

Larva Ikan Zebra (*Danio Rerio*) Sebagai Model Hewan Untuk Uji Toksisitas

Abstrak

Toksisitas adalah salah satu masalah utama dalam proses pengembangan obat. Kardiotoksisitas, neurotoksisitas dan hepatotoksisitas merupakan alasan utama obat tidak lolos dalam uji klinik atau ditarik dari pasaran. Larva ikan zebra dapat menjembatani antara uji *in vitro* dan model hewan mamalia mengerat dengan lebih cepat dan ekonomis. Toksisitas organ dapat dideteksi mulai pada tahap larva sehingga dapat diprediksi dengan tepat pengaruh obat tersebut pada manusia. Uji kardiotoksik, neurotoksik dan hepatotoksik dapat dilakukan pada hewan yang sama dengan ketepatan dan ketelitian yang tinggi.

Kata kunci: hepatotoksisitas, kardiotoksisitas, larva ikan zebra, neurotoksisitas, toksisitas

Commented [U1]: hepatotoksisitas

Commented [M2R1]: hepatotoksisitas

Commented [U3]: tidak perlu lagi

Zebra (Danio rerio) larvae as animal models for toxicity test

Abstract

Toxicity research is a very important issue for the development of new drugs, such as cardiotoxicity, neurotoxicity, and hepatotoxicity. The use of zebrafish animal models for research has long been known. Zebrafish is an animal model that can act as an object of research. Zebrafish larvae have advantages compared to rats because they are cheaper and easier to obtain. Cardiotoxic, neurotoxic and hepatotoxic assays can be carried out in the same animal with high accuracy and precision.

Keywords: cardiotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, toxicity, zebrafish larva

Pendahuluan

Salah satu masalah utama dalam pengembangan obat-obatan baru ialah efek yang tidak diinginkan, sehingga dibutuhkan pengujian toksisitas pada hewan dengan skala besar. Keamanan obat merupakan masalah utama bagi produktivitas penelitian dan pengembangan farmasi, terutama pada tahap optimisasi senyawa penemuan obat dan awal pengembangan klinis.

Pada penelitian obat baru, langkah pertama adalah uji *in vitro* secara enzimatis atau kultur sel yang hanya memerlukan sedikit senyawa dan mengurangi hewan coba. Uji toksisitas *in vitro* dirancang untuk mengidentifikasi molekul yang membahayakan dengan cepat. Meskipun sudah langsung diketahui toksisitasnya, tapi prediksi terhadap toksisitas organ manusia rendah. Proses biologis seperti mekanisme absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, interaksi sel dan jaringan susah diketahui dengan pendekatan *in vitro*.¹ Uji toksisitas pada mamalia merupakan *gold standard* untuk memprediksi keamanan pada manusia, tapi memerlukan biaya tinggi, waktu yang panjang, diperlukan senyawa dalam jumlah besar, dan tidak selalu dapat diprediksi. Karena itu mamalia kurang cocok untuk uji toksisitas pendahuluan.

Untuk mempercepat pengembangan obat dengan hewan uji dan mengurangi biaya, maka peneliti akademik dan industri memberikan perhatian pada ikan zebra (*Danio rerio*). Hasil uji pada ikan zebra dapat diaplikasikan pada hewan bertulang belakang yang lebih tinggi derajatnya termasuk manusia. Tidak seperti uji *in vitro*, larva ikan zebra merupakan organisme yang kompleks dimana jalur metabolisme maupun reaksi fisiologis sudah lengkap dan berfungsi, sehingga dapat digunakan untuk uji toksisitas serta metabolisme.² Menurut regulasi etik internasional, larva ikan zebra yang berumur sampai 5-lima hari sesudah fertilisasi (5 *five days post-fertilization* -/5 dpf) disamakan dengan uji *in vivo* dan diterima sebagai alternatif hewan coba.²

Ikan zebra telah menjadi model hewan vertebrata untuk berbagai penyakit dan telah berkontribusi pada penemuan obat berbasis fenotip.³ Untuk mengembangkan penggunaan ikan zebra maka harus diketahui perbedaan dan persamaan antara biologi ikan zebra dan manusia. Akhir-akhir ini mulai diteliti kemampuan dan keterbatasan ikan zebra untuk pemodelan penyakit, skrining obat, identifikasi target obat, farmakologi, dan toksikologi. Seiring dengan meningkatnya pemahaman kita dan teknologi untuk memanipulasi ikan zebra, diharapkan ikan zebra akan memiliki peran penting dalam mempercepat penemuan obat yang tepat. Skrining

Commented [U4]: optimalisasi?

Commented [M5R4]: optimasi

Commented [Ed6]: rujukan no?

Commented [M7R6]: Ikan zebra telah menjadi model hewan vertebrata untuk berbagai penyakit dan telah berkontribusi pada penemuan obat berbasis fenotip.³

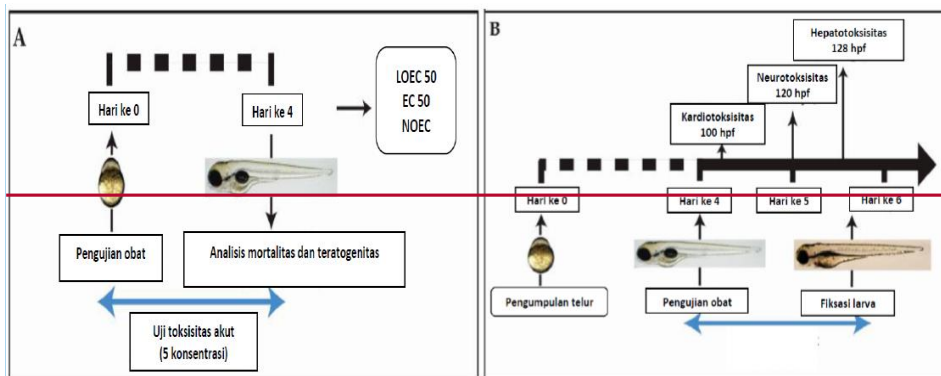
fenotip telah menjadi salah satu pendekatan yang paling efektif untuk penemuan obat, tetapi hanya sebagian dari fenotip yang berhubungan dengan penyakit dapat dimodelkan dalam sel yang dikultur. Ikan zebra menunjukkan serangkaian fenotip terkait penyakit, gangguan fisiologi, metabolisme dan perilaku.³ Ikan dan larva ikan zebra telah digunakan untuk penelitian diabetes dan komplikasinya.⁴ Pada tahun 2000, telah ditemukan obat baru pertama yang menggunakan ikan zebra hidup dalam *multiwell plate*.⁴ Sampai sekarang ada sekitar 60 obat baru yang telah ditemukan dan diketahui mekanisme kerjanya. Selain skrining fenotip, juga berkembang penelitian tentang perilaku, jantung, dan penyakit regeneratif.⁴ Secara filogenetik hubungan manusia dengan hewan mengerat lebih dekat daripada dengan ikan zebra, tetapi ikan zebra memiliki 8270% gen yang berhubungan dengan penyakit manusia.⁵ Dalam banyak kasus, ikan zebra menunjukkan sifat fisiologis dan farmakologis yang mendekati tikus. Pada penelitian dengan ikan zebra telah ditemukan beberapa senyawa yang telah diuji klinis dan praklinis. Ikan zebra juga telah digunakan pada uji toksikologi.⁵

Larva ikan zebra sedang dikembangkan sebagai alat untuk menguji toksisitas bahan kimia obat dengan lebih cepat, lebih murah dan dapat diandalkan. Analisa efek toksik umumnya dilakukan pada sistem kardiovaskuler, saraf, neuromuskuler, gastrointestinal dan tiroid. Analisa efek samping obat memerlukan analisa sistemik karena melibatkan organisme secara utuh.⁶ Karakteristik fisik dan fisiologis ikan zebra yang unik menjadikan alat yang penting untuk penemuan obat dan uji toksisitas.⁶ Sekarang ini analisa toksisitas larva ikan zebra telah digunakan sebagai metode alternatif hewan dalam penilaian bahaya/risiko dan penelitian ilmiah.⁷

Ikan Zebra untuk Analisis Toksisitas Obat

Toksisitas adalah salah satu hambatan utama dalam proses pengembangan obat. Penggunaan ikan zebra dalam skrining obat menjadi alat penting untuk menilai toksisitas dan kemanjuran obat baru. Hewan ini memiliki organ yang berkembang dari tahap awal sehingga dapat diketahui fisiologisnya. Toksisitas organ yang diinduksi obat dapat dideteksi dalam tahap larva sehingga memungkinkan prediksi yang kuat seperti pada manusia.⁸ Oleh karena itu, ikan zebra dapat menjembatani kesenjangan antara uji keamanan praklinis pada in vitro dan uji pada model hewan pengerat dengan cara cepat dan hemat biaya.⁸

Senyawa yang dapat menyebabkan toksisitas antara lain senyawa-senyawa kardiotoxik, neurotoksik dan hepatotoksik, sehingga menjadikan obat tersebut gagal dalam fase klinis dan ditariknya obat ketika dipasarkan. Sebelum dilakukan uji kardiotoxik, hepatotoksitas dan neurotoksisitas, terlebih dahulu dilakukan uji untuk kadar obat non-mortal/non teratogenik. Berdasarkan data, ternyata kegagalan penemuan obat baru terjadi karena obat tersebut mempunyai efek neurotoksik (22%), kardiotoxik (16%), dan hepatotoksik (14%).⁹ Menurut *Organisation for Economic Cooperation and Development 236 (OECD 236*



Catatan: LOEC: *Lowest Observed Effect Concentration*;
 EC 50: *Median Effective Concentration*;
 NOEC: *No Observed Effect Concentration*

Gambar 1. Uji Toksisitas pada Larva Ikan Zebra (Sumber: diadaptasi dari Cornet et al. 2017 telah diolah kembali)²

Commented [U8]: ??

Commented [M9R8]: Secara filogenetik hubungan manusia dengan hewan mengerat lebih dekat daripada dengan ikan zebra, tetapi ikan zebra memiliki 70% gen yang berhubungan dengan penyakit manusia.⁵

Commented [Ed10]: Butuh nomor rujukan

Commented [M11R10]: hewan mengerat lebih dekat daripada dengan ikan zebra, tetapi ikan zebra memiliki 70% gen yang berhubungan dengan penyakit manusia.⁵

Commented [Ed12]: rujukan

Commented [Ed13]: no rujukan? Kalimat tolong diperjelas

Commented [Ed14]: ada rujukan?

Commented [M15R14]: Larva ikan zebra sedang dikembangkan sebagai alat untuk menguji toksisitas bahan kimia obat dengan lebih cepat, lebih murah dan dapat diandalkan. Analisa efek toksik umumnya dilakukan pada sistem kardiovaskuler, saraf, neuromuskuler, gastrointestinal dan tiroid. Analisa efek samping obat memerlukan analisa sistemik karena melibatkan organisme secara utuh.⁶

Commented [Ed16]: Rujukan?

Commented [M17R16]:

Commented [Ed18]: Rujukan?

Commented [M19R18]: Toksisitas organ yang diinduksi obat dapat dideteksi dalam tahap larva sehingga memungkinkan prediksi yang kuat seperti pada manusia.⁸

Formatted: Not Highlight

Commented [Ed23]: Adaptasi bukan hanya menerjemahkan ke Bahasa Indonesia - tidak boleh copas gambar tanpa seizin pemiliknya

Saran: mohon kirimkan file yang diindonesiakan digunakan tanpa unsur copas

Formatted: Centered

Formatted: Indent: Left: 0", Don't adjust space between Latin and Asian text, Don't adjust space between Asian text and numbers

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Superscript

LOEC: Lowest Observed Effect Concentration

Untuk menganalisa perkembangan organ dapat digunakan larva ikan zebra berumur 96 hpf (hours post fertilization (hpf) atau 96 jam setelah fertilisasi (Gambar 1B).¹⁰ Tujuan utamanya adalah mengetahui pengaruh obat terhadap fisiologis dan fungsi organ. Kardiotoksisitas diamati pada 100 hari setelah fertilisasi (100 hpf), neurotoksisitas 120 hpf dan hepatotoksitas 132 hpf.¹¹

EC₅₀: Median Effective Concentration
NOEC: No Observed Effect Concentration

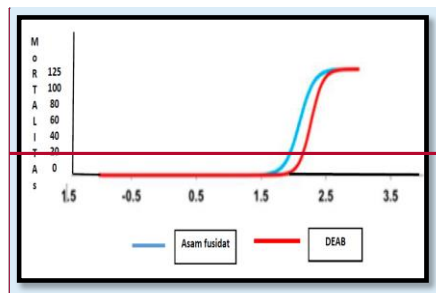
No Observed Effect Concentration (NOEC) dapat memengaruhi fisiologis organ ketika terjadi efek samping. Untuk menganalisa perkembangan organ dapat digunakan larva ikan zebra berumur 96 hpf (hours post fertilization (hpf) atau 96 jam setelah fertilisasi (Gambar 1B).¹⁰ Tujuan utamanya adalah mengetahui pengaruh obat terhadap fisiologis dan fungsi organ. Kardiotoksisitas diamati pada 100 hari setelah fertilisasi (100 hpf), neurotoksisitas 120 hpf dan hepatotoksitas 132 hpf.¹¹

Dietilaminobenzaldehid (DEAB) merupakan penghambat asam retinoat yang meningkatkan mortalitas dan teratogenik (NOEC) seperti terlihat pada Tabel 1.¹¹ DEAB digunakan sebagai kontrol positif. LOEC merupakan konsentrasi terendah dimana efek obat dapat diamati, sedangkan LC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan 50% larva ikan zebra mati.¹¹ **Kurva mortalitas untuk senyawa asam fusidat pada 96 hpf**

Tabel 1. NOEC, LOEC dan LC₅₀ Senyawa pada Larva Ikan Zebra 96 hpf (Sumber: Diadaptasi dari Cornet et al. 2017 telah diolah kembali)

Obat	96 hpf NOEC (µM)	96 hpf LOEC (µM)	96 hpf LC ₅₀ (µM)
DEAB	100	10	185,99
Epineprin HCl	1000	N-A	3,11x10 ¹⁰
Siprofloksasin	1000	NA	7,01x10 ⁹
Cisapride	1000	NA	2935,74
Asam fusidat	10	100	124,15

Catatan: NA= Not Available (hasil berada di bawah pengukuran)



Gambar 2. Kurva Konsentrasi Vs Mortalitas Asam Fusidat (Diadaptasi dari Sumber: Cornet et al. 2017 telah diolah kembali)

Tabel 2. Contoh Senyawa yang Menyebabkan Toksisitas pada Manusia dan Larva Ikan Zebra¹¹

Obat	Kardiotoksisitas	Neurotoksisitas	Hepatotoksitas
Asetaminofen	Toksik	Toksik	Toksik
Ethanol	Toksik	Toksik	Toksik
Haloperidol	Toksik	Toksik	Tidak diketahui
MPTP	Tidak diketahui	Toksik	Tidak diketahui

Senyawa 1-metil-4-fenilpiridinium (MPTP) yang berkhasiat sebagai analgesik telah terbukti menyebabkan gejala Parkinson permanen dengan menghancurkan neuron dopaminergik di *substantia nigra*.⁹ **sekarang MPTP** digunakan sebagai kontrol positif obat neurotoksik.¹¹ Etanol dan asetaminofen digunakan

Commented [Ed24]: . Untuk menganalisa perkembangan organ dapat digunakan larva ikan zebra berumur 96 hours post fertilization (hpf) atau 96 jam setelah fertilisasi.¹⁰

Commented [Ed24]: . Untuk menganalisa perkembangan organ dapat digunakan larva ikan zebra berumur 96 hours post fertilization (hpf) atau 96 jam setelah fertilisasi.¹⁰

Commented [Ed25]: Sumber Cornet? Perlu disebut angkanya

Commented [Ed25]: Sumber Cornet? Perlu disebut angkanya

Commented [M26R25]: Kardiotoksisitas diamati pada 100 hari setelah fertilisasi (100 hpf), neurotoksisitas 120 h dan hepatotoksitas 132 hpf.¹¹

Commented [M26R25]: Kardiotoksisitas diamati pada 100 hari setelah fertilisasi (100 hpf), neurotoksisitas 120 h dan hepatotoksitas 132 hpf.¹¹

Formatted: Superscript

Formatted: Superscript

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Italic

Commented [Ed27]: Sumber Cornet? Perlu disebut angkanya

Commented [M28R27]: Dietilaminobenzaldehid (DEAB) merupakan penghambat asam retinoat yang meningkatkan mortalitas dan teratogenik (NOEC) seperti terlihat pada Tabel 1. DEAB digunakan sebagai kontrol positif. LOEC merupakan konsentrasi terendah dimana efek obat dapat diamati, sedangkan LC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan 50% larva ikan zebra mati.¹¹

Formatted: Superscript

Formatted: Font: Italic

Commented [Ed30]: Terlalu banyak gambar dari satu sumber (Cornet) dan tidak boleh copas tanpa izin. saran: gambar ini tidak usah diikutsertakan

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Commented [U31]: Gambar kurang jelas/terlalu kecil

Commented [Ed32R31]:

Commented [M33R31]:

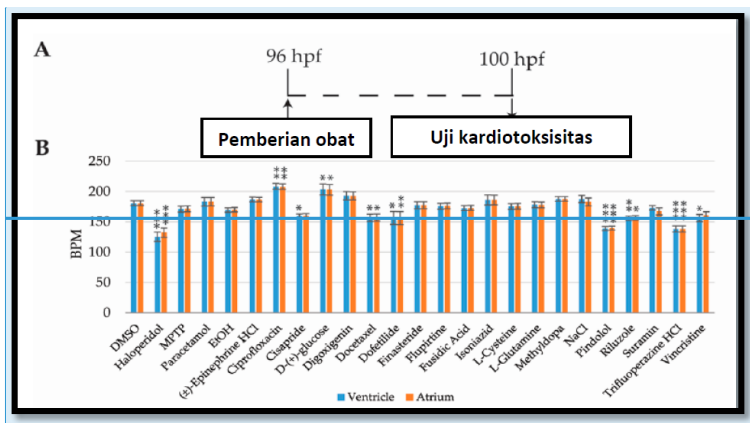
Commented [Ed34]: Tabel 2. Contoh Senyawa yang Menyebabkan Toksisitas pada Manusia dan Larva Ikan Zebra.¹¹

Formatted: Superscript

sebagai obat kontrol positif hepatotoksik.¹⁰⁻¹¹ Haloperidol, yang dikenal sebagai obat antipsikosis digunakan sebagai kontrol positif obat neurotoksis karena memblokir *human Eifer-a-go-go-Related Gene* (hERG), memperpanjang interval QT dan menyebabkan aritmia pada manusia dan hewan.^{14,2-13}

Analisis Kardiotoxikitas

Dalam dekade terakhir, ikan zebra telah menjadi model organisme utama untuk studi perkembangan dan organogenesis.¹² Aritmia jantung menjadi tantangan utama bagi penemuan obat modern. Ikan zebra dapat digunakan sebagai model, khususnya untuk biologi kardiovaskular.¹³ Pendekatan dengan ikan zebra juga potensial untuk mengatasi masalah untuk penemuan obat penyakit genetik.¹⁴ Embrio ikan zebra dapat digunakan untuk penelitian kardiotoxikitas yang diinduksi obat.⁵ Obat-obatan seperti *astemizole*, haloperidol, *pimozide*, dan terfenadin yang menyebabkan perpanjangan QT pada manusia juga memberikan hasil yang serupa pada ikan zebra.^{14,14}



Gambar 3. Uji Kardiotoxikitas Senyawa pada Larva Ikan Zebra (Sumber: Cornet *et al.* 2017 telah diolah kembali)

Sebagai kontrol positif digunakan haloperidol dan uji kardiotoxikitas dilakukan pada larva ikan zebra berumur 96 hpf ketika detak jantung ikan zebra sudah stabil.¹¹ Obat diinkubasi selama empat jam dan setelah itu dianalisa dengan perangkat lunak ZeCardio®.¹¹ Gambar di atas ini menunjukkan senyawa Haloperidol, *cisapride*, *docetaxel*, *dofetilide*, *pindolol*, *riluzole*, *trifluoperazine HCL*, dan *vincristine* dapat mengurangi detak jantung per menit (BPM) dibandingkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif.¹¹

Analisis Hepatotoksisitas

Ikan zebra merupakan perantara antara evaluasi berbasis sel dengan pengujian hepatotoksisitas pada hewan konvensional.¹⁵ Semua obat yang diuji hepatotoksik pada mamalia memberikan hasil yang sama pada larva ikan zebra, seperti degenerasi hati dan pengurangan ukuran hati.¹⁴ Prediksi tingkat keberhasilan uji obat-obatan hepatotoksik dan non-hepatotoksik dalam ikan zebra adalah 100% dibandingkan dengan mamalia. Hepatotoksisitas dari enam obat hepatotoksik (asetaminofen, aspirin, tetrasiklin HCl, natrium valproat, siklofosamid dan eritromisin) dan dua senyawa non-hepatotoksik (sukrosa dan biotin) yang telah diuji pada mamalia setelah diuji lagi pada larva ikan zebra memberikan hasil yang sama dengan menggunakan tiga fenotip spesifik hepatotoksisitas: degenerasi hati, perubahan ukuran hati dan retensi absorpsi kuning telur.¹⁵

Perkembangan hati ikan zebra dapat dibagi dalam tiga tahap yaitu: spesifikasi, diferensiasi, dan perkembangan.¹⁶ Larva ikan zebra yang berumur 5 dpf mempunyai hati berbentuk lonjong yang berfungsi penuh dan terdiri dari dua-tiga lobus.¹⁷ Efek hepatotoksik terutama disebabkan oleh proses metabolisme yang membutuhkan waktu, maka percobaan dilakukan pada larva yang berumur 132 hpf dengan kontrol positif parasetamol dan etanol, yang telah terbukti mengakibatkan toksisitas pada manusia dan ikan zebra.¹⁸

Commented [U35]: Kalimat nangung

Commented [M36R35]: Ikan zebra dapat digunakan sebagai model, khususnya untuk biologi kardiovaskular.¹³

Commented [U37]: Kurang jelas

Commented [M38R37]:

Commented [Ed39]: Lihat catatan sebelumnya - Kalau mau lebih baik dijadikan tabel dengan beberapa unsur at gambar ini tidak usah diikutsertakan

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Commented [Ed40]: rujukan

Commented [M41R40]: Sebagai kontrol positif digunakan haloperidol dan uji kardiotoxikitas dilakukan pada larva ikan zebra berumur 96 hpf ketika detak jantung ikan zebra sudah stabil.¹¹

Commented [Ed42]: rujukan

Commented [Ed43]: bila gambar dihilangkan (seperti saran), kata-kata ini bisa dihilangkan

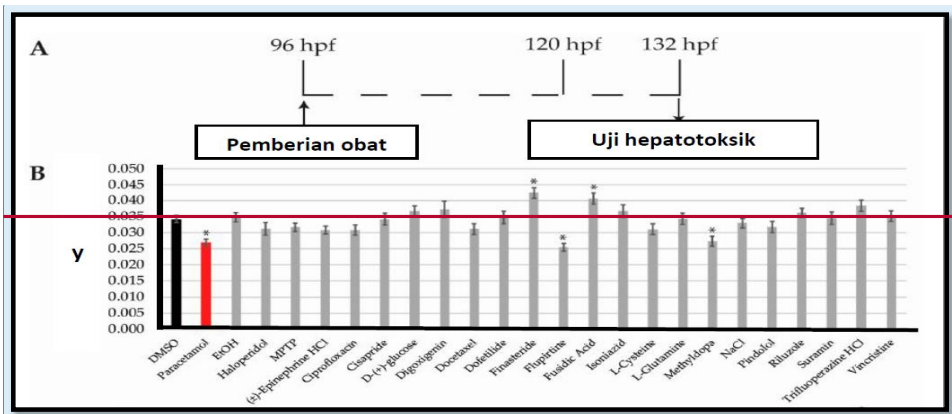
Commented [Ed44]: rujukan

Commented [M45R44]: Haloperidol, *cisapride*, *docetaxel*, *dofetilide*, *pindolol*, *riluzole*, *trifluoperazine HCl* dan *vincristine* dapat mengurangi detak jantung per menit (BPM) dibandingkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif.¹¹

Formatted: Superscript

Commented [Ed46]: rujukan untuk masing-masing kalimat (tiga)

Commented [M47R46]: Ikan zebra merupakan perantara antara evaluasi berbasis sel dengan pengujian hepatotoksisitas pada hewan konvensional.¹⁵ Semua obat yang diuji hepatotoksik pada mamalia memberikan hasil yang sama pada larva ikan zebra, seperti degenerasi hati dan pengurangan ukuran hati.¹⁴



Gambar 4. Grafik Hasil Uji Hepatotoksisitas Pada Larva Ikan Zebra (Sumber: Cornet *et al.* 2017 telah diolah kembali). A. Uji hepatotoksik pada larva ikan zebra; B. Grafik antara luas organ hati setelah pemberian obat, Y= Luas-area (mm²)

Pada perkembangan minggu pertama, sumber energi unik untuk larva ikan zebra adalah kuning telur.¹⁵ Kuning telur ikan zebra mengandung 70% lipid netral, yang sebagian besar dimetabolisme di hati.¹⁵ Dengan demikian, akumulasi lipid kuning telur dapat digunakan sebagai titik akhir untuk fungsi hati.¹⁹ Metabolisme yang terganggu akan menunda penyerapan kuning telur sehingga menghasilkan kadar lipid yang lebih tinggi.¹⁹⁻²⁰ Ukuran hati dan jumlah hepatosit dapat dianalisa dengan intensitas fluoresensi.^{20,21} Obat yang mengurangi jumlah hepatosit (nekrosis) akan menunjukkan berkurangnya area RFP (*Red Fluorescent Protein*), sedangkan obat yang meningkatkan ukuran hati (hepatomegali) akan meningkatkan area RFP.¹¹ Parasetamol, flupirtine, dan metildopa menunjukkan penurunan sinyal area RFP, sedangkan finasterid dan asam fusidat meningkatkan area sinyal RFP.¹¹ Di sisi lain, steatosis yang diinduksi oleh obat (akumulasi lipid hepatosit) dapat digunakan untuk pengembangan obat.¹¹

Penyakit hati berlemak (*fatty liver disease*) pada manusia dapat berkembang dari steatosis ke kerusakan hepatoseluler, fibrosis, sirosis, dan gagal hati.¹¹ Larva ikan zebra dengan steatosis yang diinduksi tunikamisin atau etanol dapat menyebabkan disfungsi hati dimana, yaitu terjadi perubahan ekspresi gen pada fase akut, gangguan fungsi hati, dan gangguan sekresi hepatosit.²¹

Steatosis adalah konsekuensi yang paling umum dari penyalahgunaan alkohol akut, seperti yang terjadi selama pesta minuman keras. Alkohol akut ini mungkin akan mempengaruhi penyakit hati yang lebih parah. Model penyakit hati karena alkohol (ALD/*Alcoholic Liver Disease*) yang terjadi pada larva ikan zebra dapat mengidentifikasi gen dan jalur yang berkontribusi terhadap steatosis.²¹ Larva ikan zebra yang berumur empat hari setelah fertilisasi (4 dpf) mewakili model vertebrata untuk mempelajari ALD akut karena memiliki jalur untuk metabolisme alkohol dan hati yang telah terbentuk sempurna.²¹ Penambahan etanol 2% selama 32 jam pada medium larva ikan zebra menyebabkan kadar etanol 80 mM intraseluler dan regulasi hepatic menunjukkan bahwa etanol dimetabolisme serta menyebabkan stres oksidatif.^{22,21}

Obat-obat yang dapat menyebabkan kerusakan hati tidak bisa dianalisa dengan skrining sel tunggal (*single-cell based assays*), mungkin karena kurangnya interaksi fisiologis dengan sel lain dalam hati. Sistem hati lengkap seperti yang ada di larva ikan zebra dapat memberikan nilai tambah dalam strategi skrining untuk obat yang menyebabkan kerusakan hati. Namun, kemungkinan terjadinya racun organ lain pada tahap larva dari ikan zebra dapat menyulitkan analisis yang akurat dan cepat. Analisis asam lemak dalam hati yang mengikat protein 10A (*Hfabp10a*) adalah titik akhir yang tepat untuk menilai efek hepatotoksik pada larva ikan zebra. Ekspresi *Hfabp10a* adalah penanda yang valid terjadinya hepatotoksisitas setelah pengobatan, kurva respons dosis dapat diperoleh dan signifikan secara statistik, dan berkorelasi dengan hepatoseluler dalam perubahan histopatologi hati. Namun, toksisitas dalam organ vital lainnya seperti jantung dapat berdampak pada pertumbuhan hati dan harus dinilai secara bersamaan.²³

Commented [Ed48]: lihat catatan sebelumnya

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Formatted: Justified

Commented [U49]: Grafik Hasil Uji Hepatotoksisitas Pada Larva Ikan Zebra

Field Code Changed

Formatted: Justified

Formatted: Indent: First line: 0"

Commented [Ed50]: Rujukan masing-masing kalimat (tiga)

Commented [M51R50]: Pada perkembangan minggu pertama, sumber energi unik untuk larva ikan zebra adalah kuning telur.¹⁵ Kuning telur ikan zebra mengandung 70% lipid netral, yang sebagian besar dimetabolisme di hati.¹⁵ Dengan demikian, akumulasi lipid kuning telur dapat digunakan sebagai titik akhir untuk fungsi hati.¹⁹

Formatted: Superscript

Commented [Ed52]: Rujukan masing-masing kalimat

Commented [M53R52]: Obat yang mengurangi jumlah hepatosit (nekrosis) akan menunjukkan berkurangnya area RFP (*Red Fluorescent Protein*), sedangkan obat yang meningkatkan ukuran hati (hepatomegali) akan meningkatkan area RFP.¹¹ Parasetamol, flupirtine, dan metildopa menunjukkan penurunan sinyal area RFP, sedangkan finasterid dan asam fusidat meningkatkan area sinyal RFP.¹¹ Di sisi lain, steatosis yang diinduksi oleh obat (akumulasi lipid hepatosit) dapat digunakan untuk pengembangan obat.¹¹

Commented [Ed54]: rujukan

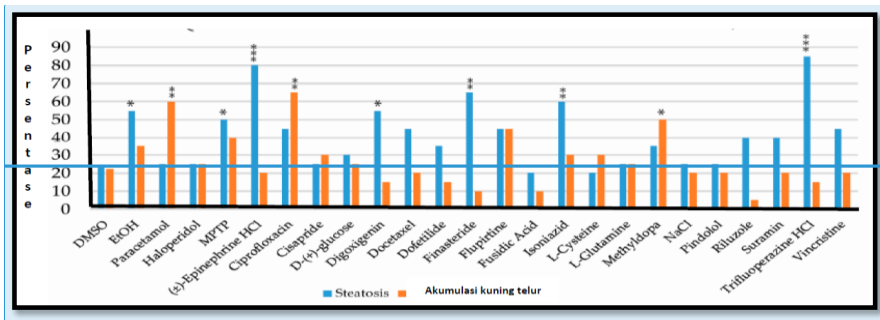
Commented [M55R54]: Penyakit hati berlemak (*fatty liver disease*) pada manusia dapat berkembang dari steatosis ke kerusakan hepatoseluler, fibrosis, sirosis, dan gagal hati.

Commented [Ed56]: rujukan

Commented [M57R56]: Model penyakit hati karena alkohol (ALD/*Alcoholic Liver Disease*) yang terjadi pada larva ikan zebra dapat mengidentifikasi gen dan jalur yang berkontribusi terhadap steatosis.²¹ Larva ikan zebra yang berumur empat hari setelah fertilisasi (4 dpf) mewakili model vertebrata untuk mempelajari ALD akut karena memiliki jalur untuk metabolisme alkohol dan hati yang telah terbentuk sempurna.²¹

Commented [U58]: Kok ada "kotak-kotaknya?"

Commented [Ed59]: rujukan



Gambar 5. Grafik Persentase Larva yang Mengalami Steatosis dan Akumulasi Kuning Telur Setelah Terpapar Senyawa (Sumber: Cornet *et al.* 2017 telah diolah kembali)

Analisis Neurotoksisitas

Potensi ikan zebra berpotensi sebagai model untuk mengembangkan skrining neurotoksisitas dan mekanisme kerja obat karena uji biokimia dapat dikombinasikan dengan pengamatan pada tingkat struktural dan fungsional dalam satu individu. Penggunaan ikan zebra dalam penelitian toksisitas dapat mengarah pada perbaikan atau pengurangan penggunaan hewan. Sudah banyak penelitian mengenai pemeriksaan toksisitas pada larva ikan zebra berbasis organ dan perilaku.^{24,22}

Gangguan neurologis seperti autisme mungkin terkait dengan paparan kimia yang mempunyai peran penting dalam perkembangan penyakit ini. Analisa neurotoksisitas dilakukan pada tahap perkembangan karena sistem sarafnya lebih rentan terhadap dampak bahan kimia daripada sistem saraf ikan zebra dewasa. Ikan zebra (*Danio rerio*) adalah model yang sesuai untuk biologi perkembangan, studi perilaku dan neurologis. Larva ikan zebra memperlihatkan banyak pola perilaku yang sangat mirip dengan tikus dan manusia.²² Karakteristik fisik ikan zebra membuatnya sangat cocok untuk skrining yang dalam jumlah banyak. Dari tahun 1995 hingga 2014 banyak dilakukan pengujian dengan larva ikan zebra yang berumur kurang dari tujuh hari setelah fertilisasi (dpf).²² Etanol, valproat dan pentilenetetrazol digunakan sebagai bahan model.²² Ternyata larva ikan zebra dapat membantu meningkatkan studi perilaku di masa depan.^{25,22}

Salah satu penyakit yang diuji dengan ikan zebra adalah Penyakit Parkinson (PD) adalah penyakit neurodegeneratif, dimana bahan kimia neurotoksin dapat menginduksi PD.²³ Fenotip, peran berbagai gen dan protein untuk Parkinsonisme parkinsonisme diuji dan dievaluasi pada ikan zebra dengan menggunakan pendekatan perilaku, molekuler dan proteomik.²³ Bahan kimia 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin haloperidol yang diberikan pada ikan zebra menunjukkan penurunan gerakan pola berenang dan peningkatan ketenangan.²⁴ Protein seperti NEFL, MUNC13-1, NAV2 dan GAPVD1 turun teratur dalam otak ikan zebra untuk fenotipe PD yang terkait dengan jalur neurologis. Ikan zebra dapat digunakan sebagai sistem model potensial untuk menjaring calon molekul obat untuk PD.^{26,25}

Larva ikan zebra peka terhadap obat neuroaktif dan respons lokomotifnya mirip dengan mamalia.²⁶ Paparan obat neuroaktif akut mengubah aktivitas alat gerak di larva ikan zebra, sehingga dapat digunakan untuk skrining *in vivo* yang cepat untuk bahan kimia beracun dengan cara mengkaraktisasi aktivitas lokomotor.²⁶ Pada mamalia, pemberian bahan-bahan seperti etanol, d-amfetamin, dan kokain dapat meningkatkan gerak pada dosis rendah dan mengurangi gerak pada dosis yang lebih tinggi.²⁷ Hasil yang sama juga dihasilkan pada larva ikan zebra enam hari pasca fertilisasi (6 dpf).^{26,27} Sebagai kontrol positif digunakan 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) yang telah diidentifikasi sebagai obat neurotoksik pada manusia dan ikan zebra.¹¹

Commented [Ed60]: Lihat catatan sebelumnya

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Commented [Ed61]: Rujukan? Ini masih kontroversi, saran - delete

Commented [Ed62]: Rujukan per kalimat

Commented [M63R62]: Larva ikan zebra memperlihatkan banyak pola perilaku yang sangat mirip dengan tikus dan manusia.²² Dari tahun 1995 hingga 2014 banyak dilakukan pengujian dengan larva ikan zebra yang berumur kurang dari tujuh hari setelah fertilisasi (dpf).²² Etanol, valproat dan pentilenetetrazol digunakan sebagai bahan model.²²

Commented [U64]: Huruf besar?

Commented [Ed65]: rujukan

Commented [M66R65]: Fenotip, peran berbagai gen dan protein untuk parkinsonisme diuji dan dievaluasi pada ikan zebra dengan menggunakan pendekatan perilaku, molekuler dan proteomik.²³

Commented [U67]: Kotak?

Commented [Ed68]: rujukan

Commented [M69R68]: Bahan kimia haloperidol yang diberikan pada ikan zebra menunjukkan penurunan gerakan pola berenang dan peningkatan ketenangan.²⁴ Ikan zebra dapat digunakan sebagai sistem model potensial untuk menjaring calon molekul obat untuk PD.²⁵

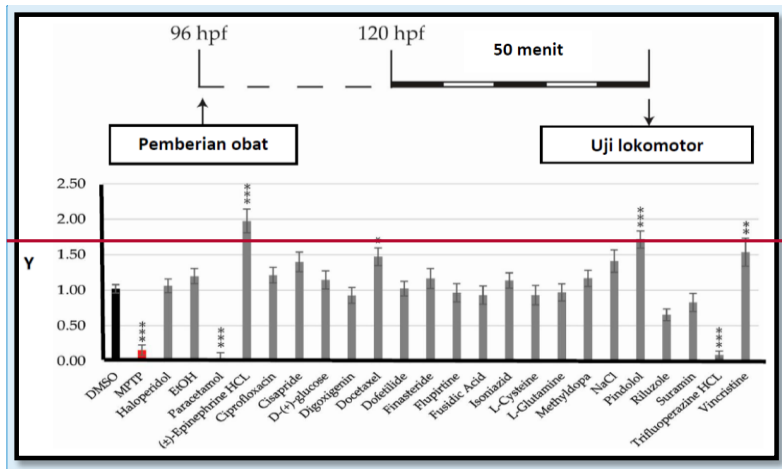
Commented [U70]: Kotak?

Commented [Ed71]: rujukan

Formatted: Superscript

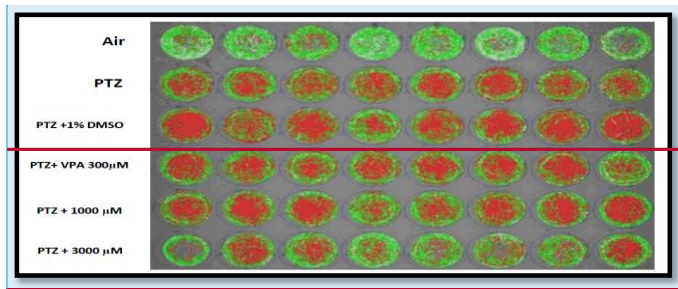
Commented [Ed72]: rujukan mohon ditambahkan per kalimat

Commented [M73R72]: Larva ikan zebra peka terhadap obat neuroaktif dan respons lokomotifnya mirip dengan mamalia.²⁶ Paparan obat neuroaktif akut mengubah aktivitas alat gerak di larva ikan zebra, sehingga dapat digunakan untuk skrining *in vivo* yang cepat untuk bahan kimia beracun dengan cara mengkaraktisasi aktivitas lokomotor.²⁶ Pada mamalia, pemberian bahan-bahan seperti etanol, d-amfetamin, dan kokain dapat meningkatkan gerak pada dosis rendah dan mengurangi gerak pada dosis yang lebih tinggi.²⁷ Hasil yang sama juga dihasilkan pada larva ikan zebra enam hari pasca fertilisasi (6 dpf).²⁶ Sebagai kontrol positif digunakan 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) yang telah diidentifikasi sebagai obat neurotoksik pada manusia dan ikan zebra.¹¹



Gambar 6. Hasil Uji Efek Lokomotor pada Larva Ikan Zebra (Kontrol Positif MPTP) (Sumber: Cornet *et al.* 2017 telah diolah kembali)

Ketersediaan hewan coba untuk obat epilepsi memberikan peluang untuk penemuan antikonvulsan baru untuk pengobatan. Untuk mengembangkan obat antiepilepsi baru dan memahami mekanisme patogenetik yang mendasari gangguan kejang diperlukan hewan coba. Model tikus telah digunakan secara luas baik untuk menjelaskan mekanisme kejang dan mengkarakterisasi mekanisme aksi obat anti-epilepsi. Namun, biaya yang relatif tinggi dan banyaknya senyawa yang diteliti menyebabkan ikan zebra muncul sebagai model unggulan vertebrata untuk analisis *in vivo* obat antiepilepsi.



Gambar 7. Perubahan aktifitas lokomotor dari obat natrium valproate (VPA) pada larva ikan zebra yang diinduksi dengan pentilen tetrazol (PTZ) (Sumber: Baxendale *et al.*, 2017 telah diolah kembali). Garis merah menunjukkan kecepatan > 20 mm/detik, putih < 4mm/detik dan hijau antara 4 mm/detik dan 20 mm/detik.

Larva ikan zebra yang berusia 7 hari diinduksi aktifitas lokomotornya dengan pentilen tetrazol (PTZ) kemudian diberi obat antiepilepsi natrium valproate (VPA).²⁸ Teknik *in vivo* ini berdasarkan ekspresi gen dan uji anti konvulsan pada larva berusia dua hari (2 dpf), sehingga dapat diketahui molekul bioaktif yang mempunyai aktifitas antikonvulsan.²⁸ Obat antikonvulsan dapat diketahui dari penurunan aktifitas lokomotor larva ikan zebra yang diukur dengan alat Zebrabox, seperti terlihat pada gambar di atas ini.²⁸

Commented [Ed74]: Lihat catatan sebelumnya – lebih baik di delete

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Field Code Changed

Commented [Ed75]: Rujukan?

Commented [Ed76]: Lihat catatan sebelumnya – tidak boleh ada unsur copas tanpa sumber

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Commented [U77]: Title case

Commented [Ed78]: rujukan

Commented [M79R78]: Larva ikan zebra yang berusia tujuh hari diinduksi aktifitas lokomotornya dengan pentilen tetrazol (PTZ) kemudian diberi obat antiepilepsi natrium valproate (VPA).²⁸ Teknik *in vivo* ini berdasarkan ekspresi gen dan uji anti konvulsan pada larva berusia dua hari (2 dpf), sehingga dapat diketahui molekul bioaktif yang mempunyai aktifitas antikonvulsan.²⁸ Obat antikonvulsan dapat diketahui dari penurunan aktifitas lokomotor larva ikan zebra yang diukur dengan alat Zebrabox.²⁸

Commented [Ed80]: Teks disesuaikan bila gambar dihilangkan

Simpulan

Larva ikan zebra merupakan model hewan yang ideal untuk uji senyawa kardiotoxik, hepatotoksik dan neurotoksik. Uji toksitas ini dapat menjembatani antara uji in vitro dan model hewan mamalia mengerat dengan lebih cepat dan ekonomis sehingga mempercepat proses pengembangan obat.

Daftar Pustaka

1. Legradi, J., E. Abdellaoui, N. Van Pomeran, M., Legler, J. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014, 22, 16277–16289.
2. European Union. European Union Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. (2010). *Off. J. Eur. Union.*, 33–79.
3. Gaikwad S, et al. Constructing the habituome for phenotype-driven zebrafish research. *Behav Brain Res.* 2012;236:110–7.
4. Calum A, MR, & Randal TP. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2015, 14, 721–731.
5. Santoriello C, Zon LI, Santoriello C, Zon LI. Hooked ! Modeling human disease in zebrafish Find the latest version : Science in medicine Hooked ! Modeling human disease in zebrafish. 2012;122(7):2337–43.
6. Hermsen SAB, van den Brandhof EJ, van der Ven LTM, Piersma AH. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicol Vitr.* 2011;25(3):745–53.
7. Jörgens, K., Hillebrands, J.-L., Hammes, H.-P., & Kroll, J. (2013). Zebrafish: A model for understanding diabetic complications. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes.* 2012, 120(4), 186–187.
8. Chongjun Z, et al. Zebrafish model for assessing induced organ toxicity by *Strychnos nux-vomica*. *J Tradit Chinese Med.* 2016;36(4):522–9.
9. Kanungo J, Cuevas E, Ali SF, Paule MG. Zebrafish Model in Drug Safety Assessment. 2014;5416–29.
10. Hartmann S, et al. Zebrafish larvae show negative phototaxis to near-infrared light. *PLoS One.* 2018;13(11):1–16.
11. Cornet C, et al. ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1-19.
12. Ota S, Kawahara A. Zebrafish: A model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders. *Congenit Anom (Kyoto).* 2014;54(1):8–11.
13. Asnani A, Peterson RT. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Dis Model Mech.* 2014;7(7):763–7.
14. Dhillon SS, et al. Optimisation of Embryonic and Larval ECG Measurement in Zebrafish for Quantifying the Effect of QT Prolonging Drugs. *PLoS ONE.* 2013 8: e60552.
15. Vliegenthart ADB, Tucker CS, Del Pozo J, Dear JW. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;78(6):1217–27.
16. Sarras Jr MP. Genetic and chemically-induced Zebrafish models for the study of diabetes mellitus. *MOJ Anat Physiol.* 2018;5(5):319–21.
17. Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. *Gastroenterology.* 2015;149(6):1361–77.
5. Calum A, MR & Randal TP. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug fatty liver disease in zebrafish larvae.* *Zebrafish.* 2013, 10, 199–210.
6. Raldúa, D.,; Piña, B. (2014). In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2014, 10, 685–697.
7. Embry, M.R., et al. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.* 2010, 97, 79–87.

Commented [U81]: Daftar pustaka sesuaikan dengan system Vancouver (semua)

Commented [RP82]: Penulisan Dapus tidak sesuai dengan ketentuan....mohon diperbaiki semua....Nama jur tidak italic

Formatted: Not Highlight

Formatted: Not Highlight

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Not Highlight

Formatted: Not Highlight

Formatted: Not Highlight

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Not Highlight

Formatted: Not Highlight

Formatted: Not Highlight

Formatted: Not Highlight

Formatted: Font: Not Italic, Not Highlight

Formatted: Font: Not Italic, Not Highlight

Formatted: Not Highlight

Formatted: Not Highlight

Commented [WU84]: 6nama ditulis, et al.

Commented [WU84]: 6nama ditulis, et al.

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

8. Cornet, C., et al. (2017). ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity fatty liver disease in zebrafish larvae. *Zebrafish* 2013;10; 199–210.
 9. Davis, G.C., et al. (1979). Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1979, 1; 249–254.
 18. Howarth, D.L.; Yin, C.; Yeh, K.; Sadler, K.C. (2013). Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae. *Zebrafish* 2013;10; 199–210.
 19. Tavares B, Santos Lopes S. The importance of Zebrafish in biomedical research. *Acta Med Port.* 2013;26(5):583–92.
 20. Quinlivan VH, Farber SA, Michel M, Farber SA. Lipid Uptake, Metabolism, and Transport in the Larval Zebrafish. 2017;8(November):1–11.
 21. Milan, D.J.; Jones, I.L.; Ellinor, P.T.; Macrae, C.A. (2006). In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; 2006. 291; H269–H273; Passeri MJ. Hepatic Steatosis in Response to Acute Alcohol Exposure in Zebrafish requires Srebp Activation. 2010;49(2):443–52.
 22. Ahmad F, Noldus LPJJ, Tegelenbosch RAJ, Richardson MK. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. 2012;149:1241–81.
 23. Outeiro TF. Green Fluorescent Protein Labeling of Dopaminergic Neurons in Zebrafish for the Study of Parkinson's Diseases. *J Microbiol Exp.* 2017;4(1)
 24. Blazina AR, Vianna MR, Lara DR. The Spinning Task: A New Protocol to Easily Assess Motor Coordination and Resistance in Zebrafish. *Zebrafish.* 2013;10(4):480–5.
 25. Outeiro TF. Green Fluorescent Protein Labeling of Dopaminergic Neurons in Zebrafish for the Study of Parkinson's Diseases. *J Microbiol Exp.* 2017;4(1).
 26. Afrikanova T, et al. Validation of the Zebrafish Pentylentetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs. *PLoS One.* 2013;8(1):1–9.
 27. Maximino C, et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behav Brain Res.* 2010;214(2):157–71.
 28. Liu C, Zhou J. Validation of the Zebra-fish Pentylene Tetrazol Seizure Model: Behaviour Assay for Assessing Anti-Epileptic Drug Efficacy. *Biochem Anal Biochem.* 2016;5(2).
-
11. —
 12. Dhillon, S.S.; Dóro, É.; Magyary, I.; Egginton, S.; Sák, A.; Müller, F. (2013). Optimisation of Embryonic and Larval ECG Measurement in Zebrafish for Quantifying the Effect of QT Prolonging Drugs. *PLoS ONE.*, 2013 8; e60552.
 13. Parker, T., et al. (2014). A multi endpoint in vivo larval zebrafish (Danio rerio) model for the assessment of integrated cardiovascular function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, 2014.69; 30–38.
 14. MacRae, C.A. Cardiac arrhythmia. (2010). In vivo screening in the zebrafish to overcome complexity in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2010; 5; 619–632.
 15. He, J.H., et al. (2013) A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, 2013; 67; 25–32.
 16. Zhang, X.; Li, C.; Gong, Z. (2014). Development of a convenient in vivo hepatotoxin assay using a transgenic zebrafish line with liver specific dsred expression. *PLoS ONE.* 2014; 9; e91874.
 17. Chu, J.; Kirsten, C.; Sadler, A. (2009). New School in Liver Development: Lessons from Zebrafish. *Hepatology.*, 2009. 50; 156–1663.

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Commented [L85]: Pustaka 10 tahun terakhir

Commented [L85]: Pustaka 10 tahun terakhir

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Commented [WU86]: 6 nama, et al.

Commented [WU86]: 6 nama, et al.

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Commented [WU87]: 6nama, et al.

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Commented [WU88]: 6nama, et al.

Commented [WU89R88]:

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Formatted

Larva Ikan Zebra (*Danio Rerio*) Sebagai Model Hewan Untuk Uji Toksisitas

Abstrak

Toksisitas adalah salah satu masalah utama dalam proses pengembangan obat. Kardiotoxikitas, neurotoksisitas dan hepatotoksisitas merupakan alasan utama obat tidak lolos dalam uji klinik atau ditarik dari pasaran. Larva ikan zebra dapat menjembatani antara uji *in vitro* dan model hewan mamalia mengerat dengan lebih cepat dan ekonomis. Toksisitas organ dapat dideteksi mulai pada tahap larva sehingga dapat diprediksi dengan tepat pengaruh obat tersebut pada manusia. Uji kardiotoxik, neurotoksik dan hepatotoksik dapat dilakukan pada hewan yang sama dengan ketepatan dan ketelitian yang tinggi.

Kata kunci: hepatotoksisitas, kardiotoxikitas, larva ikan zebra, neurotoksisitas, toksisitas

Commented [U1]: hepatotoksisitas

Commented [U2]: tidak perlu lagi

Zebra (Danio rerio) larvae as animal models for toxicity test

Abstract

Toxicity research is a very important issue for the development of new drugs, such as cardiotoxicity, neurotoxicity, and hepatotoxicity. The use of zebrafish animal models for research has long been known. Zebrafish is an animal model that can act as an object of research. Zebrafish larvae have advantages compared to rats because they are cheaper and easier to obtain. Cardiotoxic, neurotoxic and hepatotoxic assays can be carried out in the same animal with high accuracy and precision.

Keywords: cardiotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, toxicity, zebrafish larva

Pendahuluan

Salah satu masalah utama dalam pengembangan obat-obatan baru ialah efek yang tidak diinginkan, sehingga dibutuhkan pengujian toksisitas pada hewan dengan skala besar. Keamanan obat merupakan masalah utama bagi produktivitas penelitian dan pengembangan farmasi, terutama pada tahap optimalisasi senyawa penemuan obat dan awal pengembangan klinis.

Pada penelitian obat baru, langkah pertama adalah uji *in vitro* secara enzimatis atau kultur sel yang hanya memerlukan sedikit senyawa dan mengurangi hewan coba. Uji toksisitas *in vitro* dirancang untuk mengidentifikasi molekul yang membahayakan dengan cepat. Meskipun sudah langsung diketahui toksisitasnya, tapi prediksi terhadap toksisitas organ manusia rendah. Proses biologis seperti mekanisme absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, interaksi sel dan jaringan susah diketahui dengan pendekatan *in vitro*.¹ Uji toksisitas pada mamalia merupakan *gold standard* untuk memprediksi keamanan pada manusia, tapi memerlukan biaya tinggi, waktu yang panjang, diperlukan senyawa dalam jumlah besar, dan tidak selalu dapat diprediksi. Karena itu mamalia kurang cocok untuk uji toksisitas pendahuluan.

Untuk mempercepat pengembangan obat dengan hewan uji dan mengurangi biaya, maka peneliti akademik dan industri memberikan perhatian pada ikan zebra (*Danio rerio*). Hasil uji pada ikan zebra dapat diaplikasikan pada hewan bertulang belakang yang lebih tinggi derajatnya termasuk manusia. Tidak seperti uji *in vitro*, larva ikan zebra merupakan organisme yang kompleks dimana jalur metabolisme maupun reaksi fisiologis sudah lengkap dan berfungsi, sehingga dapat digunakan untuk uji toksisitas serta metabolisme.² Menurut regulasi etik internasional, larva ikan zebra yang berumur sampai 5-lima hari sesudah fertilisasi (5 five days post-fertilization/-5 dpf) disamakan dengan uji *in vivo* dan diterima sebagai alternatif hewan coba.²

Ikan zebra telah menjadi model hewan vertebrata untuk berbagai penyakit dan telah berkontribusi pada penemuan obat berbasis fenotip. Untuk mengembangkan penggunaan ikan zebra maka harus diketahui perbedaan dan persamaan antara biologi ikan zebra dan manusia. Akhir-akhir ini mulai diteliti kemampuan dan keterbatasan ikan zebra untuk pemodelan penyakit, skrining obat, identifikasi target obat, farmakologi, dan toksikologi. Seiring dengan meningkatnya pemahaman kita dan teknologi untuk memanipulasi ikan zebra, diharapkan ikan zebra akan memiliki peran penting dalam mempercepat penemuan obat yang tepat. Skrining

Commented [U3]: optimalisasi?

Commented [Ed4]: rujukan no?

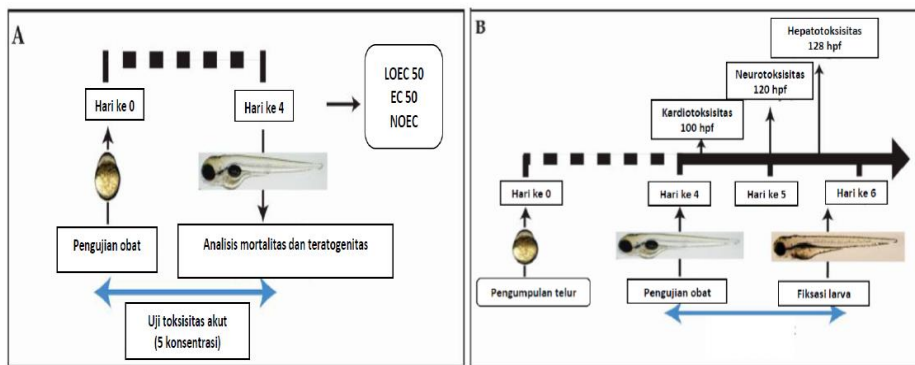
fenotip telah menjadi salah satu pendekatan yang paling efektif untuk penemuan obat, tetapi hanya sebagian dari fenotip yang berhubungan dengan penyakit dapat dimodelkan dalam sel yang dikultur. Ikan zebra menunjukkan serangkaian fenotip terkait penyakit, gangguan fisiologi, metabolisme dan perilaku.³ Ikan dan larva ikan zebra telah digunakan untuk penelitian diabetes dan komplikasinya.⁴ Pada tahun 2000, telah ditemukan obat baru pertama yang menggunakan ikan zebra hidup dalam *multiwell plate*.³ Sampai sekarang ada sekitar 60 obat baru yang telah ditemukan dan diketahui mekanisme kerjanya. Selain skrining fenotip, juga berkembang penelitian tentang perilaku, jantung, dan penyakit regeneratif.⁴ Secara filogenetik hubungan manusia dengan ikan zebra lebih jauh pada manusia daripada hewan pengerat, tetapi ikan zebra memiliki 82% gen yang berhubungan dengan penyakit manusia. Dalam banyak kasus, ikan zebra menunjukkan sifat fisiologis dan farmakologis yang mendekati tikus. Pada penelitian dengan ikan zebra telah ditemukan beberapa senyawa yang telah diuji klinis dan praklinis. Ikan zebra juga telah digunakan pada uji toksikologi.⁵

Larva ikan zebra sedang dikembangkan sebagai alat untuk menguji toksisitas bahan kimia obat dengan lebih cepat, lebih murah dan dapat diandalkan. Analisa efek toksik umumnya dilakukan pada sistem kardiovaskuler, saraf, neuromuskuler, gastrointestinal dan tiroid. Analisa efek samping obat memerlukan analisa sistemik karena melibatkan organisme secara utuh. Karakteristik fisik dan fisiologis ikan zebra yang unik menjadikan alat yang penting untuk penemuan obat dan uji toksisitas.⁶ Sekarang ini analisa toksisitas larva ikan zebra telah digunakan sebagai metode alternatif hewan dalam penilaian bahaya/risiko dan penelitian ilmiah.⁷

Ikan Zebra untuk Analisis Toksisitas Obat

Toksisitas adalah salah satu hambatan utama dalam proses pengembangan obat. Penggunaan ikan zebra dalam skrining obat menjadi alat penting untuk menilai toksisitas dan kemanjuran obat baru. Hewan ini memiliki organ yang berkembang dari tahap awal sehingga dapat diketahui fisiologisnya. Toksisitas organ yang diinduksi obat dapat dideteksi dalam tahap larva sehingga memungkinkan prediksi yang kuat seperti pada manusia. Oleh karena itu, ikan zebra dapat menjembatani kesenjangan antara uji keamanan praklinis pada in vitro dan uji pada model hewan pengerat dengan cara cepat dan hemat biaya.⁸

Senyawa yang dapat menyebabkan toksisitas antara lain senyawa-senyawa kardiotoxik, neurotoksik dan hepatotoksik, sehingga menjadikan obat tersebut gagal dalam fase klinis dan ditariknya obat ketika dipasaran. Sebelum dilakukan uji kardiotoxik, hepatotoksitas dan neurotoksisitas, terlebih dahulu dilakukan uji untuk kadar obat non-mortal/non teratogenik. Menurut *Organisation for Economic Cooperation and Development 236* (OECD 236 (*Organisation for Economic Cooperation and Development 236*)), penelitian toksisitas akut dibuat dalam 5-lima konsentrasi logaritma (Gambar 1).⁷



Catatan: *LOEC: Lowest Observed Effect Concentration;*
EC 50: Median Effective Concentration;
NOEC: No Observed Effect Concentration

Gambar 1. Uji Toksisitas pada Larva Ikan Zebra (Sumber: diadaptasi dari Cornet et al. 2017 telah diolah kembali)⁷

LOEC: Lowest Observed Effect Concentration

Commented [U5]: ??

Commented [Ed6]: Butuh nomor rujukan

Commented [Ed7]: rujukan

Commented [Ed8]: no rujukan? Kalimat tolong diperjelas

Commented [Ed9]: ada rujukan?

Commented [Ed10]: Rujukan?

Commented [Ed11]: Rujukan?

Commented [U12]: Kpanjangannya dulu, baru singkatannya

Commented [Ed13]: Tambahkan nomor rujukan

Commented [Ed14]: Adaptasi bukan hanya menerjemahkan ke Bahasa Indonesia - tidak boleh copas gambar tanpa seizin pemiliknya

Saran: mohon kirimkan file yang diindonesiakan digunakan tanpa unsur copas

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Superscript

EC 50: Median Effective Concentration
NOEC: No Observed Effect Concentration

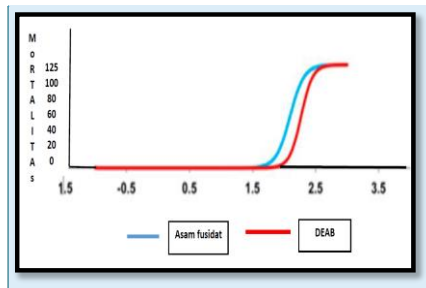
No Observed Effect Concentration (NOEC) dapat memengaruhi fisiologis organ ketika terjadi efek samping. Untuk menganalisa perkembangan organ dapat digunakan larva ikan zebra berumur 96 hpf (*hours post fertilization* (hpf) atau 96 jam setelah fertilisasi (Gambar 1B)). Tujuan utamanya adalah mengetahui pengaruh obat terhadap fisiologis dan fungsi organ. Kardi toksisitas diamati pada 100 hari setelah fertilisasi (100 hpf), neurotoksisitas 120 hpf dan hepatotoksitas 132 hpf.

Dietilaminobenzaldehid (DEAB) merupakan penghambat asam retinoat yang meningkatkan mortalitas dan teratogenik (NOEC) seperti terlihat pada Tabel 1. DEAB digunakan sebagai kontrol positif. LOEC merupakan konsentrasi terendah dimana efek obat dapat diamati, sedangkan LC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan 50% larva ikan zebra mati. Kurva mortalitas untuk senyawa asam fusidat pada 96 hpf dengan kurva DEAB ditunjukkan pada Gambar 2.

Tabel 1. NOEC, LOEC dan LC₅₀ Senyawa pada Larva Ikan Zebra 96 hpf (Sumber: Diadaptasi dari Cornet *et al.* 2017 ~~telah diolah kembali~~)

Obat	96 hpf NOEC (µM)	96 hpf LOEC (µM)	96 hpf LC50 (µM)
DEAB	100	10	185,99
Epineprin HCl	1000	N-A	3,11x10 ¹⁰
Siprofloksasin	1000	NA	7,01x10 ⁹
Cisapride	1000	NA	2935,74
Asam fusidat	10	100	124,15

Catatan: NA= *Not Available* (hasil berada di bawah pengukuran)



Gambar 2. Kurva Konsentrasi Vs Mortalitas Asam Fusidat (Diadaptasi dari Sumber: Cornet *et al.* 2017 ~~telah diolah kembali~~)

Tabel 2. Contoh Senyawa yang Menyebabkan Toksisitas pada Manusia dan Larva Ikan Zebra

Obat	Kardi toksisitas	Neurotoksisitas	Hepatotoksitas
Asetaminofen	Toksik	Toksik	Toksik
Ethanol	Toksik	Toksik	Toksik
Haloperidol	Toksik	Toksik	Tidak diketahui
MPTP	Tidak diketahui	Toksik	Tidak diketahui

Senyawa 1-metil-4-fenilpiridinium (MPTP) yang berkhasiat sebagai analgesik telah terbukti menyebabkan gejala Parkinson permanen dengan menghancurkan neuron dopaminergik di *substantia nigra*.⁹ sekarang digunakan sebagai kontrol positif obat neurotoksik. Etanol dan asetaminofen digunakan sebagai obat kontrol positif hepatotoksik.¹⁰ Haloperidol, yang dikenal sebagai obat antipsikosis digunakan sebagai kontrol positif obat neurotoksik karena memblokir *human Ether-a-go-go-Related Gene* (hERG), memperpanjang interval QT dan menyebabkan aritmia pada manusia dan hewan.¹¹⁻¹³

Formatted: Font: Italic

Commented [Ed15]: Rujukan perlu disebut angkanya

Commented [Ed16]: Sumber Cornet? Perlu disebut angkanya

Commented [Ed17]: Sumber Cornet? Perlu disebut angkanya

Commented [Ed18]: Rujukan Cornet? Perlu disebut angkanya

Formatted: Font: Italic

Commented [Ed19]: Terlalu banyak gambar dari satu sumber (Cornet) dan tidak boleh copas tanpa izin. saran: gambar ini tidak usah diikutsertakan

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Commented [U20]: Gambar kurang jelas/terlalu kecil

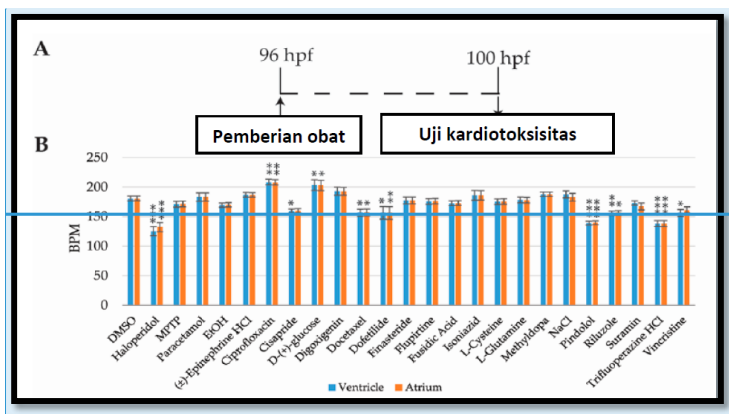
Commented [Ed21R20]:

Commented [Ed22]: Tambahkan nomor rujukan

Formatted: Font: Italic

Analisis Kardiotoxikitas

Dalam dekade terakhir, ikan zebra telah menjadi model organisme utama untuk studi perkembangan dan organogenesis. Aritmia jantung menjadi tantangan utama bagi penemuan obat modern. Ikan zebra dapat digunakan sebagai model, khususnya untuk biologi kardiovaskular. Pendekatan dengan ikan zebra juga potensial untuk mengatasi masalah untuk penemuan obat penyakit genetik.¹⁴ Embrio ikan zebra dapat digunakan untuk penelitian kardiotoxikitas yang diinduksi obat. Obat-obatan seperti *astemizole*, haloperidol, *pimozide*, dan terfenadin yang menyebabkan perpanjangan QT pada manusia juga memberikan hasil yang serupa pada ikan zebra.¹¹



Gambar 3. Uji Kardiotoxikitas Senyawa pada Larva Ikan Zebra (Sumber: Cornet *et al.* 2017 telah diolah kembali)

Sebagai kontrol positif digunakan haloperidol dan uji kardiotoxikitas dilakukan pada larva ikan zebra berumur 96 hpf ketika detak jantung ikan zebra sudah stabil. Obat diinkubasi selama empat jam dan setelah itu dianalisa dengan perangkat lunak ZeCardio®. Gambar di atas ini menunjukkan senyawa Haloperidol, *cisapride*, *docetaxel*, *dofetilide*, *pindolol*, *riluzole*, *trifluoperazine HCl*, dan *vincristine* dapat mengurangi detak jantung per menit (BPM) dibandingkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif.

Analisis Hepatotoksisitas

Ikan zebra merupakan perantara antara evaluasi berbasis sel dengan -pengujian hepatotoksisitas pada hewan konvensional. Semua obat yang diuji hepatotoksik pada mamalia memberikan hasil yang sama pada larva ikan zebra, seperti degenerasi hati dan pengurangan ukuran hati. Prediksi tingkat keberhasilan uji obat-obatan hepatotoksik dan non-hepatotoksik dalam ikan zebra adalah 100% -dibandingkan dengan mamalia. Hepatotoksisitas dari enam obat hepatotoksik (asetaminofen, aspirin, tetrasiklin HCl, natrium valproat, siklofosamid dan eritromisin) dan dua senyawa non-hepatotoksik (sukrosa dan biotin) yang telah diuji pada mamalia setelah diuji lagi pada larva ikan zebra memberikan hasil yang sama dengan menggunakan tiga fenotip spesifik hepatotoksisitas: degenerasi hati, perubahan ukuran hati dan retensi absorpsi kuning telur.¹⁵

Perkembangan hati ikan zebra dapat dibagi dalam tiga tahap yaitu: spesifikasi, diferensiasi, dan perkembangan.¹⁶ Larva ikan zebra yang berumur 5 dpf mempunyai hati berbentuk lonjong yang berfungsi penuh dan terdiri dari dua lobus.¹⁷ Efek hepatotoksik terutama disebabkan oleh proses metabolisme yang membutuhkan waktu, maka percobaan dilakukan pada larva yang berumur 132 hpf dengan kontrol positif parasetamol dan etanol, yang telah terbukti mengakibatkan toksisitas pada manusia dan ikan zebra.¹⁸

Commented [U23]: Kalimat nanggung

Commented [U24]: Kurang jelas

Commented [Ed25]: Lihat catatan sebelumnya - Kalau mau lebih baik dijadikan tabel dengan beberapa unsur atau gambar ini tidak usah diikutsertakan

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

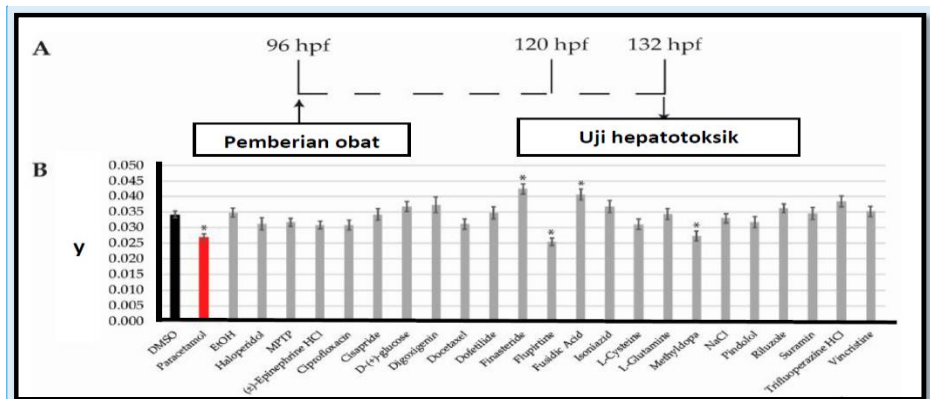
Commented [Ed26]: rujukan

Commented [Ed27]: rujukan

Commented [Ed28]: bila gambar dihilangkan (seperti saran), kata-kata ini bisa dihilangkan

Commented [Ed29]: rujukan

Commented [Ed30]: rujukan untuk masing-masing kalimat (tiga)



Gambar 4. Grafik hasil uji hepatotoksisitas pada larva ikan zebra (Sumber: Cornet *et al.* 2017 telah diolah kembali). A. Uji hepatotoksik pada larva ikan zebra; B. Grafik antara luas organ hati setelah pemberian obat, Y= Luas area (mm²)

Commented [Ed31]: Lihat catatan sebelumnya

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Commented [U32]: Title case

Pada perkembangan minggu pertama, sumber energi unik untuk larva ikan zebra adalah kuning telur. Kuning telur ikan zebra mengandung 70% lipid netral, yang sebagian besar dimetabolisme di hati. Dengan demikian, akumulasi lipid kuning telur dapat digunakan sebagai titik akhir untuk fungsi hati. Metabolisme yang terganggu akan menunda penyerapan kuning telur sehingga menghasilkan kadar lipid yang lebih tinggi.¹⁹ Ukuran hati dan jumlah hepatosit dapat dianalisa dengan intensitas fluoresensi.²⁰ Obat yang mengurangi jumlah hepatosit (nekrosis) akan menunjukkan berkurangnya area RFP (*Red Fluorescent Protein*), -sedangkan obat yang meningkatkan ukuran hati (hepatomegali) akan meningkatkan area RFP. Parasetamol, flupirtine, dan metildopa menunjukkan penurunan sinyal area RFP, sedangkan finasterid dan asam fusidat meningkatkan area sinyal RFP. Di sisi lain, steatosis yang diinduksi oleh obat (akumulasi lipid hepatosit) dapat digunakan untuk pengembangan obat.

Commented [Ed33]: Rujukan masing-masing kalimat (tiga)

Penyakit hati berlemak (*fatty liver disease*) pada manusia dapat berkembang dari steatosis ke kerusakan hepatoseluler, fibrosis, sirosis, dan gagal hati. Larva ikan zebra dengan steatosis yang diinduksi tunikamisin atau etanol dapat menyebabkan disfungsi hati dimana, yaitu terjadi perubahan ekspresi gen pada fase akut, gangguan fungsi hati, dan gangguan sekresi hepatosit.²¹

Commented [Ed34]: Rujukan masing-masing kalimat

Commented [Ed35]: rujukan

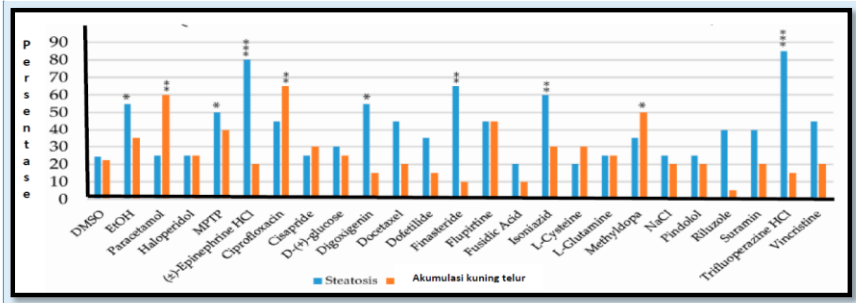
Steatosis adalah konsekuensi yang paling umum dari penyalahgunaan alkohol akut, seperti yang terjadi selama pesta minuman keras. Alkohol akut ini mungkin akan mempengaruhi penyakit hati yang lebih parah. Model penyakit hati karena alkohol (*ALD/Alcoholic Liver Disease*) yang terjadi pada larva ikan zebra dapat mengidentifikasi gen dan jalur yang berkontribusi terhadap steatosis. Larva ikan zebra yang berumur empat hari setelah fertilisasi (4 dpf) mewakili model vertebrata untuk mempelajari ALD akut karena memiliki jalur untuk metabolisme alkohol dan hati yang telah terbentuk sempurna. Penambahan etanol 2% selama 32 jam pada medium larva ikan zebra menyebabkan kadar etanol 80 mM intraseluler dan regulasi hepatic menunjukkan bahwa etanol dimetabolisme serta menyebabkan stres oksidatif.²²

Commented [Ed36]: rujukan

Obat-obat yang dapat menyebabkan kerusakan hati tidak bisa dianalisa dengan skrining sel tunggal (*single-cell-based assays*), mungkin karena kurangnya interaksi fisiologis dengan sel lain dalam hati. Sistem hati lengkap seperti yang ada di larva ikan zebra dapat memberikan nilai tambah dalam strategi skrining untuk obat yang menyebabkan kerusakan hati. Namun, kemungkinan terjadinya racun organ lain pada tahap larva dari ikan zebra dapat menyulitkan analisis yang akurat dan cepat. Analisis asam lemak dalam hati yang mengikat protein 10A (*Ifabp10a*) adalah titik akhir yang tepat untuk menilai efek hepatotoksik pada larva ikan zebra. Ekspresi *Ifabp10a* adalah penanda yang valid terjadinya hepatotoksisitas setelah pengobatan, kurva respons dosis dapat diperoleh dan signifikan secara statistik, dan berkorelasi dengan hepatoseluler dalam perubahan histopatologi hati. Namun, toksisitas dalam organ vital lainnya seperti jantung dapat berdampak pada pertumbuhan hati dan harus dinilai secara bersamaan.²³

Commented [U37]: Kok ada "kotak-kotaknya?"

Commented [Ed38]: rujukan



Gambar 5. Grafik Persentase Larva yang Mengalami Steatosis dan Akumulasi Kuning Telur Setelah Terpapar Senyawa (Sumber: Cornet *et al.* 2017 telah diolah kembali)

Commented [Ed39]: Lihat catatan sebelumnya

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Analisis Neurotoksisitas

Potensi Ikan zebra berpotensi sebagai model untuk mengembangkan skrining neurotoksisitas dan mekanisme kerja obat karena uji biokimia dapat dikombinasikan dengan pengamatan pada tingkat struktural dan fungsional dalam satu individu. Penggunaan ikan zebra dalam penelitian toksisitas dapat mengarah pada perbaikan atau pengurangan penggunaan hewan. Sudah banyak penelitian mengenai pemeriksaan toksisitas pada larva ikan zebra berbasis organ dan perilaku.²⁴

Gangguan neurologis seperti autisme mungkin terkait dengan paparan kimia yang mempunyai peran penting dalam perkembangan penyakit ini. Analisa neurotoksisitas dilakukan pada tahap perkembangan karena sistem sarafnya lebih rentan terhadap dampak bahan kimia daripada sistem saraf ikan zebra dewasa. Ikan zebra (*Danio rerio*) adalah model yang sesuai untuk biologi perkembangan, studi perilaku dan neurologis. Larva ikan zebra menunjukkan banyak pola perilaku yang sangat mirip dengan tikus dan manusia. Karakteristik fisik ikan zebra membuatnya sangat cocok untuk skrining yang dalam jumlah banyak. Dari tahun 1995 hingga 2014 banyak dilakukan pengujian dengan larva ikan zebra yang berumur kurang dari tujuh hari setelah fertilisasi (dpf). Etanol, valproat dan pentilene tetrazol digunakan sebagai bahan model. Ternyata larva ikan zebra dapat membantu meningkatkan studi perilaku di masa depan.²⁵

Salah satu penyakit yang diuji dengan ikan zebra adalah Penyakit Parkinson (PD) adalah penyakit neurodegeneratif, dimana bahan kimia neurotoksin dapat menginduksi PD. Fenotip, peran berbagai gen dan protein untuk Parkinsonisme diuji dan dievaluasi pada ikan zebra dengan menggunakan pendekatan perilaku, molekuler dan proteomik. Bahan kimia 1--metil-4--fenil-1,2,3,6--tetrahidropiridin yang diberikan pada ikan zebra menunjukkan penurunan gerakan pola berenang yang tidak menentu dan peningkatan ketenangan. Protein seperti NEFL, MUNC13--1, NAV2 dan GAPVD1 turun teratur dalam otak ikan zebra untuk fenotipe PD yang terkait dengan jalur neurologis. Ikan zebra dapat digunakan sebagai sistem model potensial untuk menjangkau calon molekul obat untuk PD.²⁶

Larva ikan zebra peka terhadap obat neuroaktif dan respons lokomotifnya mirip dengan mamalia. Paparan obat neuroaktif akut mengubah aktivitas alat gerak di larva ikan zebra, sehingga dapat digunakan untuk skrining *in vivo* yang cepat untuk bahan kimia beracun dengan cara mengkarakterisasi aktivitas lokomotor. Pada mamalia, pemberian bahan-bahan seperti etanol, d-amfetamin, dan kokain dapat meningkatkan gerak pada dosis rendah dan mengurangi gerak pada dosis yang lebih tinggi. Hasil yang sama juga dihasilkan pada larva ikan zebra enam hari pasca fertilisasi (6 dpf).²⁷ Sebagai kontrol positif digunakan 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) yang telah diidentifikasi sebagai obat neurotoksik pada manusia dan ikan zebra.

Commented [Ed40]: Rujukan? Ini masih kontroversi, saran - didelete

Commented [Ed41]: Rujukan per kalimat

Commented [U42]: Huruf besar?

Commented [Ed43]: rujukan

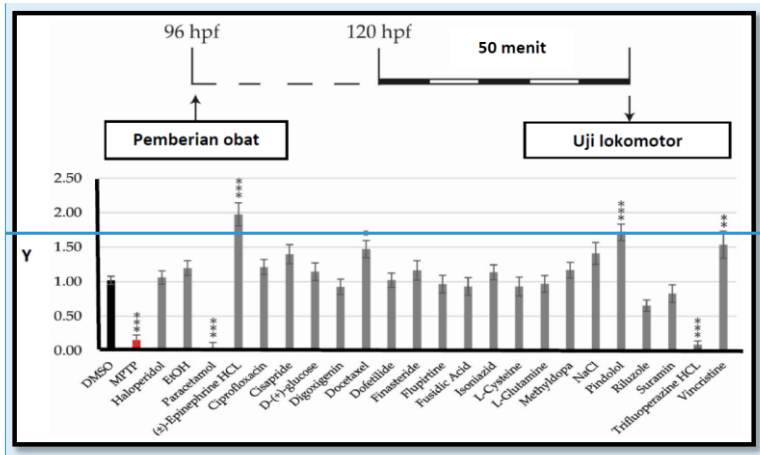
Commented [U44]: Kotak?

Commented [Ed45]: rujukan

Commented [U46]: Kotak?

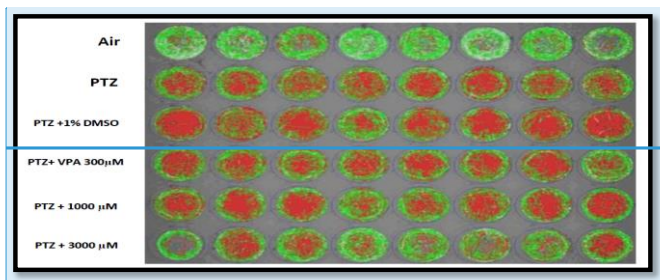
Commented [Ed47]: rujukan

Commented [Ed48]: rujukan mohon ditambahkan per kalimat



Gambar 6. Hasil Uji Efek Lokomotor pada Larva Ikan Zebra (Kontrol Positif MPTP) (Sumber: Cornet *et al.* 2017 telah diolah kembali)

Ketersediaan hewan coba untuk obat epilepsi memberikan peluang untuk penemuan antikonvulsan baru untuk pengobatan. Untuk mengembangkan obat antiepilepsi baru dan memahami mekanisme patogenetik yang mendasari gangguan kejang diperlukan hewan coba. Model tikus telah digunakan secara luas baik untuk menjelaskan mekanisme kejang dan mengkarakterisasi mekanisme aksi obat anti-epilepsi. Namun, biaya yang relatif tinggi dan banyaknya senyawa yang diteliti menyebabkan ikan zebra muncul sebagai model unggulan vertebrata untuk analisis *in vivo* obat antiepilepsi.



Gambar 7. Perubahan aktifitas lokomotor dari obat natrium valproate (VPA) pada larva ikan zebra yang diinduksi dengan pentilen tetrazol (PTZ)(Sumber: Baxendale *et al.* 2017 telah diolah kembali). Garis merah menunjukkan kecepatan > 20 mm/detik, putih < 4mm/detik dan hijau antara 4 mm/detik dan 20 mm/detik.

Larva ikan zebra yang berusia 7tujuh hari diinduksi aktifitas lokomotornya dengan pentilen tetrazol (PTZ) kemudian diberi obat antiepilepsi natrium valproate (VPA). Teknik *in vivo* ini berdasarkan ekspresi gen dan uji anti konvulsan pada larva berusia dua2 hari (2 dpf), sehingga dapat diketahui molekul bioaktif yang mempunyai aktifitas antikonvulsan. Obat antikonvulsan dapat diketahui dari penurunan aktifitas lokomotor larva ikan zebra yang diukur dengan alat Zebrafishbox, seperti terlihat pada gambar di atas ini.²⁸

Commented [Ed49]: Lihat catatan sebelumnya – lebih baik di delete

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Commented [Ed50]: Rujukan?

Commented [Ed51]: Lihat catatan sebelumnya – tidak boleh ada unsur copas tanpa sumber

Mohon pastikan teks yang mengacu pada gambar disesuaikan

Commented [U52]: Title case

Commented [Ed53]: rujukan

Commented [Ed54]: Teks disesuaikan bila gambar dihilangkan

Simpulan

Larva ikan zebra merupakan model hewan yang ideal untuk uji senyawa kardi toksik, hepatotoksik dan neurotoksik. Uji toksisitas ini dapat menjembatani antara uji *in vitro* dan model hewan mamalia mengerat dengan lebih cepat dan ekonomis sehingga mempercepat proses pengembangan obat.

Daftar Pustaka

1. Legradi, J., Fel Abdellaoui, N., Van Pomeran, M., Legler, J. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014, 22, 16277–16289.
2. European Union. European Union Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. (2010). *Off. J. Eur. Union.*, 33–79.
3. Calum A. MR. & Randal TP. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2015, 14, 721–731.
4. Jörgens, K., Hillebrands, J.-L., Hammes, H.-P., & Kroll, J. (2013). Zebrafish: A model for understanding diabetic complications. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes.* 2012, 120(4), 186–187.
5. Calum A, MR & Randal TP. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery.* 14, 721–731.
6. Raldúa, D., Piña, B. (2014). In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2014, 10, 685–697.
7. Embry, M-R, et al. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.* 2010, 97, 79–87.
8. Cornet, C., et al. (2017). ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1–19.
9. Davis, G-C, et al. (1979). Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1979, 1, 249–254.
10. Howarth, D-L, Yin, C, Yeh, K, Sadler, K-C. (2013). Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae. *Zebrafish.* 2013, 10, 199–210.
11. Milan, D-J, Jones, I-L, Ellinor, P-T, Macrae, C-A. (2006). In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006, 291, H269–H273.
12. Dhillon, S-S, Dóro, É, Magyary, I, Egginton, S, Sfk, A, Müller, F. (2013). Optimisation of Embryonic and Larval ECG Measurement in Zebrafish for Quantifying the Effect of QT Prolonging Drugs. *PLoS ONE.* 2013, 8, e60552.
13. Parker, T, et al. (2014). A multi-endpoint in vivo larval zebrafish (*Danio rerio*) model for the assessment of integrated cardiovascular function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2014, 69, 30–38.
14. MacRae, C-A. Cardiac arrhythmia. (2010). In vivo screening in the zebrafish to overcome complexity in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2010, 5, 619–632.
15. He, J-H, et al. (2013). A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2013, 67, 25–32.
16. Zhang, X, Li, C, Gong, Z. (2014). Development of a convenient in vivo hepatotoxin assay using a transgenic zebrafish line with liver-specific dsred expression. *PLOS ONE.* 2014, 9, e91874.
17. Chu, J, Kirsten, C, Sadler, A. (2009). New School in Liver Development: Lessons from Zebrafish. *Hepatology.* 2009, 50, 156–1663.
18. North, T-E, et al. (2010). PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010, 107, 17315–17320.
19. He, J.H, et al. (2013). A zebrafish phenotypic assay for assessing drug induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 67, 25–32.

Commented [U55]: Daftar pustaka sesuaikan dengan system Vancouver (semua)

Commented [RP56]: Penulisan Dapus tidak sesuai dengan ketentuan....mohon diperbaiki semua....Nama jurnal tidak italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Commented [WU57]: Sama dengan nomor 3. Perhatikan urutan nomor referensi di paragraph juga setelah diperbaiki

Formatted: Font: Not Italic

Commented [WU58]: 6nama ditulis, et al.

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Commented [L59]: Pustaka 10 tahun terakhir

Formatted: Font: Not Italic

Commented [WU60]: 6 nama, et al.

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

- 20.18. Donato M.T., Gomez-Lechon M.J. (2012). Drug-induced liver steatosis and phospholipidosis: cell-based assays for screening of drug candidates. *Curr. Drug Metab.* 2012, 13, 1160–1173.
21. Howarth D.L., Yin C., Yeh K., Sadler K.C. (2013). Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae. *Zebrafish*, 10, 199–210
- 22.19. Howarth D.L., Passeri M., Sadler K.C. (2011). Drinks like a fish: using zebrafish to understand alcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2011, 35, 826–829.
23. He, J.H. et al (2013). A zebrafish phenotypic assay for assessing drug induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 67, 25–32.
- 24.20. De Esch C., Sliker R., Wolterbeek A., Woutersen R., de Groot D. (2012). Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. *Neurotoxicol. Teratol.* 2012, 34, 545–553.
25. Legradi, J.; el Abdellaoui, N.; van Pomeroy, M.; Legler, J. (2014). Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16377–16389.
- 26.21. Sarath Babu N., Murthy C.L.N., Kakara S., Sharma R., Brahmendra Swamy C.V., Idris. (2016). M.M.1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. *2016*, 16, 1407–1420.
- 27.22. Irons T.D., MacPhail R.C., Hunter D.L., Padilla S. (2010). Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 2010, 32, 84–90.
- 28.23. Baxendale S. et al. (2012). Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Disease Models & Mechanisms* 2012, 5(6), 773–84.

Commented [WU66]:

Commented [WU67R66]: He JH sama dg no 14

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Commented [WU68]: Sama atasnya.

Formatted: Font: Not Italic

Commented [WU69]: Sama nomor 1

Formatted: Font: Not Italic

Commented [WU70]: 6nama, et al.

Formatted: Font: Not Italic

Rekomendasi meditek_2_20190528_Larva Ikan Zebra

Pilihan rekomendasi (pilih salah satu):	Beri tanda X
1. Naskah dapat dimuat tanpa perubahan	
2. Naskah dapat dimuat dengan sedikit perbaikan yang langsung dilaporkan ke penyunting/editor tanpa harus melalui pengulas (<i>reviewer</i>) (revisi minor)	
3. Penulis naskah perlu melakukan perbaikan bermakna yang diulas kembali (revisi mayor)	X
4. Naskah tidak dapat dimuat/ditolak	

Daftar centang (*checklist*) untuk pengulas (*reviewer*) – Bagian 1

Poin (beri tanda X sepengetahuan Anda):	Ya	Tidak	Tidak tahu/tidak berlaku	Keterangan dan sumber bila ada
Integritas Akademik				
• Naskah pernah diterbitkan di tempat lain				
• Naskah mengikuti etika dan kaidah penulisan anti-plagiarisme ¹	X			
• Terdapat tanda-tanda konflik kepentingan (contoh: skripsi mahasiswa namun pembimbing sebagai penulis pertama, sponsor menentukan hasil)				
• Untuk naskah penelitian, etika penelitian sudah terpenuhi (menyebutkan surat lolos kaji etik)				
• Terdapat tanda-tanda fabrikasi, falsifikasi, penghilangan hal penting, atau kesalahan serius lain secara akademik/penelitian (<i>academic/research misconduct</i>) ²				

¹ Lihat: <https://www.indiana.edu/~academy/firstPrinciples/index.html>

² Lihat: <https://www.monash.edu/rlo/research-writing-assignments/referencing-and-academic-integrity/academic-integrity>

[Halaman untuk Redaksi dan Penulis]

Daftar centang (*checklist*) untuk pengulas (*reviewer*) – Bagian 2

Poin (beri tanda X sepengetahuan Anda):	Ya	Tidak	Tidak tahu	Keterangan
Kaidah ilmiah				
• Metode dan rancangan naskah/penelitian sesuai dengan tujuan				Hanya merupakan tulisan Tinjauan Pustaka
• Data/informasi/acuan terpercaya dan akurat (menggunakan metode standar)				
• Penentuan jumlah pengambilan sampel, uji statistik yang dilakukan dan cara pemilihan rujukan sesuai kaidah ilmiah				
• Kesimpulan sahih (<i>valid</i>)				
Kontribusi keilmuan				
• Sesuai keilmuan terkini (<i>up-to-date</i>)				
• Memiliki nilai kebaruan (<i>novelty</i>)				
• Menyampaikan pengetahuan yang bermanfaat dan perlu disebarluaskan	X			
Sistematika penulisan				
• Format sesuai naskah ilmiah				
• Bahasa baku sesuai naskah ilmiah dengan istilah ilmiah yang sesuai				
• Kalimat dan alur pemikiran jelas	X			
• Penulisan rujukan dan daftar pustaka tepat				

Tambahan alasan/dasar pemikiran rekomendasi:

Artikel ini menarik dan dapat dimuat, namun perlu dilakukan:

1. Diubah menjadi Tinjauan Pustaka
2. Pembaruan sumber yang sudah lebih dari 10 tahun (kecuali PPDGJ III)
3. Penulisan rujukan harus sesuai:

Lihat: <https://www.indiana.edu/~academy/firstPrinciples/index.html> (sebaiknya penulis mendapatkan sertifikat anti-plagiarisme)

Lihat: <https://www.monash.edu/rlo/research-writing-assignments/referencing-and-academic-integrity/academic-integrity>

4. Semua singkatan perlu dijabarkan sebelumnya, lalu diikuti singkatan dalam tanda kurung.
Contoh: *Human Leukocyte Antigen* (HLA)

5. Alur bagian “Mengetahui hipersomnia dan jenisnya” kurang jelas - lebih baik sebagian digabung dengan pendahuluan, sebagian lain masuk ke bagian-bagian lainnya (narkolepsi, dst.)

6. Hipersomnia idiopatik diletakkan setelah yang lainnya (yang lain disingkirkan dulu)

7. Cek untuk salah ketik contoh: perilaku

[Halaman untuk Redaksi dan Penulis]

Email address	susana.sudrajat@ukrida.ac.id
Judul Naskah	Larva Ikan Zebra (Danio Rerio) sebagai model hewan untuk uji toksisitas
Penulis Korespondensi	Susana E Sudradjat
Alamat Email Korespondensi	susana.sudrajat@ukrida.ac.id
Unggah Artikel Revisi Anda (Nama File: Penulis Utama diikuti dengan kata Revisi)	File 1https://drive.google.com/open?id=1MRQF0fAIRS4f67m2S2QeMm42NeV70bw5

This PDF is generated by the trial version of [Google Forms Email](#) add-on.