JURNAL FARMASI SAINS DAN KOMUNITAS, Mei 2014, hlm. 43-47 Vol. 11 No. 1
ISSN : 1693-5683

KAJIAN MOLEKULER RESISTENSI *Candida albicans* TERHADAP ANTIFUNGI

DAMIANA SAPTA CANDRASARI

Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta

Email korespondensi: *damiana@usd.ac.id*

Abstract: *Candida albicans is one of the species Candida which mostly cause infection in human. Antifungal agent azole, polyene, echinocandin, and flucytosine are commonly used for Candida albicans infection treatment. The increasing using antifungal agent will cause antifungal resistance. Most of this resistance happen through gene mutation. This mutation may influence efflux pumps, interaction of the drug and the target enzyme, the component of fungal structure biosynthesis, and conformation of compound in fungal cell.*

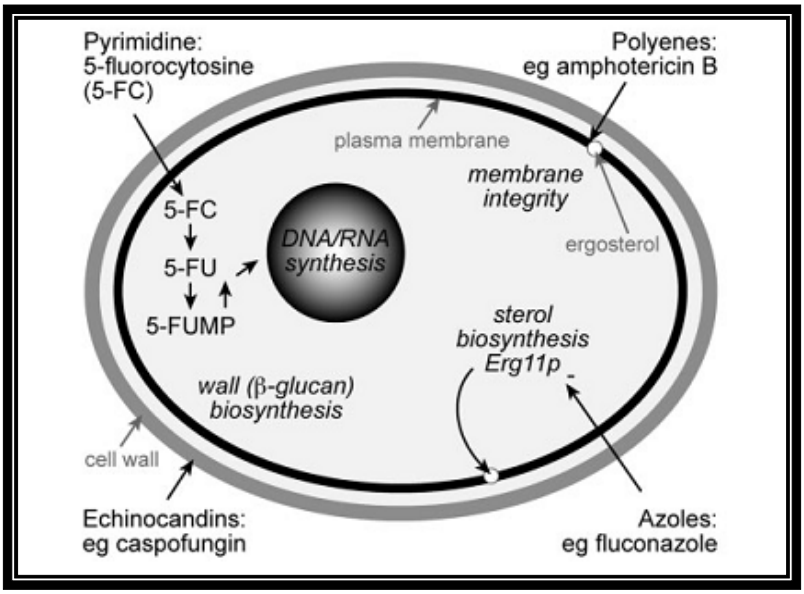
Keywords: *Candida albicans, antifungal agent, resistance, gene mutation*

1. Pendahuluan

Candida spp merupakan mikrobiota normal pada tubuh manusia dan dapat ditemukan pada *mucosal oral cavity*, saluran gastrointestinal dan vagina (Sardi *et al.*, 2013). Adanya peningkatan populasi fungi di dalam tubuh manusia dapat menimbulkan berbagai masalah kesehatan. Infeksi fungi yang disebabkan oleh khamir dalam genus *Candida* disebut dengan candidiasis (Walsh dan Dixon, 1996). Secara umum, terdapat tiga tipe candidiasis, yaitu *vaginal*, *oral* dan *gastrointestinal candidiasis* (Moyes and Naglik, 2011). *Vaginal candidiasis* terjadi pada ±75% wanita, dengan frekuensi paling tidak sekali selama masa hidupnya (Marchaim *et al.*, 2012). Kasus terjadinya *vaginal candidiasis* adalah sebanyak 30 juta/tahun. Sementara itu, *oral candidiasis* banyak terjadi pada penderita HIV dengan jumlah kasus 2 juta/tahun. Spesies *Candida* juga dapat menyebabkan penyakit mukosal pada orang tua, sebagai contoh adalah *Candia-associated denture stomatitis* (Moyes and Naglik, 2011).

Spesies dari genus *Candida* yang dikenal sebagai khamir paling patogenik adalah *Candida albicans*. Spesies ini seringkali ditemukan sebagai penyebab infeksi superfisial dan sistemik (Moran *et al.*, 2012). Penyakit yang disebabkan infeksi *C.albicans* pada manusia dapat berupa *non-life-threatening mucocutaneous* sampai penyakit yang bersifat *life-threatening invasive* (Achkar and Fries, 2010). Kemampuan infeksi *C.albicans* didukung oleh faktor virulensi yang luas dan *fitness attributes*. Beberapa faktor virulensi yang terlibat antara lain perubahan morfologi antara bentuk khamir dan *hyphal*, ekspresi *adhesin* dan *invasin* pada permukaan sel, *thigmotropisme*, pembentukan biofilm, perubahan fenotipik, dan sekresi enzim hidrolase. Sementara itu, *fitness attributes* berkaitan dengan adaptasi yang cepat terhadap fluktuasi pH lingkungan, fleksibilitas metabolisme, pengambilan nutrisi yang kuat, dan respon kuat terhadap tekanan lingkungan sekitar (Mayer *et al.*, 2013).Gambar 1. Target antifungi pada *C.albicans* (Cannon *et al.*, 2007).

Pengobatan candidiasis dilakukan dengan obat antifungi. Terapi penderita *invasive candidiasis* menggunakan *amphotericin B, echinocandin, azole,* dan *flucytosine*. Sementara pada terapi *mucocutaneous candidiasis* digunakan *azole* (Pappas *et al.*, 2004). Tujuan utama pengobatan candidiasis ada dua, yaitu dengan mempengaruhi proliferasi *Candida* pada tubuh dan mengurangi faktor-faktor yang menyebabkan *Candida* dapat tumbuh dengan baik (Zarrin and Mahmoudabadi, 2009). Obat antifungi secara umum berperan



Gambar 1. Target antifungi pada *C.albicans* (Cannon *et al.*, 2007)

dalam menghambat sintesis sterol dalam membran fungi, berinteraksi secara langsung dengan membran sel dan mempengaruhi biosintesis dinding sel (Casalinuovo *et al.*, 2004).

Agen antifungi untuk terapi candidiasis yang disebabkan oleh *C.albicans* adalah *fluorinated pyrimidine cytosine* (5-FC) yang mentarget sintesis RNA dan replikasi DNA, *polyene* yang dapat mempengaruhi integritas membran sel, *azole* dengan target jalur biosintesis ergosterol, dan *echinocandins* yang dapat berpengaruh pada biosintesis dinding sel (Cannon *et al.*, 2007).

Penggunaan agen antifungi mengalami peningkatan sejalan dengan semakin banyaknya infeksi *C.albicans*. Hal tersebut dapat menimbulkan konsekuensi klinis tertentu. Sebagai contoh adalah konsekuensi klinis akibat penggunaan *azole* secara luas, yaitu ditemukannya isolat yang bersifat resisten terhadap *azole* (Li-Juan *et al.*, 2010). Resistensi terhadap antimikrobia merupakan fenomena biologis yang dapat berdampak bagi kesehatan manusia. Resistensi tersebut tidak hanya terjadi pada bakteri namun juga pada fungi patogen (Cannon *et al.*, 2007). Resistensi didefinisikan sebagai peristiwa terjadinya ketidakpekaan mikrobia terhadap agen antimikrobia. Ketidakpekaan ditunjukkan dengan konsentrasi agen antimikrobia yang dibutuhkan untuk menghambat patogen tersebut lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi yang menghambat pertumbuhan strain *wild-type* (Loeffler and Stevens, 2003; Pfaller, 2011).

Resistensi antifungi merupakan salah satu penyebab terjadinya kegagalan pengobatan klinis infeksi fungi selain oleh penyebab lain seperti imunitas pasien yang lemah, bioavailibilitas obat yang rendah dan metabolisme obat yang cepat (Loeffler and Stevens, 2003). Kasus kegagalan pengobatan *fluconazole* karena adanya perkembangan resistensi pada fungi patogen *C.albicans* telah ditemukan sejak tahun 1990 (Cannon *et al.*, 2007). Pada penelitian-penelitian selanjutnya, resistensi *C.albicans* tidak hanya ditemukan pada terapi *fluconazole* saja, namun juga pada antifungi yang lain. Berikut akan dijelaskan lebih lanjut mengenai mekanisme resistensi *C.albicans* ditinjau dari segi molekuler terhadap empat obat antifungi.

2. Resistensi *azole*

Senyawa *azole* bekerja dengan melakukan penghambatan terhadap enzim *lanosterol demethylase (14α-sterol demethylase)*. Enzim ini berperan dalam

konversi lanosterol menjadi ergosterol (Casalinuovo *et al.*, 2004). Ergosterol merupakan sterol yang paling umum ditemukan pada membran plasma fungi (Loeffler and Stevens, 2003). Sterol bertanggung jawab terhadap rigiditas, stabilitas membran dan pertahanan terhadap tekanan fisik (Mukhopadhyay *et al.*, 2004).

Enzim *lanosterol demethylase* dikode oleh gen ERG11 yang turut berperan dalam jalur biosintesis ergosterol. Adanya hambatan terhadap enzim *lanosterol demethylase* oleh *azole* menyebabkan membran sel kekurangan kandungan ergosterol. Selain itu, juga mengakibatkan akumulasi senyawa sterol toksik (produk intermediate dari jalur biosintesis) yang akan mengganggu pertumbuhan khamir (Akins,2005 ; Cannon *et al.*, 2007). Target lain senyawa *azole* adalah lipid pada membran plasma, *azole* juga dapat berinteraksi dengan *3-ketosteroid reductase* (enzim pada biosintesis *methylsterol*) (Loeffler and Stevens, 2003).

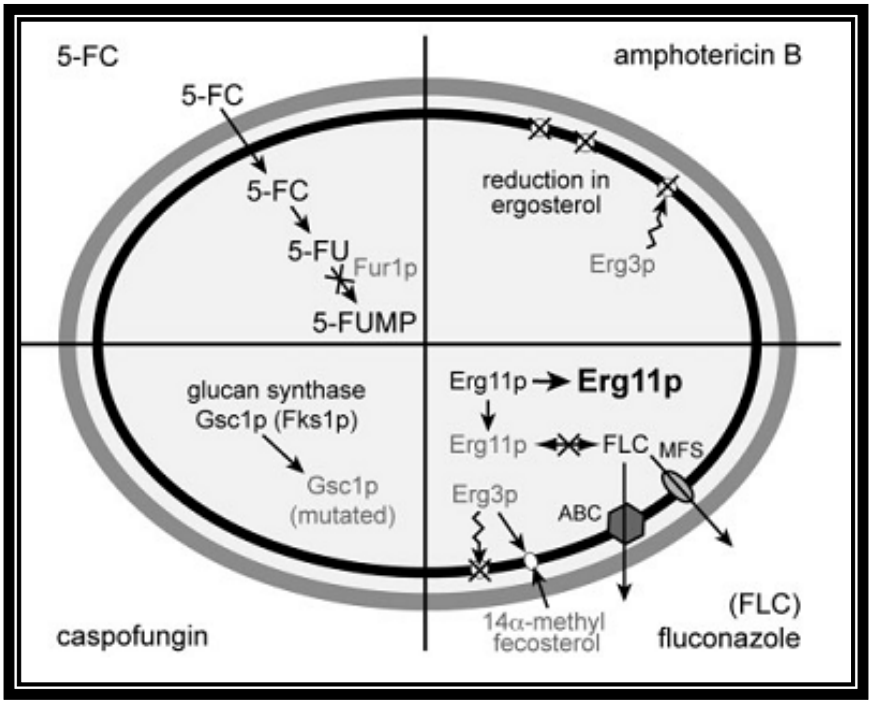
Resistensi *C.albicans* terhadap *azole* dapat terjadi melalui beberapa mekanisme sebagai berikut.

2.1. Penurunan konsentrasi obat

Pompa efluks pada spesies *Candida* dikode oleh dua kelompok gen transporter, yaitu gen CDR dari *ATP-binding cassette super family* dan gen MDR dari *major facilitator class* (Kanafani and Perfect, 2008). Pompa efluks tersebut diketahui dapat memompa berbagai macam substrat termasuk *azole*, namun tidak bagi senyawa antifungi *echinocandin* (Lamping *et al.*, 2007; Niimi *et al.*, 2006). Peningkatan regulasi gen CDR1, CDR2 dan MDR1 ditemukan pada *C.albicans* yang resisten terhadap *azole* (Sanglard *et al.*, 1995). Peningkatan regulasi gen tersebut dapat berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas pompa efluks sehingga dapat mengakibatkan penurunan konsentrasi efektif obat pada sel fungi (Casalinuovo *et al.*, 2004).

2.2. Gangguan interaksi terhadap enzim target

Mutasi gen ERG11 akan mempengaruhi ikatan *azole* pada sisi enzimatik (Kanafani and Perfect, 2008). Adanya *point mutation* pada gen tersebut diketahui dapat menurunkan pengikatan



Gambar 2. Mekanisme resistensi antifungi pada *C.albicans* (Cannon *et al.*, 2007)

fluconazole yang merupakan salah satu jenis senyawa *azole* (Canon *et al.*, 2007). Kurang lebih sebanyak 80 substitusi asam amino telah dideteksi pada protein ERG11. (Kanafani and Perfect, 2008). Pada isolat *C.albicans* yang resisten terhadap *fluconazole* seringkali ditemukan adanya substitusi asam amino di dekat *heme-binding site*. Substitusi asam amino terjadi pada posisi 464 (G464S) dan posisi 467 (R467K) menyebabkan gangguan struktural atau fungsional enzim sehingga menurunkan afinitas *fluconazole* terhadap protein ERG11 (Casalinuovo *et al.*, 2004). Substitusi asam amino posisi 315 (T315A) juga ditemukan pada *C.albicans*. Substitusi ini menyebabkan penurunan aktivitas *lanosterol demethylase* sebanyak dua kali lipat dan penurunan afinitas terhadap *fluconazole*. Sementara itu, substitusi asam amino pada posisi 105 dari fenilalanina menjadi leusina menyebabkan penurunan pengikatan pada sisi aktif enzim (Loeffler and Stevens, 2003).

2.3. Peningkatan konsentrasi enzim yang menjadi target

Peningkatan regulasi atau overekspresi enzim yang menjadi target antifungi dapat menjadi penyebab resistensi *azole* pada *C.albicans* (Pfaller, 2011). Konsentrasi intraseluler protein ERG11 ditemukan lebih tinggi pada isolat *Candida* yang mengalami penurunan suseptibilitas terhadap *azole* dibandingkan pada strain yang masih sensitif. Adanya peningkatan regulasi protein dapat terjadi melalui proses amplifikasi gen, peningkatan transkripsi dan penurunan degradasi produk gen. Pada kondisi ini, penggunaan *azole* walaupun diberikan secara rutin tidak mampu menghambat sintesis ergosterol (Kanafani and Perfect, 2008).

2.4. Gangguan pada gen ERG3

Gen ERG3 pada *C.albicans* mengkode C5,6 desaturase (Miyazaki *et al.*, 2006). Mutasi pada gen ERG3 menyebabkan adanya gangguan perubahan formasi *14α-methylfecosterol* yang seharusnya menjadi *14α-methyl-3,6-diol* (Kanafani and Perfect, 2008). Dua isolat klinis *C.albicans* dari pasien AIDS menunjukkan adanya resistensi akibat defek pada sterol $D^{(5,6)}$ desaturase yang membuat adanya akumulasi *14α-methylfecosterol* (Loeffler and Steven, 2003). Mutasi gen ERG3 pada strain *Candida* tertentu yang bersifat resisten berkaitan dengan ketiadaan aktivitas perusakan membran oleh *azole* yang berasosiasi dengan penghambatan pertumbuhan fungi (Pffaler, 2011).

2. Resistensi *polyene* (amphotericin B [AmB] dan formulasi lipid nya)

AmB diketahui mempunyai aktivitas luas terhadap berbagai macam fungi, termasuk kapang dan khamir. Target antifungi ini adalah ergosterol yang ada pada struktur membran plasma. AmB akan membentuk saluran sehingga saluran *potassium* sel fungi mengalami kebocoran. Kebocoran tersebut menyebabkan gangguan pada gradien proton (Loeffler and Stevens, 2003). Pembentukan *porin channel* selanjutnya akan membuat hilangnya potensial transmembran dan kerusakan fungsi seluler (Kanafani and Perfect, 2008). AmB juga menyebabkan kerusakan oksidatif pada membran plasma. *Polyene* dalam konsentrasi yang lebih tinggi mampu menghambat enzim *chitin synthase* (Loeffler and Stevens, 2003).

Isolasi *C.albicans* yang resisten terhadap AmB dari pasien leukemia telah dilaporkan pada penelitian Nolte *et al.* (1997). Penyebab resistensi *polyene* adalah gangguan terhadap komposisi lipid pada membran plasma (Loeffler and Stevens, 2003). Strain yang resisten terhadap *polyene* diketahui mengalami kekurangan ergosterol dibandingkan strain yang masih sensitif. Kandungan ergosterol yang berkurang diakibatkan oleh defek pada gen ERG3 yang terlibat dalam biosintesis ergosterol (Kanafani and Perfect, 2008; Cannon, *et al.* 2007). Kondisi tersebut menyebabkan penurunan afinitas AmB terhadap membran plasma (Loeffler and Stevens, 2003).

Resistensi terhadap *polyene* juga dapat dimediasi oleh peningkatan aktivitas katalase

bersamaan dengan penurunan suseptibilitas terhadap kerusakan oksidatif (Kanafani and Perfect, 2008). Selain itu, gangguan kandungan *β-1,3-D glucans* pada dinding sel fungi juga dapat mengakibatkan resistensi. Komponen tersebut berperan dalam proses masuknya molekul besar seperti AmB ke membran plasma (Loeffler and Stevens, 2003)

3. Resistensi *echinocandin*

Tiga senyawa antifungi, yaitu *caspofungin*, FK-463 dan VER-002 yang termasuk dalam kelas antifungi *echinocandin* bekerja dengan mempengaruhi biosintesis *β-1,3-D glucans* (Loeffler and Steven, 2003). *β-1,3-D glucan* merupakan komponen pada dinding sel berbagai fungi (Douglas, 2001). Adanya gangguan pembentukan dinding sel akan mengakibatkan pecahnya sel. Gangguan pada biosintesis *β-1,3-D glucan* terjadi melalui aktivitas penghambatan *echinocandin* terhadap *β-1,3-D glucan synthase* (Pfaller, 2011 ; Kanafani and Perfect, 2008).

Terjadinya resistensi *echinocandin* dalam genus *Candida* berasosiasi dengan *point mutation* pada dua regio (HS1 dan HS2) gen FKS1 yang mengkode subunit katalitik dari *β-1,3-D glucan synthase* (Perlin, 2007). Mekanisme resistensi tersebut tidak hanya ditemukan pada *Candida albicans*, namun juga pada spesies non albicans (Katiyar *et al.*, 2006).

4. Resistensi *flucytosine*

Flucytosine (5-FC) ditranspor secara aktif ke dalam sel oleh *membran permeases* (Hope *et al.*, 2004). Selanjutnya, 5-FC akan mengalami modifikasi dalam bentuk *5-fluorouracil* dan dikonversi menjadi *fluorouridine triphosphate* yang akan bergabung dengan RNA fungi sehingga menyebabkan gangguan sintesis protein. 5-FC juga dapat dikonversi menjadi *fluorodeoxyuridine monophosphate* yang dapat berinterferensi dengan enzim *thymidylate synthase*. Hambatan aktivitas *thymidylate synthase* menyebabkan gangguan sintesis DNA (Loeffler and Stevens, 2003).

Resistensi 5-FC berkaitan dengan mutasi enzim *uracil phosphoribosyl-transferase* (Fur 1p) yang akan mempertahankan bentuk *5-fluorouracil* dari konversi menjadi *5-fluoridine* (Cannon *et al.*, 2007). Pada isolat *C.albicans* yang resisten terhadap 5-FC ditemukan bahwa resistensi berasosiasi dengan penurunan aktivitas *uridine monophosphate pyrophosphorylase* (Loffler and Stevens, 2003).

5. Kesimpulan

Sebagian besar mekanisme molekuler resistensi *C.albicans* pada agen antifungi disebabkan oleh adanya mutasi gen. Mutasi ini akan mempengaruhi pompa efluks, ikatan obat dengan target enzim, biosintesis komponen dari stuktur fungi, dan konformasi senyawa dalam sel fungi. Pengembangan penelitian mekanisme resistensi antifungi sangat penting untuk menanggulangi dan mencegah terjadinya resistensi. Selain itu, juga berguna bagi pemberian pengobatan yang tepat pada pasien sehingga pengobatan yang dilakukan dapat berjalan secara efektif.

Daftar Pustaka

Achkar, J.M. and Fries, B.C., 2010, *Candida* Infection of the Genitourinary Tract, *Clinical Microbiol Rev*, vol.23, no.2, 253-273.

Akins, R. A, 2005, An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*, *Med Mycol* ,43, 285–318.

Cannon, R.D., Lamping E., Holmes, A.R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M.,and Monk, B.C., 2007, *Candida albicans* drug resistance-another way to cope with stress, *Microbiology*, 153, 3211-3217.

Casalinuovo, I.A., Di Francesco, P., and Garaci, E., 2004, Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 8:69-77.

Douglas, C.M., 2001, Fungal β(1,3)-D-glucan synthesis, *Med Mycol*, 39(suppl1), 55-66.

Hope, W.W., Tabernero, L., Denning, D.W., and Anderson, M.J., 2004, Molecular Mechanisms of Primary Resistance to Flucytosine in *Candida albicans*, *Antimicrob.Agents Chemother,* 48(11):4377.

Kanafani, Z.A. and Perfect, J.R., 2008, Resistance to

Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact, *Clin Infect Dis,*46:120-8.

Katiyar, S., Pfaller, M., and Edlind, T., 2006, *Candida albicans* and *Candida glabrata* Clinical Isolates Exhibiting Reduced Echinocandin Susceptibility, *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 2892-2894.

Lamping, E., Monk, B.C., Niimi, K., Holmes, A.R., Tsao, S., Tanabe, K., et al., 2007, Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyper-expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryot Cell*, 6, p.1150-1165.

Li-Juan, F., Zhe,W., Xia-hong, W., Ruo-Yu, L., and Wei,L., 2010, Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene, *Chin Med J*, 123(5):544-548.

Loeffler, J. And Stevens, D.A., 2003, Antifungal Drug Resistance, *Clin Infect Dis*, 36 (Suppl 1): S31-41.

Marchaim, D., Lemanek, L., Bheemreddy, S., Kaye, K.S., Sobel, J.D., 2012, Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis, *Obstet Gynecol*, 120:1407-14.

Mayer, F.l., Wilson, D., and Hube, B., 2013, *Candida albicans* pathogenicity mechanisms, *Virulence*, 4:2, 119-128.

Miyazaki, T., Miyazaki, Y., Izumikawa, K., Kakeya, H., Miyakoshi, S., Bennett, J.,E., Kohno, S., 2006, Fluconazole Treatment Is Effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 Mutant In Vivo Despite In Vitro Resistance, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50, 580-586.

Moran, G.P., Coleman, D.C., and Sullivan, D.J., 2012, Review Article: *Candida albicans* versus *Candida dublinensis* : Why Is *C.albicans* more pathogenic?, *International Journal of Microbiology*, Volume 2012, Article ID 205921.

Moyes, D.L. and Naglik, J.R., 2011, Review Article: Mucosal Immunity and *Candida albicans* infection, *Clinical and Developmental Immunology*, Volume 2011, Article ID 346307.

Mukhopadhyay,K., Prasad,T., Saini, P., Pucadyl, T.J., Chattopadhyay, A., Prajad, R., 2004, *Candida albicans* Multidrug Resistance in Interactions Are Important Determinants of Membrane Sphingolipid-Ergosterol, *Antimicrob.Agents Chemother*, 48(5):1778.

Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes, A.R., Lamping, E., Niimi, M., et al., 2006, Overexpression of *Candida albicans CDR1, CDR2*, or *MDR1* Does Not Produce Significant Changes in Echinocandins Susceptibility, 2006, *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1148-1155.

Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J.,and Edwards, J.E., 2004, Guidelines for Treatment of Candidiasis, *CID*, 38:161-89.

Perlin, D.S., 2007, Resistance to echinocandin-class antifungal drugs, *Drugs Resist Update*, 10(3): 121-130.

Pffaler, M.A., 2011, Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment, *The American Journal of Medicine*,125, S3-S13.

Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M., Bille,J., 1995, Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agent in Candida albicans Isolates from AIDS Patients Involve Specific Multidrug Transpoters, *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 2378-2386.

Sardi, J.C.O., Scorzoni,L., Bernardi,T.,Fusco-Almeida,A.M., and Mendes Giannini, M.J.S., 2013, Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, *Journal of Medical Microbiology*, 62, 10–24

Walsh, T.J. and Dixon, D.M., 1996, "Deep Mycoses". In Baron S et al. eds. Baron's Medical Microbiology, 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.

White, T.C., 1997, Increased mRNA Levels of ERG16, CDR, and MDR1 Correlate with Increases in Azole Resistance in *Candida albicans* Isolates from a Patient Infected with Human Immunodeficiency Virus, *Antimicrob.Agents Chemother,*41, p 1482-1487.

Zarrin, M. and Mahmoudabadi, A.Z., 2009, Invasive candidiasis; a review article, *Jundihaspur Journal of Microbiology*, 2(1): 1-6.