chaudhary NK. 2010. Food Additives. BIBECHANA. 6:22-26.
- Cockerill F. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, Pa.: CLSI.
- Das K, Tiwari R, & Shrivastava. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J Medic P* 4(2):104-111.
- de Souza EL, Stamford TLM, Lima EdO, Trajano VN, & Filho JMB. 2005. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz Arch Biol Techn.* 48(4):549-558.
- Deb N, Majumdar P, & Ghosh A. 2013. Pharmacognostic and phytochemical evaluation of the rhizomes of *Curcuma longa* Linn. *J Pharmascitech.* 2(2):81-86.
- DeWaal CS, & Grooters SV. 2013. Antibiotic resistance in foodborne pathogens. Center for Science in the Public Interest. Retrieved from [https://cspinet.org/sites/default/files/attachment/outbreaks\\_antibiotic\\_resistance\\_in\\_foodborne\\_pathogens\\_2013.pdf](https://cspinet.org/sites/default/files/attachment/outbreaks_antibiotic_resistance_in_foodborne_pathogens_2013.pdf).
- Gultekin F, Kumbul Doguc D, Vatansev H, & Taysi E. 2013. The effects of food and food additives on behaviors. *Int J Health Nutr.* 4(1):21-32.
- Halawani E. 2009. Antibacterial activity of Thymoquinone and Thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Adv Bio Res.* 3(5-6):148-152.
- Harsha N, Sridevi V, Chandana Lakshmi MVV, Rani K, & Divya Satya Vani N. 2013. Phytochemical Analysis of Some Selected Spices. *Int J Inno Res SciEng Technol.* 2(11):6618- 6621.
- Jagtap SD, Deokule SS, Pawar PK, Kuvalekar AA, & Harsulkar AM. 2010. Antimicrobial activity of some crude herbal drugs used for skin diseases by Pawra tribes of Nandurbar district. *Indian J Nat Prod Resour.* 1(2):216-220.
- Jeyaletchumi P, Tunung R, Margaret SP, Chai LC, Son R, Farinazleen MG, Cheah YK, Nishibuchi M, Nakaguchi Y, & Pradeep KM. 2010. Assessing the risk of acquiring listeriosis from consumption of minimally processed vegetables using a step-wise risk assessment. *As J Food Ag-Ind.* 3(6):587-596.
- Jorgensen J, & Ferraro M. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis.* 49(11):1749-1755.
- Jones W, & Kinghorn A. 2006. Extraction of plant secondary metabolites. In Sarker SD, Latif Z, & Gray AI, *Methods in Biotechnology, Vol. 20, Natural Products Isolation* (2nd ed., pp. 323-351). Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. Retrieved from <https://books.google.com.my/books?id=NIvvGGyeL3oC&printsec=frontcover>.
- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, & Možina S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Meth.* 81(2):121-126.
- Linscott AJ. 2011. Food-borne illnesses. *Clin Microb Newsletter.* 33(6):41-45.
- Manoharan A, Pai R, Shankar V, Thomas K, & Lalitha MK. 2003. Comparison of disc diffusion & E test methods with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *Indian J Med Res.* 117:81-87.
- Nair R, Kalariya T, & Chanda S. 2005. Antibacterial activity of some selected Indian medicinal flora. *Turk J Biol.* 29:41-47.
- Ncube NS, Afolayan AJ, & Okoh AI. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr J Biotechnol.* 7(12):17970-1806.
- New CY, Ubong A, Premarathne JMKJK, Thung TY, Lee E, Chang WS, Loo YY, Kwan SY, Tan CW,

- Kuan CH, & Son R. 2017. Microbiological food safety in Malaysia from the academician's perspective. *Food Res.* 1(6):183-202.
- Othman M, Loh H, Wiart C, Khoo T, Lim K, & Ting K. 2011. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *J Microbiol Meth.* 84(2):161-166.
- Parekh J, Jadeja D, & Chanda S. 2005. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turk J Biol.* 29:203-210.
- Parthasarathy V, Chempakan B, & Zachariah T. 2008. *Chemistry of spices.* Wallingford, UK: CABI Pub.
- Pires SM, Vieira AR, Perez E, Lo DFW, & Hald T. 2012. Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations. *Int J Food Microbiol.* 152(3):129-138.
- Ray B. 1996. *Fundamental Food Microbiology.* New York: CRC Press.
- Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, & Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 49(11):1749-1755.
- Shalayel MHF, Asaad AM, Qureshi MA, & Elhussein AB. 2017. Anti-bacterial activity of peppermint (*Mentha piperita*) extracts against some emerging multi-drug resistant human bacterial pathogens. *J Herb Med.* 7:27-30.
- Shan B, Cai Y, Brooks J, & Corke H. 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol.* 117(1):112-119.
- Sharifa Ezat WP, Netty D, & Sangaran, G. 2013. Paper review of factors, surveillance and burden of food borne disease outbreak in Malaysia. *Malays J Pub Health Med.* 13(2):98-105.
- Sibi G, Apsara V, Dhananjaya K, Ravikumar KR, & Mallesha H. 2013. Phytochemical and antibacterial properties of spices against food borne bacteria with special reference to *Parmelia perlata*. *Global J Bio-Sci Biotechnol.* 2(2):145-149.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, & Kaur H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci.* 1(1):98- 106.
- Tuormaa TE. 1994. The adverse effects of food additives on health: a review of the literature with special emphasis on childhood hyperactivity. *J Orthomol Med.* 9(4):225-243.
- Valgas C, de Souza SM, Smania EFA, & Smania Jr. A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microb.* 38:369-380.
- Vijayakumar A, Duraipandiyan V, Jeyaraj B, Agastian P, Raj M, & Ignacimuthu S. 2012. Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of *Illicium griffithii* Hook. f. & Thoms extracts. *Asian Pac J Trop Dis.* 2(3):190-199.
- Walsh C, & Fanning S. 2008. Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens - A Cause for Concern? *Curr Drug Targets.* 9(9):808-815.
- Wang G-W, Hu W-T, Huang B-K, & Qin L-P. 2011. *Illicium verum*: a review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol.* 136(1):10-20.
- White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, McDermott PF. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbe Infect.* 4(4):405-412.
- WHO (World Health Organization). 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases - Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Retrieved from [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1).
- Wilcock A, Pun M, Khanona J, & Aung M. 2004. Consumer attitudes, knowledge and behavior: a review of food safety issues. *Trends Food Sci Tech.* 15:56-66.

Hartini Yusof  
Siti Nasuha Abd Hadi  
Zed Zakari Abdul Hamid\*  
Centre of Medical Laboratory Technology,  
Faculty of Health Sciences, Universiti Teknologi  
MARA, Puncak Alam Campus, 42300 Bandar  
Puncak Alam,  
Selangor Darul Ehsan, Malaysia.

Reena Leeba Richard  
Mohamad Azlan Abd Majid  
Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
University of Malaya,  
50603 Kuala Lumpur, Malaysia.

\*Corresponding author:  
zedhamid@salam.uitm.edu.my

## The Impact of Salt Boiled and Acid Boiled Treatments on Allergenicity of Giant River Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

KOMATHI SOCKALINGAM, ROSMILAH MISNAN\*, ZAILATUL HANI MOHD YADZIR, NOORMALIN ABDULLAH, FAIZAL BAKHTIAR

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the allergenicity of salt boiled and acid boiled treated prawn extracts. Raw and treated prawn extracts were prepared. The extracts were then analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to determine their protein profiling. Allergenic proteins were detected by immunoblotting tests using sera from 20 prawn-allergic patients. The raw prawn contains 27 protein fractions between 6 to 207 kDa. Meanwhile, in salt boiled and acid boiled treated extracts, most of the bands were seen to be disappeared. Salt boiled extract showed some prominent bands, while in acid boiled extract, no prominent band was observed. The immunoblotting of raw prawn identified six major allergens at 72, 65, 48, 38, 36, and 30 kDa. Overall, compared to the raw prawn, the treated prawns induced lesser allergenic bands. The immunoblotting results of acid boiled extract clearly show that almost all of the sera did not react to the prawn proteins except for the 30 and 36 kDa bands. However, immunoblotting of salt boiled extract demonstrated more IgE-binding bands including the 18, 20, 30, 36, 48, 52 and 65 kDa. As a conclusion, this study indicated that both treated *M. rosenbergii* prawns could triggered IgE binding reactions but at minimum capacities than the raw prawn. The degree of allergenicity was revealed in the order of: raw > salt boiled > acid boiled treatments. These results would facilitate for developing of effective diagnosis and management strategies of prawn allergy in this country.

**Keywords:** *Macrobrachium rosenbergii*, prawn, allergy, SDS-PAGE, immunoblotting

### INTRODUCTION

Seafood constitutes a significant part in human diet. The worldwide consumption and demand on seafood has increased, that around the world, the increment on consuming various seafood products is rising rapidly (EFSA, 2006). Consistent health problems, particularly allergies have been associated by consumption of seafood products. Allergic reactions can be identified if a person having symptoms such as difficulty in breathing, skin-related signs, abdominal problems or anaphylactic shock after consuming certain food items (Lopata & Lehrer., 2009). An allergic reaction to seafood products in particular is on the rise, by affecting a huge number of patients that are sensitive to particular seafood types around the world. There are three most notable seafood groups which causes allergic reactions. There are fish, crustaceans and molluscs (Leung et al., 2012). The crustaceans and molluscs are known as “shellfish”. Tropomyosin, an abundant shellfish muscle protein

is known as the major shellfish allergen (Ayuso et al., 2008).

In Malaysia, *Macrobrachium rosenbergii* is well known for its popularity as a delicious dish and commonly consumed by local people. In Malaysia, it is known as ‘*udang galah*’ and is an important species in aquaculture. These prawns are mainly to be found and caught in the coastal waters of the Indo-West Pacific, Southeast Asia, and South China Sea (Rosmilah et al., 2012). Amongst local patients with atopic diseases, this prawn is deliberated as one of the most common allergenic prawn. Previous local study has identified several major allergens of *M. rosenbergii* including proteins of 36 and 42 kDa, identical as tropomyosin and arginine kinase, respectively. The 36 and 42 kDa major allergens were identified as the heat-resistant and heat-sensitive protein, respectively, based on the results of boiling process in their study (Yadzir et al., 2012).

Prior consumption, seafood including prawns are commonly processed by thermal or non-thermal treatments. Thermal-treated prawn

commonly involved several heat treatments such as boiling, frying and roasting or non-thermal treatments such as salting and pickling. It was reported that processing methods could modify the allergenicity of shellfish such as decreasing, increasing or having no effect on the allergenicity (Abramovitch et al., 2013; Nowak-Wegrzyn et al., 2009). Reports on the impact of combination of thermal treatments and non-thermal treatments on allergenicity of this prawn are currently not available. Thus, this study was conducted to investigate the effects of acid-boiling and salt-boiling treatments on allergenicity of *M. rosenbergii* among local patients with prawn allergy.

## MATERIALS AND METHODS

### Extraction of Prawn Proteins

Live *M. rosenbergii* was obtained from a local seafood market. Prawn proteins were extracted from their flesh, following the methods described by Rosmilah et al. (2012). Briefly, the prawn flesh was homogenized in purified water, followed by an overnight extraction at 4°C. The homogenates were then centrifuged, filtered, dialyzed, lyophilized and stored at -20°C until use. Meanwhile for the salt boiled and acid boiled extracts, respective treatments of acetic acid (pH 2.5) hydrolysis and salting (20% NaCl) were applied followed by boiling processes.

### Serum Samples

Sera from 20 patients with prawn allergy were used in this study. These sera were confirmed to have IgE antibodies specific to prawn proteins in immunoblotting experiments in previous study (Yadzir et al., 2012). Serum from a non-allergenic individual was used as a negative control. This research was approved by Medical Research and Ethics Committee (MREC), Ministry of Health Malaysia.

### SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to determine the protein profile in the prepared extracts by using the method described by Rosmilah et al. (2012). Briefly, the samples and prestained molecular markers (Bio-Rad, CA, USA) were incorporated into wells containing 12% of

resolving gel and 5% of stacking gel using a Mini Protean 3 Apparatus (Bio-Rad, CA, USA), and separated at 120 mA for 50 minutes. After the electrophoresis, the gels were then stained using Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained in destaining solution I and II. The molecular weights of the proteins were estimated using an imaging densitometer (Bio-Rad, CA).

### Immunoblotting

Immunoblotting was conducted to identify the IgE-binding properties of the allergens using sera from 20 patients with prawn allergy. Immunoblotting was performed according to the methods by Rosmilah et al. (2012) with slight modifications. Proteins which were separated by SDS-PAGE process were first transferred to nitrocellulose membrane using Mini Transblot System (Bio-Rad, USA) at 100 V and 250 mA for 70 minutes. After Immunoblotting, the membrane was stained by Ponceau S (Sigma Diagnostic, USA) to ensure that the protein was transferred. Nitrocellulose blots were then cut into strips measuring 4 mm and washed with tris buffer solution (TBS, pH 7.2) containing 5% Tween 20 (TTBS) for three times. After that, the nitrocellulose strips were blocked with 5% low-fat milk in TBS solution. The strips were then incubated with serum of 20 patients for 14 to 16 hours at 4°C. IgE binding proteins on nitrocellulose strips were identified after incubation in Biotinylated Goat antihuman IgE Antibody (KPL, UK), followed by incubation in Conjugated Streptavidin-Alkaline Phosphatase (BioRad, CA, USA) for 30 minutes at room temperature. Finally, Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (BioRad, USA) was used to detect IgE-binding protein bands.

## RESULTS AND DISCUSSION

### SDS-PAGE

The protein components in raw, salt boiled and acid boiled treated extracts were separated by SDS-PAGE. Figure 1 displayed the comparison of protein profiles between the raw, salt boiled and acid boiled treated extracts of *M. rosenbergii*.

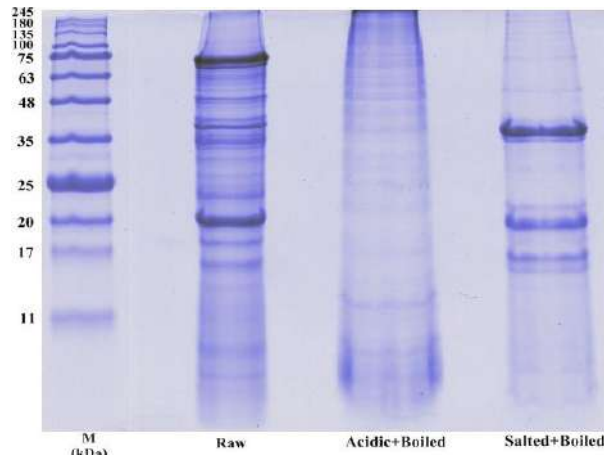


FIGURE 1. Protein profiles of raw, salt boiled and acid boiled treated extracts of *M. rosenbergii*. Lane M is molecular weight markers in kiloDalton (kDa).

The raw prawn contains 27 protein fractions between 6 to 207 kDa. In acid boiled extract, bands that can be seen slightly are at the molecular weight of 30, 18, 14 and 10 kDa. Smears of bands can be seen at the molecular weight ranging in between 68 and 40 kDa. In general, the intensity of the bands of the acid boiled samples became lighter than all of the corresponding extracts. Compared to the control samples, the intensity of the 36 kDa bands in acid boiled samples was dramatically decreased. The fading of the bands indicates decreased protein content after vinegar treatment applied. This is because, the 36 kDa protein, predicted as tropomyosin is a heat stable protein and would have not been affected by boiling (Zailatul et al., 2015). Sletten and others (2009) also reported reduction in the intensity of the protein bands in acetic acid-salt brined herring products. Although the overall protein band intensity in acid boiled treated samples decreased, Figure 1 shows several novel bands appearing between 44 and 107 kDa in the respective extract. These minor novel bands may be caused by the acid hydrolyzation of larger proteins (Elsayed, 1971).

Meanwhile, in salt boiled extract, bands that can be seen clearly are at the molecular weight

of 95, 41, 34, 30, 34, 26, 20, 18 and 14 kDa. Smears of bands can be seen at molecular weight of 92, 60, 41, 28, 20 and 16 to 14 kDa. Protein losses have been explained by the large uptake of salt (NaCl) by the muscle, resulting in competition with muscle protein for water molecules, and denaturation and aggregation of these proteins by a process of "salting out". In general, the number of bands decreases during salting processes owing to protein denaturation (Martínez-Alvarez & Gómez-Guillén, 2006). Martinez et al. (2001) investigated changes in protein patterns of shrimp muscle that was subjected at frozen state and in water, low salt and high-salt as well. The results showed that degradation of the myosin heavy chain occurred at all salt concentrations and one band of ranging between 67 kDa disappeared during storage. Similar to earlier reports and as expected, most of the bands after the salt-boiled process disappeared on the gels.

### Immunoblotting

The IgE-binding protein components of raw, salt boiled and acid boiled extracts were detected by immunoblotting. Figure 2 displays the IgE-binding proteins of raw *M. rosenbergii* extract, while Figure 3 and 4 show the IgE-binding proteins of salt boiled and acid boiled of *M. rosenbergii* extracts, respectively.

This study demonstrated that all tested sera exhibited heterogeneous IgE-binding proteins towards raw *M. rosenbergii*, most probably due to the varieties of people's insusceptible reactions towards these allergens which be dependent on both hereditary and ecological factors (Granum & Levik, 2002). Allergenic proteins are defined as a major allergen if at least 50% of the tested sera have IgE reactions to the specific protein (Leung et al., 2014). Thus, in this study, six proteins at 30, 36, 38, 48, 65 and 72 kDa were recognized as the major allergens of *M. rosenbergii*, with the binding frequencies of 60, 90, 75, 55, 60 and 75%, respectively.

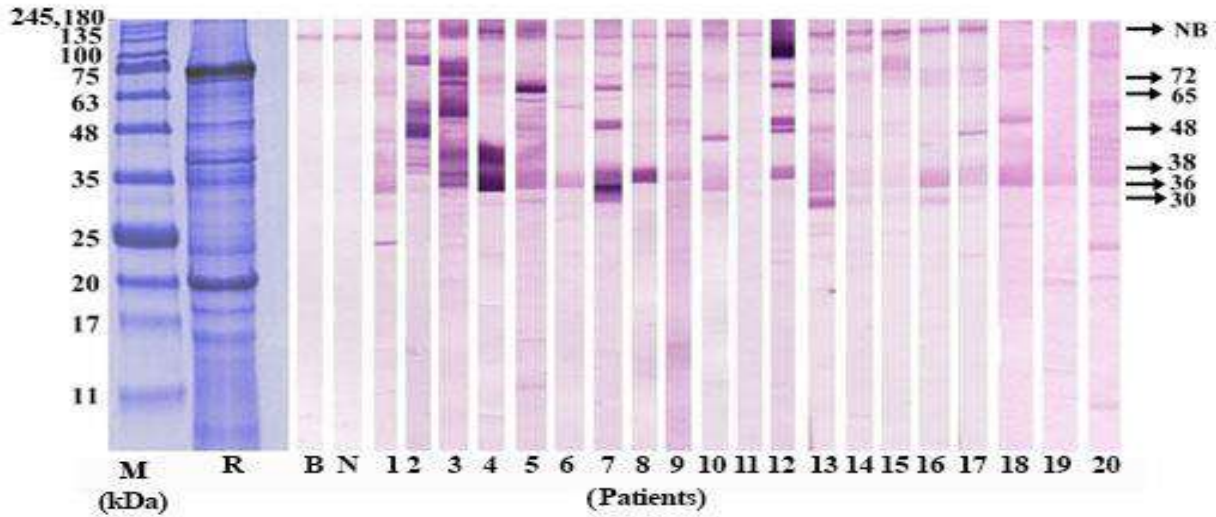


FIGURE 2. Immunoblotting results of raw *M. rosenbergii* using sera from 20 prawn-allergic patients (lane 1 to 20). Lane M is molecular mass markers in kiloDalton (kDa); lane R is raw; lane B is blank and lane N is immunoblot using a negative control serum. Arrows indicated the major allergens molecular weight in kDa.

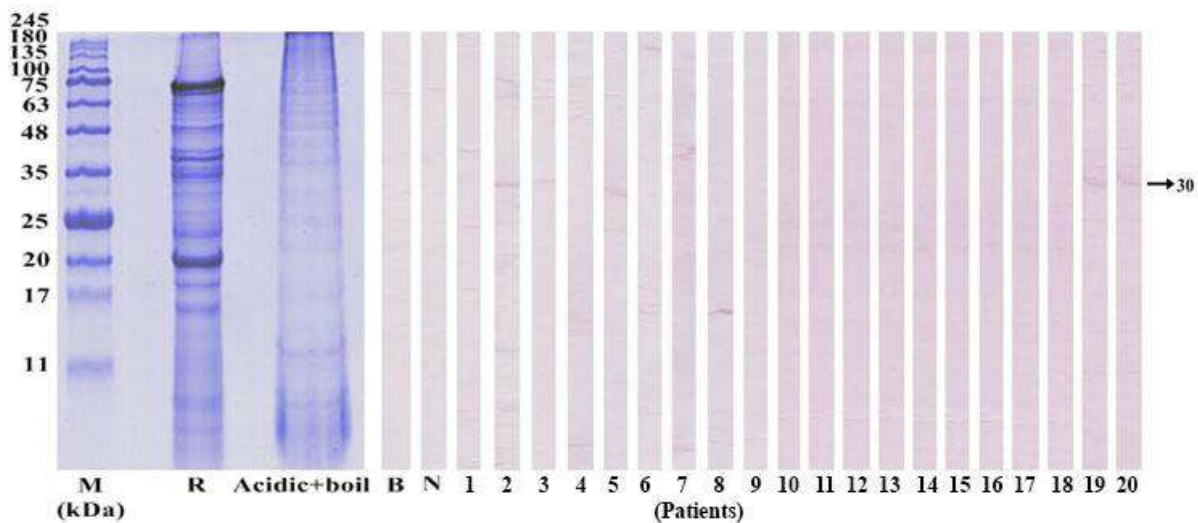


FIGURE 3. Immunoblotting results of acid boiled *M. rosenbergii* using sera from 20 prawn-allergic patients (lane 1 to 20). Lane M is molecular mass markers in kiloDalton (kDa); lane R is raw; lane B is blank and lane N is immunoblot using a negative control serum. Arrow indicated major allergen in kDa.



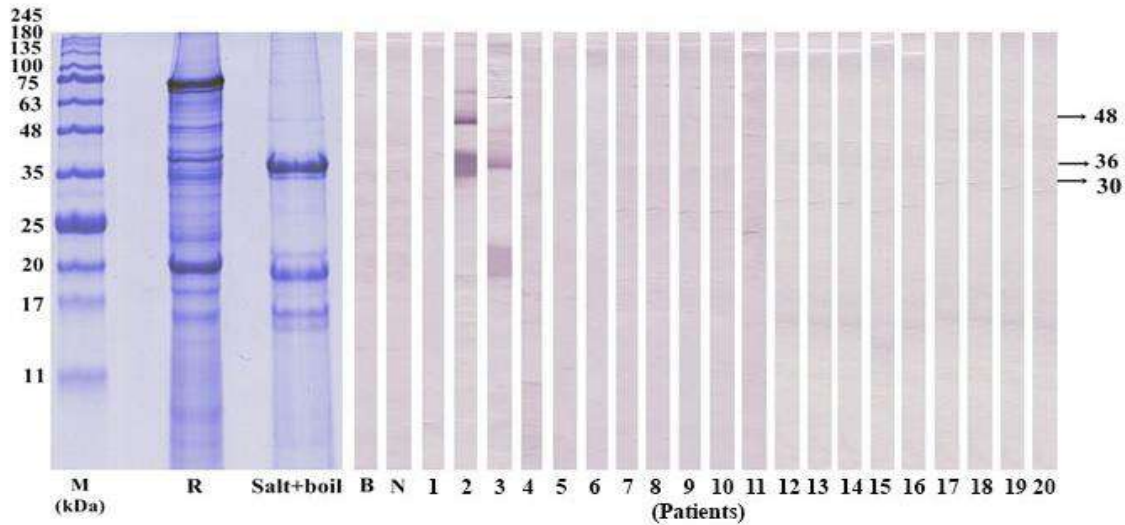


FIGURE 4. Immunoblotting results of salt boiled *M. rosenbergii* using sera from 20 prawn-allergic patients (lane 1 to 20). Lane M is molecular mass markers in kiloDalton (kDa); lane R is raw; lane B is blank and lane N is immunoblot using a negative control serum. Arrows indicated major allergen in kDa.

The immunoblotting results of acid boiled extract of *M. rosenbergii* clearly showed that almost all of the sera did not react to any protein bands (Figure 3). Only two sera (No. 2 and No. 3) demonstrated IgE-binding smear regions at molecular weight of 30 to 36 kDa in the acid boiled extract. This may be due to all the protein bands having been destroyed by the boiling process and also chemical reaction in acidic pH (Hildebrandt et al., 2010). Boiling causes protein denaturation by heat while acidic proteases in prawn muscle, which is activated by vinegar, triggered the proteolysis of the antigenic proteins in prawn muscles. So far, only one study reported on the influence of combining various heat treatments with acid hydrolysis on the structure and allergenicity of pasteurised liquid whole egg (Hildebrandt et al., 2010). This study found that the IgE-binding capacity of the end product, which underwent heating and acid treatments, was more than 100-fold reduced compared to untreated liquid whole egg (Hildebrandt et al., 2010).

Meanwhile, in immunoblotting of salt boiled extracts, only sera No. 2 and No. 3 retain the IgE binding capabilities, but with stronger IgE reactivity to the 30 and 36 kDa bands compared to the other tested sera. However, compared to the immunoblotting of acid boiled extract, immunoblotting of salt boiled extract demonstrated

more IgE-binding bands including the 18, 20, 48, 52 and 65 kDa (Figure 4).

It can be said that the patient No. 2 and No. 3 are highly allergic to prawn allergens of 30 and 36 kDa as they showed positive reactivity to IgE binding to both salt boiled and acid boiled prawn extracts. The 36 kDa major allergen might correspond to be tropomyosin, myofibrillar protein, which is the substantial allergen responsible in cross-reactivity reactions between different types of shrimps and prawns. Tropomyosin is well known to be a highly heat and pH stable in shellfish (Zailatul Hani et al., 2012). The ability of tropomyosin to withstand high temperature causes tropomyosin resistant to denaturation; hence, it still appeared after heat treatment has been applied in both acid boiled and salt boiled prawn extracts.

It should be noted that, this study found the 30 kDa protein as one of the major allergens in *M. rosenbergii*, recognized by 60% of tested sera in raw *M. rosenbergii*. Therefore, this band has been identified as one of the important major allergens of *M. rosenbergii*. Unfortunately, a protein band at this molecular weight is rarely described as the major allergen of shellfish in literatures. To date, there has been only one report on shellfish allergens that has identified a 28 kDa band (close to the molecular weight of 30 kDa) as triose phosphate isomerase, an important allergen in

shrimp *Crangon crangon* (Bauermeister et al., 2011). However, whether the 30 kDa major allergen found in this study is homologous to the 28 kDa is still not known and further research is needed to identify it.

### CONCLUSION

This study indicated the loss of almost all IgE-binding capabilities of the tested sera against both combining thermal and non-thermal treatments. The degree of allergenicity based on the IgE-binding capacities was revealed in the order of: raw > salt boiled > acid boiled treatments. For future study, research on identification of the major allergens of *M. rosenbergii* using proteomics approach is needed to identify the proteins.

### ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Universiti Pendidikan Sultan Idris (UPSI) and Institute for Medical Research (IMR) for partially supported this study by research grants UPSI 2011-0018-102-01 and JPP-IMR 11-001, respectively.

### REFERENCES

- Abramovitch JB, Kamath S, Varese N, Zubrinich C, Lopata AL, O'Hehir RE, et al. 2013. IgE reactivity of blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) Tropomyosin, Por p 1, and other allergens; cross-reactivity with black tiger prawn and effects of heating. PLoS One. 8(6): e67487.
- Ayuso R, Grishina G, Bardina, L, Carrillo T, Blanco C, Ibanez MD, Sampson HA, & Beyer K 2008. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. Allergy Clin Immunol. 122: 795-802.
- Bauermeister K, Wangorsch A, Garoffo LP, Reuter A, Conti A, Taylor SL, Lidholm J, DeWitt Å.M, Enrique E, Vieths S, Holzhauser T, Ballmer-Weber B. & Reese, G. 2011. Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp *Crangon crangon*. Mol Immunol. 48: 1983-1992.
- EFSA. 2006. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the evaluation of molluscs for labelling purposes. EFSA. 327: 1-25.
- Elsayed S & Aas K. 1971. Characterization of a major allergen (cod). Observations on effect of denaturation on the allergenic activity. J Allergy. 47: 283-291.
- Hildebrand S, Schutte L, Stoyanov S, Hammer G, Steinhart H, & Paschke A. 2010. In vitro determination of the allergenic potential of egg white in processed meat. J Allergy. 2010: 1-5.
- Leung PSC, Chu KH, Chow WK, Ansari A, Bandea CI, Kwan HS, Nagy SM, & Gershwin ME. 2012. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. J Allergy Clin Immunol. 94: 882-890.
- Martinez I, Friis TJ, & Careche M. 2001. Post mortem muscle protein degradation during ice-storage of Arctic (*Pandalus borealis*) and tropical (*Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*) shrimps: a comparative electrophoretic and immunological study. J Sci Food Agric. 81: 1199-1208.
- Martínez-Alvarez O, & Gómez-Guillén MC. 2006. Effect of brine salting at different pHs on the functional properties of cod muscle proteins after subsequent dry salting. Food Chem. 94: 123-129.
- Nowak-Wegrzyn A, & Fiocchi A. 2009. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 9: 234-237.
- Rosmilah M, Shahnaz M, Zailatul Hani MY, & Noormalin A. 2012. Identification of the major allergen of *Charybdis feriatus* (red crab) and its cross-reactivity with *Portunus pelagicus* (blue crab). Asian Pac J Allergy Immunol. 30: 285-293.
- Sletten G, Van Do T, Lindvik H, Egaas E, & Florvaag E. 2010. Effects of industrial processing on the immunogenicity of commonly ingested fish species. Int Arch Allergy Immunol. 151(3): 223-236.
- Yadzir ZHM, Misnan R, Abdullah N, Bakhtiar F, Arip M & Murad S. 2012. Identification of the Major Allergen of *Macrobrachium Rosenbergii* (Giant Freshwater Prawn). Asian Pac J Trop Biomed. 2: 50- 54.
- Zailatul HMY, Rosmilah M, Faizal B, Noormalin A, & Shahnaz M. 2015. Malaysian cockle (*Anadara granosa*) allergy: Identification of IgE-binding proteins and effects of different cooking methods. Trop Biomed. 32(2): 323-334.

Komathi Sockalingam  
Rosmilah Misnan\*  
Department of Biology, Faculty of Science and  
Mathematics, Universiti Pendidikan Sultan Idris,  
35900 Tanjong Malim, Perak, Malaysia

Zailatul Hani Mohd Yadzir  
Noormalin Abdullah  
Faizal Bakhtiar  
Allergy and Immunology Research Centre,  
Institute for Medical Research, 50588 Kuala  
Lumpur, Malaysia

\*Corresponding author:  
rosmilah@fsmt.upsi.edu.my

**Penentuan Tahap Kemurungan, Kebimbangan dan Tekanan Dalam  
Kalangan Pegawai Sains dan Staf Pelaksana di Fakulti Sains Kesihatan  
Universiti Kebangsaan Malaysia Kuala Lumpur**

(Determination Of The Level Of Depression, Anxiety And Stress Among The Science Officer  
And The Supporting Staff In The Faculty Of Health Sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia  
Kuala Lumpur)

ANUAR ITHNIN AND AMIRUL RAZAK

**ABSTRAK**

Kajian ini bertujuan untuk mengenalpasti tahap kemurungan, kebimbangan dan tekanan. Kajian keratan rentas ini melibatkan seramai 52 orang responden secara keseluruhannya. Responden kajian terdiri daripada 12 orang responden mewakili pegawai sains dan 40 orang responden mewakili staf pelaksana iaitu penolong pegawai sains dan juruteknologi makmal perubatan di Fakulti Sains Kesihatan Universiti Kebangsaan Malaysia Kampus Kuala Lumpur. Borang kaji selidik yang digunakan terdiri daripada komponen demografi, item kemurungan, item kebimbangan dan item tekanan. Majoriti responden adalah wanita (78.8%), berbangsa Melayu (98%), berumur antara 30 hingga 39 tahun (48.1%), mempunyai Indeks Jisim Badan yang berlebihan (55.8%), memiliki tahap pendidikan yang tinggi (53.8) %, sudah berkahwin (71%) dan tidak merokok (92%). Kebimbangan berada di tahap sangat teruk dengan peratusan 2%, manakala kemurungan dan tekanan berada di tahap teruk masing-masing dengan peratusan 4% dan 2%. Min dan sisihan piawai bagi keseluruhan item kemurungan, kebimbangan dan tekanan masing-masing adalah  $1.55 \pm 2.15$ ,  $1.88 \pm 1.94$ , dan  $1.27 \pm 2.23$ . Skor kemurungan, kebimbangan dan tekanan adalah berada ditahap rendah. Dapatan kajian juga menunjukkan bahawa tiada perbezaan yang signifikan ( $p > 0.05$ ) bagi item tekanan dengan faktor yang dikaji. Didapati bahawa, tiada hubungkait yang bererti antara tekanan dengan faktor sosiodemografi dan didapati tiada hubungan bererti di antara tekanan dengan faktor pekerjaan (ujian khi-kuasa dua  $p > 0.05$ ). Kesimpulannya, kajian ini menunjukkan faktor yang dikaji iaitu sosiodemografi dan pekerjaan tidak menyumbang kepada tekanan. Program promosi kesihatan mental boleh dicadangkan kepada pihak majikan dalam usaha mencegah kemurungan, kebimbangan dan tekanan di kalangan pegawai sains dan staf pelaksana.

Kata kunci: kemurungan, kebimbangan, tekanan, kesihatan mental, DASS 21

**ABSTRACT**

This study aims to identify the level of anxiety, depression and stress. This cross-sectional study involved 52 respondents as a whole. The respondents consisted of 12 participants representing science officer and 40 participants representing the supporting staff of assistant science officer and medical laboratory technologist at the Faculty of Health Sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur campus. The survey consisted of demographic components, items of depression, anxiety and items of pressure. The majority of respondents were women (78.8%), Malays (98%), aged between 30 and 39 years (48.1%), had a Body Mass Index indicating overweight (55.8%), they have a high level of education (53.8%), married (71%) and are non-smokers (92%). Anxiety level were very extremely severe with the percentage of 2%, while depression and stress are at level of severe, each with a percentage of 4% and 2%. The means and standard deviations of the entire item of depression, anxiety and stress respectively were  $1.55 \pm 2.15$ ,  $1.88 \pm 1.94$  and  $1.27 \pm 2.23$ . Scores of depression, anxiety and stress are ranked lower. The results also showed that there were no significant differences ( $p > 0.05$ ) by a factor of stress for the item under review. It was found that no significant relationship between stress with sociodemographic factors and also there was no significant relationship between stress and work factors ( $p > 0.05$ ). In conclusion, this study shows that

sociodemographic factors and the work factor does not contribute to the stress. Mental health promotion programs can be backed up to the employer in order to prevent depression, anxiety and stress among science officers and supporting staff.

Key words: depression, anxiety, stress, mental health, DASS 21

## PENGENALAN

Penyakit mental adalah penyakit yang melibatkan gangguan pada fungsi otak yang boleh menyebabkan perubahan kepada proses pemikiran, perasaan, tingkah laku seseorang serta kemampuan untuk berinteraksi secara sihat dengan persekitarannya (WHO 2012). Di Malaysia, kajian kesihatan dan morbiditi kebangsaan ke-III pada 2006, menunjukkan bahawa kewujudan masalah kesihatan mental adalah 11.2 peratus di kalangan orang dewasa dan 20.3 peratus di kalangan kanak-kanak dan remaja (IPH 2014). Ini menggambarkan bahawa kesihatan mental di kalangan masyarakat hari ini terjejas dan kian merosot.

Isu kesihatan mental di tempat kerja, harus diberikan perhatian berat kerana produktiviti pekerja di dalam sesuatu organisasi bergantung kepada tahap kesihatan mental mereka. Pekerjaan mampu menyediakan peluang pekerjaan dan pendapatan tetapi pada masa yang sama ianya mampu menyebabkan tekanan kepada pekerja (Cooper & Marshall, 1978; Hockey & Wiethiff, 1990; Harris, 2003). Masalah kesihatan mental dalam kalangan pekerja boleh menyebabkan prestasi pekerja merosot, tidak memuaskan, kekerapan mendapat penyakit, ketidakhadiran, berlaku kemalangan atau kecederaan di tempat kerja. Pihak majikan juga perlu menangani isu ini kerana pengabaian masalah kesihatan mental dan faktor psikososial di tempat kerja bukan sahaja akan merugikan pekerja terbabit tetapi juga akan memberi kesan secara langsung ke atas produktiviti, kecekapan dan pengeluaran perusahaan. Kajian ini bertujuan mengkaji tahap kesihatan mental, kemurungan, kebimbangan dan tekanan dan hubungkait antara tahap tekanan yang dihadapi dalam kalangan Pegawai sains dan staf pelaksana di Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kampus Kuala Lumpur.

## METODOLOGI KAJIAN

### Latar Belakang dan Populasi Kajian

Kajian ini melibatkan Pegawai sains dan staf pelaksana termasuklah Penolong Pegawai Sains dan Juruteknologi Makmal Perubatan di Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kampus Kuala Lumpur. Responden terdiri mereka yang bekerja mengikut waktu bekerja bermula pada jam 8 pagi hingga 5 petang.

### Persampelan

Teknik persampelan yang digunakan adalah persampelan menyeluruh di mana melibatkan kesemua Pegawai sains dan staf pelaksana di Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kampus Kuala Lumpur. Persampelan dilakukan dengan menggunakan borang soal selidik, temubual dan tinjauan di lapangan. Instrumen kajian adalah dengan menggunakan borang soal selidik yang terbahagi kepada 3 bahagian iaitu bahagian A berkaitan sosio-demografi responden. Bahagian B berkaitan pekerjaan, amalan dan sejarah kesihatan. Manakala bahagian C berkaitan kemurungan, kebimbangan dan tekanan berdasarkan soalselidik DASS 21 (Lovibond, P.F., & Lovibond, S. H. 1995). Pra uji soal selidik dilakukan untuk mengukur kebolehlaksanaan borang soal selidik kajian. Hasil ujian Cronbach Alfa yang dilakukan untuk menilai tahap kebolehpercayaan keseluruhan borang soalselidik adalah 0.878.

Kajian secara keratan rentas ini dijalankan untuk menentukan tahap kemurungan, kebimbangan dan tekanan dalam kalangan Pegawai sains dan staf pelaksana di Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kampus Kuala Lumpur. Responden terdiri Pegawai sains dan staf pelaksana yang berusia 20 tahun ke atas dan sudah bekerja lebih dari setahun.

Proses pengumpulan data daripada soal selidik, temubual dan tinjauan di lapangan. Pengumpulan maklumat dilakukan berdasarkan data primer iaitu maklumat mentah yang diperolehi melalui soal selidik dan data sekunder yang

diperolehi daripada kajian perpustakaan seperti jurnal, buku-buku dan bahan rujukan lainnya. Temubual pula dilakukan untuk mendapatkan maklumat seperti jenis pekerjaan dan tugas yang dilakukan.

#### **Analisis Statistik**

Data yang diperolehi dianalisa menggunakan *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 23.0, manakala ujian tekanan menggunakan *Depression, Anxiety and Stress Scales* (DASS 21). Data yang diperolehi dianalisis secara deskriptif dan analitik. Analisis deskriptif untuk menentukan peratusan dan frekuensi bagi melihat taburan demografi responden kajian dari segi umur, jawatan pekerjaan, pengalaman kerja dan kekerapan terdedah kepada bahaya di tempat kerja. Manakala ujian Khi Kuasa Dua ini juga bertujuan melihat adakah terdapat hubugkait faktor sosiodemografi dan pekerjaan.

### **HASIL KAJIAN**

#### **Data Sosiodemografi Responden**

Seramai 52 orang responden terlibat dalam kajian ini. Jadual 1 di bawah menunjukkan majoriti responden adalah berbangsa Melayu iaitu 98% di mana majoriti berumur antara 30 hingga 39 tahun iaitu seramai 48.1% (n=25), umur 40 hingga 49 tahun seramai 32.7% (n=17), umur 20 hingga 29 tahun seramai 13.4% (n=7) dan hanya 5.8% (n=3) yang berumur antara 50 hingga 59 tahun. Majoriti responden iaitu 53.8% (n=28) mempunyai pendidikan di peringkat diploma dan ke atas, manakala 46.2% (n=24) responden mempunyai ijazah sarjana muda dan ke atas. Dari segi status perkahwinan mendapati seramai 71% (n=37) responden telah berkahwin, manakala seramai 29% (n=15) adalah bujang.

#### **Data Responden Mengikut Sejarah Kesihatan**

Jadual 2 menunjukkan sebanyak 44.2% (n=23) responden mempunyai BMI yang normal iaitu dari 18 hingga 23.9, 42.3% (n=22) responden menunjukkan BMI berat badan yang berlebihan iaitu 24 hingga 29.9, manakala 13.5% (n=7) responden menunjukkan BMI *obese* iaitu lebih dari 30. Majoriti daripada responden adalah tidak merokok 92% (n=48), manakala sebanyak 8% (n=4) responden adalah perokok. Bagi sejarah

kesihatan didapati sebanyak 12% (n=6) responden mempunyai masalah kesihatan, manakala 88% (n=46) responden tiada mempunyai masalah kesihatan.

#### **Ciri-ciri Pekerjaan Responden**

Jadual 3 menunjukkan taburan responden mengikut ciri-ciri berkaitan pekerjaan. Analisis deskriptif yang dijalankan menunjukkan 77% responden bekerja sebagai staf pelaksana, manakala 23% bekerja sebagai pegawai sains. Sebanyak 55.7% responden telah bekerja melebihi 10 tahun, manakala 44.3% telah bekerja kurang daripada 10 tahun. Terdapat sebanyak 57.7% responden bekerja kurang dari 8 jam sehari, manakala 42.3% bekerja melebihi 8 jam sehari. Majoriti responden (92%) bekerja melebihi 7 hari seminggu dan melebihi 20 hari bekerja dalam sebulan.

#### **Amalan Pekerjaan Responden**

Berdasarkan Jadual 4, sebanyak 73% responden menggunakan alat pelindungan diri (PPE) di mana majoritinya (100%) memakai penutup muka dan kot makmal ketika bekerja. Selain itu, 63% responden menggunakan sarung tangan, 27% menggunakan kasut keselamatan dan 5.8% menggunakan alat pelindung mata ketika menjalankan tugas. Seramai 98% responden menyatakan bahawa tempat kerja mereka mempunyai sistem pengudaraan, di mana mempunyai pengudaraan setempat (65%) dan pengudaraan berpusat (35%). Bagi penggunaan penutup muka pula, sebanyak 52% daripada responden menggunakan penutup muka ketika bekerja di mana 66% menggunakan jenis kain sebagai penutup muka dan 59.2% responden kekerapan penggunaan penutup muka melebihi 1 jam semasa bekerja. Selain itu, 77% responden menyatakan bahawa terdapat hazard di tempat kerja mereka, di mana 60% responden menyatakan mereka bekerja dalam sistem yang tertutup. Majoriti responden (55.7%) menyatakan tahap puas hati terhadap persekitaran ruang bekerja, namun hanya 15.4% responden menyatakan tidak berpuas hati dengan persekitaran ruang bekerja.

JADUAL 1 Taburan sociodemografi responden.

<b>Sosiodemografi</b>	<b>Frekuensi</b>	<b>Peratusan (%)</b>
Bangsa		
Melayu	51	98
Cina	1	2
Umur		
20 – 29	7	13.4
30 – 39	25	48.1
40 – 49	17	32.7
50 – 59	3	5.8
Status Perkahwinan		
Berkahwin	37	71
Bujang	15	29

JADUAL 2 Taburan responden mengikut sejarah kesihatan.

<b>Sejarah Kesihatan</b>	<b>Frekuensi</b>	<b>Peratusan (%)</b>
Status Kesihatan		
Sihat	46	88
Tidak Sihat	6	12
Status Merokok		
Tidak Merokok	48	92
Merokok	4	8
BMI		
18 – 23.9	23	44.2
24 – 29.9	22	42.3
> 30	7	13.5

JADUAL 3 Taburan Responden mengikut ciri-ciri pekerjaan (N=52)

<b>Ciri-ciri pekerjaan</b>	<b>Frekuensi</b>	<b>Peratusan (%)</b>
Jawatan Pekerjaan		
Pegawai Sains	10	23
Staf Pelaksana	34	34
Tempoh Bekerja		
≤ 10	23	44.3
10 >	31	55.7
Jumlah Jam Bekerja Sehari		
≤ 8	30	57.7
8 >	22	42.3
Jumlah Hari Kerja Seminggu		
≤ 7	3	6
7 >	49	94
Jumlah Hari Kerja Sebulan		
≤ 20	3	6
20 >	49	94

JADUAL 4 Taburan Responden mengikut amalan pekerjaan (N=52)

<b>Amalan pekerjaan</b>	<b>Frekuensi</b>	<b>Peratusan (%)</b>
Penggunaan Alat Pelindung Diri (PPE)		
Ya	38	73
Tidak	14	27
Penggunaan Alat Pelindung Diri		
Topeng Muka	38	100
Kot Makmal	38	100
Sarung Tangan	33	63
Kasut Bot	14	27
Pelindung Mata	2	5.8
Pengudaraan Di Tempat Kerja		
Ya	51	98
Tidak	1	2
Jenis Pengudaraan		
Setempat	34	65
Berpusat	18	35
Penggunaan Penutup Muka		
Ya	27	52
Tidak	25	48
Jenis Penutup Muka		
Kertas/Kain	18/27	66
Dengan Penapis	7/27	26
Dengan Salur Udara	2/27	8
Kekerapan Penggunaan Penutup Muka		
Setiap Hari	5/27	18
Setiap Minggu	8/27	30
Sebulan	14/27	52
Purata Jam Penggunaan Penutup Muka Sehari		
$\leq 1$	11/27	40.8
$1 >$	16/27	59.2
Bekalan Penutup Muka		
Cukup	24/27	88.8
Tidak Cukup	3/27	11.2
Hazad Di Tempat Kerja		
Ya	40	77
Tidak	12	23
Jika Ya, Adakah tempat kerja anda mempunyai sistem tertutup		
Ya, Tempat kerja saya tertutup tetapi bahan hazad boleh merebak ke unit yang lain.	13/40	32.5
Ya, Tempat kerja saya tertutup, perlindungan yang baik dan terasing dari hazad.	24/40	60
Tidak, Tempat kerja saya terbuka, tiada sistem tertutup	3/40	7.5
Persekitaran Atmosfera Ruang Bekerja		
Sangat puas hati	4	7.7
Puas hati	29	55.7
Tidak Pasti	11	21.2
Tidak puas hati	8	15.4
Sangat tidak puas hati	0	0



### Analisis Deskriptif

Analisis deskriptif dilakukan untuk melihat min skor setiap soalan dan min skor bagi tahap saringan item yang dikaji. Analisis deskriptif melibatkan menggunakan DASS 21. Jadual 5 menunjukkan min skor bagi soalan berkaitan kebimbangan. Hasil kajian mendapati bahawa soalan nombor 2 memiliki skor min yang tertinggi dengan bacaan 1.1708 (SP=0.6787), manakala soalan 20 mempunyai skor min terendah, 0.3121 (SP=0.5065).

Jadual 6 menunjukkan min skor bagi soalan berkaitan dengan kemurungan. Hasil kajian

mendapati bahawa soalan nombor 3 memiliki skor min yang tertinggi dengan bacaan 0.9320 (SP=0.5951), manakala soalan 21 mempunyai skor min terendah, 0.2355 (SP=0.4253).

Jadual 7 menunjukkan min skor bagi soalan berkaitan dengan tekanan. Hasil kajian mendapati bahawa soalan nombor 18 mempunyai skor min yang tertinggi dengan bacaan 0.9212 (SP=0.5893), manakala soalan 8 yang memiliki skor min terendah, 0.4646 (SP=0.6095).

JADUAL 5 Min skor soalan kaji selidik berkaitan kebimbangan

No	Soalan	Min	SP
2	Saya sedar mulut saya rasa kering	1.1708	0.6787
4	Saya mengalami kesukaran bernafas (contohnya, bernafas terlalu cepat tercungap-cungap walaupun tidak melakukan aktiviti fizikal)	0.5263	0.5421
7	Saya pernah menggeletar (contohnya tangan)	0.3820	0.4910
9	Saya risau akan berlaku keadaan di mana saya panik dan berkelakuan bodoh	0.4821	0.6413
15	Saya rasa hampir panik	0.5813	0.6052
19	Walaupun saya tidak melakukan aktiviti fizikal, saya sedar akan debaran jantung saya	0.6701	0.6173
20	Saya rasa takut tanpa sebab	0.3121	0.5065

JADUAL 6 Min skor soalan kaji selidik berkaitan kemurungan

No.	Soalan	Min	SP
3	Saya seolah-olah tidak dapat mengalami perasaan positif sama sekali	0.9320	0.5951
5	Saya rasa tidak bersemangat untuk memulakan sesuatu keadaan	0.6231	0.5890
10	Saya rasa tidak ada yang saya harapkan (putus harapan)	0.5431	0.5762
13	Saya rasa muram dan sedih	0.8320	0.4749
16	Saya tidak bersemangat langsung	0.7551	0.5905
17	Saya rasa diri saya tidak berharga	0.4213	0.5722
21	Saya rasa hidup ini tidak beerti lagi	0.2355	0.4253

JADUAL 7 Min skor soalan kaji selidik berkaitan tekanan

No.	Soalan	Min	SP
1	Saya rasa susah untuk bertenang	0.8712	0.5612
6	Saya cenderung bertindak secara berlebihan kepada sesuatu keadaan	0.7742	0.6143
8	Saya rasa saya terlalu gelisah	0.4646	0.6095
11	Saya dapati saya mudah resah	0.7121	0.6960
12	Saya merasa sukar untuk relaks	0.7750	0.6452
14	Saya tidak boleh terima apa jua yang menghalangi saya daripada meneruskan apa yang sedang lakukan	0.7772	0.5815
18	Saya mudah tersinggung	0.9212	0.5893

### Analisis Deskriptif Tahap Saringan Kebimbangan, Kemurungan dan Tekanan.

Analisis deskriptif dilakukan untuk melihat min skor bagi setiap tahap saringan setiap item yang dikaji. Jadual 8 menunjukkan analisis deskriptif skor min bagi setiap skor saringan kebimbangan, kemurungan dan tekanan. Min skor bagi saringan tahap kebimbangan adalah 1.55 (SP=2.15), skor saringan tahap kemurungan 1.88 (SP=1.94) dan min skor saringan tahap tekanan adalah 1.27 (SP=2.23).

Jadual 9 menunjukkan rujukan berdasarkan DASS 21 untuk menentukan tahap kebimbangan, kemurungan dan tekanan. Berdasarkan Jadual 9, hasil analisis min skor bagi tahap saringan kemurungan, kebimbangan, kemurungan dan tekanan dalam kalangan responden adalah berada pada tahap rendah.

Jadual 10 menunjukkan majoriti responden berada di tahap normal iaitu sebanyak

60% (n=31) kemudian diikuti dengan responden yang berada di tahap ringan 23% (n=12), 9% (n=5) merupakan responden yang di tahap sederhana, seterusnya responden yang berada di tahap teruk dan sangat teruk masing-masing 6% (n=3) dan 2% (n=1)

Jadual 11 menunjukkan majoriti responden berada di tahap normal iaitu sebanyak 71% (n=37) kemudian diikuti dengan responden di tahap ringan 17% (n=9). Seterusnya 8% (n=4) berada di tahap sederhana dan 4% (n=2) di tahap teruk.

Jadual 12 menunjukkan majoriti responden berada di tahap normal iaitu sebanyak 86% (n=45) kemudian diikuti dengan responden di tahap ringan dan normal dengan peratusan masing-masing sebanyak 6% (n=3). Seterusnya responden yang berada di tahap teruk adalah sebanyak 2% (n=1).

JADUAL 8 Min skor tahap saringan (N=52)

Skor Saringan	Min	SP	Tahap
Kebimbangan	1.55	1.17	Rendah
Kemurungan	1.88	0.96	Rendah
Tekanan	1.27	1.48	Rendah

JADUAL 9 Skor min

Skor min	Tahap
1.00 – 2.33	Rendah
2.34 – 3.66	Sederhana
3.67 – 5.00	Tinggi

JADUAL 10 Skor saringan kebimbangan

Skor saringan kebimbangan	Frekuensi	Peratusan (%)
Sangat Teruk	1	2
Teruk	3	6
Sederhana	5	9
Ringan	12	12
Normal	31	60

JADUAL 11 Skor saringan kemurungan

Skor saringan kemurungan	Frekuensi	Peratusan (%)
Sangat Teruk	0	0
Teruk	2	4
Sederhana	4	8
Ringan	9	17
Normal	37	71

JADUAL 12 Skor saringan tekanan

Skor saringan tekanan	Frekuensi	Peratusan (%)
Sangat Teruk	0	0
Teruk	1	2
Sederhana	3	6
Ringan	3	6
Normal	45	86

### Hubungkait Prevalens Tekanan Dengan Faktor-faktor Yang Dikaji

Jadual 13 menunjukkan hubungan antara tekanan dan faktor sosiodemografi seperti umur, indeks jisim badan, tahap pendidikan dan amalan merokok. Berdasarkan Jadual 13, seramai 86.7% responden berumur daripada 40 tahun dan kurang, mengalami tekanan yang normal, dan 13.3% mengalami tekanan yang berat. Manakala seramai 90.9% responden berumur 40 tahun dan lebih mengalami tekanan yang normal dan hanya 9.1% mengalami tekanan yang berat.

Dari segi kaitan dengan BMI, menunjukkan majoriti responden (83.3%) mengalami tekanan yang normal/ringan adalah responden yang tidak mengalami masalah obesiti dan hanya 16.7% daripadanya mengalami masalah tekanan yang sederhana/berat. Manakala responden yang mengalami masalah obesiti menunjukkan seramai 95.5% mengalami tekanan yang normal/ringan dan hanya 4.5% mengalami tekanan yang sederhana/berat.

Bagi responden yang mempunyai taraf pendidikan diploma, sebanyak 92.9% responden mengalami tekanan yang normal/ringan dan hanya 7.1% daripadanya mengalami tekanan yang

sedehana/berat. Manakala responden yang mempunyai ijazah dan ke atas pula, menunjukkan seramai 83.3% responden mengalami tekanan yang normal/ringan dan hanya 16.7% daripadanya mengalami tekanan yang sederhana/berat. Dalam kalangan responden adalah tidak merokok, 87.5% daripadanya mengalami tekanan normal/ringan di mana 12.5% responden dengan tekanan yang sederhana/berat. Bagaimanapun hubungkait tekanan dengan semua faktor sosiodemografi menunjukkan tiada hubungan yang signifikan secara analisis statistik ( $p > 0.05$ ).

Berdasarkan Jadual 14, menunjukkan seramai 66.7% Pegawai sains mengalami tekanan yang normal/ringan, hanya 33.3% daripadanya mengalami tekanan yang sederhana/berat. Bagi Jawatan Pekerjaan untuk Staf pelaksana pula, seramai 95% responden mengalami tekanan normal/ringan, manakala hanya 5% daripadanya mengalami tekanan yang sederhana/berat. Dari segi amalan pekerjaan yang terdedah kepada hazard, menunjukkan seramai 87.2% responden mengalami tekanan yang normal/ringan, manakala 12.8% daripadanya mengalami tekanan yang sederhana/berat. Dari segi jumlah jam bekerja, seramai 91.3% responden yang bekerja 8 jam dan

kurang, mengalami tekanan yang normal/ringan, hanya 8.7% daripadanya mengalami tekanan yang sederhana/berat. Bagi responden yang bekerja 8 jam dan lebih, sebanyak 86.2% daripadanya mengalami tekanan yang normal/ringan dan hanya

13.8% yang mengalami tekanan yang sederhana/berat. Bagaimanapun, tiada hubungan yang signifikan hubungkait antara tekanan dan kesemua faktor pekerjaan secara analisis statistik ( $p > 0.05$ ).

JADUAL 13 Ciri-ciri berkaitan faktor sosiodemografi dengan tekanan

Faktor sosiodemografi	Tekanan		Jumlah	X <sup>2</sup>	p Value
	Normal/Ringan	Sederhana/Berat			
Umur (Tahun)					
≤40	26 (86.7%)	4(13.3%)	30	0.224	0.636
40 >	20 (90.9%)	2 (9.1%)	22		
Indeks Jisim Badan (BMI)					
Obese	21 (95.5%)	1 (4.5%)	22	1.827	0.176
Tidak Obese	25 (83.3%)	5 (16.7%)	30		
Tahap Pendidikan					
≤Diploma	26 (92.9%)	2 (7.1%)	28	1.148	0.284
Ijazah>	20 (83.3%)	2 (16.7%)	24		
Amalan Merokok					
Ya	4 (100%)	0 (0%)	48	0.565	0.452
Tidak	42 (87.5%)	6 (12.5%)	4		

\*Ujian Khi Kuasa Dua  $P < 0.05$  diambil sebagai perbezaan bererti.

JADUAL 14 Ciri-ciri berkaitan faktor pekerjaan dengan tekanan

Faktor Pekerjaan	Tekanan		Jumlah	X <sup>2</sup>	p Value
	Normal/Ringan	Sederhana/Berat			
Jawatan Pekerjaan					
Pegawai Sains	8 (66.7%)	4 (33.3%)	12	0.565	0.452
Staf Pelaksana	38 (95%)	2 (5 %)	40		
Amalan Pekerjaan					
Hazad	34 (87.2%)	5 (12.8%)	39	0.251	0.616
Tiada Hazad	1 (92.3%)	1 (7.7 %)	13		
Jumlah Jam Bekerja					
≤8	21 (91.3%)	2 (8.7%)	23	0.327	0.568
8>	25 (86.2%)	4 (13.8%)	29		

\*Ujian Khi Kuasa Dua  $P < 0.05$  diambil sebagai perbezaan bererti.

## PERBINCANGAN

### Analisis Sosiodemografi

Hasil kajian juga mendapati seramai 55.8% responden yang mempunyai Indeks Jisim Badan berat badan yang berlebihan, manakala 44.2% responden adalah normal. Faktor ini disebabkan oleh kurangnya tahap kesedaran terhadap

pengambilan makanan oleh pegawai sains dan staf pelaksana itu sendiri.

Majoriti iaitu sebanyak 53.8% daripada mereka mempunyai taraf pendidikan di peringkat tertier dan 46.2% mempunyai tahap pendidikan di peringkat ijazah sarjana muda dan ke atas. Untuk menjawat jawatan sebagai Pegawai sains dan staf pelaksana, perlulah berada di kumpulan

pengurusan dan professional dan kelayakan adalah diploma dan ijazah sarjana muda dalam bidang berkaitan yang diiktiraf oleh kerajaan daripada institusi pengajian tinggi tempatan atau kelayakan yang diiktiraf setaraf dengannya (Suruhanjaya Perkhidmatan Awam).

Sebanyak 71% daripada responden telah mendirikan rumah tangga, manakala hanya 21% responden masih bujang. Majoriti 92% daripada responden tidak menghisap rokok dan baki 8% responden adalah merokok, salah faktor yang mempengaruhi tidak merokok adalah kerana majoriti daripada responden adalah wanita. Oleh yang demikian, Majoriti responden mempunyai sihat tubuh badan dan tanpa penyakit iaitu seramai 88%, manakala 12% responden mempunyai tahap kesihatan tidak sihat. Antara penyakit menyebabkan masalah kesihatan adalah darah tinggi, kencing manis, asma dan lain-lain.

#### **Analisis Ciri-ciri Pekerjaan**

Majoriti responden bekerja sebagai staf pelaksana (77%), manakala 23% bekerja sebagai pegawai sains. Kajian mendapati sebanyak 55.7% responden bekerja dalam tempoh melebihi 10 tahun, manakala 44.3% bekerja kurang daripada 10 tahun. Manakala dari segi jam bekerja, menunjukkan sebanyak 57.7% responden bekerja 8 jam sehari, manakala 42.3% bekerja melebihi 8 jam sehari.

Kajian menunjukkan sebanyak 73% responden menggunakan Alat Pelindung Diri (PPE) semasa bekerja. Penggunaan PPE adalah salah satu daripada langkah-langkah penting untuk melindungi pekerja daripada pendedahan kepada bahaya pekerjaan (Malik N et al. 2010 & Akintayo WL 2013). Kebanyakan responden memakai penutup muka dan kot makmal ketika menjalankan tugas, 63% responden menggunakan sarung tangan, 27% responden menggunakan kasut bot dan 5.8% menggunakan alat pelindung mata. Program pengurusan keselamatan perlu mengambil kira yang ada bagi semua PPE yang diperlukan untuk menggalakkan kesihatan dan keselamatan di tempat kerja.

Sebanyak 98% responden mengakui bahawa tempat kerja mereka mempunyai sistem pengudaraan, di mana 65% daripadanya menggunakan pengudaraan setempat dan 35% pengudaraan berpusat. Peningkatan kadar pengudaraan biasanya akan meningkatkan kualiti

udara yang lebih baik (Seppanen et al. 2005). Bagi penggunaan penutup muka, sebanyak 52% daripada responden menggunakan penutup muka ketika bekerja. Kekekapan penggunaan penutup muka melebihi 1 jam melibatkan sebanyak 59.2% daripada responden. Majoriti responden (88.8%) menyatakan bahawa bekalan penutup muka di tempat kerja mereka adalah mencukupi.

Selain itu, 77% responden menyatakan bahawa terdapat hazard di tempat kerja mereka. Bagaimanapun, majoriti responden menyatakan bahawa persekitaran ruang bekerja adalah di dalam tahap puas hati iaitu 55.7%, namun hanya 15.4% responden tidak berpuas hati dengan persekitaran atmosfera ruang tempat mereka bekerja.

#### **Analisis Deskriptif Soalan Kaji Selidik**

Analisis deskriptif bertujuan untuk menilai min skor bagi setiap soalan dan skor min bagi tahap saringan item kemurungan, kebimbangan dan tekanan yang dikaji. Berdasarkan hasil kajian, didapati bahawa soalan nombor 3 iaitu “saya seolah-olah tidak dapat mengalami perasaan positif sama sekali”, memiliki skor min yang tertinggi dengan bacaan 0.9320 (SP=0.5951) bagi item kemurungan. Ini kerana penyebab kemurungan seperti masalah emosi, masalah ekonomi, faktor persekitaran, latar belakang responden, masalah keluarga, kebimbangan, tidak berminat dengan kerja harian, masalah percintaan dan sebagainya merupakan antara penyebab meletakkan min yang tinggi pada soalan tersebut.

Hasil kajian juga mendapati bahawa min skor tertinggi bagi soalan yang tergolong dalam item kebimbangan adalah soalan nombor 2, iaitu “saya sedar mulut saya rasa kering” memiliki bacaan 1.1708 (SP=0.6787). Soalan tersebut mempunyai nilai min yang tinggi dalam kategori pengujian kebimbangan kerana pada ketika kaji selidik dilakukan, terdapat responden yang sedang melakukan tugas rutin di makmal. Justeru itu, responden terbabit meletakkan skor yang tinggi pada soalan berkenaan.

Skor bagi pungutan min tertinggi bagi soalan dalam kategori tekanan adalah soalan ke-18 iaitu “saya mudah tersinggung” dengan nilai min 0.9212 (SP=0.5893). Melalui pemantauan yang dilakukan pada ketika kaji selidik dilakukan, didapati bahawa sesetengah responden dilihat dalam keadaan letih. Namun setelah dipantau sebab dan akibat terhadap reaksi tersebut, maka

didapati bahawa pada ketika itu, rata-rata responden memiliki masalah yang tiada kaitan dengan pekerjaan masing-masing. Maka situasi berkenaan boleh disimpulkan bahawa faktor pekerjaan bukanlah penyebab kepada masalah tersebut.

#### **Analisis Deskriptif Tahap Saringan Item Kemurungan, Kebimbangan dan Tekanan**

Analisis dapatan kajian menunjukkan bahawa majoriti responden adalah normal bagi tahap kemurungan namun sebanyak 4% responden memiliki simptom kebimbangan yang berada di tahap sederhana/teruk. Peratusan ini tidaklah begitu besar namun ia perlu diberi perhatian juga oleh pihak pengurusan. Ini kerana hasil kajian juga mendapati bahawa sebanyak 17% responden memiliki gejala kemurungan di tahap ringan, manakala 8% responden berada di tahap sederhana. Ini disokong berdasarkan soal selidik kesihatan dan morbiditi kebangsaan 2011, menunjukkan seramai 12% daripada rakyat Malaysia berusia di antara 18 ke 60 tahun menghadapi gangguan kesihatan mental, termasuklah kemurungan. Mereka yang berisiko tinggi ialah di kalangan wanita dari sosioekonomi yang mencabar serta yang mempunyai masalah kesihatan fizikal. Hal ini dapat dibuktikan dengan kajian terkini menunjukkan kemurungan di kalangan rakyat Malaysia ialah di antara 8 hingga 12 peratus (Ng, 2014).

Zubaidi dan Ahmad (2011) telah menyatakan kefahaman berkaitan agama merupakan aset pelindung dalam mengatasi masalah disebabkan kemurungan. Hasil daripada kajian, walaupun hasil kajian tidak menunjukkan peratusan yang tinggi, ia mampu menyumbang dan juga berpotensi kepada masalah tekanan emosi dan seterusnya membunuh diri.

Selain itu, saringan kebimbangan turut dilakukan dan didapati bahawa skor item kemurungan responden secara keseluruhan adalah normal namun yang berada di tahap sangat teruk adalah sebanyak 2% manakala 6% berada di tahap teruk. Seterusnya, responden di tahap sederhana pula adalah kira-kira 9% manakala di tahap ringan adalah 23%. Skor item kebimbangan mencatatkan nilai yang tinggi berbanding kemurungan. Ini dipercayai bahawa kebanyakan soalan yang tergolong dalam pengujian tahap kebimbangan menguji kenormalan fungsi fisiologi badan.

Di Malaysia, satu kajian mendapati bahawa terdapat pelajar menghadapi masalah kebimbangan dengan peratusan sebanyak 54.5%. Faktor pekerjaan antara salah satu faktor yang turut mempengaruhi kesihatan mental. Analisis menunjukkan terdapat 34% responden mengalami gejala keresahan di tahap yang sederhana manakala 29% responden mempunyai kebimbangan yang teruk berdasarkan DASS 21.

Skor kemurungan dalam kalangan responden yang berusia 20 tahun ke atas dan mereka yang dilahirkan di luar bandar adalah lebih tinggi (Khadijah et al. 2013). Kemurungan yang kronik akan memberi kesan yang besar kepada kualiti hidup secara keseluruhannya (Kessler & Wittchen 2000). Ini menunjukkan bahawa kebanyakan kajian membuktikan bahawa faktor pekerjaan bukanlah penyumbang utama kepada masalah kebimbangan.

Hasil kajian juga mendapati bahawa skor item tekanan responden secara majoritinya adalah normal namun yang berada di tahap teruk adalah seramai 2%, manakala responden yang berada di tahap sederhana dan ringan masing-masing mencatatkan bacaan seramai 6%. Gejala tekanan ini merupakan perkara yang paling luas dikaji dalam kebanyakan kajian prevalens kesihatan mental.

Tekanan merupakan satu fenomena yang penting dan seringkali dikaitkan dengan prestasi kerja, kesihatan dan tahap produktiviti individu atau pekerja (Rohany & Fatimah 2006). Menurut kajian oleh Mohd A. I., et al. (2010), mendapati bahawa majoriti responden yang dikaji, 77% bersetuju tekanan dalam pekerjaan telah meningkat sejak kebelakang ini.

Hampir separuh pekerja Malaysia bekerja lebih 8 jam sehari dan membawa pulang kerja secara tetap untuk diselesaikan pada sebelah malam. Situasi sebegini boleh menyebabkan seseorang itu berada dalam tekanan dan pastinya banyak implikasi negatif akan berlaku. Situasi ini jelas menggambarkan bahawa tekanan di tempat kerja merupakan perkara yang perlu dipandang serius oleh semua pihak.

Analisis hubungkait tekanan dengan faktor sosiodemografi mendapati bahawa tiada hubungan yang signifikan antara tekanan dengan umur ( $p > 0.04$ ;  $p = 0.636$ ) dan Indeks Jisim Badan ( $p > 0.05$ ;  $P = 0.176$ ). Sementara itu, didapati bahawa tiada hubungan signifikan bagi tahap pendidikan

dan amalan merokok dengan masing-masing ( $p > 0.05$ ;  $p = 0.284$ ) dan ( $p > 0.05$ ;  $p = 0.852$ ). Berdasarkan hasil kajian, tiada hubungkait yang signifikan antara tekanan dengan faktor sosiodemografi ( $p > 0.05$ ).

Analisis hubungkait tekanan dengan faktor pekerjaan, menunjukkan bahawa tiada hubungan signifikan antara tekanan dengan jawatan pekerjaan ( $p > 0.05$ ;  $p = 0.452$ ). Selain itu, bagi amalan pekerjaan dan jumlah jam bekerja masing-masing menunjukkan tiada hubungan yang signifikan ( $p > 0.05$ ;  $p = 0.616$ ) dan ( $p > 0.05$ ;  $p = 0.568$ ).

### KESIMPULAN

Berdasarkan kajian yang dijalankan, tahap kemurungan kebimbangan dan tekanan telah dapat dikenalpasti. Dengan Menggunakan kajian keratan rentas, seramai 52 orang responden telah terlibat. Antara responden kajian adalah terdiri daripada 12 orang responden yang mewakili pegawai sains dan 40 orang responden mewakili staf pelaksana iaitu penolong pegawai sains dan juruteknologi makmal perubatan di Fakulti Sains Kesihatan Universiti Kebangsaan Malaysia Kampus Kuala Lumpur. Borang kaji selidik telah digunakan dan terdiri daripada komponen demografi, item kemurungan, item kebimbangan dan item tekanan. Majoriti responden adalah wanita (78.8%), berbangsa Melayu (98%), berumur antara 30 hingga 39 tahun (48.1%), mempunyai Indeks Jisim Badan yang berlebihan (55.8%), memiliki tahap pendidikan yang tinggi (53.8%), sudah berkahwin (71%) dan tidak merokok (92%).

Berdasarkan dapatan kajian skor kemurungan, kebimbangan dan tekanan adalah berada ditahap rendah. Dapatan kajian juga menunjukkan bahawa tiada perbezaan yang signifikan ( $p > 0.05$ ) bagi item tekanan dengan faktor yang dikaji. Didapati bahawa, tiada hubungkait yang bererti antara tekanan dengan faktor sosiodemografi dan di dapati tiada hubungan bererti di antara tekanan dengan faktor pekerjaan (ujian khi-kuasa dua  $p > 0.05$ ). Didapati bahawa, tiada hubungkait yang bererti antara tekanan dengan faktor sosiodemografi dan di dapati tiada hubungan bererti di antara tekanan dengan faktor pekerjaan (ujian khi-kuasa dua  $p > 0.05$ ). Kajian ini menunjukkan faktor yang dikaji iaitu

sosiodemografi dan pekerjaan tidak menyumbang kepada tekanan.

Tahap Kesihatan Mental boleh memberikan kesan terhadap kesihatan fizikal. Penyakit mental yang serius boleh memberikan impak terhadap kehidupan. Justeru itu pihak majikan disarankan agar mengekalkan amalan kerja yang selamat serta memantapkan lagi program kesihatan mental agar boleh dilaksanakan oleh pihak pengurusan seperti mengadakan kaunseling bagi mereka yang memerlukan terapi kemurungan atau tekanan, mengadakan bengkel pengurusan diri dan aktiviti riadah. Program promosi kesihatan mental boleh dicadangkan kepada pihak majikan dalam usaha mencegah kemurungan, kebimbangan dan tekanan di kalangan pegawai sains dan staf pelaksana.

### RUJUKAN

- Akintayo WL. 2013. Knowledge, attitude and practice on the use of personal protective equipment by traditional resist Fabrics workers in Abeokuta, Nigeria. *Kuwait Rev Chapter Arabian J Bus Manag Rev.* 2013;2(7):31–3. American Psychiatric Association. 2009. Newborn reaction can predict depression and anxiety. <http://apa.org/monitor/2009/02/newborn.aspx> 40 (20): 13 [February 2009].
- Cooper, C.L. & Marshall, R. 1978. *Work and Stress*. Chichester: John Willy & Sons. Erika D., Caroline F., A.C., Valeria. 2014. Quality of Life, Depressive Symptoms and Religiosity In Elderly Adults: A Cross-Sectional Study. 23(3):648-55.
- Harris, C. 2003. *Minimize Stress, Maximize Success Effective Strategies For Realizing Your Goals*. Canada: Duncan Baird Publishers.
- Hockey, G.R.J. & Wiethoff, M. 1990. Assessing patterns of adjustment to the demands of work. In Allegra, S.P. & Oliverio, A. (Editor) *Psychobiology of Stress*, pg. 231-239. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Institute for Public Health (IPH) 2014. *Kajian Morbiditi Kebangsaan 2014: Malaysian Adult Nutrition Survey*. Vol 1: methodology and general findings.
- Kessler, R.C & Wittchen, H.U., 2000. Anxiety and Depression: The impact of shared characteristic on diagnosis and treatment. Introduction. *Acta psychiatrica scandinavica Supplementum* 406, 5-6.
- Khadijah, S. et al. 2013. Correlates of depression, anxiety and stress among Malaysian university students. *Asian Journal Psychiatric* 2013.

- Lovibond, P.F., & Lovibond, S. H. 1995. The Structures of Negative Emotional States: Comparison of The Depression Anxiety Stress Scales (DASS) With The Beck Depression and Anxiety Inventories. *Behaviour Research and Therapy* 33:335-343.
- Lovibond, P.F., & Lovibond, S. H. 1995. *Manual for Depression Anxiety Stress Scales*. Ed. Ke-2. Sydney: Psychology Foundation.
- Malik N, Mean AA, Pasha TS, Akhtar S, Ali T. 2010. Role of hazard control measures in occupational health and safety in the textile industry of Pakistan. *Pak J Agri Sci*. 2010;47(1):72-6.
- Mohd A. I., Maureen F. Dollard, Anthony H. Winefield, 2010. "Lay theory explanation of occupational stress: the Malaysian context", *Cross Cultural Management: An International Journal*, Vol 17 Issue: 2, p.p 135-153.
- Ng. C, G., 2014. A review of depression research in Malaysia, *Medical Journal Malaysia* 2014
- WHO. 2012. *Prevention of mental disorder*. Geneva: World Health Organization.
- Rohany N. & Fatimah O. 2006. *Kesejahteraan Manusia; Perspektif Psikologi Kajian tekanan kerja dan kesihatan pekerja*. Universiti Kebangsaan Malaysia. Selangor
- Seppanen, OA, Fisk, WJ, Mendell, MJ. 2005. Association of ventilation rates and CO<sub>2</sub>-concentrations with health and other responses in commercial and institutional buildings, *Indoor Air*, 9, 252-274.
- Zubaidi & Ahmad. 2011. Rawatan Terbaik Untuk Anxiety 'Anxiety Disorder'. <http://drzubaidi.com/blog/?p=1261> [15 Januari 2011].

Anuar Ithnin\*  
Amirul Razak  
Environmental Health and Industrial Safety  
Program, Faculty of Health Sciences, Universiti  
Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul  
Aziz, 50300 Kuala Lumpur

\*Corresponding author: [anuarithnin@gmail.com](mailto:anuarithnin@gmail.com)



## **Preliminary Study of Antimicrobial Potential of *Pandanus amaryllifolius* Leaves Using Methanol Solvent Extract Against Pathogenic Bacteria**

HARTINI YUSOF, FATHIN NUR'EZZAH HISHAMUDDIN, REENA LEEBA RICHARD,  
MOHAMAD AZLAN ABD MAJID, ZED ZAKARI ABDUL HAMID

### **ABSTRACT**

The alarming rate of diseases coupled with the undesirable side effects and resistance towards synthetic drugs had changed the world's attention to use medicinal plants, hence, led us to study on the antimicrobial activity of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. leaves extract against selected bacterial strains. Methanol-based extraction method was used in Antimicrobial Susceptibility Testing (AST), Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) tests as well as phytochemical compounds analysis to identify the possible findings. Results showed that the extract has antimicrobial activity against pathogenic bacteria *S. aureus* (ATCC 43300) and *P. mirabilis* (ATCC 12453) but resistant against *E. coli* (ATCC 25922) and *P. aeruginosa* (ATCC 10145). In addition, *P. mirabilis* (ATCC 12453) has greater antimicrobial effect with MBC value of 500 mg/mL compared to 1000mg/mL MBC value for *S. aureus* (ATCC 43300). The extract also revealed the presence of alkaloids, flavonoids, phenols, tannins, steroids, terpenoids, and carbohydrates compounds. Thus, methanol extract of *P. amaryllifolius* leaves has the potential as an antimicrobial agent with the presence of phytochemical compounds. This study is crucial as it is able to contribute for future studies that may also incorporate other parts of the plant and subsequently, investigate other potential medicinal plants.

**Keywords:** *Pandanus amaryllifolius*, methanol, antimicrobial activity, pathogenic bacteria, phytochemical compound

### **ABSTRAK**

Kadar peningkatan penyakit dengan kesan sampingan dan ketahanan terhadap ubat-ubatan sintetik telah mengubah perhatian global untuk menggunakan ubat-ubatan yang berasaskan tumbuhan. Situasi ini telah menjadi antara faktor utama untuk menjalankan kajian mengenai aktiviti antimikrobial daripada ekstrak daun *Pandan amaryllifolius* Roxb. terhadap jenis bakteria yang terpilih. Kaedah pengekstrakan berasaskan metanol telah digunakan untuk ujian 'Antimicrobial Susceptibility Testing' (AST), 'Minimum Inhibitory Concentration' (MIC) dan 'Minimum Bactericidal Concentration' (MBC) serta analisis sebatian fitokimia untuk mengenal pasti kemungkinan yang lain. Hasil kajian menunjukkan bahawa ekstrak mengandungi aktiviti antimikrobial terhadap bakteria patogenik seperti *S. aureus* (ATCC 43300) dan *P. mirabilis* (ATCC 12453) tetapi resisten terhadap *E. coli* (ATCC 25922) dan *P. aeruginosa* (ATCC 10145). Di samping itu, *P. mirabilis* (ATCC 12453) mempunyai kesan antimikrobial yang lebih tinggi dengan nilai MBC sebanyak 500 mg/mL berbanding *S. aureus* (ATCC 43300) dengan 1000 mg/mL. Ekstrak daun juga mengandungi sebatian alkaloid, flavonoid, fenol, tannin, steroid, terpenoid, dan karbohidrat. Kesimpulannya, ekstrak metanol daun *P. amaryllifolius* mempunyai potensi sebagai agen antimikrobial dengan kehadiran sebatian fitokimia. Keputusan daripada kajian ini adalah penting kerana ianya dapat menyumbang untuk kajian lanjut dengan menggabungkan bahagian tumbuhan yang lain dan seterusnya dapat mengkaji khasiat tumbuhan lain yang berpotensi untuk diketengahkan.

**Kata kunci:** *Pandan amaryllifolius*, methanol, aktiviti antimikrobial, bakteria patogenik, sebatian fitokimia

## INTRODUCTION

Since the existence of human civilization, man has turned to nature to seek help in treating diseases. Preserved-written documents based on experiences had longed been an ample evidence between man and nature (Petrovska 2012). Medicinal plants has become a staple in health care organizations in both developing and developed countries, over the years. However, throughout the decades, the onset of modern era had propelled the pharmaceutical industries that led to produce many synthetic drugs and caused prominent problems that induce severe side effects to mankind. In recent years, there had been a widespread of upsurge interest in herbal remedies that are considered less harmful and inexpensive.

Furthermore, the alarming rate of the emergence of diseases throughout the world (Sivasankar et al. 2013) led to a huge burden on the medical care setting, hence, resulting in a global crisis (Farjana et al. 2014) since the prevention methods was still uncertain. In addition, the numbers of antibacterial-resistant are rapidly increasing, even there are persistent productions of new antibiotics since the last few decades (Nascimento et al. 2000). A study done by Farjana et al. (2014) revealed that the increasing number may be due to indiscriminate usage of commercial synthetic drugs. Thus, development of the drugs from natural product should be emphasized as one of the strategy to solve the problem and considered as an alternative remedies for future treatments (Habib Dzulkarnain & Abdul Rahim 2014).

*Pandanus amaryllifolius* Roxb. or normally called as Pandan, was used in this study. The plant is used mostly as flavouring agent for local recipes (Dumaoal et al. 2010) and was said to originate from the Moluccas Island that can also be easily found in tropical regions, such as Thailand, Indonesia, Singapore, the Philippines and Malaysia (Wakte et al. 2012). Over the decades, numerous studies were conducted on Pandan-derived compounds that were reported to contain anti-peptic (Ibrahim et al. 2016), antioxidant (Ali et al. 2008; Chong et al. 2012; Jimtaisong & Krisdaphong 2013; Mohd. Nor et al. 2008), anticancer (Chong et al. 2012; Kumar et al. 2008), antibacterial as well as antiviral activities

(Dumaoal et al. 2010; Jimtaisong & Krisdaphong 2013; Ooi et al. 2004; Ooi et al. 2006; Tan et al. 2008). The leaves of this plant were chosen for this study as it has been traditionally used in treating various diseases such as fever, diabetes and headache (Dumaoal et al. 2010; Wakte et al. 2012; Ysrael et al. 1995). Dumaoal et al. (2010) have also reported the presence of few secondary metabolites compounds in Pandan leaves extract (i.e. alkaloids, flavonoids, tannins and steroids) and also contained major aroma component (i.e. 2-acetyl-1-pyrroline) (Faras et al. 2014; Wongpornchai 2006; Yoshihashi 2002).

Hence, a great attention needs to be carried out to further investigate the antimicrobial activity of *Pandanus amaryllifolius* leaves extract against pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* via methanol extraction. In addition, preliminary phytochemical screening test was also performed in order to qualitatively screen the presence of phytochemical compounds and associate their presence with antimicrobial activity.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Two kilogram of leaves were collected locally from Jeram, Selangor. The leaves were prepared by washing steps and left to air-dry at room temperature for 9 days. The leaves were then dried in an oven for approximately 5 h at 30°C. Once dried, the leaves were grounded and the powder form was stored in a sterile plastic bag until further use. An approximate 180 g of leaves powder used for extraction but only 16.5 g of crude extract was obtained with 9.2% of weight extraction.

### Extraction method

Methanol was used as a solvent and extraction was carried out according to Chong et al. (2012), Faras et al. (2014), Farjana et al. (2014), Hamid et al. (2010), Hamid et al. (2011), Kumar and Vijayalakshmi (2013), Shan et al. (2007) and Sivasankar et al. (2013) with slight modifications. The crude extract obtained from evaporation process was weighed and kept into a sterile petri dish and stored at 4°C until further use.

### Selected microorganisms

The bacteria used in this study were *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) and *Proteus mirabilis* (ATCC 12453) that were obtained from Centre of Medical Laboratory Technology, UiTM, Puncak Alam Campus, Selangor.

### Antibiotic susceptibility testing (AST) test

The antimicrobial activities of the extract were observed using disc diffusion method. 20  $\mu$ L of 1000 mg/mL extract was transferred into a 6 mm diameter of sterile filter paper. The extract-impregnated disc was left air-dried in a sterile petri dish overnight before placing on top of an inoculated media. 5  $\mu$ g of ciprofloxacin was applied as positive control while 20  $\mu$ L of 50% DMSO solution was used as negative control. The culture plates were grown for 24 hrs at 37°C and the turbidity was maintained according to 0.5% MacFarland standard (Oskay 2011). Interpretation of sensitivity or resistance of the inhibition zones was determined by the measurement of diameter.

### Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) test

The inoculum suspension of bacteria used for MIC test was prepared only after the bacteria had shown sensitivity against the impregnated-extract disc of the leaves during AST test. The concentration of 1000 mg/mL extract was used in the test and serial dilution was carried out on the 96-well microtiter plate. The assay was performed in triplicates. The plate was sealed with aluminium foil and incubated at 37°C for 24 hrs. Meanwhile, wells that gave no visible growth of the tested organism were then proceeded for MBC test. 50  $\mu$ L of solution from clear wells in MIC test were sub-cultured onto a Nutrient agar (NA) plate and incubated at 37°C for 24 hrs. The test was also done in triplicates.

### Phytochemical analysis

The qualitative test of preliminary phytochemical screening was done according to method performed by Alabri et al. (2014), Kodangala et al. (2010) and Sharma et al. (2013) with slight modifications. The methanol extract of *Pandanus*

*amaryllifolius* leaves were screened for presence of alkaloids (using Wagner's test method), flavonoids (using Alkaline Reagent test method), tannins (using Ferric Chloride test method), phenols (using Ferric Chloride test method), saponins (using Froth test method), terpenoids (using Salkowski test method), carbohydrates (using Fehling test method) and steroids (using Salkowski test method). The assay was done triplicate for each type of phytochemical compound to obtain a reliable result.

## RESULTS AND DISCUSSION

From this pilot study, minimal exposure to the light was applied. This technique is crucial as to prevent decomposition of thermo-labile compounds and risk of chemical transformation due to high ultraviolet radiation as reported by Jones and Kinghorn (2005). Once completely dried, the leaves were finely grounded using a blender to increase the surface area of plant materials (Habib Dzulkarnain & Abdul Rahim 2014). The secondary bioactive compounds from the leaves were selectively separated from the plant tissue by dissolving it with methanol. Methanol was chosen as the solvent for extraction method as it was previously reported that the organic solvent can provide more antimicrobial activity in comparison to aqueous solvent (Habib Dzulkarnain & Abdul Rahim 2014), even though water may give the highest yield of concentration (Areekul et al. 2009). In addition, secondary active metabolites compound were also mentioned to be more soluble in both organic and polar solvent (Areekul et al. 2009; Habib Dzulkarnain & Abdul Rahim, 2014).

Furthermore, the antimicrobial activities from the leaves extract against *S. aureus* (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 10145) and *P. mirabilis* (ATCC 12453) were evaluated by the presence of zone inhibition, both quantitative and qualitative. Based on Table 1, the leaves extract has antimicrobial activity against *S. aureus* (ATCC 43300) with 7.0 mm mean of zone inhibition. The result is in agreement with a previous study done by Hamid et al. (2011) that documented the methanol crude extract of *P. amaryllifolius* leaves has moderate antimicrobial activity towards tested bacteria that includes *S. aureus*. The leaves extract also

showed antimicrobial activity against *P. mirabilis* (ATCC 12453). However, *P. aeruginosa* (ATCC 10145) was shown to be resistant towards the leaves extract as no zone inhibition was formed. Similarly, a study done by Dumaol et al. (2010) stated that the leaves extract showed no antimicrobial activity against *P. aeruginosa*. Moreover, several studies also reported that gram-negative bacteria were unaffected by plant extracts in comparison to gram-positive bacteria (Habib Dzulnain & Abdul Rahim 2014; Sivasankar et al. 2013). This condition may be due to an easy penetration of antimicrobial agents towards single layer of gram-positive cell wall (Sivasankar et al. 2013). Meanwhile, *E. coli* (ATCC 25922) was also found negative towards the leaves extract. However, the findings were contradicted with the results reported by Hamid et al. (2011). This may be due to the chosen solvent and method used in extraction process that may affect the quality of the obtained extract (Pandey & Tripathi 2014). Pandey and Tripathi (2014) had also stated that the variations between different techniques of extraction such as polarity and nature of solvents, may also influence the quality and composition of secondary active metabolites.

Meanwhile, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test was employed. This method is still considered a goal standard in determining the sensitivity of microorganism towards antimicrobial agent (Andrews 2001; Yilmaz 2012). In this study, *S. aureus* (ATCC 43300) and *P. mirabilis* (ATCC 12453) revealed to be susceptible towards *P. amaryllifolius* leaves extract in AST were then subjected to MIC test in broth microdilution using microtiter plate. The MIC value for *S. aureus* (ATCC 43300) was 125 mg/mL whilst *P. mirabilis* (ATCC 12453) was 250 mg/mL. The results were validated by the observation on each wells, either clear or turbid (e.g. the last well that appeared clear then, that particular well's extract concentration is considered as the MIC value for the bacterial strains). Therefore, the findings also revealed that the leaves extract has good bacteriostatic effects towards gram-positive bacteria, *S. aureus* (ATCC 43300) in comparison to gram-negative bacteria, *P. mirabilis* (ATCC 12453). Moreover, Minimum Bactericidal Concentration (MBC) test was also

performed to further confirmed the results obtained in MIC test. Tajkarimi et al. (2010) also mentioned that the method helped in determining which concentration of antimicrobial agent that able to eradicate 99.9% or more of the tested microorganism. Leaves extract gives a moderate bactericidal effect towards *P. mirabilis* (ATCC 12453) which had a lower MBC value compared to *S. aureus* (ATCC 43300), even though MIC value for *S. aureus* was lower than *P. mirabilis* (ATCC 12453). For *S. aureus*, only extract concentration of 1000 mg/mL showed completely no growth of the tested microorganism, hence, revealed the MBC value as 1000 mg/mL. Meanwhile *P. mirabilis* was observed without any growth at extract concentrations of 1000 mg/mL and 500 mg/mL. Therefore, the MBC value extract against *P. mirabilis* is 500 mg/mL. Both MIC and MBC values are also tabulated in Table 1.

In addition, phytochemical compounds obtained from plant extract are well known to possess various medicinal benefits such as antioxidant, anticancer, antifungal and antimicrobial activities (Alabri et al. 2014). From this study, the compound analysis of methanol explicitly revealed the presence of all tested compounds except for saponins. The results are as shown in Table 2. A similar study conducted by Dumaol et al. (2010) reported the presence of other compounds in water distillation method of *P. amaryllifolius* leaves but saponins were not detected. Hence, further studies on the presence of saponins compound can be done by using different types of solvent and/or concentration.

## CONCLUSION

*P. amaryllifolius* leaves has the potential to be used as an antimicrobial agent with the presence of phytochemical compounds that may contribute to its antimicrobial activity against tested bacterial strains. Although there is limited information available on antimicrobial characteristics of the leaf extracts, future studies can be incorporated to provide a better understanding on the other parts of the plants as well as other potential herbal remedies.

TABLE 1. AST, MIC and MBC results for *P. amaryllifolius* leaves extract against tested bacterial strains

Bacterial Strains	AST – Diameter Zone of Inhibition (mm)			MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
	Methanolic extract (1000 mg/mL)	Positive control (5 µg of Ciprofloxacin)	Negative control (DMSO)		
<i>S. aureus</i> (ATCC 43300)	7.0	20.0	0	125.0	1000.0
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0	26.0	0	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	0	24.0	0	NA	NA
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 12453)	6.9	25.0	0	250.0	500.0

AST = Antimicrobial Susceptibility Testing; DMSO = Dimethylsulfoxide; NA = Not Applicable; mm = millimeter; mg = milligram; mL = milliliter; µg = microgram

TABLE 2. Phytochemical compound screening tests of *P. amaryllifolius* leaves extract

Phytochemical compounds	Reaction
Alkaloids	+ve
Flavanoids	+ve
Tannins	+ve
Phenols	+ve
Saponins	-ve
Terpenoids	+ve
Carbohydrates	+ve
Steroids	+ve

+ = Presence of compound (positive); - = Absence of compound (negative)

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Faculty of Health Sciences, UiTM Selangor Branch, Puncak Alam Campus for providing the research infrastructure and financial support.

#### REFERENCES

Alabri T, Al Musalami A, Hossain M, Weli A, & Al-Riyami Q. 2014. Comparative study of

phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metel* L. J King Saud Uni. 26(3):237-243.

Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A, & Bora U. 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food Res Int. 41(1):1-15.

Andrews J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemoth. 48(1):5-16.

- Areekul V, Jiapiyasakul P, & Chandrapatya A. 2009. *In Vitro* antimicrobial screening of selected traditional Thai plants. *Thai J Agric Sci.* 42(2):81-89.
- Chong HZ, Yeap SK, Rahmat A, Akim AM, Alitheen NB, Othman F, & Gwendoline-Ee CL. 2012. *In vitro* evaluation of *Pandanus amaryllifolius* ethanol extract for induction of cell death on non-hormone dependent human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cell via apoptosis. *BMC Complem Altern M.* 12:134.
- Dumaol OSR, Alaras LB, Sarah KGD, Depadua AA, & Pulmones CJG. 2010. *In vitro* activity of pandan (*Pandanus amaryllifolius*) leaves crude extract against selected bacterial isolates. *JPAIR Multidiscip J.* 4(1):102-124.
- Faras AF, Wadkar SS, & Ghosh JS. 2014. Effect of leaf extract of *Pandanus amaryllifolius* (Roxb.) on growth of *Escherichia coli* and *Micrococcus (Staphylococcus) aureus*. *Int Food Res J.* 21(1):421-423.
- Farjana A, Zerine N, & Kabir M. 2014. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pac J Trop Dis.* 4(2):S920-S923.
- Habib Dzulkarnain, SM, & Abdul Rahim, I. 2014. Antimicrobial activity of methanolic neem extract on wound infection bacteria. Paper presented at the International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences (BCES-2014), 14-15 June, Penang, Malaysia. Retrieved from [iicbe.org/upload/4396C614061.pdf](http://iicbe.org/upload/4396C614061.pdf).
- Hamid K, Saha M, Urmi K, Habib M, & Rahman M. 2010. Screening of different parts of the plant *Pandanus odoratus* for its antioxidant activity. *Int J Appl Biol Pharm.* 1(3):1364-1368.
- Hamid K, Urmi K, Saha M, Mohamad Zufiker A, & Rahman M. 2011. Screening of different parts of the plant *Pandanus odoratus* for its cytotoxic and antimicrobial activity. *J Pharma Sci Res.* 3(1):1025-1028.
- Ibrahim IAA, Abdulla MA, Hajrezaie M, Bader A, Shahzad N, Al-Ghamdi SS, Gushah AS, & Hasanpourghadi M. 2016. The gastroprotective effects of hydroalcoholic extract of *Monolluma quadrangula* against ethanol-induced gastric mucosal injuries in Sprague Dawley rats. *Drug Des Dev Ther.* 10:93-105.
- Jimtaisong A, & Krisdaphong P. 2013. Antioxidant activity of *Pandanus amaryllifolius* leaf and root extract and its application in topical emulsion. *Trop J Pharm Res.* 12(3):425-431.
- Jones W, & Kinghorn A. 2005. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In *Natural Products Isolation*, edited by Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, and Alexander I. Gray. *Methods in Biotechnology*, vol 20. Humana Press.
- Kodangala C, Saha S, & Kodangkala P. 2010. Phytochemical studies of aerial parts of the plant *Leucas lavandulaefolia*. *Der Pharma Chemica.* 2(5):434-437.
- Kumar K, & Vijayalakshmi K. 2013. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of selected fruit wastes. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2(5):196-204.
- Kumar RS, Manivannan R, Balasubramaniam A, Natarajan R, & Rajkapoor B. 2008. Anticancer activity of *Pandanus fascicularis* Lam. *Biosci Biotechnol Res Asia.* 5(1):389-394.
- Mohd Nor F, Mohamed S, Idris NA, & Ismail R. 2008. Antioxidative properties of *Pandanus amaryllifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. *Food Chem.* 110(2):319-327.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, & Silva GL. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol.* 31(4):247-256.
- Ooi LSM, Sun SSM, & Ooi VEC. 2004. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaeae). *Int J Biochem Cell B.* 36(8):1440-1446.
- Ooi LSM, Wong EYK, Sun SSM, & Ooi VEC. 2006. Purification and characterization of non-specific lipid transfer proteins from the leaves of *Pandanus amaryllifolius*. *Peptides.* 27(4):626-632.
- Oskay M. 2011. Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp., KGG32. *Int J Agric Biol.* 13:317-324.
- Pandey A, & Tripathi S. 2014. Concept of standardization, extraction and pre-phytochemical screening strategies for herbal drug. *J Pharmacogn Phytochem.* 2(5):115-119.
- Petrovska BB. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Phcog Rev.* 6(11):1-5.
- Shan B, Cai Y, Brooks J, & Corke H. 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol.* 117(1):112-119.
- Sharma V, Aragawal A, Chaudhary U, & Singh M. 2013. Phytochemical investigation of various extracts of leaves and stems of *Achyranthes Aspera* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci.* 5(1):317-320.
- Sivasankar T, Rajan SA, Maina CC, & Suvarna VC. 2013. Antimicrobial activity of some important edible leaf extracts. *Insight Microbiol.* 3(2):15-18.

- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, & Cliver DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21(9):1199-1218.
- Tan MA, Takayama H, Aimi N, Kitajima M, Franzblau SG, & Nonato MG. 2008. Antitubercular triterpenes and phytosterols from *Pandanus tectorius* Soland. var *laevis*. *J Nat Med*. 62(2):232-235.
- Wakte K, Zanan R, Saini A, Jawali N, Thengane R, & Nadaf A. 2012. *Pandanus amaryllifolius* Roxb. cultivated as a spice in coastal regions of India. *Genet Resour Crop Ev*. 59(7):1583-1595.
- Wongpornchai S, Sriseadka T, & Choonvisase, S. 2003. Identification and quantitation of the rice aroma compound, 2-acetyl-1-pyrroline, in bread flowers (*Vallaris glabra* Ktze). *J Agr Food Chem*. 51:457-462.
- Yilmaz MT. 2012. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turk J Med Sci*. 42(2):1423-1429.
- Yoshihashi T. 2002. Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking. *J Food Sci*. 67(2):619-622.
- Ysrael MC, Santiago M, & Nonato MG. 1995. Diuretic studies of five *Pandanus* species. *Acta Manila*. 43:25-30.

Hartini Yusof  
Fathin Nur'Ezzah Hishamuddin  
Zed Zakari Abdul Hamid\*  
Centre of Medical Laboratory Technology,  
Faculty of Health Sciences,  
Universiti Teknologi MARA,  
Puncak Alam Campus,  
42300 Bandar Puncak Alam,  
Selangor Darul Ehsan, Malaysia.

Reena Leeba Richard  
Mohamad Azlan Abd Majid  
Department of Parasitology,  
Faculty of Medicine,  
University of Malaya,  
50603 Kuala Lumpur, Malaysia.

\*Corresponding author:  
zedhamid@salam.uitm.edu.my

## **Kehadiran *Acanthamoeba* dalam Swab Nasal Individu Normal** (Presence of *Acanthamoeba* sp. in Nasal Swabs of Normal Individual)

MOHAMED KAMEL ABD. GHANI, ANDRY DAUNI, ANISAH NORDIN, YUSOF SUBOH,  
NORAINA ABDUL RAHIM & NORAZAH AHMAD

### **ABSTRAK**

*Acanthamoeba* sp. adalah sejenis ameba hidup bebas yang tersebar luas di persekitaran semulajadi. Organisma ini boleh menyebabkan keratitis, meningoensefalitis ameba bergranuloma (GAE) dan infeksi kutaneous. Kajian ini dijalankan untuk memencilkan *Acanthamoeba* sp. daripada nasal, individu normal. Seramai 71 orang telah dijadikan subjek kajian yang terdiri daripada kanak-kanak Tadika Bijak, pelajar sekolah rendah dan sekolah menengah Tanjung Karang, pelajar UKM Kampus Kuala Lumpur, kakitangan pembersihan KTSN, pekerja kuari dan kakitangan yang berkhidmat dengan kerajaan. Pengambilan swab nasal dilakukan pada setiap subjek. Kesemua sampel dikulturkan mengikut tatacara piawai dan diinokulasikan ke atas plat agar bukan nutrien yang telah dititiskan dengan *Escherichia coli* matian haba. Plat agar kemudian dieram pada suhu 30°C dan diperiksa setiap hari selama 14 hari di bawah mikroskop kebalikan untuk mengesan sebarang kehadiran trofozoit *Acanthamoeba* sp. Hasil kajian ini mendapati *Acanthamoeba* sp. berjaya dipencilkan daripada nasal individu normal dengan peratusan sebanyak 5.6%. Hasil positif diperolehi daripada pelajar UKM Kampus Kuala Lumpur dan keputusan ini membuktikan kehadiran *Acanthamoeba* sp. pada nasal individu normal. Kumpulan *Acanthamoeba* yang dipencil terdiri daripada kumpulan polyphagids dan culbertsonids. Golongan yang berisiko tinggi untuk memberikan hasil positif juga dikenalpasti iaitu mereka yang mempunyai sejarah terdedah dengan persekitaran berdebu dan bersentuhan dengan tanah.

Kata kunci: Isolasi; *Acanthamoeba*; Swab nasal; Malaysia

### **ABSTRACT**

*Acanthamoeba* sp. is a free-living amoeba that is widely distributed in the natural environment. This organism can cause keratitis, granulomatous amoebic meningoencephalitis (GAE) and cutaneous infection. This study was carried out to isolate *Acanthamoeba* sp. from nasal of normal individual. A total of 71 persons had been recruited as subjects which consist of children from Tadika Bijak, students from primary and secondary school around Tanjung Karang, students of the UKM Kuala Lumpur Campus, KTSN's cleaners, quarry workers and government staffs. Nasal swabs were collected from all subjects. All samples were cultured using standard method and inoculated on non-nutrient agar plates overlaid with *Escherichia coli*. The plates were incubated at 30°C and examined daily using inverted microscope for 14 days for the presence of trophozoites or cysts of *Acanthamoeba* sp. The result of this study established that *Acanthamoeba* spp. were successfully isolated from nasal cavity of normal individual at a percentage of 5.6%. Positive results came from students of UKM Kuala Lumpur Campus and these results proved the presence of *Acanthamoeba* sp. in the nasal cavity of normal individual. The *Acanthamoeba* groups isolated are the polyphagids and culbertsonids. The group of people at risk of harbouring *Acanthamoeba* had also been identified as those who had a history exposure to dusty environment and contact with soil.

Key words: Isolation; *Acanthamoeba*; Nasal swab; Malaysia.



## PENGENALAN

Ameba yang tergolong dalam genera *Acanthamoeba* adalah hidup bebas dan tersebar luas dalam persekitaran semula jadi (Martinez & Visvesvara 1997) di seluruh dunia. Ia dapat dipencilkan daripada tanah, debu, udara, air semula jadi dan yang dirawat, air laut, kolam renang, air kumbahan, sedimen, unit pendingin udara, air paip domestik, unit rawatan gigi, unit dialisis dan hospital, bekas pencuci mata dan peralatan kanta sentuh. *Acanthamoeba* adalah agen penyebab kepada meningoensefalitis ameba bergranuloma (GAE), sejenis penyakit pada sistem saraf pusat (SSP) yang boleh membawa kematian dan keratitis ameba (AK), sejenis penyakit mata yang boleh mengancam penglihatan seseorang (Jones et al. 1975; Nagington et al. 1974). Kajian mendapati *Acanthamoeba* sp. juga berkait rapat dengan lesi kutaneus dan sinusitis dalam pesakit AIDS dan individu lain yang terimunokompromi (Dunand et al. 1997; Friedland et al. 1992; Gullet et al. 1979).

Di Malaysia, pemencilan *Acanthamoeba* sp. daripada peralatan kanta sentuh, persekitaran akuatik, tanah, udara, pasir pantai, air laut dan air paip telah berjaya dilakukan oleh penyelidik tempatan (Mohamed Kamel et al. 2013; Mohamad Hasrul 2004; Mohamed Kamel et al. 2017; Wan Norliana 2002). Manusia kemungkinan mempunyai kontak yang kekal dengan organisma ini terutamanya peringkat sista yang resistan (Mergeryan 1991). Infeksi *Acanthamoeba* sp. boleh mengakibatkan penyakit serius dengan morbiditi dan mortaliti tinggi (Martinez & Visvesvara 1997). Infeksi ke atas sistem saraf pusat (SSP) biasanya berakhir dengan kematian dalam jangka masa beberapa minggu ke bulan. Berbanding dengan infeksi SSP, keratitis *Acanthamoeba* sp. biasanya tidak akan merebak tetapi mempunyai morbiditi yang sangat signifikan, sering kali memerlukan satu atau lebih pemindahan kornea atau proses enukleasi yang sempurna (Ma et al. 1990). Pengguna kanta sentuh adalah berisiko tinggi untuk mendapat jangkitan infeksi ini, terutamanya bila terdapat mikroabrasi pada kornea (Garner 1993).

Kajian-kajian sebelum ini yang dilakukan sama ada penyelidik tempatan atau luar negara telah membuktikan bahawa *Acanthamoeba* sp. boleh dipencilkan daripada manusia iaitu daripada epitelium nasal individu normal (Schuster &

Visvesvara 2004) khasnya pada musim berangin. Sista *Acanthamoeba* mudah tersebar melalui udara dan boleh sampai ke permukaan epitelium nasal (Lemgruber et al. 2010). Daripada kaviti nasal, ia boleh sampai ke sistem saraf pusat melalui saluran respiratori dan peredaran darah (Khan 2007, Siddiqui & Khan 2012).

Kes pertama keratitis *Acanthamoeba* sp. di Malaysia yang melibatkan seorang wanita pada tahun 1995 menunjukkan bahawa negara ini tidak terlepas daripada ancaman parasit ini (Mohamed Kamel & Norazah 1995). Bermula dengan kes tersebut, maka pelbagai kajian untuk melihat sebaran ameba ini di persekitaran negara telah dijalankan. Namun demikian, pemencilan ameba hidup bebas ini daripada rongga nasal individu normal masih jarang dilakukan. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk menguji sejauh mana kekerapan atau peratus kehadiran *Acanthamoeba* sp. pada nasal individu normal sekaligus membuktikan sejauh mana pendedahan manusia ke atas organisma ini.

## BAHAN DAN KAEDAH

Swab nasal diambil daripada setiap peserta yang merupakan individu normal yang menjadi subjek kajian. Subjek yang dipilih secara rawak daripada umur dan tempat yang berlainan. Jumlah keseluruhan subjek yang dipilih adalah seramai 71 orang. Untuk kumpulan subjek yang pertama seramai 10 orang telah diambil daripada kanak-kanak Tadika Bijak, Jalan Semarak, iaitu mereka yang berumur dari 4 hingga 7 tahun. Kumpulan subjek seterusnya diambil daripada pelajar sekolah rendah dan sekolah menengah Tanjung Karang yang berumur di antara 7 hingga 19 tahun. Jumlah subjek yang diambil seramai 14 orang. Sementara untuk kumpulan pelajar Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), seramai 24 orang subjek telah dipilih daripada lingkungan umur 19 hingga 29 tahun. Pelajar UKM yang diambil termasuk pelajar yang tinggal di Kolej Tun Syed Nasir (KTSN) 1 dan 2 serta mereka yang tinggal di luar kolej. Seramai 10 orang subjek yang berumur daripada 22 hingga 33 tahun diambil daripada kakitangan pembersihan KTSN. Selain itu, kumpulan subjek seramai 8 orang yang berumur daripada 19 hingga 44 tahun diambil daripada pekerja Kuari Daerah Kepong. Kumpulan subjek terakhir iaitu seramai 5 orang diambil daripada mereka yang berkhidmat

dengan kerajaan iaitu dalam lingkungan 24 hingga 60 tahun. Pengambilan subjek adalah seimbang dari sudut jantina.

Sampel diambil dengan melakukan swab pada rongga nasal, menggunakan swab yang steril. Sampel yang diperolehi dimasukkan ke dalam botol universal yang mengandungi 10 ml larutan salin Page sebagai media pengangkut. Sampel swab yang telah dimasukkan ke dalam botol universal yang mengandungi larutan salin Page akan di 'vortex' selama tiga minit untuk memastikan kesemua organisma termasuk *Acanthamoeba* sp. ditanggalkan daripada swab dan permukaan dinding botol universal. Membran turas dengan saiz liang 0.45 µm diletakkan di atas sistem penuras dengan menggunakan forsep steril. Sampel yang telah di 'vortex' kemudian dituang ke dalam corong penuras dan dituras menggunakan pam vakum.

Setelah proses penurasan selesai, dengan menggunakan forsep steril, membran turas yang mengandungi sedimen sampel akan dipindahkan secara terbalik ke atas permukaan agar bukan nutrien yang telah dititiskan dengan suspensi *E. coli* matian haba. Seterusnya, plat dieram pada suhu 30°C dan selepas 3 hari pengeraman sampel diperiksa untuk kehadiran trofozoit atau sista *Acanthamoeba* di bawah mikroskop kebalikan selama 14 hari sebelum disahkan negatif.

Bagi pengecaman kumpulan *Acanthamoeba*, kriteria Page (1967) digunakan semasa mengamati peringkat sista menggunakan program Image Analysis Software Video-Test 4.0. Saiz dan morfologi dinding sista iaitu endosista dan ektosistanya dapat memberi gambaran mengenai kumpulan *Acanthamoeba* samada kumpulan I (astronyxids), kumpulan II (polyphagids) atau kumpulan III (culbertsonids).

## HASIL KAJIAN

Pemencilan daripada swab nasal, menunjukkan 4 daripada 71 (5.6%) sampel adalah positif dengan kehadiran *Acanthamoeba* sp. (Jadual 1). Keempat-empat subjek yang positif terhadap *Acanthamoeba* adalah merupakan pelajar UKM Kampus Kuala Lumpur (Jadual 2). Pengenalpastian *Acanthamoeba* sp. daripada sampel swab yang positif mengikut kumpulan ditunjukkan di dalam Jadual 3 dan dua kumpulan yang dikenal pasti ialah kumpulan polyphagids dan culbertsonids. Seperti yang dijangkakan dalam pengkulturan kawalan positif dan kawalan negatif, didapati pertumbuhan *Acanthamoeba* sp. hanya berlaku pada plat kawalan positif dan tiada sebarang pertumbuhan *Acanthamoeba* sp. dalam plat kawalan negatif.

JADUAL 1. Peratus keseluruhan sampel swab nasal yang positif *Acanthamoeba* sp.

Jenis sampel	Bilangan sampel yang positif / jumlah keseluruhan sampel	Peratus sampel yang positif <i>Acanthamoeba</i> sp. (%)
Swab Nasal	4 / 71	5.6

JADUAL 2. Pemencilan *Acanthamoeba* sp. daripada swab nasal individu normal

Jenis Sampel	Bilangan sampel positif <i>Acanthamoeba</i> sp. / jumlah keseluruhan Sampel yang diuji	(%)
Swab Nasal:		
1. Kanak-kanak Tadika Bistari	0 / 10	0
2. Sekolah rendah dan sekolah menengah Tanjung Karang	0 / 14	0
3. Pelajar UKM kampus Kuala Lumpur	4 / 24	16.6
4. Kakitangan pembersihan KTSN	0 / 10	0
5. Pekerja Kuari	0 / 8	0
6. Kakitangan berkhidmat dengan kerajaan	0 / 5	0

JADUAL 3. Pengenalpastian jenis kumpulan *Acanthamoeba* sp. yang dipencil.

Jenis sampel	No. Subjek	Kumpulan
Swab Nasal:		
Pelajar UKM kampus Kuala Lumpur	26	<i>polyphagids</i>
	28	<i>polyphagids</i> dan <i>culbertsonids</i>
	30	<i>culbertsonids</i>
	33	<i>culbertsonids</i>

### PERBINCANGAN

Penyelidikan terdahulu berikutan penemuan atau pengenalpastian ameba hidup bebas ini lebih kepada pemencilan iaitu penentuan sebaran *Acanthamoeba* sp. di dalam pelbagai bentuk persekitaran. Dengan pemencilan ini, tempat-tempat atau sumber-sumber yang berisiko untuk mendatangkan infeksi *Acanthamoeba* sp. dapat ditentukan. Hasil kajian pemencilan yang dilakukan di luar negara mendapati *Acanthamoeba* sp. ini tersebar dengan meluas di dalam persekitaran akuatik, tanah, udara dan habuk (Kingston & Warhust 1969; Mergeryan 1991; Visvesvera & Stehr-Green 1990, Mazur 1995). Pada manusia sendiri, *Acanthamoeba* sp. pernah diisolasi daripada nasal (Lawande et al. 1979), kulit (Marshall 1997), tekak (Wang & Feldman 1967) dan tulang (Borochovitz et al. 1981).

Di Malaysia yang turut tidak terlepas daripada ancaman ameba hidup bebas ini, juga telah menjalankan penyelidikan khususnya kajian dari segi pemencilan. Antara pemencilan *Acanthamoeba* sp. yang pernah dilakukan sebelum ini iaitu pemencilan daripada kornea bagi pesakit keratitis (Mohamed Kamel & Norazah 1995), pemencilan daripada peralatan kanta sentuh dan swab mata individu normal (Mohamed Kamel et al. 2013), pemencilan daripada persekitaran akuatik, tanah dan udara (Nurulhuda 2002; Mohamad Hasrul 2004), pemencilan daripada pasir pantai dan air laut (Wan Norliana 2002) dan pemencilan daripada air paip (Mohamed Kamel et al. 2017). Kesemua pemencilan yang dilakukan menunjukkan hasil positif kehadiran *Acanthamoeba* sp. kecuali pemencilan daripada swab mata individu normal (Anisah et al. 2005) dan udara.

Dalam kajian ini, *Acanthamoeba* spp. telah berjaya dipencilkan daripada 5.6% (4/71) sampel swab nasal individu normal. Sekaligus ini membuktikan kajian yang dilakukan oleh para penyelidik luar negara sebelum ini. Daripada kumpulan subjek yang dipilih secara rawak, pelajar UKM Kampus Kuala Lumpur adalah satu-satunya sumber yang menunjukkan hasil keputusan positif ini. Berbanding dengan hasil keputusan yang diperolehi oleh Michel et al. (1982) yang menunjukkan peratusan sehingga 13%, peratusan yang diperolehi daripada kajian ini menunjukkan keputusan yang agak rendah. Dalam laporan Jonckheere (1988), *Acanthamoeba* sp. telah dipencilkan daripada kaviti nasal manusia dalam bilangan yang banyak dan kajian ke atas strain isolat mendapati 30% strain tumbuh pada 40°C dan digolongkan pada kumpulan spesies yang sangat patogenik.

Keempat-empat subjek yang menunjukkan hasil positif bagi swab nasal mempunyai sejarah atau faktor risiko terdedah dengan persekitaran luar yang berdebu dan terlibat dalam aktiviti yang bersentuhan dengan tanah. *Acanthamoeba* sp. ini kemungkinan diperolehi melalui salah satu atau kedua-dua sumber faktor risiko tersebut.

Kajian pemencilan ini hanya mengenalpasti *Acanthamoeba* sp. di peringkat kumpulan sahaja. Dua kumpulan iaitu kumpulan II (polyphagids) dan kumpulan III (culbertsonids) berjaya dipencilkan berdasarkan pemerhatian morfologi endosista dan ektosista. Kedua-dua kumpulan ini merupakan kumpulan *Acanthamoeba* yang utama di persekitaran, khasnya kumpulan polyphagids. Kumpulan polyphagids juga terkenal sebagai kumpulan yang mempunyai patogenisiti yang tinggi. Kolonisasi *Acanthamoeba* pada kaviti nasal berkait rapat dengan kebolehannya untuk tersebar luas melalui udara dalam bentuk sista yang rintang. Debu dan partikel tanah boleh dibawa oleh udara dan membenarkan sebaran sista *Acanthamoeba* ke epithelium nasal, bertukar ke peringkat trofozoit dan kemudian berjaya mengkolonisasi rongga nasal. Infeksi *Acanthamoeba* juga dipengaruhi oleh sifat-sifat perumah dan jangkitan pada manusia juga bergantung kepada kerentanan dan higennya.

Walaupun peratus pemencilan *Acanthamoeba* pada swab nasal individu normal agak rendah dalam kajian ini, ia menggambarkan pendedahan manusia terhadap *Acanthamoeba* sp.

adalah rendah. Bagaimanapun ini membuktikan *Acanthamoeba* sp. boleh dipencilkan daripada tubuh manusia walaupun bukan sebagai flora normal.

## RUJUKAN

- Anisah N, Amal H, Kamel AG, Yusof S, Noraina AR, Norhayati M. 2005. Isolation of *Acanthamoeba* sp. from conjunctival sac of healthy individuals using swab. *Tropical Biomedicine* 22:1;11-14.
- Borochoviz, D., Martinez, A.J. & Patterson, G.T. 1981. Osteomyelitis of a bone graft of the mandible with *Acanthamoeba castellanii* infection. *Human Pathology* 12: 573-576.
- Dunand, V.A., Hammer, S.M., Rossi, R., Poulin, M., Albrecht, M.A., Doweiko, J.P., DeGirolami, P.C., Coakley, E., Piessens, E. & Wanke, C.A. 1997. Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. *Clinical Infectious Diseases* 25: 267-272.
- Friedland, L.R., Raphael, S.A., Deutsch, E.S., Johal, J., Martyn, L.J., Visvesvara, G.S. & Lischner, H.W. 1992. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* 11:404-407.
- Garner, A. 1993. Pathogenesis of acanthamoebic keratitis: hypothesis based on a histological analysis of 30 cases. *British Journal of Ophthalmology* 77: 366-370.
- Gullett, J., Mills, J., Hadley, K., Podemski, B., Pitts, L. & Gelber, R. 1979. Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. *American Journal of Medicine* 67: 891-896.
- Jonckheere, J.F.D. 1988. Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol Res* 74: 314-316.
- Jones, B.R., Visvesvara, G.S. & Robinson, N.M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmology Society U.K.* 95: 221-232.
- Khan NA. 2007. *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. *Int J Parasitol* 37: 131-138.
- Kingston, D. & Warhurst, D.C. 1969. Isolation of amoebae from the air. *Journal of Medical Microbiology* 2: 27-36.
- Lawande, R.V., Abraham, S.N., John I. & Egler L.J. 1979. Recovery of soil amoebas from the nasal passages of children during the dusty hartmattan period in Zaria. *American Journal of Clinical Pathology* 71:201-203.

- Lemgruber L, Lupetti P, De Souza W, Vommaro RC, da RochaAzevedo B. 2010. The fine structure of *Acanthamoeba polyphaga* cyst wall. FEMS Microbiol Lett 305: 170-176.
- Ma, P., Visvesvara, G.S., Martinez, A.J., Theodore, F.H., Dagget, P.M. & Sawyer, T.K. 1990. *Naegleria* dan *Acanthamoeba* infections: Review. Reviews of Infectious Diseases 12(3): 490-510.
- Marshall, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y. & Sterling, C.R. 1997. Waterborne protozoan pathogens. Clinical Microbiology Reviews 10(1): 67-85.
- Martinez, A.J & Visvesvera, G.S. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathology 7: 583-589.
- Mazur, T., Hades, E. & Iwanicka, I. 1995. The duration of cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. Tropical Medicine Parasitology 46: 106-108.
- Mergeryan, H. 1991. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. Reviews of infectious Diseases 13(5): S390-S391.
- Michel, R., Rohl, R. & Schneider, H. 1982. Isolation of free-living amoebae from nasal mucosa of healthy individuals. Zentralbl Bakteriologie Microbiology Hygiene 176(2-3): 155-9.
- Mohamad Hasrul Adzhar, H. 2004. Pemencilan *Acanthamoeba* sp. daripada persekitaran akuatik, tanah dan udara. Tesis Sarjana Muda. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- 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: 652.
- Mohamed Kamel Abd Ghani, Saleha Abdul Majid, Noradillah Samseh Abdullah, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Abd Rahim, Haliza Abdul Mutalib and Norazah Ahmad. 2013. Isolation of *Acanthamoeba* spp. From Contact Lens Paraphernalia. International Med Journal 20:1;66-68.
- Mohamed Kamel Abd Ghani, Nurulhuda Sharif, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Abd Rahim & Norazah Ahmad. 2017. Isolation of *Acanthamoeba* spp. from domestic water taps. Buletin FSK 1(1):89-94.
- Nagington, J., Watson, P.G., Playfair, T.J., McGill, J., Jones, B.R. & Steele, A.D. 1974. Amoebic infection of the eye. Lancet ii:1537-1540.
- Nurulhuda, S. 2002. Pemencilan *Acanthamoeba* sp. daripada persekitaran akuatik. Tesis Sarjana Muda. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Page, F.C. 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. Journal of Protozoology 14:709-724.
- Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 34: 1001-1027.
- Siddiqui R, Khan NA. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasit Vectors 5: 6. doi: 10.1186/1756-3305-5-6.
- Visvesvara, G.S. & Stehr-Green, J.K. 1990. Epidemiology of free-living amoebae infections. Journal of Protozoology 37(4): 25S-33S.
- Wan Norliana, A., 2002. Pemencilan *Acanthamoeba* sp. daripada pasir pantai dan air laut di pantai barat, Semenanjung Malaysia. Disertasi Diploma. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Wang, S.S. & Feldman, H.A. 1967. Isolation of *Hartmanella* species from human throats. The New England Journal of Medicine 277(22):1174-9.

Mohamed Kamel Abd. Ghani\*  
 Andry Dauni  
 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

## Kesan Variasi Diurnal Tekanan Intraokular ke atas Panjang Bola Mata pada Miopia

(Effect of Diurnal Variation Intraocular Pressure on Axial Length in Myopia)

NORLAILA MAT DAUD & NURHAZIMAH KHIR JOHARI

### ABSTRAK

Kajian ini bertujuan untuk mengkaji kesan variasi diurnal tekanan intraokular ke atas panjang bola mata pada subjek miopia. Pengukuran tekanan intraokular dan panjang bola mata dilakukan pada 44 orang subjek dengan min umur  $21.57 \pm 1.44$  tahun. Kesemua subjek mempunyai miopia rendah dengan kuasa sfera setara  $\leq -3.00$  D. Bacaan tekanan intraokular dan panjang bola mata diambil pada dua sesi iaitu 9.00 pagi hingga 10.00 pagi dan 3.00 petang hingga 4.00 petang pada hari yang sama. Hanya keputusan mata kanan digunakan dalam analisa. Keputusan menunjukkan variasi diurnal tekanan intraokular adalah signifikan,  $p < 0.05$  ( $p = 0.000$ ). Variasi panjang bola mata juga adalah signifikan,  $p < 0.05$  ( $p = 0.018$ ). Namun, tiada korelasi antara tekanan intraokular dan panjang bola mata waktu pagi,  $p > 0.05$  ( $p = 0.260$ ) dan waktu petang,  $p > 0.05$  ( $p = 0.206$ ). Oleh itu, variasi diurnal tekanan intraokular didapati tidak memberi kesan kepada panjang bola mata. Kesimpulannya, tiada kesan variasi diurnal tekanan intraokular ke atas panjang bola mata pada subjek miopia. Variasi diurnal panjang bola mata yang berlaku adalah disebabkan faktor lain dan tidak dipengaruhi oleh variasi diurnal tekanan intraokular.

Kata kunci: variasi diurnal, tekanan intraokular, panjang bola mata, miopia

### ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of diurnal intraocular pressure on the axial length of myopic subjects. Measurement of intraocular pressure and axial length were done on 44 subjects with mean age  $21.57 \pm 1.44$  years old. All subjects were low myopes with spherical equivalent power of  $\leq -3.00$  D. Measurements were done in two sessions, morning 9.00 am to 10.00 am and afternoon 3.00 pm to 4.00 pm. Only right eye results was used for analysis. Results showed significant difference in diurnal variation of intraocular pressure,  $p < 0.05$  ( $p = 0.000$ ) and diurnal variation of axial length,  $p < 0.05$  ( $p = 0.018$ ). However, there was no correlation found between diurnal intraocular pressure and axial length in the morning,  $p > 0.05$  ( $p = 0.260$ ) and afternoon,  $p > 0.05$  ( $p = 0.206$ ). Therefore, diurnal variation of intraocular pressure did not give effect to the axial length. In conclusion, there is no effect of diurnal intraocular pressure variation on the axial length in myopic. Diurnal axial length variation occurs due to other factors and was not affected by diurnal intraocular pressure variation.

Keywords: Diurnal variation, intraocular pressure, axial length, myopia

### PENGENALAN

Tekanan intraokular adalah tekanan dalam bola mata yang diimbangkan oleh kadar penghasilan dan pengeluaran akues humor melalui sistem salirannya (Mukhtar et al. 2014). Akues humor yang dihasilkan oleh badan bersilium mengalir keluar antara iris dan kanta kristalin ke *anterior chamber* sebelum memasuki *trabecular network*,

*Schlemm canal* dan akhirnya ke vena okular pada kadar 2 hingga 3 mikromilimeter/minit (Sajja & Vemapti 2013). Menurut American Academy of Ophthalmology (2016), nilai julat tekanan intraokular normal adalah antara 10 hingga 21 mmHg dengan purata populasi adalah sebanyak 15.5 mmHg dan sisihan piawai 2.6 mmHg.

Variasi diurnal adalah julat perubahan tekanan intraokular dalam masa 24 jam. Tekanan

intraokular dikatakan tidak tetap dan berubah-ubah disebabkan pelbagai faktor dalaman dan persekitaran (Song et al. 2014). Peningkatan tekanan intraokular merupakan faktor risiko utama perkembangan glaukoma (Bengtsson 2007). Oleh itu, rawatan penurunan tekanan intraokular digunakan untuk memperlambatkan perkembangan glaukoma (Song et al. 2014). Sihota et al. (2005) dalam kajiannya mendapati bahawa variasi diurnal tekanan intraokular adalah lebih tinggi dalam kumpulan glaukoma kronik sudut tertutup primer dan glaukoma sudut terbuka primer berbanding dengan individu normal. Ada kajian menunjukkan tekanan intraokular tinggi pada waktu pagi dengan julat variasi sebanyak 1.82-5.45 mmHg (Chakraborty et al. 2011).

Panjang bola mata adalah jarak daripada bahagian hadapan kornea hingga ke epitelium pigmen retina (Leydolt 2008). Panjang bola mata normal orang dewasa adalah 24mm, tanpa mengira jantina, bangsa dan ukuran badan yang lain (Roy et al. 2015 dan Sutton 2003). Menurut Bekerman et al. (2014), saiz mata normal orang dewasa adalah lebih kurang 24.2mm (*transverse*) × 23.7mm (*sagittal*) × 22.0–24.8mm (*axial*) dan tiada perbezaan signifikan antara kumpulan jantina dan umur. Subjek dewasa yang terlibat di dalam kajian ini terdiri daripada 134 perempuan dan 116 lelaki berumur dalam lingkungan 18 hingga 93 tahun. Bhardwaj dan Rajeshbhai (2013) dalam kajiannya mendapati bahawa kumpulan miopia mempunyai bola mata yang lebih panjang berbanding kumpulan hiperopia. Proses pemanjangan bola mata berlaku sehingga 16-18 tahun untuk kedua-dua kumpulan. Namun, ralat refraktif sama ada rendah atau tinggi tidak diambil dikira dalam kajian tersebut. Variasi diurnal IOP pada miopia telah menunjukkan bacaan paling tinggi waktu petang berbanding pagi dan juga tinggi dalam keadaan baring berbanding duduk (Liu et al. 2002).

Objektif kajian ini adalah untuk mengkaji kesan variasi diurnal tekanan intraokular ke atas panjang bola mata pada subjek miopia dan membandingkan variasi diurnal tekanan intraokular pada waktu pagi dan petang, membandingkan variasi panjang bola mata pada waktu pagi dan waktu petang serta hubungan antara tekanan intraokular dan panjang bola mata pada subjek miopia.

## KAEDAH KAJIAN

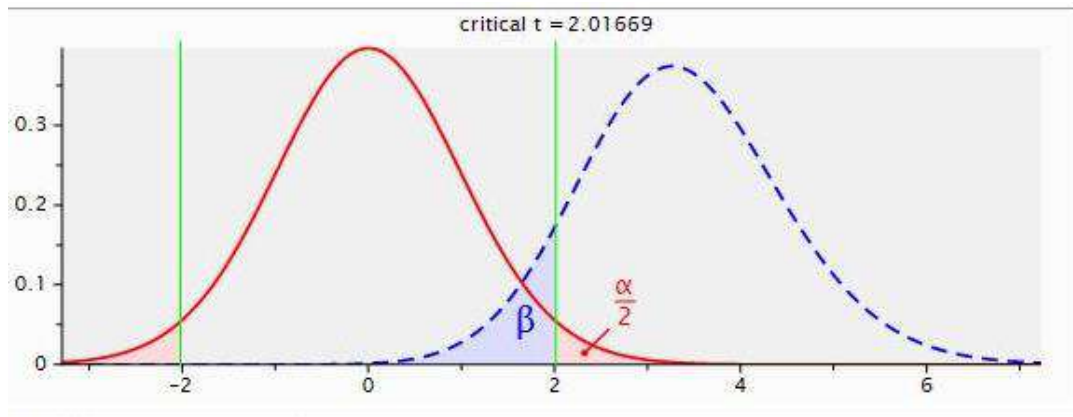
Kajian ini berbentuk keratan rentas, menggunakan teknik persampelan bertujuan yang dijalankan di Klinik Optometri Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Kampus Kuala Lumpur. Pemilihan subjek adalah berdasarkan beberapa kriteria berikut iaitu mereka mempunyai miopia dengan kuasa sfera kurang atau sama dengan -3.00D, berumur antara 18 tahun sehingga 28 tahun. Selain itu, subjek tidak mempunyai masalah kesihatan okular dan sistemik serta tidak memakai kanta sentuh dalam masa 12 jam sebelum bacaan diambil. Manakala subjek yang menghidap penyakit glaukoma dan hipertensi okular, mempunyai sejarah keluarga terdekat yang mempunyai masalah glaukoma dan hipertensi okular serta menghidap penyakit okular dan penyakit sistemik lain akan dikecualikan daripada kajian ini. Saiz sampel bagi kajian ini ditentukan dengan menggunakan perisian komputer G\*power versi 3.1.9.2 keluaran *University of Dusseldorf* (Rajah 1). Keputusan kajian dianalisa menggunakan ujian T dan seramai 44 orang subjek diperlukan. Kelulusan etika daripada Jawatankuasa Etika Penyelidikan UKM telah diperolehi (UKM PPI/111/8/JEP-2017-234).

Setiap subjek ditanya mengenai sejarah pesakit bagi memastikan mereka menepati kriteria yang ditetapkan. Akuiti visual jauh monokular habitual diuji dengan menggunakan carta Snellen pada 6 meter. Hanya subjek yang mencapai akuiti visual 6/9 atau lebih baik akan lulus saringan subjek. Akuiti visual monokular dekat habitual turut diperiksa dengan menggunakan carta dekat pada jarak membaca subjek. Hanya subjek yang mencapai akuiti visual N6 atau lebih baik akan lulus saringan subjek. Seterusnya, pemeriksaan ralat refraksi dijalankan dengan menggunakan teknik retinoskopi dan refraksi subjektif bagi memastikan subjek adalah miopia rendah dengan kuasa sfera kurang atau sama dengan 3.00D. Nilai yang diperolehi akan ditukar kepada bentuk kuasa sfera setara (SEQ = DS + 1/2 DC). Pengukuran parameter kajian dilakukan pada dua sesi iaitu 9.00 pagi hingga 10.00 pagi dan 3.00 petang hingga 4.00 petang pada hari yang sama. Pemeriksaan tekanan intraokular akan dilakukan terlebih dahulu diikuti pemeriksaan panjang bola mata. Alat yang digunakan untuk mengukur tekanan intraokular adalah tonometer *air puff* Topcon CT80 dan telah dibuktikan kesahihan dan kebolehgunaan

berbanding dengan Goldmann *applanation tonometer* (Ogbuehi 2006). Pengukuran dilakukan pada mata kanan dan kiri serta dilakukan sebanyak 3 kali dan nilai purata akan diambil. Hanya mata kanan digunakan sebagai hasil pengukuran statistik.

Pengukuran panjang bola mata dilakukan menggunakan A-scan biometri Tomey AL-2000. Syarikat pengeluar alat ini merupakan Tomey Corporation dari Jepun. Unit pengukuran yang digunakan adalah milimeter (mm) dan sisihan

piawai bagi data yang diterima adalah 0.02mm. Sebelum pengukuran diambil, anestetik topikal (1% Alcaine) akan dititiskan ke dalam mata subjek untuk tujuan pengukuran panjang bola mata. Pengukuran dilakukan semasa subjek duduk tegak dan diarahkan untuk memandang lurus ke hadapan. Hujung prob akan diletakkan secara perlahan-lahan di kawasan tengah kornea. Prosedur ini dilakukan sebanyak 10 kali bagi setiap. Hasil kajian dianalisa menggunakan Ujian T berpasangan, *Wilcoxon Signed Rank* dan korelasi Spearman.



RAJAH 1: Kaedah saiz sampel dengan Ujian Statistik: *Means: Difference between two dependents means (matched pairs)*

Jenis analisis kuasa: *A Priori*

Parameter input

Kesan saiz,  $d$  = 0.50

Kesalahan  $\alpha$  = 0.05

Kuasa ( $1 - \text{kesalahan } \beta$ ) = 0.90

Parameter output

*Noncentrality parameter*  $\delta$  = 3.3166248

T-kritikal = 2.0166922

Df = 43

Jumlah saiz sampel = 44

Kuasa sebenar = 0.9000306

### KEPUTUSAN

Kesemua subjek kajian adalah tergolong dalam kumpulan miopia rendah dengan min ralat refraksi retinoskopi (kuasa sfera setara)  $-1.81 \pm 0.96$  D untuk mata kanan dan  $-1.81 \pm 1.03$  D untuk mata kiri. Manakala min ralat refraksi (kuasa sfera setara) menggunakan teknik refraksi subjektif untuk mata kanan adalah  $-1.84 \pm 1.03$  D dan  $-1.80 \pm 1.08$  D untuk mata kiri (Jadual 1).

Min tekanan intraokular pada waktu pagi adalah  $15.42 \pm 2.38$  mmHg untuk mata kanan dan  $14.55 \pm 2.04$  mmHg untuk mata kiri dengan bacaan paling minimum adalah 10.0 mmHg dan maksimum adalah 22.67 mmHg. Manakala min tekanan intraokular pada waktu petang adalah  $14.25 \pm 2.42$  mmHg untuk mata kanan dan  $13.53 \pm 2.32$  mmHg untuk mata kiri dengan bacaan paling minimum adalah 8.67mmHg dan maksimum adalah 20.0mmHg. Min panjang bola mata pada



waktu pagi adalah  $24.26 \pm 0.92$  mm untuk mata kanan dan  $24.24 \pm 0.89$  mm untuk mata kiri dengan bacaan paling minimum adalah 22.03 mm dan maksimum adalah 26.99 mm. Manakala, min panjang bola pada waktu petang adalah  $24.22 \pm 0.92$  mm untuk mata kiri dan  $24.21 \pm 0.89$  mm untuk mata kanan dengan bacaan paling minimum adalah 22.03 mm dan maksimum adalah 26.92 mm (Jadual 2).

Ujian T berpasangan mendapati variasi diurnal tekanan intraokular bolamata pada waktu pagi dan petang adalah signifikan,  $p < 0.05$  ( $p = 0.000$ ), begitu juga dengan panjang bola mata iaitu  $p < 0.05$ , ( $p = 0.018$ ). Justeru, ini menunjukkan

wujud variasi diurnal tekanan intraokular dan panjang bola mata pada waktu pagi dan petang (Jadual 3).

Hubungan antara tekanan intraokular dan panjang bola mata waktu pagi dan petang dianalisa dengan menggunakan ujian korelasi Spearman,  $r$  (Jadual 4). Hasil analisis mendapati tiada korelasi diantara tekanan intraokular dan panjang bola mata waktu pagi,  $p > 0.05$  ( $p = 0.260$ ) dan waktu petang,  $p > 0.05$  ( $p = 0.206$ ). Secara keseluruhannya, tiada perhubungan antara tekanan intraokular dan panjang bola mata waktu pagi dan petang pada subjek miopia.

JADUAL 1 Nilai min dan sisihan piawai ralat refraksi subjek myopia.

	Mata kanan	Mata kiri
Rx retinoskopi (D)	$-1.81 \pm 0.96$	$-1.81 \pm 1.03$
Rx refraksi subjektif (D)	$-1.84 \pm 1.03$	$-1.80 \pm 1.08$

JADUAL 2 Nilai min dan sisihan piawai tekanan intraokular dan panjang bolamata pada miopia rendah.

	Mata kanan	Mata kiri
Tekanan intraokular pagi (mmHg)	$15.42 \pm 2.38$	$14.55 \pm 2.04$
Tekanan intraokular petang (mmHg)	$14.25 \pm 2.42$	$13.53 \pm 2.32$
Panjang bola mata pagi (mm)	$24.26 \pm 0.92$	$24.24 \pm 0.89$
Panjang bola mata petang (mm)	$24.22 \pm 0.92$	$24.21 \pm 0.89$

JADUAL 3 Ujian T berpasangan tekanan intraokular dan panjang bolamata pagi dan petang pada miopia rendah.

	Min ± SP	Nilai p
Tekanan intraokular pagi (mmHg)	15.42 ± 2.38	0.000*
Tekanan intraokular petang (mmHg)	14.25 ± 2.42	
Panjang bola mata pagi (mm)	24.26 ± 0.92	0.018*
Panjang bola mata petang (mm)	24.22 ± 0.92	

\*Signifikan pada  $p < 0.05$ .

JADUAL 4 Korelasi antara tekanan intraokular dan panjang bolamata miopia rendah.

Ujian korelasi Spearman	Korelasi Spearman (r)	Nilai p
Tekanan intraokular pagi - Panjang bola mata pagi	-0.173	0.260
Tekanan intraokular petang - Panjang bola mata petang	-0.194	0.206

Signifikan pada  $p < 0.05$ .

### PERBINCANGAN

Hasil kajian menunjukkan purata tekanan intraokular pagi dan petang untuk kedua-dua mata bertabur secara normal namun tidak berada dalam julat normal, iaitu antara 10 hingga 21 mmHg seperti yang diklasifikasikan menurut American Academy of Ophthalmology (2016). Tekanan intraokular waktu pagi untuk mata kanan adalah antara 11 mmHg hingga 22.67 mmHg. Begitu juga dengan tekanan intraokular waktu petang bagi mata kiri antara 9.33mmHg hingga 20mmHg. Waktu petang, tekanan intraokular mata kanan adalah 8.67 mmHg hingga 20 mmHg. Manakala tekanan intraokular mata kiri ialah 10 hingga 21 mmHg.

Hasil analisis mendapati terdapat perbezaan signifikan antara tekanan intraokular waktu pagi dan waktu petang. Kajian oleh Diaz et al. (2007) mendapati berlaku variasi diurnal tekanan intraokular di mana tekanan intraokular waktu pagi adalah lebih tinggi berbanding waktu petang untuk lelaki dan juga perempuan. Kajian beliau melibatkan pengukuran parameter waktu pagi 8.00 hingga 9.00 dan petang 5.00 hingga 6.00 menggunakan teknik applinasi tonometer Perkins.

Manakala purata panjang bola mata waktu pagi dan petang bertabur secara tidak normal untuk mata kanan dan juga mata kiri, iaitu terpencong ke arah nilai panjang bola mata yang lebih tinggi. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbezaan

signifikan antara panjang bola mata waktu pagi dan petang,  $p < 0.05$  ( $p = 0.018$ ). Justeru, berlaku variasi diurnal panjang bola mata pada miopia rendah. Hasil kajian ini disokong oleh kajian lepas oleh Stone et al. (2004) yang mendapati berlaku variasi diurnal panjang bola mata pada subjek mempunyai julat SEQ -2.875 hingga +1.00D. Maksimum panjang bola mata adalah pada tengahari menggunakan teknik *partial coherence interferometry* (PCI).

Secara keseluruhannya, tiada hubungan antara tekanan intraokular dan panjang bola mata waktu pagi dan petang pada subjek miopia rendah. Keputusan kajian ini disokong dengan kajian oleh Wilson et al. (2006) yang menunjukkan tiada hubungan antara tekanan intraokular dan panjang bola mata walaupun berlaku kenaikan dan penurunan untuk kedua-dua parameter tersebut. Kajian beliau mendapati mata yang mempunyai variasi diurnal panjang bola mata yang tinggi tidak mempunyai variasi diurnal tekanan intraokular yang tinggi. Walau bagaimanapun, hasil kajian ini tidak disokong dengan kajian oleh Read et al. (2008) yang mendapati terdapat hubungan yang signifikan secara statistik, namun tidak terlalu kuat ( $r = 0.370$ ) antara variasi tekanan intraokular dan variasi panjang bola mata pada subjek dewasa muda menghampiri emmetropia. Hal ini berkemungkinan kerana perbezaan populasi yang dikaji serta jenis alatan yang digunakan untuk mengukur tekanan intraokular dan panjang bola mata adalah berbeza. Selain itu, parameter lain seperti ketebalan tengah cornea tidak diukur yang mana parameter ini turut boleh mempengaruhi bacaan tekanan intraokular. Disamping itu, kajian ini memerlukan kerjasama subjek untuk hadir ke klinik pada waktu pagi dan petang hari yang sama untuk mendapatkan bacaan tekanan intraokular dan juga panjang bola mata.

Oleh yang demikian, kajian lanjutan harus dijalankan ke atas miopia kumpulan rendah, sederhana dan tinggi supaya perbandingan dapat dibuat di antara kumpulan miopia berbeza. Selain itu, kajian variasi diurnal IOP antara posisi baring dan duduk boleh dijalankan untuk melihat samada terdapat perbezaan antara keduanya dan hubungan dengan panjang aksial mata, kamar anterior, dan ketebalan kornea.

## KESIMPULAN

Hasil kajian mendapati berlaku variasi diurnal tekanan intraokular pada waktu pagi dan petang. Selain itu, variasi diurnal panjang bola mata pagi dan petang turut dapat dilihat pada subjek miopia. Walau bagaimanapun, tiada hubungan di antara variasi diurnal tekanan intraokular dengan variasi diurnal panjang bola mata pada waktu pagi dan petang. Justeru, Tiada kesan variasi diurnal tekanan intraokular ke atas panjang bola mata pada subjek miopia. Variasi diurnal bola mata yang berlaku adalah disebabkan faktor lain dan tidak dipengaruhi oleh variasi diurnal tekanan intraokular.

## RUJUKAN

- American Optometric Association. 1997. Care of the Patient with Myopia, Optometric Clinical Practice Guideline. Association of Optometrists. <http://www.aoa.org/myopia.xml> (accessed Oktober. 2016).
- Bekerman, I., Gottlieb, P., Vaiman, M., Bekerman, I., Gottlieb, P., & Vaiman, M. 2014. Variations in Eyeball Diameters of the Healthy Adults. *Journal of Ophthalmology* 2014, 1–5.
- Bengtsson, B., Leske, M.C., Hyman, L., & Heijl, A. 2007. Fluctuation of Intraocular Pressure and Glaucoma Progression in the Early Manifest Glaucoma Trial. *Ophthalmology* 114(2), 205–209.
- Bhardwaj, V., & Rajeshbhai, G.P. 2013. Axial length, anterior chamber depth-a study in different age groups and refractive errors. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 7(10), 2211–2212.
- Chakraborty, R., Read, S. A & Collins, M. J. 2011. Diurnal variations in axial length, choroidal thickness, intraocular pressure and ocular biometrics. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* July (52): 5121-5129.
- David Sutton, Text book of Radiology and Imaging, Ultra Sound of the Eye & Orbit, Churchill Livingstone, Edinburgh, 7th Edn- 2003; 2:1551.
- Diaz V.A.F. 2010. Definition of Myopia: *Health and Economic Implications*, 98–105.
- Leydolt, C., Findl, O. & Drexler, W. 2008. Effects of change in intraocular pressure on axial eye length and lens position. *Eye* 657–661.
- Liu, J. H. K., Kripke, D. F., Twa, M. D., Gokhale, P. A et al. 2002. Twenty four hour pattern of intraocular pressure in young adults with moderate to severe myopia. *Investigative*

- Ophthalmology & Visual Science* July (43): 2351-2355.
- Mukhtar, S. A., Jamil, A. Z., & Ali, Z. 2014. Estimation of Range of Intraocular Pressure in Normal Individuals by Air Puff Tonometer, 30(3), 129–132.
- Ogbuehi, K.C. 2006. Assessment of the accuracy and reliability of the Topcon CT80 non-contact tonometer. *Clinical and Experimental Optometry* 89(5), 310–314.
- Read, S.A., Collins, M.J., & Iskander, D.R. 2008. Diurnal variation of axial length, intraocular pressure, and anterior eye biometrics. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49(7), 2911–2918.
- Roy, A. 2015. Variation of Axial Ocular Dimensions with Age, Sex, Height, BMI -and Their Relation to Refractive Status. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 9(1), 1–4.
- Sajja, S., & Vemapti, P. 2013. Diurnal Variation of Intra Ocular Pressure (IOP) in Healthy Individuals : A Pilot Study. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences* 1(5), 488–492.
- Sihota, R., Saxena, R., Gogoi, M., Sood, A., Gulati, V. & Pandey, R. M., 2005. A comparison of the circadian rhythm of intraocular pressure in primary chronic angle closure glaucoma, primary open angle glaucoma and normal eyes. *Indian Journal of Ophthalmol* 53:243-7.
- Song, Y.K., Lee, C.K., Kim, J., Hong, S., Kim, C.Y., & Seong, G.J. 2014. Instability of 24-hour intraocular pressure fluctuation in healthy young subjects: a prospective, cross-sectional study. *BMC Ophthalmology* 14, 127.
- Wilson, L.B., Quinn, G.E., Ying, G., Francis, E.L., Schmid, G., Lam, A., Orlow, J. & Stone, R.A. 2006. The relation of axial length and intraocular pressure fluctuations in human eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(5), 1778–1784.
- Wong, T.Y., Klein, B.E.K., Klein, R., Knudtson, M. & Lee, K.E. 2003. Refractive errors, intraocular pressure, and glaucoma in a white population. *Ophthalmology* 110(1):211–7
- Norlaila Mat Daud\*  
 Nurhazimah Khir Johari  
 Program Optometri & Sains Penglihatan,  
 Pusat Rehabilitasi & Keperluan Khas  
 Fakulti Sains Kesihatan,  
 UKM Kampus KL
- \*Corresponding author: laila@ukm.edu.my

## **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 keberkesannya 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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*
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 *Acanthamoeba* yang berjaya bereksistensi 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

## **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. Pengesanan 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 konsumer 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 khasnya berkaitan risiko mendapat jangkitannya.

#### RUJUKAN

Bottomley, P.J. 1999. Microbial Ecology. Dlm. Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G. & Zuberer, D.A. (pnnt.). 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. (pnnt.). 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. 9<sup>th</sup> 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

# **BULETIN SAINS KESIHATAN (BSK)**

## **Panduan Kepada Penyumbang**

### **SKOP**

Buletin Sains Kesihatan (BSK) ialah sebuah jurnal ilmiah berwasit yang komited kepada perkembangan dapatan penyelidikan dalam pelbagai bidang sains kesihatan dan perubatan serta teknologi berkaitan. Ia meliputi makalah dalam pelbagai aspek sains kesihatan, penyelidikan klinikal dan juga pra klinikal. Antara bidang tersebut termasuklah audiologi, biokimia, pergigian, dietetik, pengimejan perubatan, sains bioperubatan, sinaran perubatan, pemakanan, optometri, farmakologi, farmasi, fisiologi, fisioterapi, terapi carakerja, sains forensik, kesihatan masyarakat, psikologi kesihatan, kesihatan persekitaran, sains pertuturan dan sains sukan. Buletin ini menerbitkan kertas asli, komunikasi pendek, laporan kes dan nota penyelidikan yang menarik minat ramai para sarjana. BSK diterbitkan oleh Sidang Pengarang daripada Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia. Selain itu para sarjana terkenal daripada universiti dalam dan luar negara dilantik sebagai ahli lembaga penasihat dan penilai artikel yang dikemukakan.

### **PROSEDUR PENYERAHAN MANUSKRIP**

Buletin Sains Kesihatan menerbitkan manuskrip yang ditulis dalam Bahasa Melayu dan Bahasa Inggeris. Manuskrip yang diserahkan untuk diterbitkan dalam jurnal ini hendaklah karya asli yang belum pernah diterbitkan atau tidak dihantar serentak untuk pertimbangan oleh mana-mana penerbitan lain. Manuskrip perlu ditaip selang dua baris, ruangan tunggal dan saiz font 12 Times New Roman di atas kertas bersaiz A4 tidak melebihi 15 mukasurat bagi kertas asli (6 mukasurat bagi komunikasi pendek, laporan kes dan nota penyelidikan) dan hendaklah diserahkan melalui sistem atas talian.

Segala surat-menyurat mengenai makalah serta perkara yang berkenaan hendaklah dialamatkan kepada:

Ketua Editor  
BULETIN SAINS KESIHATAN  
Fakulti Sains Kesihatan,  
Universiti Kebangsaan Malaysia.  
Jalan Raja Muda Abdul Aziz 50300  
Kuala Lumpur, Malaysia.

E-mail: rahaida@ukm.edu.my

### **FORMAT DAN GAYA**

Tajuk sesuatu manuskrip perlulah ringkas, deskriptif, dan seharusnya tidak melebihi 15 perkataan. Setiap manuskrip harus mempunyai abstrak, 150 hingga 250 perkataan dalam bahasa Melayu dan bahasa Inggeris yang memperihalkan isi utamanya. Sekiranya manuskrip ditulis dalam bahasa Melayu, abstrak dan tajuk dalam bahasa Inggeris perlu disertakan.

Secara am, pembahagian isi merangkumi Pengenalan, Bahan dan Kaedah, Hasil dan Perbincangan, Kesimpulan dan Rujukan. Setiap manuskrip mesti disertakan dengan 3-5 kata kunci.

Semua ilustrasi termasuk rajah, carta dan graf, mesti dilabel dan disediakan dalam halaman yang berasingan daripada teks. Kedudukan ilustrasi seperti yang dikehendaki dalam teks hendaklah ditanda dengan jelas. Semua ilustrasi ini harus dirujuk dan dinomborkan secara berurutan sebagai rajah. Semua ilustrasi hendaklah sama ada dilukis dengan jelas menggunakan dakwat kekal, difotografkan dalam bentuk hitam putih atau warna dan dicetak di atas kertas yang bermutu, atau dalam bentuk imej digital, dan disediakan dalam bentuk *camera-ready*.

Rujukan dalam teks hendaklah menggunakan sistem nama penulis dan diikuti oleh tahun penerbitan. Satu senarai rujukan yang disusun mengikut abjad hendaklah dimasukkan di bahagian akhir sesebuah manuskrip. Kesemua rujukan yang dipetik dalam teks haruslah muncul dalam senarai rujukan. Para penulis bertanggungjawab memastikan ketepatan dan kesempurnaan maklumat dalam senarai rujukan. Semua manuskrip mesti mengikut garis panduan rujukan Penerbit, Universiti



Kebangsaan Malaysia atau *The Chicago Manual of Style* (University of Chicago Press). Gaya rujukan yang digunakan haruslah konsisten di semua bahagian manuskrip.

#### **HAKCIPTA**

Para penulis bertanggungjawab sepenuhnya bagi memastikan manuskrip mereka tidak melanggar mana-mana hak cipta yang sedia ada. Para penulis seharusnya mendapat keizinan untuk menerbitkan semula atau mengubahsuai bahan-bahan yang mempunyai hak cipta, dan menunjukkan bukti keizinan tersebut semasa menyerahkan naskah akhir manuskrip.

#### **PROSES PENILAIAN**

Sesebuah manuskrip akan dinilai oleh Sidang Editor dan sekurang-kurangnya seorang pewasit bebas. Keputusan tentang penerbitan sesebuah manuskrip didasarkan kepada saranan ahli-ahli lembaga ini. Sesebuah manuskrip akan dinilai berasaskan kesesuaiannya dengan Buletin Sains Kesihatan, sumbangan kepada disiplin ilmu, kejituan analisis, keluasan konseptual, persembahan yang jelas, dan kesempurnaan teknikal. Nama penuh dan afiliasi semua penulis manuskrip hendaklah dinyatakan pada halaman depan yang dibuat secara berasingan dengan manuskrip. Manuskrip yang diserahkan oleh mana-mana anggota Sidang Editor juga tertakluk kepada prosedur penilaian yang sama.

#### **NASKAH SEMAKAN**

Satu set pruf akan dihantar kepada penulis bagi tujuan penyemakan kesilapan percetakan. Adalah menjadi tanggungjawab penulis untuk memaklumkan sebarang pembetulan kepada Sidang Editorial

# **BULLETIN OF HEALTH SCIENCES (BHS)**

## **Guide to Contributors**

### **SCOPE**

The Bulletin of Health Sciences (BHS) is a refereed journal committed to the advancement of scholarly knowledge and research findings of health and medical sciences and the related technology. It contains articles on every aspect of health sciences, pre clinical and clinical related research. These include audiology, biochemistry, dentistry, dietetic, medical imaging, biomedical science, radiotherapy, nutrition, optometry, pharmacology, pharmacy, physiology, physiotherapy, occupational therapy, forensic science, public health, health psychology, environmental health, speech science and sports science. The bulletin publishes original articles, short communications, case reports and research notes whose content and approach are of interest to a wide range of scholars. BHS is published by an autonomous Editorial Board drawn from the Faculty of Health Sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia. In addition, distinguished scholars from local and foreign universities are appointed to serve as referees and advisory board members.

### **SUBMISSION PROCEDURE**

The bulletin publishes manuscripts written in the Malay and English language. Manuscript submitted to the journal for publication should be original contribution and must not have been previously published or is under consideration simultaneously by any other publication.

The manuscript should be typed with double spacing, single column and font size 12 Times New Roman on A4 paper not exceeding 15 pages for original articles (6 pages for research notes, short communications and case reports) and should be submitted using the online submission system.

All correspondence pertaining to articles and related matters should be addressed to:

Editor-in-Chief  
BULLETIN OF HEALTH SCIENCES  
Faculty of Health Sciences,  
The National University of Malaysia.  
Jalan Raja Muda Abdul Aziz 50300  
Kuala Lumpur, Malaysia.

E-mail: rahaida@ukm.edu.my

### **FORMAT AND STYLE**

The title of a manuscript should be concise, descriptive and preferably not exceeding 15 words. The manuscript must include an abstract, describing its main points within 150 - 250 words in the Malay and English language. If the manuscript is written in Malay, it must also have an English abstract and title.

In general, the contents should comprise of Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusion, Acknowledgement and References. The manuscript should be supplied with 3-5 keywords.

All illustrations including figures, charts and graphs, must be labelled and supplied on pages separate from the text. The desired placement in the text should be clearly indicated. These illustrations should be referred to and numbered serial, as figures. All illustrations should be clearly drawn in permanent ink or photographed in sharp black and white and reproduced in the form of high - contrast glossy prints or digital images and provided in camera ready form.

References in the text should be denoted by giving the name(s) of the author(s). All alphabetically ordered references list should be included at the end of the manuscript. All references cited in the text must appear in the reference list. Authors are responsible for the accuracy and completeness of all information in the reference. Manuscripts must conform to the references in Penerbit UKM style or the Chicago Manual of Style (University of Chicago Press). The references style adopted should be consistent throughout the manuscript.

### **COPYRIGHT**

It is the author's responsibility to ensure that his or her submitted work does not infringe any existing copyright. Authors should obtain permission to reproduce or adapt copyrighted material and provide evidence of approval upon submitting the final version of a manuscript.

### **REVIEW PROCESS**

Manuscripts will be reviewed by the Editorial Board and at least one independent referee. Decisions regarding the publication of a manuscript will be based on the Board's recommendations. The manuscript will be evaluated based on its appropriateness for the Bulletin of Health Sciences (BHS), contribution to the discipline, cogency of analysis, conceptual breadth, clarity of presentation and technical adequacy. Manuscripts submitted by members of the journal's Editorial Board are subjected to the same review procedure.

### **PROOFS**

One set of proofs will be sent to the author(s) to be checked for printer's errors and it is the responsibility of the author(s) to submit corrections to the Editorial Board.

BULETIN SAINS KESIHATAN (BSK) ialah sebuah jurnal ilmiah berwasit yang diterbitkan dua kali setahun secara atas talian oleh Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia. Ia menerbitkan makalah dalam bidang sains kesihatan dan perubatan serta teknologi yang berkaitan. Makalah ditulis dalam bahasa Melayu atau Inggeris dan boleh berbentuk kertas asli, komunikasi pendek, laporan kes atau nota penyelidikan. Tujuan utama jurnal ini ialah untuk menyediakan saluran bagi menerbitkan karya penyelidikan yang dijalankan dalam bidang sains kesihatan di Universiti Kebangsaan Malaysia dan mengalu-alukan sumbangan karya dari dalam dan luar negara.

Segala surat menyurat mengenai makalah serta perkara yang berkenaan hendaklah dialamatkan kepada:

*BULLETIN OF HEALTH SCIENCES (BHS) is a peer reviewed online journal published biannually by the Faculty of Health Sciences, National University of Malaysia. It publishes articles in the field of medical and health sciences and the related technology. Articles are published in Malay or English and can be written as original articles, short communications, case reports and research notes. The primary purpose of this journal is to act as a channel for the publication of research work on health sciences undertaken at Universiti Kebangsaan Malaysia and contribution of articles from within and outside the country is most welcomed.*

*All correspondence pertaining to articles and related matters should be addressed to:*

Ketua Editor / *Editor-in-Chief*  
BULETIN SAINS KESIHATAN  
Fakulti Sains Kesihatan,  
Universiti Kebangsaan Malaysia.  
Jalan Raja Muda Abdul Aziz 50300  
Kuala Lumpur, Malaysia.

E-mail: rahaida@ukm.edu.my



ISSN 2550-1852



Diterbitkan Oleh

Fakulti Sains Kesihatan  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
Jalan Raja Muda Abdul Aziz  
50300, Kuala Lumpur  
Malaysia

[www.ukm.my/fsk](http://www.ukm.my/fsk)

Dicetak Oleh UKM Cetak 2018