

## Pola Kepekaan *Candida krusei* Isolat Jakarta terhadap Flukonazol

Ayu Eka Fatril,\* Robiatul Adawiyah,\*\*,\*\*\*,\*\*\*\* Retno Wahyuningsih,\*\*,\*\*\*\*\*

\*Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, DKI Jakarta

\*\*Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, DKI Jakarta

\*\*\*Research Centre of Biomedical Engineering, Universitas Indonesia, DKI Jakarta

\*\*\*\*Program Studi Dokter Spesialis, Parasitologi klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, DKI Jakarta

\*\*\*\*\*Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia, DKI Jakarta

### Abstrak

**Pendahuluan:** *Candida krusei* menghuni tubuh manusia sebagai saprofit namun dapat berubah menjadi patogen dan menyebabkan mikosis. *Candida krusei* umumnya bersifat resisten primer terhadap flukonazol, namun data laboratorium di Jakarta menemukan adanya *C. krusei* yang bersifat sensitif terhadap flukonazol sehingga dilakukan studi prospektif mengenai hasil uji kepekaan *C. krusei* isolat Jakarta, memakai isolat *C. krusei* yang berbeda.

**Metode:** Penelitian dilaksanakan tahun 2019-2020 di laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Sebanyak 15 isolat *C. krusei* diuji dengan metode difusi cakram. Sebelum digunakan isolat uji disegarkan dan dipurifikasi sehingga diperoleh koloni tunggal.

**Hasil:** Isolat yang digunakan berasal dari feses, sputum, broncho-alveolar lavage (BAL) dan satu isolat dari abses paru. Hasil uji kepekaan didapat sembilan isolat resisten, satu isolat intermediate dan lima isolat yang bersifat sensitif terhadap flukonazol.

**Kesimpulan:** Secara *in vitro*, *C. krusei* isolat Jakarta tidak seluruhnya bersifat resisten primer terhadap flukonazol, namun sebagian peka.

**Kata Kunci:** *Candida Krusei*, Difusi Cakram, Peka, Resisten.

## Susceptibility Pattern of *Candida krusei* Jakarta Isolates to Fluconazole

Ayu Eka FatriL,\* Robiatul Adawiyah,\*\*,\*\*\*,\*\*\*\* Retno Wahyuningsih \*\*,\*\*\*\*\*

\*Magister of Biomedical Science Program, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, DKI Jakarta

\*\*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, DKI Jakarta

\*\*\*Research Centre of Biomedical Engineering, Universitas Indonesia, DKI Jakarta

\*\*\*\*Study Program of Clinical Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, DKI Jakarta

\*\*\*\*\*Parasitology Division, School of Medicine, Christian Indonesian University, DKI Jakarta

### Abstract

**Introduction:** *Candida krusei* inhabit the human body as saprophyte but can turn into pathogen and causes mycosis. *Candida krusei* usually primarily resistant to fluconazole but laboratory data in Jakarta has different results. We found fluconazole-susceptible isolates which encouraged us to do prospective studies using the different isolates of *C. krusei*.

**Method:** The study was conducted in 2019-2020 in the Laboratory of Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia. The total of 15 *C. krusei* isolates were tested by disc diffusion method. Before being tested, the isolates were refreshed and purified to obtain a single colony.

**Result:** The isolates used, derived from many clinical samples i.e. stool, sputum, broncho-alveolar lavage (LAB) and one isolate isolated from lung abscess. The result of susceptibility test showed nine fluconazole-resistant isolates, one intermediate isolate and five fluconazole-susceptible isolates.

**Conclusion:** It can be concluded, in vitro, some *Candida krusei* isolates in Jakarta are susceptible to fluconazole.

**Keywords:** *Candida krusei*, disc diffusion test, susceptible, resistant

## Pendahuluan

*Candida spp.* diketahui dapat hidup dalam tubuh manusia sebagai saprofit. Dalam kondisi normal, jamur tersebut dijaga agar tetap hidup sebagai saprofit oleh keseimbangan antar mikroorganisme, imunitas dan sawar epitel yang intak.<sup>1</sup> Bila hal di atas hilang maka *Candida* dapat berubah menjadi patogen dan menyebabkan mikosis, mengakibatkan infeksi sistemik yang mematikan.<sup>2</sup> Salah satu spesies *Candida* yang penting adalah *Candida krusei* karena sifatnya yang unik yakni resisten primer terhadap flukonazol, obat antijamur yang banyak digunakan untuk terapi infeksi *Candida*.<sup>3-5</sup>

Hasil pemeriksaan uji kepekaan di laboratorium Parasitologi klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) menemukan hal yang berbeda. Rony melakukan study retrospektif terhadap data laboratorium Parasitologi FKUI sejak tahun 2004 hingga 2015. Data uji kepekaan terhadap *Candida* menemukan beberapa isolat *C. krusei* yang sensitif terhadap flukonazol. Dari 135 isolat yang diuji menggunakan metode difusi cakram terdapat 98 isolat yang sensitif terhadap flukonazol.<sup>6</sup>

Hasil di atas mendorong penulis untuk

melakukan studi prospektif yang bertujuan untuk mengetahui lebih lanjut tentang pola kepekaan *C. krusei* isolat Jakarta terhadap flukonazol.

## Metode

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2018 hingga September 2019 di laboratorium Mikologi, Departemen Parasitologi FKUI. Penelitian ini bersifat prospektif dengan desain potong lintang.

Sebanyak 15 isolat *C. krusei* yang diisolasi dari berbagai bahan klinik telah digunakan dalam penelitian ini. Bahan klinik ditanam pada agar Sabouraud dekstroza dengan dan tanpa kloramfenikol dan isolat yang tumbuh diidentifikasi dengan sistem Vitek 2 (BioMerieux, Paris, Perancis). Selanjutnya isolat disimpan di *Pathogenic Culture Collection* (PCC) Departemen Parasitologi FKUI sebelum diuji. Kontrol kualitas dilakukan dengan isolat standar yakni *C. krusei* ATCC 6258 yang resisten flukonazol dan *C. parapsilosis* ATCC 22019 yang peka terhadap flukonazol.<sup>7</sup> Penelitian ini telah memperoleh izin dari Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI No. 0713/UN2.F1/ETIK/2018.

### Penyegaran dan Purifikasi Isolat

Sebelum digunakan untuk uji kepekaan, isolat diambil dari PCC Departemen Parasitologi FKUI dan disegarkan dengan menanam kembali jamur pada medium agar Sabouraud dekstrosa pada suhu kamar. Selanjutnya jamur yang tumbuh ditanam pada medium kromogenik (CHROMAgar Candida, Paris, Perancis) untuk mendapatkan koloni tunggal. Koloni tunggal yang tumbuh pada medium kromogenik diuji ulang pada sistem Vitek 2 untuk memastikan isolat uji adalah *C. krusei*.

### Uji Kepekaan Menggunakan Difusi Cakram

Untuk uji kepekaan dilakukan menggunakan metode difusi cakram untuk flukonazol (konsentrasi 25 ug flukonazol, no. kat.9166, Liofilchem Sri, Italia). Pemeriksaan dilakukan sesuai dengan petunjuk pabrikan. Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut. Inokulum yang digunakan untuk uji difusi cakram dipersiapkan dengan cara, satu ose *C. krusei* disuspensikan ke dalam 1 ml akuadest steril dan dihomogenisasi dengan vorteks. Konsentrasi *C. krusei* diukur hingga mencapai konsentrasi akhir  $1,5 \times 10^3$  sel/ml. Selanjutnya inokulum di inokulasi pada medium *Müller Hinton* dengan cara sebagai berikut. Masukkan kapas lidi steril ke dalam suspensi, angkat kapas lidi dan tiriskan di dinding tabung. Selanjutnya kapas lidi dengan suspensi jamur tersebut dioleskan di seluruh permukaan agar *Müller Hinton*. Tunggu 1-2 menit agar cairan meresap, kemudian letakkan disk flukonazol dipermukaan agar yang telah diinokulasi. Interpretasi hasil diperoleh berdasarkan ukuran diameter zona hambat pertumbuhan. *Candida* dianggap resisten bila diameter zona hambat  $\leq 14$  mm, dinyatakan intermediet bila diameter 15-18 mm dan sensitif bila diameter zona hambat  $\geq 19$  mm.<sup>7</sup>

### Hasil

Upaya purifikasi atau pemurniaan isolat dilakukan dengan menanam jamur pada medium CHROMAgar Candida. Jamur tampak sebagai koloni terpisah yang selanjutnya dipakai untuk uji kepekaan (Gambar 1.) Pada medium terlihat bahwa isolat *C. krusei* uji memiliki warna merah muda dan lebih gelap pada puncak koloni dengan permukaan koloni yang halus hingga berkerut. Uji ulang dengan vitek memperlihatkan seluruh jamur uji adalah *C. krusei*. Hasil uji kepekaan menggunakan difusi cakram.



Gambar 1. Purifikasi Isolat *C. krusei*

Hasil uji kepekaan pada 15 isolat *C. krusei* isolat Jakarta. Hasil pengamatan terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Uji Kepekaan *C. krusei* untuk Flukonazol Dengan Menggunakan Difusi Cakram

No	Nomor Isolat	Asal Isolat	Difusi cakram	
			Diameter (mm)	Interpretasi data
1.	1	Pus abses paru	21,9	S
2.	2	Sputum	19,2	S
3.	3	BAL	18,1	I
4.	4	ND	7,0	R
5.	5	Sputum	0,0	R
6.	6	Feses	13,2	R
7.	7	Feses	13,7	R
8.	8	Feses	1,3	R
9.	9	Feses	14,4	R
10.	10	Feses	13,7	R
11.	11	Feses	1,0	R
12.	12	Feses	13,7	R
13.	13	Feses	19,1	S
14.	14	Feses	23,1	S
15.	15	Feses	22,4	S
16.	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	QC	7	R
17.	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	QC	27,1	S

Keterangan : ND, No data; QC, quality control

Sampel yang didapat terbanyak berasal dari fekes, abses paru, broncho-alveolar lavage, sputum dan tinja. Hasil uji kepekaan menggunakan difusi cakram pada isolat uji diperoleh bahwa sembilan isolat resisten, lima isolat sensitif serta satu isolat yang intermediet terhadap flukonazol.

## Diskusi

Penanaman pada medium kromogenik untuk mendapatkan koloni tunggal. Hal tersebut merupakan upaya purifikasi yang diperlukan untuk mencegah kemungkinan *mixed colonies* serta memastikan secara fenotipik bahwa isolat uji adalah *C. krusei*. Selanjutnya identifikasi ulang dengan Vitek 2 memastikan bahwa isolat uji adalah *C. krusei*.

Hasil kontrol kualitas menunjukkan *C. krusei* ATCC 6258 resisten terhadap flukonazol, sementara *C. parapsilosis* ATCC 22019 sensitif terhadap flukonazol. Kedua spesies *Candida* tersebut selama ini telah digunakan di berbagai laboratorium dan penelitian sebagai *quality control* untuk uji kepekaan. Pada penelitian ini kontrol kualitas menunjukkan hasil yang diharapkan. Hal itu menunjukkan bahwa metode yang digunakan pada penelitian ini bekerja dengan baik sehingga dapat dipastikan data yang didapat juga valid.

Baku emas yang umum digunakan dalam pengujian uji kepekaan jamur adalah *broth dilution*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa uji imunodifusi dan *broth macro dilution method* mempunyai kesetaraan hasil yang tinggi.<sup>8,9</sup> Keuntungan lain metode difusi cakram adalah mudah, murah dan memberikan hasil yang cepat sehingga dapat mendukung efisiensi waktu di laboratorium.<sup>10</sup> Penelitian lain oleh Dasthi *et al.*, juga melaporkan bahwa kedua metode tersebut tidak berbeda secara signifikan dalam uji kepekaan terhadap bakteri.<sup>11</sup>

Hasil penelitian ini menunjukkan sebagian besar sampel uji resisten terhadap flukonazol. *Candida krusei* selama ini dilaporkan resisten primer/intrinsik terhadap flukonazol baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.<sup>12,13</sup> Selain isolat yang resisten pada penelitian ini ditemukan lima isolat yang sensitif dan satu isolat intermediate. Hasil penelitian ini menguatkan hasil penelitian retrospektif Ronny yang menemukan isolat *C. krusei* yang sensitif terhadap flukonazol.<sup>6</sup> Penemuan *in vitro* tersebut diperkuat secara *in vivo* oleh hasil terapi pada dua pasien yang mengalami infeksi epididimis dan buli-buli, kedua pasien tersebut sembuh setelah mendapat flukonazol dosis intermediate yang dibuktikan dengan pemeriksaan laboratorium mikologi. Ditemukannya isolat yang sensitif dan intermediate, menunjukkan bahwa terdapat isolat *C. krusei* di Jakarta yang memiliki sifat berbeda dengan *C. krusei* yang selama ini diketahui yaitu resisten terhadap flukonazol.

Flukonazol adalah obat anti jamur yang selama ini telah digunakan secara luas baik untuk mikosis superfisial maupun mikosis sistemik.<sup>14,15</sup> Flukonazol bersifat larut air, mudah diserap hingga ketersediaan hayatinya dalam darah sangat baik. Selain itu flukonazol mudah melalui sawar otak sehingga merupakan salah satu obat yang banyak digunakan untuk berbagai mikosis yang disebabkan yeast, kecuali *C. krusei*.<sup>16</sup> Penemuan isolat *C. krusei* yang sensitif flukonazol tentu menimbulkan pertanyaan apakah ada perbedaan antara isolat yang sensitif dengan isolat yang resisten? Apakah isolat yang sensitif dan *intermediate* mempunyai profil genetik yang berbeda dengan *strain* yang resisten? Baik profil basa DNA di daerah ribosom yakni wilayah internal spacer dan large *sub unit* (ITS region dan LSU) maupun profil/ aktivitas gene *ERG11* yang terlibat dalam proses biosintesis ergosterol melalui penyandian enzim yang terlibat dalam proses tersebut.<sup>17-20</sup> Saat ini penelitian tentang sifat genetik jamur ini tengah berlangsung.

Pada penelitian ini *C. krusei* diisolasi dari seorang pasien abses paru. Kandidiasis paru merupakan hal yang sangat jarang terjadi. Dalam rentang waktu 1977-2008 hanya dilaporkan dua kasus kandidiasis paru pada pasien imunokompromi dengan gangguan imunitas lokal karena steroid inhalasi dan satu pasien diabetes melitus yang tidak terkontrol.<sup>21,22</sup> Isolat yang diisolasi sensitif terhadap flukonazol yang tentu akan menguntungkan bagi pasien karena tidak diperlukan derivat azol lain seperti vorikonazol yang biasa digunakan untuk terapi kandidiasis yang disebabkan oleh *C. krusei*.<sup>23</sup> Isolat lain terutama berasal dari feses. Keberadaan *Candida* dalam lumen usus sangat penting dalam patogenesis kandidiasis sistemik. *Candida* dalam usus dapat mengalami translokasi dari lumen usus ke dalam sirkulasi dikarenakan adanya lesi dan menyebabkan kandidemia dan diseminasi ke alat dalam.<sup>24,25</sup>

## Kesimpulan

Pola kepekaan *C. krusei* isolat Jakarta terdiri dari isolat yang resisten dan peka terhadap flukonazol.

## Conflicts of Interest

Tidak ada *conflict of interest* dalam tulisan ini.

## Daftar Pustaka

1. Marie C, White TC. Genetic Basis of Antifungal Drug Resistance. *Curr Fungal Infect Rep* 2009;3:163-9.
2. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky ZL. Clinical Practice Guideline for The Management of Candidiasis. *IDSA* 2016;62:1-50.
3. Antinori S, Millazo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and Invasive Candidiasis In Adults: A Narrative Review. *Eur J Intern Med* 2016;434:21-8.
4. Sedeghi G, Ebrahimi-Rad M, Mousavi SF, Shams-Ghahfaroki M, Razzaghi-Abyeneh M. Emergence of On-Candida albicans Species: Epidemiology, Phylogeny and Fluconazole Susceptibility Profile. *J Mycol Med* 2018;28(1):51-8.
5. Colombo AL, Junior JNA, Guinea J. Emerging Multidrug Resistant Candida Species. *Curr Opin Infect Dis* 2017;30(6):528-38.
6. Ronny. Profil Jamur yang Diisolasi dari Darah Klinis dan Pola Kepekaannya [Tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia;2017.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast; Approved Guidline M44-A (May 2004). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2004.
8. Kumar R, Shrivastava SK, Chakraborti A. Comparison of Broth Dilution and Disc Diffusion Method for The Antifungal Susceptibility Testing of Aspergillus Flavus. *Am. J. Biomed. Sci.* 2010;2(3):202-8.
9. Canton E, Peman J, Espinel-Ingroff A, Martn-Mazuelos E, Carrillo-Munoz A, Martinez JP. Comparison of Disc Diffusion Assay with The Clsi Reference Method (M27-A2) for Testing In-Vitro Posaconazole Activity Against Common and Uncommon Yeasts. *J. Antimicrob Chemother* 2008;61:135-8.
10. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *ASM* 2016:1-23.
11. Dasthi AA, Jadaon MM, Habeeb FM. Can We Rely on One Laboratory Test in Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among Enterobacteriaceae? An Evaluation of The Vitek 2 System and Comparison with Four Other Detection Methods in Kuwait. *J Clin Pathol* 2009;62(8):739-42.
12. Dermoumi H. In-Vitro Susceptibility of Yeast Isolates from The Blood to Fluconazole and Amphotericin B. *Chemotherapy* 1992;38:112-7.
13. Fisher MA, Shen SH, Haddad J, Tarry WF. Comparison of In-Vivo Activity of Fluconazole with That of Amphotericin B Against Candida tropicalis, Candida glabrata, and Candida krusei. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1443-6.
14. Dias MFRC, bernardes-Filho F, Schechtman RC, Quaresma-Santos MVP, Amorim AgdF, Azulay DR. Update on Therapy for Superfisial Mycoses. *An Bras Dermatol* 2013;88(5):764-74.
15. Charlier C, Hart E, Lefort A, Ribaud P, Domer F Denning DW et al. Fluconazole for The Management of Invasive Candidiasis: Where Do We Stand After 15 Years?. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:384-90.
16. Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole Resistance in Candida Species: A Current Perspective. *Infect Drug Resist* 2017, 10, 237-45.
17. Benedetti VP, Savi DC, Aluizio R, Adamoski D, Kava V, Galli-Terasawa LV et al. ERG11 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Fluconazole in Candida Isolates from Diabetic and Kidney Transplant Patients. *Rev Sic Bras Med* 2019;52:1-6
18. Alizadeh F, Khodavandi A, Zalakian S. Quantitation of Ergosterol Content and Gene Expression Profile of ERG11 Gene in Fluconazole-Resistant Candida albicans. *Curr Med Mycol* 2017;3:13-9
19. Ricardo ETA. Genetic and Molecular Insights of Candida krusei Antifungal Resistance. *Serviço E Laboratório De Microbiologia Faculdade De Medicina Da Universidade Do Porto* 2015:14-41.
20. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS et al. Azole Antifungal Resistance in Candida albicans and Emerging Non-Albicans Candida Species. *Frontier in Microbiology* 2017;7(2173):1-12
21. Gupta PP, Agarwal D, Yadav R. Lung Abscess Due to Pulmonary Candidiasis. *Lung India* 2006; 23 : 160-2
22. Bachh AA, Haq I, Gupta R, Hanmant V, Mohan R. Pulmonary Candidiasis Presenting as Mycotoma. *Lung India* 2008:165-7.
23. Ghannoum MA, Elewski B. Succesful Treatment of Fluconazole-Resistant Oropharyngeal Candida by A Combination of Fluconazole and Terbinafine. *CDLI* 1999:921-3.
24. Andrutis KA, Riggle PJ, Kumamoto CA, Tzipori S. Intestinal Lesions Associated with Disseminated Candidiasis in An Experimental Animal Model. *J.Clin. Microbiol* 2000;38(6):2317-23.
25. Clemons KV, Gonzalez GM, Singh G, Imai J, Espiritu M, Parmar R, et al. Development of An Orgastrointestinal Mucosal Model of Candidiasis with Dissemination to Viseral Organs. *Antimicrob Agents and Chemother* 2006;50:2650-7.

