

BAB 1

PENDAHULUAN

Latar Belakang Penelitian

Perubahan iklim yang ekstrim telah mengakibatkan kerugian ekonomi yang nyata pada dunia perunggasan. Pada kondisi tanpa intervensi, kerugian ekonomi akibat paparan *heat stress* (HS) pada semua jenis komoditas ternak di Amerika dapat mencapai 2.4 miliar dollar/tahun, dan turun menjadi 1.7 miliar dollar/tahun, setelah diterapkan berbagai metode intervensi penurunan suhu, dengan rincian 897 juta, 369 juta, 299 juta, and 128 juta dollar/tahun, masing-masing untuk komoditas ternak sapi perah, sapi potong, babi dan unggas (St. Pierre *et al.*, 2003). Dampak buruk yang ditimbulkan HS pada daerah beriklim tropis jauh lebih besar dan telah menjadikan penelitian tentang efek merugikan akibat faktor lingkungan pada industri perunggasan (*poultry industry*) semakin intensif dilakukan (Nardone *et al.*, 2010; Renaudeau *et al.*, 2012).

Pada ayam *broiler*, paparan HS diketahui merupakan penyebab penting kejadian *pulmonary arterial hypertension* (PAH), atau dikenal dengan sindroma *ascites* atau sindroma kematian mendadak [*sudden death syndrome* (SDS)], dengan perubahan patologis *post mortem* yang khas yaitu *ascites*, *kongesti centrolobullar* hepar, serta hipertofi-dilatasi ventikel kanan jantung. Golongan ayam ras modern dilaporkan rentan mengalami PAH akibat sifat pertumbuhan yang cepat, namun tidak didukung oleh fungsi kerja jantung dan paru-paru yang memadai, dimana keadaan ini akan menjadi lebih buruk ketika ayam *broiler* terpapar HS (Janwari *et al.*, 2018).

Peningkatan frekuensi (hiperventilasi) yang terjadi selama paparan HS, merupakan faktor terpenting dimulainya perjalanan penyakit PAH pada ayam *broiler*. Hiperventilasi mengakibatkan waktu difusi oksigen kedalam eritrosit pada mikrosirkulasi paru-paru menjadi lebih singkat, hingga mengakibatkan hipoksemia dan hiperkapnia. Dalam kondisi normal pada zona nyaman, frekuensi pernafasan *broiler* adalah antara 30-50 kali/menit, dan meningkat menjadi 70-80 kali/menit dan 90-110 kali/menit, berturut-turut ketika suhu lingkungan meningkat menjadi 35°C dan 37.8°C (Ruizhi *et al.*, 2019). Peningkatan frekuensi pernafasan ini berdampak pada peningkatan tekanan aliran (*shear stress*) pada permukaan pembuluh darah pada paru-paru, menjadi lebih dari 15 dyn/cm², dimana keadaan ini berpotensi dapat meningkatkan produksi ROS (Marchio *et al.*, 2019).

Hipoksia dan stres oksidatif dilaporkan menjadi dua faktor penting pada patogenesis PAH (Wideman *et al.*, 2013; Afolayan, 2016). Keterkaitan antara HS dengan kejadian PAH pada ayam *broiler* telah banyak dilaporkan, namun demikian mekanisme molekuler yang mendasari peristiwa ini belum banyak diungkap, terutama terkait dengan mekanisme *remodeling* vaskuler paru-paru sebagai lesi paling dominan. Hingga saat ini PAH masih menjadi permasalahan kesehatan yang rumit baik pada manusia maupun hewan, dikarenakan sifat perjalanan penyakitnya yang *enigmatic* akibat dari faktor penyebabnya yang sering tidak diketahui (*idiopathic*). PAH merupakan salah satu bentuk hipertensi paru-paru dengan perubahan klinis yang khas berupa *remodeling* pembuluh darah arterial, mikrovaskular paru-paru dan angionesis yang patologis (Stenmark *et al.*, 2016).

SCUBE2 [*signal peptide*, CUB domain, EGF (*epidermal growth factor*)-like

protein2], merupakan salah satu target molekul baru yang diketahui terlibat pada proses *remodeling* pembuluh darah. Dilaporkan bahwa SCUBE2 terekspresi kuat pada berbagai tahapan *remodeling* vaskuler pada penderita *atherosclerosis*, dimulai dari cedera endotel dan penebalan ringan dinding pembuluh darah sebagai fase awal, hingga pada tahap akhir pembentukan plak sklerotik (Lin *et al.*, 2018). SCUBE2 terekspresi pada arteri karotis pada tikus model iskemia-reperfusi (pasca ligasi pembuluh darah) dan diet tinggi lemak. Secara konsisten SCUBE2 terekspresi pada semua tahap pertumbuhan plak sklerotik (Hirowati *et al.*, 2013).

Overexpression SCUBE2 pada fase awal *remodeling* vaskuler, telah menjadikan SCUBE2 sebagai target protein baru, yang banyak diteliti saat ini dengan harapan dapat digunakan sebagai cara deteksi dini dan memunculkan harapan baru dunia medis dalam mengontrol kejadian penyakit kardiovaskuler dimasa mendatang. Keluarga protein SCUBE dikode oleh tiga gen independent yaitu SCUBE 1, 2, dan 3. Aktivitas SCUBE2 dilaporkan melibatkan jalur pensinyalan *Hedgehog* (Hh) [*Hedgehog* (Hh) *pathway*]. SCUBE2 dapat membentuk kompleks protein pada sinyal Hh untuk berikatan dengan reseptor transmembran Patched-1 (Ptc1), ikatan ligan-reseptor ini selanjutnya akan mengaktivasi serangkaian sinyal transduksi dan faktor transkripsi penting pada jalur sinyal Hh yaitu GLI-1 atau *Zinc finger protein* GLI-1 atau *glioma associated oncogene*, dimana rangkaian sinyal ini berakhir dengan proliferasi sel target (Hirowati, *et al.*, 2013).

Dilaporkan bahwa hipoksia dan stres oksidatif dapat memicu aktivitas SCUBE2. Ekspresi SCUBE2 meningkat dalam biakan sel endotel vena umbilikal

manusia (HUVECs) yang mengalami hipoksia, dimana peningkatan ekspresi SCUBE2 ini secara nyata diikuti dengan peningkatan ekspresi *hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α) dan VEGFR2 hingga menginduksi proliferasi myosit dan fibroblas dinding pembuluh darah (Lin *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018).

Remodeling vaskuler paru-paru pada penderita PAH diyakini terkait dengan peningkatan aktivitas beberapa protein mitogenik yang diinduksi oleh hipoksia, seperti *hypoxia-induced factor* HIF1, HIF 2 dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) serta *vasoconstrictor factor* seperti endothelin-1 (ET-1) (Hernández and Monroy, 2017). Dilaporkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi *hypoxia-induced mitogenic factor* (HIMF) secara signifikan pada sel endotel, sel miosit pembuluh darah dan sel parenkim paru-paru tikus model hipoksia (Yamaji-Kegan *et al.*, 2006).

Pada kondisi normoksia, HIF-1 α tidak stabil dan inaktif karena terus menerus mengalami hidroksilasi oleh aktivitas protein yang kaya akan prolin hidroksilase [*prolyl hydroxylase domain-containing* (PHD) proteins]. Hipoksia dan ROS menghambat aktivitas PHD, hingga mengakibatkan stabilisasi dan aktivasi HIF-1 α untuk memasuki sel. Pada sitoplasma HIF-1 α berikatan dengan sub unit HIF-1 β dan membentuk kompleks dengan HRE (*hypoxia response element*) sebagai *binding site* HIF-1 α pada faktor transkripsi NF- κ B, yang kemudian mensinyal induksi VEGF (Bishop *et al.*, 2013).

Sementara itu, ROS juga dilaporkan dapat meningkatkan ekspresi HIF-1 α dan menginduksi proliferasi melalui aktivitas P13 pada jalur P13-kinase/Akt. Hasil penelitian lain oleh van Uden *et al.*, (2006) dan Ikada *et al.*, (2012), melaporkan

bahwa, ROS menginduksi aktivitas VEGF pada *microvascular* paru-paru tikus melalui jalur pensinyalan *hypoxia-induced mitogenic factor* (HIMF) (Zaplatica *et al.*, 2019). Dilaporkan bahwa VEGF terlibat pada kejadian PAH yang diinduksi oleh hipoksia, seperti pada penyakit pembuluh darah paru lanjut sekunder yang ditemukan pada pasien penyakit jantung bawaan (Mitzner and Wagner, 2004). Diketahui bahwa ROS yang dihasilkan dalam mitokondria sel-sel parenkim paru-paru terlibat dalam pensinyalan VEGF yang berperan dalam respon angiogenik selama proses peradangan (Nakayama and Kataoka, 2019).

Keterlibatan ROS dalam pensinyalan VEGF pada paru-paru diketahui melalui aktivitas beberapa protein *transducer* dalam jalur pensinyalan MAPK meliputi, sinyal Ras/raf/p42/p44 MAPK, Rac/MAPK kinase, 1/JNKs dan Rac/PAC/p38/MAPK, yang selanjutnya mengakibatkan aktivasi beberapa protein dibawahnya (*down stream*), meliputi Sp1, AP-1, NF- κ B, and Stat3, yang penting dalam pengaturan ekspresi VEGF. VEGF merupakan salah satu molekul angiogenik paling spesifik dan telah terbukti penting untuk pembentukan dan perkembangan pembuluh darah pada proses penyembuhan luka yang normal. Pada kondisi patologis, ekspresi VEGF menjadi tidak teratur, dan sering ditemukan meningkat secara signifikan menyertai beberapa penyakit, seperti aterosklerosis dan pertumbuhan tumor (Zaplatica *et al.*, 2019; Ichimura *et al.*, 2003).

Heat stress dilaporkan meningkatkan secara nyata produksi ROS pada ayam *broiler* akibat tingginya aktivitas metabolisme, disamping akibat *shear stress*. Dilaporkan bahwa paparan suhu lingkungan diatas 30°C serta kelembaban relatif diatas 65%, mengakibatkan peningkatan kadar plasma radikal OH⁻ (hidrogen

peroksil) dan $O_2^{\cdot-}$ (superoksida radikal) pada ayam *broiler* hingga memicu stres oksidatif (SO). Hiperventilasi selama HS diyakini dapat meningkatkan tegangan geser (*shear stress*) pada sel endotel pembuluh darah di paru-paru, serta menginduksi berbagai mediator peradangan (seperti P-selectin dan VEGF) dan memicu infiltrasi sel-sel radang pada dinding pembuluh darah (Akbarian *et al.*, 2016). *Shear stress* pada sel endotel arteri dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan reseptor VEGF 2 (VEGFR2), yang dimediasi oleh faktor seperti Kru"ppel2 (KLF2). VEGF memainkan peran penting dalam *remodeling* arteri dan proses angiogenesis yang merugikan (Nathaniel *et al.*, 2011).

Isoprostane merupakan metabolit peroksidasi lemak yang dipicu oleh peningkatan ROS. ROS dapat menyebabkan peroksidasi PUFA (asam lemak tak jenuh ganda) membran sel, termasuk asam arakidonat, dan membentuk kelas molekul yang merupakan isomer dari prostanoids, yaitu isoprostane. Kadar isoprostane dalam darah diketahui meningkat pada pasien dengan cedera paru akut, hipertensi arteri pulmonal (PAH), asma, penyakit paru obstruktif kronik dan *cystic fibrosis* (Dromparis *et al.*, 2012; Janssen *et al.*, 2001). Pada manusia, anjing, babi dan sapi, isoprostane diketahui dapat mengakibatkan vasokonstriksi arteri dan vena paru dengan cara menginduksi endothelin-1 (ET-1), serta mengakibatkan kontraksi otot polos saluran pernafasan. Melalui mekanisme ini, isoprostane dapat mengganggu ventilasi paru dan menyebabkan hipoksia paru disertai dengan vasokonstriksi paru-paru hipoksik (Dromparis *et al.*, 2012).

Berbagai strategi intervensi untuk menekan kejadian PAH pada ayam *broiler* akibat paparan HS telah banyak dilakukan, antara lain dengan penggunaan sistem

kandang tertutup (*closed house*), rekayasa genetik, serta pemberian berbagai suplemen antistres. Sejauh ini berbagai model intervensi tersebut terbukti kurang efektif, dan cenderung tidak konsisten (Lara and Rostagno, 2013).

Penelitian tentang peran SCUBE2 terhadap kejadian PAH pada ayam *broiler* yang terpapar HS kronis belum pernah dilakukan sebelumnya. Mengetahui peran SCUBE2 pada proses *remodeling* vaskuler arterial paru-paru melalui jalur pensinyalan hipoksia dan stres oksidatif akan memperjelas mekanisme molekuler patogenesis PAH pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.

Melalui pengungkapan keterlibatan SCUBE2 dalam patogenesis PAH diharapkan dapat membuka kemungkinan untuk menemukan target molekul baru yang dapat digunakan sebagai metode intervensi untuk menekan angka kesakitan dan penurunan produksi, hingga mortalitas yang diakibatkan oleh PAH pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis dimasa akan datang.

Rumusan Permasalahan

1. Apakah paparan HS kronis dapat mengakibatkan *remodeling* pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler*?
2. Apakah terdapat peningkatan ekspresi SCUBE2 pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis?
3. Apakah terdapat peningkatan ekspresi HIF- α pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis?
4. Apakah terdapat peningkatan ekspresi isoprostene pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis?

5. Apakah terdapat peningkatan ekspresi p38 pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis?
6. Apakah terdapat peningkatan ekspresi NFkB pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis?
7. Apakah terdapat peningkatan ekspresi VEGF pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis?
8. Apakah terdapat hubungan antara *remodeling* pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru dengan peningkatan ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NFkB dan VEGF pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis?
9. Bagaimanakah peran SCUBE2 melalui jalur pensinyalan hipoksia dan stres oksidatif dalam *remodeling* arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis,?

Tujuan

Umum

1. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap peran SCUBE2, melalui jalur pensinyalan hipoksia dan stres oksidatif, dengan menganalisis aktivitas HIF-1 α sebagai *biomarker* untuk hipoksia, isoprostane sebagai *biomarker* untuk stres oksidatif, p38 dan NFkB sebagai faktor transkripsi serta VEGF sebagai protein efektor, pada *remodeling* vaskuler arterial dan mikrosirkulasi paru-paru pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
2. Menganalisis kemungkinan pemanfaatan SCUBE2 sebagai target protein baru untuk model deteksi dini dan alternatif model intervensi untuk

penanganan PAH pada ayam *broiler* yang terpapar HS kronis.

Khusus

1. Mengetahui berbagai bentuk *remodeling* yang terjadi pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara pada paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
2. Mengetahui ekspresi SCUBE2 pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
3. Mengetahui ekspresi HIF- α pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
4. Mengetahui ekspresi isoprostene pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
5. Mengetahui ekspresi p38 pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
6. Mengetahui ekspresi NFkB pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
7. Mengetahui ekspresi VEGF pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
8. Menganalisis hubungan ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB dan VEGF pada *remodeling* vaskuler arterial dan mikrosirkulasi paru-paru ayam *broiler* dipapar HS kronis.
9. Menganalisis peran SCUBE2 melalui jalur pensinyalan hipoksia dan stres oksidatif, dalam *remodeling* pada arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis

Manfaat

Manfaat Teoritis

1. Melalui penelitian ini diharapkan dapat terungkap peran SCUBE2 melalui jalur pensinyalan hipoksia dan stres oksidatif pada *remodeling* arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru ayam *broiler* yang dipapar HS kronis.
2. Melalui penelitian ini diharapkan dapat terungkap peran SCUBE2, HIF- α , Isoprostane, p38, NF κ B dan VEGF dalam *remodeling* arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis melalui perannya.

Manfaat Praktis

1. Melalui penelitian ini diharapkan dapat diungkap kemungkinan pemanfaatan SCUBE2 sebagai model deteksi dini dan bentuk intervensi baru dalam pengendalian PAH pada ayam *broiler* akibat paparan HS kronis dimasa mendatang.
2. Melalui penelitian ini diharapkan didapatkan metode diagnosa histopatologi yang lebih akurat pada ayam *broiler* penderita PAH, melalui pemeriksaan berbagai bentuk *remodeling* arteri interparabronkus, arteriol dan kapiler udara paru-paru yang ditemukan.