

Jurnal Sains Kesihatan Malaysia 7 (2) 2009: 39-46

Kertas Asli/Original Article

**Keberkesanan Antibiotik Titisan Mata Neomycin,
Gentamycin & Ciprofloxacin Terhadap Sista
Acanthamoeba spp.**

NORADILAH SAMSEH ABDULLAH, MOHAMED KAMEL ABD GHANI,
ANISAH NORDIN, YUSOF SUBOH & NORAINA AB RAHIM

ABSTRAK

Keratitis Acanthamoeba merupakan masalah okular yang serius dan boleh mengakibatkan buta jika tidak dirawat. Kajian ini bertujuan menentukan keberkesanan antibiotik titisan mata terhadap lapan isolat sista Acanthamoeba spp., empat daripada isolat klinikal dan empat lagi daripada isolat persekitaran. Tiga antibiotik titisan mata (neomycin, ciprofloxacin dan gentamicin) yang terdapat di pasaran dalam bentuk sedia guna telah diuji. Suspensi sista daripada kelapan-lapan isolat diuji dengan antibiotik titisan mata masing-masing. Selepas tempoh inkubasi selama 48 jam, larutan dituras dan membran turasan diletakkan ke atas agar bukan nutrien yang dilapisi E.coli. Plat agar diperiksa setiap hari hingga hari ke-14 untuk melihat kehadiran trofozoit Acanthamoeba di bawah mikroskop inverted. Ketiga-tiga antibiotik ujian iaitu neomycin, ciprofloxacin dan gentamicin didapati berkesan terhadap sista Acanthamoeba daripada semua strain kajian.

Kata kunci: Keratitis Acanthamoeba, Antibiotik Titisan Mata, Keberkesanan

ABSTRACT

Acanthamoeba keratitis is a serious ocular problem and can cause blindness if not treated. This study was therefore performed to evaluate the effectiveness of eyedrop antibiotics on eight Acanthamoeba spp. isolates, of which four were clinical isolates and the remaining four from the environment. Three different eyedrop antibiotics (neomycin, ciprofloxacin and gentamicin) currently available in the market and ready for use were tested. Cyst suspension from all strains were tested against eyedrop antibiotics, respectively. After 48 hours of incubation period, the solutions were filtered and the filtered membranes were put onto non-nutrient agar lawn with E. coli.

39

The plates were examined daily for Acanthamoeba trophozoites under inverted microscope until day 14. Neomycin, ciprofloxacin and gentamicin were found to be effective against Acanthamoeba spp. cysts for all test strains.

Key words: Acanthamoeba Keratitis, Eyedrop Antibiotics, Effectiveness

PENDAHULUAN

Acanthamoeba merupakan organisma hidup bebas di bawah order Amoebida yang prevalens di persekitaran termasuklah air laut, air paip, udara dan tanah. *Acanthamoeba* adalah rintang terhadap disinfektan, variasi suhu dan kekeringan dan merupakan penyebab penting kepada keratitis mikrob yang menyebabkan inflamasi mata yang teruk dan kehilangan penglihatan (Marciano-Cabral & Guy 2003; Mohamed Kamel et al. 2000). *Acanthamoeba* sering mengakibatkan keratitis pada hos imunokompeten dan *granulomatous amoebic encephalitis* (GAE) serta lesi kutaneus pada hos terimunokompromi (Schwarzwald et al. 2003). Infeksi oleh *Acanthamoeba* yang semakin meningkat menjadi penting dalam beberapa tahun kebelakangan oleh kerana peningkatan populasi pengguna kanta sentuh dan pesakit AIDS (Khan 2003). Insiden infeksi *Acanthamoeba* semakin meningkat, terutamanya di kalangan pemakai kanta sentuh lembut jenis pakai buang (Lema et al. 2001).

Pelaksanaan penjagaan kanta sentuh adalah penting kerana kanta sentuh yang terkontaminasi boleh menyebabkan infeksi *Acanthamoeba* sp. Penggunaan produk yang tidak steril dan berenang dengan memakai kanta sentuh telah dikenal pasti sebagai faktor risiko keratitis *Acanthamoeba* (William 2003). Selain itu, keratitis *Acanthamoeba* pada pemakai kanta sentuh jenis lembut diasosiasi dengan salin buatan sendiri dan penggunaan disinfeksi kanta sentuh yang jarang atau tidak sekerap yang disyorkan oleh pengeluar kanta sentuh (Frederick & Visvesvara 2003).

Keratitis oleh *Acanthamoeba* jarang berlaku tetapi jika berlaku, rawatan adalah sangat sukar kerana *Acanthamoeba* rintang terhadap terapi antimikrob dan antivirus (Moore et al. 1987). Antara sebab lain rawatan adalah sukar ialah kerana keratitis *Acanthamoeba* sering disalah diagnos. Ini adalah kerana gejala dan tanda peringkat awal menyerupai infeksi organisma lain (David et al. 1997). *Acanthamoeba* dapat bertahan hidup dengan kehadiran bakteria dan yis. Maka, bekas kanta sentuh yang tidak bersih akan menggalakkan kehadiran bakteria dan ini menjadi sumber pertumbuhan *Acanthamoeba*. Oleh itu, sista *Acanthamoeba* akan membahagi dan bereksistensi di dalamnya. Ini berlaku terutamanya setelah bahan pencuci dibuka dan digunakan dalam tempoh yang panjang (Lang et al. 2004).

Dalam menentukan diagnosis keratitis *Acanthamoeba*, gejala dan tanda yang tidak spesifik sering mengelirukan doktor dan boleh mengakibatkan kegagalan rawatan yang berkesan dan kehilangan penglihatan pesakit mungkin

berlaku. Kajian ini dijalankan untuk mengetahui kesan sesetengah antibiotik titisan mata yang ada dalam pasaran terhadap sista *Acanthamoeba* yang dipencilkan.

BAHAN DAN KAEDAH

SUMBER *ACANTHAMOEBEA*

Acanthamoeba spp. diperolehi daripada Makmal Kultur *Acanthamoeba*, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia: subkultur dari isolat klinikal (HKL22, HKL7, HKL37, HTH49) dan isolat persekitaran (TGAL4, SDAL5, BLAL4A, TL3). *Acanthamoeba* yang telah disubkultur di atas agar bukan nutrien dibiarkan selama beberapa hari supaya trofozoit *Acanthamoeba* bertukar kepada sista.

ANTIBIOTIK TITISAN MATA

Antibiotik yang ingin diuji keberkesanannya terhadap *Acanthamoeba* dalam kajian ini adalah Neomycin, Gentamicin dan Ciprofloxacin. Kesemua antibiotik ini diperolehi daripada Hospital Pakar Mata Tun Hussein Onn dan digunakan sebelum tarikh luput antibiotik titisan mata tersebut.

PEMROSESAN SAMPEL

Kaedah ini mengikut kaedah piawai yang dijalankan oleh Narasimhan dan rakan-rakannya pada tahun 2001. Suspensi sista *Acanthamoeba* divorteks selama lebih kurang satu minit sebelum digunakan untuk memastikan sista bertabur sama rata dalam larutan salin Page (PAS). Sebanyak 5 μ L suspensi sista dipipet masuk ke dalam telaga mikrotiter. Kemudian, antibiotik titisan mata sebanyak 100 μ L dicampurkan kepada suspensi sista tadi. Campuran dicampurratakan dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Kawalan positif disediakan dengan sista di dalam larutan salin Page dan satu lagi kawalan positif dengan sista yang dicampurkan dengan hidrogen peroksida. Kawalan negatif pula disediakan dengan larutan salin Page sahaja. Uji kaji dijalankan secara duplikat.

Campuran antibiotik titisan mata dengan sista *Acanthamoeba*, kawalan positif dan kawalan negatif dituras menggunakan unit filtrasi yang terdiri daripada milipore, pam vakum dan membran selulosa nitrat sebagai komponen utama. Membran selulosa nitrat yang digunakan berukuran 0.45 μ m pada set penuras. Telaga mikrotiter perlu dibilas sekali lagi dengan menggunakan larutan salin Page untuk membersihkan atau menanggalkan sebarang sista yang tertinggal.

Setelah selesai turasan, membran selulosa nitrat dipindah ke atas agar bukan nutrien yang diinokulasi *E. coli* yang dibunuh melalui autoklaf. Agar tersebut kemudiannya diinkubasi pada 37°C selama 3 hari. Selepas 3 hari, membran

ditanggalkan dan agar diperhatikan di bawah mikroskop *inverted* untuk melihat kehadiran trofozoit. Pemerhatian dilakukan setiap hari selama 14 hari untuk mengesahkannya sebagai negatif (Narasimhan et al. 2001). Viabiliti sista dinilai melalui keupayaannya untuk bereksistasi dan membahagi berbanding dengan plat agar kawalan (Niszl & Markus 1998).

Dalam kajian ini, tumpuan lebih diberikan terhadap sista *Acanthamoeba* oleh kerana sista *Acanthamoeba* kebiasaannya adalah lebih rintang terhadap sebarang rawatan atau antibiotik yang didedahkan terhadapnya.

KEPUTUSAN

Kesemua antibiotik titisan mata dalam kajian ini didapati berkesan untuk membunuh sista *Acanthamoeba* spp. Neomycin 5 mg/mL didapati berkesan terhadap sista *Acanthamoeba* spp. daripada kelapan-lapan isolat yang diuji selepas rendaman selama 48 jam (Jadual 1). Ketiga-tiga antibiotik telah berjaya menghalang sista *Acanthamoeba* spp yang diuji daripada bereksistasi menjadi trofozoit. Ciprofloxacin HCl 3 mg/mL sebagai bes juga didapati dapat membunuh sista *Acanthamoeba* daripada kesemua isolat yang diuji dalam kajian ini. Begitu juga dengan Gentamicin 3 mg/mL yang didapati berupaya membunuh sista *Acanthamoeba* spp. kajian. Kawalan suspensi sista semua isolat yang diuji dijalankan bersama kawalan negatif yang hanya terdiri daripada larutan Page Amoebic Saline (PAS) tanpa sista berjaya membuktikan bahawa semua isolat adalah viable dan larutan PAS tidak terkontaminasi (Jadual 2). Begitu juga dengan kawalan antibiotik sahaja tanpa sista menunjukkan tiada kontaminasi pada antibiotik yang digunakan (Jadual 3).

JADUAL 1. Keputusan kajian keberkesanan Neomycin 5 mg/mL, Ciprofloxacin 3 mg/mL (konsentrasi terapeutik) dan Gentamicin 3 mg/mL terhadap kesemua strain klinikal dan persekitaran yang dikaji

Strain	Neomycin	Ciprofloxacin	Gentamicin
HKL22	-	-	-
HKL7	-	-	-
HKL37	-	-	-
HTH49	-	-	-
BLAL4A	-	-	-
TGAL5	-	-	-
TL3	-	-	-
SDAL4	-	-	-

Petunjuk:

+ trofozoit hadir

- trofozoit tidak hadir

JADUAL 2. Keputusan untuk kawalan suspensi sista semua isolat klinikal dan persekitaran dan Page Amoebic Saline (PAS)

Strain	Sista	PAS
HKL22	+	-
HKL7	+	-
HKL37	+	-
HTH49	+	-
BLAL4A	+	-
TGAL5	+	-
TL3	+	-
SDAL4	+	-

JADUAL 3. Keputusan untuk kawalan Neomycin, Ciprofloxacin dan Gentamycin

Antibiotik titisan mata	Kawalan
Neomycin	-
Ciprofloxacin	-
Gentamicin	-

Petunjuk:

+ Trofozoit hadir

- Trofozoit tidak hadir

PERBINCANGAN

Berdasarkan keputusan kajian, ketiga-tiga antibiotik titisan mata yang seringkali digunakan dalam rawatan terhadap penyakit keratitis bakteria atau penyakit mata yang lain, telah berjaya membunuh sista *Acanthamoeba* spp. yang diketahui sangat rintang kepada kebanyakan antibiotik atau antimikrob secara in vitro.

Neomycin dalam bentuk titisan mata mengandungi 1 mg/mL dexamethasone-21 fosfat dan 5 mg/mL neomycin sulfat. Pengawet yang digunakan adalah benzalkonium klorida. Neomycin merupakan antibiotik daripada kumpulan aminoglikosida dan merupakan agen bakterisidal. Ia efektif terhadap kebanyakan bakteria gram positif dan negatif. Dexamethasone pula adalah glukokortikoid sintetik yang mempunyai kegunaan sebagai agen anti-inflamasi. Cara tindak neomycin adalah secara pengikatan tidak berbalik dengan ribosom RNA 16S dan membekukan inisiasi kompleks (30S-mRNA-tRNA) maka dengan itu tiada inisiasi berlaku. Ia juga memperlambatkan sintesis protein yang telah diinisiasi dan mengaruh bacaan yang salah terhadap mRNA.

Dalam kajian keberkesanan Neomycin terhadap sista *Acanthamoeba* spp., didapati neomycin dapat membunuh kesemua sista *Acanthamoeba* spp. daripada

strain klinikal dan persekitaran. Dalam rawatan klinikal, neomycin sering digunakan secara kombinasi dengan propamidine untuk merawat pesakit keratitis *Acanthamoeba* sp. secara *in vivo* kerana aktiviti sistisidal neomycin yang lemah (Lucy 2000). Namun, dalam kajian secara *in vitro*, Neomycin tanpa kombinasi dengan propamidine didapati dapat membunuh sista *Acanthamoeba*.

Mungkin secara *in vivo*, apabila Neomycin diberikan sendirian tanpa kombinasi, terdapat interaksi dengan air mata yang menyebabkannya menjadi kurang berkesan untuk membunuh *Acanthamoeba* jika tidak digandingkan dengan agen lain.

Walau bagaimanapun, daripada hasil yang diperolehi daripada kajian ini, berkemungkinan juga neomycin boleh membunuh strain *Acanthamoeba* spp. yang terdapat di Malaysia berbanding strain yang terdapat di luar negara oleh kerana mungkin tidak wujud lagi kerintangan *Acanthamoeba* sp terhadap Neomycin.

Larutan oftalmik Ciprofloxacin HCl pula mengandungi Ciprofloxacin HCl 3.5 mg berkadaran dengan 3 mg bes sebagai bahan aktif, bahan pengawetnya adalah benzalkonium klorida dan bahan tidak aktifnya adalah sodium asetat, asid asetik, mannitol 46 mg/mL, Adetate disodium 0.5 mg/mL, asid hidroklorik dan/atau sodium hidroksida (untuk mengubahsuai pH) dan air tulen. pH adalah 4.5 dan osmolaliti adalah 300 mOsm. Ciprofloxacin berada dalam kumpulan fluoroquinolone dan mempunyai aktiviti *in vitro* terhadap organisma gram negatif dan positif. Ciprofloxacin merupakan agen bakterisidal daripada tindakannya yang mengganggu enzim DNA gyrase yang diperlukan dalam sintesis DNA bakteria.

Dalam kajian yang dijalankan, Ciprofloxacin didapati dapat membunuh kesemua sista daripada semua strain kajian. Ini bermakna, tindakannya sebagai antibiotik yang dapat membunuh bakteria juga dapat membunuh sista *Acanthamoeba* spp.

Gentamicin 3 mg/mL mengandungi 3 mg gentamicin sulfat dan 4.4 µg/mL benzalkonium klorida sebagai pengawet. Ia tergolong dalam kumpulan aminoglikosida dan cara tindaknya juga hampir sama dengan Neomycin kerana berada dalam kumpulan yang sama. Gentamicin dan Ciprofloxacin tidak pernah digunakan dalam kajian keberkesanannya terhadap *Acanthamoeba* spp. di dalam negara mahupun di luar negara. Maka tiada rujukan dan perbandingan dapat dilakukan untuk membuktikan keberkesanannya. Oleh kerana ketiga-tiga antibiotik titisan mata dalam kajian ini sangat mudah diperolehi daripada kebanyakan kedai farmasi di Malaysia, maka ujian ini dilakukan. Sebelum ini, kesemua antibiotik yang diuji dalam kajian ini tidak pernah digunakan dalam rawatan klinikal keratitis *Acanthamoeba*. Hanya Neomycin yang sering digunakan dalam rawatan secara kombinasi dengan propamidine dan rawatan kombinasi ini didapati berkesan merawat kebanyakan kes keratitis *Acanthamoeba*.

Hasil kajian ini juga akan menjadi titik permulaan bagi ujian in vivo yang dirancang akan dijalankan kelak dan diharapkan antibiotik titisan mata ini dapat digunakan dalam rawatan pesakit keratitis di Malaysia. Dicadangkan juga agar kajian ini kelak dapat diuji dengan menggunakan lain-lain strain klinikal yang akan diperolehi pada masa hadapan.

KESIMPULAN

Kesemua antibiotik titisan mata dalam kajian yang terdapat di pasaran iaitu Neomycin, Ciprofloxacin dan Gentamicin dapat membunuh sista *Acanthamoeba* daripada isolat klinikal dan persekitaran dan menunjukkan potensi penggunaannya untuk rawatan keratitis di Malaysia kelak.

RUJUKAN

- David, S., Hay, J. & Kirkness, O.M. 1997. Increase incidence of *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lens wear: The need to prevent this waterborne infection. *Ophthalmol. Physiol. Optics*. 17(2): 171.
- Frederick, L.S. & Visvesvara, G.S. 2003. Amebic encephalitis and amebic keratitis caused by pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Current Treatment Inf. Dis.* 5: 273-282.
- Khan, N.A. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infection. *Microbial Pathogenesis*. 36(6): 277-285.
- Lang, Jacob., Rah, Marjorie, J. 2004. Adverse corneal events associated with corneal reshaping: a case series. *J. Cont. Lens Assoc. Ophthalmol, Inc (USA)* 30(4): 231-233.
- Lema, Isabel, Rodriguez A., Theresa M., Gomez, T., Manuel, Penalver & Dolores, M. 2001. Adherence of *Acanthamoeba* to unworn conventional and disposable soft contact lens. *J. Cornea Ext. Dis.* 20(6): 635-638.
- Lucy, C.T. 2000. Topical ocular antibiotics: part 1. *Pharma J.* 264:298-301.
- Marciano-Cabral, F. & Guy, C. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(2): 273-307.
- Mohamed Kamel, A.G., Faridah, H.A., Norazah, A., Noor Rain, A., John H., David, S. 2000. A case of waterborne contact lens associated *Acanthamoeba* keratitis from Malaysia: Successful treatment with chlorhexidine and propamidine. *Inter. Med. J.* 7(1): 63-65.
- 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.
- Narasimhan, Sandhya M.S., Madhavan, Hajib N. & Lily, T. 2001. Development and application of an in vitro susceptibility test for *Acanthamoeba* species isolated from keratitis to polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. *J. Cornea Ext. Dis.* 21(2): 203-205.

- Niszl, I.A. & Markus, M.B. 1998. Anti-*Acanthamoeba* activity of contact lens solution. *Br J. Ophthalmol.* 82: 1033-1038.
- Schwarzwald, Heidi, Shah, Purvi, Hicks, John, Levy, Moise, Wagner, Milton, L., Kline, & Mark, W. 2003. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a human immunodeficiency virus-infected infant. *Paed. Infect Dis. J.* 22(2): 197-199.
- William T.D.J. 2003. Present status of contact lens-induced corneal infections. *Ophthalmol. Clin. North Am.* 16(3): 101-107.

Noradilah Samsah Abdullah
Mohamed Kamel Abdul Ghani
Jabatan Sains Bioperubatan
Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu
Universiti Kebangsaan Malaysia
50300 Jalan Raja Muda Abdul Aziz
Kuala Lumpur, Malaysia.

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

Corresponding author: Mohamed Kamel Abd. Ghani
Email address: mkamal@medic.ukm.my
Tel: 603-92897632; Fax: 603-: 603-26929032

Received: October 2008
Accepted for publication: May 2009