

DISERTASI

MEKANISME AKTIVASI SEL PUNCA KULIT OLEH PROBIOTIK *Lactobacillus plantarum* IS-10506 PADA DERMATITIS ATOPIK

**(Uji Praklinis pada Mencit Balb/c (*Mus musculus*)
Model Dermatitis Atopik)**



RADITYASTUTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

DISERTASI

MEKANISME AKTIVASI SEL PUNCA KULIT OLEH PROBIOTIK *Lactobacillus plantarum* IS-10506 PADA DERMATITIS ATOPIK

**(Uji Praklinis pada Mencit Balb/c (*Mus musculus*)
Model Dermatitis Atopik)**

RADITYASTUTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

**MEKANISME AKTIVASI SEL PUNCA KULIT
OLEH PROBIOTIK *Lactobacillus plantarum* IS-10506
PADA DERMATITIS ATOPIK**

**(Uji Praklinis pada Mencit Balb/c (*Mus musculus*)
Model Dermatitis Atopik)**

DISERTASI

Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
dan dipertahankan di hadapan Panitia
Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Oleh:

**RADITYASTUTI
011817017302**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

**MEKANISME AKTIVASI SEL PUNCA KULIT
OLEH PROBIOTIK *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IS-10506
PADA DERMATITIS ATOPIK
(Uji Praklinis pada Mencit Balb/c (*Mus musculus*) Model Dermatitis Atopik)**

**TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 14 MARET 2022**

Oleh

Promotor



Prof. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswa, dr, SpKK(K), FINS DV, FAADV
NIP. 196708041997032002

Kopromotor 1



Dr. Anang Endaryanto, dr, SpA(K)
NIP 196304231989011003

Kopromotor 2



Prof. Ir. Ingrid S. Surono, MSc, PhD
NIP 195702071990032001

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji Ujian Tahap 1 (Tertutup)
pada tanggal 23 Februari 2022**

PANITIA PENGUJI:

Ketua : 1. Dr. M. Yulianto Listiawan, dr, SpKK(K), FINS DV, FAADV

Anggota: 2. Prof. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswa, dr., SpKK(K), FINS DV, FAADV

3. Dr. Anang Endaryanto, dr., SpA(K)

4. Prof. Ir. Ingrid S. Surono, MSc, PhD

5. Prof. Dr.Fedik A Rantam, drh, MSc

6. Prof. Dr. Oki Suwarsa, dr, M Kes, SpKK(K), FINS DV, FAADV

7. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr, M.Kes

8. Dr. Risky Vitria Prasetyo, dr, SpA(K)

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor: 90/ UN3.1.1/HK/ 2022
Tanggal: 23 Februari 2022

SURAT PERNYATAAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Radityastuti, dr. SpKK, FINS DV
NIM : 011817017302
Program Studi : Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Alamat / No. Telp : Jl. Lamongan IV No. 14 Kecamatan Gajahmungkur
Kota Semarang / 08122811451

dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli, benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas-namakan saya, serta bukan hasil peniruan atau penjiplakan (*plagiatism*) hasil karya orang lain. Disertasi ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya, Maret 2022
Yang membuat pernyataan



Radityastuti, dr. SpKK, FINS DV
NIM. 011817017302

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmaanirrahiim....

Puji syukur kepada Allah SWT sehingga penulis dapat menjalani proses, pendidikan, penelitian, dan penyusunan disertasi yang berjudul Mekanisme Aktivasi Sel Punca Kulit oleh Probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 pada Dermatitis Atopik (Uji Praklinis pada Mencit Balb/c (*Mus musculus*) Model Dermatitis Atopik).

Terimakasih yang tulus serta penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Promotor yaitu Prof. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswa, dr, SpKK(K), FINSADV, FAADV yang memberikan motivasi kepada penulis untuk menempuh pendidikan S3 di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, memberikan bimbingan dan petunjuk dalam masa studi S3.
2. Ko Promotor I yaitu Dr. Anang Endaryanto, dr, SpA(K) yang memberikan arahan, ide, dan asupan selama proses pendidikan S3 di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
3. Ko Promotor II yaitu Prof. Ir. Ingrid S Surono, MSc, PhD yang sangat teliti dan telaten dalam memberikan bimbingan dan asupan dalam proses pendidikan S3 di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
4. Rektor Universitas Airlangga yaitu Prof. Dr. Moh Nasih, SE, MT, Ak beserta seluruh sivitas akademika Universitas Airlangga atas fasilitas yang disediakan dan suasana akademik yang kondusif dalam proses belajar mengajar.
5. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yaitu Prof. Dr. Budi Santoso, dr, SpOG(K) beserta sivitas akademika yang telah memberikan

fasilitas selama proses pendidikan S3 di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

6. Koordinator Program Studi (KPS) Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yaitu Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr, SpOG(K), Ketua Gugus Penjamin Mutu (GPM) Prodi S3 Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor yaitu Dr. Reni I'tishom, S.Pi, MSi, staf sekretariat PascaSarjana yaitu Adhdriyani, SE, Fitriya Diah Isnaini, AMd, Paramita Kurnia Sari, AMd dan Sobkhi Mafakir, SKom yang telah banyak memberikan bantuan serta kelancaran administrasi selama pendidikan S3.
7. Tim penguji yaitu Prof. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswa, dr, SpKK(K), FINS DV, FAADV, Dr. Anang Endaryanto, dr, SpA(K), Prof. Ir. Ingrid S Surono, MSc, PhD, Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh, MSc, Prof. Dr. Oki Suwarsa, dr, SpKK(K), MKes, FINS DV, FAADV, Dr. M. Yulianto Listiawan, dr, SpKK(K), FINS DV, FAADV, Dr. Hari Basuki Notobroto, dr, MKes, Dr. Risky Vitria Prasetyo, dr, SpA(K), dan Prof. Dr.agr. Mohamad Amin, SPd, MSc (alm) atas kesediaannya meluangkan waktu untuk membaca dan mengoreksi naskah disertasi, menguji dan memberikan bimbingan, asupan, dan arahan selama proses pendidikan S3. Semoga ilmu yang diperoleh dari para guru bermanfaat bagi pengembangan ilmu penulis selanjutnya.
8. Seluruh staf pengajar Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yang telah memberikan ilmu yang sangat bermanfaat dalam proses pendidikan S3 ini.
9. Rektor Universitas Diponegoro Semarang yaitu Prof. Dr. Yos Johan Utama, SH, M.Hum beserta jajarannya yang telah memberikan kesempatan tugas

belajar S3 kepada penulis dan Universitas Diponegoro sebagai penyanggah dana tugas belajar S3 penulis.

10. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang yaitu Prof. Dr. Dwi Pujonarko, dr, M.Kes, SpS(K) beserta jajarannya yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk melaksanakan tugas belajar S3 di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
11. Bapak dan Ibu penulis yaitu Bapak Ir. Sumaryo (alm) dan Ibu Sugastiasri, dr, SpKK(K), FINS DV, FAADV yang telah mengasuh dan mendidik penulis sejak masa kecil hingga sekarang.
12. Kakak- kakak penulis yaitu Wulandari, SE Ak, MM dan Fajar Kartika SS, MHum yang saat ini sedang menempuh studi S3 semoga diberikan kelancaran.
13. Suami penulis yaitu Adi Wibowo, dr, SpAn yang telah mendukung, memberikan semangat dan menyediakan berbagai fasilitas kepada penulis, juga anak-anak yaitu Hasan Aditya Wibowo serta Ridwan Baskoro Wibowo yang menjadi penyemangat penulis dalam menyelesaikan studi S3 ini.
14. Teman-teman S3 FKUA Angkatan 2018 yaitu Dr. Flora Ramona Sigit Prakoeswa, dr, SpKK, Dipl STD HIV, FINS DV, Dr. Winawati Eka Putri, dr, SpDV, Dr. Medhi Denisa Alinda, dr, SpKK, Roni Yuliwar, S Kep, Ns, M Ked, Sholahudin Rhatomy, dr, SpOT(K), Tito Sumarwoto, dr, SpOT(K), MKes, Romaniyanto, dr, SpOT (K), Istiana, dr, M Kes, Moh. Fathi Ilmawan, dr, SpPD yang banyak memberikan informasi berguna selama menempuh studi S3, juga untuk teman teman S3 FKUA Angkatan 2018 yang lain yaitu Danny Irawan, dr, SpPD, Adyan Donastin, dr, SpP, Abraham Ahmad Ali

Firdaus, dr, SpJP, Linda Margretha Mamengko, dr, SpOG (K), Olivia Mahardani Adam, dr, SpS, Jansen Loudwik Lalandos, dr, SpOG, Nasrul Musadir, dr, SpS, R. Andhi Prijosedjati, dr, SpOT (K), dan Risma, dr, M Kes
terimakasih atas kebersamaan dan keceriaan selama menempuh studi S3.

Akhir kata, penulis mendoakan semoga Allah SWT, Tuhan YME melimpahkan karunia Kesehatan dan kebahagiaan kepada semua pihak yang terlibat dan turut berjasa dalam penyelesaian disertasi ini.

Penulis juga mohon maaf kepada semua pihak apabila selama menempuh pendidikan dan penelitian S3 ini, ada hal-hal yang kurang berkenan. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat. *Aamiin yaa Rabbal 'Aalamiin.*

Surabaya, Maret 2022

Penulis

RINGKASAN

**MEKANISME AKTIVASI SEL PUNCA KULIT
OLEH PROBIOTIK *Lactobacillus plantarum* IS-10506
PADA DERMATITIS ATOPIK**

**(Uji Praklinis pada Mencit Balb/c (*Mus musculus*)
Model Dermatitis Atopik)**

Dermatitis Atopik (DA) adalah penyakit kulit inflamasi yang disebabkan oleh interaksi kompleks antara kerentanan genetik, defek sawar kulit, defek sistem imun alamiah dan peningkatan respon imunologik terhadap alergen dan antigen mikrobial. Dermatitis Atopik (DA) ditandai dengan gatal, eksaserbasi dan remisi yang berulang, sering menyebabkan gangguan tidur sehingga mempengaruhi kualitas hidup pasien.

Pada DA, aktivitas sel T helper 2 (Th2) dan sel T helper 17 (Th 17) meningkat, sedangkan aktivitas sel T helper 1 (Th1) menurun. Selain itu, pada DA jumlah sel T regulator (Treg) Foxp3+ rendah. Sel T reg Foxp3+ berperan dalam menyeimbangkan lingkungan pro inflamasi yaitu dengan menekan respon Th 2 dan Th 17. Sitokin yang dihasilkan oleh sel Th2 misalnya *Interleukin* (IL)-4 menghambat ekspresi *human beta defensin* (hBD) -2, suatu *antimicrobial peptide*. Salah satu peran hBD-2 adalah menstimulasi sel punca folikel rambut *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor* (Lgr) 6. *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α yang dihasilkan oleh keratinosit, berikatan dengan reseptor endotel vaskuler. Sitokin ini menghambat *Stromal cell-derived factor* (SDF)-1, dimana SDF-1 mengaktifkan proliferasi keratinosit melalui jalur *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK). Perbaikan lesi kulit memerlukan kerjasama antarsel punca kulit diantaranya adalah sel punca keratinosit *Cluster of*

Differentiation (CD) 71 dan sel punca folikel rambut Lgr 6. Di samping itu, DA sebagai penyakit kulit inflamasi dengan gangguan sawar kulit menunjukkan peningkatan *transepidermal water loss* (TEWL).

Penatalaksanaan DA meliputi lima pilar penatalaksanaan DA, terapi sistemik, dan terapi topikal. Salah satu pilar dari lima pilar penatalaksanaan DA adalah menghindari faktor pencetus. Pencegahan alergi dengan menghindari faktor pencetus (alergen) sulit dilaksanakan. Induksi aktif toleransi imunologik dengan probiotik diharapkan dapat menurunkan reaksi alergi.

Probiotik mempunyai kemampuan mengatur keseimbangan sel Th1/ Th2 dan meningkatkan jumlah dan fungsi sel T reg. Penelitian oleh Prakoeswa, dkk menunjukkan bahwa probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS-10506) memberikan perbaikan klinis lesi DA yang diukur dengan *Scoring for Atopic Dermatitis* (SCORAD) pada pasien DA anak dan dewasa. Namun demikian, mekanisme probiotik dalam aktivasi sel punca kulit untuk perbaikan lesi kulit DA belum dapat dijelaskan.

Sehubungan dengan situasi pandemi Covid-19, maka penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian dilakukan setelah mendapat *ethical clearance* no. 106/ EC/ H/ FK-UNDIP/ XI/ 2020 dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian ini dilakukan dengan membuat hewan model DA menggunakan mencit Balb/c (*Mus musculus*) jantan usia 8-12 minggu yang terbagi dengan alokasi random menjadi kelompok plasebo dan kelompok probiotik. Kedua kelompok mencit diberikan paparan ovalbumin secara injeksi intraperitoneal sebanyak 2 kali dengan interval 2 minggu,

dilanjutkan paparan ovalbumin secara epikutaneus dengan ditutup kasa dan plester selama 1 minggu dan paparan epikutaneus tanpa ditutup kasa selama 1 minggu. Pemodelan DA pada penelitian ini diamati dengan adanya tanda klinis lesi kulit DA berupa eritema/ perdarahan, udem, erosi/ ekskoriasi, dan kekeringan kulit serta gambaran histopatologi pada sediaan Hematoksilin Eosin yang menyokong diagnosis DA.

Sebelum dan sesudah perlakuan, kelompok plasebo dan kelompok probiotik dilakukan pengukuran TEWL menggunakan tewameter TM 300® dari Courage & Khazaka Koln, Jerman dan dilakukan pengamatan manifestasi klinis oleh dua orang dokter Spesialis Kulit dan Kelamin. Kelompok plasebo mendapat 0,7 gram susu skim dalam 1 ml *aquadest* melalui sonde lambung. Kelompok probiotik mendapat *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS) 10^9 cfu (0,7 gram) dalam 1 ml *aquadest*. Setelah mencit diterminasi, jaringan kulit punggung diambil dan dibuat preparat histopatologi untuk dilakukan pemeriksaan imunohistokimia. Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Pemeriksaan imunohistokimia mendapatkan hasil bahwa ekspresi Foxp3+ lebih tinggi secara signifikan pada kelompok probiotik dibandingkan dengan kelompok plasebo $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Perbedaan ekspresi TNF- α pada kedua kelompok tidak signifikan secara statistik $p = 0,363$ ($p > 0,05$). Ekspresi hBD-2 lebih tinggi secara signifikan pada kelompok probiotik dibandingkan dengan kelompok plasebo $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Ekspresi SDF-1 lebih tinggi secara signifikan pada kelompok probiotik dibandingkan dengan kelompok plasebo $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Ekspresi Lgr6+ lebih tinggi secara signifikan pada kelompok

probiotik dibandingkan dengan kelompok plasebo $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Ekspresi CD 71 lebih tinggi secara signifikan pada kelompok probiotik dibandingkan dengan kelompok plasebo $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Kelompok plasebo tidak mengalami penurunan TEWL yang signifikan $p = 0,194$ ($p > 0,05$) sedangkan kelompok probiotik mengalami penurunan TEWL yang signifikan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Persentase penurunan TEWL kelompok probiotik berbeda secara signifikan dengan persentase penurunan TEWL kelompok plasebo $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Hasil analisis menunjukkan penilaian antar 2 pengamat tidak ada perbedaan yang bermakna, baik penilaian manifestasi klinis DA pre ataupun post perlakuan. Korelasi yang sangat kuat antar hasil pengukuran pengamat 1 dan pengamat 2 menunjukkan hasil pengukuran manifestasi klinis DA reliabel. Persentase perbaikan manifestasi klinis DA kelompok probiotik berbeda secara signifikan dengan perbaikan manifestasi klinis DA kelompok plasebo $p = 0,009$ ($p < 0,05$).

Analisis jalur menunjukkan bahwa pemberian probiotik LIS-10506 menstimulasi Treg Foxp3+, hBD-2, SDF-1, CD 71, dan Lgr6+. Selain itu, pemberian probiotik LIS-10506 menurunkan TEWL dan memperbaiki manifestasi klinis DA secara langsung.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekspresi Treg Foxp3+, hBD-2, SDF-1, Lgr6+, dan CD 71 lebih tinggi secara signifikan pada kelompok probiotik dibandingkan dengan kelompok plasebo. Perbedaan ekspresi TNF- α pada kedua kelompok penelitian tidak signifikan. Pemberian probiotik LIS-10506 menurunkan TEWL dan mempercepat perbaikan manifestasi klinis DA

dibandingkan plasebo. Pada analisis jalur didapatkan hasil bahwa pemberian probiotik LIS memperbaiki manifestasi klinis DA melalui jalur lain yang tidak dianalisis pada penelitian ini, yaitu jalur PI3K/ AKT/ β -catenin dan jalur TGF β 1. Keterbatasan penelitian ini adalah tidak menganalisis jalur lain dalam mekanisme aktivasi sel punca kulit pada Dermatitis Atopik yaitu jalur *Phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/ protein kinase B (AKT)/ β -catenin* dan jalur *Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF β 1)*. Selain itu, pada penelitian ini tidak mengukur kadar IL-4, IL-5 dan IL-13 serum mencit sebagai salah satu tanda bahwa model hewan coba DA telah terjadi.

SUMMARY

**SKIN STEM CELL ACTIVATION MECHANISM
BY PROBIOTIC *Lactobacillus plantarum* IS-10506
IN ATOPIC DERMATITIS**

**(Preclinical Study on Balb/c Mice (*Mus musculus*)
as Atopic Dermatitis Model)**

Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory skin disease caused by complex interactions between genetic susceptibility, skin barrier defects, innate immune system defect, and enhanced immunologic response to allergens and microbial antigens. Atopic dermatitis (AD) is characterized by itching, repeated periods of exacerbation and remission which often cause sleep disturbances so that affect patient's quality of life.

In AD, the activity of T helper cells 2 (Th2) and T helper cells 17 (Th 17) are increased, while the activity of T helper 1 (Th1) cells is decreased. In addition, in AD, Foxp3⁺ regulatory T cell (Treg) count was low. Foxp3⁺ Treg cells play a role in balancing the pro-inflammatory environment by suppressing the Th2 and Th 17 responses. Cytokines produced by Th2 cells such as *Interleukin* (IL)-4 inhibits the expression of *antimicrobial peptide human beta defensin* (hBD)-2. One of the roles of hBD-2 is to stimulate hair follicle stem cells *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor* (Lgr) 6. *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α produced by keratinocytes, binds to vascular endothelial receptors. This cytokine inhibits *stromal cell-derived factor* (SDF)-1, in which SDF-1 activates keratinocyte proliferation through the *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK) pathway. Repair of skin lesions requires collaboration among skin stem cells, including *Cluster of Differentiation* (CD) 71 keratinocyte stem cells and hair

follicle stem cells Lgr 6. In addition, AD as an inflammatory skin disease with impaired skin barrier shows increased *transepidermal water loss* (TEWL).

AD management includes the five pillars of AD management, systemic, and topical therapy. One of the five pillars of AD management is to avoid precipitating factors. Prevention of allergies by avoiding triggers factors

(allergens) are difficult to implement. Active induction of immunologic tolerance with probiotics are expected to reduce allergic reactions.

Probiotics have the ability to regulate the balance of Th1/Th2 cells and improve the amount and function of T reg cells. Research by Prakoeswa, et al showed that probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS-10506) gives clinical improvement of AD lesions as measured by the *Scoring for Atopic Dermatitis* (SCORAD) in paediatric and adult AD patients. However, the mechanism of probiotics in skin stem cell activation for the repair of AD skin lesions cannot be explained.

Due to pandemic covid-19, this research was conducted at the Experimental Animal Laboratory, Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang. The research was carried out after obtaining *ethical clearance* no. 106/EC/ H/ FK-UNDIP/ XI/ 2020 from the Health Research Ethics Commission (*Komisi Etik Penelitian Kesehatan/ KEPK*) Faculty of Medicine, Diponegoro University, Semarang. This research was conducted by making animal models of AD using males Balb/c (*Mus musculus*) mice, aged 8-12 weeks, divided by random allocation into placebo group and probiotic group. Both groups were exposed to ovalbumin by intraperitoneal injection, 2 times, at 2-week intervals,

followed by percutaneous exposure to ovalbumin, covered with gauze and plaster for 1 week and percutaneous exposure without being covered with gauze for 1 week. The AD modelling in this study was observed with clinical signs of AD skin lesions those were erythema/ hemorrhage, edema, erosion/ excoriation, dryness and histopathological feature on the Hematoxylin Eosin preparation which supported the diagnosis of AD.

Before and after the treatment, the TEWL of the placebo and the probiotic group was measured using TM 300® (Courage & Khazaka) Cologne, Germany tewameter and the clinical manifestations were observed by two dermatovenereologists. Placebo group received 0.7 grams of skim milk in 1 ml distilled water via a gastric tube. The probiotic group received 10^9 cfu of *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS-10506) (0.7 grams) in 1 ml of distilled water. After the mice were terminated, the skin tissue of the back is taken and histopathological preparations were made for immunohistochemical examination. Immunohistochemical examination was carried out in the Laboratory of Biochemistry and Biomolecular, Faculty of Medicine, Brawijaya University Malang.

Immunohistochemical examination showed that Foxp3⁺ expression was significantly higher in the probiotic group compared to placebo group with $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Differences in TNF- α expression between the two groups was not statistically significant with $p = 0.363$ ($p > 0.05$). hBD-2 expression was significantly higher in the probiotic group compared to placebo group with $p = 0.000$ ($p < 0.05$). SDF-1 expression was significantly higher in the probiotic group compared to the placebo group with $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Lgr6⁺ expression

was significantly higher in the probiotics group compared with the placebo group with $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Expression of CD71 was significantly higher in the probiotic group compared to placebo group with $p = 0.000$ ($p < 0.05$).

The placebo group did not experience a significant decrease in TEWL with $p = 0.194$ ($p > 0.05$) whereas the probiotic group experienced a significant decrease in TEWL with $p = 0.000$ ($p < 0.05$). The percentage of TEWL reduction in the probiotic group was significantly different compare to the placebo group with $p = 0.000$ ($p < 0.05$).

The results of the analysis show that there is no meaningful difference between the assessments of 2 observers for both pre- and post-treatment clinical manifestations of AD. A very strong correlation between the results of measurement from observer 1 and observer 2 showed a reliable measurement of the clinical manifestations of AD. Percentage improvement in clinical manifestations of AD in the probiotic group was significantly different with the percentage of the placebo group with $p = 0.009$ ($p < 0.05$).

Pathway analysis showed that administration of LIS probiotics stimulated T regs Foxp3+, hBD-2, SDF-1, CD 71, and Lgr6+. In addition, the administration of probiotic LIS-10506 decreased TEWL and improved clinical manifestations of AD directly.

The conclusion of this study was that the expressions of Treg Foxp3+, hBD-2, SDF-1, Lgr6+ and CD71 were significantly higher in probiotic group compared to the placebo group. The difference of TNF- α expression in both study group was not significant. Administration of probiotic LIS-10506 decreased TEWL and accelerated improvement the clinical manifestation of AD compared

to placebo. Pathway analysis showed that the administration of LIS-10506 probiotics improved clinical manifestations of AD through the other pathways that have not been analysed in this research those were PI3K/AKT/ β -catenin and TGF β 1 pathways . The limitation of this study was that this study did not analyse other pathways for the mechanism of skin stem cell activation in AD such as the pathway of *Phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/ protein kinase B (AKT)/ β -catenin* and *Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF β 1)* pathway. In addition, this study did not measure the serum levels of IL-4, IL-5, and IL-13 as one of several signs that animal model of AD had been occurred.

ABSTRAK

Latar Belakang:

Dermatitis Atopik (DA) adalah inflamasi kulit kronik dengan rasa gatal, timbul pada predileksi tertentu, bersifat kronik berulang sehingga dapat mempengaruhi kualitas hidup pasiennya. Salah satu terapi DA adalah pemberian probiotik per oral. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS-10506) merupakan probiotik asli Indonesia yang didapatkan dari fermentasi susu kerbau di Sumatra Barat. Mekanisme probiotik dalam aktivasi sel punca kulit untuk perbaikan lesi kulit DA belum dapat dijelaskan.

Objective:

Untuk menjelaskan mekanisme probiotik dalam aktivasi sel punca kulit untuk perbaikan lesi kulit DA.

Method:

Sebanyak 40 ekor mencit Balb/c (*Mus musculus*) jantan usia 8-12 minggu diaklimatisasi selama 1 minggu dan dibagi secara acak menjadi 2 kelompok. Kedua kelompok dipaparkan dengan ovalbumin secara intraperitoneal dilanjutkan secara epikutaneus. Kelompok plasebo mendapat susu skim 0,7 gram per hari per oral dan kelompok probiotik mendapat LIS-10506 dosis 10^9 cfu per hari per oral selama 4 minggu. Pengukuran TEWL dan manifestasi klinis dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan. Jaringan kulit punggung mencit dibuat sediaan histopatologi dan dilakukan pemeriksaan imunohistokimia. Analisis statistik menggunakan uji t 2 sampel bebas, uji t berpasangan, uji Wilcoxon Signed Rank, dan analisis jalur.

Hasil:

Terdapat perbedaan yang signifikan antar dua kelompok pada ekspresi Foxp3+ ($p = 0,000$), hBD-2 ($p = 0,000$), SDF-1 ($p = 0,000$), CD 71 ($p = 0,000$), Lgr6+ ($p = 0,000$), TEWL ($p = 0,000$), dan manifestasi klinis DA ($p = 0,009$). Perbedaan ekspresi TNF- α pada dua kelompok tidak signifikan secara statistik ($p = 0,363$). Analisis jalur menunjukkan bahwa pemberian LIS-10506 per oral secara langsung memperbaiki manifestasi klinis DA.

Kesimpulan:

Probiotik LIS-10506 meningkatkan ekspresi Foxp3+, hBD-2, SDF-1, CD 71, Lgr6+, menurunkan TEWL, dan memperbaiki manifestasi klinis DA secara langsung.

Kata kunci: dermatitis atopik, sel punca kulit, *Lactobacillus plantarum* IS-10506

ABSTRACT

Background:

Atopic Dermatitis (AD) is a chronic inflammation of the skin with itching on certain predilection. The course of AD is chronic and recurrent so that it affects the quality of life of the patient. One of AD therapy is oral probiotic administration. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS-10506) is a native probiotic from Indonesia obtained from fermented buffalo milk in West Sumatra. Probiotic mechanism in skin stem cell activation for the repair of AD skin lesions is still unknown.

Objectives:

To analyse the mechanism of probiotics in skin stem cell activation for the repair of AD skin lesions.

Methods:

A total of 40 male Balb/c (*Mus musculus*) mice aged 8-12 weeks were acclimatized for 1 week and randomly divided into 2 groups. Both groups were exposed to ovalbumin intraperitoneally followed by percutaneous. The placebo group received 0.7 grams of skim milk daily orally and the probiotic group received 10^9 cfu of LIS (= 0,7 grams) daily orally for 4 weeks. Transepidermal water loss (TEWL) measurements and clinical manifestations observations were performed before and after treatment. The back skin tissue of mice was made into histopathological preparations and underwent immunohistochemical examination. Statistical analysis was done with independent sample t-test, paired t-test, Wilcoxon Signed Rank test, and pathway analysis.

Results:

There were significant differences between the two groups in the expression of Foxp3+ ($p = 0.000$), hBD-2 ($p = 0.000$), SDF-1 ($p = 0.000$), CD 71 ($p = 0.000$), Lgr6+ ($p = 0.000$), TEWL ($p = 0.000$), and clinical manifestations of AD ($p = 0.009$). The difference in TNF- α expression in the two groups was not statistically significant ($p = 0.363$). Pathway analysis showed that oral administration of LIS-10506 directly improved the clinical manifestations of AD.

Conclusion:

Foxp3+, hBD-2, SDF-1, CD 71, and Lgr6+ expressions were significantly higher in probiotic group compared to placebo group. Probiotic group experienced a significant decrease in TEWL while the placebo group did not. Probiotic LIS-10506 directly improved clinical manifestation of AD.

Keywords: atopic dermatitis, skin stem cells, *Lactobacillus plantarum* IS-10506

DAFTAR ISI

Halaman Sampul Luar.....	i
Halaman Sampul Dalam	ii
Halaman Prasyarat Gelar.....	iii
Halaman Pengesahan	iv
Halaman Penetapan Panitia Penguji.....	v
Pernyataan Orisinalitas Penelitian	vi
Halaman Ucapan Terima Kasih	vii
Halaman Ringkasan	xi
Halaman Summary.....	xvi
Halaman Abstrak.....	xxi
Halaman <i>Abstract</i>	xxii
Daftar Isi.....	xxiv
Daftar Tabel	xxviii
Daftar Gambar.....	xxix
Daftar Singkatan.....	xxxi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Definisi DA.....	8
2.2. Epidemiologi DA.....	8

2.3. Etiologi Dermatitis Atopik	10
2.3.1. Kerentanan Genetik	11
2.3.1.1. Genetik Filaggrin dan Sawar Epidermis pada DA	12
2.3.1.2. Lipid	13
2.3.2. Faktor Lingkungan pada DA	14
2.3.3. Faktor Pencetus DA.....	16
2.4. Immunopatogenesis Dermatitis Atopik	18
2.5. <i>Antimicrobial peptide</i> pada Dermatitis Atopik.....	22
2.6. Sel Punca Kulit	28
2.7. Manifestasi Klinis dan Diagnosis Dermatitis Atopik	31
2.8. Penatalaksanaan Dermatitis Atopik.....	36
2.8.1. Lima Pilar Penatalaksanaan DA di Indonesia	36
2.8.2. Terapi Topikal	37
2.8.2.1. Pelembab	37
2.8.2.2. Kortikosteroid.....	38
2.8.2.3. Inhibitor Kalsineurin Topikal.....	38
2.8.3. Terapi Sistemik.....	38
2.8.3.1. Kortikosteroid	38
2.8.3.2. Siklosporin	39
2.8.3.3. Azatioprin.....	39
2.8.3.4. Metotreksat.....	39
2.8.3.5. Antibiotik dan Antivirus.....	39
2.8.3.6. Interferon (IFN)- γ	40
2.8.4. Terapi Lain	40

2.8.4.1. Fototerapi	40
2.8.4.2. Vitamin D oral	40
2.8.4.3. Probiotik.....	40
2.9. Peran Probiotik pada Dermatitis Atopik.....	41
2.10. <i>Lactobacillus plantarum</i> IS-10506.....	45
2.11. Kerangka Teori	48
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL	52
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	52
3.2. Hipotesis	55
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	57
4.1. Jenis dan rancangan penelitian	57
4.2. Subyek penelitian	58
4.2.1. Sampel penelitian	58
4.2.2. Kriteria inklusi.....	58
4.2.3. Kriteria eksklusi.....	58
4.2.4. Kriteria Drop Out	58
4.2.5. Replikasi	59
4.2.6. Teknik randomisasi	60
4.3. Identifikasi variabel	60
4.3.1. Variabel bebas dan variabel tergantung	60
4.3.2. Definisi operasional variabel.....	61
4.4. Bahan penelitian	63
4.4.1. Hewan coba yang digunakan.....	63
4.4.2. Bahan perlakuan	64

4.4.3. Bahan pemeriksaan laboratorium	64
4.5. Instrumen penelitian	65
4.6. Waktu dan tempat penelitian	66
4.7. Prosedur, pengamatan eksperimen, dan alur penelitian.....	66
4.7.1. Prosedur dan pengamatan eksperimen	66
4.7.2. Alur penelitian	69
4.8. Cara pengolahan dan analisis data.....	70
BAB 5. HASIL PENELITIAN	72
5.1 Pengaruh LIS terhadap ekspresi Foxp3+	76
5.2 Pengaruh LIS terhadap ekspresi TNF- α	77
5.3 Pengaruh LIS terhadap ekspresi hBD-2	78
5.4 Pengaruh LIS terhadap ekspresi SDF-1.....	80
5.5 Pengaruh LIS terhadap ekspresi Lgr6+	81
5.6 Pengaruh LIS terhadap ekspresi CD71.....	83
5.7 Pengaruh LIS terhadap TEWL	84
5.8 Pengaruh LIS terhadap manifestasi klinis DA.....	85
5.9 Analisis Jalur (Outcome % penurunan manifestasi klinis).....	87
BAB 6. PEMBAHASAN	90
6.1 Pengaruh LIS terhadap ekspresi Foxp3+	90
6.2 Pengaruh LIS terhadap ekspresi TNF- α	91
6.3 Pengaruh LIS terhadap ekspresi hBD-2	92
6.4 Pengaruh LIS terhadap ekspresi SDF-1.....	94
6.5 Pengaruh LIS terhadap ekspresi Lgr6+	95
6.6 Pengaruh LIS terhadap ekspresi CD71.....	97

6.7	Pengaruh LIS terhadap TEWL	99
6.8	Pengaruh LIS terhadap manifestasi klinis DA.....	101
6.9	Hubungan antar variabel pada Analisis Jalur	104
6.10	Temuan Baru Penelitian	106
6.11	Keterbatasan penelitian.....	106
BAB 7 PENUTUP.....		107
7.1	Kesimpulan.....	107
7.2	Saran	108
DAFTAR PUSTAKA.....		109
LAMPIRAN 1. Keterangan Laik Etik.....		116
LAMPIRAN 2. Hewan Coba , Alat, dan Bahan Penelitian		117
LAMPIRAN 3. Artikel Jurnal		119
LAMPIRAN 4. Data Penelitian		125
LAMPIRAN 5. Hasil Analisis		127

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Disregulasi imun pada DA	21
Tabel 5.1	Ekspresi Foxp3+ pada kedua kelompok penelitian.....	76
Tabel 5.2	Ekspresi TNF- α pada kedua kelompok penelitian	78
Tabel 5.3	Ekspresi hBD-2 pada kedua kelompok penelitian	79
Tabel 5.4	Ekspresi SDF-1 pada kedua kelompok penelitian	81
Tabel 5.5	Ekspresi Lgr6+ pada kedua kelompok penelitian	82
Tabel 5.6	Ekspresi CD71 pada kedua kelompok penelitian.....	84
Tabel 5.7	Nilai TEWL pada kedua kelompok penelitian.....	85
Tabel 5.8	Manifestasi klinis DA dari kedua penilai.....	85
Tabel 5.9	Manifestasi klinis DA sebelum dan sesudah perlakuan	86

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Skema patofisiologi DA	11
Gambar 2.2	Susunan keratinosit pada berbagai tahap diferensiasi	13
Gambar 2.3	Analogi “ dinding batu bata” sawar kulit	14
Gambar 2.4	Hipotesis deviasi imun	16
Gambar 2.5	Ilustrasi skematik inisiasi DA.....	19
Gambar 2.6	Defensin.....	24
Gambar 2.7	Regulasi hBD pada DA	26
Gambar 2.8	Sel punca Lgr6+ diaktivasi oleh hBD	27
Gambar 2.9	Sel punca dermatologik	30
Gambar 2.10	Keberagaman sel punca kulit.....	31
Gambar 2.11	DA infantil.....	32
Gambar 2.12	DA fase anak	33
Gambar 2.13	DA pada penderita dewasa	33
Gambar 2.14	Efek probiotik pada mikrobiota intestinal	42
Gambar 2.15	Mekanisme imun dari probiotik	43
Gambar 2.16	Mekanisme kerja probiotik pada model hewan coba	44
Gambar 2.17	Kerangka Teori.....	48
Gambar 3.1	Kerangka konseptual	52
Gambar 4.1	Pengelompokan subyek penelitian	57
Gambar 4.2	Alur penelitian	69
Gambar 4.3	Kerangka analisis jalur	71

Gambar 5.1	Pemodelan DA dengan ovalbumin pada mencit Balb/c (<i>Mus musculus</i>).....	73
Gambar 5.2	Gambaran histopatologi dermatitis pada pewarnaan HE	75
Gambar 5.3	Perbandingan ekspresi Foxp3+ pada kedua kelompok penelitian	76
Gambar 5.4	Gambaran ekspresi Foxp3+	77
Gambar 5.5	Perbandingan ekspresi TNF- α pada kedua kelompok penelitian	77
Gambar 5.6	Gambaran ekspresi TNF- α	78
Gambar 5.7	Perbandingan ekspresi hBD-2 pada kedua kelompok penelitian	79
Gambar 5.8	Gambaran ekspresi hBD-2	80
Gambar 5.9	Perbandingan ekspresi SDF-1 pada kedua kelompok penelitian	80
Gambar 5.10	Gambaran ekspresi SDF-1.....	81
Gambar 5.11	Perbandingan ekspresi Lgr6+ pada kedua kelompok penelitian	82
Gambar 5.12	Gambaran ekspresi Lgr6+	83
Gambar 5.13	Perbandingan ekspresi CD71 pada kedua kelompok penelitian	83
Gambar 5.14	Gambaran ekspresi CD71.....	84
Gambar 5.15	Analisis jalur berdasarkan <i>outcome</i> persentase penurunan manifestasi klinis DA	87
Gambar 6.1.	Analisis Jalur	104

DAFTAR SINGKATAN

AMP	: <i>Anti Microbial Peptide</i>
ASCs	: <i>Adult Stem Cells</i>
Blimp1+	: <i>B lymphocyte – induced maturation protein-1</i>
CD 71	: <i>Cluster of Differentiation 71</i>
CLA	: <i>Cutaneous Lymphocyte associated Antigen</i>
DA	: <i>Dermatitis Atopik</i>
Der f	: <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	: <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
EASI	: <i>Eczema Area Severity Index</i>
EDC	: <i>Epidermal Differentiation Complex</i>
ERK	: <i>Extracellular-signal-Regulated Kinases</i>
ESCs	: <i>Embryonic Stem Cells</i>
FoxP3+	: <i>Forkhead box p3</i>
FSCs	: <i>Fetal Stem Cells</i>
hBD	: <i>human Beta Defensin</i>
HDP	: <i>Host Defense Peptide</i>
HFSCs	: <i>Hair Follicle SCs</i>
HPA	: <i>Hypothalamic Pituitary Adrenal</i>
IDEC	: <i>Inflammatory Dendritic Epidermal Cell</i>
IF	: <i>Interfollicular</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IL	: <i>Interleukin</i>

iNOS	: <i>inducible Nitric Oxide Synthetase</i>
iPSCs	: <i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
K15	: Keratin 15
KEPK	: Komisi Etik Penelitian Kesehatan
KSCs	: <i>Keratinocyte Stem Cells</i>
Lgr6+	: <i>leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6+</i>
LIS	: <i>Lactobacillus plantarum</i> IS-10506
LL-37	: <i>cathelicidin</i>
LPS	: Lipopolisakarida
LTA	: <i>Lipoteichoic Acid</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MSC	: <i>Mesenchimal Stem Cells</i>
NaPCA	: <i>Sodium Pyrrolidone Carboxylic Acid</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor- κB</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
NMF	: <i>Natural Moisturizing Factor</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K/AKT/ β -catenin	: <i>Phosphoinositide 3-kinase/ protein kinase B/ β-catenin</i>
SCFA	: <i>Short Chain Fatty Acid</i>
SCORAD	: <i>Scoring for Atopic Dermatitis</i>
SDF-1	: <i>Stromal cell-derived factor-1</i>
TEWL	: <i>Trans Epidermal Water Loss</i>

TGF β 1	: <i>Transforming Growth Factor β 1</i>
Th	: <i>T helper</i>
TJ	: <i>Tight Junction</i>
TLR	: <i>Toll-Like Receptor</i>
TLSP	: <i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	: <i>Sel T regulator</i>
TSLP	: <i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
tUCA	: <i>transurocanic acid</i>
ZO	: <i>Zonula Occluden</i>