

## Kajian Tindak Balas *Candida albicans* Terhadap Tekanan Oksidatif

(The Study of Oxidative Stress Responses in *Candida albicans*)

WAN NOORHAYATI WAN IBRAHIM, FARAH DIBA ABU BAKAR,  
NOR MUHAMMAD MAHADI & ABDUL MUNIR ABDUL MURAD

### ABSTRAK

*Kebolehpayaan Candida albicans pencilan klinikal tempatan untuk beradaptasi dan memberi tindakbalas terhadap tekanan oksidatif telah dikaji dalam penyelidikan ini. Perlakuan dengan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) terhadap C. albicans mendedahkan sel kepada tekanan oksidatif dan memberi kesan terhadap kadar pertumbuhan patogen oportunistik ini. Kadar pertumbuhan C. albicans dalam media Yis Pepton Dekstrosa (YPD) dengan kehadiran 4.0 mM  $H_2O_2$  telah memberi masa generasi 51 min/generasi, berbanding 44 min/generasi pada kepekatan 0.4 mM dan tanpa perlakuan dengan  $H_2O_2$ . Untuk mengkaji tahap kerintangan sel terhadap tekanan oksidatif, sel telah didedahkan kepada beberapa siri kepekatan  $H_2O_2$  yang berbeza. Data menunjukkan peratus kemandirian sel berbanding kawalan menurun berkadar dengan peningkatan tekanan yang diberi. Ini membuktikan sel mempunyai tahap kerintangan tertentu terhadap tekanan oksidatif. Untuk mengenalpasti sama ada sistem pertahanan aruhan hadir di dalam C. albicans pencilan ini, sel telah didedahkan dengan kepekatan  $H_2O_2$  yang rendah selama satu jam sebelum didedahkan kepada tekanan yang lebih tinggi. Didapati peratus kemandirian untuk sel yang menerima perlakuan dengan tekanan oksidatif lemah meningkat berbanding sel yang tidak menerima perlakuan awal. Ini menunjukkan bahawa mekanisme pertahanan aruhan untuk menghadapi tekanan oksidatif hadir di dalam C. albicans. Untuk mengenalpasti sama ada tekanan oksidatif mampu mengaruh morfogenesis yis menjadi hifa, sel telah didedahkan kepada 0.4 mM  $H_2O_2$  pada suhu 37 °C dan jumlah hifa yang terbentuk dikira dan dibandingkan dengan pembentukan hifa apabila sel didedahkan pada suhu 37 °C sahaja. Hasil yang diperolehi menunjukkan bahawa tekanan oksidatif tidak memainkan peranan penting untuk mengaruh morfogenesis yis menjadi hifa dalam strain C. albicans pencilan klinikal tempatan ini.*

*Kata kunci:* Candida albicans; tekanan oksidatif

### ABSTRACT

*The ability of a locally isolated clinical strain of C. albicans to adapt and response towards oxidative stress were investigated in this study. Treatment of C. albicans with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) will exert an oxidative stress to C. albicans cells and affect the growth rate of this opportunistic pathogen. Cells that were grown in Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium with the presence of 4.0 mM  $H_2O_2$  gave a doubling time of 51 min/generation compared to 44 min/generation for those grown in 0.4 mM  $H_2O_2$  and without  $H_2O_2$ . In order to determine the resistance level of C. albicans towards oxidative stress, cells were exposed to different concentration of  $H_2O_2$ . Results showed that percentage of cells viability decreased with the increased concentration of  $H_2O_2$ . These data indicated that C. albicans could overcome oxidative stress to a certain level before they were killed. To determine whether this strain exhibited a stress induce protection, cells were treated with mild oxidative stress for one hour before exposed to a stronger oxidative stress. Data obtained shows that cells that were pre-treated with mild oxidative stress showed higher percentage of survival compared to non pre-treated cells. This strongly suggested that stress induce protection was present in this C. albicans. Finally, in order to determine whether oxidative stress can induce yeast to hyphal morphogenesis in C. albicans, cells were then exposed to 0.4 mM  $H_2O_2$  at 37 °C and the number of hyphal formed were compared to hyphal formation when the cells were grown at 37 °C only. However the results showed that oxidative stress failed to induce yeast to hyphal morphogenesis in this clinically isolated C. albicans strain.*

*Keywords:* Candida albicans; oxidative stress

### PENDAHULUAN

*Candida albicans* merupakan patogen oportunistik yang boleh menyebabkan jangkitan sistemik dan membawa

kepada kematian dalam keadaan tertentu. Di Malaysia, *C. albicans* merupakan spesies *Candida* yang kerap dipencilkan daripada individu yang mengalami jangkitan *Candida* seperti penyakit kandidiasis (Ng et al. 1999). Peningkatan

bilangan individu yang menderita disebabkan serangan yis oportunistik ini telah membuka perhatian umum tentang kepentingan *C. albicans* sebagai agen yang penting bagi penyakit kandidiasis. Pada kebiasaannya *C. albicans* hadir sebagai organisma komensal. Namun sekiranya sistem pertahanan hos terganggu, *C. albicans* mampu untuk memasuki ke bahagian tisu yang lebih dalam serta memasuki saluran peredaran darah dan tersebar di dalam hos sehingga menyebabkan jangkitan sistemik yang boleh membawa maut (Odds 1994). Pada masa kini, agen antikulat seperti flukonazol, itrakonazol dan amfoterisin B digunakan untuk merawat pesakit yang dijangkiti oleh *C. albicans*. Walau bagaimanapun, penggunaan agen-agen antikulat tersebut semakin terhad ketika ini disebabkan kemunculan strain-strain klinikal yang rintang terhadapnya. Penggunaan amfoterisin B pula didapati dapat menyebabkan kesan sampingan yang teruk terhadap pesakit seperti hipotemia, hipotensi dan kerosakan ginjal (Martin 1999). Disebabkan faktor-faktor inilah, maka penghasilan ubatan atau agen antikulat yang baru sangat diperlukan.

Keupayaan untuk bertindak balas terhadap tekanan oksidatif adalah penting untuk kemandirian sebarang patogen yang menjangkiti tubuh manusia. Di dalam salur darah, patogen akan terdedah kepada beberapa tekanan dan salah satunya adalah tekanan oksidatif (Hampton et al. 1998). Selain daripada itu, sel fagosit yang terdapat dalam sistem kekebalan hos akan bertindak untuk memusnahkan patogen tersebut secara fagositosis. Sel-sel fagosit seperti neutrofil dan makrofaj akan menghasilkan bahan oksidan yang dikenali sebagai spesies oksigen reaktif (ROS) yang berfungsi untuk memusnahkan patogen (Vazquez-Torrez & Balish 1997). ROS bertindak terhadap sel dengan menyebabkan kemusnahan terhadap komponen penting sel seperti asid nukleik, asid lemak dan protein. Untuk mengatasi kesan ROS, beberapa sistem pertahanan seperti penghasilan beberapa enzim dan molekul yang dapat menangani kesan ROS telah dibentuk oleh patogen. Kebolehan patogen seperti *C. albicans* untuk bertahan daripada dimusnahkan oleh tindakan bahan oksidan merupakan satu faktor yang difikirkan penting untuk membolehkan yis ini mengkolonisasi organ dalaman hos (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2000). Menurut Jamieson et al. (1996), *C. albicans* menunjukkan ketahanan terhadap tekanan oksidatif yang lebih tinggi berbanding dengan yis bukan patogen, *Saccharomyces cerevisiae*. Ini menunjukkan bahawa keupayaan untuk mempertahankan sel daripada dimusnahkan oleh bahan oksidan dapat membantu meningkatkan tahap kevirulenan *C. albicans* berbanding *S. cerevisiae*. Kajian tentang tindak balas *C. albicans* terhadap tekanan oksidatif dijangkakan dapat mengupas persoalan bagaimana patogen ini berupaya menghadapi mekanisme pertahanan oksidatif oleh sistem pertahanan hos. Dalam kajian ini, kebolehpayaan *C. albicans* pencilan tempatan untuk beradaptasi terhadap tekanan oksidatif telah dikaji. Selain itu, perubahan morfologi sel apabila didedahkan dengan bahan oksidan juga telah dianalisis. Hasil daripada kajian ini diharapkan dapat meningkatkan kefahaman tentang peranan yang dimainkan

oleh ketahanan terhadap tekanan oksidatif dalam proses kepatogenan yis ini.

## BAHAN DAN KAEDAH

### KULTUR YIS DAN MEDIUM PERTUMBUHAN

*C. albicans* strain C288 yang digunakan adalah strain pencilan klinikal tempatan. Strain ini diperolehi dari Institut Penyelidikan Perubatan (IMR), Kuala Lumpur dan disimpan di dalam 20% gliserol pada suhu -80 °C. Untuk kajian ini, kultur daripada stok gliserol telah dihidupkan di atas piring agar Yis Pepton Dektrosa (YPD) yang mengandungi 1% ekstrak yis, 2% pepton dan 2% glukosa. Agar yang telah diinokulat dieramkan pada suhu 30 °C selama 48 jam sebelum digunakan dalam sesuatu ujikaji berikutnya.

### PERLAKUAN HIDROGEN PEROKSIDA KE ATAS KULTUR MEMBAHAGI

Untuk mengenalpasti masa generasi apabila *C. albicans* didedahkan kepada kepekatan  $H_2O_2$  yang berbeza, sel yang berkepekatan sebanyak  $1.0 \times 10^6$  sel/ml telah disubkulturkan ke dalam medium YPD tanpa  $H_2O_2$  dan yang mengandungi 0.4 mM dan 4.0 mM  $H_2O_2$ . Kultur ini dihidupkan pada suhu 30 °C dengan goncangan pada 200 psm. Bacaan spektrofotometer ( $OD_{600}$ ) telah diambil untuk setiap jam. Untuk mengkaji tahap kerintangan sel terhadap perlakuan dengan  $H_2O_2$ , sebanyak  $1.0 \times 10^6$  sel/ml telah disubkulturkan ke dalam medium YPD. Kultur dieramkan pada 30 °C dengan goncangan pada 200 psm sehingga pertengahan fasa log ( $OD_{600}$  mencapai ~0.8). Seterusnya 9 ml daripada kultur ini dialihkuat ke dalam tiub Falcon dan dicampurkan dengan 1.0 ml  $H_2O_2$  yang berbeza kepekatan untuk memberi kepekatan akhir  $H_2O_2$  iaitu; 0.2 mM, 0.4 mM, 0.6 mM, 0.8 mM, 1.0 mM, 2.0 mM, 4.0 mM, 6.0 mM, 8.0 mM dan 10.0 mM. Air suling digunakan untuk kultur kawalan. Sel kemudiannya dieramkan selama 60 minit pada suhu 30 °C sebelum dilakukan pencairan dan disebar di atas piring agar YPD. Bilangan koloni yang terhasil dikira selepas dieramkan selama 48 jam pada suhu 30 °C.

### KEHADIRAN TINDAKBALAS ARUHAN TERHADAP TEKATAN OKSIDATIF

Untuk menentukan sama ada pendedahan terhadap tekanan oksidan rendah dapat melindungi sel dari tekanan oksidan yang berkepekatan lebih tinggi, kultur pada pertengahan fasa log ( $OD_{600} = \sim 0.8$ ) didedahkan dengan 0.4 mM  $H_2O_2$  selama 60 minit pada keadaan yang sama seperti yang telah dinyatakan di atas. Kemudian, kultur diemparkan dan supernatan dibuang. Untuk memastikan bahawa kultur bebas daripada kehadiran  $H_2O_2$ , sel dibersihkan sekali lagi dengan air suling steril.  $H_2O_2$  pada kepekatan akhir 10.0 mM dimasukkan ke dalam kultur dan dieramkan sekali lagi selama satu jam pada suhu 30 °C. Air suling telah

yang terbentuk dikira selepas dieramkan selama 48 jam pada suhu 30 °C. Peratus kemandirian sel dikira dengan membandingkan bilangan keseluruhan sel hidup (TVCC) kultur eksperimen dengan kultur kawalan. Semua eksperimen dijalankan dalam tiga replikasi.

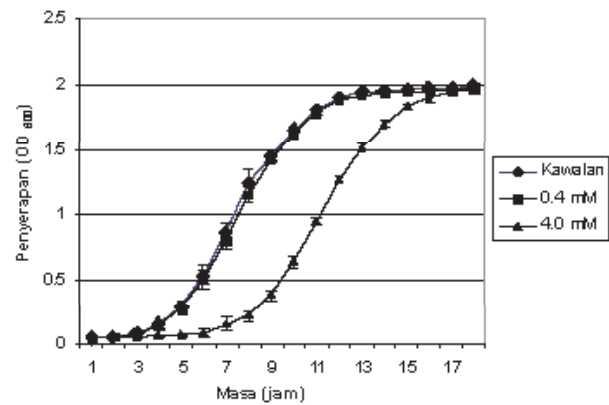
#### KESAN TINDAK BALAS OKSIDATIF TERHADAP MORFOGENESIS YIS KEPADA HIFA

Sel telah dihidupkan pada suhu 25 °C dalam kaldu YPD selama 72 jam. Seterusnya kultur diempar sebelum dicampurkan semula dengan air suling steril pada isipadu yang sama. Sel kemudiannya dieramkan pada 25 °C selama tiga jam. Akhirnya sel dicairkan pada pencairan sepuluh kali di dalam medium YPD yang mengandungi 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan tanpa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kawalan) dan dieramkan selama dua jam pada suhu 37 °C. Jumlah pembentukan hifa dikira menggunakan hemasitometer berdasarkan cerapan di bawah mikroskop cahaya. Eksperimen telah dilakukan secara triplikat.

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

##### KESAN BAHAN OKSIDAN TERHADAP PERTUMBUHAN *C. ALBICANS*

Analisis lengkung pertumbuhan menunjukkan kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada aras rendah (0.4 mM) tidak memberi kesan terhadap masa generasi (Rajah 1). Pada kepekatan ini masa generasi adalah sama dengan sel kawalan iaitu 44 min/generasi. Namun begitu, apabila didedahkan kepada kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang lebih tinggi (4.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sel mengambil masa yang lebih panjang sebelum memasuki fasa log dan masa generasi yang dicatatkan ialah 51 min/generasi. Ini menunjukkan bahawa *C. albicans* berupaya untuk beradaptasi dengan baik pada tekanan oksidatif yang lemah. Namun pada tekanan oksidatif yang lebih tinggi, sel mengambil masa untuk beradaptasi sebelum dapat berkembang. Ini mungkin disebabkan sel memerlukan lebih masa untuk menghasilkan protein-protein yang sesuai yang dapat menghalang sel dari dimusnahkan. Berdasarkan pemerhatian mikroskopi, pada fasa lag pertumbuhan sel yang didedahkan dengan 4.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sel-sel didapati melekat untuk membentuk gumpalan sel di dalam kultur. Apabila kultur pertumbuhan mula memasuki fasa log, barulah sel kembali ke dalam bentuk sel tunggal. Berkemungkinan mekanisme pembentukan gumpalan ini merupakan salah satu cara sel mempertahankan diri dari kesan bahaya bahan oksidan. Apabila sel bergumpal, kemungkinan sel-sel yang berada ditengah-tengah gumpalan akan terhalang dari kesan tekanan oksidatif. Kemudian, sel-sel ini akan berkembang dan menghasilkan protein-protein tertentu yang membolehkan sel beradaptasi dengan tekanan oksidatif yang diberikan. Fenomena ini berpotensi untuk dijadikan bahan kajian yang menarik yang berkemungkinan dapat memberi jawapan tentang keupayaan *Candida* beradaptasi dengan baik terhadap tekanan oksidatif.

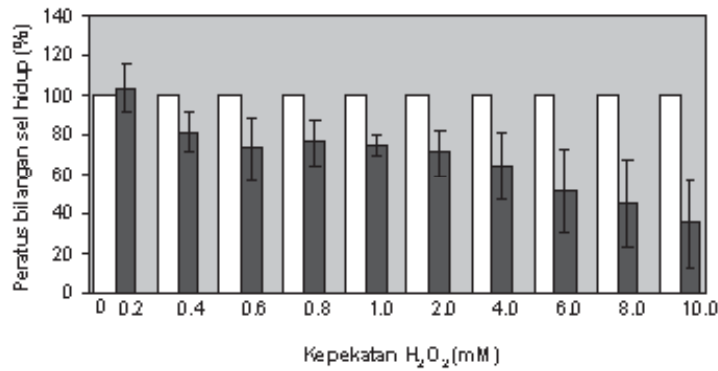


RAJAH 1. Perbandingan lengkung pertumbuhan *C. albicans* pada kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> berbeza berbanding kawalan

Untuk mengkaji tahap kerintangan sel terhadap perlakuan dengan bahan oksidan, sel telah didedahkan kepada kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang berbeza selama 60 minit, sebelum bilangan keseluruhan sel hidup ditentukan. Rajah 2 menunjukkan semakin tinggi kepekatan tekanan oksidatif yang diberikan, peratus kemandirian sel berbanding kawalan semakin berkurangan. Pada kepekatan 0.4-1.0 mM sebanyak 70-80% sel masih bermandiri. Namun apabila tekanan ditingkatkan dari 2.0-8.0 mM, peratus kemandirian sel menurun ke sekitar 50-60%. Pada kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10.0 mM, jumlah sel yang masih bermandiri adalah kurang dari 50%. Manakala pada kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM hingga 175 mM, hanya 0.8% hingga 0.1% sel sahaja mampu beradaptasi. Hasil yang diperoleh ini menunjukkan keupayaan *C. albicans* untuk beradaptasi terhadap tekanan oksidatif menurun dengan meningkatnya kepekatan bahan oksidan yang dikenakan. Selain daripada itu hasil daripada kajian ini menunjukkan bahawa *C. albicans* pencilan klinikal tempatan ini dapat beradaptasi dengan baik terhadap tekanan oksidatif. Hanya pada kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10.0 mM dan ke atas barulah jumlah sel yang dapat bermandiri kurang dari 50 peratus.

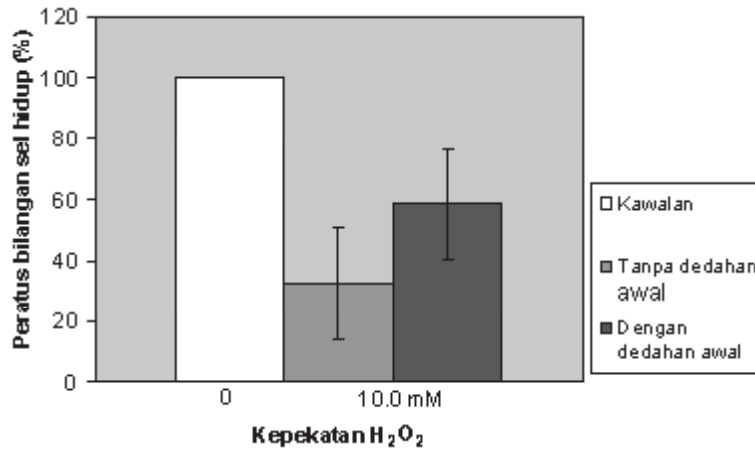
##### ANALISIS KEHADIRAN TINDAKBALAS ARUHAN TERHADAP OKSIDATIF

Keupayaan sel untuk beradaptasi dengan kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang tinggi selepas didedahkan dengan dos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang lemah iaitu 0.4 mM juga telah dikaji. Apabila memasuki salur darah, sel akan berhadapan dengan beberapa tekanan termasuklah tekanan oksidatif. Namun begitu apabila sel ditelan oleh makrofaj atau neutrofil, sel akan berhadapan dengan tekanan oksidatif yang lebih tinggi (Fradin et al. 2003, Misall et al. 2004). Adalah dijangkakan bahawa pendedahan sel kepada tekanan oksidatif yang rendah dapat membantu sel untuk menghadapi tekanan yang lebih tinggi. Berdasarkan data pada Rajah 3, peratus kemandirian sel yang telah menerima perlakuan awal dengan 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> didapati lebih tinggi berbanding sel yang terus didedahkan



RAJAH 2. Perbandingan peratus sel yang hidup selepas didedahkan kepada hidrogen peroksida pada kepekatan yang berbeza berbanding kawalan.

□ Tanpa dedahan kepada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kawalan)    ■ dedahan kepada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



RAJAH 3. Eksperimen pengadaptasian sel pada kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tinggi selepas menerima perlakuan pada dos yang lebih rendah

digunakan untuk kultur kawalan. Kemudian, sel pada pencairan tertentu disebarkan di atas piring YPD. Akhir sekali, bilangan koloni kepada kepekatan tinggi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peratus kemandirian sel yang telah menerima perlakuan awal sebelum didedahkan kepada kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang lebih tinggi iaitu pada 10.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalah 58.5%. Peratusan ini adalah lebih tinggi berbanding dengan sel-sel yang tidak menerima pendedahan awal terhadap H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, di mana peratus kemandirian adalah sebanyak 32.6% sahaja. Ini menunjukkan bahawa pendedahan *C. albicans* terhadap tekanan oksidatif yang lemah akan memberi perlindungan terhadap tekanan oksidatif yang lebih tinggi. Adalah dicadangkan bahawa ketika sel didedahkan terhadap tekanan oksidatif yang lemah, sel mula membina sistem pertahanan dalaman yang membolehkan sel rintang terhadap kesan bahan oksidan tersebut. Seterusnya, apabila sel terdedah kepada tekanan oksidatif yang lebih tinggi, keupayaan sel untuk beradaptasi meningkat kerana sistem pertahanan terhadap bahan oksidan telahpun diaruhkan.

KESAN TINDAKBALAS OKSIDATIF TERHADAP MORFOGENESIS YIS KEPADA HIFA

Keupayaan untuk membentuk struktur hifa adalah penting untuk membantu *C. albicans* menembusi sel-sel epitelium, membantu perlekatan sel di tisu-tisu yang telah dijangkiti dan menghindarkan dari dibunuh oleh sistem pertahanan hos seperti makrofaj (Sherwood et al. 1992; Lo et al. 1997). Di dalam makrofaj, sel-sel yis *C. albicans* akan berkembang menjadi sel hifa yang berupaya untuk menembusi dan memusnahkan makrofaj untuk terus berpoliferasi (Lorenz et al. 2004). Persoalan yang timbul ialah apakah isyarat luaran yang diterima oleh sel di dalam makrofaj yang mampu untuk mengaruhkan morfogenesis yis kepada hifa. Oleh sebab salah satu cara makrofaj memusnahkan patogen asing ialah dengan penghasilan bahan oksidan, maka berkemungkinan tekanan oksidatif tersebut merupakan isyarat luaran yang memainkan peranan untuk mengaruh pembentukan hifa. Di dalam kajian ini kesan tekanan oksidatif terhadap morfogenesis yis-hifa telah dilakukan dengan mendedahkan sel *C. albicans* kepada 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada suhu 37 °C. Suhu 37 °C digunakan dalam kajian ini



kerana ia adalah suhu badan hos dan pada suhu ini juga *C. albicans* berupaya untuk membentuk hifa daripada sel yis (Ernst, 2000). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahawa pendedahan terhadap tekanan oksidatif tidak mengaruh pembentukan hifa di mana sebanyak  $31.29 \pm 6.76$  hifa terhasil

berbanding dengan pendedahan pada suhu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  tanpa kehadiran bahan oksidan, iaitu sebanyak  $29.45\% \pm 8.97$ . Ini menunjukkan bahawa tekanan oksidatif tidak memberikan kesan yang besar dalam mengaruh morfogenesis yis-hifa *C. albicans* pencilan tempatan ini. Daripada hasil yang diperoleh dapatlah disimpulkan bahawa tekanan oksidatif bukanlah satu faktor yang penting untuk morfogenesis yis-hifa. Oleh itu, berkemungkinan di dalam makrofaj, tekanan oksidatif mungkin tidak memainkan peranan penting untuk mengaruh morfogenesis *C. albicans*.

#### KESIMPULAN

Pendedahan *C. albicans* terhadap bahan oksidan seperti hidrogen peroksida menunjukkan perencatan terhadap kadar pertumbuhan sel. Semakin tinggi kepekatan oksidan yang diberikan, peratus sel yang dapat bermandiri berkurangan. Namun pendedahan terhadap tekanan oksidatif lemah dapat memberi perlindungan daripada tekanan oksidatif yang lebih tinggi. Ini menunjukkan bahawa sistem pertahanan aruhan hadir di dalam *C. albicans* dan ianya penting untuk memastikan yis ini dapat mempertahankan diri dari tekanan oksidatif yang hadir pada persekitarannya. Kajian lanjutan terutamanya untuk mengenalpasti komponen-komponen penting sistem pertahanan ini sangat berguna untuk meningkatkan kefahaman tentang kebolehan *C. albicans* beradaptasi terhadap tekanan oksidatif. Kefahaman ini mungkin dapat membantu merangka strategi atau mengenalpasti sasaran yang sesuai untuk agen antikulat baru yang dapat menangani masalah jangkitan *C. albicans*.

#### PENGHARGAAN

Kajian ini telah dibiayai oleh geran penyelidikan IRPA 09-02-02-0103-EA255.

#### RUJUKAN

- Ernst, J.F. 2000. Transcription factors in *Candida albicans* - Environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146: 1763-1774.
- Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C. & Hube, B. 2003. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Biology* 47(6): 1523-1543
- Hampton, M.B., Kettle, A.J. & Winterbourn, C.C. 1998 Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92(9): 3007-3017.
- Jamieson, D.J., Stephen, D.W.S. & Terriere, E.C. 1996. Analysis of the adaptive stress response of *Candida albicans*. *FEMS*

- Lo, H., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebeberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G.R. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949.
- Lorenz, M.C., Bender, J.A. & Fink, G.R. 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell* 3(5): 1076-1087.
- Martin, M.V. 1999. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44: 429-437.
- Misall, T.A., Lodge, J.K. & McEwan, J.E. 2004. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: Implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryotic Cell* 3(4): 835-846.
- Ng, K.P., Madasamy, M., Saw, T.L., Baki, A., He, J. & Soo-Hoo, T.S. 1999. *Candida* biotypes isolated from clinical specimens in Malaysia. *Mycopathologia* 144: 135-140.
- Odds, F.C. 1994. *Candida* species and virulence. *ASM News* 60: 313-318.
- Pelroche-Llacsahuanga, H., Schnitzler, N., Schmidt, S., Tintelnot, K., Luticken, R. & Haase, G. 2000. Phagocytosis, oxidative burst, and killing of *Candida dubliensis* and *Candida albicans* by human neutrophils. *FEMS Microbiology Letters* 191: 151-155
- Sherwood, J., Gow, N.A.R., Gooday, G.W. & Marshall, D. 1992. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 30: 461-469.
- Vazquez-Torres, A. & Balish, E. 1997. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 170-192.

Pusat Pengajian BioSains dan Bioteknologi  
Fakulti Sains dan Teknologi  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
43600 UKM Bangi, Selangor  
MALAYSIA