

EFEK DEGRADASI KOLAGEN SIPROFLOKSASIN PADA FIBROBLAS DERMIS NORMAL MANUSIA

Thianti Sylviningrum, Sa'adatul Huriyah, Nurwestu Rusetiyanti,
Yohanes Widodo Wirohadidjojo

Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
FK Universitas Gadjah Mada/RSUD dr. Sardjito, Yogyakarta

ABSTRAK

Siprofloksasin merupakan antibiotik yang sering digunakan. Laporan klinis menunjukkan bahwa siprofloksasin dapat menurunkan ketebalan kulit pasien skleroderma. Penelitian pada binatang menunjukkan bahwa obat ini dapat memacu aktivitas matriks metaloproteinase. Sifat serupa pada kulit manusia normal belum diketahui.

Penelitian ini bertujuan menilai efek siprofloksasin dalam mendegradasi kolagen pada kulit normal. Fibroblas kulit normal passage II yang diisolasi dari preputium anak berusia 11 tahun digunakan sebagai subyek. Suspensi sel fibroblas 10^3 /ml dimasukkan ke dalam sumuran piring petri bersumur 96 dan dibagi menjadi 4 kelompok (plasebo, siprofloksasin 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml) masing-masing kelompok terdiri dari 6 sumuran. Sel dibiakan dengan DMEM + 10% FBS, diinkubasi selama 4 dan 5 hari. Untuk menilai degradasi kolagen, medium diganti dengan larutan garam fisiologis buffer, diinkubasi selama 30 menit dan digoyang-goyang dengan penggoyang otomatis 250 rpm. Kolagen larut diukur dengan esai sirius red, kemudian dibaca dengan spektrofotometer 570 nm dan dianalisa dengan uji Mann-Whitney.

Rerata kolagen larut dari kelompok plasebo dan perlakuan berturut-turut adalah $0,79 \pm 0,13$ dan $0,84 \pm 0,15$; $0,77 \pm 0,11$; $0,77 \pm 0,15$ di hari ke-4 ($P > 0,05$). Pada hari ke-5, rerata kolagen larut kelompok plasebo dan perlakuan yaitu $0,92 \pm 0,06$; dan $0,88 \pm 0,06$; $0,92 \pm 0,15$; $1,08 \pm 0,39$ ($P > 0,05$).

Siprofloksasin tidak berefek mendegradasi kolagen pada dermis manusia normal. (MDVI 2013; 40/3:104-107)

Kata Kunci: siprofloksasin, fibroblas, degradasi kolagen

ABSTRACT

Ciprofloxacin is an antibiotic. Clinical report showed ciprofloxacin reduce skin thickness in scleroderma patients. In animal study, ciprofloxacin induced matrix metalloproteinase activity. The same effect on normal human skin is unknown.

To measure collagen degradation effect of ciprofloxacin on normal human skin, passage II normal skin fibroblast isolated from 11 year-old-boy preputium used as subject study. Concentration of 10^3 /ml fibroblast cell suspensions were plated on 96 well tissue cultures and divided into 4 groups (placebo, ciprofloxacin 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml) with 6 wells for each group. Cells were cultured with DMEM+10% FBS, incubated for 4 and 5 days. To assess collagen degradation, culture medium was changed with buffer normal saline solution, incubated for 30 minutes and shaken it with shaker at 250 rpm. Soluble collagen was measured with sirius red essay, read with spectrophotometer 570nm and analyzed with Mann-Whitney test.

Means of soluble collagen from placebo and treated groups were $0,79 \pm 0,13$ and $0,84 \pm 0,15$; $0,77 \pm 0,11$; $0,77 \pm 0,15$ at day 4 ($P > 0,05$). At day 5, means of soluble collagen from placebo and treated groups were $0,92 \pm 0,06$; and $0,88 \pm 0,06$; $0,92 \pm 0,15$; $1,08 \pm 0,39$ ($P > 0,05$).

Ciprofloxacin has no collagen degradation effect on normal human dermal fibroblast. (MDVI 2013; 40/3:104-107)

Keywords : ciprofloxacin, fibroblast, collagen degradations

Korespondensi:
Gd. Radiopoetra Lt.3,
Jl. Farmako, Sekip, Yogyakarta
Telp: 0274 - 560700
Email: thiantisylviningrum@yahoo.com

PENDAHULUAN

Siprofloksasin adalah antibiotik golongan *fluoroquinolone* yang banyak digunakan untuk terapi infeksi pada berbagai sistem tubuh. Efek samping penggunaan *fluoroquinolone*, termasuk siprofloksasin pada anak-anak dan usia lanjut, berupa tendinitis dan ruptur tendon terutama pada tendon dan sendi penyangga berat badan.¹ Penelitian pada hewan coba (anjing normal) dengan spesimen dari tendon *Achilles*, paratenon dan kapsul bahu menunjukkan bahan siprofloksasin meningkatkan aktivitas *matrix metalloproteinase* (MMP) fibroblas, mengurangi proliferasi fibroblas, menurunkan sintesis kolagen, serta sintesis proteoglikan fibroblas yang diduga menjadi dasar efek antifibrosis siprofloksasin.²

Efek antifibrosis siprofloksasin juga ditunjukkan oleh penelitian Rubén dkk. Pada pasien dengan skleroderma yang mengalami penurunan ketebalan kulit yang diukur dengan modifikasi *Rodnan skin score* setelah diberi siprofloksasin 250 mg setiap 12 jam per hari selama 6 bulan.³ Hasil penelitian tersebut sesuai dengan penelitian Sendzik, dkk. yang menyebutkan bahwa siprofloksasin pada dosis terapi dapat meningkatkan MMP dan degradasi kolagen tipe I pada kultur sel tendon manusia.⁴

Peningkatan MMP di dermis kulit normal manusia dapat menyebabkan penurunan *extracellular matrix* (ECM) sehingga memicu kerut di kulit. Hal tersebut dapat diperparah dengan efek fotosensitisasi siprofloksasin.¹ Informasi tentang efek kerutan akibat siprofloksasin masih terbatas, karena belum ada penelitian tentang efek degradasi kolagen sebagai komponen ECM utama pada dermis kulit normal manusia. Berdasarkan bukti tersebut, muncul permasalahan apakah siprofloksasin dapat mendegradasi kolagen sebagai akibat peningkatan aktivitas MMP pada fibroblas kulit normal manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk menilai efek siprofloksasin dengan berbagai konsentrasi dalam mendegradasi kolagen pada kulit normal manusia.

METODE

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian *in vitro* dengan rancangan kuasi eksperimental. Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Februari 2012 di Laboratorium Teknologi Kedokteran Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Sampel penelitian adalah biakan fibroblas (subkultur II), diisolasi dari kulit *preputium* anak berusia 11 tahun, dan dibiakkan dengan teknik *explant*. *Preputium* tersebut dibiakkan dalam *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) dari Gibco® yang mengandung 10% *Bovine Serum* (BS), 1000 µg/100 unit Penstrep-Gibco®/ml, *Fungizone* 1000 µg/ml, dan 100 mg/ml *Ceftriaxone*. Suspensi fibroblas diteteskan pada tiap sumuran sebanyak 1×10^5 untuk masing-masing sumuran.

Kelompok penelitian dibagi menjadi 2 yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat siprofloksasin dari *Phapros*® 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml dan masing-masing kelompok diulang sebanyak 6 kali. Variabel bebas pada penelitian ini adalah biakan fibroblas kulit normal manusia dan siprofloksasin dalam berbagai konsentrasi. Variabel terikat adalah hasil pengukuran kolagen larut yang terdegradasi dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-4 dan ke-5.

Persiapan biakan fibroblas dilakukan sesuai protokol subkultur *Freshney*.⁵ Dilakukan pengambilan biakan fibroblas *passage II* dari cawan kultur dengan membuang media dalam cawan tersebut. Sebanyak 10 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dimasukkan ke dalam cawan, dibiarkan selama 10 menit lalu dibuang. Tripsin dalam EDTA 0,25% sebanyak 3-4 ml dimasukkan ke dalam cawan kultur dan biakan diinkubasi dalam suhu 37° C dengan 5% CO₂ selama 2 menit. Biakan disuspensikan dalam 6 ml DMEM lengkap dan dilakukan *vortex* serta disentrifugasi pada 5000 putaran permenit selama 5 menit dengan suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan sebanyak 8 ml NaCl 0,9% dimasukkan ke dalam tabung, lalu di *vortex* kembali, dilanjutkan dengan sentrifugasi ulang pada kecepatan dan suhu yang sama selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan DMEM lengkap ditambahkan ke dalam tabung sebanyak 1 ml dan di lakukan *vortex* kembali. Suspensi yang terbentuk berisi fibroblas yang siap untuk digunakan. Suspensi fibroblas dipindahkan ke cawan petri steril dan ditambahkan DMEM lengkap sesuai kebutuhan penelitian. Suspensi fibroblas sebanyak 200 µL yang berisi 1×10^5 sel diteteskan ke dalam setiap sumuran pada 2 *microplate* yang berisi 96 sumur (Iwaki™) serta diinkubasi pada suhu 37° C dan kadar CO₂ 5% selama 48 jam sampai sel fibroblas bercampur.

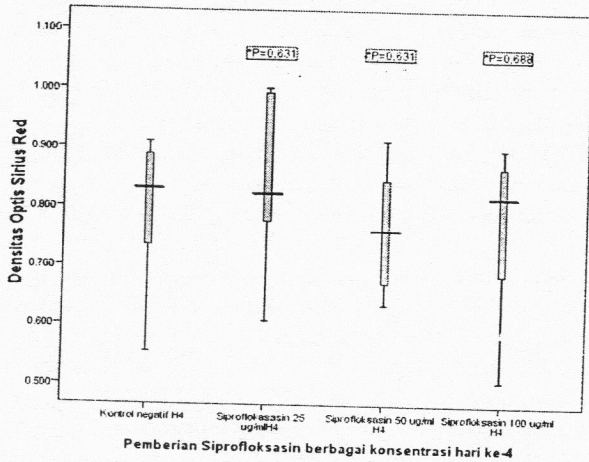
Biakan fibroblas pada kelompok perlakuan yang sudah bercampur ditambahkan siprofloksasin dalam konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, sedangkan kelompok kontrol tidak diberi tambahan siprofloksasin. Biakan fibroblas selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C dan kadar CO₂ 5% selama 4 dan 5 hari. Pada hari ke-4, media biakan di ganti dengan PBS dan diinkubasi selama 30 menit serta digoyang-goyang dengan penggoyang otomatis pada kecepatan 250 putaran permenit. Kolagen larut diukur dengan *sirius red* dan dibaca dengan spektrofotometer 570 nm. Langkah yang sama dilakukan pada inkubasi biakan di *microplate* yang berbeda pada hari ke-5.

Teknik pewarnaan *sirius red* dilakukan dengan cara memindahkan 50 µl dari setiap sumuran ke dalam *microtube* 1,5 ml lalu ditambahkan 1000 µl *sirius red* dan diaduk dengan *vortex*. Selanjutnya, *microtube* disentrifugasi pada 1000 G selama 5 menit dan supernatan yang terbentuk dibuang. Sebanyak 1000 µl HCl 0,1 N ditambahkan ke dalam *microtube* dan dikocok kembali dengan *vortex* serta disentrifugasi lagi. Langkah ini dilakukan sampai 4 kali untuk menghilangkan pewarna yang terikat. Sebanyak

1000 µl NaOH 0,5 N ditambahkan ke dalam *microtube* dan dikocok dengan *vortex*, kemudian dari setiap *microtube* diambil sebanyak 200 µl dan dimasukkan ke dalam *multiwell plate* dan dibaca dengan spektrofotometer 570 nm untuk mengukur kolagen larut yang terdegradasi. Analisis data dilakukan menggunakan uji *Mann-Whitney* dengan hasil bermakna $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

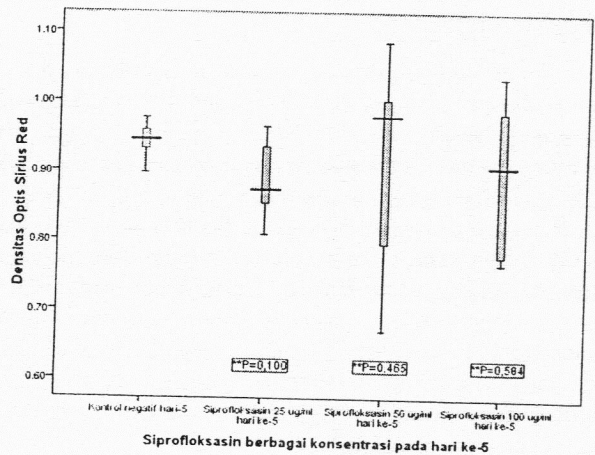
Hasil perbandingan dan analisis jumlah kolagen larut yang terdegradasi pada kelompok perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.



*p = nilai p perbedaan rerata jumlah kolagen larut yang terdegradasi pada masing- masing dosis siprofloksasin terhadap kontrol pada hari ke-4

Gambar 1. Grafik perbandingan rerata jumlah kolagen larut yang terdegradasi pada kultur fibroblas dalam berbagai dosis siprofloksasin hari ke-4 dengan kontrol

Pada gambar 1, tampak rerata jumlah kolagen larut yang terdegradasi pada hari ke-4 lebih banyak dijumpai pada kelompok siprofloksasin dengan konsentrasi 25 µg/ml, dibandingkan dengan kelompok yang lain. Hasil uji *Mann-Whitney* diperoleh nilai p antara kelompok kontrol dengan kelompok siprofloksasin 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml berturut-turut adalah 0,100; 0,465; dan 0,584. Hal ini menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna dalam jumlah kolagen larut yang terdegradasi antara kelompok kontrol dan perlakuan pada hari ke-4.



**p = nilai p perbedaan rerata jumlah kolagen larut yang terdegradasi pada masing- masing dosis siprofloksasin terhadap kontrol pada hari ke-5

Gambar 2. Grafik perbandingan rerata jumlah kolagen larut yang terdegradasi pada kultur fibroblas dalam berbagai dosis siprofloksasin hari ke-5 dengan kontrol

Pada hasil observasi terhadap kelompok kontrol dan siprofloksasin dengan konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml hari ke-5 diperoleh rerata kolagen larut yang terdegradasi lebih banyak pada kelompok perlakuan siprofloksasin 100 µg/ml seperti yang tampak pada gambar 2. Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan perbedaan tidak signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-5 ($p > 0,05$).

Dermis adalah bagian struktur kulit yang terdiri atas berbagai sel antara lain fibroblas, makrofag, dan sel mast. Komponen utama lain di dermis adalah ECM yang didominasi oleh kolagen tipe I.⁶ Ketidakseimbangan antara faktor yang mempengaruhi produksi dan degradasi kolagen dapat menyebabkan gangguan pada dermis sehingga dermis tidak dapat berfungsi dengan baik. Salah satu faktor yang mempengaruhi produksi kolagen yaitu sel fibroblas sebagai sumber kolagen, sedangkan *matrix metalloproteinase* (MMP) merupakan enzim yang bersifat mendegradasi kolagen.

Siprofloksasin merupakan antimikroba yang bekerja dengan menghambat *DNA gyrase* pada bakteri. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa siprofloksasin secara *in vitro* dapat menyebabkan efek sitotoksik yang tergantung pada konsentrasi dan durasi pajanan berupa kerusakan susunan ECM, peningkatan MMP, inflamasi paratenon, perubahan degeneratif pada sel tendon, penurunan

aktivitas mitokondria, apoptosis, dan proliferasi sel terhenti.^{2,7,8} Mekanisme yang mendasari efek sitotoksik siprofloksasin tersebut adalah kerusakan mitokondria sehingga terjadi gangguan metabolisme energi selular, produksi *reactive oxygen species* (ROS) berlebihan, siklus sel terhenti, dan apoptosis.⁹⁻¹¹

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa efek antimikroba diperoleh pada konsentrasi siprofloksasin maksimal 7 µg/ml dalam darah manusia setelah pemberian secara oral atau intravena. Penelitian pada *Jurkat cells* menunjukkan bahwa siprofloksasin dengan konsentrasi 25 µg/ml selama 4-11 hari dapat menghambat proliferasi *Jurkat cells* tanpa menyebabkan apoptosis, sedangkan pada konsentrasi di atas 80 µg/ml dengan durasi pajanan yang sama dapat muncul efek apoptosis.¹² Siprofloksasin dengan konsentrasi 200-300 µg/ml dapat menimbulkan efek apoptosis pada sel karsinoma *vesica urinaria* hanya dalam waktu beberapa jam.¹³ Hasil penelitian pada kultur sel fibroblas dermis normal manusia menyebutkan bahwa siprofloksasin pada konsentrasi 0.129 - 0.194 mM selama 48 atau 72 jam dapat menghambat proliferasi fibroblas, sedangkan di luar rentang konsentrasi tersebut fibroblas tetap dapat tumbuh.¹⁴

Penelitian tentang konsentrasi siprofloksasin yang dapat menyebabkan degradasi kolagen pada dermis manusia belum pernah diteliti. Pada penelitian ini rentang konsentrasi siprofloksasin yang digunakan mengacu pada hasil penelitian Wen-Chung dkk. yaitu konsentrasi siprofloksasin optimal yang sudah dapat mendegradasi kolagen tipe I pada kultur tendon *Achilles* tikus.⁷ Perbandingan jumlah rerata kolagen larut yang terdegradasi pada kelompok kontrol dan perlakuan antara hari ke-4 dan ke-5 menunjukkan jumlah yang lebih banyak pada hari ke-5. Hal ini sesuai dengan penelitian Williams dkk. yang menyebutkan bahwa efek sitotoksik siprofloksasin bergantung pada waktu dan konsentrasi.² Hasil penelitian ini menyatakan tidak ada perbedaan bermakna pada jumlah kolagen larut yang terdegradasi antara kelompok kontrol dan siprofloksasin 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml. Hasil penelitian ini dapat dijelaskan karena kemungkinan konsentrasi siprofloksasin dan durasi waktu pajanan yang belum dapat menimbulkan efek mendegradasi kolagen tipe I pada dermis normal manusia.

KESIMPULAN DAN SARAN

Siprofloksasin dengan konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml tidak dapat menimbulkan efek degradasi kolagen pada fibroblas dermis manusia normal. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi

siprofloksasin optimal yang dapat memacu degradasi kolagen fibroblas dermis normal manusia dengan mengamati parameter lain yang lebih spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

1. R Stahlmann. Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicology Lett.* 2002; 127: 269-77.
2. Williams PJ III, Attia E, Wickiewicz, Hannafin JA. The effect of ciprofloxacin on tendon, paratenon, and capsular fibroblast metabolism. *Am J Sports Med.* 2000; 28: 364-9.
3. Rubén EC, Manuel VR, Agustín OR, Huerta M, Antonio FM, Ivan DE. Ciprofloxacin utility as antifibrotic in the skin of patients with scleroderma. *J Dermatol.* 2010; 37: 323-9.
4. Sendzik J, Shakibaei M, Schäfer-Korting M, Stahlmann R. Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix signaling proteins, metalloproteases and caspase-3 in cultured human tendon cells. *Toxicology.* 2005; 212: 24-36.
5. Freshney RI. Cytotoxicity. Dalam: *Culture of animal cell. A manual of basic technique.* Edisi ke-4. New York: Wiley-Liss; 2000. h. 329-44.
6. Taihao Q, Zhaoping Q, Robichaud P, Voorhees JJ, Fisher GJ. CCN1 contributes to skin connective tissue aging by inducing age-associated secretory phenotype in human skin dermal fibroblasts. *J Cell Commun and Sign.* 2011; 5: 201-7.
7. Corps AN, Harrall RL, Curry VA, Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. Ciprofloxacin enhances the stimulation of matrix metalloproteinase 3 expression by interleukin-1 beta in human tendon-derived cells. A potential mechanism of fluoroquinolone-induced tendinopathy. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 3034-40.
8. Tsai WC, Hsu CC, Tang FT, Wong AM, Chen YC, Pang JH. Ciprofloxacin mediated cell proliferation inhibition and G2/M cell cycle arrest in tenocytes. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 1657-63.
9. Oue'draogo G, Morlie' re P, Santus R, Miranda MA, Castell JV. Damage to mitochondria of cultured human skin fibroblasts photosensitized by fluoroquinolones. *J Photochem and Photobiol B: Biology.* 2000; 58: 20-5.
10. Pouzaud F, Bernard-Beaubois K, Thevenin M, Warnet JM, Hayem G, Rat P. In vitro discrimination of fluoroquinolones toxicity on tendon cells: involvement of oxidative stress. *J Pharm Exp Ther.* 2004; 308: 394-402.
11. Herold C, Ocker M, Ganslmayer M, Gerauer H, Hahn EG, Schuppan D. Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer.* 2002; 86: 443-8.
12. Koziel R, Szczepanowska J, Magalska A, Piwocka K, Duszyński J, Zablocki K. Ciprofloxacin inhibits proliferation and promotes generation of aneuploidy in jurkat cells. *J Physiol Pharmacol.* 2010; 61: 233-9.
13. Aranha O, Wood DP, Sarkar FH. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 891-900.
14. Guérbay A, Garrel C, Osman M, Richard MJ, Favier A, Hincal F. Cytotoxicity in ciprofloxacin-treated human fibroblast cells and protection by vitamin E. *Hum & Exper Toxicol.* 2002; 21: 635-41.