

SINERGI KURKUMIN DENGAN FLUKONAZOLE MENGHAMBAT *Candida albicans* STRAIN RESISTEN FLUKONAZOLE DARI ISOLATE OROFARING PASIEN HIV MELALUI EKSPRESI Cdr1p, HAT-Rtt109, METILASI CDR1 & Rtt109

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Doktor



Oleh

NOVIDA ARIANI

NIM. 147070100111007

PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

KEKHSUSUSAN BIOMEDIK

PROSES PENGEMBANGAN PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH

Ariani, N., Ali, M., Noorhamdani, Rahardjo, B., Santoso, B., Aulanni'am, A., Sumarno, Chandra, S. 2018. The Role of Curcumin in Inhibiting Growth of Oropharyngeal Isolates of *Candida albicans* Fluconazole-Resistant Strain from HIV Patients through Decreased Cdr1p Expression. *Medicinal Plants Int. Journal of Phytomed. & Rel. Ind.* 10(1): 1-7

PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah **DISERTASI** ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah disertasi ini dapat dibuktikan unsur-unsur **PLAGIASI**, saya bersedia **DISEERTASI** ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (**DOKTOR**) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 20 Maret 2018

Mahasiswa,

Nama Mahasiswa : Novida Ariani
NIM : 147070100111007
Program Studi : Ilmu Kedokteran
Minat : Biomedik

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala Rahmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul: Sinergi Kurkumin dengan Flukonazole Menghambat *Candida albicans* Strain Resisten Flukonazole dari Isolate Oroatitis Pasien HIV Melalui Ekspresi Cdr1p, HAT-Rtt109, Metilasi CDR1 & Rtt109.

Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Doktor Ilmu Kedokteran Kekhususan Biomedik, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Disertasi ini membahas tentang intervensi epigenetik, khususnya metilasi DNA (CDR1), yang mempengaruhi ekspresi *drug efflux transporter* (Cdr1p) yang sangat berperan pada terjadinya resistensi antifungal melawan *Candida albicans*. Pada disertasi ini, Kurkumin digunakan sebagai agen kombinasi terapi standar (Flukonazole) dan menunjukkan efek sinergis melawan resistensi tersebut.

Dengan selesainya disertasi ini, saya menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. dr. Mulyohadi Ali, SpFK selaku Promotor, Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM., SpMK, Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG (K) dan Dr. dr. Siti Chandra, SpOG (K) (Alm) selaku Ko-promotor yang telah dengan terus-menerus memberikan ilmu, bimbingan dan motivasi dalam menyelesaikan Pendidikan ini.
2. Prof. Dr. dr. Budi Santoso, SpOG (K) (Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga), Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES (Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya) dan Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., SpMK (K) (Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya) selaku penguji yang telah memberikan saran, masukan yang sangat membangun untuk perbaikan disertasi;
3. Seluruh Dosen pada Program Doktor Ilmu Kedokteran Kekhususan Biomedik yang telah memberikan banyak ilmu, masukan dan bimbingan selama proses Pendidikan ini
4. Rektor Universitas Brawijaya Malang, Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh Program Doktor di Universitas Brawijaya
5. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes. yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas

selama saya mengikuti Pendidikan Program Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

6. Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes., SpPK yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. Direktur RSUD Bangil Kabupaten Pasuruan drg. Loembini Pedjati Lajoeng dan mantan Direktur RSUD Bangil dr. Agung Basuki, M.Kes. Wakil Direktur dr. Moch. Jundi Agustoro, SpB, dan dr. Bambang Heru, M.Kes., serta Kabid Yanmed RSUD Bangil dr. Arma Roosalina, MARS, seluruh sejawat dan karyawan RSUD Bangil yang telah memberikan dukungan dan kesempatan, serta masyarakat Kabupaten Pasuruan yang memberikan inspirasi dan motivasi kepada saya untuk mengabdikan ilmu dan pelayanan serta menyelesaikan Pendidikan ini.
8. Segenap Guru dan Senior pada almamater saya di Departemen Obgyn RS Saiful Anwar Malang atas motivasi dan dukungan dalam menyelesaikan Pendidikan ini.
9. Suami Arif Budiarto, ST, Ibunda, Ayahanda (Alm), Mertua, Kakak dan Adik tercinta atas segala kesabaran, dukungan yang sangat besar dan tiada henti sehingga saya dapat menyelesaikan Pendidikan ini.
10. Teman-teman PDIK angkatan 2014 atas kebersamaan dan motivasinya.
11. Seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu yang terlibat dalam penyelesaian disertasi ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Saya menyadari dalam tulisan ini banyak terdapat kekurangan dan keterbatasan sehingga saran dan masukan sangat saya harapkan demi perbaikan disertasi ini.

Malang, Maret 2018

Penulis



RINGKASAN

Novida Ariani, NIM 147070100111007. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 2 April 2018. Sinergi Kurkumin dengan Flukonazole Menghambat *Candida albicans* Resisten dari Isolate Otoraring Pasien HIV Melalui Ekspresi Cdr1p, HAT-Rtt109, Metilasi CDR1 & Rtt109. Komisi Promotor: Mulyohadi Ali, Ko-promotor: Noorhamdani, Bambang Rahardjo.

Insidensi infeksi fungal saat ini meningkat signifikan dan menyebabkan peningkatan morbiditas dan mortalitas. Pada dekade terakhir terjadi peningkatan signifikan resistensi antifungal melawan *C. albicans*. Resistensi ini memiliki implikasi penting bagi morbiditas, mortalitas dan biaya layanan kesehatan masyarakat. Tantangan mengatasi resistensi semakin berat karena penggunaan agen antifungal seperti azole yang masif terbentur oleh toksisitasnya yang tinggi. Suatu studi menunjukkan bahwa resistensi azole terjadi hingga sepetiga isolat *C. albicans* oral yang diperoleh dari pasien positif-HIV.

Mekanisme resistensi antifungal antara lain : 1) Perubahan genetik membran lipid *C. albicans* yaitu ergosterol, dan 2) Perubahan pada membran *drug efflux transporter*, antara lain: kelas ABC (*ATP binding cassette*) seperti Cdrp1 (dikodekan oleh CDR1), Cdrp2 (dikodekan oleh CDR2), dan kelas MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Bila terjadi perubahan mekanisme resistensi di atas, antifungal tidak dapat lagi masuk dan bekerja mengganggu integritas membran *Candida*. *C. albicans* akan tetap bertahan hidup dan tetap memberikan gejala infeksi pada host.

Faktor epigenetik merupakan faktor di luar gen yang dapat mempengaruhi ekspresi protein *drug efflux transporter*. Faktor epigenetik meliputi: 1) Asetilasi histon, dan 2) Metilasi DNA. HAT (Histone Acetyl Transferase) mengkatalisa asetilasi histon. Asetilasi histone menyebabkan ikatan histon dengan nukleosom menjadi longgar dan proses ini akan memulai transkripsi gen resistensi seperti CDR1. Aktivasi CDR1 meningkatkan *drug efflux transporter* seperti Cdrp1 yang kemudian menyebabkan *Candida* resisten. Baru-baru ini ditemukan bahwa suatu enzim Histone Acetyl Transferase (HAT) Rtt109, enzim yang hanya ada dalam kingdom fungal, diperlukan untuk patogenisitas fungal. Tanpa Rtt109, fungal hipersensitif terhadap efek

genotoksik dari reactive oxygen species (ROS) dan gangguan respon stress *drug efflux transporter*. Inhibisi HAT Rtt109 sangat mungkin mempengaruhi ekspresi Cdrp1 sehingga akan menurunkan resistensi antifungal.

Metilasi DNA merupakan salah satu reaksi epigenetik melalui penambahan gugus metil pada sitosin. Metilasi dapat mengubah aktivitas DNA tanpa mengubah sekuens gen. Metilasi menyebakan kromatin inaktif (*silent chromatin*). Bila berada pada gen promotor, maka metilasi DNA akan merepresi transkripsi gen.

Suatu flavonoid (misalnya Kurkumin) diduga merupakan agen yang dapat menjadi inhibitor HAT maupun stimulator metilasi DNA. Studi efek Kurkumin terhadap metilasi masih kontroversial dan hanya sedikit. Suatu studi menunjukkan bahwa Kurkumin memodulasi metilasi DNA pada sel-sel colon cancer. Efek Kurkumin terhadap metilasi DNA ini akan menyebabkan *silencing* gen. Hal ini menunjukkan bahwa Kurkumin dapat menjadi agen rekayasa ekspresi gen tanpa melalui perubahan gen. Namun apakah Kurkumin menginhibisi HAT-Rtt109 maupun menstimulasi metilasi DNA pada Candida resisten dan apakah kemampuan ini nantinya akan menurunkan ekspresi *drug efflux transporter* Cdrp1 sehingga menyelesaikan permasalahan resistensi antifungal (Fluconazole) masih belum ada penelitian yang membuktikannya. Bila temuan ini terbukti maka dapat menjadi landasan untuk pengembangan Kurkumin selanjutnya dalam terapi Candida yang resisten Fluconazole.

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) Membuktikan bahwa Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menghambat proliferasi *C. albicans* strain resisten Fluconazole, 2) Membuktikan bahwa kombinasi Kurkumin dengan Fluconazole menghambat ekspresi *drug efflux transporter* (Cdr1p) *C. albicans* strain resisten Fluconazole melalui hambatan epigenetik HAT-Rtt109, 3) Membuktikan bahwa Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Fluconazole menyebabkan metilasi CDR1 dan Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole dan menjelaskan pathway-nya.

Penelitian ini dibagi dalam 3 tahap, yaitu: tahap I, tahap II dan tahap III. Penelitian tahap I merupakan Uji Sinergisme Kurkumin dengan Flukonazole dalam menghambat pertumbuhan Candida resisten. Uji ini terdiri dari analisa kualitatif kuantitatif terhadap pertumbuhan Candida resisten. Uji kualitatif berupa

perbandingan kualitatif pertumbuhan koloni *Candida* resisten pada berbagai kelompok perlakuan (Flukonazol, Kurkumin, dan kombinasi Kurkumin + Flukonazole). Uji kuantitatif berupa perhitungan jumlah sel *Candida* resisten pada berbagai kelompok perlakuan dengan menggunakan spektrofotometer. Dilakukan pula penghitungan Minimum Inhibition Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC) pada berbagai kelompok. Selanjutnya, tahap II merupakan penelitian insilico inhibisi Kurkumin terhadap epigenetik (*Histon Acetyl Transferase* (HAT) serta penelitian efek berbagai perlakuan terhadap ekspresi Cdr1p dan HAT-Rtt109. Cdr1p merupakan protein drug efflux transporter yang menimbulkan resistensi membran *Candida* dan HAT merupakan epigenetik CDR. Tahap III merupakan penelitian efek berbagai perlakuan terhadap metilasi CDR1 dan Rtt109 pada *C. albicans* strain Resisten Fluconazole. Metilasi DNA akan menyebabkan *silencing* dari CDR1 dan Rtt109.

Penelitian tahap I menggunakan visual dan spektrofotometer untuk membuktikan efek sinergis Kurkumin + Flukonazole dalam menghambat pertumbuhan *Candida* resisten sekaligus menentukan MIC yang akan digunakan sebagai dosis uji pada tahap II dan III penelitian. Selanjutnya, tahap II merupakan penelitian insilico inhibisi Kurkumin terhadap *Histon Acetyl Transferase* (HAT) menggunakan software PASS untuk mengetahui potensinya sebagai agen inhibitor proliferasi. Selain itu dilakukan *Molecular Docking* menggunakan autodock Vina pada program PyRx 0.8. Ekspresi Cdr1p dan HAT-Rtt109 pada berbagai perlakuan dinilai dengan analisa *band* pada SDS-PAGE. Tahap III penelitian merupakan analisa sekuen termetilasi CDR1 dan Rtt109 dari isolasi DNA *Candida* pada berbagai perlakuan, yang kemudian dilakukan PCR dan dilanjutkan dengan bisulfite *treatment*.

Hasil tahap I penelitian menunjukkan bahwa: Kurkumin dan Flukonazole menghambat pertumbuhan *Candida* strain resisten Flukonazole, namun dosis Flukonazole sangat besar dan toksik pada manusia (Resistensi tidak absolut). Kombinasi Kurkumin dan Flukonazol menunjukkan sinergisme dalam menghambat pertumbuhan *Candida* strain resisten Flukonazol bila dibandingkan dengan Kurkumin saja maupun Flukonazol saja. MIC Kurkumin terhadap *Candida* strain resisten Flukonazole adalah 100 ug/ml. MIC kombinasi Kurkumin + Flukonazole adalah 6,25 ug/ml + 12,5 ug/ml. Hasil tahap II penelitian menunjukkan bahwa: Kurkumin mempengaruhi HAT (*Histon Acetyl Transferase*) secara insilico

Repository Universitas Brawijaya
dengan software PASS. Kurkumin menurunkan ekspresi Cdr1p namun tidak menurunkan ekspresi HAT-Rtt109. Kombinasi Kurkumin + Flukonazole menurunkan ekspresi Cdr1p namun tidak menurunkan ekspresi HAT-Rtt109. Hasil tahap III penelitian menunjukkan bahwa: Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Flukonazol menyebabkan metilasi gen CDR1 pada area promotor gen. Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Flukonazol tidak menyebabkan metilasi gen Rtt109 pada area promotor gen. Kurkumin tidak mempengaruhi HAT-Rtt109 secara langsung tetapi melalui HAT tipe lainnya.

Hasil penelitian ini menjelaskan efek sinergis Kurkumin dengan Flukonazole melawan resistensi Candida. Efek sinergis ini berasal dari kerja Kurkumin menurunkan ekspresi drug efflux transporter (Cdr1p) sehingga Flukonazole dapat masuk kembali ke dalam sel Candida dan bekerja sebagai fungistatic. Kerja Kurkumin ini berasal dari kemampuan Kurkumin menyebabkan metilasi CDR1 sehingga terjadi silencing CDR1 dimana akhirnya tidak terjadi ekspresi drug efflux transporter (Cdr1p). Meskipun secara insilico Kurkumin juga menghambat HAT sehingga menghambat asetilasi histon dan inaktivasi transkripsi CDR1, namun dampaknya kerja Kurkumin melalui HAT selain HAT-Rtt109. Perlu penelitian efek Kurkumin terhadap metilasi gen CDR1 dan Rtt109 pada area gen pengkode. Selain itu, perlu penelitian efek Kurkumin terhadap gen HAT lainnya selain Rtt109 untuk menemukan mekanisme epigenetik lainnya. Hasil penelitian ini juga dapat menjadi landasan penggunaan Kurkumin dalam mencegah sebelum terjadi resistensi antifungal. Hasil studi ini juga dapat diekstrapolasi untuk penelitian peran Kurkumin mengatasi resistensi antibiotik yang juga memiliki mekanisme *drug efflux transporter* yang pada penelitian ini ditemukan merupakan target kerja Kurkumin melawan resistensi obat.

SUMMARY

Novida Ariani. NIM 147070100111007. Post Graduate Program of Medical Faculty Brawijaya University Malang, April 2nd 2018. Curcumin Sinergy with Fluconazole in Inhibiting Resistant *Candida albicans* from Orofaring Isolate of HIV Patient through Cdr1p expression, HAT-Rtt109, methylation of CDR1 & RTT109. Promotor Commission: Mulyohadi Ali, Co-Promotor: Noorhamdani, Bambang Rahardjo.

Fungal infection incident was rising significantly and causing morbidity and mortality increase. During last decade there was significant increase in antifungal resistance against *C. albicans*. This resistance carry the important implication for morbidity, mortality and community health service cost. Challenge to face this resistance was higher due to the use of antifungal agent such as azole which still limited by its high level of toxicity. A study showed that azole resistance occur in almost one third of oral *C. albicans* isolates collected from HIV-positive patients.

Antifungal resistance mechanism involving: 1) Genetic change in *C. albicans* lipid membrane that is ergosterol, and 2) Changes in *drug efflux transporter* membranes such as: ABC class (*ATP binding cassette*) like Cdrp1 (code by CDR1), Cdrp2 (code by CDR2) and MFS class (*Major Facilitator Superfamily*). If the above changes occurs, antifungal could no longer enter and disturb the integrity of *Candida* membranes. *C. albicans* would still survive and continuously gave infection symptoms toward its host.

Epigenetic factor is the factor outside of the genes that could affect protein expression of *drug efflux transporter*. Epigenetic factors includes: 1) Histone acetylation and 2) DNA methylation. HAT (Histone Acetyl Transferase) would catalyze histone acetylation. Histone acetylation would loosened the binding between histone and nucleosome which would trigger then the resistance gene transcription such as CDR1. CDR1 activation would improve *drug efflux transporter* such as Cdrp1 and would cause resistant *Candida*. Lately, it was discovered that a Histone Acetyl Transferase (HAT) enzyme, Rtt109, which only exist in fungal kingdom, was needed for fungal pathogenicity. Without Rtt109, fungal would be hypersensitive toward genotoxic effect from reactive oxygen species (ROS) and stress response disturbance of *drug efflux transporter*. Inhibition of HAT Rtt109

would probably influence Cdrp1 resistance.

DNA methylation is one of the epigenetic reactions by adding metal cluster to cytosin. Methylation could change DNA activity without changing gen sequence.

Methylation would cause active chromatinin (silent chromatin). If it lies in promotor gene, DNA methylation would repressed gene transcription.

A flavonoid (such as Curcumin) was assumed to be an agent that could become HAT inhibitor or stimulator in DNA methylation. Study concerning effect of Curcumin toward methylation was still controversial and very few. A Study showed that Curcumin modulate DNA methylation in colon cancer cells. Effect of Curcumin toward DNA methylation would cause gene silencing. This showed that Curcumin can be use as gene expression manipulator agent without having gene changes.

However, whether Curcumin inhibit HAT-Rtt109 or stimulate DNA methylation in resistant Candida and whether this ability would lower the expression of drug efflux transporter Cdrp1 to solve antifungal (fluconazole) resistance was still not yet proven in any study. If this assumption was proven then it could be used for subsequent Curcumin development in Fluconazole-resistant Candida therapy.

This study aimed to: 1) Show evidence that Curcumin has synergized with Fluconazole to inhibit the proliferation of Fluconazole-resistant strain of *C. albicans*, 2) Show evidence that combination of Fluconazole + Curcumin could inhibit Cdrp1 and HAT-Rtt109 expression in Fluconazole-resistant strain of *C. albicans*, 3) Show evidence that combination of Fluconazole + Curcumin could cause CDR1 and Rtt109 methylation in Fluconazole-resistant strain of *C. albicans*, and explain the pathway of synergy effect of Fluconazole + Curcumin toward Cdrp1 expression, HAT-Rtt109 expression, CDR1 methylation and Rtt109 methylation.

This study was divided into 3 stages, which were: stage I, stage II and stage III. Stage I study consist of Synergism Test of Curcumin with Fluconazole in Inhibiting the Growth of Resistant Candida. This test consist of qualitative and quantitative analysis toward the growth of resistant Candida. Qualitative test was qualitative comparison of the colony growth of resistant Candida in several treatment groups (Fluconazole, Curcumin, and combination of Curcumin +

Fluconazole). Quantitative test was counting the number of resistant Candida cells in several treatment groups by using spectrophotometer. Minimum Inhibition Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) calculation was also done for treatment groups. Stage II consist of in silico study regarding Curcumin inhibition toward epigenetic (Histone Acetyl Transferase (HAT)) and the study regarding effect of several treatments toward Cdr1p and HAT-Rtt109 expression. Cdrp1 is a drug efflux transporter protein that cause Candida's membrane resistance and HAT is the CDR epigenetic. Stage III consist of studying the effect of several treatments toward CDR1 and Rtt109 methylation in Fluconazole-resistant strain of *C. albicans*. DNA methylation would cause *silencing* from CDR1 and Rtt109.

Stage I of this study was using visual and spectrophotometer to prove the synergic effect of Curcumin + Fluconazole in inhibiting the growth of resistant Candida and also determine MIC which is going to be used as test doses in stage II and III studies. Stage II was an in silico study of Curcumin inhibition toward Histone Acetyl Transferase (HAT) by using PASS software to discover its potential as proliferation inhibitor agent. In this stage, Molecular Docking was also done by using Vina autodock in PyRx 0.8 program. Cdrp1 and HAT-Rtt109 expression in several treatments was assessed by band analysis on SDS-PAGE. Stage III of this study was methylated sequence analysis of CDR1 and Rtt109 from Candida's DNA isolation in several treatments, and proceeded with PCR and continued with bisulfite treatment.

Result from stage I of this study showed that: Curcumin and Fluconazole inhibit the growth of Fluconazole-resistant Candida strain, however Fluconazole dose was very high and toxic for human (non absolute resistance). Combination of Curcumin and Fluconazole showed synergism in inhibiting the growth of Fluconazole-resistant Candida strain compared to treatment using only Curcumin and Fluconazole. MIC Curcumin toward Fluconazole-resistant Candida strain is 100 µg/ml. MIC combination of Curcumin + Fluconazole is 6,25 µg/ml + 12,5 µg/ml.

Result from stage II of this study showed that: Curcumin affect HAT (Histone Acetyl Transferase) in in silico manner with PASS software. Curcumin lower Cdr1p expression but did not lower HAT-Rtt109 expression. Result from stage III of this study showed that: Curcumin and combination of Curcumin + Fluconazole causing

CDR1 gene methylation in gene promotor area. Curcumin and combination of Curcumin + Fluconazole did not cause Rtt109 gene methylation in gene promotor area. Curcumin did not affect HAT-Rtt109 in direct manner but mediate it through other type of HAT.

This result explained the synergic effect of Curcumin and Fluconazole against Candida resistance. This synergic effect came from the work of Curcumin that lower drug efflux transporter (Cdr1p) expression so that Fluconazole could enter Candida cells and works as fungistatic. The work of Curcumin was originated from its ability in causing CDR1 methylation and thus triggers CDR1 silencing and did not causing drug efflux transporter (Cdr1p) expression. Although in silico manner, Curcumin would inhibit HAT and thus inhibit histone acetylation and inactivation of CDR1 transcription, however it seems that Curcumin works through HAT other than HAT-Rtt109.

There should be more study regarding the effect of Curcumin toward CDR1 and Rtt109 methylation in coding gene area. Moreover, there should be more study regarding the effect of Curcumin toward other HAT gen to found other epigenetic mechanism. These results can be used as the fundamental basic of Curcumin use to prevent antifungal resistance. Results in this study could also be extrapolated to the study of Curcumin role against antibiotic resistance that use drug efflux transporter mechanism which was found in this study as the working target of Curcumin against drug resistance.

Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
2.3.2.2. Transporter ABC	15
2.3.2.2.1. Topologi Transporter ABC	16
2.3.2.2.2. Siklus Transport	17
2.4. Resistensi pada <i>Candida albicans</i>	18
2.5. Asetilasi dan Deasetilasi Histon	25
2.6. HAT-Rtt109	27
2.7. Metilasi DNA Mempengaruhi Regulasi Transkripsi	28
2.8. Metilasi CpG Islands	29
2.8.1. Metode Metilasi DNA pada CpG Islands	30
2.9. Struktur Kimia Kurkumin	31
2.10. Kerja Kurkumin menghasilkan ROS	32
2.11. Pengaruh Kurkumin terhadap <i>C. albicans</i>	34
2.11.1. Kurkumin Mengganggu Dinding Sel	34
2.11.2. Pengaruh Kurkumin terhadap Resistensi Antifungal	35
2.11.2.1. Pengaruh Kurkumin terhadap Ergosterol	35
2.11.2.2. Pengaruh Kurkumin terhadap Drug Efflux Pump	36
2.12. Candidiasis pada pasien HIV	36
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	39
3.1. Kerangka teori	39
3.1.1. Kerangka teori 1	39
3.1.2. Kerangka teori 2	40
3.2. Kerangka konsep	41
3.3. Hipotesis	42
BAB 4 METODE PENELITIAN	43
4.1. Rancangan Penelitian	43
4.1.1. Penelitian Tahap I	44
4.1.2. Penelitian Tahap II	44

Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
4.1.3. Penelitian Tahap III.....	44
BAB 5 PENELITIAN TAHAP I	
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
5.1. Pendahuluan.....	46
5.2. Perumusan Masalah.....	49
5.2.1. Masalah Umum.....	49
5.2.2. Masalah Khusus.....	49
5.3. Tujuan penelitian.....	49
5.3.1. Tujuan Umum.....	49
5.3.2. Tujuan Khusus.....	49
5.4. Tempat dan Waktu Penelitian.....	50
5.5. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel	50
5.5.1. Variabel Penelitian.....	50
5.5.1.1. Variabel bebas	50
5.5.1.2. Variabel Tidak Bebas.....	50
5.5.2. Definisi Operasional.....	50
5.6. Materi Penelitian.....	51
5.7. Metode Eksperimen.....	52
5.7.1. Perlakuan terhadap Spesimen Candida Resisten	52
5.7.2. Kultur Candida.....	53
5.7.3. <i>Tube Dillution Test</i>	53
5.8. Hasil Penelitian.....	55
5.9. Pembahasan.....	61
5.10. Kesimpulan.....	68
5.11. Saran.....	68
BAB 6 PENELITIAN TAHAP II	
6.1. Pendahuluan.....	69
6.2. Perumusan Masalah.....	71

Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.2.1. Masalah umum.....	71
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.2.2. Masalah Khusus.....	71
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.3. Tujuan penelitian.....	72
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.3.1. Tujuan Umum.....	72
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.3.2. Tujuan Khusus.....	72
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.4. Tempat dan Waktu Penelitian.....	72
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.5. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel.....	72
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.5.1. Variabel Penelitian.....	72
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.5.1.1. Variabel Bebas	73
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.5.1.2. Variabel Tidak Bebas	73
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
5.6.2. Definisi Operasional.....	73
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.6. Prosedur Penelitian	73
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.6.1. Studi <i>Insilico</i>	73
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.6.2. Studi Ekspresi Cdr10 dan HAT-Rtt10.....	74
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.6.3. Elektroforesis Gel Agarose.....	74
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.6.3.1. Bahan Penelitian.....	74
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.6.3.2. Prosedur Elektroforesis Gel Agarose.....	74
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.7. Hasil Penelitian.....	76
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.8. Pembahasan.....	78
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.9. Kesimpulan.....	82
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
6.10. Saran.....	82
BAB 7 PENELITIAN TAHAP III	
7.1. Pendahuluan.....	83
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.2. Perumusan Masalah.....	86
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.2.1. Masalah umum.....	86
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.2.2. Masalah Khusus.....	86
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.3. Tujuan penelitian.....	86
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
xviii	

Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.3.1. Tujuan Umum	86
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.3.2. Tujuan Khusus	86
7.4. Tempat dan Waktu Penelitian	87
7.5. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel	87
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.5.1. Variabel Penelitian	87
7.5.1.1. Variabel bebas	87
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.5.1.2. Variabel Tidak Bebas	87
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.5.2. Definisi Operasional	87
7.6. Prosedur Penelitian	88
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.6.1. Isolasi DNA	88
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.6.2. Treatment Bisulfit pada DNA	89
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.6.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)	91
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.6.4. Prosedur Elektroforesis Gel Agarose	93
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.6.5. Sekuens DNA dan Analisa Sekuens	95
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.7. Hasil Penelitian	97
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.8. Pembahasan	104
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.9. Kesimpulan	107
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
7.10. Saran	108
BAB 8 PEMBAHASAN UMUM	109
BAB 9 KESIMPULAN DAN SARAN	121
9.1. Kesimpulan	121
9.2. Saran	121
DAFTAR PUSTAKA	123
LAMPIRAN	130

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Blastospora dan hifa <i>C. albicans</i>	9
Gambar 2.2 Struktur Dinding Sel <i>C. albicans</i>	10
Gambar 2.3 Mekanisme Kerja Antifungal.....	12
Gambar 2.4 Struktur Azole.....	13
Gambar 2.5 ABC dan MFS Transporter	17
Gambar 2.6 Siklus Transportasi pada Drug Efflux Pump	18
Gambar 2.7 Mekanisme Resistensi pada Candida	19
Gambar 2.8 Mekanisme Resistensi Azole	21
Gambar 2.9 Mekanisme Resistensi Flukonazole..	23
Gambar 2.10 Organisasi Kromatin.....	24
Gambar 2.11 Asetilasi Histon dan Ekspresi Gen	25
Gambar 2.12 Reaksi Asetilasi.....	26
Gambar 2.13 Regulasi Transkripsi.....	30
Gambar 2.14 Struktur Kimia Kurkumin	32
Gambar 2.15 Kurkumin sebagai Oksidator	33
Gambar 2.16 Pengaruh Kurkumin terhadap Ekspresi Gen <i>Candida</i>	35
Gambar 3.1 Bagan kerangka teori 1	39
Gambar 3.2 Bagan kerangka teori 2	40
Gambar 3.3 Bagan Kerangka Konsep.....	41
Gambar 4.1 Bagan alur penelitian.....	45
Gambar 5.1 Pertumbuhan Koloni <i>C. albicans</i> (Streaking Agar Plate).....	55
Gambar 5.2 Grafik Efek Flukonazole	58
Gambar 5.3 Grafik Efek Kurkumin	58
Gambar 5.4 Grafik efek Kombinasi Flukonazole + Kurkumin	59
Gambar 5.5 Grafik Perbandingan	60
halaman xx	

DAFTAR SINGKATAN

ABC : *ATP binding cassette*

C. albicans : *Candida albicans*

CD : *Cluster Differentiated*

COX-2 : *Cyclooxygenase-2*

CTL : *Cytotoxic T Lymphocyte*

DNA : *Deoxyribo Nucleic Acid*

ERG : *Ergosterol*

ERK : *Extracellular regulated kinase ()*

HAT : *Histone Acetyl Transferase*

HDAC : *Histone Deacetylase*

HSP : *Heat shock Protein*

IFN- γ : *Interferon γ*

IgY : *Imunoglobulin*

iNOS : *Inducible Nitrit Oksid Syntase*

LPS : *Lipopolisakarida*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MDR : Multidrug resistance protein

MFS : *Major Facilitator Superfamily*

MIC : *Minimal Inhibition Concentration*

NBD : *Nucleotide-Binding Domain*

NFkB : Nuclear Factor Kappa Beta

NSAID : *Non Steroid Antiinflammatofry Drug*

PAMPS : *Pathogen associated molecular patterns*

PGE2 : *Prostaglandin E2*

PRRs : *C-type lectin Pattern Recognition Receptors*

ROS : *Reactive oxygen species*

TLR : *Toll like receptor*

TMD : *Transmembrane Domain*

TNF : *Tumor Necrotizing Factor*

VVC : *Vulvovaginal Candidiasis*

VVC : *vulvo-vaginal candidiasis*

1.1. Latar Belakang

Insidensi infeksi fungal saat ini meningkat signifikan dan menyebabkan peningkatan morbiditas dan mortalitas (Nucci & Marr, 2005). Infeksi fungal seperti spesies *Candida* tumbuh pada kulit, mukosa saluran gastrointestinal dan vagina.

Banyak faktor yang meningkatkan insidensi ini, seperti: 1) Virulensi *C. albicans* yang sangat kompleks, 2) Penurunan sistem imun pada pasien immunocompromised, serta 3) Kurangnya efektivitas terapi standard saat ini karena resistensi antifungal (Martins *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2014).

Pada dekade terakhir terjadi peningkatan signifikan resistensi antifungal melawan *C. albicans*. Resistensi ini memiliki implikasi penting bagi morbiditas, mortalitas dan biaya layanan kesehatan masyarakat. Sullivan *et al.* (2004) menemukan bahwa resistensi terhadap *C. albicans* berkontribusi terhadap 65% kejadian Candidemia. Mortalitas pada kejadian Candidemia ini mencapai hingga 35-55%. Peningkatan resistensi ini menjadikan *C. albicans* termasuk dalam mikroorganisme yang sulit mengatasinya (Chakrabarti,

Tantangan mengatasi resistensi obat melawan infeksi *C. albicans* semakin berat karena penggunaan agen antifungal seperti azole yang masif terbentur oleh toksisitasnya yang tinggi dan sempitnya rentang terapeutik pada golongan ini.

Penggunaan antifungal ini secara berlebihan mengakibatkan kerusakan liver (Martins *et al.*, 2009). Selain itu, jumlah obat antifungal yang tersedia secara komersial terbatas karena masih memiliki banyak efek samping, seperti:

komersil terbatas karena masih memiliki banyak efek samping, seperti:

Repository Universitas Brawijaya
BAB I
Repository Universitas Brawijaya

BAB I

PENDAHULUAN

ini meningkat signifikan dan menyebabkan infeksi (Nucci & Marr, 2005). Infeksi fungal seperti candidiasis ini, seperti: 1) Virulensi *C. albicans* yang turun sistem imun pada pasien menganggur efektivitas terapi standar saat ini (*et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2014).

jadi peningkatan signifikan resistensi resistensi ini memiliki implikasi penting bagi yanan kesehatan masyarakat. Sullivan et stensi terhadap *C. albicans* berkontribusi al. Mortalitas pada kejadian Candidemia ini atan resistensi ini menjadikan *C. albicans*

itnya rentang terapeutik pada golongan ini. Berlebihan mengakibatkan kerusakan jumlah obat antifungal yang tersedia secara memiliki banyak efek samping, seperti

hipersensitivitas dan reaksi alergi. Sangat penting menemukan strategi terapi yang baru (*novel therapeutic*) untuk melawan resistensi ini.

Banyak riset difokuskan untuk mengembangkan pemahaman resistensi antifungal terhadap *C. albicans*. Mekanisme tersebut antara lain : 1) Perubahan genetik membran lipid *C. albicans* yaitu ergosterol, dan 2) Perubahan pada membran *drug efflux transporter*. Perubahan terhadap dua mekanisme di atas menyebabkan perubahan sensitivitas *C. albicans* terhadap antifungal. Bila terjadi perubahan mekanisme resistensi di atas, antifungal tidak dapat lagi masuk dan bekerja mengganggu integritas membran *Candida*. *C. albicans* akan tetap bertahan hidup dan tetap memberikan gejala infeksi pada *host* (Prasad et al., 2011; Cannon et al., 2007; Cannon et al., 2009).

Studi menunjukkan bahwa *drug efflux transporter* meningkat pada *C. albicans* resisten (Looi et al., 2005). *Drug efflux transporter* tersebut antara lain kelas *ATP binding cassette* (ABC) dan kelas *Major Facilitator Superfamily* (MFS) (Prasad et al., 2015). Mekanisme resistensi yang paling umum dimediasi oleh kelas ABC. Transporter membran kelas ABC berfungsi sebagai pompa molekuler yang secara aktif memindahkan antifungal melalui membran plasma dengan menggunakan energi yang diperoleh dari hidrolisis ATP. Transporter membran kelas ABC antara lain: Cdrp1 (dikodekan oleh CDR1) dan Cdrp2 (dikodekan oleh CDR2) (Cannon et al., 2009).

Faktor epigenetik merupakan faktor di luar gen yang dapat mempengaruhi ekspresi protein *drug efflux transporter*. Epigenetik meliputi reaksi asetilasi histon dan metilasi DNA. HAT (Histone Acetyl Transferase) mengkatalisa reaksi asetilasi histon. Asetilasi histone menyebabkan ikatan histon dengan nukleosom menjadi longgar dan memungkinkan ikatan dengan faktor

transkripsi. Proses ini akan memulai transkripsi gen resistensi seperti CDR1.

Asetilasi adalah bagian esensial dari regulasi gen. Oleh karenanya, asetilasi histon oleh HAT akan mempengaruhi CDR1 sehingga meningkatkan *drug efflux transporter* seperti Cdrp1 yang kemudian menyebabkan resistensi Candida meningkat (Li *et al.*, 2015; Pffaler *et al.*, 2009; Edlind & Smith, 2002).

Baru-baru ini ditemukan bahwa suatu enzim Histone Acetyl Transferase (HAT) Rtt109, enzim yang hanya ada dalam kingdom fungal, diperlukan untuk patogenisitas fungal (Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Wurtele *et al.*, 2012). Tanpa

Rtt109, fungal hipersensitif terhadap efek genotoksik dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dilepaskan oleh sel fagositik, gangguan repair gen dan

gangguan respon stress *drug efflux transporter*. HAT Rtt109 sepenuhnya bertanggung jawab untuk asetilasi histone H3 lysine 56 (H3K5) pada jamur

(Han *et al.*, 2007a; Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2006; Xhemalce *et al.*, 2007; Lopes da Rosa *et al.*, 2010). Inhibisi HAT Rtt109 sangat

mungkin mempengaruhi respon stress dan ekspresi transporter Cdrp1 sehingga akan menurunkan resistensi antifungal.

Metilasi DNA merupakan salah satu reaksi epigenetik melalui penambahan gugus metil pada sitosin. Metilasi dapat mengubah aktivitas DNA

tanpa mengubah sekuenz gen. Metilasi sitosin menghasilkan 5-methylsitosin yang akan terjadi deaminasi spontan menjadi timin (T). T akan berikatan dengan A sehingga terjadi substitusi G menjadi A. Hal ini menyebabkan T:G

mismatch. Perubahan menjadi A-T akan menghasilkan mutasi. Metilasi menyebakan kromatin inaktif (*silent chromatin*). Bila berada pada gen promotor, maka metilasi DNA akan merepresi transkripsi gen (Ehrlic *et al.*, 1982).

Suatu flavonoid (misalnya Kurkumin) diduga merupakan agen yang dapat menjadi inhibitor HAT maupun stimulator metilasi DNA (Balasubramanyam *et al.*, 2003; Balasubramanyam *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007; Mantelingu *et al.*, 2007; Marcu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Studi efek Kurkumin terhadap metilasi masih kontroversial dan hanya sedikit. Studi Link *et al.* (2013) menunjukkan bahwa Kurkumin memodulasi metilasi DNA pada sel-sel colon cancer. Metilasi diukur dengan menggunakan pengukuran global metilasi. Induksi metilasi oleh Kurkumin terjadi partial pada gen. Efek Kurkumin terhadap metilasi DNA ini akan menyebabkan *silencing* gen. Hal ini menunjukkan bahwa Kurkumin dapat menjadi agen rekayasa ekspresi gen tanpa melalui perubahan gen. Namun apakah Kurkumin menginhibisi HAT Rtt109 maupun menstimulasi metilasi DNA pada *Candida* resisten dan apakah kemampuan ini nantinya akan menurunkan ekspresi *drug efflux transporter* Cdrp1 sehingga menyelesaikan permasalahan resistensi antifungal (Fluconazole) masih belum ada penelitian yang membuktikannya. Bila temuan ini terbukti maka dapat menjadi landasan untuk pengembangan Kurkumin selanjutnya dalam terapi *Candida* yang resisten Fluconazole.

Studi mengenai kurkumin yang bekembang saat ini hanya menunjukkan potensinya sebagai antifungal. Studi peran Kurkumin melawan resistensi masih belum ekstensif. Studi terapi sinergistik Kurkumin dengan antifungal saat ini juga belum banyak dilakukan. Studi efek antifungal Kurkumin menunjukkan bahwa penambahan bubuk kurkumin 0.8 dan 1.0 g/L pada kultur memiliki aktivitas inhibisi terhadap kontaminasi fungi. Ekstrak metanol dari kyunjut menunjukkan aktivitas antifungal terhadap *Candida albicans* dengan nilai MIC 256 µg/mL

(Moghadamtousi *et al.*, 2014). *Candida albicans* adalah spesies yang paling rentan terhadap kurkumin (Martins *et al.*, 2009).

Memerangi infeksi *Candida*, khususnya yang disebabkan oleh strain yang resisten menjadi sebuah tantangan besar bagi ilmuwan. Terlebih lagi *Candida* resisten banyak ditemukan pada pasien HIV yang telah memiliki problema kesehatan kompleks dengan infeksi HIV tersebut. Suatu studi menunjukkan bahwa resistensi azole terjadi hingga sepertiga isolat *C. albicans* oral yang diperoleh dari pasien positif-HIV (White, *et al.*, 2002). Studi lain menunjukkan bahwa oropharyngeal candidiasis terjadi pada hingga 90% lama perjalanan penyakit HIV. Studi Maenza *et al.* (1995) menunjukkan bahwa resistensi fluconazole berhubungan dengan episode pengobatan HIV yang panjang, sel CD4 yang lebih rendah, durasi penggunaan fluconazole yang lebih panjang dan penggunaan terapi sistemik (Hamzah *et al.*, 2008).

Banyak upaya telah dilakukan untuk merancang sebuah *treatment* untuk isolat azole-resistant, diantaranya: (i) mencari agen antifungal baru, (ii) mengembangkan formulasi baru dan (iii) meningkatkan efikasi agen antifungal menggunakan terapi kombinasi (Weig & Muller, 2001, Nishi *et al.*, 2009).

Menemukan agen baru menjadi sangat kompleks karena harus memiliki efektivitas lebih baik dari terapi standard saat ini, yakni Flukonazole. Treatment (iii) merupakan alternatif yang penulis usulkan pada penelitian ini. Studi tentang terapi kombinasi melawan *Candida* belum terlalu ekstensif, diantaranya adalah sinergi Azole dengan Amiodarone dan sinefisi Azole dengan Curcumin tetapi hanya pada pertumbuhan koloni

Candida yang bukan strain resisten. Oleh karena itu, perlu penelitian intensif mengenai potensi Kurkumin melawan resistensi tersebut, baik sebagai agen

tunggal maupun agen kombinasi dengan terapi standard antifungal saat ini. Kurkumin menjadi suatu alternatif pilihan *novel therapy* yang berkembang saat ini karena kurkumin sudah banyak digunakan masyarakat luas sejak jaman kuno hingga sekarang. Masyarakat sudah familiar dan mengenal bahan herbal ini (Moghadamtousi *et al.*, 2014). Harapannya penggunaan kurkumin sebagai terapi kombinasi antifungal baru melawan resistensi yang efektif akan diterima di masyarakat.

1.2. Permasalahan

1.2.1. Permasalahan Umum

1. Apakah terdapat efek sinergis Kurkumin dengan Fluconazole menghambat proliferasi *C. albicans* strain resisten Fluconazole?
2. Apakah kombinasi Kukumin + Fluconazole menghambat ekspresi *drug efflux transporter* (*Cdr1p*) *C. albicans* strain resisten Fluconazole melalui hambatan epigenetik HAT-Rtt109?
3. Apakah kombinasi Kukumin + Fluconazole menyebabkan metilasi CDR1 dan Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole dan bagaimana pathway-nya?

1.2.2. Permasalahan Khusus

1. Apakah terdapat efek sinergis Kurkumin dengan Fluconazole menghambat pertumbuhan koloni *C. albicans* strain resisten Fluconazole?
2. Apakah terdapat efek sinergis Kurkumin dengan Fluconazole menurunkan jumlah sel *C. albicans* strain resisten Fluconazole?
3. Berapa dosis MIC (*Minimal Inhibition Concentration*) dan MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) kombinasi Kurkumin dengan Fluconazole?

4. Bagaimana efek Kurkumin terhadap HAT (Histone Acetyl Transferase) melalui studi insilico?
5. Apakah kombinasi Kurkumin dengan Flukonazole menghambat ekspresi Cdr1p dan HAT-Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole?
6. Apakah kombinasi Kurkumin + Flukonazole menyebabkan metilasi CDR1 dan Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole?
7. Bagaimana *pathway* efek sinergis Flukonazole dengan Kurkumin terhadap ekspresi Cdr1p, ekspresi HAT-Rtt109, metilasi CDR1 dan Rtt109?

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan Umum

1. Membuktikan bahwa terdapat efek sinergis Kurkumin dengan Fluconazole menghambat proliferasi *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
2. Membuktikan bahwa kombinasi Kurkumin dengan Fluconazole menghambat ekspresi *drug efflux transporter* (Cdr1p), *C. albicans* strain resisten Fluconazole melalui hambatan epigenetik HAT-Rtt109.
3. Membuktikan bahwa kombinasi Kurkumin dengan Fluconazole menyebabkan metilasi CDR1 dan Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole dan menjelaskan *pathway*-nya.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa terdapat efek sinergis Kurkumin dengan Fluconazole menghambat pertumbuhan koloni *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
2. Membuktikan bahwa terdapat efek sinergis Kurkumin dengan Fluconazole menurunkan jumlah sel *C. albicans* strain resisten Fluconazole.

3. Menentukan dosis MIC (*Minimal Inhibition Concentration*) dan MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) kombinasi Kurkumin dengan Fluconazole.
4. Menjelaskan efek Kurkumin terhadap HAT (*Histone Acetyl Transferase*) melalui studi insilico.
5. Membuktikan bahwa kombinasi Kurkumin dengan Fluconazole menghambat ekspresi Cdr1p dan HAT-Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
6. Membuktikan bahwa kombinasi Kurkumin + Fluconazole menyebabkan metilasi CDR1 dan Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
7. Menjelaskan *pathway* efek sinergi Fluconazole + Kurkumin terhadap ekspresi Cdr1p, ekspresi HAT-Rtt109, metilasi CDR1 dan Rtt109.

1.4. Manfaat

1.4.1. Manfaat Akademis

Mengembangkan pengetahuan mengenai intervensi epigenetik pada pengendalian transporter *drug efflux* melalui pemberian senyawa alami Kurkumin.

1.4.2. Manfaat Klinis

- 1) Menjadi landasan untuk terapi Candidiasis dengan kombinasi Kurkumin.
- 2) Menjadi landasan untuk merancang penelitian lebih lanjut upaya pencegahan Candidiasis dengan kombinasi Kurkumin.
- 3) Memberikan peluang untuk juga mengembangkan kombinasi Kurkumin dalam terapi resistensi antibiotika yang menjadi permasalahan kompleks di klinik saat ini.

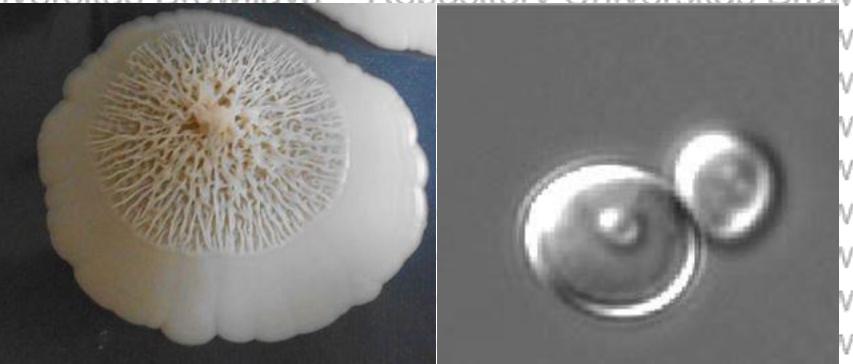
TINJA

2.1. *Candida albicans* dan Strukturnya

Candida albicans adalah menjadikan manusia. Jamur ini komensal, terdapat pada saluran pencernaan, terbanyak pada mulut dan saluran pencernaan. *Candida albicans* diploid, mampu bereproduksi secara mitotik dan meiosis. Pada 2017; Nyirjesy, 2001; Urban et al. menyajikan gambar blastopora, hifa dan pseudohifa.

2.1. *Candida albicans* dan Struktur Dinding Sel

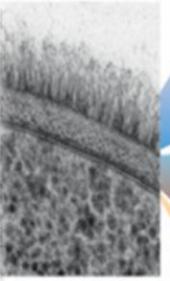
Candida albicans adalah merupakan jamur oportunistik pada oral dan genital manusia. Jamur ini komensal, terdapat pada flora usus dan merupakan organisme terbanyak pada mulut dan saluran genetalia perempuan. *Candida* berbentuk diploid, mampu bereproduksi secara seksual namun tidak bermiosis (Gow, et al., 2017; Nyirjesy, 2001; Urban et al., 2006; Urban et al., 2009). Berikut ini adalah gambar blastopora, hifa dan pseudo hifa dari *C. albicans*:



Gambar 2.1. Hifa dan Blastospora *C. albicans*

Keterangan:

Gambar C. albicans. 1) Hifa 2) Blastopora (Gow, et al., 2017).



Gambar 2.2. Struktur Dinding Sel *Candida albicans*

Keterangan:

Dinding sel *Candida albicans* terdiri dari bagian luar dan dalam. Dinding sel ini mengandung polisakarida yang terdiri dari tiga bentuk: (i) mannans (ii) b-glucans dan (iii) chitin (Gow & Hube, 2012).

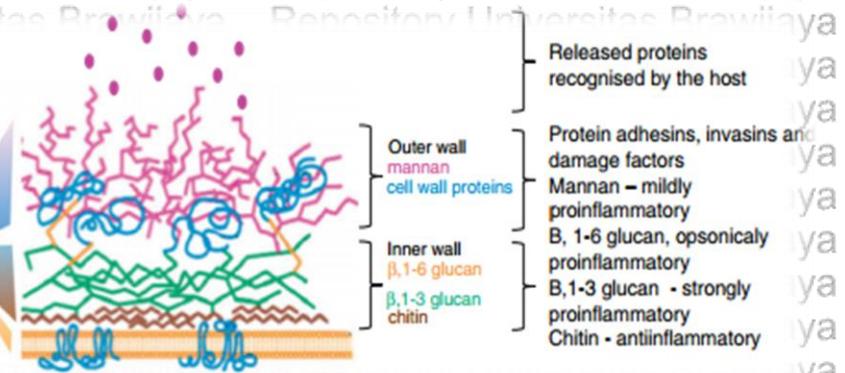
Dinding sel *Candida albicans* terdiri dari bagian luar dan dalam. Dinding sel ini mengandung polisakarida. Polisakarida terdiri dari tiga bentuk: (i) mannans (O-linked and N-linked) (ii) b-glucans dan (iii) chitin merupakan bentuk deacetylated chitosan. Mannoproteins membentuk bagian luar fibrillar, sementara b-glucan/chitin berada di bawah mannoprotein outer layer. Mannan berada bebas dalam dinding sel. b-1,3 glucan via b-1,6 glucan, berperan sebagai jangkar. Chitin

sel. Mannan mempengaruhi dinding sel dalam resistensinya terhadap antifungal.

O-linked and N-linked mannans adalah pathogen associated molecular patterns (PAMPs) yang berhubungan dengan Toll like receptor (TLR). Dalam sel mannans

dikenali oleh TLR4 (Gow & Hube, 2001; Samorae et al., 2000; Oakley, 2014; Netea et al., 2002).

2.2. Prinsip Mekanisme Kerja Antifungal



Berikut ini adalah gambar struktur dinding sel *Candida albicans*:

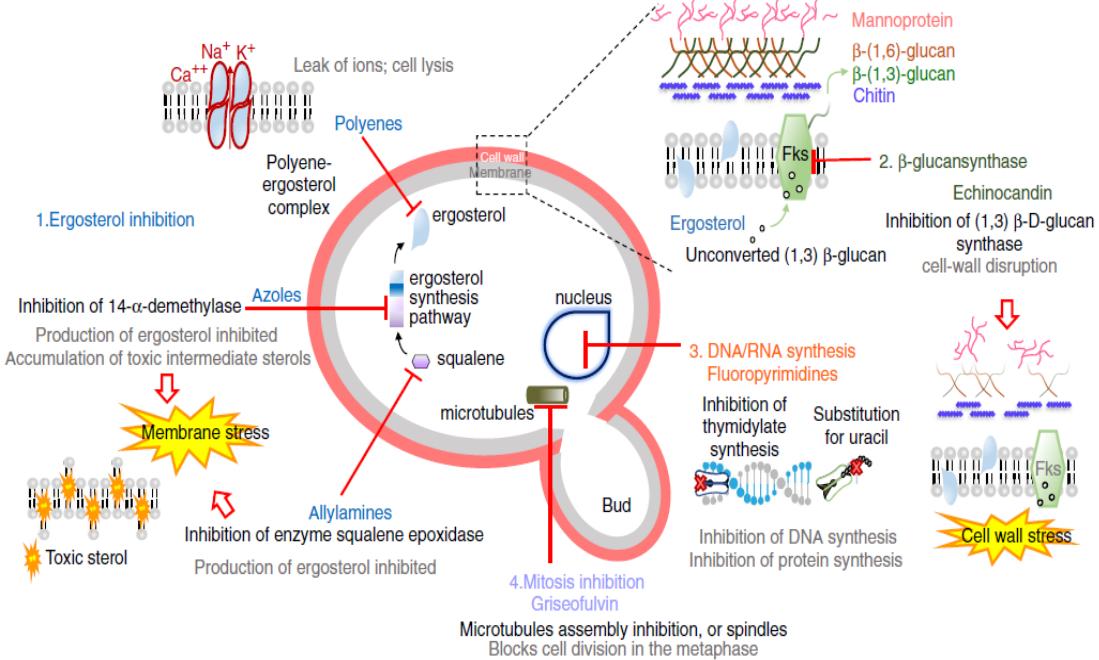
Agen antifungal pada prinsipnya bekerja mempengaruhi sterol fungal.

Ergosterol adalah komponen utama dari membran sel fungal. Empat grup utama agen antifungal dalam penggunaan klinis antara lain: azoles, polyenes, echinocandin dan allylamine/thiocarbamates, semuanya memiliki aktivitas antifungal untuk inhibisi sintesis atau interaksi langsung dengan ergosterol (Martinez & Falson, 2014). Ada empat alur metabolism fungal yang menjadi target antifungal ini, yaitu: 1. Hambatan sintesis ergosterol, (derivates azole dan allylamine) dan perubahan membrane melalui perubahan kompleks ergosterol (polyenes), 2. Hambatan sintesis glucan (echinocandin), 3. Hambatan sintesis makromolekul (analog pirimidin terfluorinas), dan 4. Interaksi dengan microtubule (griseofulvin). Azole seperti fluconazole menghambat sterol 14-a-demethylase, protein yang dikodekan ERG11, menyebabkan penurunan ergosterol dan akumulasi 14-a-methyl-3,6-diol, sterol toksik yang diproduksi D-5,6-desaturase yang dikode oleh ERG3.

Alylamin seperti terbinafine menghambat skualen epoxidase yang dikode ERG1, bertanggung jawab terhadap tahap pertama biosintesis ergosterol (Sapiro et al., 2011). Polyenes seperti nystatin dan amphotericin B adalah molekul siklik amfifilik yang mengikatkan lipid bilayer ke ergosterol. Antifungal ini menyebabkan lubang pada membran. Ecinocandin seperti caspofungin bekerja sebagai nonkompetitif inhibitor dari (1,3) b-D-glucan sintase, menghasilkan dinding sel yang tidak tahan stress osmosis (Vandepitte et al., 2012). Fluoropirimidin seperti 5-fluorocytosin dapat menghambat sintesis DNA, transkripsi, translasi dan sisntesis protein.

Griseofulvin mengikat tubulin sehingga menghancurkan benang spindle dan menghambat pembelahan yeast (Morschhauser, 2010).

Berikut ini adalah mekanisme kerja antifungal:



Gambar 2.3. Mekanisme Kerja Antifungal

Keterangan:

Ada empat mekanisme kerja antifungal, yaitu: 1. Hambatan sintesis ergosterol, (derivates azole dan allylamine) dan perubahan membran melalui perubahan kompleks ergosterol (polyenes), 2. Hambatan sintesis glucan (echinocandin), 3. Hambatan sintesis makromolekul (analog pirimidin terfluorinasi), dan 4. Interaksi dengan mikrotubule (griseofulvin) (Martinez & Falson, 2014).

2.2.1. Mekanisme Kerja Azole

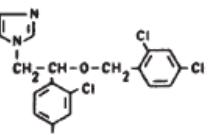
Senyawa ini antara lain: miconazole dan econazole, dan generasi setelahnya seperti ketoconazole, fluconazole dan itraconazole. Efisiensi klinis dan safety dari fluconazole mengakibatkan penggunaannya yang luas.

Beberapa studi menunjukkan bahwa target primer dari azole adalah heme protein, cocatalyzes sitokrom P-450-dependent 14a-demethylation lanosterol.

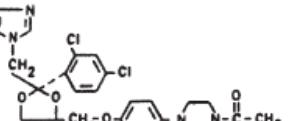
Inhibisi 14a-demethylase mengarah pada hilangnya ergosterol dan akumulasi prekursor sterol termasuk 14a-methylated sterols (lanosterol, 4, 14-

dimethylzymosterol, dan 24-methylenedihydrolanosterol), menghasilkan pembentukan sebuah membran plasma dengan perubahan struktur dan fungsi. Turunan triazole yang baru seperti fluconazole, itraconazole dan voriconazole (dalam pengembangan), menginhibisi sitokrom P-450-dependent 14 α -sterol demethylase. Hal ini akan mengganggu sintesis ergosterol dalam membran sel fungal (Martinez & Falson, 2014; Kanafani, 2008; Ghannoum & Rice, 1999).

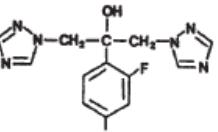
Berikut ini adalah struktur kimia antifungal Azole:



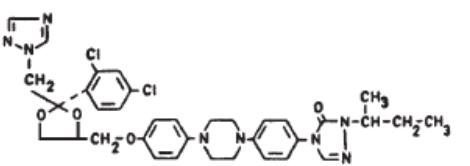
Miconazole



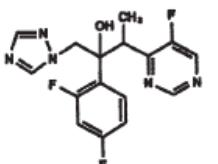
Ketoconazole



Fluconazole



Itraconazole



Voriconazole

Gambar 2.4. Struktur Kimia Antifungal Azole (Casaliniuovo, 2004).

2.3. Mekanisme Resistensi Antifungal

Resistensi antifungal memiliki empat mekanisme, antara lain: 1) Perubahan metabolisme obat, 2) Mutasi pada gen pengode target protein, 3) Pencegahan masuknya obat, dan 4) Pengeluaran obat dari sel melalui peningkatan ekspresi pompa pengeluaran obat (*multidrug efflux pumps*).

Candida memiliki mekanisme resistensi dengan meningkatkan ekspresi pompa eliminasi obat (Martinez & Falson, 2005; White *et al.*, 1999; Casalinuovo, 2004; Cannon *et al.*, 2009).

2.3.1. ERG11

Pada semua spesies fungal, ERG11 adalah gen yang mengkodekan ERG11p atau lanosterol 14-demethylase, sebuah enzim esensial untuk sintesis ergosterol. Resistensi terhadap azole berhubungan dengan *overexpression* gen ERG11 dan/atau point mutation dan juga perubahan di dalam *ergosterol biosynthetic pathway*. *Overexpression* ERG11 menyebabkan peningkatan jumlah copy dari enzim lanosterol 14-demethylase dan menghasilkan peningkatan sintesis ergosterol yang membebani antifungal. Fluconazole dan resistensi azole lainnya berhubungan dengan *point mutation* gen ERG11 (Halstrom *et al.*, 2001; Kohli *et al.*, 2002; White *et al.*, 1999).

2.3.2. Multidrug Efflux Pumps

Terdapat dua kelas utama efflux pumps, ABC proteins dan MFS pumps. Protein membran ini secara aktif memindahkan senyawa antar membran sel menggunakan sumber energi. ABC proteins adalah transporter primer yang menggunakan hidrolisis ATP. MFS pumps adalah transporter

sekunder yang menggunakan kekuatan proton di seluruh membran plasma (Casalnuovo, 2004; Liscovith, 2000).

Mekanisme resistensi yang paling umum adalah penghilangan obat dari sel yang dimediasi oleh *ATP-binding cassette* (ABC) membran transporters. ABC membran transporter berfungsi sebagai pompa molekuler yang secara aktif memindahkan obat melalui membran plasma dengan menggunakan energi yang diperoleh dari hidrolisis ATP. Pompa ini mampu memindahkan obat-obat. Empat puluh delapan ABC transporters telah ditemukan. Mereka diklasifikasikan dalam lima subfamili sesuai dengan hubungan filogenetik mereka: PDR, MDR, multidrug-resistance protein (MRP)/(CFTR), adrenoleukodystrophy protein (ALDP), dan yeast elongation faktor 3 (YEF3)/Rnase L inhibitor 1 (RLI1). Pompa-pompa ini membentuk perlindungan terhadap antifungal. *Pdr1p/Pdr3p-like transcriptional control system* memberikan kontribusi terhadap PDR dan merupakan target potensial untuk mengatasi resistensi azole termediasi-efflux (Looi *et al.*, 2005; Cannon *et al.*, 2009).

2.3.2.1. Transporter MFS

MFS transporter, tidak seperti ABC transporter, terdiri atas superfamili protein besar. Terdapat dua subfamili MFS transporter yang terlibat dalam drug efflux: DHA1 dan DHA2 (Martinez & Falson, 2005).

2.3.2.2. Transporter ABC

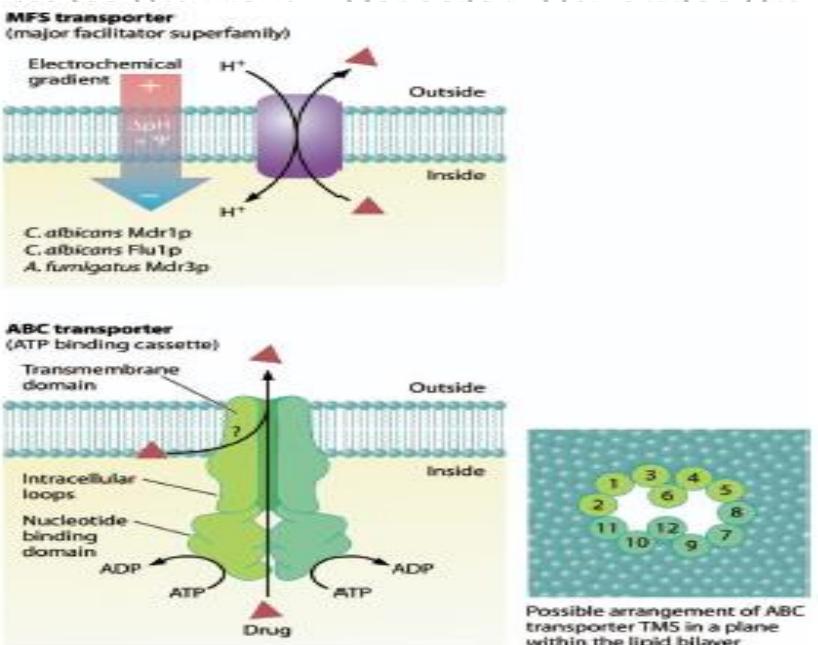
ABC transporter tergantung energi dari hidrolisis ATP. Peningkatan level mRNA ABC transporter berkorelasi dengan peningkatan resistensi terhadap fluconazole. Resistensi ini tumbuh setelah pemaparan fluconazole

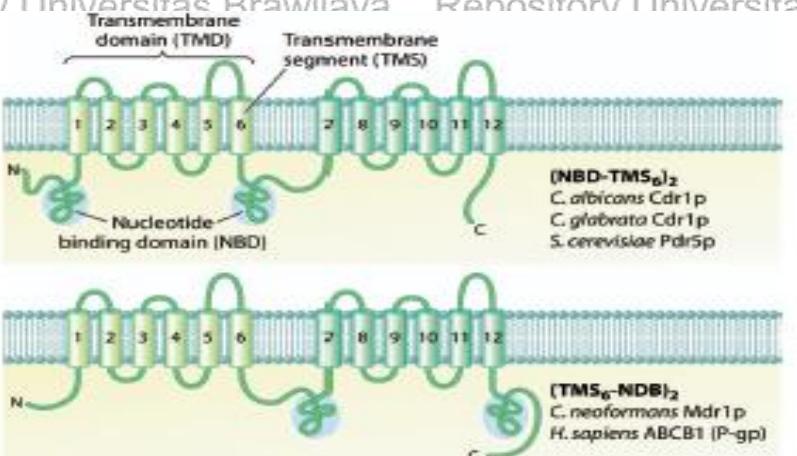
menetap. Bahkan, kerentanan juga muncul setelah obat tidak lagi diberikan kepada pasien. ABC transporter ditemukan dalam semua sel di semua organisme, seringkali di membran plasma, tapi juga di membran organel. Fungsi mereka adalah untuk mentransfer senyawa melintasi membran. Beberapa ABC protein bertanggung jawab untuk resistensi sel kanker terhadap agen kemoterapeutik dan *multidrug resistance* (MDR) (Casaliunovo, 2004; Martinez & Falson, 2005; Vermitsky *et al.*, 2004).

2.3.2.2.1. Topologi transporter ABC

Struktur dasar ABC transport adalah sebuah cytosolic nucleotide-binding domain (NBD) dan sebuah transmembrane domain (TMD) yang terdiri dari 1 hingga 4 polypeptida (Cannon *et al.*, 2009; Ghonnum & Rice, 1999).

Berikut ini adalah gambar MFS transporter dan ABC transporter:





Gambar 2.5. ABC dan MFS Transporter pada Membrane sel Fungal

Keterangan:

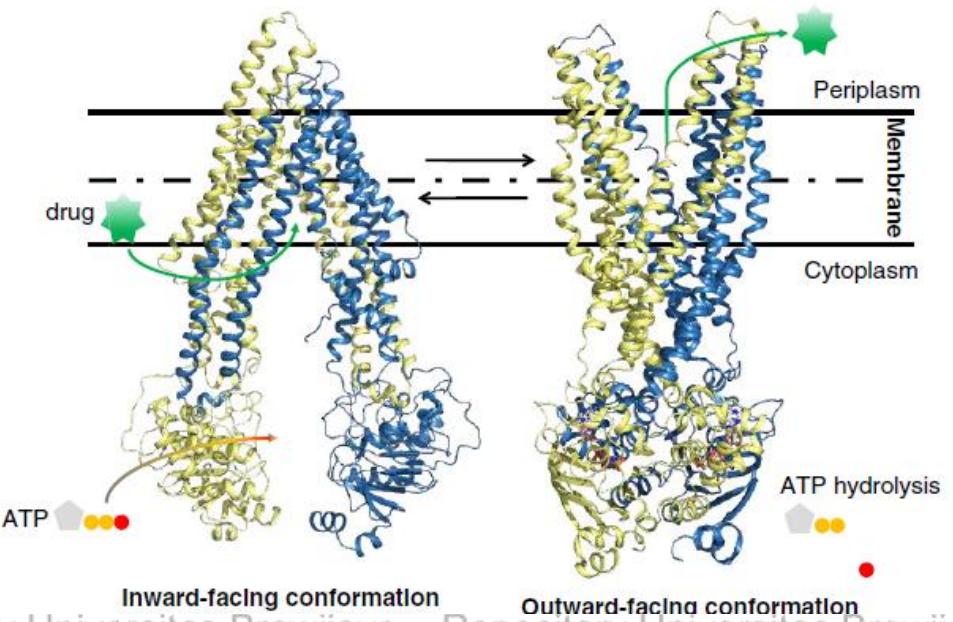
Domain pengaturan ABC dan MFS transporter pada membran sel fungal. Gambar di atas berdasar struktur Kristal. ABC transport adalah sebuah cytosolic nucleotide-binding domain (NBD) dan sebuah transmembrane domain (TMD) (Cannon *et al.*, 2009).

2.3.2.2. Siklus transport

Dalam sebuah siklus effluk obat, obat berikatan mula-mula ke TMD.

Pengikatan ini akan memicu sebuah perubahan konformasi dimana tiap NBD akan menjadi lebih dekat terhadap satu sama lain, menghasilkan ATP binding sites. Binding dari dua ATP menghambat protein dalam sebuah kondisi tertutup yang mengarah pada terjadinya sebuah perubahan konformasional besar kedua dari konformasi *inward-facing* menjadi *outward-facing*. Dalam konformasi baru ini, kedua NBD tetap terikat bersama dengan ATP mereka sementara bagian leaflet luar dari tiap TMD akan menjadi jauh, terbuka terhadap bagian ekstraseluler dari *drug-binding sites*. Obat akan dilepaskan oleh perubahan dalam afinitas di lokasi-lokasi (*sites*). Terakhir protein akan kembali ke konformasi *inward-facing* dengan menghidrolisis ATP, yang memberikan energi ke protein untuk memungkinkan pemisahan (Cannon *et*

al., 2009; Ghonnum & Rice, 1999; Martinez & Falson, 2004). Berikut ini adalah gambar perubahan konformasi pada siklus transport obat pada pompa efflux obat:



Gambar 2.6. Siklus Transportasi Obat pada Drug Efflux Pump

Keterangan:

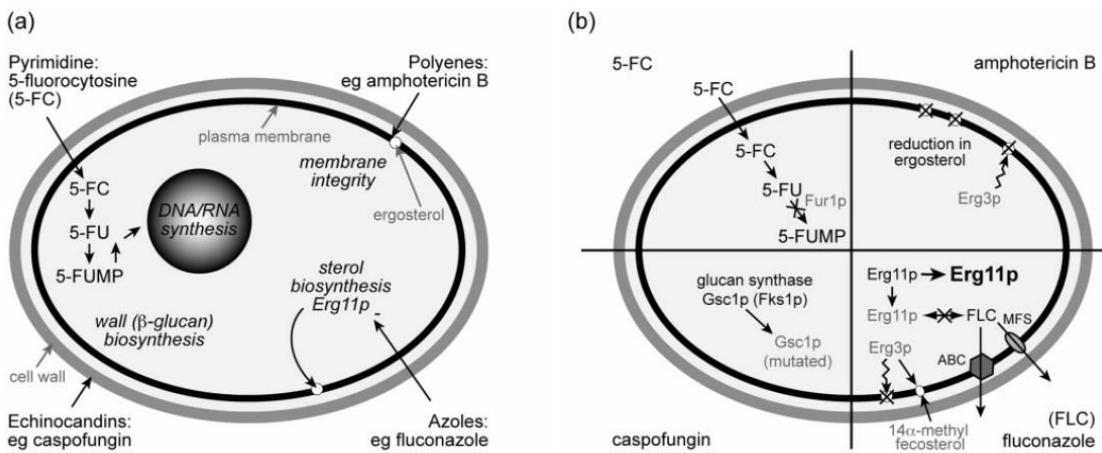
Obat berikatan mula-mula ke TMD (transmembrane domain). Pengikatan ini akan memicu sebuah perubahan konformasi *inward-facing* menjadi *outward-facing*. Obat akan dilepaskan di *sites*. Pada akhirnya protein akan kembali ke konformasi *inward-facing* dengan menghidrolisis ATP (Martinez & Falson, 2004).

2.4. Resistensi pada *C. albicans*

Pemaparan antifungal pada *C. albicans* akan menginduksi respon stress yang tergantung pada dosis dan sifat antifungal. Untuk obat fungisidal seperti echinocandins dan polyenes pada konsentrasi *minimum growth-inhibitory concentration* (MIC), respon ini menyebabkan kematian sel.

Dengan obat fungistatic, seperti misalnya azole, MIC menyebabkan sel terhambat tapi tidak terbunuh (Sanglard et al., 2003; Ghonnum & Rice, 1999;

Cannon *et al.*, 2009). Berikut ini adalah gambar mekanisme resistensi antifungal terhadap *C. albicans*:



Gambar 2.7. Mekanisme Resistensi pada *C. albicans*

Keterangan:

a) Target obat antifungal saat ini, b) Mekanisme resistensi antifungal pada *C. albicans*. Abu-abu menunjukkan protein mutase. Cetak tebal menunjukkan protein overexpression. 5-FU=5-fluorouracil; 5-FUMP=5-fluorouridine monophosphate (Cannon *et al.*, 2009).

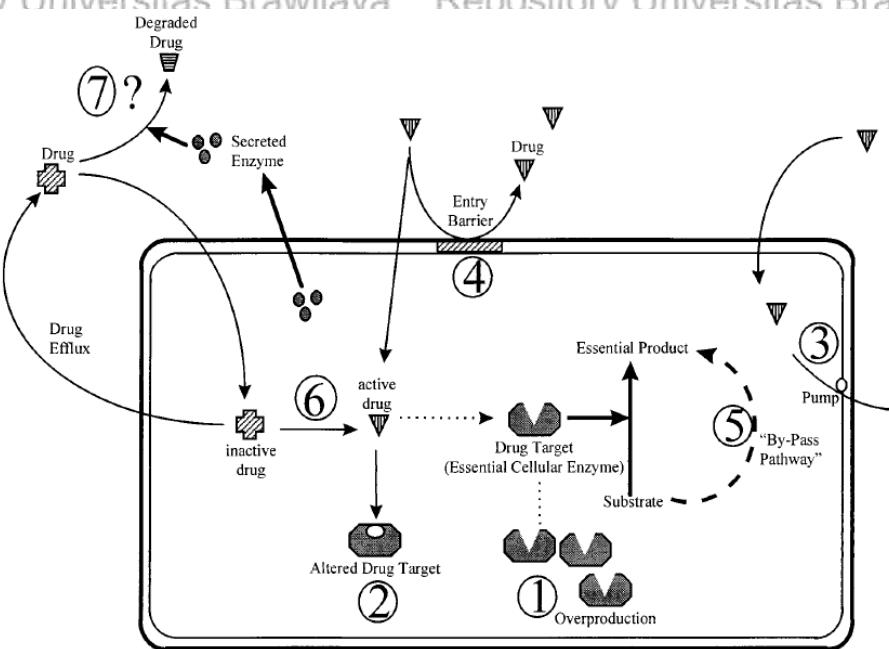
Banyak mekanisme resistensi azole pada *C. albicans*. Target obat Erg11p mengalami *overexpressed* atau *point mutation* yang mengurangi ikatan fluconazole (Akins, 2005; Sanglard & Bille, 2002; White *et al.*, 1998; Cannon *et al.*, 2007). *C. albicans* memiliki beragam tipe sel yang berbeda dan bervariasi dalam hal kerentanannya terhadap azole. *C. albicans* dapat dibagi ke dalam dua serotype, A dan B, berdasarkan pada marker permukaan karbohidrat. Strain serotype B dari *C. albicans* ini akan lebih sensitif terhadap azole (khususnya ketoconazole) tapi lebih resisten terhadap 5-FC jika dibandingkan dengan strain serotype A. Resistensi obat antifungal bukanlah sebuah hal yang konstan. Jumlah sel yang bertahan setelah paparan

antifungal akan memberikan pengaruh resistensi antifungal. Studi menggunakan obat berlabel radioaktif seperti misalnya fluconazole menunjukkan bahwa *Candida* resisten mengakumulasikan lebih sedikit obat intrasel *Candida* jika dibandingkan *Candida* yang sensitif. Isolat yang resisten terhadap satu azole seringkali cross-resistant terhadap azole lain dan bisa pula cross-resistant terhadap polyene. Overexpression gen CDR adalah mekanisme umum resistensi, dan gen-gen CDR resisten terhadap banyak azole yang berbeda (White *et al.*, 1998; Sanglard & Bille, 2002; Bruno & Mitchell, 2005).

Terdapat peningkatan prevalensi *C. albicans* resisten-fluconazole diantara pasien terinfeksi HIV dengan oropharyngeal atau esophageal candidiasis. Penggunaan yang luas dengan itraconazole dan fluconazole dianggap sebagai penyebab utama resistensi azole. Faktor lain, seperti pemaparan antibakteri, terapi immunosuppressive dan kondisi medis dasar dari host juga menyebabkan resistensi (Kanafani & Perfect, 2008). Dalam isolat klinis, resistensi biasanya muncul setelah periode panjang penggunaan obat (White *et al.*, 1998; Pfaller *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 2006).

Empat mekanisme resistensi utama terhadap azole ada pada spesies *Candida*. Lebih dari 1 mekanisme bisa berjalan. Resistensi azole terjadi melalui modifikasi enzim target dan pengurangan akses terhadap target, atau kombinasi mekanisme-mekanisme tersebut. Studi menunjukkan bahwa modifikasi ekspresi 14a-demethylase berkontribusi dalam resistensi azole. Overexpression 14a-demethylase merupakan dasar mekanisme resistensi terhadap azole. Studi pada strain *C. glabrata* resisten azole dan menunjukkan

bawa kandungan ergosterolnya meningkat. Peningkatan ini disertai dengan penurunan sensitivitas terhadap azole. Peningkatan sintesis ergosterol berhubungan dengan overexpression enzim 14a-demethylase (Kanafani & Perfect, 2008; Ghannoum & Rice, 1999; Sanglard & Bille, 2002). Berikut ini adalah gambar skema resistensi obat:



Gambar 2.8. Mekanisme Resistensi Azole

Keterangan:

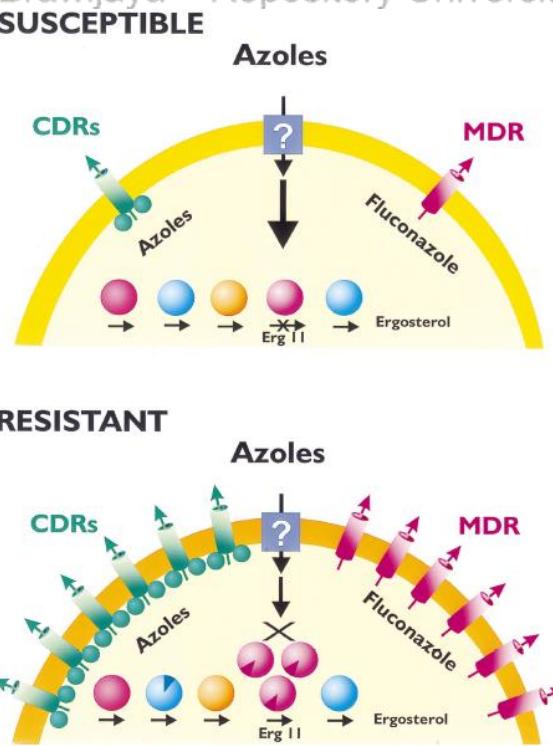
Mekanisme resistensi Azole: 1) Overproduced target enzim, 2) Perubahan target obat, 3) Peningkatan drug efflux pump, 4) Pencegahan masuknya obat pada membrane sel, 5) Jalur bypass yang mengkompensasi gangguan fungsi membrane karena obat, 6) Hambatan aktivasi obat oleh enzim fungal, & 7) Sekresi enzim fungal ke ekstraseluler untuk degradasi obat (Ghannoum & Rice, 1999).

Peningkatan pompa efflux (*efflux pumps*) obat berhubungan dengan penurunan konsentrasi obat. Efflux pumps Candida dikodekan oleh dua famili

gen transporter: gen CDR dari ATP binding cassette (ABC) super family, dan gen MDR dari kelas fasilitator utama. Upregulation dari CDR1, CDR2 dan MDR1 ada dalam *C. albicans* resisten-azole. Analisa genom *C. albicans* mengidentifikasi 27 ABC protein yang diklasifikasikan ke dalam enam subfamili: CDR1, CDR2, CDR3, CDR11[CDR5], SNQ2 dan YOR1. CaCDR3 dan CaCDR4 mengkodekan phospholipid lipase. CaCdr2p, CaCdr3p tidak terlibat dalam resistensi antifungal, termasuk fluconazole. CaCDR4 juga tidak terlibat dalam resistensi fluconazole *C. albicans*. Enam gen merupakan MFS-like dalam CGD (MDR1, FLU1, TPO3, orf19.2350, NAG3 dan MDR97. Gangguan terhadap MDR1 dalam *C. albicans* akan mengakibatkan penurunan sensitivitas fluconazole, CaMDR1 diupregulasikan oleh sejumlah strain *C. albicans* pada penurunan sensitivitas fluconazole (Kanafani & Perfect, 2008; Cannon *et al.*, 2009; Vandepitte, 2012).

Studi menunjukkan bahwa mutasi di ERG11, gen yang mengkodekan enzim target lanosterol C14a-demethylase, mencegah binding azole ke lokasi enzimatik (Kanafani & Perfect, 2008). Beberapa isolat *Candida* resisten azole memiliki konsentrasi ERG11p intraseluler yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan strain yang sensitive. Antifungal konsentrasi terapeutik akan kurang dan tidak lagi bisa menghambat sintesis ergosterol. Up-regulasi enzim target terjadi melalui amplifikasi gen, peningkatan laju transkripsi atau penurunan degradasi dari produk gen (Kanafani & Perfect, 2008; Andes, 2006). Paparan azole akan menghasilkan penurunan ergosterol dari membran fungal dan akumulasi produk toksik 14a-methyl-3,6-diol yang mengakibatkan berhentinya pertumbuhan. Mutasi di gen ERG3 akan mencegah pembentukan 14a-methyl-3,6-diol dari 14a-methylfecosterol. Penggantian ergosterol

dengan 14a-methyl-3,6-diol akan mengakibatkan membran fungal tetap fungsional (White *et al.*, 1998; Kanafani & Perfect, 2008).

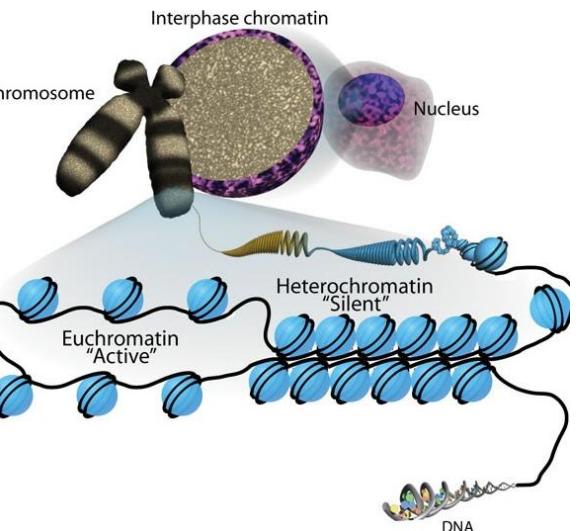


Gambar 2.9. Mekanisme Resistensi Fluconazole

Keterangan:

Pada sel sensitive, Fluconazole akan memasuki sel melalui mekanisme difusi pasif. Fluconazole kemudian menghambat sintesis ergosterol. Dua tipe pompa efflux berada pada level rendah. Pada sel resisten, Fluconazole kurang efektif terhadap enzim target karena point mutation ERG11 dan overexpression enzim target. Modifikasi enzim lain pada sintesis ergosterol juga berperan pada resistensi (White *et al.*, 1998).

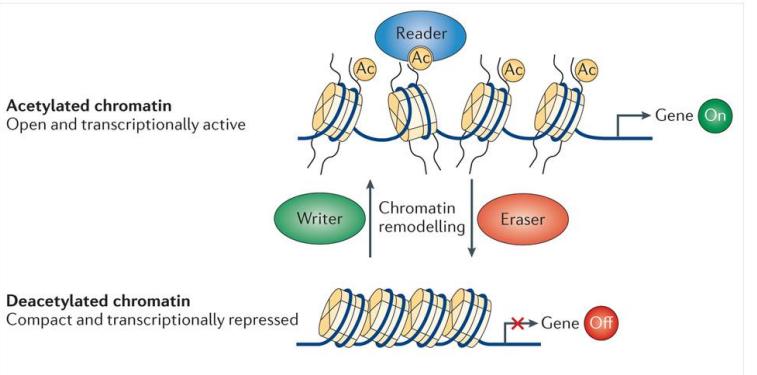
2.5. Asetilasi & Deasetilase Histone mempengaruhi Regulasi Transkripsi



Gambar 2.10. Organisasi Kromatin

Keterangan:

Unit dasar kromatin adalah nukleosom yang terdiri dari 147 bp DNA yang melingkari protein histon. Euchromatin adalah susunan terbuka kromatin yang memungkinkan transkripsi, sedang heterokromatin lebih kompak (Wang, 2007).

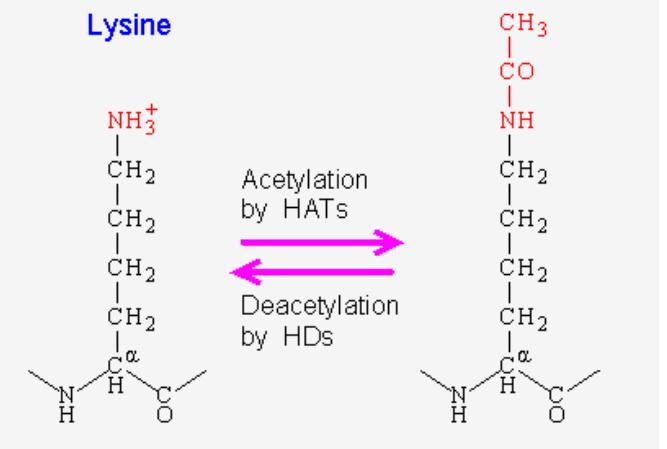


Gambar 2.11. Asetilasi Histone dan Ekspresi Gen

Keterangan:

DNA yang aktif atau ‘on’ secara transkripsi akan relaks dirujuk sebagai euchromatin mengalami asetilasi. DNA yang ‘off’ lebih padat (sangat padat) dirujuk sebagai heterochromatin. Kondensasi (pemadatan) bisa dilakukan dengan proses-proses termasuk diantaranya adalah deasetilasi dan metilasi (Verdin & Ott, 2015).

Histone yang terasetilasi merupakan protein oktamerik yang mengorganisir chromatin ke dalam nukleosome ke struktur tatanan yang lebih tinggi. Regulasi histon merupakan faktor epigenetik di dalam chromatin. Asetilasi menghilangkan muatan positif di histone, sehingga mengurangi interaksi N termini dari histone dengan grup fosfat DNA yang bermuatan negatif. Sebagai akibatnya, chromatin terkondensasi ditransformasikan ke dalam struktur yang lebih rileks dan yang dapat melakukan level transkripsi gen yang lebih besar. Relaksasi ini bisa dibalikkan dengan aktivitas HDAC (Tsubota *et al.*, 2007; Wurtele *et al.*, 2012; Verdin & Ott, 2015).



Gambar 2.12. Reaksi Asetilasi

Keterangan:

Reaksi asetilasi pada gugus lysine dari kromati akan menyebabkan gen menjadi transkripsi. Proses ini dikatalisa oleh enzim Histone Acetyl Transferase (Wang, 2007).

Gambar di atas menunjukkan kondisi dinamis dari asetilasi/deasetilasi histone yang diregulasi oleh enzim HAT dan HDAC. Asetilasi histone mengubah aksesibilitas chromatin dan memungkinkan protein pengikat DNA untuk berinteraksi untuk mengaktifkan transkripsi gen dan fungsi seluler. Asetilasi diasosiasi dengan aktivasi transkripsional sementara deasetilasi dihubungkan dengan deaktivasi transkripsi. Reaksi-reaksi ini terjadi paska-translasi dan dapat reversibel. Asetilasi memiliki pengaruh mengubah keseluruhan muatan ujung ekor histone dari positif menjadi netral. Pembentukan nucleosome akan tergantung

oada muatan positif H4 histone dan muatan negatif di permukaan H2A histone. Dengan melakukan ini, DNA akan lebih mudah diakses dan mengarah pada lebih banyak faktor transkripsi yang bisa mencapai DNA sehingga meningkatkan ekspresi gen melalui aktivasi transkripsi. Deasetilasi yang dilakukan oleh molekul HDAC memiliki pengaruh yang berkebalikan dengan ini. Dengan melakukan

CH_3

deasetilasi ujung ekor histone, DNA akan menjadi terikat lebih erat di sekeliling inti histone, membuatnya semakin sulit bagi faktor transkripsi untuk berikatan dengan DNA. Hal ini mengarah pada penurunan ekspresi gen dan dikenal sebagai gene silencing dan menjadi regulasi transkripsi (Wang, 2007; Verdone *et al.*, 2006; Gallinari *et al.*, 2007).

2.6. Histone Acetyl Transferase (HAT) - Rtt109

Rtt109 merupakan enzim histone acetyl-transferase (HAT) dalam asetilasi H3K56. Rtt109 mempengaruhi event “switching” white-opaque pada *Candida albicans*. Sel opaque *rtt109^{-/-}* tidaklah stabil dan memiliki sebuah frekuensi switching yang meningkat terhadap sel putih (white cells) (Stevenson dan Liu, 2011). Hilangnya H3K56 asetilasi via penghapusan RTT109 pada *C. albicans* mengurangi mortalitas mencit yang mengalami candidiasis sistemik (Lopes da Rosa *et al.*, 2010). Selain itu, sel *rtt109^{-/-}* tidak bisa menyebabkan koloni jamur pada ginjal (Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Wurtele *et al.*, 2010). Sel *rtt109^{-/-}* berkorelasi dengan ketidakmampuan untuk menahan ROS yang dihasilkan-fagosit. Data ini menunjukkan bahwa perlindungan terhadap stres respon yang disediakan oleh Rtt109 dan H3K56 termasuk penting bagi *C. albicans* untuk bisa bertahan dari fagositosis oleh makrofage, termasuk bertahan melalui respon stress Candida menghasilkan Candida resisten (Wurtele *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008; Lopes da Rosa *et al.*, 2010; D'Arcy & Luger, 2011). Rtt109, fungal hipersensitif terhadap efek genotoksik dari Reactive Oxygen Species (ROS) yang dilepaskan oleh sel fagositik, gangguan repair gen dan gangguan respon stress drug efflux transporter. HAT Rtt109 sepehuinya bertanggung jawab untuk asetilasi histone H3 lysine 56 (H3K56)

pada jamur (Han *et al.*, 2007a; Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2006; Xhemalce *et al.*, 2007; Lopes da Rosa *et al.*, 2010).

Senyawa yang menginhibisi Rtt109 diprediksi menyebabkan sensitivitas terhadap kerusakan DNA pada sel yeast/ragi. Karena Rtt109 mempromosikan patogenesis *C. albicans* (Lopes da Rosa *et al.*, 2010), sebuah inhibitor kimiawi dari enzim diharapkan untuk merekapitulasikan fenotipe ini dan membuat kandidat obat anti-fungal baru. Pemeriksaan terhadap database protein mengungkapkan homolog dari Rtt109 hanya diantara spesies fungal lainnya (Han *et al.*, 2007a; Tsubota *et al.*, 2007). Selain itu, ketidaksamaan antara Rtt109 dan enzim dari famili HAT yang lain mengindikasikan bahwa sebuah inhibitor spesifik akan memiliki aktivitas dan toksitas minimal terhadap protein mamalia (Wang *et al.*, 2008; Lopes da Rosa *et al.*, 2010; D'Arcy & Luger, 2011).

2.7. Metilasi DNA mempengaruhi Regulasi Transkripsi

Metilasi DNA merupakan modifikasi ikatan kovalen pada sitosin yang menyebabkan penambahan gugus metil (CH_3) pada posisi karbon nomor 5 pada dinucleotide CpG. Metilasi dapat mengubah aktivitas DNA tanpa mengubah sekuen gen. Metilasi DNA mempengaruhi transkripsi gen dalam dua cara. Pertama, pengikatan (*binding*) protein transkripsional dihambat secara fisik dengan adanya metilasi. Kedua, DNA termetilasi diikat oleh methyl-CpG-binding domain proteins yang merekrut protein tambahan lainnya dan berakhir dengan modifikasi DNA menjadi kromatin inaktif (*silent chromatin*).

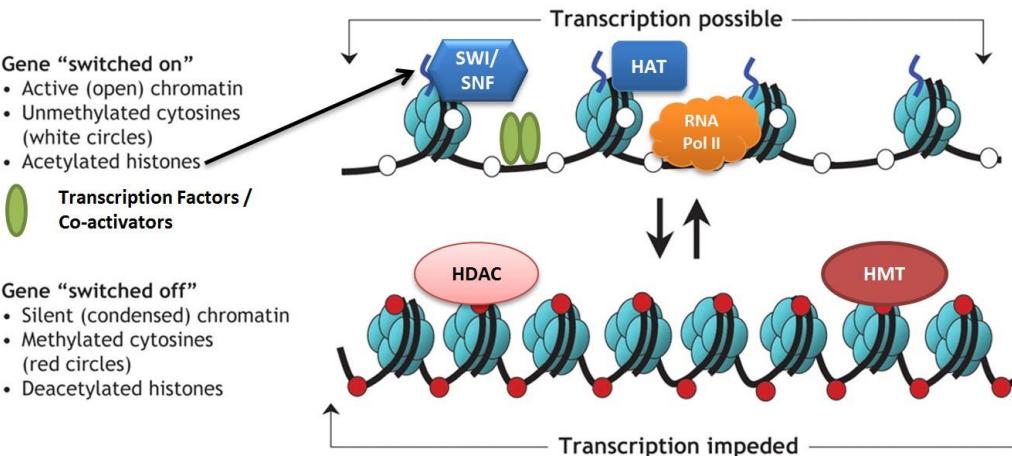
Bila berada pada gen promotor maka metilasi DNA akan merepresi transkripsi gen. DNA sangat penting bagi pertumbuhan sel termasuk *genomic imprinting* (Ehrlic *et al.*, 1982; Dodge *et al.*, 2001; Lister *et al.*, 2009).

Metilasi sitosin menghasilkan 5-methylsitosin yang akan terjadi deaminasi spontan menjadi timin (T). T akan berikatan dengan A sehingga terjadi substitusi G menjadi A. Hal ini menyebabkan T:G mismatch. Mekanisme repair terjadi dengan mengoreksi kembali ke C-G atau menjadi A-T. Perubahan menjadi A-T akan menghasilkan mutase. Mutasi ini akan terkoreksi saat replikasi namun bila tidak terkoreksi akan menghasilkan sel yang masuk siklus sel dengan masih termutasi membawa T yang berkomplemen dengan A pada sel anak. Perubahan universal sitosin atau urasil menjadi timin akan menghasilkan mekanisme error pada sel. Metilasi DNA merupakan proses enzimatik yang diperantara oleh DNA methyltransferase (DNMT) yang terdiri dari DNMT1, 3a dan 3b. Peran utama DNMT1 adalah mempertahankan aktivitas methyltransferase dan berperan penting dalam pembelahan dan perkembangan sel. Pola metilasi akan dipertahankan sampai sel anak dengan kerja DNMT1 yang akan mengkatalisis gugus metil dari S-adenocylmethionin (SAM) yang merupakan donor metil kepada sitosin (Ehrlic *et al.*, 1982; Robertson, 2001; Sharma *et al.*, 2010; Dodge *et al.*, 2001; Lister *et al.*, 2009).

2.8. Metilasi CpG Island

CpG islands paling umum ditemukan di dalam region 5' dari gen dan 60% promotor gen berada di region ini. CpG island juga bisa ditemukan di tempat lain di dalam genom. CpG island dianggap sebagai tempat yang biasanya tidak mengalami metilasi DNA. Ini penting karena area yang tak termetilasi akan esensial untuk transkripsi gen. CpG islands yang dimetilasi pada banyak lokasi promoter diasosiasikan dengan represi gen. Pemicu metilasi CpG island masih belum diketahui mungkin terjadi melalui pemberian akses ke DNA-methyltransferase. Inisiasi terjadi ketika protein pengikat DNA-

termetilasi (*methylated-DNA binding proteins*) berikatan, diikuti dengan sebuah kompleks protein yang mengandung histones, deacetylases dan protein lain. Kompleks protein ini kemudian menginduksi sebuah struktur kromatin tertutup yang mengeluarkan faktor transkripsi dari area promotor dan menghasilkan *gene silencing*. Ketika promotor CpG islands menjadi termetilasi maka gen menjadi silent dan silencing ini ditransmisikan melalui mitosis (Wang, 2007; Dodge et al., 2001; Lister et al., 2009).



Gambar 2.13. Regulasi Transkripsi

Keterangan:

Protein SWI/SNF membantu membuka nucleosome yang biasanya terpadatkan dan memungkinkan faktor transkripsi berkontak dengan DNA template, mengarah pada transkripsi gen. Asetilasi histon dan metilasi sitosin akan menyebabkan gen represi atau "Off" (Wang, 2007).

2.8.1. Metode Metilasi DNA di CpG Island

Metode untuk analisa metilasi DNA bisa dibagi secara kasar ke dalam dua tipe: analisa metilasi global dan spesifik gen. Analisa metilasi global mengukur level sitosin metil keseluruhan didalam genom seperti misalnya dengan metode kromatografik dan *methyl accepting capacity assays*. Untuk mempelajari

metilasi DNA CpG island, terdapat dua tipe eksperimen yang bisa dilakukan: a) Enzim Restriksi Sensitif-Metilasi, dan b) Konversi Bisulfit. Metode restriksi sensitive metilasi merupakan metode yang membedakan DNA termetilasi dari yang tak termetilasi berbasis pada enzim restriksi sensitif-metilasi.

Menggunakan enzim restriksi sensitif-metilasi diikuti oleh PCR adalah hal yang rumit, karena teknik ini rentan dalam memberikan nilai positif palsu karena adanya pemrosesan tak lengkap (*incomplete digestion*), terutama bila hanya

satu site. Penceraan enzim restriksi sensitif-metilasi membutuhkan setidaknya lima µg DNA yang berkualitas bagus. Metode bisulfit merupakan metode membedakan DNA termetilasi dari yang tak termetilasi berbasis pada konversi

bisulfite pada DNA yang ketika selesaikan dilakukan, mengkonversikan C termetilasi menjadi U atau T. Konversi bisulfite pada DNA bisa diikuti oleh

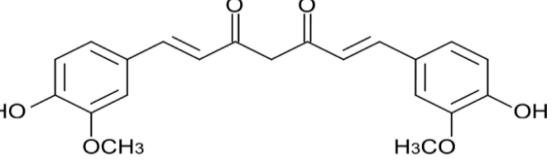
beberapa assay termasuk sekvensing. Kedua metode membutuhkan PCR dan karenanya rentan terhadap masalah kuantitas yang melekat pada PCR. Desain primer sangat penting untuk menghindari DNA tak terkonversi (Herman *et al.*, 1996; Chatterjee *et al.*, 2012; Dahl dan Guldberg, 2003).

2.9. Struktur Kimia Kurkumin

Kurkumin (*1, 7-bis [4-hydroxy-3-methoxyphenyl]-1, 6-heptadiene-3, 5-Dione*) (Gambar-1) merupakan bahan aktif yang terdapat dalam tanaman tradisional herbal rimpang kunyit (*Curcuma longa Val*) dan temulawak (*Curcuma xanthoriza Robx*) (Goot, 1995). Kurkumin adalah komponen utama dari turmeric (kunyit). Telah diketahui bahwa Kurkumin memiliki spektrum aktivitas biologis yang luas seperti misalnya antifungal, imunomodulasi, antioksidan, anti-*inflammatory*, dan antibakteri (Singh & Jain, 2012).

Kurkuminoid merupakan grup fenol yang terkandung dalam temulawak. Tiga

Kurkuminoid yang telah dapat diisolasi yaitu Kurkumin (C), demetoksiKurkumin (DMC) dan bisdemetoksiKurkumin (BDMC). Ketiganya memberi kontribusi warna kuning pada tanaman jenis kunyit (Majeed et al., 1995).



Gambar 2.14. Struktur Kimia Kurkumin

Keterangan:

Struktur kimia Kurkumin memiliki gugus OH dan gugus metil (Majeed et al., 1995).

2.10. Kerja Kurkumin Menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS)

Kurkumin memiliki kedua bentuk pro dan antioksidan bergantung pada kondisinya. Studi tentang aktivitas redoks kurkumin cukup banyak. Kurkumin akan menjadi *free radical scavenger* dengan adanya ion Cu dan Fe. Banyak studi menunjukkan mekanisme α hydrogen atom transfer (HAT). Beberapa studi mengusulkan bahwa kurkumin menghasilkan *single proton loss electron transfer* (SPLET). Proses SPLET melibatkan deprotonisasi grup keto-enol dan transfer electron untuk membentuk β -diketonil radical dan diikuti dengan donasi proton pada fenol. Akhirnya migrasi electron merubah fenoksi menjadi fenoksi radikal.

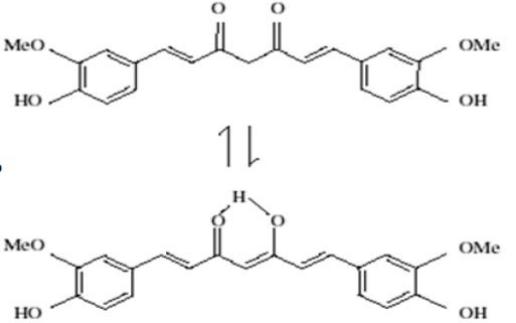
Kurkumin berubah menjadi agen reduksi baik melalui HAT maupun lebih signifikan lagi melalui SPLET. Kurkumin dalam PH terkontrol mengikat seluruh ion metal dan kompleksnya. Meskipun banyak studi mengenai kemampuan kurkumin mengikat Fe, Cu, Mn namun hanya sedikit yang diketahui. Untuk mengenali ikatan dan redoks pada kurkumin. Interaksi kurkumin dengan Fe dan Cu memiliki efek prooksidan dengan analogi seperti proses fenton. Ikatan [FeIII(H₂curcumin-OH)₂]

akan selalu ada pada pH 7. Pembentukan ini konstan terjadi seperti pembentukan transferrin ($\log K_f = 22.06$). Pembentukan ini karena pK_a kurkumin adalah 8,54.

Sedangkan Fe(II) adalah sedikit asam dengan Fe(II) lebih kecil daripada Fe(III).

Karena itulah maka kurkumin merupakan *chelator* yang kuat untuk Fe pada keadaan netral dan sedikit asam (Al-Rubaei *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2010; Majeed, 1995).

Kurkumin adalah molekul polifenol berat rendah yang bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas maupun donor hidrogen. Kurkumin mengikat logam besi dan tembaga. Kurkumin menghambat toksitas amyloid intraseluler pada dosis rendah pada tikus karena aktivitas *scavenging* radikal bebasnya. Kurkumin juga efektif dalam beragam model antioksidan (Sreejayan, 1996; Hatchera *et al.*, 2012). Namun pada PH 3-7 atau asam, Kurkumin akan berlaku sebagai atom H donor atau oksidator menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Sedangkan pada PH 8 akan berlaku sebagai electron donor (Sharma *et al.*, 2010; Majeed, 1995; Mehrota *et al.*, 2013).



Gambar 2.15. Kurkumin sebagai Oksidator

Keterangan:

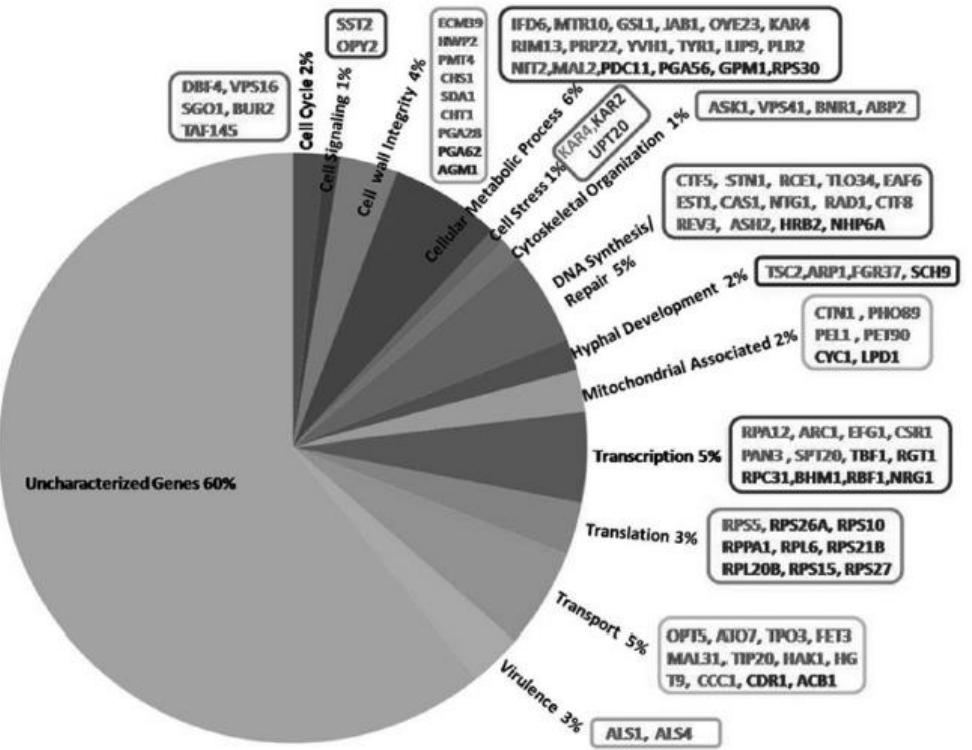
Pada PH 3-7 atau asam, Kurkumin akan berlaku sebagai atom H donor atau oksidator (Mehrota *et al.*, 2013).

Aktivitas antifungal kurkumin juga berasal dari kemampuannya menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS memiliki banyak pengaruh merusak terhadap fungi target, yang pada akhirnya mengakibatkan kerusakan dinding sel dan kematian sel (apoptosis). Oleh karenanya, ROS ini mewakili sebuah agen yang bagus untuk pengembangan selanjutnya sebagai agen antifungal (Sharma *et al.*, 2010). Adanya ROS ini akan menurun bila ditambahkan antioksidan ke dalam medium. Namun demikian, adanya kurkumin juga akan menginduksi level transkripsi gen antioksidan seperti [CAP1 (*C. albicans* AP-1), *CalPF7817* (putative NADH-dependent flavin oxidoreductase), *GRP2* (NADPH-dependent methyl glyoxal reductase), *CAT1* (catalase 1) dan *SOD2* (superoxide dismutase 2)] (Al-Rubaei *et al.*, 2014; Mehrota *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2010).

2.11. Pengaruh Kurkumin terhadap *Candida albicans*

2.11.1. Kerja Kurkumin Mengganggu Integritas Dinding Sel *Candida*

Studi Kumar (2014) menunjukkan bahwa Kurkumin memiliki target kerja gen-gen yang terlibat dalam integritas dinding sel. Diantara 348 gen sel fungi yang dipengaruhi kurkumin, 51 akan *upregulated* dan 297 akan *downregulated*. Menariknya, kebanyakan gen integritas dinding sel yang akan *downregulated*. Gen-gen ini antara lain *PGA28*, *ECM39*, *GFA1*, *HWP2*, *PMT4*, *HYR3*, *HDA1*, *CHS1*, *CHT1*, *orf19.5271*, and *orf19.376*. Data ini merupakan bukti kuat bahwa kurkumin mengganggu integritas dinding sel pada *C. albicans*. Jalur integritas dinding sel memainkan peranan penting dalam melawan beragam pengobatan (Kumar *et al.*, 2014).



Gambar 2.16. Pengaruh kurkumin terhadap ekspresi gen-gen *C. albicans*.

Keterangan:

Kurkumin menurunkan gen yang terlibat dalam integritas dinding sel *C. albicans*. Gen yang bercepat tebal adalah gen yang ekspresinya dosen regulated pada dinding sel *Candida albicans* setelah mendapat paparan kurkumin (Kumar et al., 2014).

2.11.2. Peran Kurkumin terhadap Resistensi Antifungal pada *C. albicans*

2.11.2.1. Efek Kerja Kurkumin terhadap Ergosterol

Studi tentang Kurkumin menunjukkan bahwa kurkumin menurunkan secara signifikan level ergosterol pada *C. albicans*. Kurkumin menunjukkan sinergi dengan fluconazole dalam menurunkan ergosterol ini. Namun demikian dosis yang lebih rendah dari MIC₅₀ tidak dapat menurunkan ergosterol. Terdapat penurunan dramatis level ergosterol dengan penambahan akumulasi prekusor biointetiknya secara simultan. Hal ini didukung oleh studi tentang mutan yang memiliki kelainan

pada biosintesis ergosterol (*ERG2* and *ERG11*) dan kehilangan faktor transkripsi untuk mengatur biosintesis ergosterol sangat rentan terhadap kurkumin (Sharma et al., 2012).

2.11.2.2. Efek Kurkumin terhadap *Drug Efflux Pump*

Ekspresi *ATP-binding cassette* (ABC) *multidrug transporters*, termasuk P-glycoprotein (ABCB1), *multidrug resistance protein* (ABCC1) dan *mitoxantrone resistance protein* (ABCG2) memainkan peranan penting dalam pengembangan *multidrug resistance* (MDR). Beberapa inhibitor fungsional dari protein MDR telah diuji, tapi sejauh ini tidak satupun mencapai hasil yang baik. Untuk mengatasi permasalahan ini, banyak upaya telah dilakukan untuk mengidentifikasi inhibitor alami eksporter MDR, karena produk alami memiliki potensi untuk menghasilkan sejumlah besar obat baru. Kurkuminoid telah dilaporkan dapat membalikkan fenotipe resistensi obat pada sel kanker yang mengalami *overexpressing ABC transporters* (Gottesman et al., 2002; Sharma et al., 2009).

2.12. Candidiasis pada pasien HIV

Penelitian ini menggunakan *Candida albicans* strain resisten yang diambil dari isolate oropharyng pasien *human immunodeficiency virus* (HIV) RSU Ciptomangunkusumo. Pemilihan pengambilan isolate dari pasien HIV ini didasarkan atas resistensi Canda sering terjadi pada pasien dengan penurunan imunitas. Infeksi jamur (termasuk Candida) menjadi penyebab utama kesakitan dan kematian pada pasien dengan daya tahan tubuh yang rendah (misalnya HIV/AIDS). Banyak pasien yang terinfeksi HIV menerima terapi antifungal azole (termasuk fluconazole) dosis rendah yang berjangka panjang, yang

mengakibatkan isolat *C. albicans* resisten azole (termasuk fluconazole). Pemaparan berulang pada pasien *recurrent*, yang sering terjadi pada pasien HIV, juga bisa mempengaruhi perubahan spesies *Candida*. Perubahan ini bisa berupa perubahan molekuler membran *Candida* (mutasi ERG11) maupun perubahan transporter drug efflux (*overexpressed*). Peningkatan dosis tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai solusi jangka panjang, oleh karena itu suatu novell therapy sangat diperlukan untuk mengatasi resistensi Fluconazole pada pasien HIV ini.

Candidiasis adalah suatu kondisi umum yang biasanya dapat diobati dengan mudah pada orang-orang yang tidak mengalami penurunan imunitas. Pada lingkungan normal, *Candida albicans* hidup pada 80% dari populasi manusia tanpa efek merugikan, namun bila terdapat pertumbuhan berlebihan, menjadi penyebab penyakit Candidiasis (Brooklyn, GF., Omston, 1996). Pertumbuhan berlebihan dapat terjadi pada pasien dengan imunitas rendah seperti HIV.

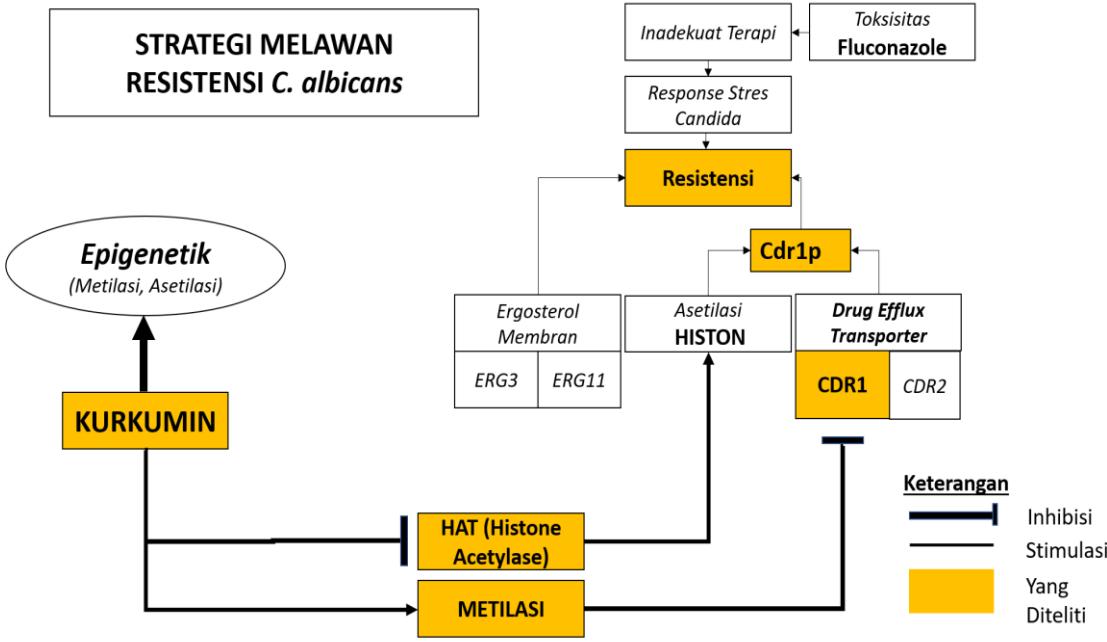
Suatu studi menunjukkan bahwa resistensi azole terjadi hingga sepertiga isolat *C. albicans* oral yang diperoleh dari pasien positif-HIV (White, et al., 2002). Studi lain menunjukkan bahwa oropharyngeal candidiasis terjadi pada hingga 90% lama perjalanan penyakit HIV. Insidensi oropharyngeal candidiasis berhubungan dengan CD4 T-lymphocyte dibawah 200 sel/mm³, viral load yang tinggi dan perjalanan lanjut penyakit. Studi Maenza et al. (1995) menunjukkan bahwa resistensi fluconazole berhubungan dengan episode pengobatan yang lebih banyak, sel CD4 yang lebih rendah, durasi penggunaan fluconazole yang lebih panjang dan penggunaan terapi sistemik. Penggunaan *highly active antiretroviral therapy* (HAART) menghasilkan supresi replikasi viral dan CD4 T-lymphocyte sehingga menurunkan oropharyngeal candidiasis. Namun

demikian, oropharyngeal candidiasis masih sangat berhubungan dengan pasien HIV (Hamzah et al., 2008).

KERANGKA TEORI & K

1.1. Kerangka Teori

1.1. Kerangka Teori



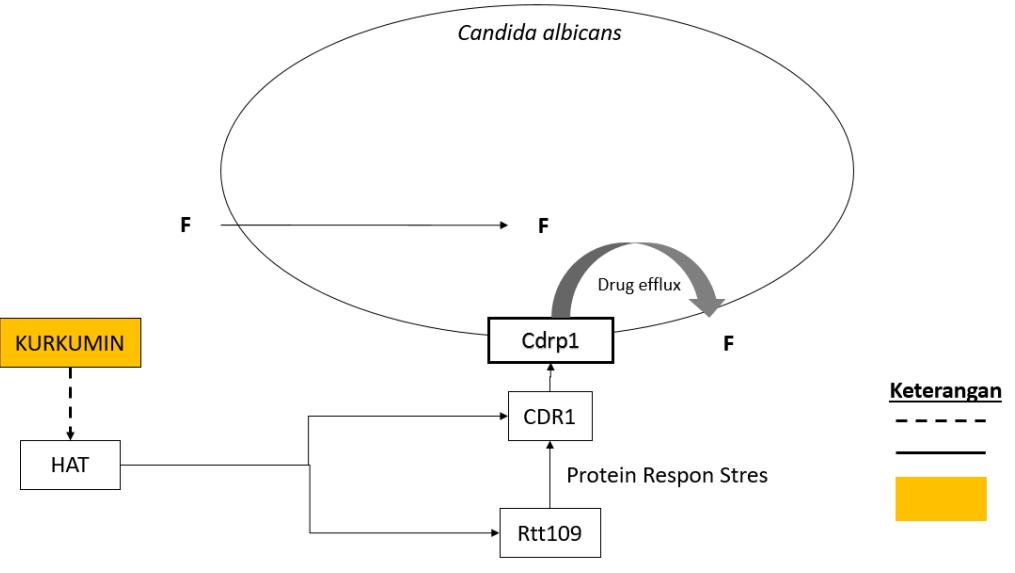
Gambar 3.1. Kerangka Teori

Keterangan: Strategi melawan *Candida albicans* bisa berupa melawan virulensi (misal melawan

Resistensi Fluconazole berkembang dari toksisitas yang tinggi sehingga rentang pengobatannya sempit dan menyebabkan penggunaannya cenderung tidak adekuat.

Saat terapi inadekuat maka akan muncul mutan baru hasil perubahan genetik Candida yang resisten Fluconazole. Gen ini bisa berupa ERG3, ERG11 dan gen drug efflux transporter. Kultur ini merupakan inhibitor azotrim. Ustion Acetyl

Transferase (HAT) yang mengkatalisa asetilasi kromatin, inhibisi ini menyebabkan transkripsi gen “off”. HDAC: Histon Deacetylase.

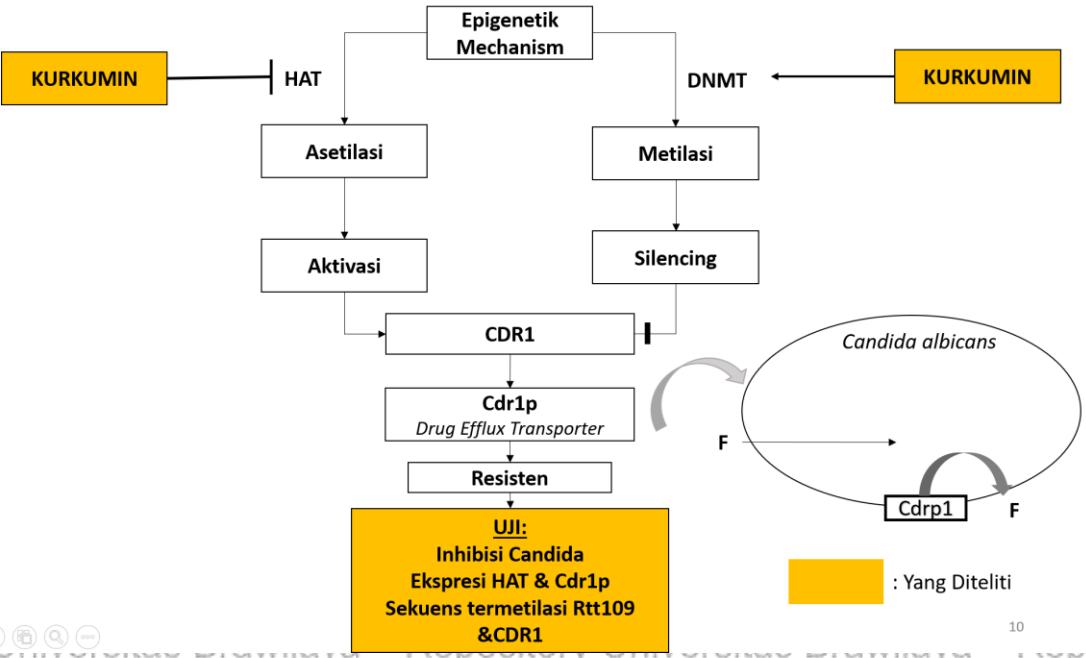


Gambar 3.2 Kerangka Teori 2

Keterangan:

Kurkumin menghambat HAT sehingga menyebabkan Rtt109 dan juga menyebabkan CDR1 "off". Rtt109 merupakan gen yang mengatur repair DNA dan respon stress sehingga menstimulasi gen resistensi (CDR1). Silencing CDR1 menurunkan ekspresi Cdrp1 agar tidak terjadi Fluconazole efflux sehingga Fluconazole mampu bekerja melawan Candida. Kurkumin memodulasi resistensi agar Fluconazole dapat bekerja melawan Candida atau dengan kata lain Kurkumin dan Fluconazole bersinergi mengatasi resistensi Candida.

1.2. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.3. Kerangka Konsep

Keterangan:

Mekanisme pengaturan protein-fungsional selain oleh genetik juga oleh faktor epigenetik. Mekanisme epigenetik melibatkan enzim Histon Asetil Transferase (HAT) dan Histon Deacetilase (HDAC). HAT menyebabkan aktivasi dan deasetilasi menyebabkan silencing gen Rtt109. Gen ini akan mengatur repair DNA. Kurkumin adalah inhibitor HAT Rtt109 sehingga repair DNA dari *Candida* yang resisten Fluconazole dapat terganggu. Pada akhirnya Kurkumin akan meningkatkan inhibisi *Candida* (IC_{50} rendah), Apoptosis meningkat, dan gen resisten menurun.



1.3. Hipotesis Penelitian

1.3.1. Hipotesis Umum Penelitian

- 1) Terdapat efek sinergistik Kurkumin dengan Fluconazole menghambat pertumbuhan *C. albicans* strain resisten Fluconazole
- 2) Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Fluconazole menghambat ekspresi *drug efflux transporter* (Cdr1p) *C. albicans* strain resisten Fluconazole melalui hambatan epigenetik HAT-Rtt109
- 3) Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Fluconazole menyebabkan metilasi CDR1 dan Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole

1.3.2. Hipotesis Khusus Penelitian

- 1) Terdapat efek sinergistik Kurkumin dengan Fluconazole menghambat pertumbuhan koloni *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
- 2) Terdapat efek sinergistik Kurkumin dengan Fluconazole menurunkan jumlah sel *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
- 3) Kurkumin dan kombinasi Kurkumin dengan Fluconazole menghambat ekspresi Cdr1p pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
- 4) Kurkumin dan kombinasi Kurkumin dengan Fluconazole menghambat ekspresi HAT-Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
- 5) Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Fluconazole menyebabkan metilasi CDR1 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
- 6) Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Fluconazole menyebabkan metilasi Rtt109 pada *C. albicans* strain resisten Fluconazole.

pemberian a) Fluconazole, b) Kurkumin c) dan kombinasi Fluconazole + Kurkumin pada kultur *C. albicans* strain Resisten Fluconazole.

4.1.1. Penelitian tahap I

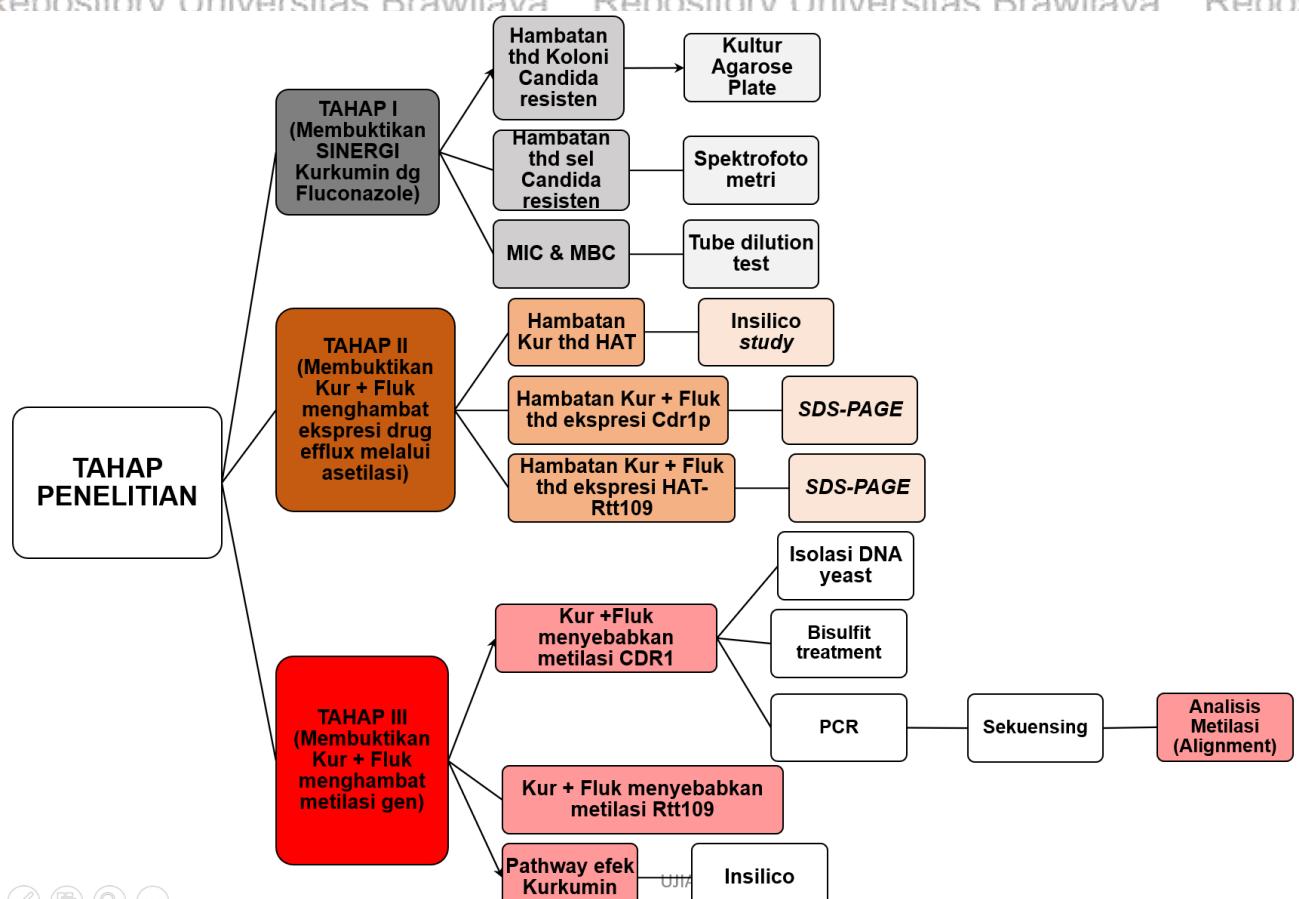
Tahap penelitian merupakan uji sinergisme Kurkumin + Fluconazole dengan melakukan analisa kualitatif dan kuantitatif perbandingan berbagai kelompok perlakuan. Tahap ini dilakukan evaluasi hambatan pertumbuhan koloni *Candida* dan identifikasi sel *Candida* pada kultur agarose plate secara kualitatif, serta hambatan pada pertumbuhan sel *Candida* resisten secara kuantitatif dengan spektrofotometer. Pada tahap ini dilakukan pula penghitungan MIC dan MBC berbagai perlakuan terhadap *C. albicans* strain Resisten Fluconazole dengan menggunakan *Tube Dilution Test*.

4.1.2. Penelitian tahap II

Tahap II penelitian merupakan tahap uji insilico efek Kurkumin terhadap epigenetik (Histon Acetyl Transferase (HAT)). Uji insilico ini menggunakan data dari NCBI dan menggunakan software PASS untuk mengetahui potensi Kurkumin terhadap Histon Acetyl Transferase (HAT). Tahap II penelitian juga bertujuan untuk mengetahui efek berbagai perlakuan terhadap ekspresi Cdr1p dan HAT-Rtt109 pada *C. albicans* strain Resisten Fluconazole.

4.1.3. Penelitian tahap III

Tahap III penelitian bertujuan untuk mengetahui efek berbagai perlakuan terhadap metilasi DNA. DNA yang diuji terjadinya metilasi adalah CDR1 dan Rtt109 dengan target area promotor dengan menggunakan construct primer. DNA *Candida* diisolasi dengan menggunakan KIT untuk yeast dilanjutkan dengan uji metilasi dengan menggunakan bisulfite treatment. Hasil isolasi kemudian dilakukan



Gambar 4.1. Bagan Alur Penelitian

5.1. Pendahuluan

Pemaparan antifungal pada *C. albicans* akan menginduksi respon

stress yang tergantung pada dosis dan sifat antifungal. Untuk obat fungisidal,

pada konsentrasi diatas *minimum growth-inhibitory concentration* (MIC),

respon ini menyebabkan kematian sel. Untuk obat fungistatik, seperti

misalnya azole, MIC menyebabkan sel terhambat tapi tidak terbunuh

(Sanglard *et al.*, 2003; Ghonnum & Rice, 1999; Cannon *et al.*, 2009). Hal inilah

yang menyebabkan tingginya resistensi Flukonazole meskipun menjadi terapi

standard pada infeksi Candida, terlebih seringnya inadequat dosis karena

menghindari efek toksik Flukonazole. Sangat penting menemukan strategi terapi

yang baru (*novel therapeutic*) untuk melawan resistensi ini.

Memerangi infeksi *Candida*, khususnya yang disebabkan oleh strain

yang resisten menjadi sebuah tantangan besar bagi ilmuwan. Terlebih lagi

Candida resisten banyak ditemukan pada pasien HIV yang telah memiliki

perblema kesehatan kompleks dengan infeksi HIV tersebut. Suatu studi

menunjukkan bahwa resistensi azole terjadi hingga sepertiga isolat *C. albicans*

oral yang diperoleh dari pasien positif-HIV (White, *et al.*, 2002). Studi Maenza

et al. (1995) menunjukkan bahwa resistensi fluconazole berhubungan dengan

episode pengobatan HIV yang panjang, sel CD4 yang lebih rendah, durasi

penggunaan fluconazole yang lebih panjang dan penggunaan terapi sistemik

(Hamzah *et al.*, 2008).

BAB V

PENELITIAN TAHAP I

Resistensi antifungal memiliki empat mekanisme, antara lain: 1) Perubahan metabolisme obat, 2) Mutasi pada gen pengode target protein, 3) Pencegahan masuknya obat, dan 4) Pengeluaran obat dari sel melalui peningkatan ekspresi pompa pengeluaran obat (*multidrug efflux pumps*). *Candida* memiliki mekanisme resistensi dengan meningkatkan ekspresi pompa eliminasi obat (Martinez & Falson, 2005; White et al., 1999; Casalinoovo, 2004; Cannon et al., 2009). Studi menggunakan obat berlabel radioaktif seperti misalnya fluconazole menunjukkan bahwa isolat resisten seringkali mengakumulasikan lebih sedikit obat dalam sel *Candida* jika dibandingkan isolat yang sensitif. Isolat klinis yang resisten terhadap satu azole seringkali *cross-resistant* terhadap obat azole lain. Overexpression dari gen CDR adalah sebuah mekanisme umum resistensi, dan tampaknya gen-gen CDR memiliki sebuah sel yang resisten terhadap banyak azole yang berbeda (White et al., 1998; Bruno & Mitchell, 2005).

Kurkumin memiliki efek antifungal. Ekstrak metanol dari kunyit menunjukkan aktivitas antifungal terhadap *Candida albicans* dengan nilai MIC 256 µg/mL (Moghadamousi et al., 2014). *Candida albicans* adalah spesies yang paling rentan terhadap Kurkumin diantara spesies *Candida* yang dipelajari (Martins et al., 2009). Kerja Kurkumin mengganggu integitas dinding sel *Candida albicans*. Studi Kumar (2014) menunjukkan bahwa Kurkumin memiliki target kerja gen-gen yang terlibat dalam integritas dinding sel. Diantara 348 gen sel fungi yang dipengaruhi kurkumin, 51 akan *upregulated* dan 297 akan *downregulated*.

Kurkumin diduga memiliki peran terhadap resistensi antifungal pada *C. albicans*. Studi tentang Kurkumin menunjukkan bahwa kurkumin menurunkan secara signifikan level ergosterol pada *C. albicans*. Kurkumin menunjukkan sinergi dengan fluconazole dalam menurunkan ergosterol ini (Sharma et al., 2012).

Kurkuminoid telah dilaporkan dapat membalikkan fenotipe resistensi obat pada sel kanker yang mengalami *overexpressing ABC transporters* (Gottesman *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2009).

Banyak upaya telah dilakukan untuk merancang sebuah *treatment* untuk isolasi resistensi azole, diantaranya: (i) mencari agen antifungal baru, (ii) mengembangkan formulasi baru dan (iii) meningkatkan efikasi agen antifungal menggunakan terapi kombinasi (Weig & Müller, 2001; Nishi *et al.*, 2009). Menemukan agen baru menjadi sangat kompleks karena harus memiliki efektivitas lebih baik dari terapi standard saat ini, yakni Flukonazole. Treatment (iii) merupakan alternatif yang penulis usulkan pada penelitian ini. Studi tentang terapi kombinasi melawan *Candida* belum terlalu ekstensif, diantaranya adalah sinergi Azole dengan Amiodarone dan sinergi Azole dengan Curcumin tetapi hanya pada pertumbuhan koloni *Candida* yang bukan strain resisten. Oleh karena itu, perlu penelitian intensif mengenai potensi Kurkumin melawan resistensi tersebut, baik sebagai agen tunggal maupun agen kombinasi dengan terapi standard antifungal saat ini. Kurkumin menjadi suatu alternatif pilihan *novel therapy* yang berkembang saat ini karena kurkumin sudah banyak digunakan masyarakat luas sejak jaman kuno hingga sekarang. Masyarakat sudah familier dan mengenal bahan herbal ini (Moghadamousi *et al.*, 2014). Harapannya penggunaan kurkumin sebagai terapi kombinasi antifungal baru melawan resistensi yang efektif akan diterima di masyarakat.

5.2. Perumusan Masalah

5.2.1. Masalah Umum

Apakah Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menghambat *C. albicans*

5.2.2. Masalah Khusus

Berikut ini adalah masalah khusus pada penelitian tahap I:

1. Apakah Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menghambat pertumbuhan koloni *C. albicans* strain resisten Fluconazole?

2. Apakah Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menurunkan jumlah sel *C. albicans* strain resisten Fluconazole?

3. Berapa dosis MIC (*Minimal Inhibition Concentration*) dan MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) Fluconazole, Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Fluconazole terhadap *C. albicans* strain resisten Fluconazole?

5.3. Tujuan Penelitian

5.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan bahwa Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menghambat *C. albicans* strain resisten Fluconazole.

5.3.2. Tujuan Khusus

Berikut ini adalah tujuan khusus penelitian tahap I:

1. Membuktikan bahwa Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menghambat pertumbuhan koloni *C. albicans* strain resisten Fluconazole.

2. Membuktikan bahwa Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menurunkan jumlah sel *C. albicans* strain resisten Fluconazole.

3. Menentukan dosis MIC (*Minimal Inhibition Concentration*) dan MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) Flukonazole, Kurkumin dan kombinasi

Kurkumin + Fluconazole terhadap *C. albicans* strain resisten Fluconazole

5.4. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2017 s/d Maret 2017 di

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Kultur sel Candida strain resisten Fluconazole : hasil pembiakan dari Laboratorium

Mikrobiologi FK UI yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi FK UI pada bulan

Desember 2016.

5.5. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

5.5.1. Variabel Penelitian

Variabel penelitian tahap I ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas adalah kelompok : 1) Fluconazole, 2) Kurkumin dan 3)

Kombinasi Kurkumin + Fluconazole.

2. Variabel Tidak Bebas (*Dependent*)

Variabel tidak bebas dalam penelitian ini adalah koloni Candida resisten,

jumlah sel Candida resisten, MIC dan MBC.

5.5.2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Penilaian
1.	Kelompok perlakuan	Pemberian perlakuan dengan dosis bertingkat pada kultur <i>Candida albicans</i> strain resisten Fluconazole	berbagai dengan kultur	-	Kelompok Fluconazole, Kurkumin & Kombinasi Kurkumin+ Fluconazole
2.	Pertumbuhan koloni Candida resisten	Pertumbuhan Candida resisten pada kultur agarose plate setelah dilakukan streaking dan diinkubasi 24 jam	Visual	Ordinal	Analisa kualitatif Pertumbuhan Colony Candida

3. Pertumbuhan sel Candida resisten pada agarose plate

4. MIC Konsentrasi minimum hambat visual rasio Sel Candida/ml Dosis dimana kekeruhan pada tube test mulai jernih

5. MBC Konsentrasi minimum bunuh visual rasio Sel Candida/ml Dosis dimana kekeruhan pada tube test paling jernih

5.6 Materi Penelitian

Berikut ini adalah materi penelitian:

- Kultur Candida strain resisten Fluconazole: hasil pembiakan dari Laboratorium Mikrobiologi FK UI
- Spesimen dikumpulkan dari mukosa buccal pasien HIV/AIDS di bangsal Interne RS Cipto Mangunkusumo
- Material Transfer Agreement (MTA) dibuat dalam hal pengaturan penggunaan spesimen dari Laboratorium Mikrobiologi FK UI
- Kurkumin
- ✓ Purity >97 % Produksi TCI
- ✓ Makroskopis: bubuk kuning halus
- ✓ Bahan aktif Curcumin, Curcuma longa L.



- Fluconazole
- ✓ Purity >98 %
- ✓ Produksi TCI
- ✓ Makroskopis: bubuk
- ✓ PubChem SID 8756
- ✓ Merc Index (14) 412
- ✓ MF/M.W. C₁₇H₁₂F₂N

5.7. Metode Eksperimen

5.7.1. Perlakuan terhadap Specimen Candida Resisten

Berikut ini adalah perlakuan terhadap spesimen *Candida* resisten yang

diambil dari Laboratorium Mikrobiologi FK UI:

Spesimen asal dilakukan peremajaan dengan menumbuhkannya kembali dalam kultur baru setelah 24 jam. Candida yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil dari sub kultur specimen asal dari FK UI.

2 Hari ke-3 Spektrofotometer Candida (10^4) + dosis UV

2. Hari ke-2 Spektrofotometer Candida (10^4) + dosis uji.

Hasil sub kultur kemudian dilakukan pengenceran dan dihitung dengan spektrofotometer sehingga didapatkan berjumlah 10^4 sel Candida. Hasil ini yang kemudian akan diberikan dosis uji untuk dilakukan *Tube Dillution Test*,

dilakukan streaking pada agar plate dan diinkubasikan kembali 48 jam melihat pertumbuhan sel *Candida* dengan spektrofotometer.

melihat pertumbuhan sel Candida dengan spektrofotometer.

3 Hari ke-3 Tube dilution test





Tube dilution test dilakukan dengan menggunakan metode NCCLS untuk mendapatkan dosis MIC dan MBC berbagai kelompok perlakuan.

4. Hari ke-4 Evaluasi jumlah sel Candida resisten. Penghitungan dengan menggunakan spektrofotometer

5.7.2. Kultur Candida

Suspensi 65 g medium kultur ke dalam 1 L air terdestilasi. Dipanaskan hingga mendidih untuk melarutkan seluruh bahan. Autoclav selama 15 menit pada suhu 121°C. Ditaburkan 25-30 mL medium agar pada plate steril dan dimasukkan dalam laminar flow chambre. Streak Candida dari broth cultures pada agar plate dan inkubasi pada 30°C (Gibco/Invitrogen Corp., Auckland, New Zealand).

5.7.3. Tube Dillution Test

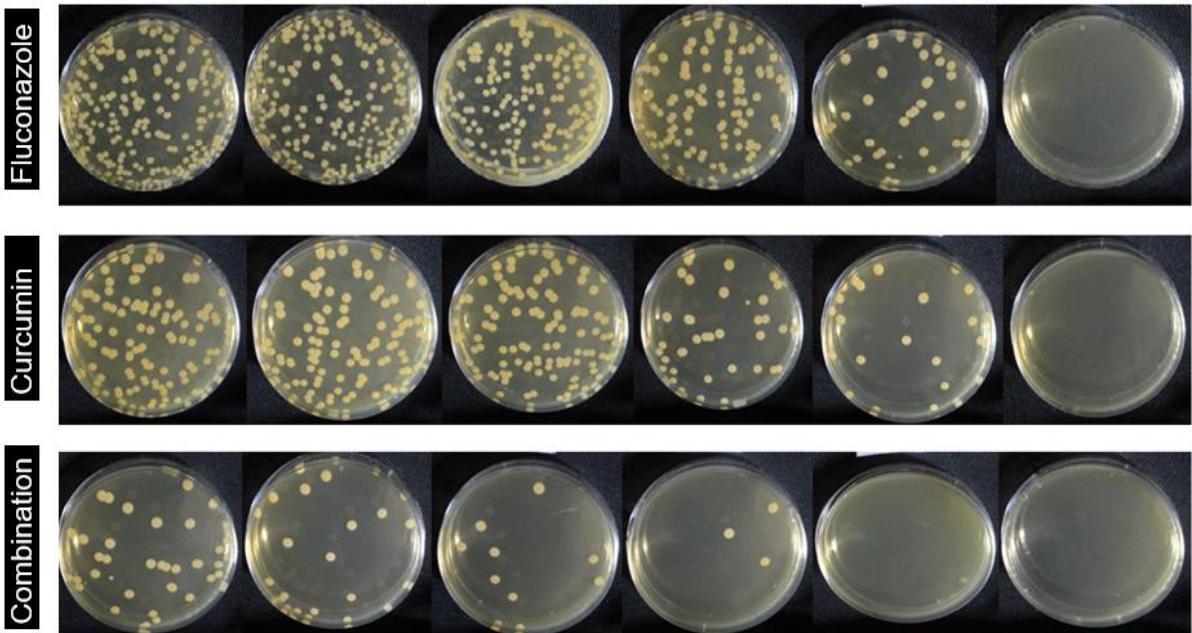
Berikut ini adalah Tube Dilution test dengan menggunakan NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN: 1-56238-469-4):

- Synthetic Medium: Menggunakan RPMI 1640 (dengan glutamine, tanpa bicarbonate, dan dengan phenol red sebagai pH indicator).
- Buffers: Media di-buffer menjadi pH of 7.0 pada 25 °C. Buffer bukanlah antagonis agen antifungal seperti phosphate buffer. pH dicek dengan pH meter segera setelah medium disiapkan yaitu antara 6.9 dan 7.1 pada suhu ruangan (25 °C).
- Persiapan dilusi agen Antifungal: (1) Menggunakan sterile, 12- x 75-mm plastic test tubes, (2) Menggunakan growth control tube yang mengandung medium RPMI 1640, (3) Tutup tube dengan tutup berulir plastic. Dilusi adalah 1:10.

- **Persiapan Inokulasi:** Candida harus dilakukan sub kultur dari vial steril pada Sabouraud dextrose agar untuk menjamin viabilitas dan kemurnian. Temperatur inubasi 35°C . Inokulum disiapkan dengan mengambil lima koloni dengan diameter ~ 1 mm dari kultur 24 jam. Koloni dilarutkan dalam 5 mL steril 0.145-mol/L saline (8.5 g/L NaCl; 0.85% saline). Hasil suspensi dilakukan vortex 15 detik dan densitas sel disesuaikan dengan spectrophotometer dengan menambahkan sterile saline untuk meningkatkan transmittance sesuai 0.5 McFarland standard pada gelombang 530 nm. Stock suspension ini menghasilkan $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ cells per mL. Suspensi kerja dibuat dengan dilusi 1:100 diikuti dilusi 1:20 dengan RPMI 1640 yang menghasilkan $5.0 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3$ cells per mL.
- **Inokulasi RPMI-1640 Medium:** 0.1 mL bahan uji dimasukkan dalam tube 12- x 75-mm. 0.9 mL inokulum yang sesuai ditambahkan sehingga konsentrasi bahan uji menjadi 1:10.
- **Inkubasi:** Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.
- **Pembacaan hasil:** Pertumbuhan Candida dalam tube bahan uji dibandingkan secara visual.

5.8. Hasil Penelitian

Hasil penelitian pada tahap I terdiri dari hasil streaking Candida resisten pada agar plate, penghitungan sel Candida resisten pada berbagai dosis uji dan MIC serta MBC pada berbagai kelompok perlakuan (Flukonazole, Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Flukmonazole). Berikut ini adalah hasil penelitian tahap I:



Gambar 5.1. Efek Sinergis Kurkumin dengan Flukonazole terhadap Hambatan Koloni *C. albicans* fluconazole-resistant strain

Keterangan:

Pemberian Fluconazole dosis bertingkat pada medium kultur *Sabouraud agar plate* *C. albicans* menunjukkan pertumbuhan koloni Candida yang sangat padat. Pemberian Kurkumin dosis bertingkat juga menunjukkan pertumbuhan koloni yang sangat padat dan padat. Pemberian dosis kombinasi Kurkumin dan Fuconazole menunjukkan pertumbuhan koloni yang signifikan menurun (Jarang). Dosis Flukonazole: 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 (ug/ml). Dosis Kurkumin: 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 (ug/ml). Dosis Kombinasi: 6,25 F +12,5 K; 12,5 F + 25 K; 25 F + 50 K; 50 F + 100 K; 100 F + 200 K; 200 F + 400 K. F= Flukonazole, K=Kurkumin.

Berikut adalah tabel hasil penghitungan sel Candida resisten pada berbagai kelompok perlakuan dengan dosis bertingkat menggunakan analisis ANOVA:

Tabel 5.1. Efek Sinergis Kurkumin dengan FLukonazole terhadap Hambatan Sel *C. albicans* fluconazole-resistant strain

GROUPS	DOSE ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cells/ml \pm SD (10^3)	p
Fluconazole	0	300,00 \pm 0,00	0,000
	6,25	130,25 \pm 9,71	
	12,5	121,50 \pm 10,25	
	25	105,50 \pm 18,69	
	50	99,00 \pm 2,83	
	100	0,75 \pm 0,5	
	200	0,00 \pm 0,00	
Curcumin	0	300,00 \pm 0,00	0,000
	12,5	236,75 \pm 7,68	
	25	174,50 \pm 12,58	
	50	155,25 \pm 11,95	
	100	14,50 \pm 4,12	
	200	3,00 \pm 0,82	
	400	0,00 \pm 0,00	
Fluconazole + Curcumin	0	300,00 \pm 0,00	0,000
	6,25 + 12,5	33,00 \pm 8,29	
	12,5 + 25	26,75 \pm 3,86	
	25 + 50	12,25 \pm 2,22	
	50 + 100	3,50 \pm 1,00	
	100 + 200	0,00 \pm 0,00	
	200 + 400	0,00 \pm 0,00	

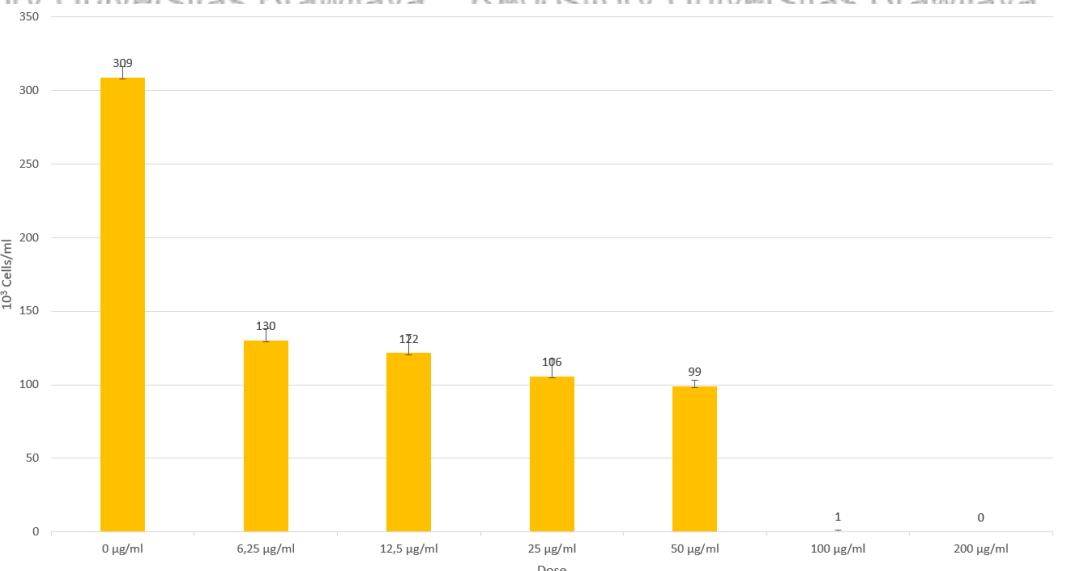
Keterangan:

Tabel menunjukkan dose dependent *Candida* growth diantara berbagai kelompok perlakuan (Flukonazole, Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Flukonazole). Penghitungan sel Candida resisten dengan menggunakan spektrofotometri. Perlakuan dilakukan empat kali, nilai sel Candida merupakan means \pm standard deviasi.

Berdasarkan Tabel 5.1 di atas, peningkatan dosis uji Flukonazol akan menurunkan sel Candida resisten (Dosis 6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Flukonazol menghasilkan sel Candida resisten $1,3 \cdot 10^5$, dst). Peningkatan dosis uji Kurkumin dan kombinasi Flukonazol dan Kurkumin juga memberikan hasil yang sama, yakni penurunan Candida

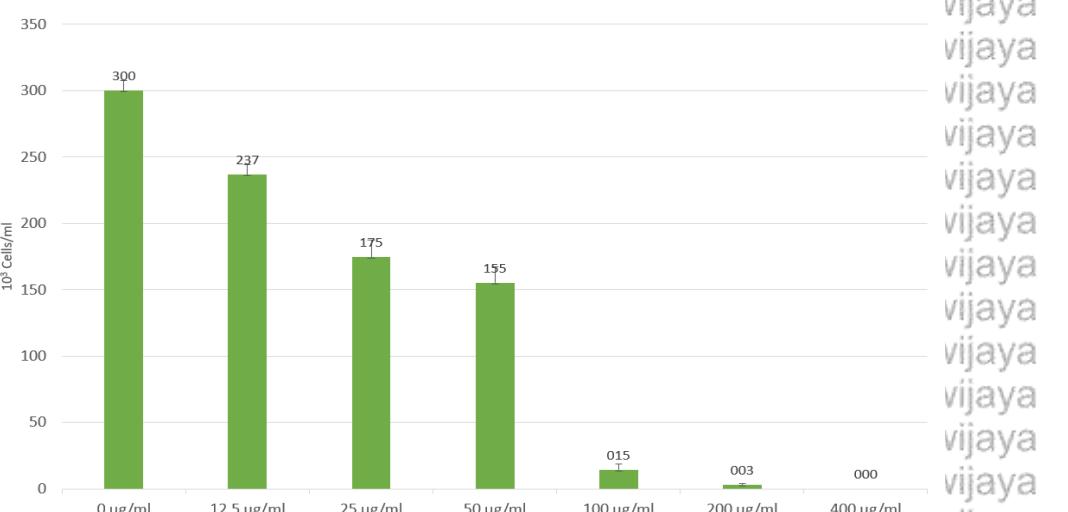
resisten (Dosis 12,5 ug/ml Kurkumin menghasilkan $2,3 \cdot 10^5$ Candida resisten, dosis 25 ug/ml Kurkumin menghasilkan $1,7 \cdot 10^5$ Candida resisten, dst serta kombinasi dosis 0,62 ug/ml Flukonazol + dosis 12,5 ug/ml Kurkumin menghasilkan $3,3 \cdot 10^4$ Candida resisten, dst). Penurunan Candida resisten paling signifikan terjadi pada kombinasi Flukonazol dan Kurkumin (Kombinasi dosis 6,25 ug/ml Flukonazol + dosis 12,5 ug/ml Kurkumin menghasilkan $3,3 \cdot 10^4$ Candida resisten, dst). Bahkan pada peng gabungan kedua agen ini menyebabkan pertumbuhan koloni Candida tidak terjadi sama sekali pada dosis uji tingkat ke-5 (Dosis Flukonazol 100 ug/ml + dosis Kurkumin 200 ug/ml). Pada dosis yang sama bila diberikan terpisah, Kurkumin (Dosis Kurkumin 200 ug/ml) maupun Flukonazol (Dosis Flukonazol 100 ug/ml) masih memberikan hasil pertumbuhan Candida resisten yang cukup besar bila dibandingkan kombinasi Flukonazol dan Kurkumin. Pada tabel di atas Nampak bahwa penurunan Candida resisten terbesar terjadi pada kelompok Kombinasi Flukonazol dan Kurkumin.

Berikut adalah *dose dependent* inhibisi pertumbuhan Candida resisten pada pemberian Flukonazole, Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Flukonazole:



Gambar 5.2. Efek Hambatan Flukonazole terhadap Pertumbuhan *C. albicans* fluconazole-resistant strain

Pada grafik di atas nampak bahwa peningkatan dosis uji Flukonazol akan menurunkan sel Candida resistan. Dosis 6,25 µg/ml Flukonazol menghasilkan sel Candida resistan $1,3 \cdot 10^5$, dosis 12,5 µg/ml Flukonazol menghasilkan sel Candida resistan $1,2 \cdot 10^5$, dst.

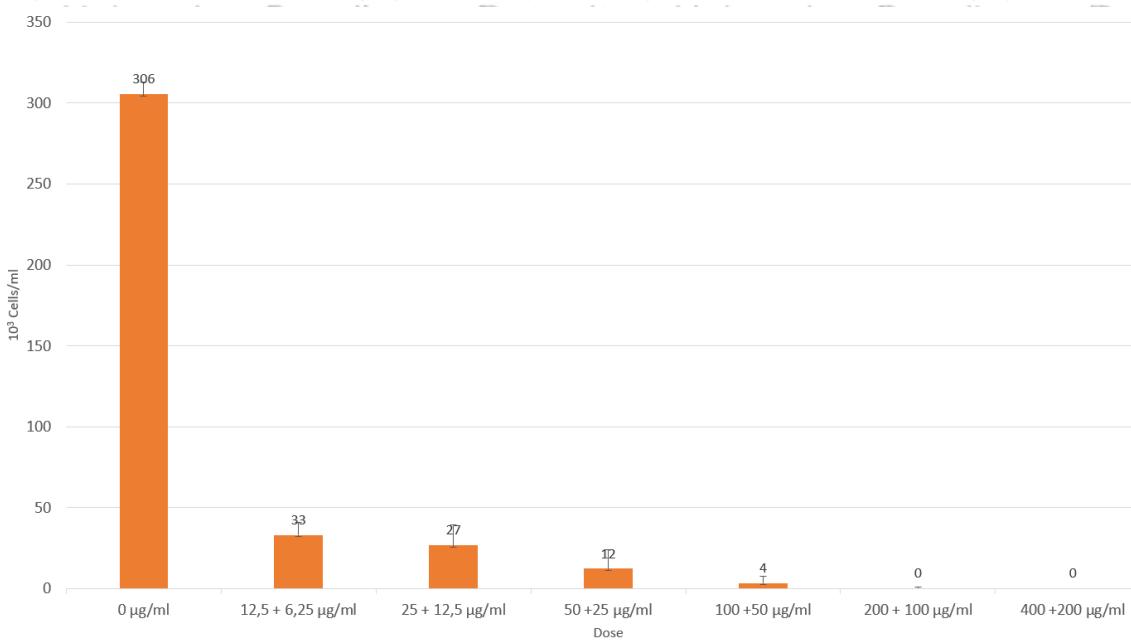


Gambar 5.3. Efek Hambatan Kurkumin terhadap Pertumbuhan *C. albicans* fluconazole-resistant strain



Pada grafik di atas nampak bahwa peningkatan dosis uji Kurkumin akan menurunkan *Candida* resisten. Dosis $12,5 \text{ ug/ml}$ Kurkumin menghasilkan $2,3 \cdot 10^5$

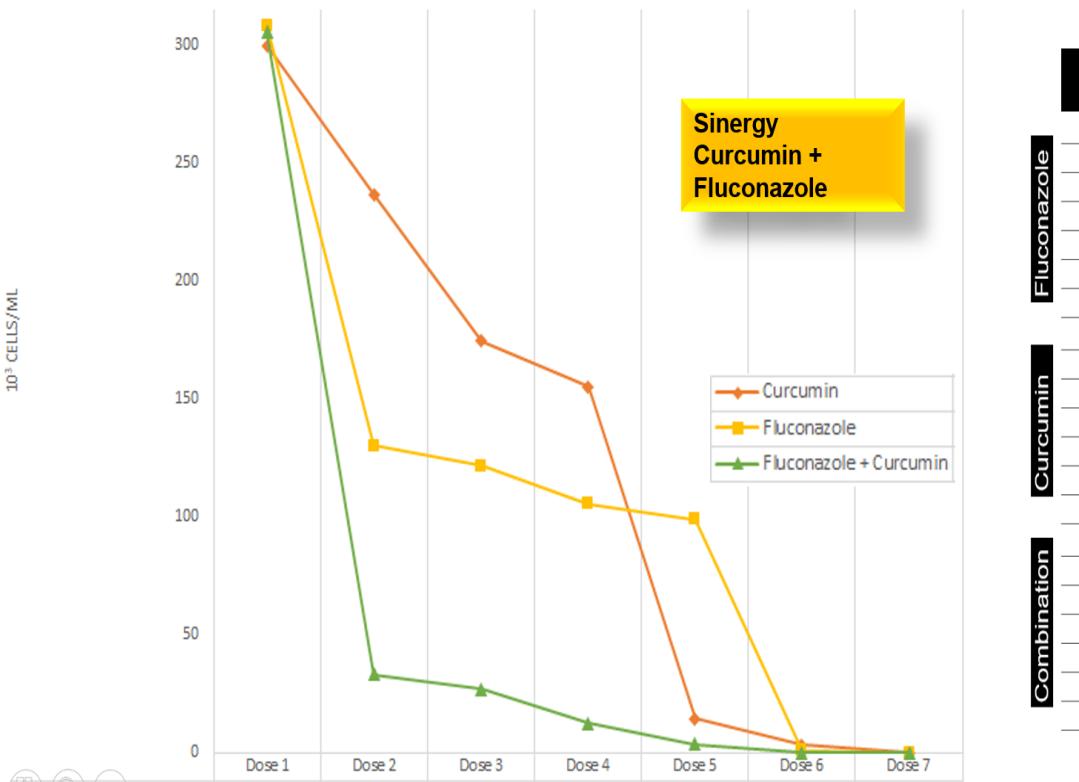
Candida resisten, dosis 25 ug/ml Kurkumin menghasilkan $1,7 \cdot 10^5$ *Candida* resisten, dst.



Gambar 5.4. Efek Sinergis Flukonazole dengan Kurkumin terhadap Pertumbuhan *C. albicans* fluconazole-resistant strain

Penurunan *Candida* resisten paling signifikan terjadi pada kombinasi Flukonazol dan Kurkumin. Kombinasi dosis $6,25 \text{ ug/ml}$ Flukonazol + dosis $12,5 \text{ ug/ml}$ Kurkumin menghasilkan $3,3 \cdot 10^4$ *Candida* resisten, dst.

Berikut ini adalah gambar grafik perbandingan efek Flukonazole, Kurkumin dan kombinasi terhadap Pertumbuhan *C. albicans* fluconazole-resistant strain:



Gambar 5.5. Perbandingan Efek Flukonazole, Kurkumin dan kombinasi terhadap Pertumbuhan *C. albicans* fluconazole-resistant strain

GROUPS	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*	MBC ($\mu\text{g/ml}$)*
Fluconazole	100	200
Curcumin	100	400
Fluconazole + Curcumin	6,25 + 12,5	100 + 200

*MIC (Minimal Inhibition Concentration) and MBC (Minimal Bactericidal Concentration). Method used to obtain MIC and MBC was Tube Dilution Test using CLSI standard.

Pada tabel hasil *Tube Dilution Test* di atas, nampak bahwa MIC Flukonazol

100 $\mu\text{g/ml}$ dan MIC Kurkumin 100 $\mu\text{g/ml}$. MIC kombinasi jauh lebih rendah

dibandingkan MIC Flukonazol sendiri maupun MIC Kurkumin sendiri, yakni 6,25

$\mu\text{g/ml}$ Kurkumin dan 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Flukonazol. Demikian pula dosis MBC, kombinasi

Flukonazol dan Kurkumin menghasilkan MBC lebih rendah bila dibandingkan MBC

Flukonazol sendiri maupun MBC Kurkumin sendiri. Dosis MIC di atas merupakan

dosis yang digunakan sebagai dosis perlakuan pada tahap ke-2 dan tahap ke-3

penelitian.

5.9. Pembahasan

Pengambilan Sampel C. albicans Strain Resisten dari Isolat Oropharyng

Pasien HIV

Penelitian ini menggunakan *Candida albicans* strain resisten yang diambil

dari isolate oropharyng pasien *human immunodeficiency virus* (HIV) RSU

Ciptomangunkusumo. Pemilihan pengambilan isolate dari pasien HIV ini

didasarkan atas resistensi Canda sering terjadi pada pasien dengan penurunan imunitas. Candidiasis merupakan infeksi oportunistik, dimana *Candida albicans* merupakan normal flora dan akan terjadi overgrowth bila imunitas menurun.

Candidiasis adalah suatu kondisi umum yang biasanya dapat diobati dengan mudah pada orang-orang yang tidak mengalami penurunan imunitas. Pada

lingkungan normal, *Candida albicans* hidup pada 80% dari populasi manusia tanpa efek merugikan, namun bila terdapat pertumbuhan berlebihan, menjadi penyebab

penyakit Candidiasis (Brooklyn & Omston, 1996). Pertumbuhan berlebihan dapat terjadi pada pasien dengan imunitas rendah seperti HIV. Infeksi jamur (termasuk

Candida) menjadi penyebab utama kesakitan dan kematian pada pasien dengan daya tahan tubuh yang rendah (misalnya HIV/AIDS). Banyak pasien yang

terinfeksi HIV menerima terapi antifungal azole (termasuk fluconazole) dosis rendah yang berjangka panjang, yang memangsang stress respon *Candida* sehingga menginduksi isolat *C. albicans* resisten azole (termasuk fluconazole).

Pemaparan berulang pada pasien recurrent, yang sering terjadi pada pasien HIV, mempengaruhi perubahan spesies *Candida*. Perubahan ini bisa berupa

perubahan molekuler membran *Candida* (mutasi ERG11) maupun perubahan transporter drug efflux (overexpressed). Peningkatan dosis tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai solusi jangka Panjang dikarenakan efek toksik

Flukonazole pada dosis tinggi, oleh karena itu suatu novel therapy sangat diperlukan untuk mengatasi resistensi Fluconazole pada pasien HIV ini.

Suatu studi menunjukkan bahwa resistensi azole terjadi hingga sepertiga isolat *C. albicans* oral yang diperoleh dari pasien positif-HIV (White, et al., 2002). Studi lain menunjukkan bahwa oropharyngeal candidiasis terjadi pada

hingga 90% lama perjalanan penyakit HIV. Insidensi oropharyngeal candidiasis

berhubungan dengan CD4-T-lymphocyte dibawah 200 sel/mm^3 , viral load yang tinggi dan perjalanan lanjut penyakit. Studi Maenza *et al.* (1995) menunjukkan bahwa resistensi fluconazole berhubungan dengan episode pengobatan yang lebih banyak, sel CD4 yang lebih rendah, durasi penggunaan fluconazole yang lebih panjang dan penggunaan terapi sistemik. Penggunaan *highly active antiretroviral therapy* (HAART) menghasilkan supresi replikasi viral dan CD4 T-lymphocyte sehingga menurunkan oropharyngeal candidiasis. Namun demikian, oropharyngeal candidiasis masih sangat berhubungan dengan pasien HIV (Hamzah *et al.*, 2008).

Hambatan Pertumbuhan *Candida albicans* Strain Resisten Fluconazole pada Pemberian Flukonazole, Kurkumin dan Kombinasi Flukonazole + Kurkumin dengan Dosis Bertingkat

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Flukonazol, Kurkumin dan kombinasi Flukonazole + Kurkumin menghambat pertumbuhan *C. albicans* strain resisten Fluconazole seiring dengan meningkatnya dosis uji. Dosis Fluconazole yang diberikan yang dapat menyebabkan pertumbuhan *Candida* terhambat haruslah dosis tinggi. Hal ini disebabkan karena strain yang digunakan merupakan strain resisten Flukonazole dengan MIC hasil pengujian Laboratorium Mikrobiologi - Universitas Indonesia adalah $\text{MIC} > 64 \text{ ug/ml}$. Meskipun Flukonazole dosis tinggi mampu menghambat pertumbuhan *Candida* strain resisten Flukonazole, namun dosis tersebut sulit diaplikasikan pada pasien karena efek samping dan efek toksisitasnya yang sangat tinggi. Oleh karena itu perlu *novell therapy* untuk mengatasi *Candida* resisten ini.

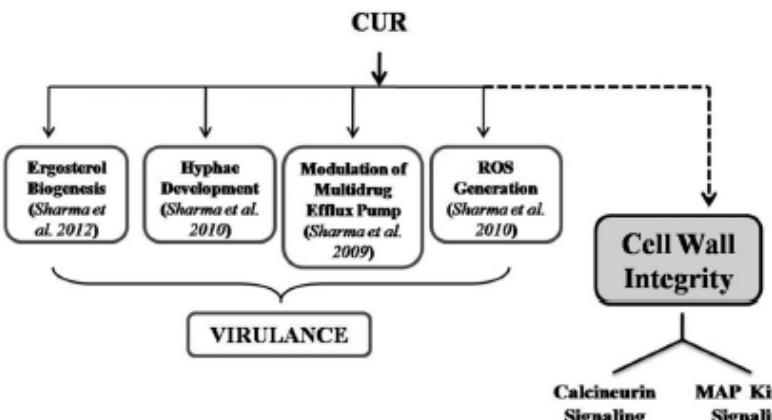
Azole adalah agen antifungal yang dikategorikan menjadi imidazole dan triazole. Fluconazole dan itraconazole adalah senyawa triazole yang mengandung sebuah nitrogen tambahan di dalam cincin. Antifungal lain dari generasi baru seperti misalnya posaconazole, ravuconazole dan voriconazole, juga termasuk ke dalam triazole. Efek samping fluconazole sangat banyak, misalnya: nausea, sakit kepala, ruam kulit, sakit di perut, muntah dan diare, hepatotoksitas, jarang dilaporkan. Fluconazole diberikan untuk pasien yang memiliki resiko tinggi candidemia, misalnya pada individu dengan kekebalan tubuh yang rendah seperti neutropenic, pasien terinfeksi HIV dan resipien transplantasi (Horne & Holomon, 1997; Syndman, 2003; Casalinoovo, 2004).

Perkembangan resistensi obat antimikroba bukanlah sebuah fenomena baru. Mikroorganisme akan berespon terhadap stres lingkungan (Wright, 2007). Pemaparan terhadap obat antifungal bagi *C. albicans* merupakan stres lingkungan yang menstimulasi respon-respon untuk menghilangkan efek merugikan dari obat dan memungkinkan kelanjutan pertumbuhan. Stres antifungal melalui *signaling pathway* akan menginduksi respon stress dan mempengaruhi virulensi fungal (Cannon et al., 2007) termasuk mekanisme resistensi yang dikembangkan *Candida albicans* strain resisten Fluconazole ini.

Kurkumin pada penelitian ini difokuskan pada kemampuannya mengatasi resistensi *Candida*. Namun demikian, Kurkumin sendiri memiliki kemampuan sebagai antifungal. Hal inilah yang menjelaskan hasil penelitian bahwa Kurkumin juga menghambat pertumbuhan *Candida* strain resisten Flukonazole. Banyak mekanisme kerja Kurkumin sebagai agen antifungal. Kurkumin menunjukkan

aktivitas antifungal melawan fungi patogenik, termasuk *Candida albicans*. Mekanisme target kerja Kurkumin yang dilaporkan antara lain adalah: 1) Kurkumin menyebabkan kematian sel melalui *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menginduksi apoptosis, 2) Modulasi dari multidrug efflux pumps seperti CaCdr1p, CaCdr2p, CaMdr1p, and ScPdr5p serta 3) Gangguan metabolisme ergosterol yang merupakan komponen membran, 4) Kerja Kurkumin terhadap dinding sel *Candida albicans* melalui Calcineurin-mediated signal dan 5) Gangguan filamentasi atau perkembangan hifa. Ketiga target kerja pertama Kurkumin diatas merupakan jalur-jalur yang terlibat dalam terjadinya resistensi antifungal (Sharma et al., 2009; Kumar et al., 2014; Sharma & Praśad, 2011; Sharma et al., 2010; Prasad et al., 2011, Goe & Hube 2012, Hameed et al., 2011).

Berikut ini adalah gambar skema ringkasan target kerja Kurkumin melawan *Candida albicans*:



Gambar 5.6. Skema Target Kerja Kurkumin Melawan *Candida albicans*

Keterangan:

Target kerja Kurkumin melawan *C. albicans* antara lain: 1) Gangguan biogenesis ergosterol, 2) Gangguan filamentasi atau pertumbuhan hifa, 3) Gangguan modulasi pompa efflux obat, 4) Akumulasi ROS dan 5) Gangguan integritas dinding sel (Sharma et al., 2010)

Berbagai penelitian dikerahkan untuk mengetahui secara jelas mekanisme kerja kurkumin sebagai antifungal lainnya melawan *C. albicans*. Mekanisme tersebut antara lain: reduksi dalam sekresi proteinase dan perubahan dari *membrane-associated properties of ATPase activity*, gangguan integritas dinding sel melalui Calcineurin-Mediated Signalling (Kumar et al., 2014), kematian sel melalui reactive oxygen-species (ROS)-induced apoptosis (Sharma et al., 2010), gangguan morfologi permukaan sel, *hypersusceptibility* pada mutan calcineurin dan MAP kinase pathway (Kumar et al., 2014) dan mencegah pertumbuhan hifa melalui global repressor TUP1 (Sharma et al., 2010).

Kombinasi Flukonazole + Kurkumin merupakan hasil pengamatan yang paling menarik pada penelitian ini. Kombinasi Flukonazole + Kurkumin sangat signifikan menghambat pertumbuhan Candida strain resisten Flukonazole. Beberapa studi memang menunjukkan bahwa Flukonazole dan Kurkumin bersinergi dalam bekerja sebagai antifungal. Namun strain yang digunakan pada penelitian ini adalah strain resisten Flukonazole, sehingga sangat mungkin bahwa mekanisme penurunan signifikan pertumbuhan Candida strain resisten terutama berasal dari kemampuan Kurkumin memperbaiki masalah resistensi pada Candida strain resisten yang digunakan pada penelitian ini. Akibat kemampuan Kurkumin mengatasi masalah resistensi, maka Flukonazole dapat masuk ke dalam Candida dan bekerja sebagai antifungal yang efektif sebagaimana kerja Flukonazole saat masih belum terjadi mekanisme resistensi pada Candida.

Sinergi Kurkumin dan obat antifungal pernah diteliti sebelumnya. Sebuah kombinasi voriconazole dan terbinafine ditemukan sinergistik terhadap isolat *C. albicans* yang diperoleh dari pasien yang terinfeksi HIV (Weig & Muller, 2001; Nishi *et al.*, 2009). Banyak produk herbal seperti allicin, berberine, ekstrak benih jeruk besar dan lainnya dikenal memiliki properti antifungal sendiri atau berkombinasi dengan antifungal yang telah dikenal. Misal, allicin memiliki aktivitas inhibisi terhadap *C. albicans* dan *Aspergillus fumigatus*. Selain itu, allicin meningkatkan aktivitas antifungal AMB terhadap *C. albicans*. Kombinasi fluconazol dan allicin menunjukkan efek antifungal sinergistik in vivo dan in vitro yang bagus, dan terapi fluconazol/ allicin lebih bermanfaat dibandingkan dengan monoterapi fluconazol untuk membersihkan ginjal dari *Candida* (Guo *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2008). Tiga kurkuminoid murni yang diisolasi dari kurkumin alami menunjukkan aktivitas antifungal, CUR-I (diferuloylmethane), CUR-II (demethoxykurkumin) dan CUR-III (bisdemethoxykurkumin). Studi menunjukkan bahwa CUR-I murni, yang merupakan komponen utama kurkumin alami, dapat dieksplorasi lebih jauh berkombinasi dengan azole atau polyenes (Martins *et al.*, 2009).

Merangani infeksi *Candida*, khususnya yang disebabkan oleh strain yang resisten merupakan sebuah tantangan saat ini. Banyak upaya telah dilakukan, termasuk: (i) mencari agen antifungal baru, (ii) mengembangkan formulasi baru dan (iii) meningkatkan efikasi agen antifungal menggunakan terapi kombinasi. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar pengembangan terapi kombinasi Kurkumin dan Flukonazole bagi infeksi *Candida albicans*.

strain resisten Fluconazole yang sangat sulit pengobatannya hingga saat ini.

5.10. Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian tahap I sebagai berikut:

- 1) Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menghambat pertumbuhan koloni *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
- 2) Kurkumin bersinergi dengan Fluconazole menurunkan jumlah sel *C. albicans* strain resisten Fluconazole.
- 3) MIC (Minimal Inhibition Concentration) Fluconazole, Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Fluconazole terhadap *C. albicans* strain resisten Fluconazole masing-masing adalah: 100 ug/ml, 100 ug/ml dan 6,25 ug/ml (Flukonazole) + 12,5 ug/ml (Kurkumin). Sedangkan MBC (Minimal Bactericidal Concentration) masing-masing adalah: 200 ug/ml, 400 ug/ml dan 100 ug/ml (Flukonazole) + 200 ug/ml (Kurkumin).

5.11. Saran

Hasil penelitian di atas menunjukkan perlunya dilanjutkan tahap penelitian selanjutnya untuk mengetahui mekanisme Kurkumin mengatasi resistensi. Oleh karena itu, tahap II penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek Kurkumin terhadap ekspresi protein penyebab resistensi (*drug efflux transporter/Cdr1p*). Selain itu, tahap selanjutnya dari penelitian tahap I ini juga bertujuan untuk mengetahui efek Kurkumin terhadap faktor epigenetik ekspresi *drug efflux transporter* seperti asetilasi (Histon Acetyl Transferase/HAT) dan metilasi. HAT akan diteliti pada tahap II penelitian, sedangkan metilasi akan diteliti pada tahap III penelitian ini.

mempengaruhi ekspresi protein *drug efflux transporter*. Asetilasi histone menyebabkan ikatan histon dengan nukleosom menjadi longgar dan memungkinkan ikatan dengan faktor transkripsi. Proses ini akan memulai transkripsi gen resistensi seperti ERG11, CDR1, dll. Asetilasi adalah bagian esensial dari regulasi gen. Oleh karenanya, asetilasi histon oleh HAT akan mempengaruhi CDR1 sehingga meningkatkan *drug efflux transporter* seperti Cdrp1 yang kemudian menyebabkan resistensi Candida meningkat. Li *et al.* (2015) juga menunjukkan bahwa enzim asetilasi dan deasetilasi histon seperti Rpd3 sangat berperan dalam resistensi azole. Studi pffaler *et al.* (2009) menunjukkan bahwa suatu inhibitor asetilase histon MGCD290 juga mempengaruhi resistensi azole. Studi lain juga menunjukkan bahwa HAT sangat berkaitan dengan gen ERG11 yang juga menyebabkan resistensi (Edlind & Smith, 2002). Baru-baru ini ditemukan bahwa suatu enzim Histone Acetyl Transferase (HAT) Rtt109, enzim yang hanya ada dalam kingdom fungal, diperlukan untuk patogenitas fungal (Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Wurtele *et al.*, 2012). Tanpa Rtt109, fungal hipersensitif terhadap efek genotoksik dari Reactive Oxygen Species (ROS) yang dilepaskan oleh sel fagositik dari sistem imun mamalia, gangguan repair gen dan gangguan respon stress *drug efflux transporter*. HAT Rtt109 sepenuhnya bertanggung jawab untuk asetilasi histone H3 lysine 56 (H3K5) pada ragi (Han *et al.*, 2007a; Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2006; Xhemalce *et al.*, 2007; Lopes da Rosa *et al.*, 2010). Inhibisi HAT Rtt109 sangat mungkin mempengaruhi respon stress dan ekspresi transporter Cdrp1 sehingga akan menurunkan resistensi antifungal.

Suatu flavonoid (misalnya Kurkumin) diduga merupakan agen yang dapat menjadi inhibitor HAT (Balasubramanyam *et al.*, 2003; Balasubramanyam *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007; Mantelingu *et al.*, 2007; Marcu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Studi menunjukkan bahwa Kurkumin bersinergi dengan fluconazole dalam menurunkan ergosterol (Sharma *et al.*, 2012). Kurkuminoid telah dilaporkan dapat membalikkan fenotipe resistensi obat pada sel kanker yang mengalami overexpressing ABC transporters (Gottesman *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2009). Namun apakah Kurkumin menjadi inhibitor bagi HAT Rtt109 pada Candida dan apakah kemampuan inhibisi Kurkumin ini nantinya akan menurunkan transporter drug efflux Cdrp1 sehingga menyelesaikan permasalahan resistensi antifungal (Fluconazole) masih belum ada penelitian yang membuktikannya. Bila temuan ini terbukti maka dapat menjadi landasan untuk pengembangan Kurkumin selanjutnya dalam terapi Candida yang resisten Fluconazole.

6.2. Permasalahan Penelitian

6.2.1. Masalah Umum

Apakah sinergi Kukumin + Fluconazole menghambat ekspresi drug efflux transporter (Cdr1p) *C. albicans* strain resisten Fluconazole melalui hambatan epigenetik HAT-Rtt109?

6.2.2. Masalah Khusus

- 1) Bagaimana potensi hambatan Kurkumin terhadap epigenetik drug efflux transporter (Histon Acetyl Transferase/HAT) secara *insilico*?
- 2) Apakah sinergi Kukumin + Fluconazole menghambat ekspresi Cdr1p?

6.5.1.1. Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas adalah kelompok : 1) *Candida albicans* strain resisten Flukonazole yang tidak dipapar, 2) Dipapar Flukonazole dosis MIC, dipapar Kurkumin dosis MIC dan 3) Dipapar kombinasi Flukonazole + Kurkumin dosis MIC.

6.5.1.2. Variabel Tidak Bebas (*Dependent*)

Variabel tidak bebas dalam penelitian ini adalah ekspresi Cdr1p dan ekspresi HAT-Rtt109.

6.5.2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Penilaian
1.	Kelompok perlakuan	Pemberian berbagai perlakuan dengan dosis bertingkat pada kultur <i>Candida albicans</i> strain resisten Fluconazole	Nominal	Kelompok Fluconazole, Kurkumin & kombinasi Kurkumin+ Fluconazole	
2.	Probability affinity	Potensi reaksi atau ikatan molekuler antara molekul yang diuji secara insilico dengan software PASS Online dan PyRx 0,8	Software	Interval	0< Nilai <1
3.	Ekspresi Cdr1p	Ketebalan band yang merupakan ekspresi protein yang diduga Cdr1p pada gel acrilamide setelah dilakukan elektroforesis	Visual-elektroforesis	Ordinal	Gradiasi ketebalan band
4.	Ekspresi HAT-Rtt109	Ketebalan band yang merupakan ekspresi protein yang diduga HAT-Rtt109 pada gel acrilamide setelah dilakukan elektroforesis	Visual-elektroforesis	Ordinal	Gradiasi ketebalan band

6.6. Prosedur Penelitian

6.6.1. Studi Insilico

Menggunakan software PASS untuk mengetahui potensinya sebagai agen inhibitor proliferasi. Selain itu dilakukan proses Moleculer Docking menggunakan

autodock Vina pada program PyRx 0.8 untuk mengetahui interaksi senyawa Kurkumin dengan HAT yang berperan pada asetilasi histon.

6.6.2. Studi ekspresi Cdr1p dan HAT-Rtt109

Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimen murni dengan design *post test only with control*. Dalam penelitian ini terdapat kontrol dan 3 perlakuan, yaitu: Pemberian Flukonazole, Kurkumin, kombinasi Flukonazole + Kurkumin, dimana semuanya dengan dosis MIC yang didapatkan pada tahap I penelitian. Masing-masing adalah 100 ug/ml untuk Flukonazole, 100 ug/ml untuk Kurkumin, dan 6,25 ug/ml + 12,5 ug/ml untuk kombinasi Flukonazole + Kurkumin.

6.6.3. Elektroforesis gel agarose (Laboratorium Biomedis FK UB)

6.6.3.1. Bahan Penelitian

Berikut adalah bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini:

- Bubuk Agarosa
 - TBE Buffer 1x pH 8: 50 nM Tris Base, 50 mM Boric Acid, 1mM EDTA disesuaikan agar pH 8
 - Etidium Bromida (EtBr) 1 mg/ml
 - Loading dye: 50% glycerol, 1 mM EDTA pH 8, 0.4% Bromophenol Blue

6.6.3.2. Prosedur Elektroforesis Gel Agarose

Berikut ini adalah prosedur Elektroforesis Gel Agarose:

1. Disiapkan gel agarosa 0,8-1,5%: melarutkan bubuk agarosa dengan larutan TBE pH 8 (50 mM Tris Base, 50 mM Boric Acid, 1 mM EDTA) dan dididihkan dalam microwave.

2. Setelah mendidih, didinginkan hingga temperatur sekitar 80°C dan ditambahkan 1 μ l EtBr 1 mg/ml, kemudian tuangkan agarosa + EtBr di cetakan yang telah dipasang sisir.

3. Penanganan Gel

Sarung tangan karet yang telah dicuci dan dibilas dengan menggunakan airsuling (non terionisasi) dipakai. Wadah kaca digunakan dan dipastikan volume yang digunakan telah memadai untuk memungkinkan gerakan bebas gel selama shaking. Sebuah orbital shaker digunakan untuk pencampuran semua tahapan. Sebuah cawan terpisah digunakan untuk tiap gel. Tekanan terhadap gel dihindari selama penanganan atau ketika menuang larutan.

4. Bila telah mengeras, gel dan cetakannya dimasukkan ke dalam chamber dan dituang TBE buffer pH 8 sampai gel terendam. Kemudian masukkan DNA dan loading dye dengan rasio 2:1 untuk DNA total dan 5:1 untuk DNA-RAPD pada masing-masing sumuran.

5. Elektroda dihubungkan dengan power supply dan nyalakan hingga 1 jam lamanya.

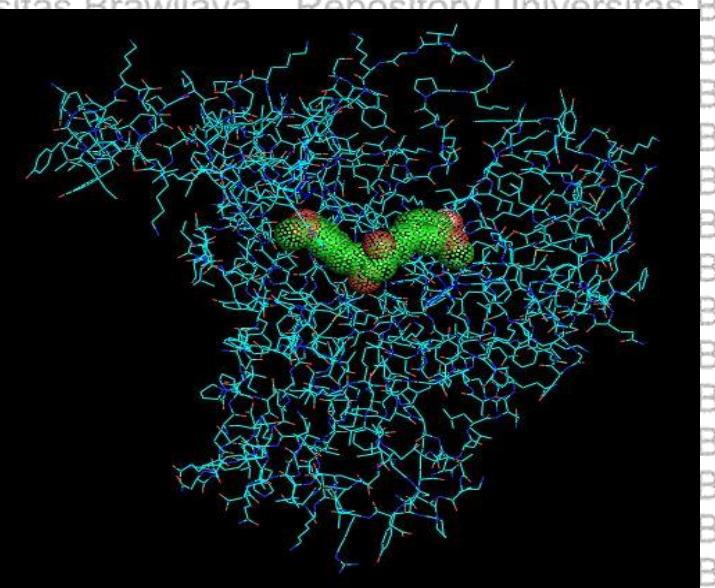
6. Setelah selesai, mesin dimatikan dan ambil gel, pindahkan ke UV-transilluminator dan amati hasilnya.

7. *Band Development* (Pemunculan Pita)

Band atau pita biasanya muncul berwarna biru di sebuah latar belakang yang berwarna lebih cerah. Durasi dari langkah pemunculan/development ini bersifat kurang lebih, dan pemunculan/development harus dimonitor dengan erat. Hasil didokumentasikan dengan *ChemiDoc Gel Imaging*.

6.7. Hasil Penelitian

Melalui software PASS dan Pyrx 8.0 didapatkan bahwa Pa (Probability Affinity) Kurkumin dengan protein tranferase adalah 0,08. Berikut adalah gambar docking Kurkumin dengan HAT (PyRx):



Gambar 6.1. Aktivitas Docking Kurkumin terhadap HAT

Keterangan:

Studi Insilico. Kurkumin mengadakan *docking* pada area katalitik dari HAT. Menggunakan software PASS dan Pyrx 8.0. Kurkumin berwarna hijau dan HAT berwarna biru.

Tahap ke-2 penelitian merupakan studi analisa level protein transporter membrane Candida (ABC transporter efflux, yakni cdr1p) dan protein asetilase histon (Histone Acetyl Transferase- Rtt109). Studi kualitatif protein ini didapatkan melalui SDS-PAGE hasil berbagai kelompok uji (Kontrol, Flukonazol, Kurkumin, kombinasi Flukonazol + Kurkumin dengan dosis MIC) yang dipaparkan pada

Candida. Hasil SDS-PAGE tampak pada gambar di bawah. Berat molekul Cdr1p adalah 160 kDalton. Berat molekul ini terbentuk dari 4 kelompok protein, yakni 2 protein *trans membrane domain* (TMD) dan 2 protein *nuclear binding domain*

(NBD) sehingga menghasilkan total berat molekul 160 kDalton. Pada gambar hasil

SDS-PAGE, lajur paling kanan adalah marker, lajur ke-1 adalah kelompok kontrol,

lajur ke-2 adalah kelompok Flukonazol, lajur ke-3 adalah kelompok Kurkumin, lajur

ke-4 adalah kelompok kombinasi Flukonazol + Kurkumin. Band Cdr1p ditunjukkan

dengan panah hitam. Pada gambar nampak bahwa kelompok kontrol dan

Flukonazol memiliki band paling tebal, disusul band Kurkumin dan kelompok

kombinasi Flukonazol + Kurkumin. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi Cdr1p

kelompok Kurkumin dan kombinasi Flukonazol + Kurkumin paling rendah.

Pada gambar SDS-PAGE di bawah juga menunjukkan band protein

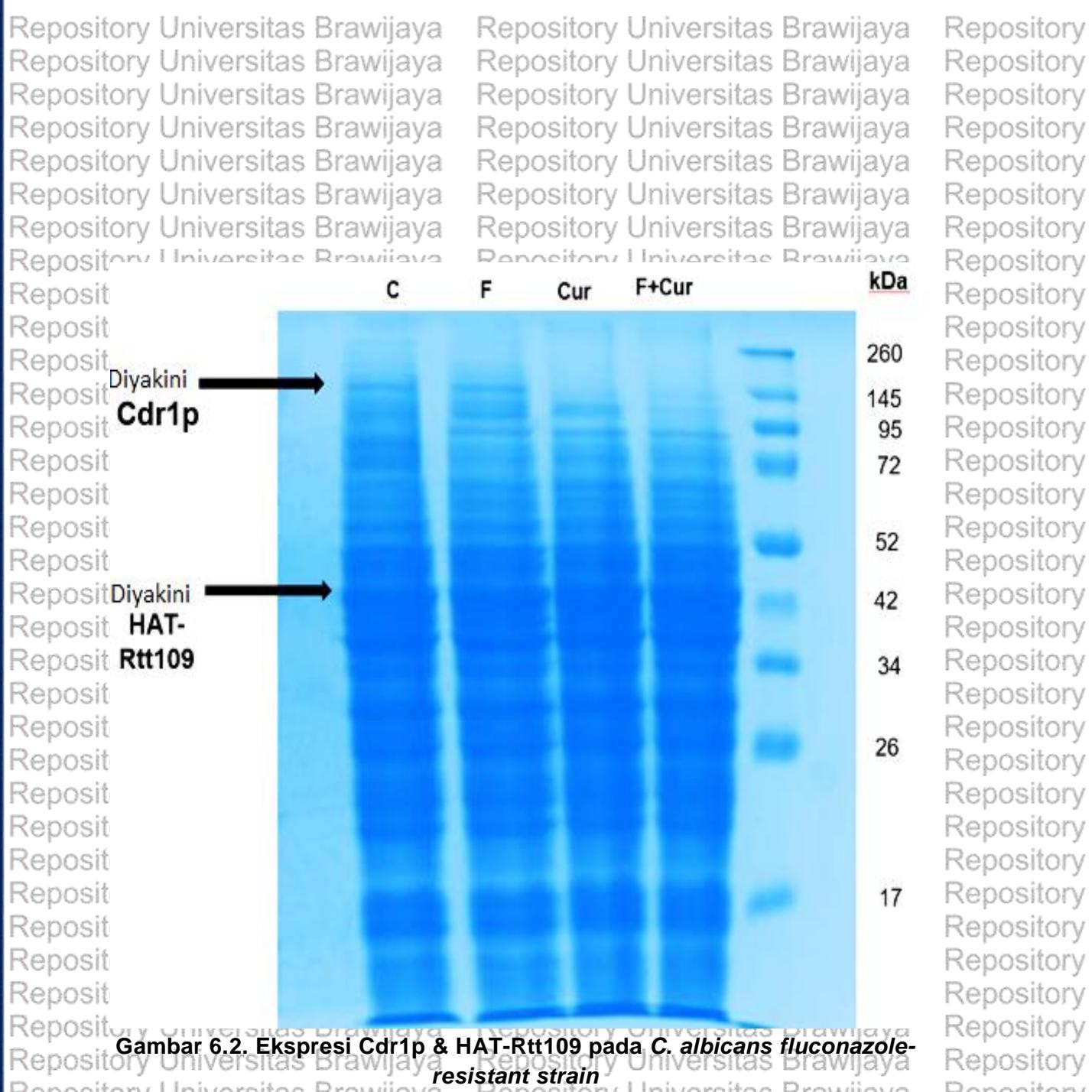
asetilasi HAT-Rtt109 (Histone Acetyl Transferase- Rtt109) dengan berat molekul

44 kDalton. Band HAT-Rtt109 tidak menunjukkan perbedaan antar ke-4 kelompok.

Band HAT-Rtt109 juga menunjukkan band yang sangat tipis antar ke-4 kelompok.

Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi protein HAT-Rtt109 pada *Candida* rendah

pada ke-4 kelompok.



Gambar 6.2. Ekspresi Cdr1p & HAT-Rtt109 pada *C. albicans* fluconazole-resistant strain

Keterangan:

C = Control, F = Fluconazole, Cur = Curcumin, F+Cur = Fluconazole + Curcumin. Analisis Cdr1p melalui SDS-PAGE. Berat molekul Cdr1p adalah 160 kDa dan HAT-Rtt109 adalah 44 kDa. Analisis di atas menunjukkan bahwa kelompok kontrol dan Fluconazole memiliki band Cdr1p lebih tebal dibandingkan dengan band Kurkumin dan kombinasi Kurkumin + Flukonazole. Band HAT-Rtt109 menunjukkan sama diantara keempat kelompok.

6.8. Pembahasan

Tahap ke-2 penelitian merupakan studi analisa ekspresi protein transporter membran *Candida* (*drug efflux transporter*, yakni cdr1p) dan protein asetilase

histon (Histone Acetyl Transferase- Rtt109). Tahap ke-2 penelitian ini merupakan studi kualitatif protein dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan adanya ekspresi protein Cdr1p yang lebih jelas pada kelompok kontrol dan paparan Flukonazole dibandingkan dengan kelompok Kurkumin maupun kombinasi Flukonazole + Kurkumin. Ekspresi Cdr1p merupakan salah satu mekanisme resistensi yang utama pada *Candida*. Kemampuan hambat Kurkumin terhadap ekspresi Cdr1p tentu saja akan menyelesaikan permasalahan resistensi pada *Candida* strain resisten, sehingga pemberian Flukonazole selanjutnya akan efektif bekerja melawan *Candida*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Kurkumin memang sangat berperanan dalam mengatasi masalah resistensi *Candida*. Hasil ini juga menjelaskan efek sinergisme Kurkumin + Flukonazole melawan *Candida* resisten pada penelitian ini.

Hasil studi ini sejalan dengan studi Sharma (2010). Dalam studi ini, diperiksa potensi kurkumin dalam memodulasi aktivitas efflux dari CaCdr1p dan membandingkannya dengan aktivitas efflux dari CaCdr2p dan Pdr5p *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil studi menunjukkan bahwa kurkumin berperilaku sebagai sebuah modulator spesifik rhodamine 6G (R6G) efflux yang dimediasi oleh CaCdr1p, CaCdr2p dan ScPdr5p yang memodulasi kerja transporter-transporter ini. Efek kurkuminoid terhadap fungal ABC transporter memodulasi kerjanya.

Pada *Candida*, upregulation dari gen *multidrug transporter* yang termasuk dalam famili ABC atau major *facilitator superfamily* (MFS) mengarah pada terjadinya fenomena *Candida* resisten. Untuk isolat klinis *C. albicans*, telah diketahui bahwa ABC transporters dari *C. albicans* Cdr1p dan CaCdr2p, serta MFS transporter CaMdr1p adalah MDR transporter

utama yang memberikan kontribusi terhadap resistensi azole. Beberapa senyawa, seperti misalnya FK506 dan ibuprofen dapat menghambat fungal

ABC transporters. Inhibitor semacam ini mungkin beraksi langsung dengan mempengaruhi ikatan substrat dan transport yang dimediasi oleh *drug efflux proteins* (Vermitsky *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2009).

Studi lain juga menunjukkan bahwa efflux aktif adalah sebuah mekanisme resistensi penting terhadap antifungal azole. Studi terkini menunjukkan bahwa fungi memiliki setidaknya dua sistem efflux: (i) protein yang termasuk dalam major facilitator superfamily (MFS) dan (ii) *ATP-binding cassette (ABC) superfamily of protein*. MFS *drug efflux protein* diasosiasikan dengan transport senyawa yang berbeda secara struktural untuk sebuah rentang resistensi hingga senyawa toksik pada mikroorganisme (Ghannoum & Rice, 1999).

Strategi untuk mengatasi resistensi antifungal dapat dilakukan pada efflux pumps. Transporter CaCdr1p, CaCdr2p dan CaMdr1p adalah efflux pump utama yang memediasi resistensi *C. albicans*. Antifungal yang ideal tidak sensitif terhadap resistensi karena mekanisme efflux. Terdapat empat pendekatan utama untuk meniadakan dampak efflux, semuanya

bertujuan untuk mempertahankan konsentrasi tinggi antifungal. Pendekatan yang paling sederhana adalah menggunakan antifungal yang bukan substrat efflux pumps, contohnya polyene dan echinocandin. Pendekatan lain dengan mencegah terjadinya efflux. Pendekatan ketiga adalah untuk mengosongkan sel dari energi yang dibutuhkan untuk *drug efflux* dengan jalan menghambat membran plasme H-ATPase (Cannon *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2009).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi HAT-Rtt109 tidak berbeda pada ke-4 kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa memang Kurkumin

tidak berpengaruh terhadap protein ini. HAT-Rtt109 merupakan enzim asetilasi protein yang sangat penting untuk respon stress Candida. Oleh karenanya, agen yang mampu menghambat HAT-Rtt109 akan berfungsi sangat toksik bagi

Candida. Terlebih lagi protein ini eksklusif hanya terdapat pada kingdom fungal.

Hambatan pada protein ini berarti hanya berefek merusak bagi Candida saja dan

tidak pada inang.

Curcumin (dari kunyit), asam anarcadic (dari minyak kacang mede) dan

garcinol (dari buah *Garcinia indica*) adalah senyawa alami yang memiliki efek

inhibisi terhadap tiga anggota famili HAT, termasuk p300, Gcn5 dan Tip60

(Balasubramanyam *et al.*, 2003; Balasubramanyam *et al.*, 2004; Cui *et al.*,

2007; Mantelingu *et al.*, 2007; Marcu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Namun

hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Kurkumin tidak memberikan efek pada

HAT-Rtt109. Namun demikian, terdapat jenis HAT lainnya yang sangat

mungkin dipengaruhi oleh Kurkumin. Pengaruh Kurkumin pada HAT lainnya

juga dapat secara tidak langsung mempengaruhi HAT-Rtt109. Beberapa protein

terkait proses asetilasi, seperti GCN5 (Acetyltransferase), HHT1 (Histone H3),

HHT2 (Histone H3), HHF1 (Histone H4), HHF2 (Histone H4) serta ASF1

(*Nucleosome assembly factor*).

Hasil penelitian di atas yang menunjukkan bahwa Kurkumin mempengaruhi

ekspresi Cdr1p namun tidak melalui HAT-Rtt109 memunculkan dugaan bahwa

ada mekanisme lain yang menyebabkan Kurkumin dapat mempengaruhi Cdr1p.

Faktor yang diduga merupakan jalur yang menyebabkan Kurkumin menurunkan

Cdr1p diduga adalah pengaruh Kurkumin terhadap metilasi. Metilasi merupakan

salah satu faktor epigenetik yang secara teori dapat mempengaruhi ekspresi gen.

Oleh karena itu, perlu penelitian lanjutan mengenai pengaruh Kurkumin terhadap metilasi gen.

6.9. Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian tahap II ini sebagai berikut:

- 1) Kurkumin mempengaruhi HAT (Histon Acetyl Transferase) secara *insilico* dengan software PASS
- 2) Kurkumin menurunkan ekspresi Cdr1p
- 3) Kurkumin tidak menurunkan ekspresi HAT-Rtt109
- 4) Kombinasi Kurkumin + Flukonazole menurunkan ekspresi Cdr1p
- 5) Kombinasi Kurkumin + Flukonazole tidak menurunkan ekspresi HAT-Rtt109

6.10. Saran

Penelitian tahap II ini perlu dilanjutkan dengan penelitian mekanisme

Kurkumin mempengaruhi faktor epigenetik yaitu metilasi DNA. Kurkumin **diduga** mempengaruhi metilasi CDR1 dilihat dari perubahan metilasi sekuen DNA setelah pemberian Kurkumin. Penelitian ini nantinya juga dapat menghasilkan analisa jalur yang menerangkan hubungan resistensi Candida, ekspresi Cdr1p, HAT-Rtt109, metilasi CDR1 dan Rtt109.

7.1 Pendahuluan

BAB VII

PENELITIAN TAHAP III

Pemaparan Flukonazole yang inadekuat karena toksisitasnya dapat mengaktifasi CDR1. Aktivasi CDR akan menghasilkan protein *drug efflux transporter* yang berperan penting dalam mekanisme terjadinya resistensi. Faktor epigenetik merupakan faktor di luar gen yang dapat mempengaruhi ekspresi protein *drug efflux transporter*. Epigenetik meliputi reaksi asetilasi histon dan metilasi DNA (Li *et al.*, 2015; Pffaler *et al.*, 2009; Edlind & Smith, 2002). HAT (Histone Acetyl Transferase) mengkatalisa reaksi asetilasi histon. Asetilasi histone menyebabkan ikatan histon dengan nukleosom menjadi longgar dan memungkinkan ikatan dengan faktor transkripsi. Proses ini akan memulai transkripsi gen resistensi seperti CDR1. Asetilasi adalah bagian esensial dari regulasi gen. Oleh karenanya, asetilasi histon oleh HAT akan mempengaruhi CDR1 sehingga meningkatkan *drug efflux transporter* seperti Cdrp1 yang kemudian menyebabkan resistensi Candida meningkat (Li *et al.*, 2015; Pffaler *et al.*, 2009; Edlind & Smith, 2002).

Metilasi DNA merupakan salah satu reaksi epigenetik melalui penambahan gugus metil pada sitosin. Metilasi dapat mengubah aktivitas DNA tanpa mengubah sekuen gen. Metilasi sitosin menghasilkan 5-methylsitosin yang akan terjadi deaminasi spontan menjadi timin (T). T akan berikatan dengan A sehingga terjadi substitusi G menjadi A. Hal ini menyebabkan T:G mismatch. Perubahan menjadi A-T akan menghasilkan mutasi. Metilasi menyebakan kromatin inaktif (*silent chromatin*). Bila berada pada den promotor,

maka metilasi DNA akan merepresi transkripsi gen (Ehrlic *et al.*, 1982). Metilasi dapat mengubah aktivitas DNA tanpa mengubah sekuen gen. Bila berada pada gen promotor maka metilasi DNA akan merepresi transkripsi gen. DNA sangat penting bagi pertumbuhan sel termasuk *genomic imprinting* (Ehrlic *et al.*, 1982; Dodge *et al.*, 2001; Lister *et al.*, 2009).

CpG island dianggap sebagai tempat yang biasanya tidak mengalami metilasi DNA. Ini penting karena area yang tak termetilasi akan esensial untuk transkripsi gen. CpG islands yang dimetilasi pada banyak lokasi promoter diasosiasikan dengan represi gen. Remicu metilasi CpG island masih belum diketahui mungkin terjadi melalui pemberian akses ke DNA-methyltransferase.

Inisiasi terjadi ketika protein pengikat DNA-termetilasi (*methylated-DNA binding proteins*) berikatan, diikuti dengan sebuah kompleks protein yang mengandung histones, deacetylases dan protein lain. Kompleks protein ini kemudian menginduksi sebuah struktur kromatin tertutup yang mengeluarkan faktor transkripsi dari area promotor dan menghasilkan *gene silencing*. Ketika promotor CpG islands menjadi termetilasi maka gen menjadi silent dan silencing ini ditransmisikan melalui mitosis (Wang, 2007; Dodge *et al.*, 2001; Lister *et al.*, 2009).

Selama dekade terakhir, banyak penelitian tentang efek Kurkumin sebagai sebuah epigenetik modifier yang menjanjikan. Faktor genetik merupakan penentu biologis yang terpelihara dan sulit dimodifikasi. Berbeda dengan faktor epigenetik yang mampu mempengaruhi ekspresi dan bersifat reversible. Karakter ini meningkatkan antusiasme untuk mengembangkan strategi-strategi terapeutik dengan menarget faktor epigenetik, seperti misalnya HDAC, HAT, Metilasi (DNMTs) dan miRNA, dengan diet alami, seperti misalnya

Kurkumin. Bukti eksperimental mendukung bahwa *dietary nutraceutical* seperti misalnya Kurkumin memiliki potensi yang sangat besar sebagai agen epigenetik (Edlind & Smith, 2002). Penyelidikan lebih jauh terhadap fitokimia sebagai agen epigenetik sangat diperlukan untuk bisa sepenuhnya mengeksplorasi potensi *dietary nutraceutical* dalam pengobatan penyakit.

Suatu flavonoid (misalnya Kurkumin) diduga merupakan agen yang dapat menjadi inhibitor HAT maupun stimulator metilasi DNA (Balasubramanyam *et al.*, 2003; Balasubramanyam *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007; Mantelingu *et al.*, 2007; Marcu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Studi efek Kurkumin terhadap metilasi masih kontroversial dan hanya sedikit. Studi Link *et al.* (2013) menunjukkan bahwa Kurkumin memodulasi metilasi DNA pada sel-sel colon cancer. Metilasi diukur dengan menggunakan pengukuran global metilasi. Induksi

metilasi oleh Kurkumin terjadi partial pada gen. Efek Kurkumin terhadap metilasi DNA ini akan menyebabkan *silencing* gen. Hal ini menunjukkan bahwa Kurkumin dapat menjadi agen rekayasa ekspresi gen tanpa melalui perubahan gen. Namun apakah Kurkumin menstimulasi metilasi DNA pada *Candida efflux transporter* Cdrp1 sehingga menyelesaikan permasalahan resistensi antifungal (Fluconazole) masih belum ada penelitian yang membuktikannya.

Bila temuan ini terbukti maka dapat menjadi landasan untuk pengembangan Kurkumin selanjutnya dalam terapi *Candida* yang resisten Fluconazole. Di dalam penelitian ini, dipelajari peranan Kurkumin dalam metilasi DNA. Hanya sejumlah kecil laporan yang telah menyelidiki pengaruh Kurkumin terhadap metilasi DNA. Untuk mengklarifikasi kontradiksi ini, lebih banyak riset penelitian perlu dilakukan.

- 3) Menjelaskan analisis pathway Kurkumin terhadap ekspresi Cdr1p, HAT-Rtt109, metilasi CDR1 dan metilasi Rtt109.

7.4. Metode Penelitian

7.4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2017 s/d Oktober 2017. Untuk perlakuan isolasi DNA, Polymerase Chain Reaction, bisulfite treatment dilakukan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Untuk analisis sekuen termetilasi dilakukan di 1st BASE Laboratories No 7-1 to 7-4, Jalan SP 2/7 Taman Serdang Perdana, Seksyen 2, Seri Kembangan 43300, Selangor, Malaysia.

7.4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

7.4.2.1. Variabel Penelitian

Variabel bebas (*Independen*): 1) *Candida albicans* strain resisten Flukonazole yang dipapar Flukonazole dosis MIC, 2) Dipapar Kurkumin dosis MIC, dan 3) Dipapar kombinasi Flukonazole + Kurkumin dosis MIC

Variabel tergantung (*Dependen*): Metilasi CDR1 dan Rtt109

7.4.2.2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Penilaian
1.	Kelompok perlakuan	Pemberian berbagai perlakuan pada kultur <i>Candida albicans</i> strain resisten Fluconazole	Repository Universitas Brawijaya	Nominal	Kelompok Kurkumin
2.	Metilasi gen CDR1	Penambahan gugus metil pada promotor gen CDR1	Pengamatan sekuen DNA paska bisulfite treatment	Nominal	Kelompok Fluconazole

3.	Metilasi gen Rtt109	Penambahan gugus metil pada promotor gen Rtt109	Pengamatan sekuens DNA paska bisulfite treatment	Nominal	Sekuens Rtt109 termetilasi
----	---------------------	---	--	---------	----------------------------

7.5. Prosedur Penelitian

7.5.1. Isolasi DNA

Isolasi DNA yeast menggunakan kit isolasi DNA merk Zymo Research

Quick DNA Fungal Miniprep Kit No. D6005. Protokol isolasi DNA Yeast sebagai berikut:

1. Untuk performa optimal, tambahkan beta-mercaptoethanol (disuplai user) ke Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer dalam sebuah pengenceran akhir 0,5% (v/v), misal., 500 μ l per 100 ml.
2. Ditambahkan 50-100 mg (berat segar) fungal atau sel bakteri yang telah dilarutkan kembali (*resuspended*) ke dalam 200 μ l air atau buffer isotonik (misal., PBS) atau hingga 200 mg jaringan ke dalam ZR BashingBead Lysis Tube (0.1 mm & 0.5 mm). Ditambahkan 750 μ l Lysis solution ke dalam tube.
3. Diamankan ke sebuah *bead beater* yang cocok untuk sebuah rangkaian *tube holder* 2 ml dan diproses pada kecepatan maksimum selama ≥ 5 menit.
4. Disentrifugasi ZR BashingBead Lysis Tube dalam sebuah mikrosentrifugasi pada 10,000 x g selama 1 menit.
5. Dipindahkan sekitar 400 μ l supernata ke sebuah Zymo-Spin IV Spin Filter (Orange Top) dalam sebuah Collection Tube (tabung koleksi) dan disentrifugasi pada 7,000 x g selama 1 menit.

- Pangkal/bagian dasar Zymo-Spin IV Spin Filter (*Orange Top*) dilepaskan sebelum digunakan.
6. Ditambahkan 1,200 μ l *Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer* ke filtrat di dalam Collection Tube yang ada di langkah 4.
 7. Dipindahkan 800 μ l campuran dari langkah 5 ke dalam sebuah Zymo-Spin IIC Column dalam sebuah Collection Tube dan disentrifugasi pada 10,000 $\times g$ selama 1 menit.
 8. Diuang cairan dari Collection Tube dan diulangi langkah 6.
 9. Ditambahkan 200 μ l *DNA Pre-Wash Buffer* ke dalam Zymo-Spin IIC Column dalam sebuah Collection Tube baru dan disentrifugasi pada 10,000 $\times g$ selama 1 menit.
 10. Ditambahkan 500 μ l *Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer* ke Zymo-Spin IIC Column dan disentrifugasi pada 10,000 $\times g$ selama 1 menit.
 11. Dipindahkan Zymo-Spin IIC Column ke sebuah tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml yang bersih dan tambahkan 100 μ l (minimal 50 μ l) *DNA Elution Buffer* secara langsung ke matriks kolom. Disentrifugasi pada 10,000 $\times g$ selama 30 detik untuk melarutkan (elute) DNA.

7.5.2. Treatment Bisulfite pada DNA (menggunakan metode MethylCode

Bisulfite Conversion Kit – Invitrogen)

Pola metilasi dapat diamati dengan melakukan metode modifikasi bisulfite. Bisulfite akan mengkonversi sitosin tidak termetilasi menjadi urasil, sedangkan sitosin termetilasi tidak mengalami perubahan dan tidak bereaksi dengan sodium bisulfite. Reaksi ini merupakan dasar untuk membedakan residu sitosin termetilasi dan tidak termetilasi (Herman et

- al., 1996; Gustafson et al., 2004; Feng et al., 2005; Jeong et al., 2005).* Dalam mengidentifikasi adanya metilasi digunakan primer spesifik untuk mengamplifikasi daerah yang diinginkan. Prosedurnya sebagai berikut:
1. DNA yang dibutuhkan adalah 200-500 ng, sampel DNA ditambahkan air steril hingga volume 20 ul dalam *thinwall*. Selanjutnya ditambahkan dengan *CT conversion Reagent* sebanyak 130 ul, dipipeting hingga homogen
 2. Tabung *thinwall* yang berisi sampel DNA dan *CT conversion reagent* ditempatkan dalam thermal cycler dengan program:
 - i. 98°C 10 menit (*DNA denaturation step*)
 - ii. 64°C 2,5 jam (*Bisulfite conversion step*)
 - iii. 4°C last step for storage
 3. Spin column ditempatkan dalam tabung koleksi dan tambahkan 600 ul Binding Buffer dalam column, kemudian ditambahkan sampel DNA dari tahap 2, dicampur dengan dipipeting. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 13000xg, selama 1 menit pada suhu ruang.
 4. Tabung koleksi diganti, ditambahkan 100 ul *wash buffer* pada *spin column* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13000xg selama 1 menit pada suhu ruang.
 5. Tabung koleksi diganti, ditambahkan 200 ul desulphonation buffer pada *spin column*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit.
 6. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 13000xg, selama 1 menit pada suhu ruang.
 7. Ditambahkan 200 ul *wash buffer* pada *spin column* dan disentrifugasi pada kecepatan 13000xg, selama 1 menit pada suhu ruang.

8. Tabung koleksi diganti, ditambahkan 200 ul *wash buffer* pada *spin column* dan disentrifugasi pada kecepatan 13000xg, selama 1 menit pada suhu ruang.
9. Tanpa penambahan larutan dalam *spin column*, disentrifugasi lagi pada kecepatan 13000xg, selama 1 menit pada suhu ruang.
10. Tabung koleksi diganti dengan tabung 1,5 ml, kemudian ditambahkan dengan 5 ul *elution buffer* dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 13000xg, selama 1 menit pada suhu ruang.
11. Ditambahkan kembali larutan *elution buffer* sebanyak 5 ul dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13000xg, selama 1 menit pada suhu ruang.
12. DNA disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C.

7.5.3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* (Laboratorium Biomedis FK UB)

Berikut adalah protocol PCR:

- 1) Disiapkan *master mix* sesuai dengan jumlah sampel yang akan dirunning.
- 2) Perhitungan komposisi *master mix* (GoTaq Green Master Mix (Promega)) untuk 1x reaksi dengan volume total 25 μ l.

Reagen	Volume Reagen untuk 1x Reaksi (μl)	Volume Reagen x Jumlah Sampel (Jumlah sampel = 10)	Total Volume yang dibutuhkan untuk 10 sampel (μl)
Master Mix (Final Conc: 1x)	12,5	12,5 x 10	125
Primer Forward 10 μM (Final Conc: 0,1-1,0 μM)	1	1 x 10	10
Primer Reverse	1	1 x 10	10

10 μ M
(Final Conc: 0.1-
1.0 μ M)
DNase/RNase
Free water (N.A)
Total Volume
Reaksi

3) Dibagi master mix ke dalam PCR tube masing-masing dengan volume **24**

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
pl/tube.
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

4) Dimasukkan 1 μ l DNA template (**Final Conc:<250 ng**) ke masing-masing

PCR tube yang telah berisi master mix hingga volume akhir adalah 25

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

5) Di-homogenkan dengan cara di-pipetting.

6) Spin down dengan kecepatan 6000 rpm hingga tidak ada larutan yang

tersisa di dinding bagian dalam *PCR tube* dan tidak terbentuk gelembung

Repository Universitas Brawijaya
udara.

7) Dimasukkan ke dalam alat PCR, *running* sesuai dengan kondisi optimum

PCR masing-masing sampel.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya | Nest 1 | Nest 2

PCR condition for Nest 1 and Nest 2

Kondisi PCR	Nest 1			Nest 2		
	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Siklus	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Siklus
Denaturasi Awal	95	5	1	95	5	1
Denaturasi	94	1		94	1	
Annealing	58	2	30	60	2	35
Extension	72	2		72	2	
Final Extension	72	5	1	72	5	1
Hold	12	Tanpa batas	1	12	Tanpa batas	1

Sekuens primer gen CDR1 dan Rtt109

Gen		Sekuens
CDR1	-F	5'-GAA TTT TTT GAA TTA GGG TTT TT-3' (Forward)
	-R	5'-CTA AAC TCC TCC CCA CCT AC-3' (Reverse)
RTT109	-F	5'-TTTTTTTTTTAGTTCATCATC-3' (Forward)
	-R	5'-GGTCATTATTTATTCTTCAT-3' (Reverse)

Amplifikasi DNA bisulfit dilakukan menggunakan mesin PCR (Takara) dalam campuran untuk 50 reaksi berturut-turut adalah primer forward 10 pmol/ul sebanyak 2,5 ul, primer reverse 10 pmol/ul sebanyak 2,5 ul, steril water sebanyak 18 ul, PCR mix (2x Go Taq Green PCR Mix) sebanyak 25 ul dan DNA template sebanyak 2 ul. Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi primer P16F_2 dan ABCGF_1 pada DNA bisulfit menggunakan PCR touchdown dengan program sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit diikuti dengan 10 siklus tahapan yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 5 detik, annealing 65°C selama 10 detik dengan pengurangan tiap siklus sebanyak 1.2°C, extension 72°C selama 10 detik. Denaturasi 94°C selama 1 menit, annealing 55°C selama 1 menit, extensi 72°C selama 1 menit, dan diakhiri dengan satu siklus perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Sedangkan program PCR yang digunakan untuk amplifikasi primer P16F_2 dan ABCGF_2 pada sampel DNA bisulfit EGCG menggunakan PCR touchdown dengan program sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit diikuti dengan 10 siklus tahapan yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 5 detik, annealing 60°C selama 10 detik dengan pengurangan tiap siklus sebanyak 1,1°C, extension 72°C selama 10 detik, kemudian diikuti dengan tahapan 28 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 1 menit, annealing 50°C selama 1 menit, extensi 72°C selama 1 menit, dan diakhiri dengan satu siklus perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 7 menit.

7.5.4. Prosedur Elektroforesis Gel Agarose

- 1) Disiapkan gel agarosa 0,8-1,5%: melarutkan bubuk agarosa dengan larutan TBE pH 8 (50 mM Tris Base, 50 mM Boric Acid, 1 mM EDTA) dan dididihkan dalam microwave.

- 2) Setelah mendidih, didinginkan hingga temperatur sekitar 80°C dan ditambahkan 1 μ l EtBr 1 mg/ml, kemudian tuangkan agarosa + EtBr di cetakan yang telah dipasang sisir.
- 3) Penanganan Gel Sarung tangan karet yang telah dicuci dan dibilas dengan menggunakan air suling (non terionisasi) dipakai. Wadah kaca digunakan dan dipastikan volume yang digunakan telah memadai untuk memungkinkan gerakan bebas gel selama shaking. Sebuah *orbital shaker* digunakan untuk pencampuran semua tahapan. Sebuah cawan terpisah digunakan untuk tiap gel. Tekanan terhadap gel dihindari selama penanganan atau ketika menuang larutan.
- 4) Bila telah mengeras, gel dan cetakannya dimasukkan ke dalam chamber dan dituang TBE buffer pH 8 sampai gel terendam. Kemudian masukkan DNA dan *loading dye* dengan rasio 2:1 untuk DNA total dan 5:1 untuk DNA-RAPD pada masing-masing sumuran.
- 5) Elektroda dihubungkan dengan *power supply* dan nyalakan hingga 1 jam lamanya.
- 6) Setelah selesai, mesin dimatikan dan ambil gel, pindahkan ke UV-transilluminator dan amati hasilnya.
- 7) *Band Development* (Pemunculan Pita) Band atau pita biasanya muncul berwarna biru di sebuah latar belakang yang berwarna lebih cerah. Durasi dari langkah pemunculan/development ini bersifat kurang lebih, dan pemunculan/development harus dimonitor dengan erat. Hasil didokumentasikan dengan *ChemiDoc Gel Imaging*.

7.5.5. Sequencing dan analisa hasil sequencing

Purifikasi DNA hasil PCR (berdasarkan metode Nucleospin PCR

(clean up)

- 1) Sampel DNA hasil PCR diambil sebanyak 30 ul dan ditambahkan steril water hingga 100 ul kemudian ditambahkan buffer NT1 sebanyak 200 ul, dimix.
- 2) Larutan dipindahkan ke dalam tube silica dan collection tube, kemudian disentrifugasi 11000xg selama 2 menit, pada suhu 25°C.
- 3) Tabung column diganti, kemudian ditambahkan dengan buffer NT3 sebanyak 700 ul dan disentrifugasi pada kecepatan 11000xg selama 1 menit, pada suhu 25°C.
- 4) Tabung column diganti, kemudian ditambahkan dengan buffer NT3 sebanyak 500 ul dan disentrifugasi pada kecepatan 11000xg selama 1 menit, pada suhu 25°C.
- 5) Tabung column diganti dan tanpa pemberian larutan apapun, disentrifugasi ulang pada kecepatan 11000xg selama 1 menit, pada suhu 25°C.
- 6) Tabung column diganti dengan tube 1,5 ml, selanjutnya ditambahkan dengan buffer NE hangat sebanyak 10 ul, kemudian diinkubasi selama 5 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 11000xg selama 3 menit, pada suhu 25°C.
- 7) Ditambahkan dengan 10 ul buffer NE hangat, kemudian diinkubasi selama 5 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 11000xg selama 3 menit pada suhu 25°C.
- 8) Sampel DNA-PCR hasil purifikasi disimpan dalam freezer -20°C.

Sequencing

Sequencing dilakukan dengan menggunakan produk hasil PCR yang dipurifikasi untuk memperoleh DNA. Hasil dari *sequencing* berupa sekuen DNA dan grafik *peak* dari masing-masing basa nukleotida.

Analisa Hasil Sequencing

Analisa hasil sekueensiung untuk menentukan basa yang termetilasi maupun yang tidak termetilasi dilakukan dengan membandingkan sekuen hasil *sequencing* dan sekuen yang ada pada data bank (NCBI). Proses pembandingan dengan metode *alignment* menggunakan online program BLAST-NCBI. Basa yang mengalami metilasi akan memiliki sekuen yang sama dengan pada data bank (*Cytosine* tetap tidak berubah), sedangkan basa yang tidak mengalami metilasi akan mengalami perubahan (*Cytosine* berubah menjadi *Tymine*), sehingga hasilnya akan ditunjukkan dengan tidak adanya garis penghubung antar basa dari kedua sekuen yang dibandingkan.

Hasil *alignment* antara sekuen hasil *sequencing* dengan data bank. Jika terjadi metilasi maka tidak terjadi perubahan dan ditunjukkan dengan adanya garis penghubung (kotak berwarna merah), sedangkan jika tidak terjadi metilasi maka akan terjadi perubahan basa dan penghilangan garis penghubung (kotak berwarna hijau).

Walaupun pada hasil sekueensiung DNA dan *alignment* pada metilasi dan mutasi menunjukkan hasil yang sama, namun metilasi pada DNA dapat dibedakan dengan mutasi DNA melalui perubahan basa nukleotida pada DNA. Pada mutasi DNA, perubahan yang terjadi dapat berupa timin, sitosin, adenin atau guanin tanpa adanya treatment sebelumnya. Perubahan pada metilasi DNA

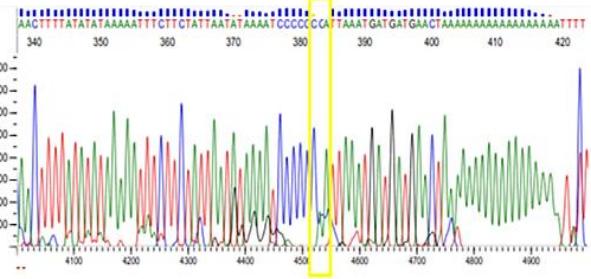
terjadi setelah treatment bisulfit, dimana sitosin yang tidak mengalami metilasi akan berubah menjadi timin, dan sitosin yang mengalami metilasi tetap sebagai sitosin. Selain metode bisulfit, pemeriksaan metilasi DNA dapat diidentifikasi dengan metode yang lain diantaranya methylight, Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS), CpG island microarrays, promoter arrays.

Mutasi yang ditandai dengan adanya nukleotida C yang mempunyai *double peak*, dan ini terjadi tanpa ada perlakuan sebelumnya. Hal ini dapat dibuktikan dengan metilasi, pada metilasi yang ditunjukkan dengan adanya nukleotida C atau T *double peak* setelah diberikan treatment bisulfit.

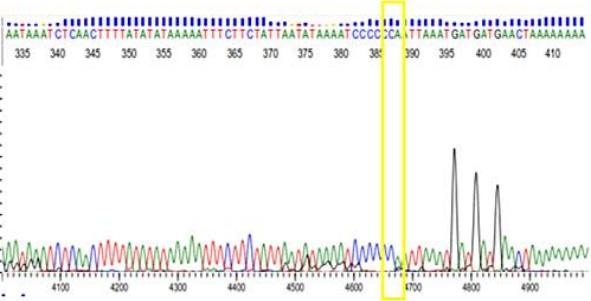
7.6. Hasil Penelitian

Berikut ini adalah gambar alignment sekuen termetilasi CDR1 dan Rrt109 yang dipelajari.

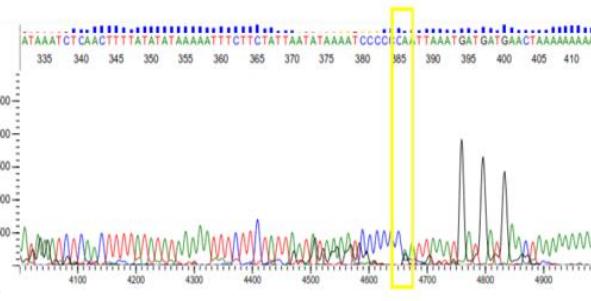
Control



Curcumin



Combination Fluconazole + Curcumin



Gambar 7.1. Metilasi CDR1 pada *C. albicans* Fluconazole-resistant strain

: Promoter area observed
: Methylation position observed
: Methylation position observed

Keterangan:

Metilasi yang terjadi setelah perlakuan bisulfite akan mengubah Sitosin menjadi Timin. Berdasarkan hasil e alignment, Nampak bahwa ada perubahan Sitosin menjadi Timin pada posisi 1057 (kotak biru pada hasil sekuen) yang terjadi pada kelompok Kurkumin dan kombinasi Kurkumin. Sitosin juga akan menunjukkan termetilasi bila terdapat *double peak*. Kelompok Kontrol and Fluconazole menunjukkan *single peak*, sedangkan Curcumin and Curcumin+Fluconazole memiliki *double peak* (kotak kuning pada grafik sekuen). Sitosin pada posisi ini terletak pada regio promotor dan CpG (near G base)

Analisis metilasi umumnya dilakukan dengan melakukan *bisulfate treatment* pada DNA yang akan dianalisis sehingga menyebabkan adanya

perubahan pada semua basa C menjadi basa T. Pada posisi basa C yang mengalami metilasi ditandai dengan adanya dua *peak* (*double peak*) yang hampir sama tinggi pada daerah CpG (atau sekvens CG yang berdekatan). *Double peak* tersebut akan menunjukkan warna biru dan merah yang merupakan penanda untuk basa C dan T jika sekvensing dilakukan menggunakan *primer forward* atau warna hijau dan hitam basa A dan G jika menggunakan *primer reverse*. sehingga jika, Sedangkan Demetilasi ditandai dengan adanya satu *peak* merupakan penanda basa T (merah, jika sekvensing menggunakan primer foward) atau basa A (hijau, jika sekvensing menggunakan primer reverse)

Berdasarkan hasil alignment Nampak bahwa telah terjadi perubahan basa Cr pada posisi 1057 menjadi basa T yang terjadi pada semua kelompok (Kotak warna biru pada hasil alignment). Basa C pada posisi tersebut berada pada daerah promoter dan CpG (dekat dengan basa G), sehingga merupakan posisi yang diduga mengalami metilasi atau demetilasi. Ketika dilakukan pengecekan pada

diagram hasil *sequencing*, didapat pola *peak* yang berbeda pada setiap kelompok. Kelompok kontrol dan Fluconazole memiliki *single peak*, sedangkan kelompok curcumin dan curcumin-fluconazole memiliki *double peak* (kotak warna kuning pada hasil *sequencing*). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa kelompok Kontrol dan Fluconazole mengalami demetilasi, sebaliknya kelompok curcumin dan curcumin-fluconazole mengalami metilasi, sehingga aktivitas gen CDR1 pada kelompok kontrol dan fluconazole lebih tinggi dibandingkan kedua kelompok yang lain.

Berdasarkan hasil alignment nampak bahwa pada beberapa posisi terjadi perubahan atau hilangnya basa tertentu yang ditunjukkan dengan hilangnya garis penghubung antara basa *query* (yang merupakan sekuen *template*) dengan basa *subject* (yang merupakan sekuen hasil *sequencing*). Namun pada dasarnya pola tersebut tidak jauh berbeda pada kelompok Kontrol, Fluconazole dan Curcumin.

Ketika dibandingkan dengan diagram hasil *sequencing*, ketiga kelompok tersebut juga menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda meskipun terdapat beberapa posisi yang menunjukkan adanya *double peak*, *peak* warna merah yang merupakan penanda basa T dan *peak* warna biru yang merupakan penanda basa C (kotak kuning), namun tidak terdapat perbedaan dari ketiga kelompok tersebut.

Ketiga posisi tersebut tidak bisa dikatakan mengalami metilasi meskipun terdapat *double peak*, karena tidak terletak pada posisi CpG (atau sekuen basa C yang diikuti dengan basa G) dan bukan pada daerah promoter melainkan pada daerah pengkode asam amino.

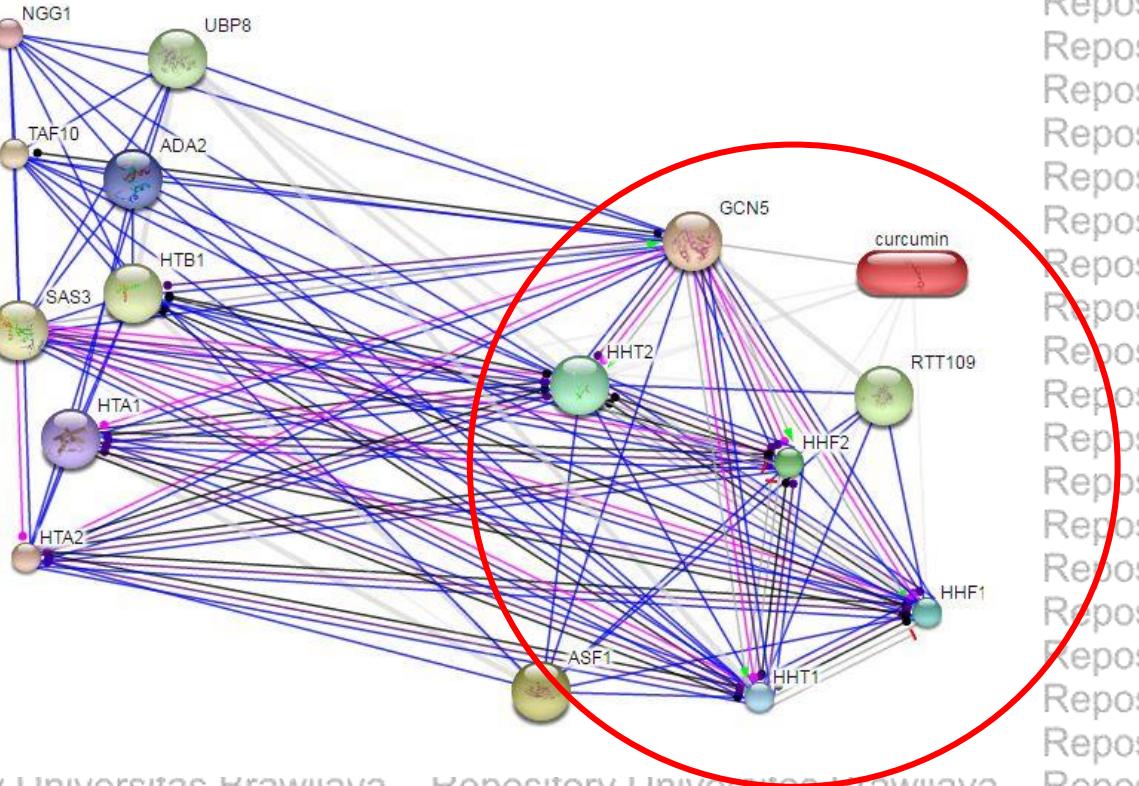
Hasil *alignment* pada kelompok Curcumin-Fluconazole tidak dapat dibandingkan dengan kelompok yang lain. Hal ini dikarenakan beberapa alasan antara lain:

1. Grafik hasil sekuen yang kurang bagus sehingga tidak menunjang proses *alignment*. Grafik yang kurang bagus menyebabkan analisis *alignment* pada kelompok ini hanya menghasilkan potongan-potongan sekuen pendek.

2. Posisi sekuen hasil analisis *sequencing* antara ketiga kelompok dengan kelompok CF tidak sama. Sekuen kelompok CF berada pada rentang +100-400bp, sedangkan ketiga kelompok yang lain berada pada rentang + 700-800bp.

Hal ini Nampak dari posisi *query* hasil *alignment*. Adanya perbedaan ini dimungkinkan karena hasil *sequencing* kelompok CF yang kurang bagus.

Berikut ini adalah hasil studi insilico pathway pengaruh Kurkumin terhadap



Gambar 7.3. *Pathway* Kurkumin dengan Rtt109

Curcumin tidak menghambat RTT109 (Histon Acetyltransferase) melalui interaksi secara langsung, tetapi berinteraksi secara tidak langsung dengan beberapa protein terkait proses asetilasi, seperti GCN5 (Acetyltransferase), HHT1 (Histone H3), HHT2 (Histone H3), HHF1 (Histone H4), HHF2 (Histone H4) serta ASF1 (*Nucleosome assembly factor*). HAT memodulasi ekspresi gen dengan mengkatalis target asetilasi dari kelompok asam amino yang memiliki residu lisin pada protein histon dan non-histon. HAT dapat diklasifikasikan menjadi beberapa famili berdasarkan struktur motif yang bersifat highly conserved, seperti famili

7.7. Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok paparan Kurkumin dan kombinasi Flukonazole + Kurkumin menghasilkan metilasi pada CDR1. Metilasi DNA adalah sebuah proses dimana grup metil ditambahkan ke dalam molekul DNA. Metilasi bisa mengubah aktivitas sebuah segmen DNA tanpa mengubah sekuen DNA. Ketika berada dalam sebuah promotor gen, metilasi DNA biasanya bertindak untuk menekan transkripsi gen. Metilasi DNA termasuk esensial untuk inaktivasi genomic, sehingga sangat berhubungan dengan ekspresi atau tidaknya resistensi obat. Metilasi DNA yang disebabkan oleh Kurkumin akan menghasilkan *silencing* gen. Pada Candida strain resisten yang menjadi sampel pada penelitian ini, terjadi silencing CDR1 sehingga ekspresi Cdr1p menurun. Penurunan ekspresi Cdr1p ini akan menyebabkan transporter drug efflux tidak bekerja sehingga Flukonazole yang masuk ke dalam Candida ini tidak akan dikeluarkan ke ekstraseluler Candida. Pada akhirnya Flukonazole akan bekerja intraseluler Candida yakni mengganggu biosintesis membrane Candida sehingga dapat bekerja kembali sebagai fungistatic. Hal ini sejalan dengan hasil pada penelitian tahap ke-2, dimana pada kelompok Kurkumin dan kelompok kombinasi Flukonazole + Kurkumin terdapat penurunan ekspresi Cdr1p. Hasil ini juga membuktikan bahwa Kurkumin merupakan agen yang sangat mempengaruhi epigenetik, yaitu metilasi DNA dan modifikasi histone. Meskipun Kurkumin merepresi gen, namun pengaruh ini reversible.

Metilasi terhadap sitosin untuk membentuk 5-methylcytosine. Deaminasi spontan dari 5-methylcytosine mengkonversinya menjadi timin. Hal ini mengakibatkan ketidakcocokan T: G. Mekanisme perbaikan kemudian akan mengoreksinya dengan mengganti G dengan A, mengubah pasangan oriinal

C: G menjadi pasangan A: T. Hal ini menyebabkan mutasi. Basa yang salah masuk ini tidak akan dikoreksi selama replikasi DNA sehingga menghasilkan sel turunan yang mutan pula, atau dengan kata lain mutasi ini akan permanen ((Ehrlic *et al.*, 1982; Robertson, 2001, Sharma *et al.*, 2010; Dodge *et al.*, 2001; Lister *et al.*, 2009).

Metilasi DNA ditemukan dalam tiga sekvens yang berbeda: 'CG (atau CpG *island*), CHG atau CHH (dimana H merupakan A, T atau C). Metilasi DNA hampir selalu ditemukan pada CpG sekitar 60-80%. CpG *island* biasanya didefinisikan sebagai wilayah dengan 1) panjang lebih dari 200 bp, 2) konten G+C lebih besar dari 50%, 3) rasio CpG lebih besar daripada 0,6. Sekitar 50% CpG *island* berada dalam area promotor gen, sementara 25% lagi berada di badan gen. Metilasi DNA bisa mempengaruhi transkripsi gen dalam dua cara.

Pertama, metilasi DNA itu sendiri bisa secara menghambat pengikatan protein transkripsi ke gen, dan kedua, (lebih penting), DNA yang termetilasi bisa diikat oleh protein yang dikenal sebagai *methyl-CpG-binding domain proteins* (MBD). Protein MBD kemudian merekrut protein tambahan ke lokus, seperti misalnya histone deacetylases dan protein remodeling kromatin lainnya yang bisa memodifikasi histone sehingga inaktif atau memediasi *transcriptional silencing* dari gen-gen termetilasi. Fungi memiliki metilasi sitosin berlevel rendah (0.1 hingga 0.5%) (Bekesi, 2011; Lister *et al.*, 2009; Rana *et al.*, 2016).

Hasil penelitian ini sejalan dengan studi Link *et al.* (2013). Studi ini menunjukkan bahwa Kurkumin memodulasi metilasi DNA pada sel kanker kolorektal. Perubahan metilasi DNA terinduksi-curcumin terjadi dalam cara yang bergantung-waktu (time-dependent). Pengobatan dengan curcumin

menghasilkan perubahan metilasi di lokasi yang termetilasi parsial tertentu, dan bukannya di lokasi CpG termetilasi penuh.

Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan studi Boyanapalli & Kong (2015), dimana Kurkumin menurunkan metilasi DNA. Kurkumin menurunkan ekspresi DNMT1 pada AML cell lines. Selain itu, Kurkumin bersama dengan modifier epigenetik lain mengubah pengaruh inhibitor DNMT terhadap metilasi DNA untuk mereaktivisasikan kembali gen-gen yang silent di dalam sel-sel leukemia. Selain peranan regulatifnya pada kanker darah, Kurkumin adalah sebuah agen regulatif epigenetik potensial pada banyak tumor solid. Sebagai inhibitor DNMT potensial, Kurkumin pada konsentrasi 5 μ M membalikkan (reverse) metilasi CpG di region promotor Neurog1 pada sel kanker prostat manusia.

Selain mekanisme silencing gen dengan menyebabkan metilasi, Kurkumin juga menghambat transkripsi melalui inhibisi asetilasi histon. Inhibisi asetilasi menyebabkan histon berkondensasi sehingga replikasi DNA tidak berjalan. Hasil akhir dari inhibisi HAT ini adalah silencing gen. Inhibisi HAT ini sejalan dengan studi Boyanapalli & Kong (2015), dimana Kurkumin, sebuah inhibitor HAT, secara signifikan mereduksi level H3ac di dalam promoter IL-6 sehingga menginduksi peningkatan produksi IL-6 oleh RASF dan karenanya berpartisipasi dalam patogenesis rheumatoid arthritis. Studi lain melaporkan bahwa Kurkumin adalah inhibitor HAT yang potensial. Pada tahun 2004, Balasubramanyam *et al.* (2004) melaporkan bahwa curcumin adalah sebuah inhibitor spesifik dari p300/CREB-binding protein (CBP) HAT activity *in vitro* dan *in vivo* tapi tidak dari p300/CBP-associated factor. Selain itu, mereka menunjukkan bahwa Kurkumin menginhibisi p300-mediated acetylation, p53

scara *in vivo* dan secara signifikan merepress asetilasi HIV-Tat protein secara *in vitro* dan proliferasi virus (Balasubramanyam *et al.*, 2004). Kurkumin sebagai inhibitor spesifik p300/CBP HAT menginhibisi p300 HAT activity sehingga mencegah gagal jantung pada tikus (Morimoto *et al.*, 2008). Marcu *et al.* (2006)

menemukan bahwa binding site curcumin pada p300/CBP cukup spesifik dan binding ini mengarah pada sebuah perubahan konformasional, menghasilkan sebuah penurunan efisiensi binding dari histone H3 dan H4 serta acetyl CoA.

Teknik pengujian metilasi pada penelitian ini dengan menggunakan metode bisulfite *treatment*. Metode ini dipilih karena tujuan penelitian adalah mengetahui metilasi pada posisi tertentu, bukan mengetahui total metilasi yang terjadi. Teknik sekuensing bisulfite dianggap sebagai metode “standar emas” dalam studi metilasi DNA. Teknologi sekuensing DNA saat ini tidak mampu membedakan methylcytosine dari cytosine. Oleh karena itu, perlu perlakuan bisulfite pada DNA untuk mengetahuinya.

7.8. Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian tahap III ini adalah:

- 1) Kurkumin menyebabkan metilasi gen CDR1 pada area promotor gen.
- 2) Kombinasi Kurkumin + Flukonazol menyebabkan metilasi gen CDR1 pada area promotor gen
- 3) Kurkumin tidak menyebabkan metilasi gen Rtt109 pada area promotor gen
- 4) Kombinasi Kurkumin + Flukonazol tidak menyebabkan metilasi gen Rtt109 pada area promotor gen
- 5) Kurkumin tidak mempengaruhi HAT-Rtt109 secara langsung tetapi melalui HAT tipe lain

7.9. Saran

Perlu penelitian metilasi pada gen CDR1 dan Rtt109 untuk menunjukkan

efek Kurkumin pada area pengkode gen selain area promotor gen. Selain itu, perlu

penelitian efek Kurkumin terhadap gen HAT lainnya selain Rtt109 untuk

menemukan mekanisme epigenetik lainnya. Hasil penelitian ini juga dapat menjadi

landasan penggunaan Kurkumin dalam mencegah sebelum terjadi resistensi

antifungal.

Repository Universitas Brawijaya
PEMB
Berbagai penelitian menunjukkan

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa Kurkumin memiliki efek antifungal

(Moghadamtousi *et al.*, 2014). *Candida albicans* adalah spesies yang paling rentan terhadap Kurkumin diantara spesies *Candida*. (Martins *et al.*, 2009). Pada penelitian ini Kurkumin juga ditemukan memiliki peran terhadap resistensi antifungal pada *C. albicans*. Peningkatan dosis uji Kurkumin akan menurunkan sel

Candida resisten. Peningkatan dosis uji Kurkumin dan kombinasi Flukonazol + Kurkumin juga memberikan hasil yang sama. Penurunan sel Candida resisten paling signifikan terjadi pada kombinasi Flukonazol + Kurkumin. Bahkan

penggabungan kedua agen ini menyebabkan pertumbuhan sel *Candida* tidak terjadi sama sekali pada dosis uji tingkat ke-5 (Dosis Flukonazol 100 ug/ml + dosis Kurkumin 200 ug/ml). Pada dosis yang sama bila diberikan terpisah, Kurkumin maupun Flukonazol masih memberikan hasil pertumbuhan *Candida* yang cukup

besar bila dibandingkan kombinasi Flukonazol + Kurkumin.

Pemberian Flukonazole dengan dosis tinggi pada kasus resisten pada setting klinis tentu saja tidak bisa dilaksanakan. Meskipun Flukonazole dosis tinggi mampu menghambat pertumbuhan Candida strain resisten Flukonazole, namun dosis tersebut sulit diaplikasikan pada pasien karena efek samping dan efek toksitasnya yang sangat tinggi. Efek toksitas Flukonazol sangat berat yakni hepatotoksitas sehingga terapi Kurkumin dan kombinasi Flukonazole + Kurkumin dapat menjadi alternatif terapi melawan resistensi Candida.

Kombinasi Flukonazole + Kurkumin merupakan hasil pengamatan yang paling menarik pada penelitian ini. Beberapa studi memang

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
109
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
SAB VIII
Repository Universitas Brawijaya

BAB VIII

PEMBAHASAN UMUM

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
kan bahwa Kurkumin memiliki efek antifungal

ting sama. Penurunan sel Candida resisten terhadap uji Kurkumin dan kombinasi Flukonazol + Kurkumin. Pada penurunan sel Candida resisten terhadap uji Kurkumin dan kombinasi Flukonazol + Kurkumin yang sama. Penurunan sel Candida resisten terhadap uji Kurkumin dan kombinasi Flukonazol + Kurkumin. Bahkan

nyebabkan pertumbuhan sel Candida tidak
sama bila diberikan terpisah, Kurkumin
akan hasil pertumbuhan Candida yang cukup

ukonazol + Kurkumin.

gan dosis tinggi pada kasus resisten pada ksanakan. Meskipun Flukonazole dosis tinggi Candida strain resisten Flukonazole, namun ada pasien karena efek samping dan efek toksitas Flukonazol sangat berat yakni

rumin dan kombinasi Flukonazole + Kurkumin
dan resistensi Candida.

Kurkumin merupakan hasil pengamatan penelitian ini. Beberapa studi memang

109 Repository Universitas Brawijaya

menunjukkan bahwa Flukonazole dan Kurkumin bersinergi dalam bekerja sebagai antifungal. Namun strain yang digunakan pada penelitian ini adalah strain resisten Flukonazole, sehingga sangat mungkin bahwa mekanisme penurunan signifikan pertumbuhan *Candida* strain resisten terutama berasal dari kemampuan Kurkumin membalikkan masalah resistensi pada *Candida* resisten yang digunakan pada penelitian ini. Akibat kemampuan Kurkumin membalikkan masalah resistensi, maka Flukonazole dapat masuk ke dalam *Candida* dan bekerja sebagai antifungal yang efektif sebagaimana kerja Flukonazole saat masih belum terjadi mekanisme resistensi pada *Candida*. Penjelasan di atas akan dibuktikan pada tahap II dan III penelitian ini.

Kurkumin pada penelitian ini difokuskan pada kemampuannya mengatasi resistensi *Candida*. Namun demikian, Kurkumin sendiri memiliki kemampuan sebagai antifungal. Hal inilah yang menjelaskan hasil penelitian bahwa Kurkumin juga menghambat pertumbuhan *Candida* strain resisten Flukonazole.

Penelitian ini menggunakan *Candida albicans* strain resisten yang diambil dari isolate oropharyng pasien *human immunodeficiency virus* (HIV) RSU Ciptomangunkusumo. Pemilihan pengambilan isolate dari pasien HIV ini didasarkan atas resistensi *Candida* sering terjadi pada pasien dengan penurunan imunitas. Infeksi jamur (termasuk *Candida*) menjadi penyebab utama kesakitan dan kematian pada pasien dengan daya tahan tubuh yang rendah (misalnya HIV/AIDS). Banyak pasien yang terinfeksi HIV menerima terapi antifungal azole (termasuk fluconazole) dosis rendah yang berjangka panjang, yang mengakibatkan isolat *C. albicans* resisten azole (termasuk fluconazole).

Pemaparan berulang pada pasien *recurrent*, yang sering terjadi pada pasien HIV,

juga bisa mempengaruhi perubahan spesies *Candida*. Peningkatan dosis tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai solusi jangka panjang, oleh karena itu suatu novell therapy sangat diperlukan untuk mengatasi resistensi Fluconazole pada pasien HIV ini.

Suatu studi menunjukkan bahwa resistensi azole terjadi hingga sepertiga isolat *C. albicans* oral yang diperoleh dari pasien positif-HIV (White, et al., 2002). Studi lain menunjukkan bahwa oropharyngeal candidiasis terjadi pada hingga 90% lama perjalanan penyakit HIV. Insidensi oropharyngeal candidiasis berhubungan dengan CD4 T-lymphocyte dibawah 200 sel/mm³, viral load yang tinggi dan perjalanan lanjut penyakit. Studi Maenza et al. (1995) menunjukkan bahwa resistensi fluconazole berhubungan dengan episode pengobatan yang lebih banyak, sel CD4 yang lebih rendah, durasi penggunaan fluconazole yang lebih panjang dan penggunaan terapi sistemik. Penggunaan *highly active antiretroviral therapy* (HAART) menghasilkan supresi replikasi viral dan CD4 T-lymphocyte sehingga menurunkan oropharyngeal candidiasis. Namun demikian, oropharyngeal candidiasis masih sangat berhubungan dengan pasien HIV (Hamzah et al., 2008).

Tahap ke-2 penelitian merupakan studi analisa level protein transporter drug efflux *Candida* (*ABC transporter drug efflux*, yakni Cdr1p) dan protein acetilase histon (*Histone Acetyl Transferase- Rtt109*). Tahap ke-2 penelitian ini merupakan studi kualitatif protein dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan adanya ekspresi protein Cdr1p yang lebih jelas pada kelompok kontrol dan paparan Flukonazole dibandingkan dengan kelompok Kurkumin maupun kombinasi Flukonazole + Kurkumin. Ekspresi Cdr1p merupakan salah satu mekanisme resistensi yang utama pada *Candida*. Kemampuan hambat

Kurkumin terhadap ekspresi Cdr1p tentu saja akan menyelesaikan permasalahan resistensi pada Candida strain resisten, sehingga pemberian Fluconazole selanjutnya akan efektif bekerja melawan Candida. Hasil penelitian ini menunjukkan bagaimana mekanisme Kurkumin memang berperan dalam mengatasi masalah resistensi Candida, yakni dengan menurunkan ekspresi drug efflux transporter (Cdr1p).

Hasil studi ini sejalan dengan studi Sharma (2010). Dalam studi ini, diperiksa potensi kurkumin dalam memodulasi aktivitas efflux dari CaCdr1p dan CaCdr2p. Transporter CaCdr1p, CaCdr2p dan CaMdr1p adalah efflux pump utama yang memediasi resistensi *C. albicans*. Ketiadaan efflux akan mempertahankan konsentrasi tinggi antifungal. Candida meningkatkan resistensi Fluconazole dengan meningkatkan ekspresi multidrug efflux pumps (Martinez & Falson, 2005; White *et al.*, 1999; Casalinuovo, 2004; Cannon *et al.*, 2009). Mekanisme resistensi yang paling umum terhadap obat adalah penghilangan obat yang dimediasi oleh ATP-binding cassette (ABC) membran transporters ini. ABC transporter salah satunya adalah CDR. Overexpression dari gen CDR1 adalah sebuah mekanisme umum resistensi (White *et al.*, 1998; Bruno & Mitchell, 2005).

Studi lain juga menunjukkan bahwa efflux aktif adalah sebuah mekanisme resistensi penting terhadap antifungal azole. Studi terkini menunjukkan bahwa fungi memiliki setidaknya dua sistem efflux: (i) protein yang termasuk dalam major facilitator superfamily (MFS) dan (ii) ATP-binding cassette (ABC) superfamily of protein. MFS drug efflux protein diasosiasikan dengan transport senyawa yang berbeda secara struktural untuk sebuah rentang resistensi hingga senyawa toksik pada mikroorganisme (Ghannoum

& Rice, 1999). Strategi untuk mengatasi resistensi antifungal dapat dilakukan pada efflux pumps. Transporter CaCdr1p, CaCdr2p dan CaMdr1p adalah efflux pump utama yang memediasi resistensi *C. albicans*. Antifungal yang ideal tidak sensitif terhadap resistensi karena mekanisme efflux. Terdapat empat pendekatan utama untuk meniadakan dampak efflux, semuanya bertujuan untuk mempertahankan konsentrasi tinggi antifungal. Pendekatan yang paling sederhana adalah menggunakan antifungal yang bukan substrat efflux pumps, contohnya polyene dan echinocandin. Pendekatan lain dengan mencegah terjadinya efflux. Pendekatan ketiga adalah untuk mengosongkan sel dari energi yang dibutuhkan untuk drug efflux dengan jalan menghambat membran plasme H-ATPase (Cannon et al., 2004; Cannon et al., 2009). Faktor epigenetik sangat mempengaruhi ekspresi gen. Faktor epigenetik bisa mempengaruhi ekspresi gen tanpa mengubah gen. Faktor epigenetik antara lain adalah reaksi asetilasi histon dan metilasi DNA. Asetilasi dikatalisis oleh HAT (Histone Acetyl Transferase). Asetilasi akan mempengaruhi ekspresi protein drug efflux transporter. Asetilasi histone menyebabkan ikatan histon dengan nukleosom menjadi longgar dan memungkinkan ikatan dengan faktor transkripsi. Proses ini akan memulai transkripsi gen resistensi seperti ERG11, CDR1, dll. Asetilasi adalah bagian esensial dari regulasi gen. Oleh karenanya, asetilasi histon oleh HAT akan mempengaruhi CDR1 sehingga meningkatkan drug efflux transporter seperti Cdrp1 yang kemudian menyebabkan resistensi Candida meningkat. Li et al. (2015) juga menunjukkan bahwa enzim asetilasi dan deasetilasi histon seperti Rpd3 sangat berperan dalam resistensi azole. Studi pfafal et al. (2009) menunjukkan bahwa suatu inhibitor asetilase histon MGCD290 juga

mempengaruhi resistensi azole. Studi lain juga menunjukkan bahwa HAT sangat berkaitan dengan gen ERG11 yang juga menyebabkan resistensi (Edlind & Smith, 2002).

Kromatin adalah sebuah struktur dinamis yang dipengaruhi oleh perubahan modifikasi histone yang sering disebut sebagai faktor epigenetik.

Mekanisme epigenetik termasuk perubahan dalam metilasi DNA, modifikasi histone, dan perubahan ekspresi microRNA (miRNA) (Yoo dan Jones, 2006; Winter et al., 2009). Oleh karena itu, selain mutasi gen, suatu faktor epigenetik juga memberikan kontribusi terhadap ekspresi penyakit manusia. Sebagai akibatnya, sejumlah komponen dietary bioaktif menarik di dalam bidang epigenetik dapat menjadi target terapeutik.

Selama dekade terakhir, berkembang pengetahuan tentang biokimia Kurkumin dan dianggap sebagai sebuah epigenetik modifier yang menjanjikan.

Bukti eksperimental mendukung bahwa *dietary nutraceutical* seperti misalnya Kurkumin memiliki potensi yang sangat besar sebagai agen epigenetik (Edlind & Smith, 2002). Tidak seperti perubahan genetik, perubahan epigenetik bisa dimodifikasi oleh lingkungan, diet (makanan), ataupun intervensi farmakologi.

Karakter ini meningkatkan antusiasme untuk mengembangkan strategi-strategi terapeutik dengan menarget faktor epigenetik, seperti misalnya HDAC, HAT, DNMTs dan miRNA, dengan dietary polyphenols seperti misalnya Kurkumin.

Penyelidikan lebih jauh terhadap fitokimia sebagai agen epigenetik sangat diperlukan untuk bisa sepenuhnya mengeksplorasi potensi nutraceutical-nutraceutical dalam pengobatan penyakit.

Suatu flavonoid (misalnya Kurkumin) diduga merupakan agen yang dapat menjadi inhibitor HAT (Balasubramanyam et al., 2003;

Balasubramanyam *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007; Mantelingu *et al.*, 2007; Marcu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Kurkumin menunjukkan sinergi dengan fluconazole dalam menurunkan ergosterol ini (Sharma *et al.*, 2012).

Kurkuminoid telah dilaporkan dapat membalikkan fenotipe resistensi obat pada sel kanker yang mengalami overexpressing ABC transporters (Gottesman *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2009. Meskipun Kurkumin merupakan inhibitor HAT, namun Kurkumin tidak menghambat HAT-Rtt109.

Bagaimana pathway dari efek Kurkumin ini akan dijelaskan pada hasil studi insilico tahap III penelitian ini.

Baru-baru ini ditemukan bahwa suatu enzim Histone Acetyl Transferase (HAT) Rtt109, enzim yang hanya ada dalam kingdom fungal, diperlukan untuk patogenisitas fungal (Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Wurtele *et al.*, 2012). Tanpa Rtt109, fungal hipersensitif terhadap efek genotoksik dari Reactive Oxygen Species (ROS) yang dilepaskan oleh sel fagositik dari sistem imun mamalia, gangguan repair gen dan gangguan respon stress drug efflux transporter. HAT Rtt109 sepenuhnya bertanggung jawab untukasetilasi histone H3 lysine 56 (H3K5) pada ragi (Han *et al.*, 2007a; Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2006; Xhemalce *et al.*, 2007; Lopes da Rosa *et al.*, 2010). Inhibisi HAT Rtt109 sangat mungkin mempengaruhi respon stress dan ekspresi transporter Cdrp1 sehingga akan menurunkan resistensi antifungal.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi HAT-Rtt109 tidak berbeda pada ke-4 kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa memang Kurkumin tidak berpengaruh terhadap protein ini. HAT-Rtt109 merupakan enzim asetilasi protein yang sangat penting untuk respon stress Candida. Oleh karenanya, agen yang mampu menghambat HAT-Rtt109 akan berfungsi sangat toksik bagi

Candida. Terlebih lagi protein ini eksklusif hanya terdapat pada kingdom fungal.

Hambatan pada protein ini berarti hanya berefek merusak bagi Candida saja dan tidak pada inang.

Curcumin (dari kunyit), asam anarcadic (dari minyak kacang mede) dan

garcinol (dari buah *Garcinia indica*) adalah senyawa alami yang memiliki efek

inhibisi terhadap tiga anggota famili HAT, termasuk p300, Gcn5 dan Tip60

(Balasubramanyam *et al.*, 2003; Balasubramanyam *et al.*, 2004; Cui *et al.*,

2007; Mantelingu *et al.*, 2007; Marcu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Namun

hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Kurkumin tidak memberikan efek pada

HAT-Rtt109. Namun demikian, terdapat jenis HAT lainnya yang sangat

mungkin dipengaruhi oleh Kurkumin. Pengaruh Kurkumin pada HAT lainnya

juga dapat secara tidak langsung mempengaruhi HAT-Rtt109. Beberapa protein

terkait proses asetilasi, seperti GCN5 (Acetyltransferase), HHT1 (Histone H3),

HHT2 (Histone H3), HHF1 (Histone H4), HHF2 (Histone H4) serta ASF1

(Nucleosome assembly factor).

Hasil penelitian di atas yang menunjukkan bahwa Kurkumin mempengaruhi

ekspresi Cdr1p namun tidak melalui HAT-Rtt109 memunculkan dugaan bahwa

ada mekanisme lain yang menyebabkan Kurkumin dapat mempengaruhi Cdr1p.

Faktor yang diduga merupakan jalur yang menyebabkan Kurkumin menurunkan

Cdr1p diduga adalah pengaruh Kurkumin terhadap metilasi. Metilasi merupakan

salah satu faktor epigenetik yang secara teori dapat mempengaruhi ekspresi gen.

Oleh karena itu, perlu penelitian lanjutan mengenai pengaruh Kurkumin terhadap

metilasi gen.

Hasil studi invitro ini sejalan dengan hasil studi insilico, dimana Curcumin

tidak menghambat RTT109 (Histon Acetyltransferase) melalui interaksi secara

langsung, tetapi berinteraksi secara tidak langsung dengan beberapa protein terkait proses asetilasi, seperti GCN5 (Acetyltransferase), HHT1 (Histone H3), HHT2 (Histone H3), HHF1 (Histone H4), HHF2 (Histone H4) serta ASF1 (Nucleosome assembly factor).

Metilasi DNA merupakan salah satu reaksi epigenetik melalui penambahan gugus metil pada sitosin. Metilasi dapat mengubah aktivitas DNA tanpa mengubah sekuen gen. Metilasi DNA merepresikan transkripsi secara langsung dengan menghambat binding faktor transkripsi. Metilasi DNA memainkan sebuah peranan esensial dalam meregulasi proses-proses biologis (Esteller, 2007). Metilasi DNA adalah sebuah modifikasi yang dapat diwariskan. Struktur DNA yang tidak berubah tapi bisa secara langsung menghambat ekspresi gen (Das dan Singal, 2004). Peningkatan metilasi pada CpG island spesifik di dalam area promotor gen di gen-gen spesifik bisa menghasilkan silencing transkripsi (Ehrlich, 2009). Metilasi DNA diregulasi oleh metyltransferase DNA (DNMT1, DNMT3a, dan DNMT3b) dengan keberadaan S-adenosyl-methionine, yang berfungsi sebagai sebuah donor metil untuk metilasi residu sitosin pada posisi C-5 untuk menghasilkan 5-methylcytosine (Herman dan Baylin, 2003). Metilasi residu sitosin dalam 5'-cytosine-guanosine (CpG) di area promotor gen adalah sebuah mekanisme epigenetik yang mengontrol transkripsi gen, stabilitas genom dan genetik imprinting. Metilasi diregulasi oleh sekelompok enzim yang disebut DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT3a dan DNMT3b) dengan adanya S-adenosyl-methionine (SAM). SAM berfungsi sebagai sebuah donor metil untuk metilasi residu sitosin di posisi C-5 untuk menghasilkan 5-methylcytosine. Beberapa studi penelitian telah menunjukkan bahwa silencing tumor suppressor genes (TSG) karena hypermetilasi dari promotor CpG island

(>55% kandungan CG) (Boyanapalli & Kong, 2015). Metilasi dapat mengubah aktivitas DNA tanpa mengubah sekuen gen. Bila berada pada gen promotor maka metilasi DNA akan merepresi transkripsi gen. DNA sangat penting bagi pertumbuhan sel termasuk *genomic imprinting* (Ehrlic *et al.*, 1982; Dodge *et al.*, 2001; Lister *et al.*, 2009).

Di dalam penelitian ini, dipelajari peranan Kurkumin dalam metilasi DNA dan modifikasi histone melalui regulasi HAT. Hanya sejumlah kecil laporan yang telah menyelidiki pengaruh curcumin terhadap metilasi DNA (Liu *et al.*, 2009).

Namun, sebuah studi penelitian menunjukkan bahwa Kurkumin hanya memiliki sedikit atau tidak ada aktivitas sebagai sebuah inhibitor DNMT (Medina-Franco *et al.*, 2010). Untuk mengklarifikasi kontradiksi ini, lebih banyak riset penelitian perlu dilakukan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok paparan Kurkumin dan kombinasi Flukonazole + Kurkumin menghasilkan metilasi pada CDR1. Metilasi DNA yang disebabkan oleh Kurkumin akan menghasilkan *silencing* gen. Pada *Candida* strain resisten, terjadi *silencing* CDR1 sehingga ekspresi Cdr1p menurun. Hal ini sejalan dengan hasil pada penelitian tahap ke-2 dimana memang pada kelompok Kurkumin dan kombinasi Flukonazole + Kurkumin menunjukkan penurunan ekspresi Cdr1p. Hasil ini juga membuktikan bahwa Kurkumin merupakan agen yang

sangat mempengaruhi epigenetik, yaitu metilasi DNA dan modifikasi histone. Meskipun Kurkumin merepresi gen, namun pengaruh ini reversible. Selain mekanisme *silencing* gen dengan menyebabkan metilasi, Kurkumin juga menghambat transkripsi melalui inhibisi asetilasi histon.

Inhibisi asetilasi menyebabkan histon berkondensasi sehingga replikasi DNA tidak berjalan. Hasil akhir dari inhibisi HAT ini adalah *silencing* gen. Hasil penelitian ini sejalan dengan studi Link *et al.* (2013). Studi ini menunjukkan bahwa Kurkumin memodulasi metilasi DNA pada sel kanker kolorektal. Perubahan metilasi DNA terinduksi-curcumin terjadi dalam cara yang bergantung-waktu (time-dependent). Pengobatan dengan curcumin menghasilkan perubahan metilasi di lokasi yang termetilasi parsial tertentu, dan bukannya di lokasi CpG termetilasi penuh. Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan studi Boyanapalli & Kong (2015), dimana Kurkumin menurunkan metilasi DNA. Curcumin tidak menghambat RTT109 (Histon Acetyltransferase) melalui interaksi secara langsung, tetapi berinteraksi secara tidak langsung dengan beberapa protein terkait proses asetilasi, seperti GCN5 (Acetyltransferase), HHT1 (Histone H3), HHT2 (Histone H3), HHF1 (Histone H4), HHF2 (Histone H4) serta ASF1 (*Nucleosome assembly factor*). HAT memodulasi ekspresi gen dengan mengkatalisis target asetilasi dari kelompok asam amino yang memiliki residu lisin pada protein histon dan non-histon. HAT dapat diklasifikasikan menjadi beberapa famili berdasarkan struktur motif yang bersifat highly conserved, seperti famili GNAT (contoh: GCN5). Curcumin (dari kunyit), asam anarcadic (dari minyak kacang mede) dan garcinol (dari buah *Garcinia indica*) adalah senyawa alami yang memiliki efek inhibisi terhadap tiga anggota famili HAT, termasuk p300, Gcn5 dan Tip60 (Balasubramanyam *et al.*, 2003; Balasubramanyam *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007; Mantelingu *et al.*, 2007; Marcu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Namun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Kurkumin tidak memberikan efek pada

HAT-Rtt109. Namun demikian, terdapat jenis HAT lainnya yang sangat mungkin dipengaruhi oleh Kurkumin. Pengaruh Kurkumin pada HAT lainnya juga dapat secara tidak langsung mempengaruhi HAT-Rtt109. Beberapa protein terkait proses asetilasi, seperti GCN5 (Acetyltransferase), HHT1 (Histone H3), HHT2 (Histone H3), HHF1 (Histone H4), HHF2 (Histone H4) serta ASF1 (*Nucleosome assembly factor*).

9.1. Kesimpulan

- Kesimpulan pada penelitian ini sebagai berikut:
- 1) Kurkumin menghambat pertumbuhan *Candida* strain resisten Flukonazole.
 - 2) Kombinasi Kurkumin + Flukonazol menunjukkan sinergisme dalam menghambat pertumbuhan *Candida* strain resisten Flukonazol bila dibandingkan dengan Kurkumin saja maupun Flukonazol saja pada invitro dengan MIC kombinasi Kurkumin + Flukonazole adalah 6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
 - 3) Kurkumin dan Kombinasi Kurkumin + Flukonazole menurunkan ekspresi Cdr1p tetapi tidak menurunkan ekspresi HAT-Rtt109.
 - 4) Kurkumin dan Kombinasi Kurkumin + Flukonazol menyebabkan metilasi gen CDR1 tetapi tidak menyebabkan metilasi gen Rtt109 pada area promotor gen.
 - 5) Kurkumin tidak mempengaruhi HAT-Rtt109 secara langsung tetapi melalui HAT tipe lain.

9.2. Saran

Perlu penelitian metilasi pada gen CDR1 dan Rtt109 untuk menunjukkan efek Kurkumin pada area pengkode gen selain area promotor gen. Selain itu, perlu penelitian efek Kurkumin terhadap gen HAT lainnya selain Rtt109 untuk menemukan mekanisme epigenetik lainnya. Hasil penelitian ini juga dapat menjadi landasan penggunaan Kurkumin dalam mencegah sebelum terjadi resistensi antifungal. Hasil studi ini juga dapat diekstrapolasi untuk penelitian peran Kurkumin mengatasi resistensi antibiotik yang juga memiliki mekanisme drug efflux

transporter yang pada penelitian ini ditemukan merupakan target kerja Kurkumin melawan resistensi obat.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Akins, R. A. 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 43: 285–318.
- Al-Rubaei ZM, Mohammad, TU, Ali, LK. 2014. Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity in vivo study. *Pak J Biol Sci*. 17(12):1237-41.
- Andes, D. 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin North Am* 20:679–97.
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A., and Kundu, T.K. 2003. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *The Journal of biological chemistry* 278: 19134-19140.
- Balasubramanyam, K., Varier, R.A., Altaf, M., Swaminathan, V., Siddappa, N.B., Ranga, U., and Kundu, T.K. 2004. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *The Journal of biological chemistry* 279: 51163-51171.
- Békési, A., Vértesy, BG. 2011. "Uracil in DNA: error or signal?" Published on line on <http://www.scienceinschool.org/2011/issue18/uracil>.
- Biomedical Chemistry page. *Regulation of Glycogen Synthesis*. 2016. Published on line on <http://themedicalbiochemistrypage.org/glycogen.php#synthreg>.
- Bruno, V. M., Mitchell, A. P. 2005. Regulation of azole drug susceptibility by *Candida albicans* protein kinase CK2. *Mol Microbiol* 56: 559–573.
- Cannon, RD, Lamping, E, Holmes, AR, Niimi, K, Baret, PV, MV, Kenya, Tanabe, K, Niimi, M, Goffeau, A, Monk, BC. 2009. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* Apr.: 291–321.
- Casalihuovo, I.A., Di Francesco, P., Garaci, E. 2004. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*; 8: 69-77.
- Chakrabarti, A. 2011. Drug resistance in fungi – an emerging problem. *Regional Health Forum* 15 (1): 97-103.
- Chatterjee A, Stockwell PA, Rodger EJ and Morison IM. 2012. Comparison of alignment software for genome-wide bisulphite sequence data. *Nucleic Acids Research* 40(10): e79.
- Churchill, M., Chadburn, A., Bilinski, RT., Bertagnoli, MM. 2000. Inhibition of intestinal tumors by Curcumin is associated with changes in the intestinal immune cell profile. *Journal of Surgery Research* 13: 201-8.
- Cui, L, Miao, J, Cui, L. 2007. Cytotoxic Effect of Curcumin on Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*: Inhibition of Histone Acetylation and Generation of Reactive Oxygen Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (2): 488–494.

- Cui, L., Miao, J., and Cui, L. (2007). Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite Plasmodium falciparum: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 488-494.
- Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Lam, W.M., Skordalakes, E., Zhang, R., Mantelingu, K., Reddy, B.A.A., Swaminathan, V., Kishore, A.H., Siddappa, N.B., Kumar, G.V.P., Nagashankar, G., Natesh, N., Roy, S., Sadhale, P.P., et al. 2007. Specific inhibition of p300-HAT alters global gene expression and represses HIV replication. *Chemistry & Biology* 14: 645-657.
- D'Arcy S, Luger K. 2011. Understanding histone acetyltransferase Rtt109 structure and function: how many chaperones does it take? *Curr Opin Struct Biol.* 2011 21(6): 728-34.
- Dodge, JE; Ramsahoye, BH; Wo, ZG; Okano, M; Li, E. 2002. De Novo Methylation of MMLV Provirus in Embryonic Stem Cells: CpG versus non-CpG Methylation. *Gene* 289 (1-2): 41-48.
- Ehrlich M; Gama Sosa MA; Huang L-H.; Midgett RM; Kuo KC; McCune RA; Gehrke C. 1982. "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells". *Nucleic Acids Research.* 10 (8): 2709–2721. doi:10.1093/nar/10.8.2709. PMC 320645. PMID 7079182.
- Gallinari, P.; Di Marco, S.; Jones, P.; Pallaoro, M.; Steinkuhler, C. 2007. HDACs, Histones Deacetylation and Gene Transcription: from Molecular Biology to Cancer Therapeutics. *Cell Research* 17(3): 195-211.
- Ghannoum, MA; Rice, LB. 1999. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 0893-8512/99/\$04.00/10 Oct. p. 501-517.
- Gottesman, M. M., Fojo, T., Bates, S. E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2:48–58.
- Gow, Hube 2012. The role of chitin in *C. albicans*: Cell wall, commensalism and infection. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology* 15:1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.005>
- Gow, N.A., Brown, A.J., Odds, F.C. 2002. Fungal Morphogenesis and Host Invasion. *Curr. Opin Microbiol.* (5): 366-371.
- Gow, N.A.R. (2017). "Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans". *Microbiology*. 163: 1145–1147.
- Guo, N., Wu, X., Yu, L., Liu, J., Meng, R., Jin, J., Lu, H., Wang, X., Yan, S., Deng, X. 2009. In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazoleresistant *Candida albicans* determined by alternative methods. *FEMS Immunol Med Mic* 58: 193–201.
- Guo, Q., Sun, S., Yu, J., Li, Y., Cao, L. 2008. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. *J Med. Microbiol* 57: 457–462.

- Hamza, OJM., Matee, MI., Moshi, MJ., Simon, ENM., Mugusi, F., Mikx, FHM., Helderman, W., Rijs, AJAM., van der Ven, Verweij, PE. 2008. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis *BMC Microbiology* 8: 135.
- Han, J., Zhou, H., Horazdovsky, B., Zhang, K., Xu, R.M., and Zhang, Z. (2007a). Rtt109 Acetylates Histone H3 Lysine 56 and Functions in DNA Replication. *Science* 315: 653-655.
- Hatchera, R. Planalpb, J. Chob, F. M. Tortia, S. V. Tortic. 2008. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cell. Mol. Life Sci. DOI 10.1007/s00018-008-7452-4. Birkhäuser Verlag, Basel*:1-22.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (September 1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (18): 9821–6.
- Kanafani, ZA, Perfect, JR. 2008. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Antimicrobial Resistance January CID*; 46 (1): 119-128.
- Kohli, A., Smriti, K., Mukhopadhyay, A., Rattan, Prasad, R. 2002. In vitro low-level resistance to azoles in *Candida albicans* is associated with changes in membrane lipid fluidity and asymmetry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1046–1052.
- Kumar, A., Dhamgaye, S., Maurya, IK, Singh, A., Sharma, M., Prasad, R. 2014. Curcumin Targets Cell Wall Integrity via Calcineurin-Mediated Signaling in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1): 167–175.
- Lee, W, Lee, DG. 2014. An Antifungal Mechanism of Curcumin Lies in Membrane-Targeted Action within *Candida albicans*. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 66 (11): 780–785.
- Li, X., Cai, Q., Mei, H., Zhou, X., Shen, Y., Li, D., Liu, W. 2015. The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 70: 1993–2003.
- Liscovitch, M., Lavie, Y. 2000. Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways? *Trends Biochem. Sci.* 25: 530–537.
- Lister, R; Pellizola, M; Dowen RH. 2009. Human DNA Methylomes at Base Resolution Show Widespread Epigenomic Differences. *Nature* 462 (7271): 315-22.
- Liu, Y., Shepherd, EG, Nelin, LD. 2007. MAPK phosphatases-regulating the immune response. *Nature Reviews Immunology*, 7(3): 202-212.
- Löffler, J., H. Einsele, H. Hebart, U. Schumacher, C. Hrafnik, and G. Daum. 2000. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 59–63.
- Looi, CY, Silva, EC., Seow, HF., Rosli, R., Ng, KP, Chong, PP. 2005. Increased Expression and Hotspot Mutation of The Multidrug Efflux Transporter,

- CDR1 in Azole-Resistant *Candida albicans* Isolates from Vaginitis. *FEMS Microbiology Letters* 249: 283-289.
- Maenza, JR., Keruly, JC., Moore, RD., Chaisson, RE., Merz, WG., Gallant, JE. 1996. Risk Factors for Fluconazole-Resistant Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *The Journal of Infectious Diseases* 173: 219-225.
- Majeed, M., Badmaev, V., Shikumar, U. and Rajendran, R. 1995. *Curcuminoid, Antioksidant Phytonutrients*. Piscataway, Nutriscience Publishers, Inc. New Jersey.
- Marcu, M.G., Jung, Y.-J., Lee, S., Chung, E.-J., Lee, M.-J., Trepel, J., and Neckers, L. 2006. Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Medicinal chemistry* 2: 169-174.
- Martin, SW., Konopka, J. 2004. Lipid rafts polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 3: 675-684.
- Martinez, L., Falson, P. 2014. Multidrug resistance ATP-binding cassette membrane transporters as targets for improving oropharyngeal candidiasis treatment. *Advances in Cellular and Molecular Otolaryngology* 2: 23955 - <http://dx.doi.org/10.3402/acmo.v2.23955>
- Martins, D. L. Da Silva, A. T. M. Neres. 2009. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63(2): 337-339.
- Mehrotra, S., Agnihotri, G., Singh, S., Jamal F. 2013. Immunomodulatory potential of Curcuma longa: A review. *South Asian J Exp Biol* 3 (6): 299-307.
- Moghadamousi, SZ, Kadir, AH, Hassandarvish, P., Tajik, H. Abubakar, S., Zandi, K. 2014. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *Hindawi Publishing Corporation*. BioMed Research International. Volume, Article ID 186864, 12 pages.
- Morschhauser, J. 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 47: 94-106.
- Mukhopadhyay, K. Prasad, T., Saini, P., Pucadyil, TJ, Chattopadhyay, A., Prasad, R. 2004. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (5): 1778-87.
- Netea, M. G., de Graaf, C., Vonk, A., Verschueren, I., Van der Meer, J. W. M., Kullberg, B. J. 2002. The role of Toll-like receptors in the defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.* 185: 1483.
- Netea, MG., Van der Graaf, CAA., Vonk, AG., Verschueren, I., Van der Meer, JWM., Kullberg. 2002. The Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 in the Host Defense against Disseminated Candidiasis. *J Infect Dis.* 185 (10): 1483-1489.
- Nishi, I., Sunada, A., Toyokawa, M., Asari, S., Iwatani, Y. 2009. In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. *J Infect Chemother* 15: 1-5.

- Nucci, M., Marr, KA. 2005. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Emerging fungal diseases. Clin Infect Dis.* 41: 521–6.
- Oakley, A. 2014. *Vulvovaginal candidiasis*. DermNet New Zealand Trust. Published online on <http://www.dermnetnz.org/fungal/vaginal-candidiasis.html>.
- Pfaller, MA, Diekema, DJ, Rinaldi, MG. 2005. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 43:5848–59.
- Pfaller, MA, Diekema, DJ, Sheehan, DJ. 2006. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 19: 435–47.
- Pfaller, MA, Diekema, DJ. 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* 10(Suppl 1):11–23.
- Pfaller, MA, Messer SA, Georgopapadakou, N., Martell, LA, Besterman, JM., Diekema, DJ. 2009. Activity of MGCD290, a Hos2 Histone Deacetylase Inhibitor, in Combination with Azole Antifungals against Opportunistic Fungal Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 47 (12): 3797–3804.
- Prasad R, Banerjee A, Khandelwal NK, Dhamgaye S. 2015. The ABCs of *Candida albicans* multidrug transporter Cdr1. *Eukaryot Cell* 14:1154 –1164.
- Prasad, R., Kapoor, K. 2005. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* 242: 215–248. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)42005-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(04)42005-1).
- Rana, Ajay K., Ankri, Serge. 2016. "Reviving the RNA World: An Insight into the Appearance of RNA Methyltransferases" Published online on <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2016.00099/full>
- Samoraes, P., Taketomi, EA, Immunology of the Vagina. 2000. *AstraZeneca Pharm* 85:253-267
- Sanglard, D, Bille, J. 2002. Current understanding of the modes of action of and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections. In *Candida and Candidiasis*: 349–383. Edited by R. A. Calderone. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Seitsma, H., Veldman, R. J., Kok, J. W. 2001. The involvement of sphingolipids in multidrug resistance. *J. Membr. Biol.* 181: 153–162.
- Shapiro, RS, Robbins, N, Cowen, LE. 2011. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75:213-67.
- Sharma M., Manoharlal R., Negi A. S., and Prasad R. 2010. "Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis," *FEMS Yeast Research* 10 (5): 570–578.

- Sharma, M., Dhamgaye, S., Singh, A., Prasad, R. 2012. Lipidome analysis reveals antifungal polyphenol curcumin affects membrane lipid homeostasis. *Front. Biosci. (Elite ed.)* 4:1195–1209. <http://dx.doi.org/10.2741/451>.
- Sharma, R., Manoharlal, N., Puri, R., Prasad. 2010. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*, *Bioscience Reports* 30(6): 391–404.
- Singh, RP, Jain, DA. 2012. Evaluation of antimicrobial activity of curcuminoids isolated from turmeric. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3(1): ISSN: 0976-7126.
- Smith, WL, Edlind, TD. 2002. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance *Candida albicans* Sensitivity to Azoles and Related Antifungals: Correlation with Reduction in CDR and ERG Upregulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11): 3532–3539.
- Stevenson, J.S., and Liu, H. 2011. Regulation of white and opaque cell-type formation in *Candida albicans* by Rtt109 and Hst3. *Molecular Microbiology* 81: 1078-1091.
- Sullivan, DJ, Moran, GP, Pinjon, E, Al-Mosaid, A, Stokes, C, Vaughan, C, Coleman, DC. 2004. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 4 (4-5): 369-76.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings 102 of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 13182- 13187.
- Thangapazham, R., Sharma, A., Maheshwari, R. K. 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J* 8, E443–449.
- Tsubota, T., Berndsen, C.E., Erkmann, J.A., Smith, C.L., Yang, L., Freitas, M.A., Denu, J.M., and Kaufman, P.D. 2007. Histone H3-K56 acetylation is catalyzed by histone chaperone-dependent complexes. *Molecular cell* 25: 703-712.
- Urban, CF., Ermert, D., Schmid, M. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 5 (10) Article ID e 1000639.
- Urban, CF., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cellular Microbiology* 8 (4): 668-676.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., Coste, AT. 2012. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol.* 2012: 713687.
- Verdin, Ott. 2015. from 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16: 258–264.

- Verdone, L.; Agricola, E; Caserta, M; Di Mauro, E. 2006. Histone Acetylation in Gene Regulation. *Briefing in Functional Genomics & Proteomics* 5(3): 209-21
- Vermitsky, JP, Edlind, TD. 2004. Azole Resistance in *Candida glabrata*: Coordinate Upregulation of Multidrug Transporters and Evidence for a Pdr1-Like Transcription Factor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (10): 3773-3781.
- Wang, G, Allis, CD, Chi, P. 2007. "Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling." *Trends Mol Med.* 13 (9): 373-80.
- Watson, JD, Baker, TA, Gann, A, Levine, M, Losik, R. 2014. *Molecular Biology of the Gene*. Boston: Pearson/CSH Press
- Weig, M., Muller, FM. 2001. Synergism of voriconazole and terbinafine against *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Ch* 45: 966-968.
- White, TC, Marr, KA, Bowden, RA. 1998. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 0893-8512/98/\$04.00/10: 382-402.
- Wright, G. D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 5: 175-186.
- Wurtele, H., Kaiser, G.S., Bacal, J., St-Hilaire, E., Lee, E.-H., Tsao, S., Dorn, J., Maddox, P., Lisby, M., Pasero, P., et al. 2012. Histone h3 lysine 56 acetylation and the response to DNA replication fork damage. *Molecular and Cellular Biology* 32: 154-172.
- Zhou, H., Beevers, CS., Huang, S. 2011. Targets of curcumin. *Curr Drug Targets*. 12 (3): 332-347.

Lampiran 1. Elektroforesis

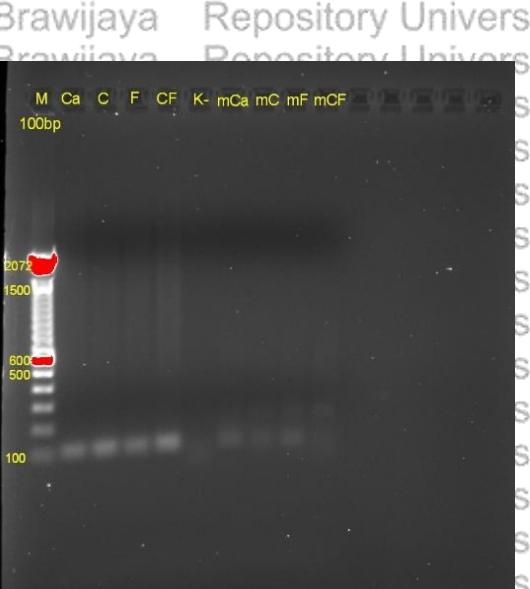
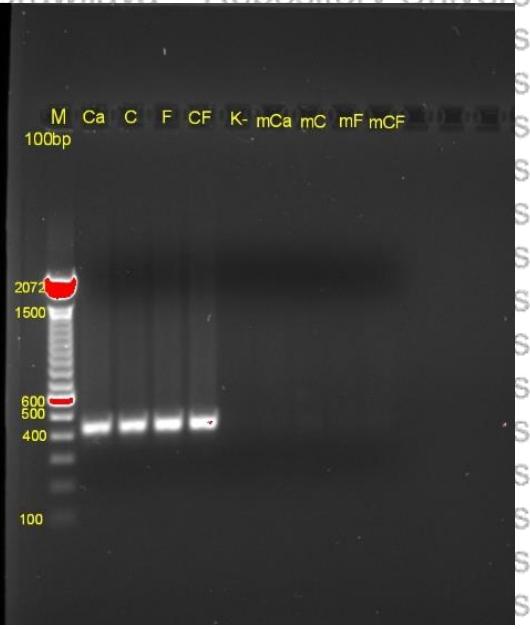
Top Gel Lanes: M, Ca, C, F, 100bp

Bottom Gel Lanes: M, Ca, C, F, CF, 100bp

Marker sizes (bp): 2072, 1500, 600, 500, 100

Keterangan:
Warna merah bukan merupakan b
reader

Warna merah bukan merupakan bagian hasil laboratorium melainkan hasil mesin reader.



A photograph of an agarose gel electrophoresis (PAGE) result. The gel has a dark background and a white central region where the lanes are visible. There are 12 distinct lanes labeled from left to right: F, K-, mCa, mC, mF, mCF, and three lanes labeled with question marks (?). Each lane shows a series of bands of varying intensity, indicating the presence and quantity of different DNA fragments. The labels are positioned above the gel, with 'F' and 'K-' on the far left, followed by a group of three labels (mCa, mC, mF), and then another group of three labels (mCF, ?, ?).

A large black rectangular redaction box covers the central portion of the page, obscuring most of the text content. The visible text at the top left corner reads "Repository Universitas Brawijaya" and "Repository Universitas Brawijaya". The visible text at the bottom right corner reads "sitas Brawijaya".

Repository Universitas Brawijaya
Lampiran 2. Pre
Repository Universitas Brawijaya

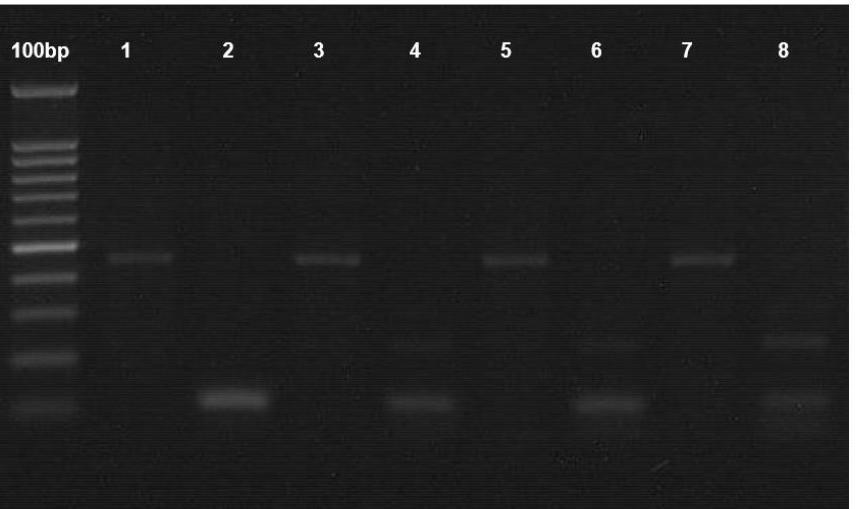
Lampiran 2. Pretreatment Sequence Gene

Repository Universitas Brawijaya
treatment Sequence Gene
Repository Universitas Brawijaya

Order ID: 133023 Order Type: Enhance
PT. Genetika Science Indonesia,
Ruko Puri Mansion, Blok A No 19.
Jl. Lingkar Luar Barat Puri Kembangan.
Jakarta Barat, 11610, Indonesia.
Attn : Mr. Wiardii Tarina Widaningrum

Lane #	SampleName	SamType	SamSize	Volume	Progress	Comments	Following Action
1	K_CaCDR	Unpurified PCR Product	450	25	Proceed	PCR clean up.	
2	K_RTT	Unpurified PCR Product	150	25	Proceed	PCR clean up.	
3	Ca_CaCDR	Unpurified PCR Product	450	25	Proceed	PCR clean up.	
4	Ca_RTT	Unpurified PCR Product	150	25	Proceed	Gel Extraction. Multiple band observed.	
5	F5_CaCDR	Unpurified PCR Product	450	25	Proceed	PCR clean up.	
6	F5_RTT	Unpurified PCR Product	150	25	Proceed	Gel Extraction. Multiple band observed.	
7	CF_CaCDR	Unpurified PCR Product	450	25	Proceed	PCR clean up.	
8	CF_RTT	Unpurified PCR Product	150	25	Wait customer confirm	Multiple band observed, band too close to cut. If insist proceed, please circle band of interest Result will not be guaranteed	Gel Extraction. Yield is not guaranteed. Result is not guaranteed.

Order ID: 133023



Amount of DNA ladder loaded per lane: 0.2ug each

Volume of Sample loaded per lane: 1uL each

100bp DNA Ladder (bp): 100, 200, 300, 400, **500**, 600, 700, 800, 900, 1000, **1500**

100bp DNA Ladder (ng/0.2ug): 16, 16, 14, 16, **34**, 12, 11, 16, 16, 20, **29**

Note: The DNA ladder is not applicable for sizing comparison of non-linear DNA samples (e.g. plasmid DNA)

Lampiran 3. Nanodrop Result Post DNA Isolation

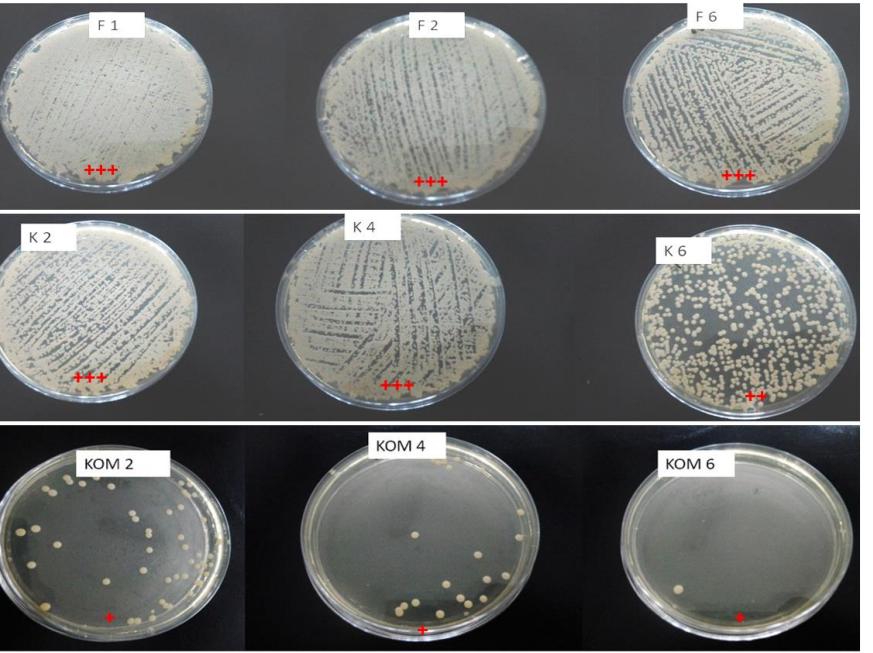
ID	mg/ml	A280 10 mm
K	32,61	32,614
C	35,55	35,550
F	38,54	38,540
C	35,73	35,728

Tanggal 9/5/2017; Pukul 11.55 PM

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 4. Preliminary Study (Kualitatif)

FLUCONAZOLE



KURKUMIN

KOMBINASI

Keterangan:
+++ : koloni sangat padat ++ : koloni padat + : koloni jarang

Keterangan:

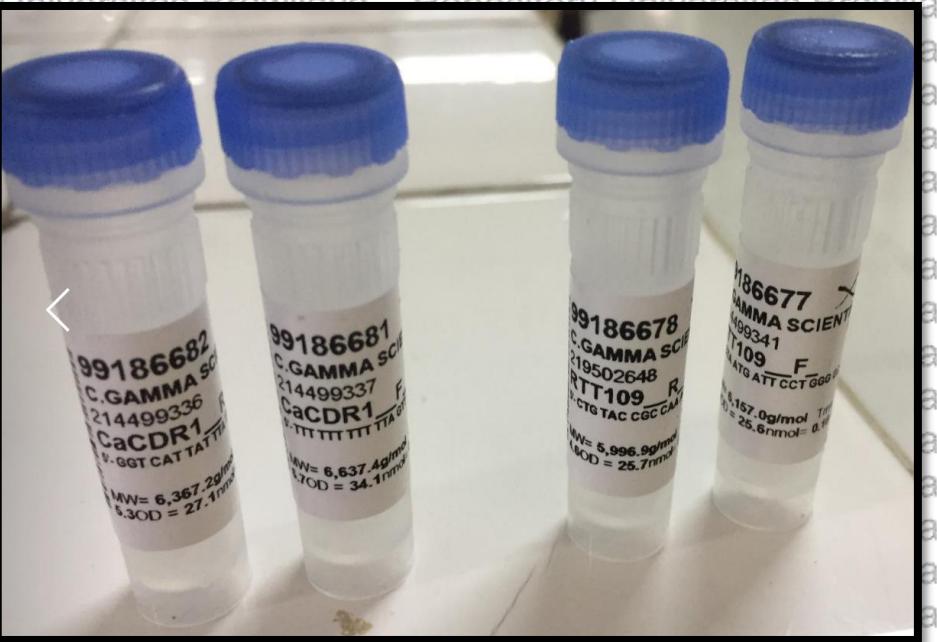
Pengamatan kualitatif terhadap pertumbuhan koloni Candida resisten.

Lampiran 5. Isolasi DNA



Lampiran

Lampiran 6. Construct Primer



The image shows two clear plastic vials with blue screw-on caps. The vial on the left is labeled "99186678" and "C. GAMMA SCIE". Below this, it says "219502648", "RTT109", and "R". It also contains handwritten text: "Molar = 5,996.9 pmol/mol" and "OD260 = 25.7 nmol". The vial on the right is labeled "186677" and "GAMMA SCIENT". Below this, it says "499341", "T109", and "F". It also contains handwritten text: "Molar = 5,157.0 pmol/mol" and "OD260 = 25.6 nmol". Both vials appear to contain a clear liquid.

Repository Universitas Brawijaya
Lampiran 7. Ma
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 7. Material Transfer Agreement

FORMULIR PERJANJIAN PENGGUNAAN MIKROBA

NAMA : dr. Novida Ariani SpOG, M.Kes
INSTITUSI : Mahasiswa Program Doktor Ilmu Kedokteran FK
Universitas Brawijaya
ALAMAT : Laboratorium Mikrobiologi FK Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang, Jawa Timur, 65145

Telah menerima Jamur : *Candida albicans* strain Resisten Flukonazole

Dari Bagian Mikrobiologi FKUI Jakarta / RSCM

Dengan Tujuan : Penelitian Program Doktor Ilmu Kedokteran FKUB

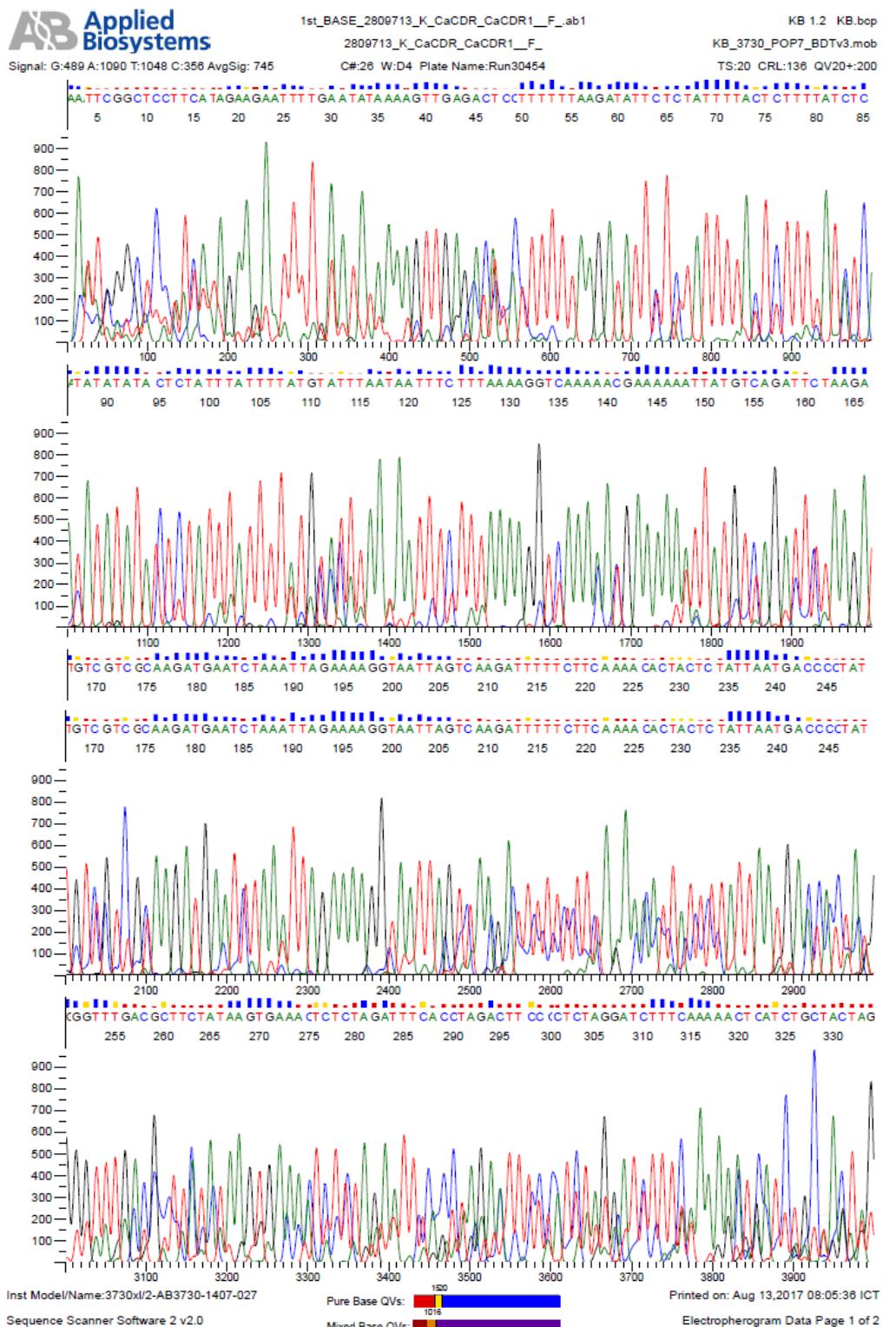
Berionii behwe

1. Tidak akan digunakan untuk tujuan komersil

Repository Universitas Brawijaya
rial Transfer Agreement
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

2. Tidak akan diserahkan pada pihak ke tiga tanpa persetujuan Bagian Mikrobiologi FKUI
 3. Tidak akan disalahgunakan sehingga dapat merugikan masyarakat
 4. Sumber mikroba tersebut diatas harus dituliskan pada publikasi ilmiah yang akan dipresentasikan/dipublikasikan
 5. Apapun hasil yang ditemukan terkait *Candida albicans* resisten Flukonazol untuk publikasi dan paten, maka akan mencantumkan sumber isolate dari Dr. dr. Yeva Rosana, MS, SpMK(K) sebagai peneliti dari Bagian Mikrobiologi FKUI/RSCM Jakarta

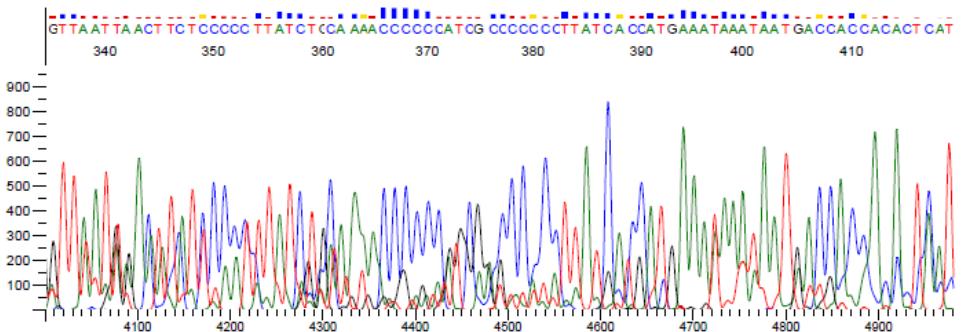
Apabila perjanjian penggunaan mikroba tersebut di atas disalahgunakan/dilanggar maka akan dikenakan sanksi berupa tidak

Lampiran 8. Sequence Result



AB Applied
Biosystems

Signal: G:489 A:1090 T:1048 C:356 AvgSig: 745



Inst Model/Name:3730xl/2-AB3730-1407-027

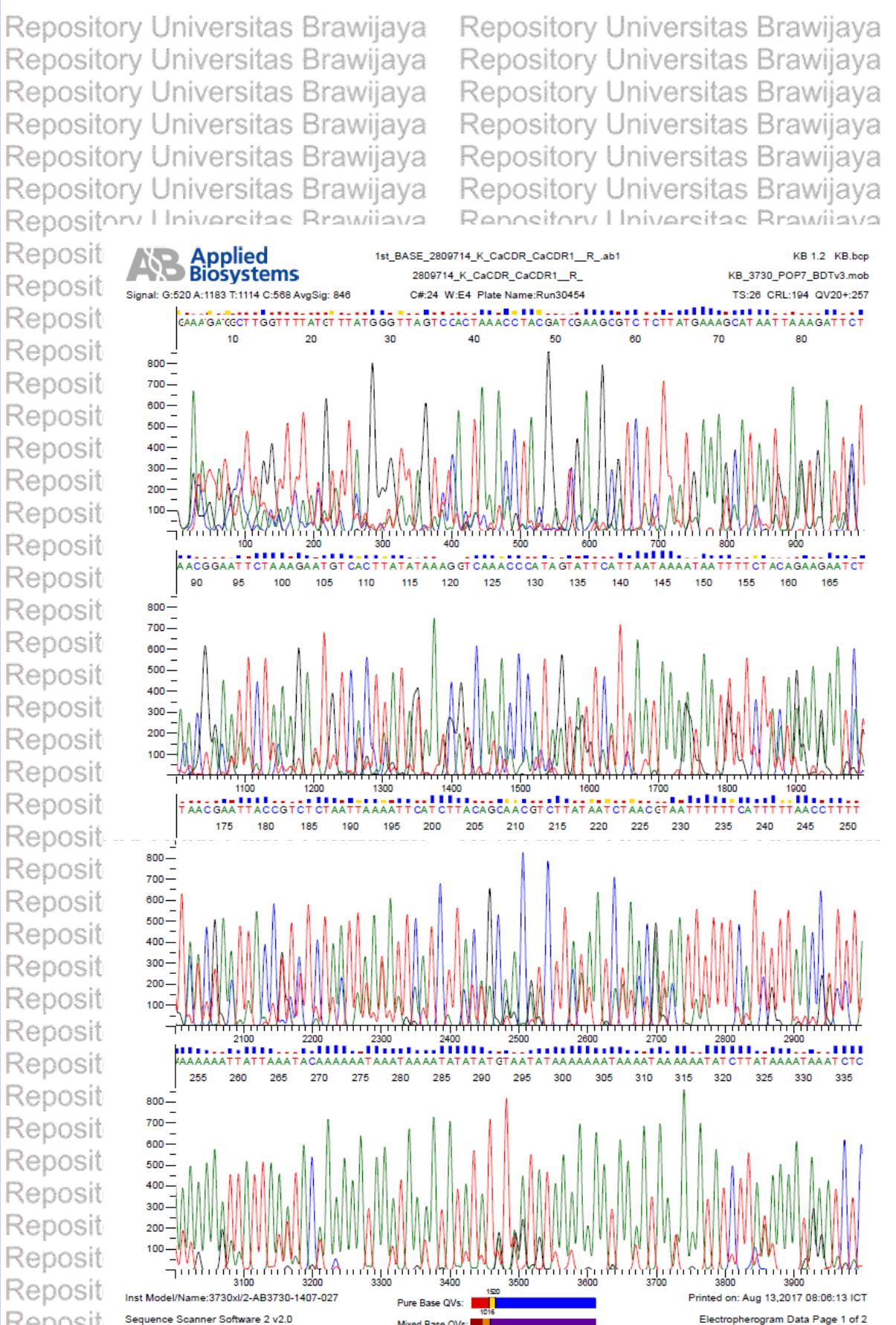
Sequence Scanner Software 2 v2.0

Pure Base QVs: 150

Mixed Base QVs: 105

Printed on: Aug 13,2017 08:05:36 ICT

Electropherogram Data Page 2 of 2





QVs:  Electropherogram Data Page 2 of 2

Applied Biosystems

1st_BASE_28097

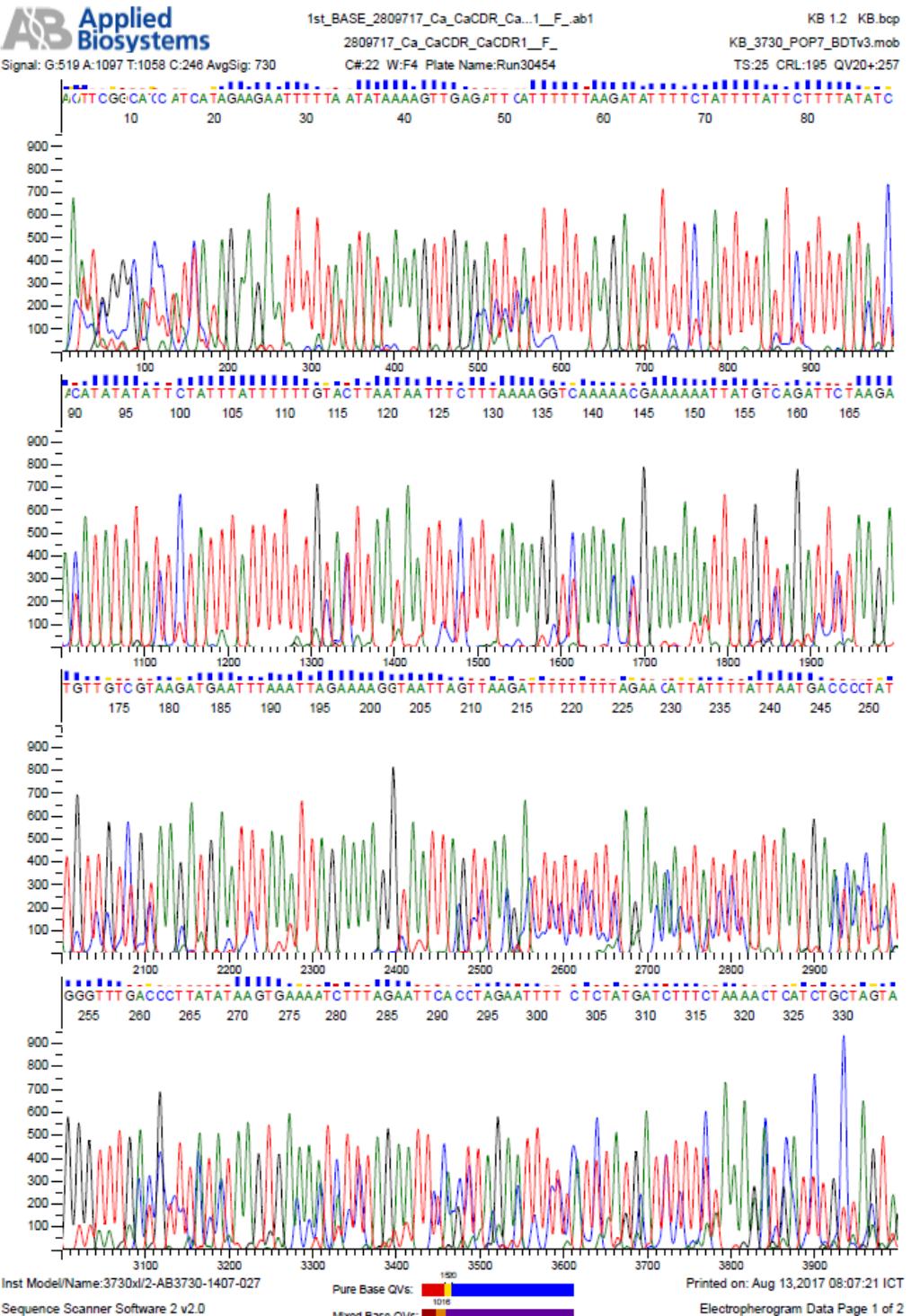
Signal: G:519 A:1097 T:1058 C:246 Avg Sig: 730 C#:22

Inst Model/Name:3730xl/2-AB3730-1407-027

Pure Base

Sequence Scanner Software 2 v2.0

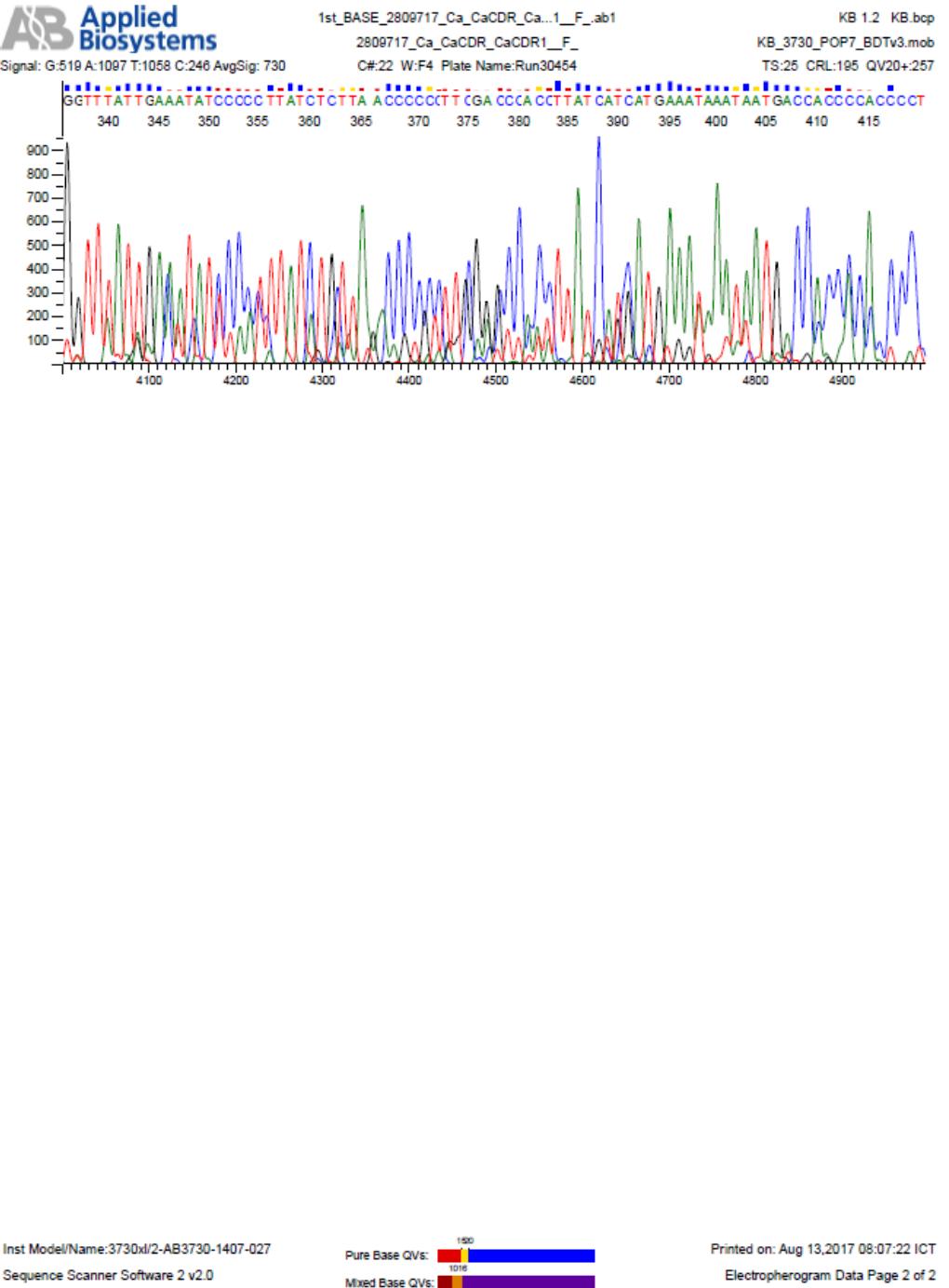
Mixed Base

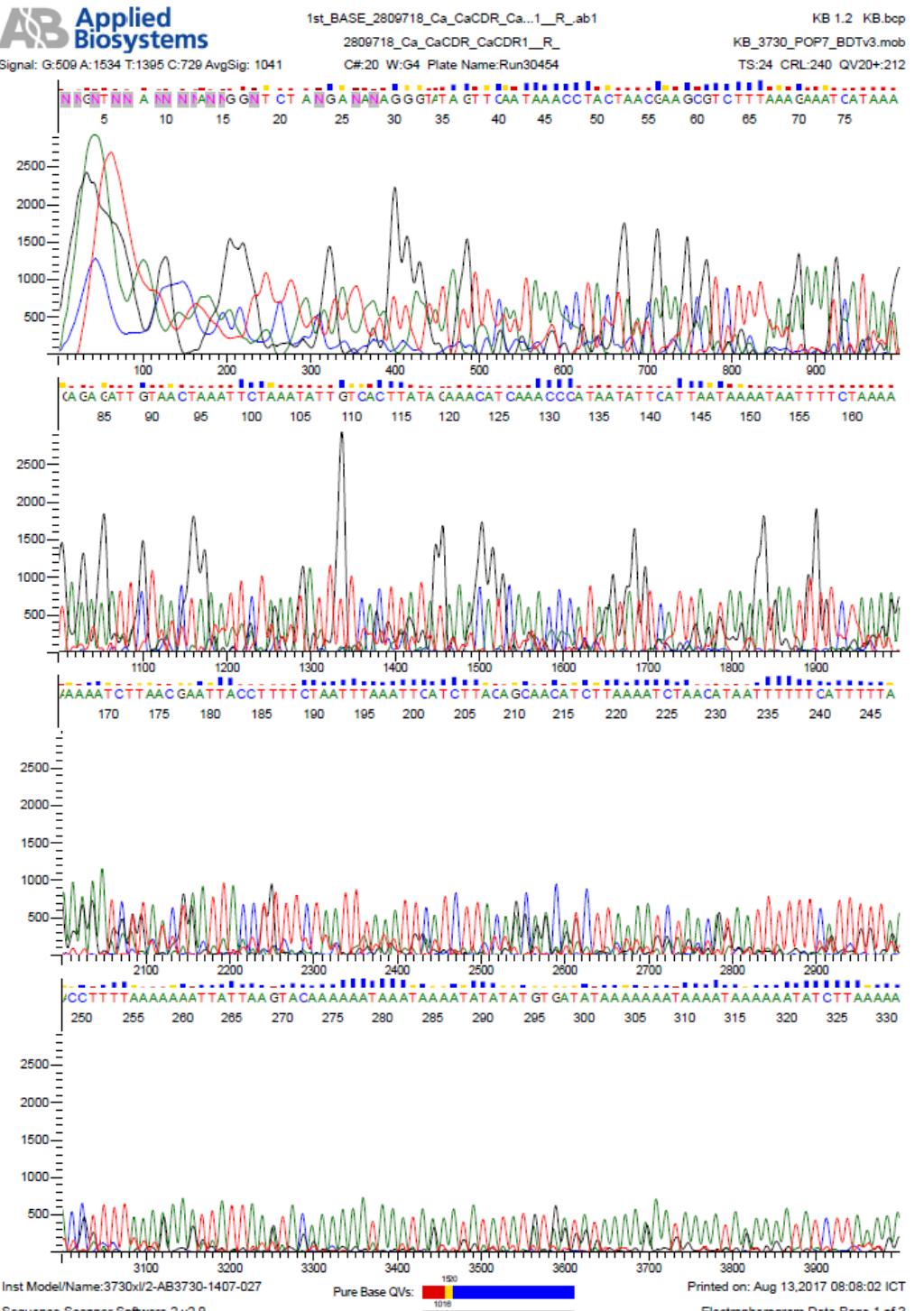


Applied Biosystems

1st_BASE_28097
C#:22

Signal: G:519 A:1097 T:1058 C:246 AvgSig: 730





Applied Biosystems

1st_BASE_28097

Signal: G:509 A:1534 T:1395 C:729 AvgSig: 1041 C#:20

ATAAATCTCAACTTTTATATAAAAAATTTC

335 340 345 350 355 360

2500
2000
1500
1000
500
0

4100 4200 4300

2500
2000
1500
1000
500
0

420

2500
2000
1500
1000
500
0

5050

2500
2000
1500
1000
500
0

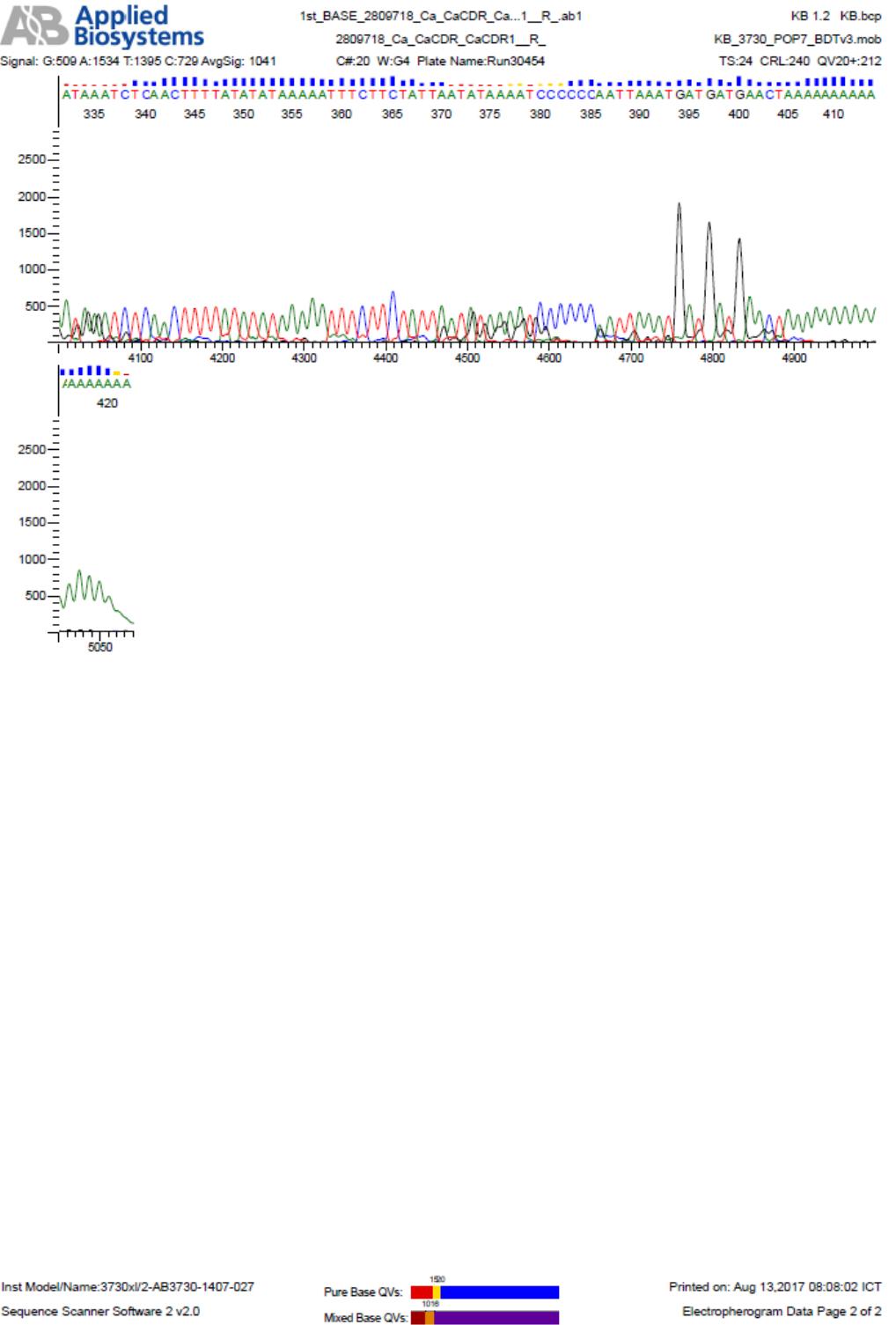
1st BASE 28097

Inst Model/Name:3730xl/2-AB3730-1407-027

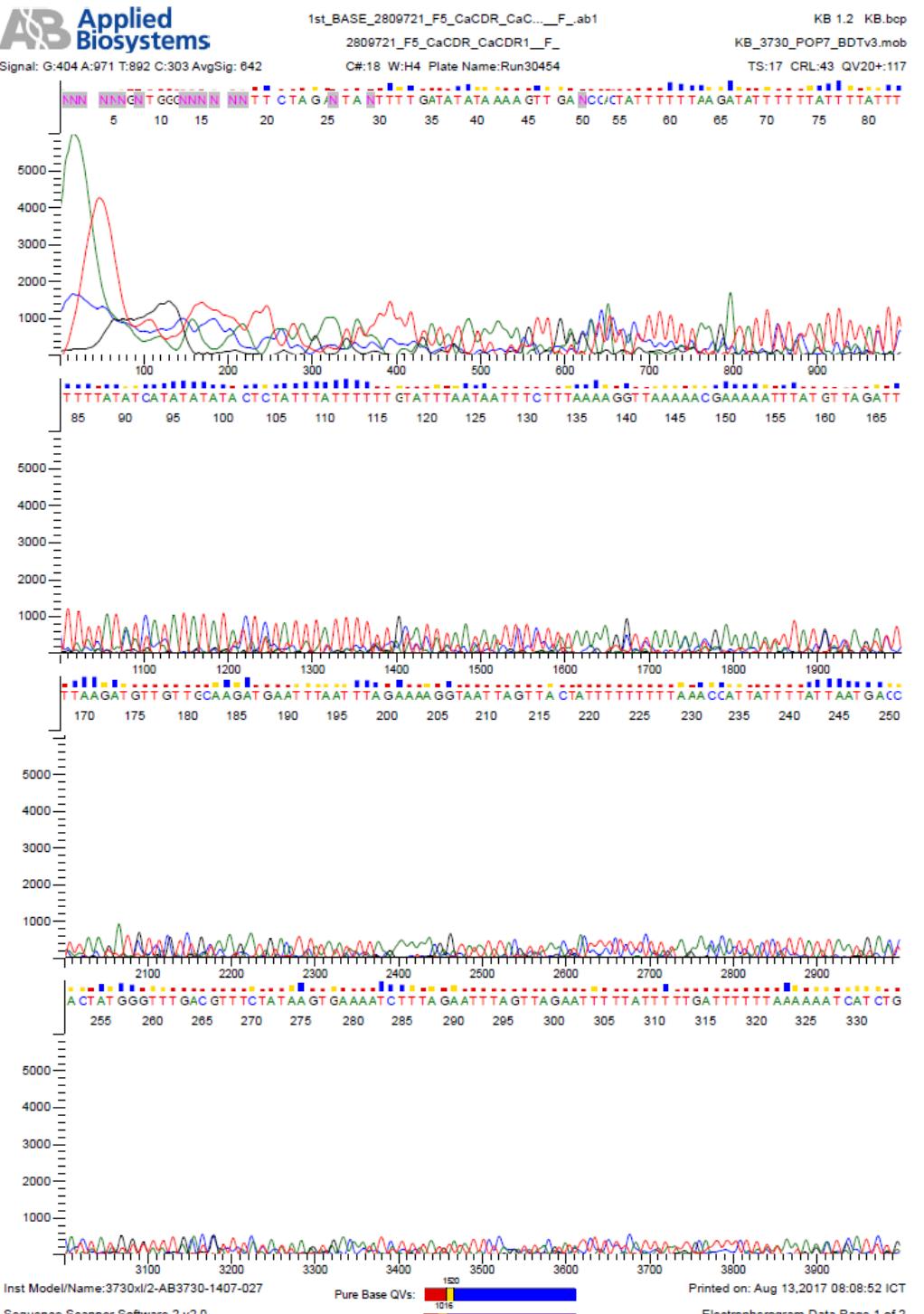
Pure Base

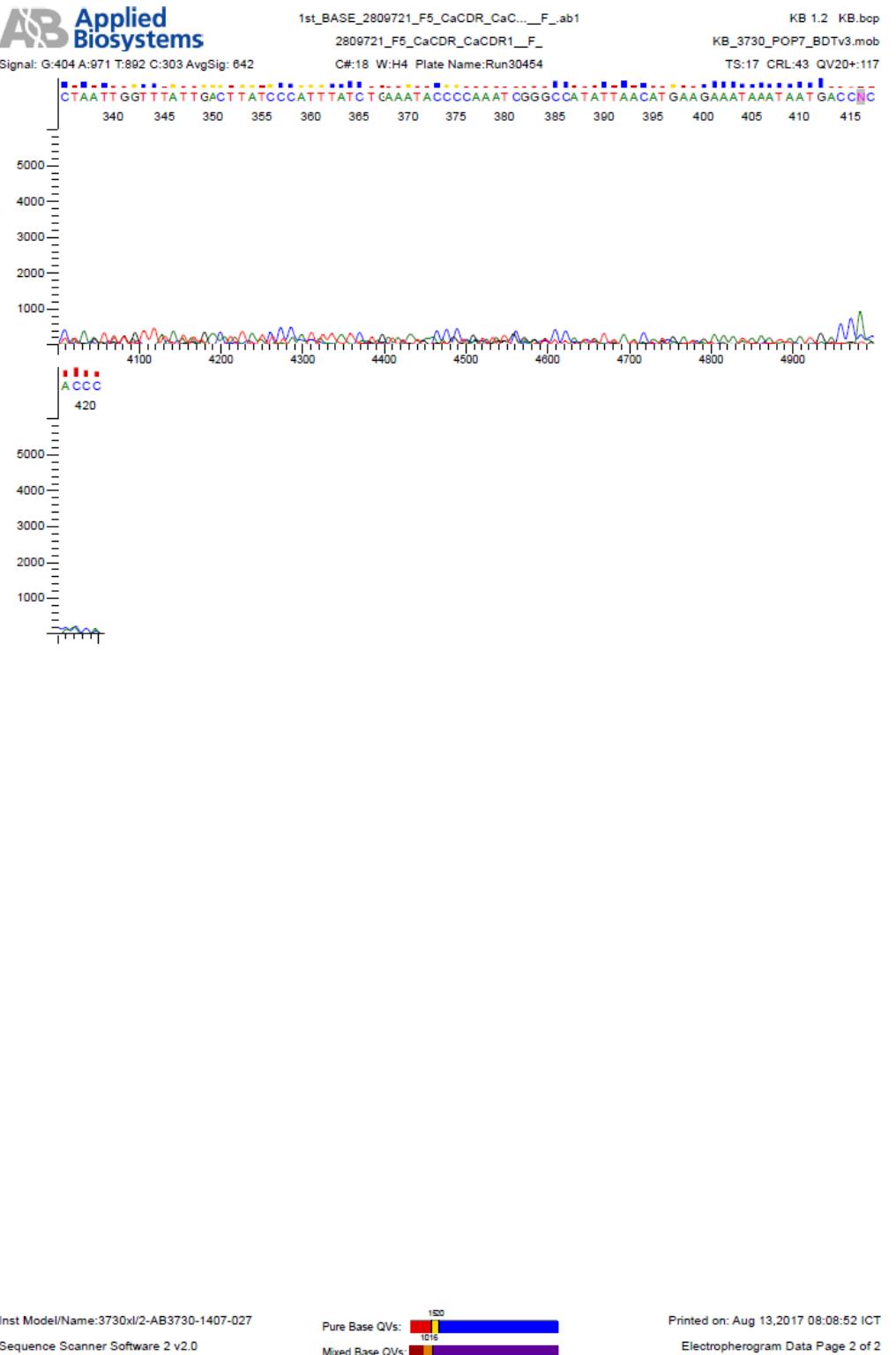
Sequence Scanner Software 2 v2.0

Mixed Base

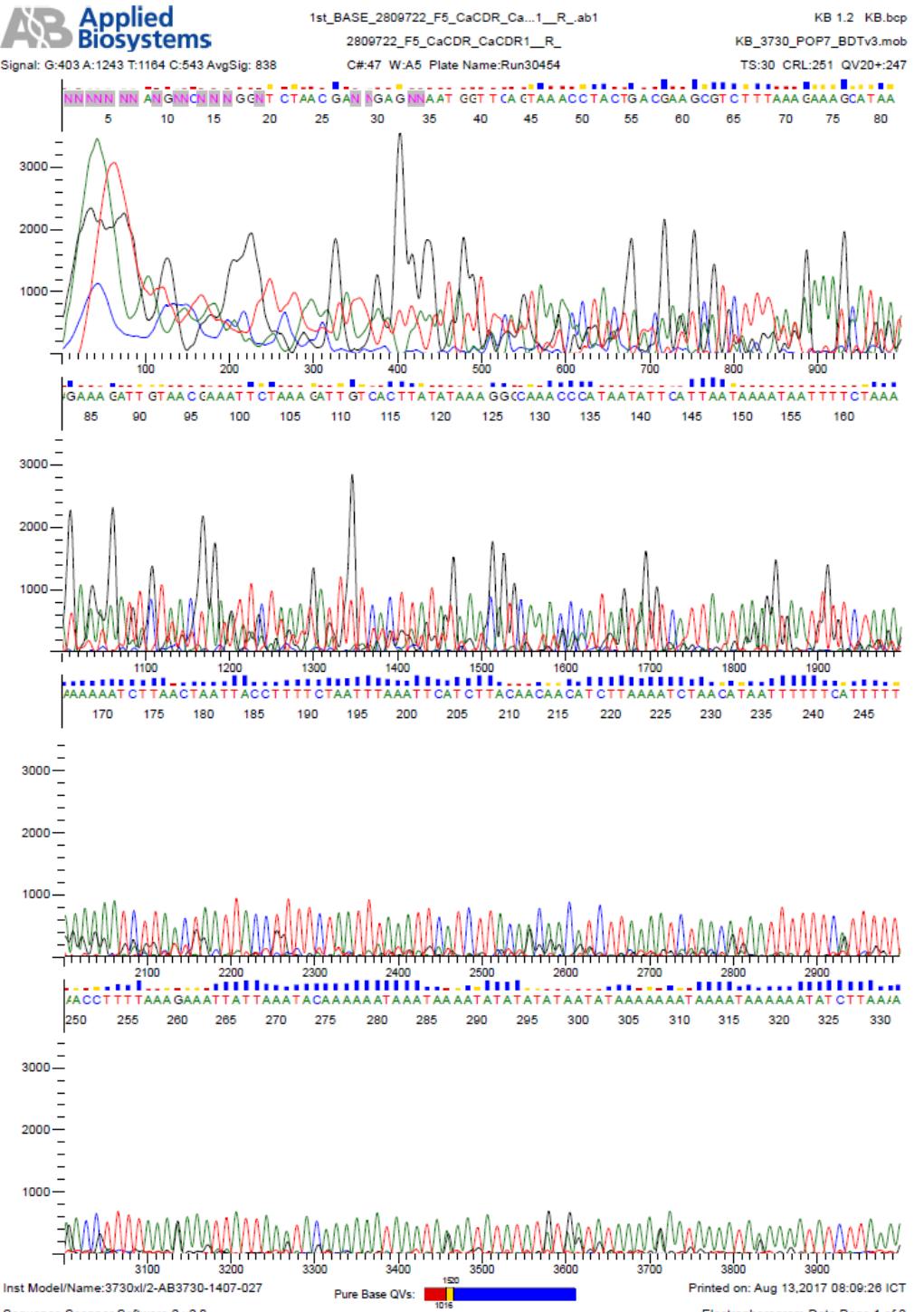


Repository Universitas Brawijaya
144 Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya





Repository Universitas Brawijaya
146
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya



Applied Biosystems

1st_BASE_28097

Signal: G:403 A:1243 T:1164 C:543 AvgSig: 838 C#:47

AATAAAATCTCAACTTTATATATAAAAAATTTC

335 340 345 350 355 360

3000
2000
1000

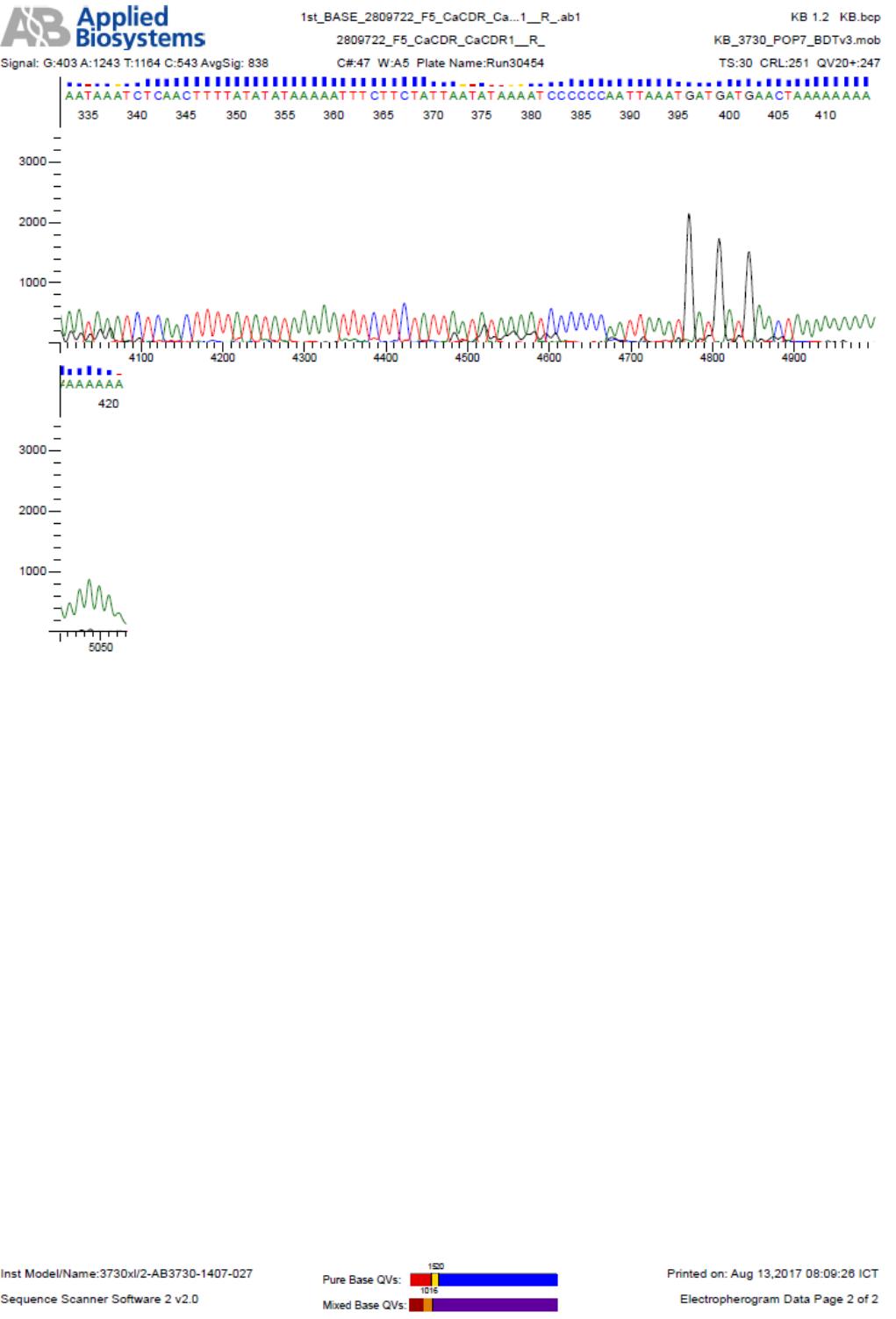
4100 4200 4300

420

3000
2000
1000

5050

Inst Model/Name:3730xl/2-AB3730-1407-027
Sequence Scanner Software 2 v2.0
Pure Base
Mixed Base



Repository Universitas Brawijaya
148 Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Signal: G:418 A:850 T:786 C:219 AvgSig: 568

1st_BASE_2809725_CF_CaCDR_Ca...1_F_ab1
2809725_CF_CaCDR_CaCDR1_F_
C#:45 W:B5 Plate Name:Run30454
KB 1.2 KB.bcp
KB_3730_POP7_BDTv3.mob
TS:25 CRL:201 QV20+254

Inst Model/Name:3730xl/2-AB3730-1407-027
Sequence Scanner Software 2.1.0
Printed on: Aug 13, 2017 08:10:08 ICT
Electropherogram Data Page 1 of 2

Repository Universitas Brawijaya
149 Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

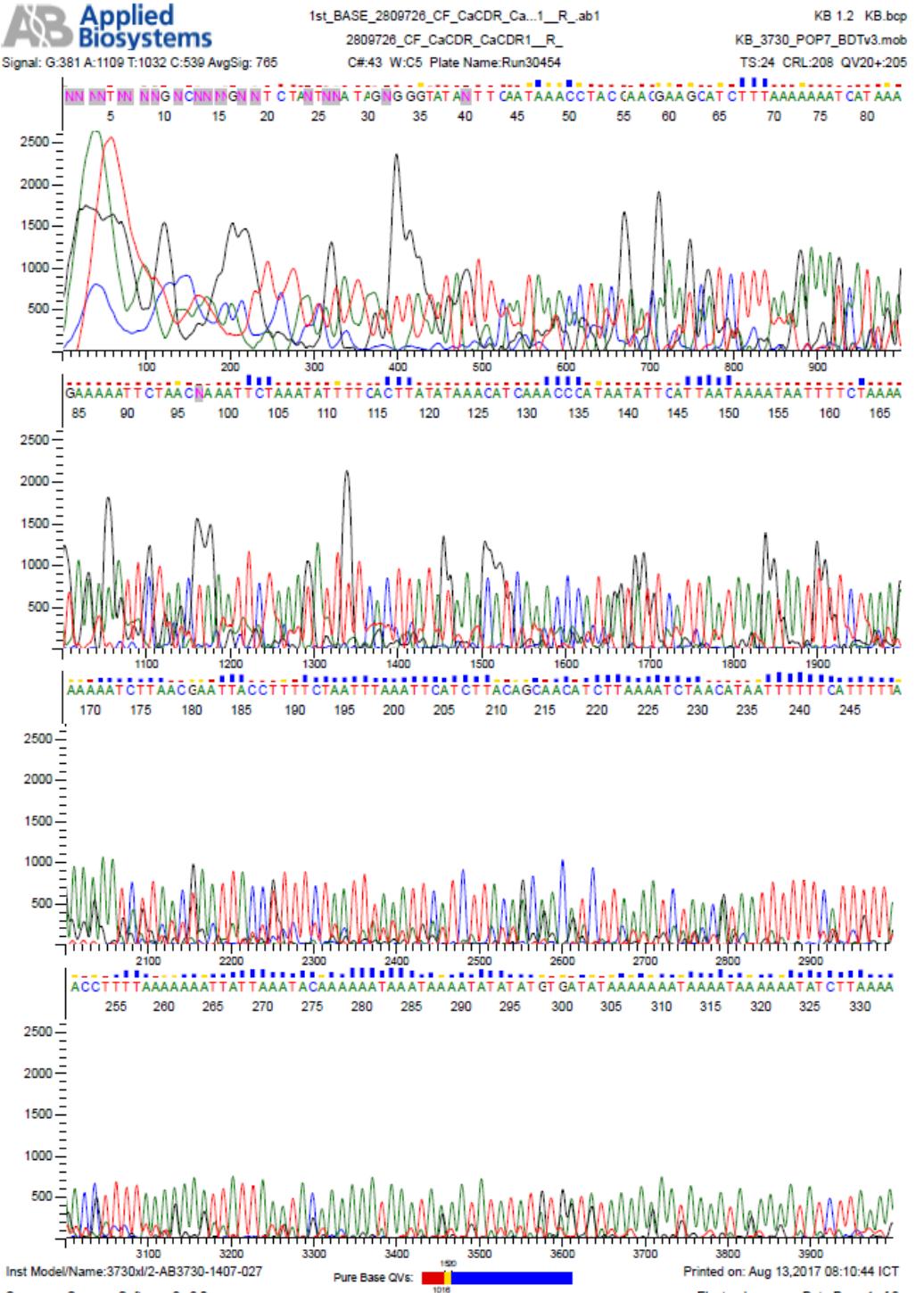
Applied Biosystems

Signal: G:381 A:1109 T:1032 C:539 AvgSig: 765

1st_BASE_280972 C#:43

Inst Model/Name: 3730xl/2-AB3730-1407-027

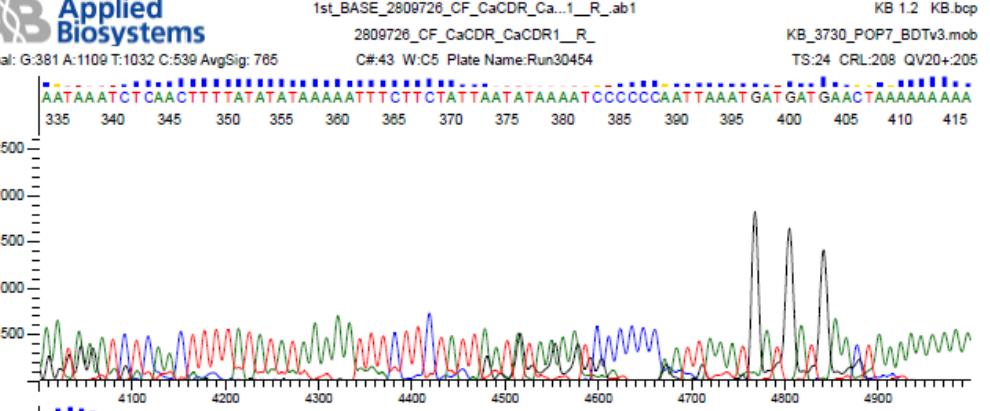
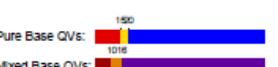
Pure Base

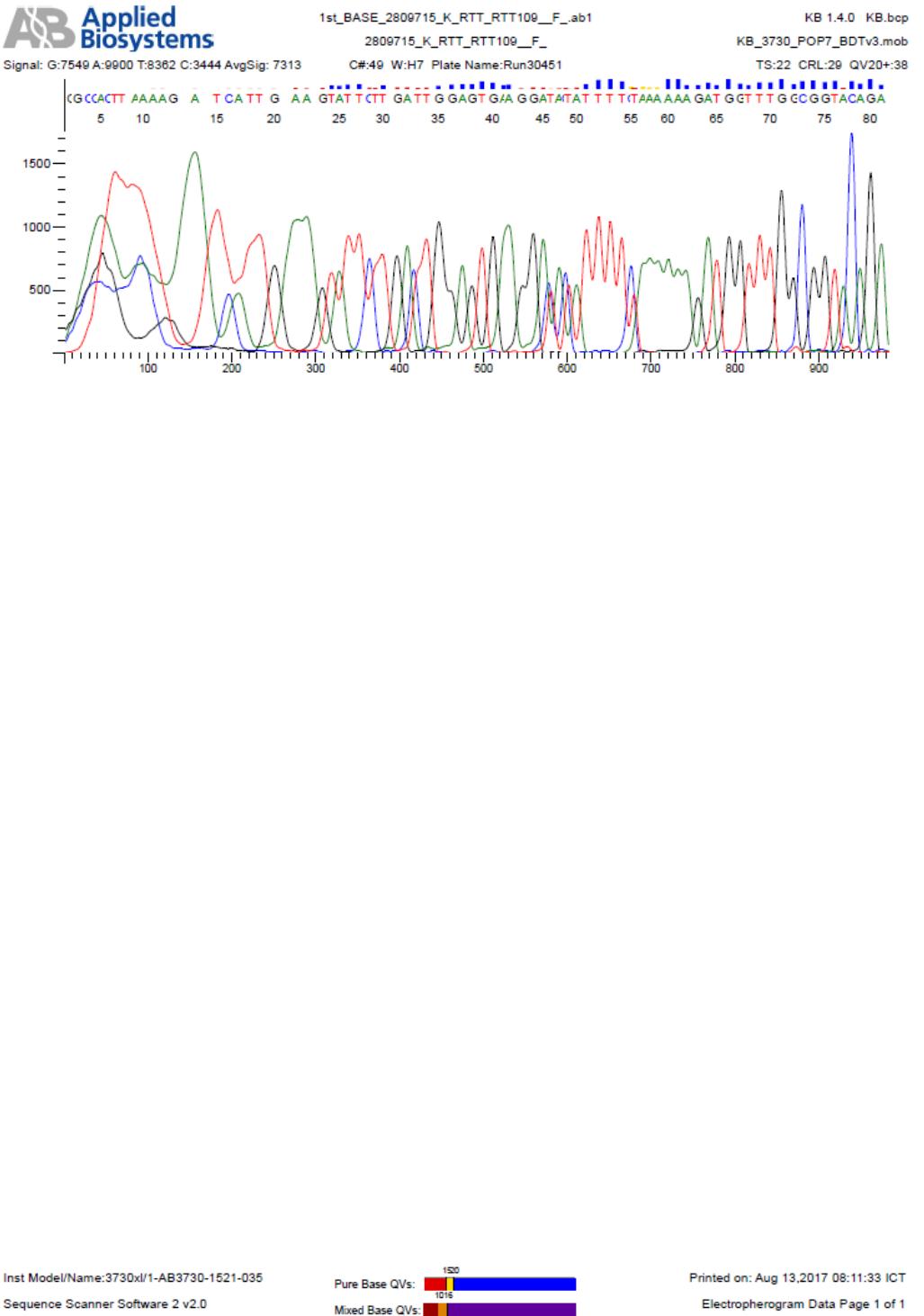


Electropherogram Data Page 1 of 2



Signal: G:381 A:1109 T:1032 C:539 AvgSig: 765

Inst Model/Name:3730xl/2-AB3730-1407-027
Sequence Scanner Software 2 v2.0Printed on: Aug 13,2017 08:10:44 ICT
Electropherogram Data Page 2 of 2



AB Applied Biosystems

Signal: G:2792 A:5722 T:5000 C:4215 AvgSig: 4432 C#:90

1st_BASE_2800

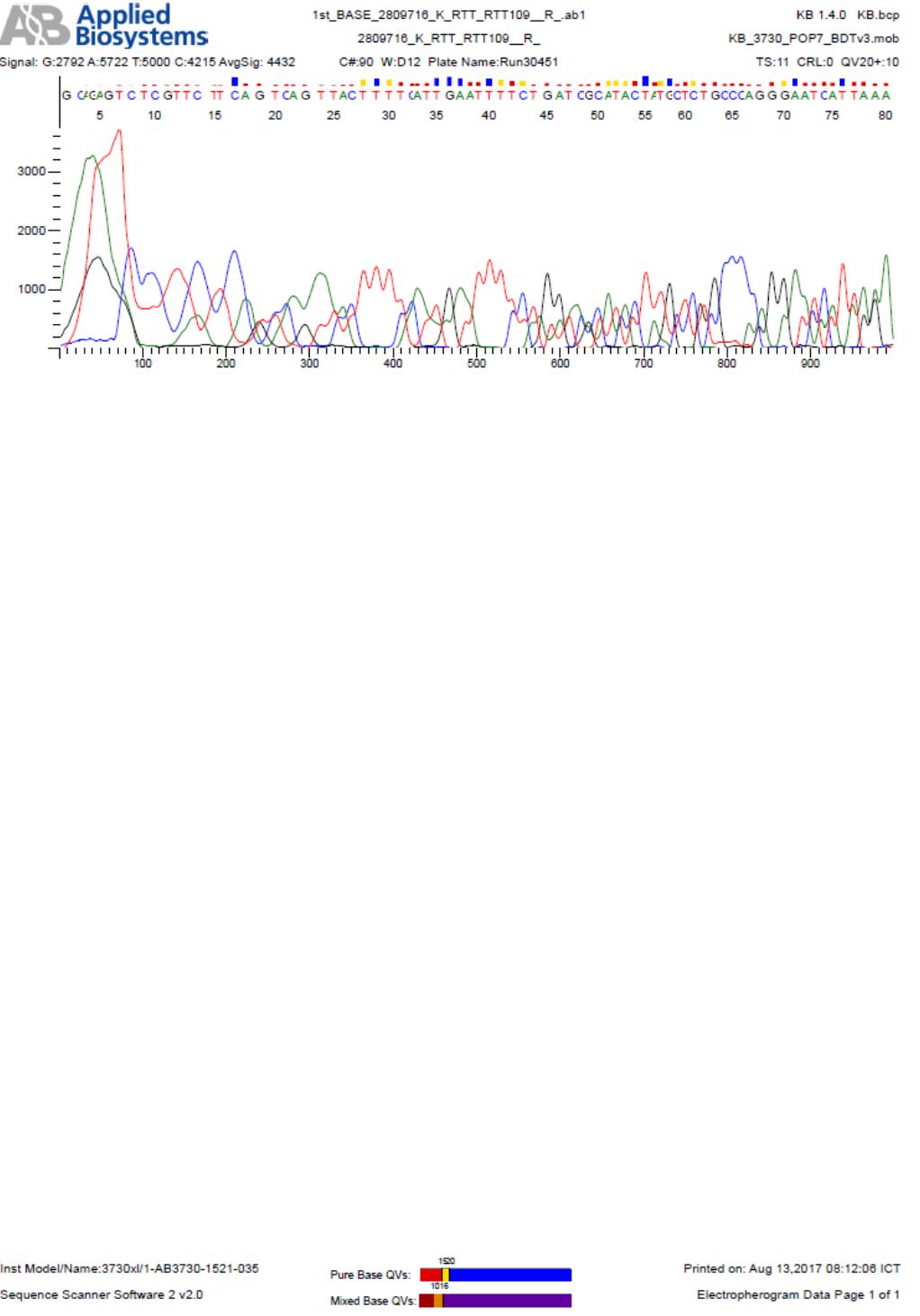
G A C A G T C T C G T T C T T C A A G T C A G T T A C C T

5 10 15 20 25

3000
2000
1000
0

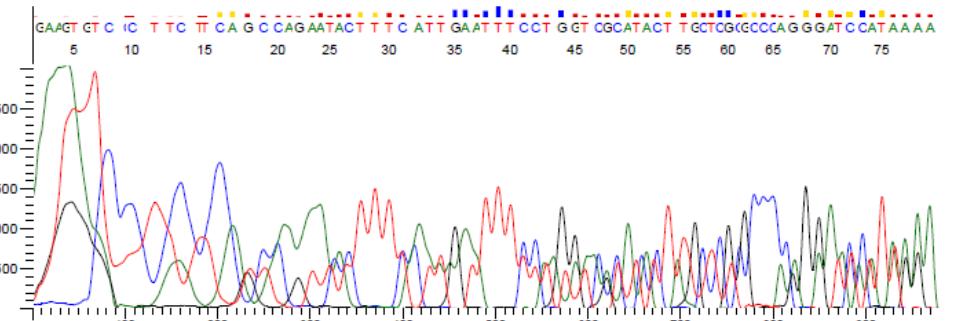
1 100 200 300

Inst Model/Name:3730xl/1-AB3730-1521-035
Sequence Scanner Software 2 v2.0
Pure Base
Mixed Base



AB Applied Biosystems
Signal: G:3385 A:6310 T:6488 C:4839 AvgSig: 5255

Signal: G:3385 A:6310 T:6488 C:4839 AvgSig: 5255



Inst Model/Name:3730xl/1-AB3730-1521-035
Sequence Scanner Software 2 v2.0

A horizontal bar chart comparing the number of QVs for two categories: "Pure Base QVs" and "Mixed Base QVs".

- Pure Base QVs:** The bar length is approximately 150, with the exact value labeled as 150 above the bar.
- Mixed Base QVs:** The bar length is approximately 1016, with the exact value labeled as 1016 above the bar.

Printed on: Aug 13,2017 08:13:33 ICT

Applied Biosystems

Signal: G:9178 A:11151 T:10016 C:41...gSig: 8613 C#:4

1st_BASE_2
2809

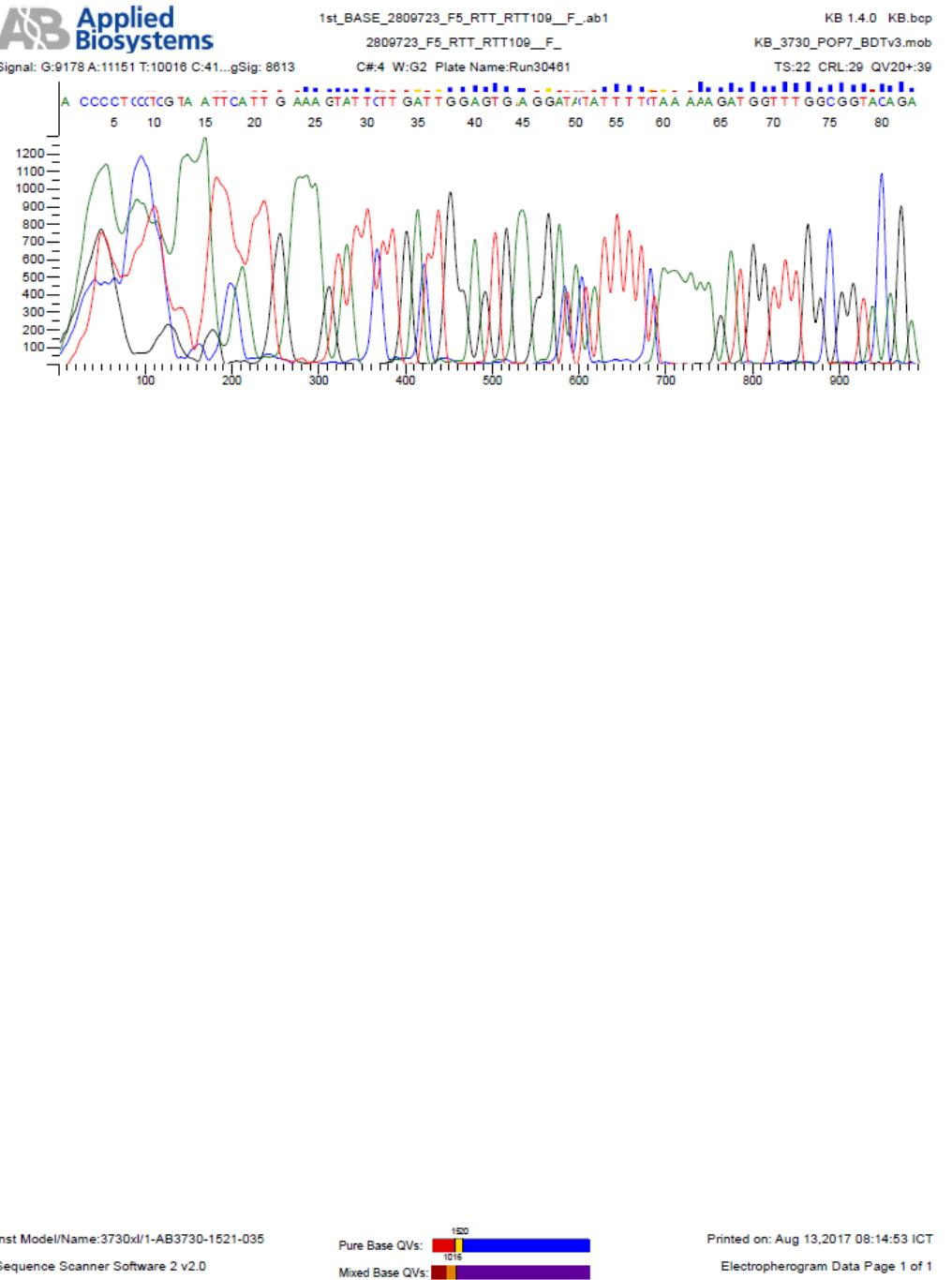
A CCCCTCCCGTA ATTCAATTG AAA GTATTCCTT

5 10 15 20 25 30

1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100

100 200 300

Inst Model/Name:3730xl/1-AB3730-1521-035
Sequence Scanner Software 2 v2.0
Pure Base
Mixed Base



Signal: G:3636 A:5619 T:5380 C:4352 AvgSig: 4748 C#:2

1st_BASE_2
2809

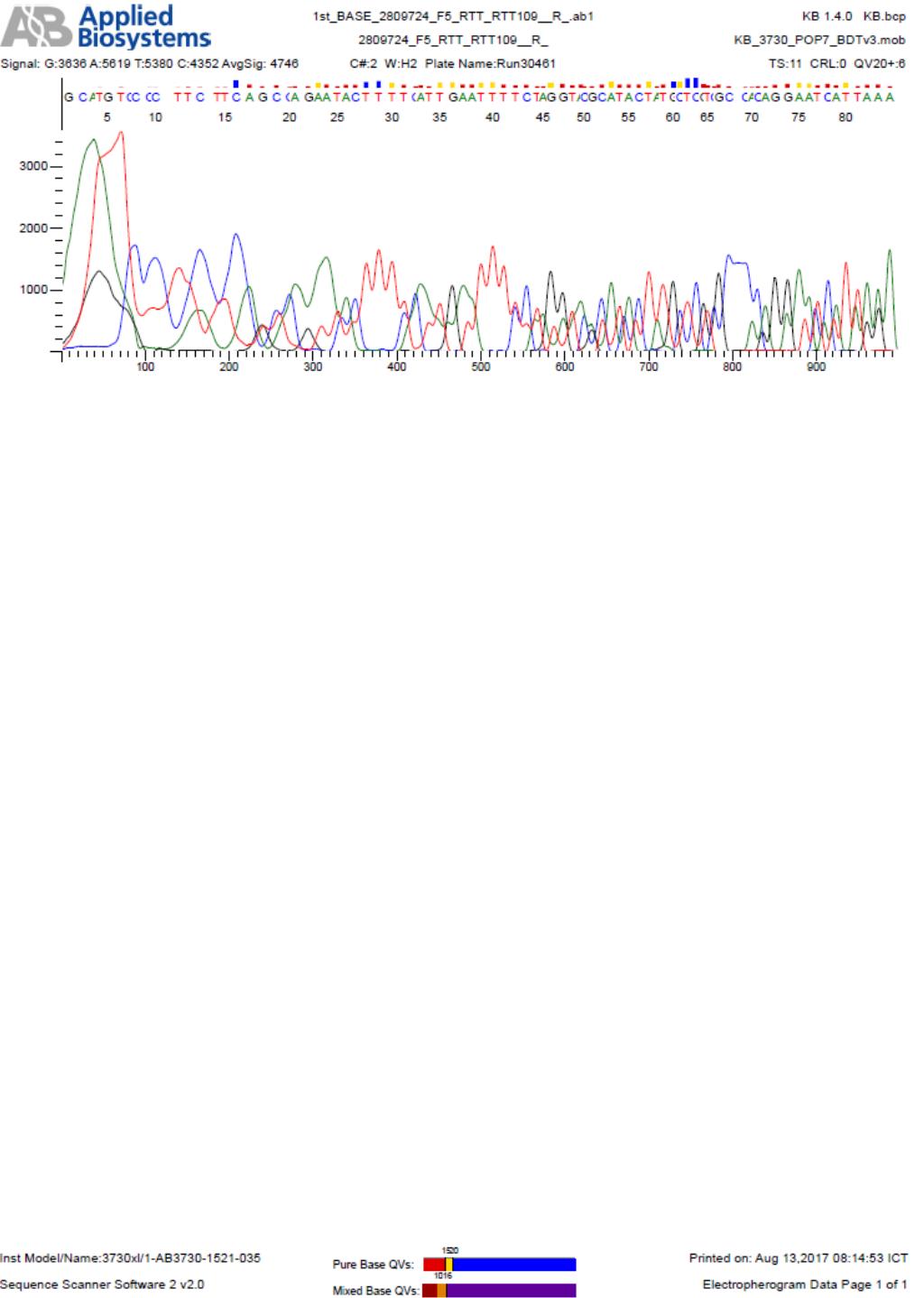
G ATG T C C T T C A G C A G A A T A C T T

5 10 15 20 25

3000
2000
1000
0

100 200 300

Inst Model/Name:3730xl-1-AB3730-1521-035
Sequence Scanner Software 2 v2.0
Pure Base
Mixed Base



Repository Universitas Brawijaya
158
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Applied Biosystems

Signal: G:2096 A:1251 T:1925 C:181 AvgSig: 1363

1st_BASE_2
282405
C#80

NNNNNN NTTAN T NN TGAT G GT GT GATA

T T T T T T T T T T T T A A A G T G T G G T G A A T G T

1050 1100 1150 1200 1250 1300 1350

GTTGTTTTTTTTTATGTAAGAAGATGGTTTGGC

165 170 175 180 185 190



Repository Universitas Brawijaya
159 Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Applied Biosystems

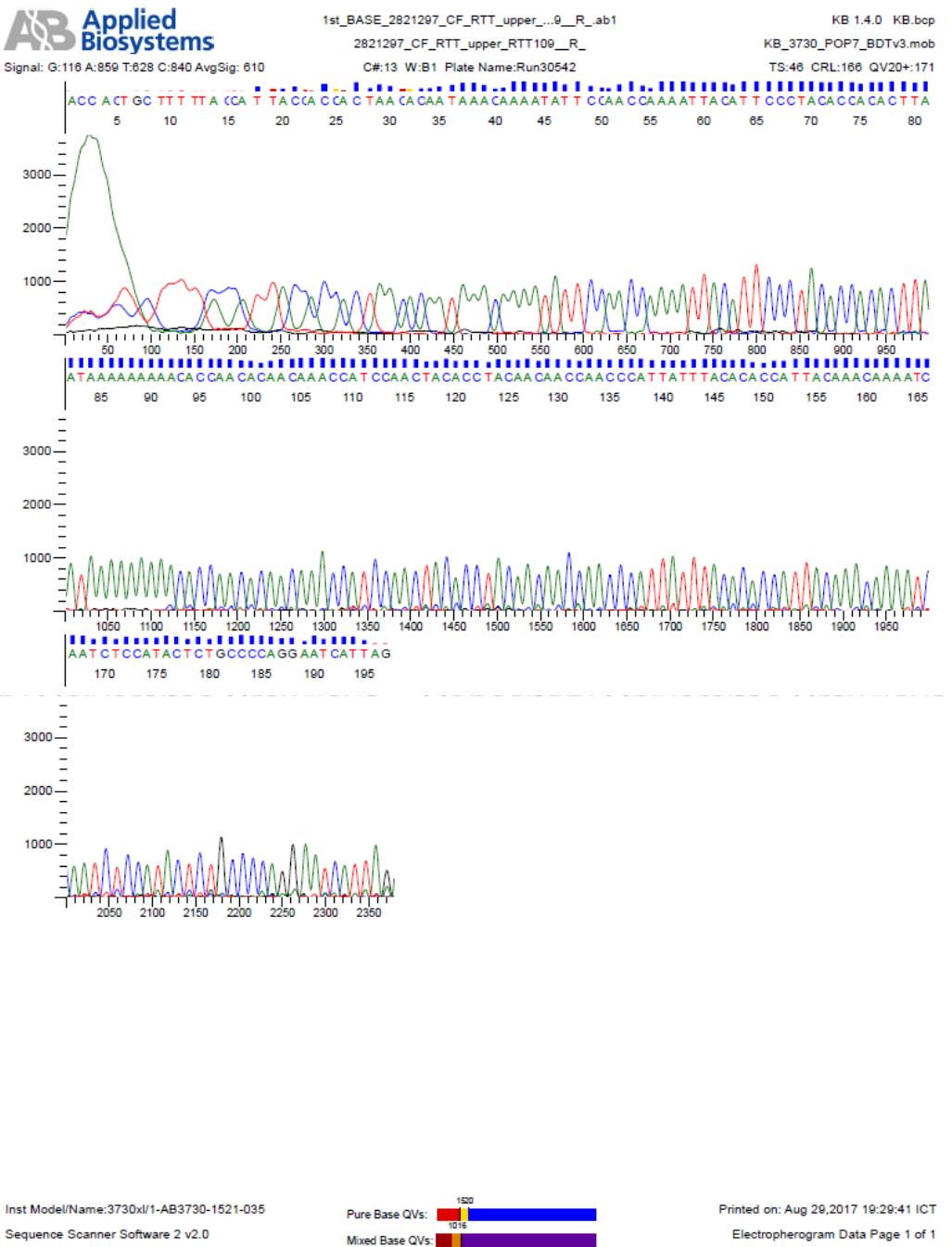
Signal: G:116 A:859 T:828 C:840 AvgSig: 610 C#:13

1st_BASE_2
282129

Sequence: ACC ACT GCT TT TTA CCA T TA CCA CCA CTA AA

Sequence: ATAAAAAAACACCAACAAAACCAATCCAA

Sequence: AATCTCCATACTCTGGCCCCAGGAATCATTAG



Lampiran 9. Statistika

ONEWAY Cur Fluc Kom BY Dose
/MISSING ANALYSIS.

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cur	Between Groups	356744.214	6	59457.369	963.801	.000
	Within Groups	1295.500	21	61.690		
	Total	358039.714	27			
Fluc	Between Groups	256473.929	6	42745.655	455.549	.000
	Within Groups	1970.500	21	93.833		
	Total	258444.429	27			
Kom	Between Groups	298239.357	6	49706.560	2132.457	.000
	Within Groups	489.500	21	23.310		
	Total	298728.857	27			

* Curve Estimation.

TSET NEWVAR=NONE.

CURVEFIT

```
/VARIABLES=Cur Fluc Kom WITH Dose  
/CONSTANT  
/MODEL=LINEAR  
/PLOT FIT.
```

Curve Fit

Model Description

Model Name		MOD_1
Dependent Variable	1	Cur
	2	Fluc
	3	Kom
Equation	1	Linear
Independent Variable		Dose
Constant		Included
Variable Whose Values Label Observations in Plots		Unspecified

Case Processing Summary

	N
Total Cases	28
Excluded Cases ^a	0
Forecasted Cases	0
Newly Created Cases	0

a. Cases with a missing value in any variable are excluded from the analysis.

Variable Processing Summary

		Variables			
		Dependent		Independent	
		Cur	Fluc	Kom	Dose
Number of Positive Values		24	23	20	28
Number of Zeros		4	5	8	0
Number of Negative Values		0	0	0	0
Number of Missing Values	User-Missing	0	0	0	0
	System-Missing	0	0	0	0

Model Summary and Parameter Estimates

Dependent Variable: Cur

Model Summary						Parameter Estimates	
Equation	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	.931	350.619	1	26	.000	344.500	-54.554

The independent variable is Dose.

