

EFEK SIPROFLOKSASIN TERHADAP AKTIVITAS MATRIX METALLOPROTEINASE DAN VIABILITAS SEL FIBROBLAS KELOID

Thianti Sylviningrum, Niken Trisnowati, Yohanes Widodo Wirohadidjojo

Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
FK. Universitas Gadjah Mada / RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta

ABSTRAK

Keloid merupakan tumor jinak dermis ditandai oleh peningkatan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen serta inaktivasi matrix metalloproteinase (MMP) sehingga degradasi kolagen menurun. Siprofloksasin telah terbukti menyebabkan penurunan proliferasi fibroblas serta peningkatan aktivitas MMP, tetapi efek tersebut pada keloid belum diketahui. Penelitian ini bertujuan menilai efek siprofloksasin terhadap aktivitas MMP dalam mendegradasi kolagen dan viabilitas sel fibroblas keloid.

Biakan fibroblas keloid dibagi menjadi kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang masing-masing diberi siprofloksasin 2,5, 10 dan 40 µg/ml selama 48 jam dengan 3 kali pengulangan untuk setiap kelompok. Sirius red dan MTT assay digunakan untuk menilai aktivitas MMP dalam mendegradasi kolagen dan viabilitas sel fibroblas keloid. Hasil kedua pengukuran tersebut dibaca dengan spektrofotometer panjang gelombang 570 nm. Perbandingan rerata densitas optik kolagen terdegradasi dianalisis dengan uji one way ANOVA. Rerata densitas optik viabilitas sel fibroblas keloid dianalisis menggunakan uji Friedman dilanjutkan uji Wilcoxon.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada rerata densitas optik kolagen terdegradasi dan viabilitas sel, antara kelompok fibroblas keloid terpajan siprofloksasin dan kelompok kontrol ($p > 0,05$). Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa siprofloksasin tidak menunjukkan efek peningkatan aktivitas MMP dalam mendegradasi kolagen dan penurunan viabilitas sel fibroblas keloid.

Kata kunci: siprofloksasin, keloid, fibroblas, kolagen

ABSTRACT

Keloid is a benign dermal tumor characterized by increased fibroblast proliferation and collagen synthesis, and matrix metalloproteinase (MMP) inactivation that lead to decreased collagen degradation. Ciprofloxacin has been known to decrease fibroblast proliferation and to increase MMP activity, however its effect on keloid fibroblasts still unidentified. This study aimed to assess ciprofloxacin effect on MMP activity to degrade collagen and keloid fibroblast cell viability.

Keloid fibroblast cultures were divided into control and 3 ciprofloxacin-treated groups with 2,5,10 and 40 µg/ml range dose exposure, for 48 hours with 3 times repetition. Sirius red and MTT assay were performed to assess MMP activity on collagen degradation and fibroblast cell viability. The results were measured by a spectrophotometer with 570 nm wavelength. The optical density mean difference of degraded collagen was analyzed using one way ANOVA test, while the mean difference optical density of fibroblast cell viability was analyzed using the Friedman test followed by Wilcoxon test.

The mean optical density of degraded collagen and fibroblast cell viability of ciprofloxacin-treated groups were not significantly different compare to control group ($p > 0,05$). We concluded that ciprofloxacin has no effect on the increase of MMP activity to degrade collagen and decrease of keloid fibroblast cell viability.

Keywords: ciprofloxacin, keloid, fibroblast, collagen

PENDAHULUAN

Keloid adalah tumor jinak di dermis yang ditandai oleh peningkatan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen.^{1,2} Proliferasi fibroblas keloid yang meningkat juga disebabkan oleh penurunan apoptosis yang dipengaruhi oleh berbagai gen serta peningkatan ekspresi *transforming growth factor* β (TGF- β 1), TGF- β 2 dan reseptornya.^{3,4} Pada keloid, sintesis kolagen yang tinggi disebabkan oleh peningkatan proliferasi dan viabilitas fibroblas, peningkatan ekspresi TGF- β 1 dan penurunan degradasi kolagen akibat inaktivasi *matrix metalloproteinase* (MMP).^{4,5}

Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan *fluoroquinolone* yang efektif untuk terapi infeksi sistemik.⁶ Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pajanan siprofloksasin secara *in vitro* mengakibatkan peningkatan aktivitas MMP dan degradasi kolagen, penurunan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen.^{7,8} Efek siprofloksasin terhadap aktivitas MMP dalam mendegradasi kolagen dan viabilitas fibroblas keloid sejauh ini belum diketahui. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menilai efek siprofloksasin terhadap degradasi kolagen akibat aktivitas MMP dan viabilitas fibroblas keloid.

METODE DAN CARA PENELITIAN

Sampel

Sampel penelitian adalah biakan fibroblas keloid subkultur ketiga dengan teknik explants yang diisolasi dari 6 orang pasien keloid setelah menandatangani *informed consent*. Fibroblas keloid dibiakkan dalam medium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)-Sigma™ dengan tambahan 10% *fetal bovine serum* (FBS), 1000 μ g/100 unit Pen Strep (Gibco®, California, Amerika Serikat), *Fungizone* 1000 μ g/ml (Gibco®, California, Amerika Serikat); dan 100 mg/ml *Ceftriaxone* (Phapros®, Indonesia). Suspensi fibroblas berisi 1×10^5 sel dari masing – masing pasien keloid yang diteteskan pada tiap sumur yang berbeda dari *microplate* berisi 96 sumur (Iwaki™, Jepang).

Kelompok penelitian yang masing - masing berisi biakan fibroblas dibagi menjadi 4, yaitu 1 kelompok kontrol yang diberi DMEM tanpa pajanan siprofloksasin (Phapros®, Indonesia) dan 3 kelompok perlakuan yang mendapat DMEM dan siprofloksasin 2,5 μ g/ml, 10 μ g/ml dan 40 μ g/ml. Pada setiap kelompok dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Semua kelompok diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dan CO₂ 5%. Setelah inkubasi selama 48 jam, media pada seluruh kelompok dibuang dan diganti *phosphat buffer saline* (PBS), kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C dan CO₂ 5%.

Pengukuran kolagen terdegradasi

Penilaian kolagen terdegradasi akibat aktivitas MMP dilakukan dengan prosedur berikut. Setiap sumur yang berisi biakan fibroblas, diambil sebanyak 50 μ l dan dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mililiter (ml) lalu ditambahkan 1000 mikroliter (μ l) *sirius red* dan digoyang-goyang dengan penggoyang otomatis kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 G selama 5 menit, lalu supernatan dibuang. Langkah selanjutnya adalah menambahkan 1000 μ l HCl 0,1 N ke dalam setiap *microtube* dan digoyang-goyang dengan penggoyang otomatis, dilanjutkan pencucian dengan HCl 0,1 N sebanyak 2-3 kali lalu ditambahkan 1000 μ l NaOH 0,5 N ke dalam setiap *microtube* dan digoyang-goyang kembali dengan penggoyang otomatis. Dilakukan pengambilan supernatan sebanyak 200 μ l dari setiap *microtube*, kemudian dimasukkan ke dalam *multiwell plate* dan kolagen terdegradasi diukur secara kolorimetris menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 570 nm.

Pengukuran viabilitas fibroblas keloid

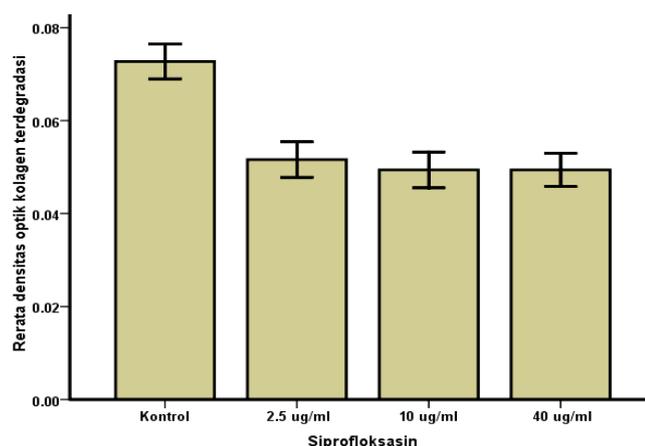
Pada penelitian ini, pengukuran viabilitas sel dilakukan menggunakan *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT) assay. Prosedur tersebut dimulai dengan membuang semua medium yang tersisa dalam sumur di *microwell plate*, lalu ditambahkan 200 μ l medium baru dan 50 μ l MTT. Selanjutnya, *microplate* dibungkus dengan kertas *aluminium foil*, diinkubasi pada suhu 37°C dan CO₂ 5% selama 4-8 jam, kemudian MTT dan medium dibuang. Pada setiap sumur ditambahkan 200 μ l *dimethylsulfoxide* (DMSO) dan 25 μ l glisin *buffer*, lalu viabilitas fibroblas keloid dinilai dengan spektrofotometer panjang gelombang 570 nm.

Analisis data

Analisis data dilakukan dengan program komputer. Perbedaan densitas optik viabilitas fibroblas keloid dan kolagen terdegradasi dari kelompok kontrol dan perlakuan dianalisis dengan uji *one way ANOVA* bila sebaran data normal. Bila nilai $p < 0,05$ dari hasil uji *one way ANOVA*, maka analisis dilanjutkan dengan *post hoc test* menggunakan *Least Square Difference* (LSD). Apabila sebaran data tidak normal, analisis data dilakukan dengan uji *Friedman*, dan dilanjutkan uji *Wilcoxon* sebagai *post hoc test* bila $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN

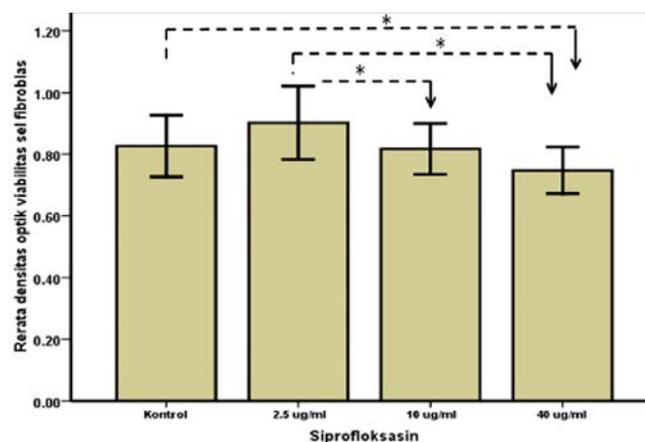
Hasil perbandingan rerata densitas optik kolagen terdegradasi antara kelompok fibroblas keloid setelah terpajan *siprofloksasin* berbagai konsentrasi dan kelompok kontrol selama 48 jam dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Grafik perbandingan rerata densitas optik kolagen terdegradasi antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Rerata densitas optik kolagen terdegradasi kelompok kontrol lebih tinggi ($0,727 \pm 0,015$) dibandingkan semua kelompok fibroblas keloid yang terpajan siprofloksasin. Rerata densitas optik kolagen terdegradasi pada kelompok dengan siprofloksasin 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 40 $\mu\text{g/ml}$ sedikit lebih rendah dibandingkan kelompok siprofloksasin dengan konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/ml}$, yaitu $0,049 \pm 0,016$ dan $0,049 \pm 0,015$. Hasil uji *one way ANOVA* terhadap rerata densitas optik kolagen terdegradasi antara kelompok kontrol dan kelompok fibroblas keloid yang terpajan siprofloksasin tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$).

Rerata densitas optik viabilitas fibroblas keloid antara kelompok kontrol dan perlakuan tampak pada gambar 2.



* $p < 0,05$

Gambar 2. Grafik perbandingan rerata densitas optik viabilitas fibroblas keloid antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Rerata densitas optik viabilitas fibroblas keloid pada kelompok perlakuan siprofloksasin dengan konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/ml}$ lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol, yaitu $0,902 \pm 0,503$. Penurunan densitas optik viabilitas

fibroblas keloid ditunjukkan pada kelompok fibroblas yang mendapatkan pajanan siprofloksasin mulai dari dosis 10 $\mu\text{g/ml}$. Kelompok fibroblas keloid terpajan siprofloksasin 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 40 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan rerata densitas optik viabilitas fibroblas yang sama dan sedikit lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, yaitu $0,816 \pm 0,353$ dan $0,747 \pm 0,322$. Uji Friedman untuk membandingkan rerata densitas optik viabilitas fibroblas keloid antara kelompok kontrol dan perlakuan menunjukkan perbedaan hasil yang bermakna ($p < 0,000$). *Post hoc test* dengan uji Wilcoxon menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada rerata densitas optik viabilitas fibroblas keloid antara kelompok fibroblas terpajan siprofloksasin dan kelompok kontrol ($p > 0,05$).

PEMBAHASAN

Keloid adalah tumor jinak di dermis dengan akumulasi kolagen berlebihan dan peningkatan proliferasi serta viabilitas fibroblas. Peningkatan kolagen terdegradasi terjadi akibat aktivitas MMP-1 dan degradasi lebih lanjut oleh MMP-2. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pajanan siprofloksasin selama 48 jam tidak meningkatkan aktivitas MMP dalam mendegradasi kolagen. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Tsai, dkk (2011), yaitu siprofloksasin mulai dosis 5 $\mu\text{g/ml}$ selama 24 jam telah menyebabkan peningkatan kolagen terdegradasi melalui peningkatan aktivitas MMP-2.⁸ Menon, dkk (2013) menyebutkan bahwa tenosit manusia yang terpajan siprofloksasin 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 20 $\mu\text{g/ml}$ selama 48 jam telah menunjukkan penurunan kemampuan *cross link* kolagen dan *tissue inhibitors of metalloproteinase-1* (TIMP-1) serta peningkatan aktivitas MMP-1.⁹ Hasil penelitian ini berbeda dari hasil penelitian sebelumnya,^{8,9} karena sampel pada penelitian ini menggunakan kultur fibroblas keloid. Fibroblas keloid berbeda dengan fibroblas yang dijumpai pada dermis dan tendon, baik dari manusia maupun hewan coba. Pada fibroblas keloid terjadi peningkatan berbagai ekspresi gen serta peningkatan TGF- β 1 dan TGF- β 2 yang berakibat pada peningkatan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen serta penurunan apoptosis sel.^{4,8}

Akumulasi kolagen pada keloid diakibatkan oleh peningkatan TGF- β 1, peningkatan *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) serta peningkatan kadar TIMP-1, MMP-1 dan MMP-2 dibandingkan dengan orang normal.^{3,10} Penelitian oleh Wang, dkk (2011) menunjukkan *tamoxifen* dengan konsentrasi 1 nanomolar (nM), 10nM, dan 100 nM menurunkan ekspresi TIMP-1 pada kultur *human lung adenocarcinoma cell line*.¹¹ Hasil penelitian dari Lipton, dkk (2008) menyebutkan bahwa pemberian tamoxifen pada penderita kanker payudara metastasis selama 13 bulan dapat menurunkan kadar TIMP-1 serum, walaupun

efek tersebut lebih rendah dibandingkan dengan *letrozole*.¹² Efek *tamoxifen* yang dapat menurunkan TIMP-1 belum dimanfaatkan secara luas pada berbagai penyakit dengan peningkatan TIMP-1, misalnya keloid. Siprofloksasin terbukti meningkatkan kadar MMP-1 dan MMP-2 sehingga kadar kedua protein tersebut semakin tinggi.^{7,8} Peningkatan MMP-1 dan MMP-2 pada keloid tidak dapat menyebabkan degradasi kolagen akibat peningkatan PAI-1. Peningkatan PAI-1 akan menyebabkan MMP tidak dapat dikonversi menjadi enzim yang aktif untuk mendegradasi kolagen.¹⁰ Hal tersebut dapat menjadi salah satu dasar mekanisme yang menyebabkan tidak terjadi peningkatan kolagen terdegradasi pada kultur fibroblas keloid yang terpajan siprofloksasin.

Faktor lain yang dapat mengakibatkan tidak ada peningkatan degradasi kolagen pada kultur fibroblas keloid adalah peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS). Hasil penelitian dari Jiang, dkk (2003) menyebutkan bahwa ekspresi TGF- β 1 bersifat ROS-dependent dalam meningkatkan coding gen protein *extra cellular matrix* (ECM) sehingga terjadi peningkatan sintesis ECM, peningkatan sintesis PAI-1, dan penurunan aktivitas plasmin.¹³ Peran TGF- β 1 sebagai sumber ROS endogen pada berbagai tipe sel non-fagositik termasuk fibroblas terjadi melalui peningkatan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxidase 4 atau NOX4.¹⁴ Siprofloksasin merupakan salah satu sumber ROS eksogen dan efek sitotoksik siprofloksasin diperantarai oleh ROS.^{15,16} Peningkatan produksi ROS oleh siprofloksasin bergantung pada dosis dan pajanan. Guérbay, dkk (2002) menyebutkan siprofloksasin 0,194 mM dalam 48 jam menyebabkan peningkatan *lipid peroxidation* dan berhubungan dengan penurunan viabilitas fibroblas.¹⁶ Pada penelitian ini, walaupun ROS tidak diukur, tetapi tidak menutup kemungkinan terdapat keterlibatan ROS pada degradasi kolagen yang tidak meningkat pada kultur fibroblas keloid yang terpajan siprofloksasin.

Hasil penelitian ini menunjukkan viabilitas fibroblas keloid cenderung meningkat pada siprofloksasin dengan konsentrasi 2,5 μ g/ml. Hal tersebut mungkin disebabkan karena siprofloksasin pada dosis 2,5 μ g/ml dapat memproduksi ROS yang mampu meningkatkan proliferasi fibroblas sebagai kompensasi terhadap kerusakan sel. Penjelasan tersebut sesuai dengan pendapat Traverso, dkk (2013) bahwa ROS yang tidak diproduksi berlebihan dapat menyebabkan respons peningkatan sintesis sel sebagai kompensasi atas kerusakan sel yang tidak permanen.¹⁷

Hasil pengukuran viabilitas sel fibroblas keloid dengan menggunakan MTT *assay* menunjukkan penurunan viabilitas fibroblas setelah pajanan siprofloksasin dosis 10 μ g/ml dan 40 μ g/ml. Hal tersebut menunjukkan bahwa

telah terjadi peningkatan kerusakan mitokondria oleh siprofloksasin. Efek siprofloksasin dapat menyebabkan kematian sel melalui kerusakan mitokondria.¹⁶ Siprofloksasin diikuti radiasi sinar ultra violet A terbukti menyebabkan kerapuhan membran mitokondria sehingga terjadi kerusakan mitokondria.¹⁶ Kerusakan mitokondria berhubungan dengan berhentinya siklus sel dan peningkatan apoptosis.

Mekanisme lain yang mungkin mendasari penurunan viabilitas fibroblas keloid pada kelompok yang terpajan siprofloksasin 10 μ g/ml dan 40 μ g/ml pada penelitian ini adalah jumlah ROS yang mungkin diproduksi berlebihan sehingga terjadi penghentian siklus sel, peningkatan apoptosis, dan peningkatan kerusakan mitokondria fibroblas.^{18,19} Pada penelitian ini tidak dijumpai perbedaan yang bermakna pada viabilitas sel antara kelompok fibroblas keloid yang terpajan siprofloksasin dan kelompok kontrol. Hasil tersebut menunjukkan siprofloksasin tidak memiliki efek pada penurunan viabilitas fibroblas keloid.

SIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa pajanan siprofloksasin selama 48 jam pada biakan fibroblas keloid tidak menunjukkan efek peningkatan aktivitas MMP dalam mendegradasi kolagen dan penurunan viabilitas fibroblas keloid. Perlu dilakukan percobaan *in vitro* yang mengkombinasikan siprofloksasin dengan agen yang dapat menghambat TIMP, misalnya *tamoxifen*.

DAFTAR PUSTAKA

- Chike-Obi CJ, Cole PD, Brissett AE. Keloids: pathogenesis, clinical features, and management. *Semin Plast Surg.* 2009; 23: 178-84.
- Sidgwick GP, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *JEADV* 2012; 26: 141-52.
- Cohly HHP, Scott H, Ndebele K, Jenkins JK, Angel MF. Differential gene expression of fibroblasts: keloid versus normal. *Int J Mol Sci.* 2002; 3: 1162-76.
- Bock O, Yu H, Zitron S, Bayat A, Ferguson MWJ, Mrowietz U. Studies of transforming growth factors beta 1-3 and their receptors I and II in fibroblast of keloids and hypertrophic scars. *Acta Derm Venereol.* 2005; 85: 216-20.
- Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration. *Br J Dermatol.* 2005; 153: 295-300.
- Stahlmann R. Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicol Lett.* 2002; 127: 269-77.
- Sendzik J, Shakibaei M, Schäfer-Korting M. Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. *Toxicol.* 2005; 212: 24-36.
- Tsai WC, Hsu CC, Chen PCC, Chang HN, Wong AM, Lin MS, dkk. Ciprofloxacin up-regulates tendon cells to express matrix metalloproteinase-2 with degradation of type I collagen. *J Orthop Res.* 2011; 29: 67-73.
- Menon A, Pettinari L, Martinelli C, Colombo G, Portinaro N, Dalle-

- Donne I. New insights in extracellular matrix remodeling and collagen turnover related pathways in cultured human tenocytes after ciprofloxacin administration. *MLTJ*. 2013; 3: 122-31.
10. Tuan TL, Wu H, Huang EY, Chong SS, Laug W, Messadi D, dkk. Increased plasminogen activator inhibitor-1 in keloid fibroblasts may account for their elevated collagen accumulation in fibrin gel cultures. *Am J Pathol*. 2003; 162: 1579-89.
 11. Wang XY, Wang Y, Liu HC. Tamoxifen lowers the MMP-9/TIMP-1 ratio and inhibits the invasion capacity of ER-positive non-small cell lung cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2011; 65: 525-8.
 12. Lipton A, Leitzel K, Chaudri-Ross HA, Evans DB, Ali SM, Demers L, dkk. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2653-8
 13. Jiang Z, Seo JY, Ha H, Lee EA, Kim YS, Han DC, dkk. Reactive oxygen species mediate TGF- β 1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Com*. 2003; 309: 961-6.
 14. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int*. 2011; 79: 944-56.
 15. 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 Pharmacol Exp Ther*. 2004; 308: 394-402.
 16. 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 Exp Toxicol*. 2002; 21: 635-41.
 17. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, dkk. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 1-10.
 18. Oue'draogo G, Morlie're P, Santus R, Miranda, Castell JV. Damage to mitochondria of cultured human skin fibroblasts photosensitized by fluoroquinolones. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2000; 58: 20-5.
 19. Tsai WC, Hsu CC, Tang FT. Ciprofloxacin mediated cell proliferation inhibition and G2/M cell cycle arrest in tenocytes. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 1657-63.